

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE MEDICINA



OBTENCION DE LA ECUACION DE VELOCIDAD  
DE LA DESCOMPOSICION DE PEROXISOMICINA  
A1 EN PRESENCIA DE ISOPEROXISOMICINA A1

Por  
M.C. AMADOR OSORIO PEREZ

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

Abril, 2001

TD  
QH603  
.P47  
O8  
c.1





1080092883

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE MEDICINA



OBTENCION DE LA ECUACION DE VELOCIDAD  
DE LA DESCOMPOSICION DE PEROXISOMICINA  
A1 EN PRESENCIA DE ISOPEROXISOMICINA A1

Por

M.C. AMADOR OSORIO PEREZ

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

Abril, 2001

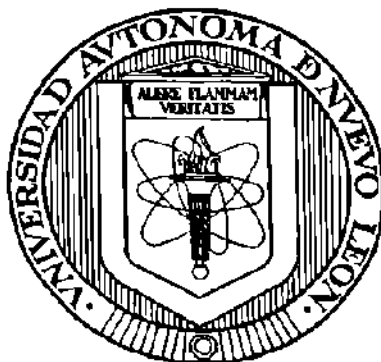
T D  
HG03

08



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE MEDICINA**



**OBTENCIÓN DE LA ECUACIÓN DE VELOCIDAD DE LA  
DESCOMPOSICIÓN DE PEROXISOMICINA A1 EN  
PRESENCIA DE ISOPEROXISOMICINA A1**

**Por**

**M. C. AMADOR OSORIO PÉREZ**

**Como requisito parcial para obtener el Grado de  
DOCTOR EN CIENCIAS con Especialidad en Química Biomédica**

**Abril, 2001**

*"El hombre no aprenderá nunca nada  
a menos que proceda de lo conocido a lo desconocido"*

**Claude Bernard**

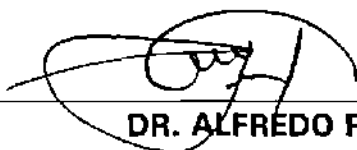
**OBTENCION DE LA ECUACION DE VELOCIDAD DE LA DESCOMPOSICION DE  
PEROXISOMICINA A<sub>1</sub> EN PRESENCIA DE ISOPEROXISOMICINA A<sub>1</sub>**

**Aprobación de la Tesis:**



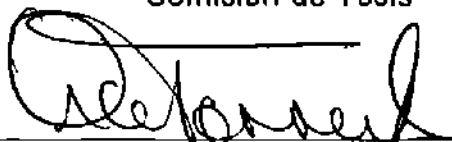
**DRA. NOEMI WAKSMAN DE TORRES**

Director de Tesis



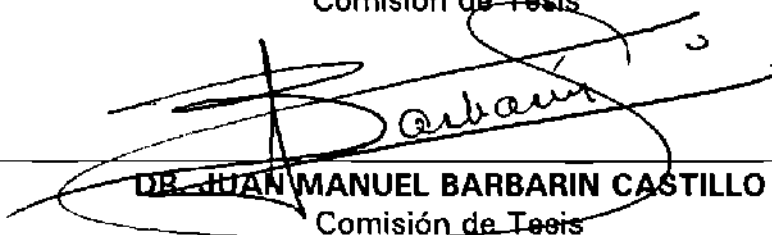
**DR. ALFREDO PIÑEYRO LOPEZ**

Comisión de Tesis



**DR. OSCAR TORRES ALANIS**

Comisión de Tesis



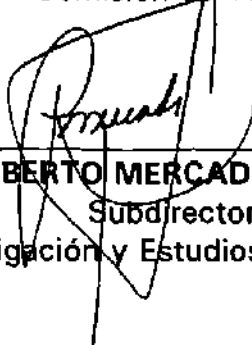
**DR. JUAN MANUEL BARBARIN CASTILLO**

Comisión de Tesis



**DRA. ROSALBA RAMIREZ DURON**

Comisión de Tesis



**DR. ROBERTO MERCADO LONGORIA**

Subdirector

de Investigación y Estudios de Posgrado



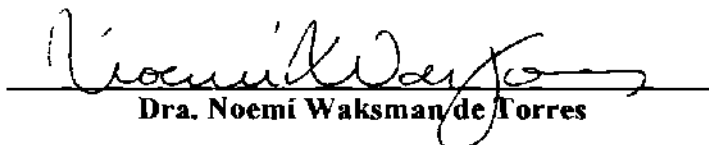
**“OBTENCIÓN DE LA ECUACIÓN DE VELOCIDAD DE LA  
DESCOMPOSICIÓN DE PEROXISOMICINA A1 EN  
PRESENCIA DE ISOPEROXISOMICINA A1”**

**Presentado por**

**M. C. AMADOR OSORIO PÉREZ**

**Este trabajo se realizó en el Departamento de Farmacología y  
Toxicología de la Facultad de Medicina de la Universidad  
Autónoma de Nuevo León, bajo la asesoría de la Dra. Noemí  
Waksman de Torres**

**Firma**

  
**Dra. Noemí Waksman de Torres**

## AGRADECIMIENTOS

A Dios

Porque siempre hay mucho porque agradecer

A mis padres: Segundo Osorio (Q.E.P.D.) y Agustina Pérez (Q.E.P.D.)  
Su recuerdo perdurará por siempre

Adriana Ayala Carrejo  
El amor de mi vida

Adriana Delfina y Heidi Bohr  
La luz que ilumina mi vida

Agradezco a mis hermanos: Alberto, Francisca, Paola, María, Delfina,  
Sabino, José Juan, Rosario, Hilario, Diego, Guadalupe  
y sus respectivas familias.

José Antonio, Griselda, Yat Sen, Saho Alexis, Rosario Irene, Kisil Anayanci, Agustín,  
Ceferino, Ricardo, Gustavo, Inés, Ana, Indira, Glenda, Liliana, "Chichi", Paulino,  
Claudia  
Por los lazos que unen

A la Dra. Noemí Waksman de Torres  
De quien me considero afortunado de ser su alumno

A la Dra. Rosalba Ramírez Durón  
Su amistad y apoyo son invaluable para mí

Al Dr. Alfredo Piñeyro López  
Porque su apoyo, siempre desinteresado, me hizo sentir parte del  
Departamento de Farmacología, al cual nunca olvidare

Al Dr. Juan Manuel Barbarín Castillo  
Por su amistad y enseñanzas que siempre perdurarán

Al Dr. Oscar Torres Alanís  
Por sus recomendaciones y sugerencias

A la M. C. María de la Luz Salazar Cavazos  
No sé que hubiera sucedido sin su amistad, apoyo y enseñanzas

Al M. C. Ruben Luján  
Sus sugerencias y apoyo constituyeron un soporte importante en mis estudios

A la Dra. Herminia Martínez Rodríguez  
Por su apoyo y por la amistad que siempre me brindó

A la M. C. Verónica Rivas Galindo  
Porque su apoyo y amistad siempre sincera no tienen igual

**A la Universidad Autónoma de Sinaloa, a la Escuela de Biología de la Universidad Autónoma de Sinaloa y al SUNTUAS-Académicos**

**Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología**

**A la Universidad Autónoma de Nuevo León, a la Facultad de Medicina y al Departamento de Farmacología y Toxicología**

**A la Dra. Magdalena Gómez y al Dr. Rigoberto Vargas Zapata**

**M. C. Adolfo Caballero Quintero, Dra. Teresa Zanata,  
M. C. Yarelli Colunga y M. C. Ricardo Salazar Aranda**

**M. C. Luis Alejandro Pérez López y Q. C. B. Adrián Fernández,  
M. C. Agustina de los Santos Vega**

**Q. B. P. Lucía Ceniceros, T. L. Ivonne Carrera**

**Lic. José Cabriales, Q. C. B. Marco Antonio Bernal**

**A la Dra. Mirthala Moreno, M. C. Lidia Runia Naccha, Dr. Lorenzo Heyer, Dr. Karim Askar Acuña, Q. C. B. Juana María Castillo, M. C. Norma Cavazos, M. C. Elsa Ramírez, M. C. Aurora Garza a todos los maestros del Departamento de Química Analítica**

**Dr. Marco Antonio Flores Diego y M. C. Martha Salazar**

**Biol. Guillermo Flores Briseño**

**M. V. Z. Luis Vázquez, Dr. Juan Manuel Solís, Q. C. B. Juan Pedro Castellón, Ing. Enrique Alcorta, M. C. Luis Lauro Escamilla, M. C. Octavio Díaz, Dr. Víctor Tamez, Dr. Martín Canizales, René García**

**M. C. Efraín Gómez Agüero y familia, M. C. Hipólito Castillo Ureta y Familia,**

**M. C. Rosario Torres, Dr. Everardo Tamez, Dr. Everardo Piñeyro  
y a la Lic. Margarita Martínez**

**Blanca González, Norma Sánchez**

**Jaime Castañeda, Pedro Briones, Javier Álvarez, Carlos Zúñiga, Antonio Rodríguez,  
Roberto Villarreal, Isabel Flores, Daniela García  
y a todos los trabajadores del Departamento de Farmacología  
y del Departamento de Química Analítica**

**A todos los maestros, trabajadores y administrativos  
de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L**

Dedicada

A

Sra. Agustina Pérez  
(Q.E.P.D.)

Del más desobediente de tus hijos  
pero el que más te amó

Dra. Noemí Waksman de Torres

Pilar indiscutible de la enseñanza de la Química  
en la Universidad Autónoma de Nuevo León  
y de quién me siento orgulloso de ser su alumno

Adriana Ayala Carrejo

Amor como el nuestro no hay dos  
en la vida

## TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Generalidades	1
1.2 Métodos Analíticos	5
1.3 Degradación de PA1 y Uso de Antioxidantes	7
1.4 Estabilidad de Fármacos	9
1.5 Definición del Problema	14
Hipótesis	17
Objetivo General	18
Objetivos Específicos	19
2. MÉTODOS	20
2.1 Equipo, Material y Reactivos	20
2.2 Obtención de Peroxisomicina A1 e Isoperoxisomicina A1 Puros	21
2.2.1 Extracción, Fraccionamiento y Purificación	21
2.3 Determinación de las Condiciones Apropriadas para Realizar la Cuantificación de PA1 en Presencia de Cantidades Pequeñas de Isoperoxisomicina A1	23
2.4 Obtención de la Ecuación de Velocidad de la Degradación de Dos Lotes de PA1 con Diferente Contenido de Isoperoxisomicina A1 cada Uno, en Estado Sólido, a $-22^{\circ}\text{C}$ y $-4^{\circ}\text{C}$ , en Oscuridad bajo Condiciones Aeróbicas	24
2.4.1 Determinación de la Estabilidad de Estándares de PA1	24
2.4.2 Estudio de la Cinética de Degradación Acelerada a $25^{\circ}\text{C}$ , $30^{\circ}\text{C}$ y $50^{\circ}\text{C}$	26
2.4.3 Estudio de la Cinética de Descomposición de Peroxisomicina A1 en Estado Sólido	27
2.5 Determinación del Efecto de la Adición de IsopA1, Ácido Ascórbico y Bisulfito de Sodio sobre la Velocidad de Degradación de un Lote	



de PA1 en: Metanol, Buffer de Fosfatos pH 7,4, en Suero y en Acetato de Etilo, a - 4°C, 25°C y 37°C en Oscuridad . . . . .	28
<b>3. RESULTADOS . . . . .</b>	<b>31</b>
3 . 1 Obtención de Peroxisomicina A1 e Isoperoxisomicina A1 Puras . . . . .	31
3 . 2 Establecimiento de las Condiciones Apropriadas para Realizar la Cuantificación de Peroxisomicina A1 en Presencia de Cantidades Pequeñas de Isoperoxisomicina A1 . . . . .	39
3 . 3 Obtención de la Ecuación de Velocidad de la Degradación de Dos Lotes de Peroxisomicina A1 con Diferente Contenido de Isoperoxisomicina A1 cada Uno, en Estado Sólido, a - 22°C y - 4°C en Oscuridad . . . . .	44
3 . 3 . 1 Estudio de Estabilidad de Estándares . . . . .	44
3 . 3 . 2 Degradación Acelerada . . . . .	46
3 . 3 . 3 Obtención de la Ecuación de Velocidad de la Degradación de Dos Lotes de Peroxisomicina A1 con Diferente Contenido de Isoperoxisomicina A1 cada Uno, en Estado Sólido, a - 22°C y - 4°C en Oscuridad . . . . .	52
3 . 4 Determinación del Efecto de la Adición de Isoperoxisomicina A1, Ácido Ascórbico y Bisulfito de Sodio, sobre la Velocidad de Degradación de Un Lote de Peroxisomicina A1 en: Metanol, Buffer de Fosfatos de pH 7,4, Suero y en Acetato de Etilo a - 4°C, 25°C y 37°C en Oscuridad a Condiciones Aeróbicas . . . . .	57
3 . 4 . 1 Degradación de Peroxisomicina A1 en Metanol . . . . .	58
3 . 4 . 1 . 1 Degradación de PA1 A - 4°C . . . . .	58
3 . 4 . 1 . 2 Degradación de PA1 A 25°C . . . . .	64
3 . 4 . 1 . 3 Degradación de PA1 A 37°C . . . . .	70
3 . 4 . 2 Degradación de Peroxisomicina A1 en Buffer de Fosfatos pH 7,4 . . . . .	76
3 . 4 . 2 . 1 Degradación de PA1 a - 4°C . . . . .	76
3 . 4 . 2 . 2 Degradación de PA1 a 25°C . . . . .	82
3 . 4 . 2 . 3 Degradación de PA1 a 37°C . . . . .	88
3 . 4 . 3 Degradación de Peroxisomicina A1 en Suero . . . . .	94
3 . 4 . 3 . 1 Degradación de PA1 a - 4°C . . . . .	94
3 . 4 . 3 . 2 Degradación de PA1 a 25°C . . . . .	100
3 . 4 . 3 . 3 Degradación de PA1 a 37°C . . . . .	106
3 . 4 . 4 Degradación de PA1 en Acetato de Etilo . . . . .	112
3 . 4 . 4 . 1 Degradación de PA1 a - 4°C . . . . .	112
3 . 4 . 4 . 2 Degradación de PA1 a 25°C . . . . .	117
3 . 4 . 4 . 3 Degradación de PA1 a 37°C . . . . .	122

3 . 4 . 5	Tablas con los Valores de las Constantes de Velocidad de la Degradación de PA1 en Metanol, Buffer de Fosfatos pH 7,4, Suero y Acetato de Etilo a - 4°C, 25°C y 37°C	127
4 .	DISCUSIÓN	132
	CONCLUSIONES	156
	REFERENCIAS	157
	RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO	163

## LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1 . Resultados de Toxicidad de Peroxisomicina A1 de Compuestos Antineoplásicos en Distintas Líneas Celulares . . . . .	2
2 . Porcentaje de Toxinas en Diferentes Especies del Género <i>Karwinskia</i> que Existen en el País . . . . .	4
3 . Tiempo de Retención de Antracenonas Diméricas de Extractos de <i>K. parvifolia</i> . . . . .	6
4 . Tiempo de Retención de PA1, PA2, PA3, IsopA1 e IsopA2 (Método Optimizado) . . . . .	7
5 . Tiempo de Vida Media de PA1 en Relación al pH, Temperatura y Luz . . . . .	8
6 . Cantidad de PA1 Obtenida con y sin Ácido Ascórbico, Utilizando Distintos Solventes a Partir de 1 K de Semilla de <i>K. parvifolia</i> . . . . .	10
7 . Diseño Experimental para la Elaboración por CLAR de la Curva de Calibración Inicial de PA1 . . . . .	25
8 . Diseño Experimental para el Estudio del Efecto de IsopA1 en el Proceso de Degradación de PA1 . . . . .	27
9 . Cantidad de las Soluciones Utilizadas para el Estudio de la Degradación de PA1 en Solución . . . . .	29
10 . Tiempo de Vida Media de PA1 a pH 6,0 . . . . .	30
11 . Contenido de IsopA1 en Lotes de PA1 Cuantificada por <sup>1</sup> HRMN . . . . .	38
12 . Condiciones de Elución para la Separación de PA1 en Presencia de una Proporción del 5 % de IsopA1 . . . . .	40
13 . Linealidad de la Respuesta: 1-20 ng/μL . . . . .	43
14 . Linealidad de la Respuesta: 20-100 ng/μL . . . . .	43
15 . Datos de la Estabilidad de Estándares de PA1 . . . . .	44
16 . Degradación de PA1 Sólido a 25°C . . . . .	47
17 . Degradación de PA1 Sólido a 30°C . . . . .	47
18 . Degradación de PA1 Sólido a 50°C . . . . .	48
19 . Ecuaciones de Regresión de Degradación Acelerada de PA1 (Cinéticas de Primer Orden) . . . . .	50
20 . Vida Media (t1/2) a Diferentes Temperaturas . . . . .	50
21 . Extrapolación de la Vida Media de PA1 A - 22°C y - 4°C . . . . .	51
22 . Datos de las Cinéticas de Degradación de PA1 Sólida: ng/μL . . . . .	53
23 . Datos de las Cinéticas de Degradación de PA1 Sólida: ln ng/μL . . . . .	53
24 . Constantes de Velocidad del Estudio de Degradación de PA1 en Estado Sólido . . . . .	56

25 .	Datos del Estudio de Degradación de PA1 en Metanol a - 4°C: ng/μL . . . . .	59
26 .	Datos del Estudio de Degradación de PA1 en Metanol a - 4°C: ln ng/μL . . . . .	60
27 .	Datos del Estudio de Degradación de PA1 en Metanol a 25°C: ng/μL . . . . .	65
28 .	Datos del Estudio de Degradación de PA1 en Metanol a 25°C: ln ng/μL . . . . .	66
29 .	Datos del Estudio de Degradación de PA1 en Metanol a 37°C: ng/μL . . . . .	71
30 .	Datos del Estudio de Degradación de PA1 en Metanol a 37°C: ln ng/μL . . . . .	72
31 .	Datos del Estudio de Degradación de PA1 en Buffer pH 7,4 a - 4°C: ng/μL . . . . .	77
32 .	Datos del Estudio de Degradación de PA1 en Buffer pH 7,4 a - 4°C: ln ng/μL . . . . .	78
33 .	Datos del Estudio de Degradación de PA1 en Buffer pH 7,4 a 25°C: ng/μL . . . . .	83
34 .	Datos del Estudio de Degradación de PA1 en Buffer pH 7,4 a 25°C: ln ng/μL . . . . .	84
35 .	Datos del Estudio de Degradación de PA1 en Buffer pH 7,4 a 37°C: ng/μL . . . . .	89
36 .	Datos del Estudio de Degradación de PA1 en Buffer pH 7,4 a 37°C: ln ng/μL . . . . .	90
37 .	Datos del Estudio de Degradación de PA1 en Suero a - 4°C: ng/μL . . . . .	95
38 .	Datos del Estudio de Degradación de PA1 en Suero a - 4°C: ln ng/μL . . . . .	96
39 .	Datos del Estudio de Degradación de PA1 en Suero a 25°C: ng/μL . . . . .	101
40 .	Datos del Estudio de Degradación de PA1 en Suero a 25°C: ln ng/μL . . . . .	102
41 .	Datos del Estudio de Degradación de PA1 en Suero a 37°C: ng/μL . . . . .	107
42 .	Datos del Estudio de Degradación de PA1 en Suero a 37°C: ln ng/μL . . . . .	108
43 .	Datos del Estudio de Degradación de PA1 en Acetato de Etilo a - 4°C: ng/μL . . . . .	113
44 .	Datos del Estudio de Degradación de PA1 en Acetato de Etilo a - 4°C: ln ng/μL . . . . .	114
45 .	Datos del Estudio de Degradación de PA1 en Acetato de Etilo a 25°C: ng/μL . . . . .	118
46 .	Datos del Estudio de Degradación de PA1 en Acetato de Etilo a 25°C: ln ng/μL . . . . .	119
47 .	Datos del Estudio de Degradación de PA1 en Acetato de Etilo a 37°C: ng/μL . . . . .	123

48 .	Datos del Estudio de Degradación de PA1 en Acetato de Etilo a 37°C: ln ng/ $\mu$ L . . . . .	124
49 .	Constantes de Velocidad de la Degradación de PA1 en Metanol . . . . .	128
50 .	Constantes de Velocidad de la Degradación de PA1 Buffer de Fosfatos pH 7,4 . . . . .	129
51 .	Constantes de Velocidad de la Degradación de PA1 en Suero . . . . .	130
52 .	Constantes de Velocidad de la Degradación de PA1 en Acetato de Etilo . . . . .	131
53 .	Análisis de Varianza de las Constantes de Velocidad de la Degradación de PA1 Sólido . . . . .	137
54 .	Comparación de los Promedios de las Constantes de Velocidad de la Degradación de PA1 Sólido, Utilizando t Student . . . . .	138
55 .	Periodos de Caducidad de PA1 Sólido . . . . .	139
56 .	Análisis de Varianza de la Degradación de PA1 en Solución . . . . .	142
57 .	Valores t90% de la Degradación de PA1 en Buffer de Fosfatos pH 7,4 . . . . .	151
58 .	Valores t90% de la Degradación de PA1 en Suero . . . . .	152
59 .	Periodo de Caducidad de PA1 en Buffer de Fosfatos . . . . .	152
60 .	Periodo de Caducidad de PA1 en Suero . . . . .	153
61 .	Estabilidad de Compuestos Antineoplásicos Comerciales . . . . .	153
62 .	Período de Caducidad de PA1 en Solución Buffer y en Suero . . . . .	154



## LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1.	Estructura de Peroxisomicina A1 . . . . .	1
2.	Estructura de Isoperoxisomicina A1 . . . . .	15
3.	Procedimiento para la Obtención de Peroxisomicina A1 e Isoperoxisomicina A1 . . . . .	22
4.	Carta Control de Schewart . . . . .	25
5.	Cromatogramas de la Separación Preparativa de PA1 en Columna C8 (100x8 mm), Eluente: Metanol-Agua (50-50), Flujo: 4 mL/min . . . . .	32
6.	Cromatogramas de la Separación Preparativa de PA1 en Columna C8 (100x8 mm), Eluente: Metanol-Agua (55:45), Flujo: 4 mL/min . . . . .	33
7.	Cromatogramas de la Separación Preparativa de PA1 en Columna C18 (100x40 mm), Eluente: Metanol-Agua (55-45), Flujo: 60 mL/min . . . . .	34
8.	Cromatogramas de la Separación Preparativa de PA1 en Columna C8 (100x8 mm), Eluente: Metanol-Agua (55-45)-Acetonitrilo 1 %, Flujo: 4 mL/min . . . . .	35
9.	Cromatogramas de la Separación Preparativa de PA1 en Columna C18 (100X40 mm), Eluente: Metanol-Agua (55-45), Flujo 60 mL/min . . . . .	36
10.	Espectro de 1HRMN de Peroxisomicina A1 e Isoperoxisomicina A1 . . . . .	37
11.	Cromatograma de la Separación Analítica de Peroxisomicina A1 e Isoperoxisomicina A1 . . . . .	40
12.	Cromatogramas del Estudio de Repetibilidad de la Separación de Peroxisomicina A1 e Isoperoxisomicina A1 . . . . .	41
13.	Cromatogramas de la Linealidad de la Respuesta de Peroxisomicina A1 . . . . .	42
14.	Gráfica de Control de Schewart . . . . .	45
15.	Cinética de Degradación Acelerada de PA1 a 25°C . . . . .	48
16.	Cinética de Degradación Acelerada de PA1 a 30°C . . . . .	49
17.	Cinética de Degradación Acelerada de PA1 a 25°C . . . . .	49
18.	Gráfica de Arrhenius . . . . .	51
19.	Gráfica de la Degradación de PA1 sólido, Experimento A . . . . .	54
20.	Gráfica de la Degradación de PA1 sólido, Experimento B . . . . .	54
21.	Gráfica de la Degradación de PA1 sólido, Experimento C . . . . .	55
22.	Gráfica de la Degradación de PA1 sólido, Experimento D . . . . .	55

23 .	Cinéticas de la Degradación de PA1 en Metanol – 4°C, Experimento A	61
24 .	Cinéticas de la Degradación de PA1 en Metanol – 4°C, Experimento B	61
25 .	Cinéticas de la Degradación de PA1 en Metanol – 4°C, Experimento C	62
26 .	Cinéticas de la Degradación de PA1 en Metanol – 4°C, Experimento D	62
27 .	Cinéticas de la Degradación de PA1 en Metanol – 4°C, Experimento E	63
28 .	Cinéticas de la Degradación de PA1 en Metanol – 4°C, Experimento F	63
29 .	Cinéticas de la Degradación de PA1 en Metanol 25°C, Experimento A	67
30 .	Cinéticas de la Degradación de PA1 en Metanol 25°C, Experimento B	67
31 .	Cinéticas de la Degradación de PA1 en Metanol 25°C, Experimento C	68
32 .	Cinéticas de la Degradación de PA1 en Metanol 25°C, Experimento D	68
33 .	Cinéticas de la Degradación de PA1 en Metanol 25°C, Experimento E	69
34 .	Cinéticas de la Degradación de PA1 en Metanol 25°C, Experimento F	69
35 .	Cinéticas de la Degradación de PA1 en Metanol 37°C, Experimento A	73
36 .	Cinéticas de la Degradación de PA1 en Metanol 37°C, Experimento B	73
37 .	Cinéticas de la Degradación de PA1 en Metanol 37°C, Experimento C	74
38 .	Cinéticas de la Degradación de PA1 en Metanol 37°C, Experimento D	74
39 .	Cinéticas de la Degradación de PA1 en Metanol 37°C, Experimento E	75
40 .	Cinéticas de la Degradación de PA1 en Metanol 37°C, Experimento F	75
41 .	Cinéticas de la Degradación de PA1 en Buffer pH 7,4 a – 4°C, Experimento A	79
42 .	Cinéticas de la Degradación de PA1 en Buffer pH 7,4 a – 4°C, Experimento B	79
43 .	Cinéticas de la Degradación de PA1 en Buffer pH 7,4 a – 4°C, Experimento C	80
44 .	Cinéticas de la Degradación de PA1 en Buffer pH 7,4 a – 4°C, Experimento D	80
45 .	Cinéticas de la Degradación de PA1 en Buffer pH 7,4 a – 4°C, Experimento E	81

46.	Cinéticas de la Degradación de PA1 en Buffer pH 7,4 a - 4°C, Experimento F	81
47.	Cinéticas de la Degradación de PA1 en Buffer pH 7,4 a 25°C, Experimento A	85
48.	Cinéticas de la Degradación de PA1 en Buffer pH 7,4 a 25°C, Experimento B	85
49.	Cinéticas de la Degradación de PA1 en Buffer pH 7,4 a 25°C, Experimento C	86
50.	Cinéticas de la Degradación de PA1 en Buffer pH 7,4 a 25°C, Experimento D	86
51.	Cinéticas de la Degradación de PA1 en Buffer pH 7,4 a 25°C, Experimento E	87
52.	Cinéticas de la Degradación de PA1 en Buffer pH 7,4 a 25°C, Experimento F	87
53.	Cinéticas de la Degradación de PA1 en Buffer pH 7,4 a 37°C, Experimento A	91
54.	Cinéticas de la Degradación de PA1 en Buffer pH 7,4 a 37°C, Experimento B	91
55.	Cinéticas de la Degradación de PA1 en Buffer pH 7,4 a 37°C, Experimento C	92
56.	Cinéticas de la Degradación de PA1 en Buffer pH 7,4 a 37°C, Experimento D	92
57.	Cinéticas de la Degradación de PA1 en Buffer pH 7,4 a 37°C, Experimento E	93
58.	Cinéticas de la Degradación de PA1 en Buffer pH 7,4 a 37°C, Experimento F	93
59.	Cinéticas de la Degradación de PA1 en Suero a - 4°C, Experimento A	97
60.	Cinéticas de la Degradación de PA1 en Suero a - 4°C, Experimento B	97
61.	Cinéticas de la Degradación de PA1 en Suero a - 4°C, Experimento C	98
62.	Cinéticas de la Degradación de PA1 en Suero a - 4°C, Experimento D	98
63.	Cinéticas de la Degradación de PA1 en Suero a - 4°C, Experimento E	99
64.	Cinéticas de la Degradación de PA1 en Suero a - 4°C, Experimento F	99
65.	Cinéticas de la Degradación de PA1 en Suero a 25°C, Experimento A	103
66.	Cinéticas de la Degradación de PA1 en Suero a 25°C, Experimento B	103
67.	Cinéticas de la Degradación de PA1 en Suero a 25°C, Experimento C	104
68.	Cinéticas de la Degradación de PA1 en Suero a 25°C, Experimento D	104

69 .	Cinéticas de la Degradación de PA1 en Suero a 25°C, Experimento E . . . . .	105
70 .	Cinéticas de la Degradación de PA1 en Suero a 25°C, Experimento F . . . . .	105
71 .	Cinéticas de la Degradación de PA1 en Suero a 37°C, Experimento A . . . . .	109
72 .	Cinéticas de la Degradación de PA1 en Suero a 37°C, Experimento B . . . . .	109
73 .	Cinéticas de la Degradación de PA1 en Suero a 37°C, Experimento C . . . . .	110
74 .	Cinéticas de la Degradación de PA1 en Suero a 37°C, Experimento D . . . . .	110
75 .	Cinéticas de la Degradación de PA1 en Suero a 37°C, Experimento E . . . . .	111
76 .	Cinéticas de la Degradación de PA1 en Suero a 37°C, Experimento F . . . . .	111
77 .	Cinéticas de la Degradación de PA1 en Acetato de Etilo a - 4°C, Experimento A . . . . .	115
78 .	Cinéticas de la Degradación de PA1 en Acetato de Etilo a - 4°C, Experimento B . . . . .	115
79 .	Cinéticas de la Degradación de PA1 en Acetato de Etilo a - 4°C, Experimento C . . . . .	116
80 .	Cinéticas de la Degradación de PA1 en Acetato de Etilo a - 4°C, Experimento D . . . . .	116
81 .	Cinéticas de la Degradación de PA1 en Acetato de Etilo a 25°C, Experimento A . . . . .	120
82 .	Cinéticas de la Degradación de PA1 en Acetato de Etilo a 25°C, Experimento B . . . . .	120
83 .	Cinéticas de la Degradación de PA1 en Acetato de Etilo a 25°C, Experimento C . . . . .	121
84 .	Cinéticas de la Degradación de PA1 en Acetato de Etilo a 25°C, Experimento D . . . . .	121
85 .	Cinéticas de la Degradación de PA1 en Acetato de Etilo a 37°C, Experimento A . . . . .	125
86 .	Cinéticas de la Degradación de PA1 en Acetato de Etilo a 37°C, Experimento B . . . . .	125
87 .	Cinéticas de la Degradación de PA1 en Acetato de Etilo a 37°C, Experimento C . . . . .	126
88 .	Cinéticas de la Degradación de PA1 en Acetato de Etilo a 37°C, Experimento D . . . . .	126
89 .	Comparación de Promedios de las Constantes de Velocidad entre los Resultados de los Experimentos A y B, a - 4°C . . . . .	143
90 .	Comparación de Promedios de las Constantes de Velocidad entre los Resultados de los Experimentos A y B, a 25°C . . . . .	143
91 .	Comparación de Promedios de las Constantes de Velocidad entre los Resultados de los Experimentos A y B, a 37°C . . . . .	144

92 .	Comparación de Promedios de las Constantes de Velocidad entre los Resultados de los Experimentos A y D, a $-4^{\circ}\text{C}$ . . . . .	145
93 .	Comparación de Promedios de las Constantes de Velocidad entre los Resultados de los Experimentos A y D, a $25^{\circ}\text{C}$ . . . . .	145
94 .	Comparación de Promedios de las Constantes de Velocidad entre los Resultados de los Experimentos A y D, a $37^{\circ}\text{C}$ . . . . .	146
95 .	Comparación de Promedios de las Constantes de Velocidad entre los Resultados de los Experimentos A y F, a $-4^{\circ}\text{C}$ . . . . .	147
96 .	Comparación de Promedios de las Constantes de Velocidad entre los Resultados de los Experimentos A y F, a $25^{\circ}\text{C}$ . . . . .	147
97 .	Comparación de Promedios de las Constantes de Velocidad entre los Resultados de los Experimentos A y F, a $37^{\circ}\text{C}$ . . . . .	148
98 .	Comparación de Constantes de Velocidad de la Degradación de PA1 en Metanol a $-4^{\circ}\text{C}$ , $25^{\circ}\text{C}$ y $37^{\circ}\text{C}$ . . . . .	149
99 .	Comparación de Constantes de Velocidad de la Degradación de PA1 a $25^{\circ}\text{C}$ en Metanol, Buffer, Suero y A cetato de Etilo . . . . .	150
100 .	Gráfica de las Constantes de Velocidad de la Degradación de un Lote de PA1 con 0,8% de Isoperoxisomicina A1 . . . . .	155



## NOMENCLATURA

PA1	Peroxisomicina A1
CT50	Concentración tóxica media
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno
IsopA1	Isoperoxisomicina A1
IsopA2	Isoperoxisomicina A1
CLAR	Cromatógrafo de líquidos de alta resolución
PA2	Peroxisomicina A2
PA3	Peroxisomicina A3
mAU	miliabsorbancia
X'	Promedio
s	Desviación estándar
DMSO	Dimetilsulfóxido
<sup>1</sup> HMRN	Resonancia magnética nuclear de hidrógeno
ln	Logaritmo natural
K	Temperatura absoluta en Kelvin
t <sub>1/2</sub>	Vida media
t <sub>90%</sub>	Concentración residual 90%
ng/μL	nanogramos/microlitros
k	Constante de velocidad
g. l.	grados de libertad

## RESUMEN

AMADOR OSORIO PÉREZ

Fecha de graduación: Abril de 2001

Universidad Autónoma de Nuevo León  
Facultad de Medicina

Título del estudio

OBTENCIÓN DE LA ECUACIÓN DE VELOCIDAD DE LA DESCOMPOSICIÓN DE PA1 EN PRESENCIA DE ISOPA1

Número de páginas: 162

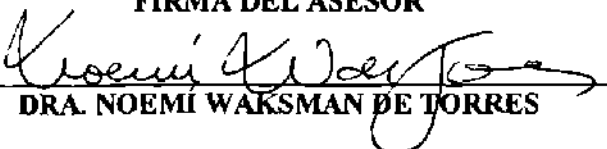
Candidato para el grado de Doctor en Ciencias con especialidad en Química Biomédica

Área de estudio: Química Biomédica

**Propósito y Método de Estudio:** La descomposición que Peroxisomicina A1 (PA1) sufre durante su almacenado es un fenómeno que complica su posible uso como agente antineoplásico. Las buenas prácticas de manufactura de fármacos indican que en la obtención de un fármaco se debe adoptar un estricto programa de control de calidad mediante el cual se pueda determinar la vida útil del fármaco. El desarrollo de los métodos de obtención y determinación de PA1 permitió observar la presencia de isoperoxisomicina A1 (isopA1), un isómero de posición de PA1 proveniente de los mismos extractos de donde se obtiene PA1, en los lotes de este compuesto. En el presente trabajo se estudió el efecto de ese contaminante en el proceso de descomposición de PA1, tanto en estado sólido como en solución. En sólido la descomposición de PA1 se estudió utilizando dos lotes con diferente contenido del contaminante, a  $-22^{\circ}\text{C}$  y  $-4^{\circ}\text{C}$ . En solución la descomposición de PA1 se estudió en cuatro solventes: metanol, buffer de fosfatos pH 7,4, suero y acetato de etilo, a  $-4^{\circ}\text{C}$ ,  $25^{\circ}\text{C}$  y  $37^{\circ}\text{C}$ . Las constantes de velocidad del modelo cinético obtenido en cada caso, se compararon utilizando análisis de varianza y t student. De la misma manera se estudió en solución el efecto de dos antioxidantes comúnmente usados en la conservación de fármacos: ácido ascórbico y bisulfito de sodio.

**Conclusiones y contribuciones:** Los resultados de los estudios cinéticos de la descomposición de PA1 en estado sólido mostraron que la presencia de isopA1, en una proporción pequeña, con respecto a PA1, no afecta la velocidad de degradación de PA1. De la misma manera los resultados del efecto de isopA1, ácido ascórbico y bisulfito de sodio, también en una proporción pequeña, del estudio de descomposición de PA1 en solución mostraron que esos compuestos no influyen en la velocidad de degradación de PA1. Con este estudio se estableció que la repurificación de los lotes de PA1 no mejorarán el periodo de caducidad de PA1.

FIRMA DEL ASESOR

  
DRA. NOEMÍ WAKSMAN DE TORRES

# CAPÍTULO 1

## INTRODUCCIÓN

### 1.1. Generalidades

Peroxisomicina A1 o PA1, figura 1, originalmente nombrada como T514, es una antracenona dimérica que se obtiene por extracción con solventes semipolares de frutos de plantas pertenecientes al género *Karwinskia* (1).

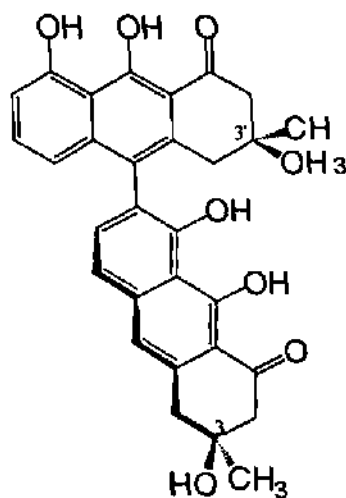


Figura 1. Estructura de Peroxisomicina A1 (PA1),

Mediante un estudio *in vitro* con células normales y neoplásicas se encontró que este compuesto posee actividad citotóxica selectiva; se comparó la citotoxicidad de PA1 con agentes citotóxicos conocidos, utilizando células neoplásicas y normales de hígado, pulmón y colon, encontrándose que PA1 posee toxicidad selectiva en todas las líneas celulares utilizadas (Tabla 1), ya que destruye más fácilmente a las células neoplásicas que a las células normales estudiadas (2).

De esta manera, y debido al potencial uso de PA1 como agente antineoplásico, se

ha consolidado una importante línea de investigación en el Departamento de Farmacología y Toxicología de la Universidad Autónoma de Nuevo León, que ha incluso permitido obtener una patente para su uso en la Comunidad Económica Europea (3), en Estados Unidos de América (4) y en Japón (5).

**TABLA 1**  
**RESULTADO DEL ESTUDIO DE TOXICIDAD DE PA1**  
**CT50 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) OBTENIDO DESPUÉS DE 72 h**

	Vincristina	5Fluoracilo	Doxorrubicina	Epidoxorrubicina	Mitomicina	T 514
PLC/PRF/5	0,023	70,7	0,05	0,10*	1,00	5,0*
Hep 3B	8,000**	50,0	0,40**	0,56**	0,71	7,1*
Hep G2	0,710	100,0	0,40**	0,80**	0,71	7,1*
Chang	0,016	70,7	0,05	0,14	1,00	113,0
ChaGoK-1	0,360	25,0*	0,10*	0,10*	1,00	20,0*
Calu-3	0,360	25,0*	0,20	0,20*	0,71	20,0*
SK-Mes-1	2,000	70,7	0,40**	0,40	1,00	28,3*
NCI-H69	0,360	400,0	0,28	0,28	0,71	10,0
Pulmón	0,500	70,7	0,20	0,40	1,00	160,0
LoVo	0,360	25,0*	0,56	1,13	0,71*	5,0*
Colon	0,720	565,0	0,56	1,13	4,00	160,0

\* Células neoplásicas fueron más sensibles que las células normales.  $p < 0,025$

\*\* Células normales fueron más sensibles que las células neoplásicas.  $P < 0,025$

Actualmente la utilización de PA1 como agente antineoplásico se encuentra en investigación clínica en fase I.

A partir del interés que existe sobre la citotoxicidad selectiva de PA1, se han realizado distintos estudios que van desde: estudios para conocer su mecanismo de acción, aislamiento y caracterización de compuestos antracénicos estructuralmente semejantes a partir de extractos de plantas del género *Karwinskia*, el desarrollo de métodos analíticos y la optimización del proceso de obtención y purificación, entre otros.

El mecanismo de acción de la PA1 no es bien conocido todavía, pero en estudios

sobre su efecto en las levaduras metilotróficas *Hansenula polymorpha* y *Candida boidinii*, se observó que PA1 produce daño sobre los peroxisomas, degradándolos y produciendo la muerte celular (6).

En estudios *in vitro* se demostró que esta antracenona produce inhibición no competitiva, con respecto a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, de la actividad de catalasa de origen buey, perro y ratón (7).

Se ha estudiado también el efecto de dos antracenonas diméricas: PA2 y T544 (compuestos estructuralmente semejantes a PA1) sobre peroxisomas de *Candida boidinii*, y se encontró que estos compuestos producen disminución en la viabilidad, y rompimiento de la membrana peroxisomal de esta levadura. En ese estudio (8) se concluyó que la muerte celular y el daño peroxisomal son eventos independientes.

En un estudio *in situ* efectuado para conocer el efecto de PA1 sobre la actividad de la catalasa en fragmentos de hígado, así como *in vivo* en ratones intoxicados, se encontró que PA1 no inhibe la actividad de la catalasa, por lo que este mismo estudio sugiere que la actividad de esta enzima *in vivo* está protegida contra el efecto inhibitorio de la PA1 por un factor desconocido (9).

Mediante estudios fisicoquímicos (10) realizados en plantas del género *Karwinskia* que existen en México se pudo conocer que *Karwinskia parvifolia* constituye una fuente importante de extracción de PA1, ya que además de tener una mayor cantidad de este compuesto carece de T544 (Tabla 2) que pueda interferir en su extracción y purificación, además de que el contenido de PA1 es poco variable no dependiendo del sitio y época de su recolección.

También se ha avanzado en el aislamiento y caracterización de derivados antracénicos de extractos semipolares a partir de plantas del género *Karwinskia*.

A partir de frutos de *K. humboldtiana* se han aislado y caracterizado los compuestos: T 496, T516, T514, T544 o tullidinol (1) e isoperoxisomicina A1 (isopA1) (11).

TABLA 2

PORCENTAJE DE TOXINAS EN DIFERENTES ESPECIES DEL GÉNERO  
*Karwinskia* (10)

<i>Karwinskia</i>	Porcentaje		
	T514	T544	T496
<i>subcordata</i>	1,07	1,51	0,98
<i>parvifolia</i>	1,02	--	1,58
<i>mollis</i>	0,95	1,33	1,08
<i>humboldtiana</i>	0,70	1,60	0,80
<i>calderonii</i>	0,70	0,75	2,00
<i>latifolia</i>	0,50	--	1,10
<i>tehuacana</i>	0,33	0,83	0,40
<i>umbellata</i>	0,05	0,75	0,50
<i>johnstonii</i>	--	2,10	0,70
<i>rzendowskii</i>	--	--	1,60
<i>venturae</i>	--	--	0,11

(-- ) no detectado

A partir de raíces de *K. humboldtiana* se han obtenido y caracterizado los compuestos: T544, T516 (12), Karwinaftol A, Karwinaftol B y 2-acetil-6,8-dimetoxi-3-metil-1-naftol (13) y el desmetoxilado 7' de T544 (14).

A partir de frutos de *K. umbellata* se obtuvo y caracterizó isoperoxisomicina A1 (11), mientras que del fruto de *K. tehuacana* (antes conocida como *Karwinskia affin humboldtiana*) se obtuvo el compuesto nombrado como T510 (11) y de raíz de *K. subcordata*, *mollis*, *umbellata* y *johnstonii*: T544 y el desmetoxilado de este compuesto (14).

De los frutos de *Karwinskia parvifolia* se han obtenido y caracterizado las toxinas: Peroxisomicina A1 (PA1), Peroxisomicina A2 (PA2), Peroxisomicina A3 (PA3), isoperoxisomicina A1 (isopA1) e isoperoxisomicina A2 (isopA2) (15). De extractos de raíces de plantas de esta misma especie se ha reportado la presencia de: tullidinol B1 y tullidinol B2 (16); estudios químicos, efectuados proporcionan evidencia que el desmetoxilado 7' de T544 se encuentra también en las raíces de esta especie (17, 18).

## 1.2. Métodos Analíticos

El desarrollo de métodos analíticos ha permitido mayor sensibilidad y repetitividad en los resultados de las determinaciones que sobre estos compuestos antracenónicos se realizan, y con esto también se han logrado optimizar los métodos de extracción y purificación de estos compuestos.

Primeramente se utilizó la cromatografía en capa fina con cuantificación espectrofotométrica por reflectancia (19) para la determinación de T496, T544 y T514, reportándose con este método un límite de detección de 0,2 nmol para estos compuestos. La sensibilidad de este método puede ser inadecuado para estudios del mecanismo de acción de PA1.

Dado lo anterior, se desarrolló un método analítico por cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) en fase reversa C18 en el que se mejoró el límite de cuantificación de PA1 hasta 0,01 nmol, a 410 nm de longitud de onda del detector, límite que se puede mejorar utilizando radiación de 269 nm, ya que la absorptividad molar a esta longitud de onda es mayor (20).

En esta técnica el detector de arreglo de diodos permite obtener el espectro UV-Vis de los compuestos hidroxiantracenónicos de interés en tiempo real y también permite obtener gráficas de relación de absorbancias a distintas longitudes de onda, las que señalan la pureza de los compuestos separados.

El desarrollo tecnológico de la cromatografía de líquidos de alta resolución ha permitido la utilización de columnas de diámetros pequeños, con fase estacionaria cuyo tamaño de partícula es pequeño y homogéneo, con las que se obtienen mejores condiciones de resolución, de capacidad y de selectividad y mayor rapidez en la separación, con lo que se logró resultados reproducibles y confiables en el análisis de los compuestos de interés.

Los tiempos de retención obtenidos mediante el método anterior para las distintas antracenonas analizadas, se encuentran reportados en la Tabla 3. Los tiempos de retención de PA1 e isopA1 son semejantes, más en la columna C8.

TABLA 3

TIEMPO DE RETENCIÓN POR CLAR (15) DE ANTRACENONAS DIMÉRICAS  
DE EXTRACTOS DE *K. parvifolia* (20).  
(minutos)

Compuesto	Columna C8 (5 $\mu$ m)	Columna C18 (5 $\mu$ m)
PA2	1,66	1,64
PA1	2,65	2,43
T516	2,85	2,42
isoPA1	2,55	2,85
PA3	3,00	3,17
T496	6,92	6,99

Se ha observado también, que las señales de PA1 e isopA1 se traslapan en la medida que la columna envejece (que se incrementa el número de inyecciones), llegándose incluso a invertir el orden de elución entre ambos compuestos.

Con respecto a este último método se optimizó la separación analítica (21) de cantidades equimolares de PA1, PA2, PA3, isopA1 e isopA2 en columna C18 de 3  $\mu$ m, los tiempos de retención se encuentran reportadas en la Tabla 4.



Los parámetros de resolución, separación y de selectividad se mejoraron con respecto al método preestablecido.

Con estos resultados se puede realizar la cuantificación de PA1 e isopA1 con mayor confianza, ya que la resolución entre ambas señales se mejoró. Sin embargo, el problema de traslape de PA1 e isopA1 se sigue presentando a medida que la columna envejece.

TABLA 4

TIEMPO DE RETENCIÓN DE PA1, PA2, PA3, ISOPA1 E ISOPA2  
(MÉTODO OPTIMIZADO) (21)

Compuesto	Tiempo de retención (min)
PA2	2,146
isopA1	3,443
PA1	3,899
IsopA2	4,234
PA1	5,068

### 1.3. Degradación de PA1 y Uso de Antioxidantes

Un fenómeno que merece atención es el proceso de descomposición que sufre PA1. Se ha observado que algunos lotes de PA1 se descomponen rápidamente, mientras que otros lo hacen de manera lenta.

Un antecedente que existe con respecto al estudio de la degradación de PA1 en el Departamento de Farmacología y Toxicología, es el estudio de degradación realizado con PA1 en solución (22). En éste se concluyó que la descomposición de PA1 está directamente relacionada con la luz, el pH y la temperatura. El tiempo de vida media de PA1 a distintas condiciones de pH, temperatura y luz se encuentra reportado en la tabla 5, sin embargo el mecanismo con que se produce la degradación de PA1 no es conocido

todavía. Los procesos químicos destructivos más comunes de los fármacos son la hidrólisis y oxidación (23).

En el área de obtención de medicamentos tales como: aspirina, atropina, derivados del ácido barbitúrico, cloranfenicol, penicilina, procaina, sulfonamidas, etc. puede considerarse a la hidrólisis como el proceso de degradación químico más importante (23).

TABLA 5

TIEMPO DE VIDA MEDIA DE PA1 EN RELACIÓN AL PH, TEMPERATURA Y LUZ (HORAS) (22)

Buffer	T514					
	25°C		37°C		70°C	
	Luz	Oscuridad	Luz	Oscuridad	Luz	Oscuridad
2,5	123	213	148	158	59,0	59,0
6,0	85	169	60	70	24,0	23,0
9,0	61	129	25	45	6,2	6,5
12,0	--	--	--	--	--	--

Martínez Villarreal, L., tesis de maestría, U.A.N.L., 1990.

La oxidación puede considerarse como el proceso de degradación química más importante para muchos otros fármacos, como: aldehídos, alcoholes, fenoles, azúcares, alcaloides y grasas insaturadas. Posiblemente sea este proceso por el que PA1 se descompone (23).

La oxidación de un compuesto susceptible es más probable que ocurra cuando es mantenida en una forma diferente al estado seco, en presencia de oxígeno, expuesto a la luz, o combinada con otros agentes (23).

Por otro lado, el uso de estabilizadores y antioxidantes parece ser una buena opción para ayudar a conservar un fármaco (24–31) ya que estos pueden actuar reaccionando con los compuestos que lo degradan y de esa manera se evita el progreso de la reacción en cadena de este indeseable proceso de degradación. Entre los antioxidantes más comunes para preparaciones acuosas, se emplean sulfito de sodio, bisulfito de sodio, ácido hipofosforoso y ácido ascórbico (23).

Un antecedente de la utilización de antioxidantes en el área de obtención de compuestos con actividad citotóxica, son los resultados obtenidos en el estudio de optimización de la extracción de PA1 de la semilla del fruto de *Karwinskia parvifolia*, realizado por Gómez A., E. (1997) (32), en los que se observa una mayor cantidad de este compuesto cuando se utilizan antioxidantes en el proceso de extracción, (Tabla 6).

El uso de un antioxidante debe ser recomendado después del estudio de su efecto sobre el proceso de descomposición de interés, ya que a la par que puede actuar deteniendo el proceso indeseable, su efecto puede ser en sentido contrario, reaccionando químicamente con el compuesto que se desea estabilizar, lo que ocasionaría un efecto inverso al deseado con el uso de estos compuestos.

#### **1.4. Estabilidad de Fármacos**

Datos científicos pertinentes a la estabilidad de los fármacos permiten la predicción de la vida útil esperada del producto de interés, y en ocasiones aportan conocimientos para rediseñar la droga (por ejemplo en forma de sal o un éster puede ser más estable).

El estudio de la velocidad del cambio químico, y la forma en que ella es influenciada por factores tales como la concentración del reactante, el solvente empleado, las condiciones de temperatura o la presencia de otros agentes químicos en la reacción, se conoce estableciendo la ley de velocidad en tales condiciones.

La importancia de los estudios de estabilidad de fármacos queda de manifiesto en el hecho de que países como Estados Unidos, Japón y la Comunidad Económica Europea, han elaborado recomendaciones en esta área, en sus respectivas legislaciones (33-39).

TABLA 6

CANTIDAD DE PA1 OBTENIDA CON Y SIN ÁCIDO ASCÓRBICO UTILIZANDO DISTINTOS SOLVENTES A PARTIR DE 1 K DE LA SEMILLA DEL FRUTO DE *K. parvifolia* (32)

Solvente usado para la extracción	Masa de PA1 obtenidos/g	
	Sin ácido ascórbico	Con ácido ascórbico
Acetato de etilo	1,852	2,441
Metanol	0,689	0,747
Cloroformo	2,382	3,774

Efraín Gómez A., Seminario de Terminación, U.A.N.L., 1997.

La U. S. Food And Drug Administration (1998) elaboró la guía para los estudios de estabilidad de fármacos, en donde se establecen los requerimientos necesarios para efectuar este tipo de estudios y así obtener evidencias de cómo la calidad del compuesto activo, o un fármaco, varía con el tiempo bajo la influencia de factores medioambientales tales como la temperatura, humedad y luz, con el fin de recomendar las condiciones de guardado, periodos de prueba y vida útil (35-37, 40).

En México la Secretaría de Salud emitió una Norma (41) para regular los estudios de estabilidad que deben realizarse a los medicamentos nacionales o importados que aquí se comercializan. En ésta se definen los estudios de estabilidad como a las pruebas que se efectúan a un medicamento para determinar el período de caducidad y las condiciones de almacenamiento a las que sus características físicas, químicas, y biológicas permanecen dentro de los límites especificados, bajo la influencia de diversos factores ambientales como temperatura, humedad y luz.

Los estudios de estabilidad, además de realizarse para determinar la fecha de caducidad, se realizan también para caracterizar la degradación de un fármaco con respecto al tiempo. Un antecedente que existe al respecto es el estudio de estabilidad que se realizó con cloruro de doxorubicina (un agente antineoplásico ampliamente utilizado en el tratamiento de adenocarcinoma de pulmón y carcinoma de vejiga, entre otros) en condiciones de refrigeración y en congelación para evaluar la potencial degradación de este compuesto después que se reconstituía para su aplicación (42). En este estudio, soluciones acuosas de cloruro de doxorubicina de 2 mg/mL se colocaron en refrigeración (4°C) y congelación (- 20°C) y se determinó la concentración por CLAR en distintos intervalos de tiempo. El estudio se efectuó durante un año para el caso de la temperatura de refrigeración y tres meses en congelación, encontrándose que esta solución puede ser refrigerada por seis meses después de que se reconstituye, o durante un mes si es congelada.

Otro antecedente que existe es el estudio que se realizó con soluciones de los compuestos antineoplásicos: adriamicina, daunorrubicina, rubidazona y mitoxantrona, a fin de observar la degradación de éstos durante la preparación y guardado mediante ensayos *in vitro*. Con este estudio se estableció que una solución de adriamicina con una concentración de 2 mg/mL se degradó en un 10 % en 14 días a 37°C; una solución de 5 mg/mL de daunorrubicina es estable por 7 días a temperatura de laboratorio; la estabilidad de una solución 12,5 % de rubidazona fue de 8 horas a 25°C y de 24 h a 4°C; y mitoxantrona en una solución de 2 mg/mL, en una solución acidificada de cloruro de sodio, fue estable durante tres años a temperatura de laboratorio (25, 26).

En otro estudio efectuado con un análogo de la antraciclina, el 3'-diamino-3'-[2-(S)-methoxi- 4-morpholino] doxobicina se observó que bajo condiciones ácidas éste alcanza su concentración residual de 46,2 % en 144 días; bajo condiciones básicas se registró una concentración residual de 48,2 % en el mismo tiempo; y bajo luz intensa la concentración residual de 39,9 se obtuvo en 72 h. En este estudio el fármaco fue congelado y después reconstituído con agua-acetonitrilo (70:30, v/v) en concentraciones de 50 y 100 µg/mL y determinada su concentración por CLAR (43).

Los estudios de estabilidad bajo condiciones normales de almacenado pueden consumir una cantidad importante de recursos y tiempo ya que la estabilidad de un compuesto bajo estas condiciones debe estudiarse por lo menos durante 5 años (33, 34, 40), por lo que las regulaciones legales (34, 40) permiten la determinación tentativa de la estabilidad de un fármaco mediante estudios de estabilidad acelerada (37, 39, 41) cuyo propósito, además de permitir la estimación de un período tentativo de caducidad y de parámetros cinéticos importantes que se utilizan en la elaboración del diseño del estudio de estabilidad a largo plazo (40), también sirven para determinar la vida útil de un fármaco. Los estudios de estabilidad acelerada son utilizados frecuentemente para identificar los problemas potenciales que pueden ser encontrados durante el guardado.

La vida útil de un fármaco, bajo condiciones de guardado en anaquel, puede ser obtenida por extrapolación de los resultados de estudios realizados bajo condiciones aceleradas de guardado a temperatura relativamente elevada (23, 37, 38, 39, 42, 44), como puede ser 25°C, 50°C y 70°C, humedad relativa del 70 % y bajo diferentes longitudes de onda de radiación electromagnética. La bibliografía reporta diversos métodos para el estudio de degradación acelerada de un fármaco (45): método empírico, método de Tootill, método de la tabla de estabilidades, método del coeficiente de temperaturas, Ecuación de Eyring y el método de Arrhenius (28, 46, 47).

En la industria farmacéutica la ecuación de Arrhenius es empleada frecuentemente para relacionar la velocidad de degradación con la temperatura (23, 33, 36, 37, 38, 39, 42, 45), en este método se determina primero el orden de reacción de la degradación del fármaco bajo condiciones aceleradas de almacenado. Una vez que el orden de reacción ha sido determinado, se establece la relación entre la velocidad de degradación y la temperatura, para de esta manera extrapolar la velocidad de degradación a la temperatura de interés; de manera práctica esto se hace gráficamente el inverso de la temperatura absoluta contra la vida media ( $t_{50\%}$ ) o el tiempo en que la concentración residual del compuesto alcance el 90% ( $t_{90\%}$ ) y con la ecuación de regresión obtenida de este modo se extrapola la degradación que sufriría este compuesto a la temperatura de interés.

Un estudio de degradación acelerada de cefadroxil, una cefalosporina de uso oral, ha sido reportado como una función del pH (48). En ese trabajo se determinó la concentración residual de cefradroxil a pH 2,5, 3,2, 4,0, 5,0, 6,0, 7,0 y 8,0 a tres temperaturas en el intervalo de 40°C a 87°C, en los que todas las cinéticas de degradación se ajustaron a un modelo cinético de primer orden, con los que se obtuvieron las ecuaciones de regresión a cada pH y se extrapoló el t50% y t90% a las temperaturas de -4°C, 20°C y 37°C.

Existen otros estudios de degradación acelerada en donde el método de Arrhenius ha sido utilizado para extrapolar parámetros a condiciones de interés a partir del estudio de la degradación de un compuesto bajo condiciones aceleradas. Entre esos estudios se mencionan la cinética de la oxidación aeróbica de ácido ascórbico (49), la cinética de la hidrólisis y epimerización de pilocarpina en solución acuosa (50), la cinética y factores que afectan la estabilidad de metilprednisolona en formulación acuosa (28), etc.

Un estudio de autooxidación de fármacos con la adición de iniciadores de radicales libres fue estudiado como una forma más de acelerar el proceso de degradación (51). En ese estudio una solución de tetrazepam en acetonitrilo, una benzodiazepina usada como miorelajante y el iniciador de radicales libres AIBN, fue almacenada en oscuridad durante 48 h a 40°C y el perfil de la degradación observado fue similar a los que se obtuvieron en estudios tradicionales de degradación acelerada. En ese mismo artículo se estudió de la misma manera la degradación de fenilbutazona, hidrobromuro de dextrometorfano e hidrocloreuro de trifluoperazina, encontrándose resultados similares a los ya descritos.

Las precauciones que se deben considerar para la evaluación de los datos cuando estos se obtienen de estudios de degradación acelerada, han sido abordados en los trabajos reportados por Yoshioka (52) y Franks, F. (53), en donde se consideran las posibilidades de que la extrapolación de los datos no coincida con el comportamiento real de los parámetros determinados.

Caracterizar la degradación de un fármaco requiere de un enorme número de ensayos; un estudio de estabilidad de largo plazo o acelerado puede involucrar factores como tiempo, lotes, temperatura, humedad, contenedores y niveles de concentración, entre otros, los cuales pueden consumir mucho tiempo y costo, por lo que la aplicación del diseño de experimentos apropiado puede ser la mejor opción para optimizar los recursos disponibles para un estudio de esta naturaleza, sin detrimento de la precisión. A partir de la resolución que se desee de los resultados (34), se puede optar por utilizar un diseño factorial completo (34, 54, 55), un diseño factorial fraccionado (34, 55, 56), un diseño matricial (33, 38, 39, 55) y también diseños de regresión basados en la mediana (55, 57).

### **1.5. Definición del Problema**

De lo dicho anteriormente surge que el estudio de la cinética de descomposición, en estado sólido, resulta fundamental para disponer, en la medida de lo posible, de un producto puro de PA1, con una gran vida de almacenaje. De la misma manera, el estudio cinético de la degradación de este compuesto de interés permitirá sentar las bases para proponer precauciones que se deben tomar dentro del proceso de extracción y purificación.

Peroxisomicina A1 es un compuesto que, como ya se mencionó, se obtiene utilizando solventes semipolares a partir de plantas del género *Karwinskia*; en este extracto se ha detectado la presencia, entre otras antracenas, de un isómero de posición caracterizado como isopA1 (figura 2); este compuesto tiene propiedades cromatográficas semejantes a PA1 por lo que los tiempos de retención de ambos compuestos son semejantes.

De esta manera, y dado que el desarrollo de los métodos analíticos lo ha permitido, se ha podido observar que los lotes de PA1 obtenidos en el Laboratorio de Producción del Departamento de Farmacología tienen una pequeña proporción de este



compuesto, que por esta razón se le considera un contaminante natural de los lotes de PA1.

Un problema que merece la atención es la degradación que PA1 sufre, debido a esto la pureza de los lotes disminuye, además de que los productos de degradación pueden complicar los estudios que sobre el mecanismo de acción de este compuesto se realizan.

Para hacer la presente propuesta de investigación se consideró que ya que isopA1, figura 2, está presente en los lotes de PA1 en cantidad pequeña, y aunque ésta no afecta la actividad citotóxica de PA1, se cree que sí influye en el proceso de degradación descrito, por lo que se investigó este proceso en estado sólido y en estado líquido, bajo las diversas condiciones experimentales que permitieran obtener las evidencias pertinentes para tratar de, en la medida que los resultados lo permitan, proponer medidas para conservar con la mayor vida útil posible a este compuesto.

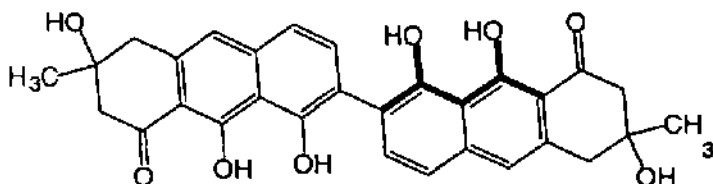


Figura 2 . Estructura de Isoperoxisomicina A1

El estudio del efecto del contaminante de los lotes de PA1 en el proceso de degradación descrito, tanto en estado sólido como en solución, permitirá contar con los elementos adecuados para determinar si es necesario dedicar más esfuerzos y recursos a la repurificación de los lotes de PA1.

Los resultados del estudio de degradación del presente trabajo permitirán enriquecer los estudios de selectividad del método analítico que actualmente se utiliza para la determinación de PA1, ya que se podría saber si durante el tiempo en que se

aplica al método analítico el proceso de degradación ocasiona de manera importante la disminución de la concentración de PA1, y si éste afecta la magnitud de la señal analítica y/o la producción de interferencias pudieran ser importantes en su cuantificación.

El estudio de estabilidad en los solventes que ordinariamente se utilizan para la extracción, y en el método analítico, servirán para determinar que tan importante es el impacto de la degradación de PA1 en éstos (55). En este sentido, con los resultados de la presente investigación se dispondrá de la información pertinente para, en la medida de lo posible, tratar de minimizar este proceso que podría repercutir en la cantidad de PA1 presente cuando se extrae de la semilla de plantas del género *Karwinskia*.

En este contexto se recomienda también determinar la estabilidad de las soluciones estándar de referencia y sus diluciones para establecer el período máximo durante el cual podrán ser guardadas para su uso (58); además se recomienda que se estudie el uso apropiado de aditivos (ejemplo: antioxidantes, inhibidores de enzimas, buffers, etc) para conservar el analito y poder optimizar su uso, consideraciones fueron tomadas en cuenta al proyectar la presente investigación, ya que se elaboró un estudio de estabilidad de estándares y se incluyó en el estudio de la degradación de PA1 el uso de los antioxidantes, ácido ascórbico y bisulfito de sodio, que como se mencionó antes son ampliamente utilizados en la industria farmacéutica.

Considerando los antecedentes hasta aquí descritos se formuló la siguiente:

## **HIPÓTESIS**

**La Presencia de Isoperoxisomicina A1 Influye en el Proceso de Descomposición de los Lotes de Peroxisomicina A1.**

## **OBJETIVO GENERAL**

**Establecer por CLAR la Ecuación de Velocidad de la Descomposición de Peroxisomicina A1 en Presencia Cantidades Conocidas de Isoperoxisomicina A1, en Estado Sólido y en Solución a Distintas Condiciones Experimentales.**

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1.- Obtener Peroxisomicina A1 e isoperoxisomicina A1 puros.**
- 2.- Establecer las condiciones apropiadas para realizar la cuantificación de Peroxisomicina A1 en presencia de cantidades pequeñas de isoperoxisomicina A1.**
- 3.- Obtener la ecuación de velocidad de la degradación de dos lotes de PA1 con diferente contenido de isoperoxisomicina A1 cada uno, en estado sólido, a  $-22^{\circ}\text{C}$  y  $4^{\circ}\text{C}$ , en oscuridad bajo condiciones aeróbicas.**
- 4.- Determinar el efecto de la adición de isoperoxisomicina A1, ácido ascórbico y bisulfito de sodio, sobre la velocidad de degradación de un lote de Peroxisomicina A1 en: metanol, buffer de fosfatos pH 7,4, en suero y acetato de etilo a  $-4^{\circ}\text{C}$ ,  $25^{\circ}\text{C}$  y  $37^{\circ}\text{C}$ , en oscuridad en condiciones aeróbicas.**

## **CAPÍTULO 2**

### **MÉTODOS**

#### **2.1 Equipo, Material y Reactivos**

En la obtención y/o repurificación de PA1 e isopA1 se utilizó el material y equipo de uso común del laboratorio de extracción y síntesis del Departamento de Farmacología, como: columnas cromatográficas de sílica gel 60, columna Lobar Lichrorep RP-18, cromatofolios AL de sílica gel 60 F 254, cromatoplacas TLC sílica gel RP-18, etc.

Las evaporaciones a presión reducida se realizaron en un rotavapor marca Büchi, a 35 °C con baño de agua a temperatura controlada.

Para el control de la purificación: el punto de fusión se midió con un aparato Electrothermal y los espectros UV-Vis se realizaron en un espectrofotómetro Beckman DU 7500 con arreglo de diodos.

Los estudios a la temperatura de - 22°C, se realizaron en un congelador Westinghouse, para los estudios a - 4 °C las muestras se colocaron en el congelador de un refrigerador vertical Kelvinator.

Los estudios a 25 y 35 °C se realizaron en una estufa con termostato. Las temperaturas fueron controladas durante todos los experimentos.

El pH de la solución buffer de fosfatos a pH 7,4 se midió con un aparato Beckman modelo 61. La calibración del equipo se hizo con soluciones buffer de pH 4, 7 y 10.

La separación analítica se desarrolló en un cromatógrafo de líquidos de alta resolución Hewlett-Packard HP-1090 serie II / L. Se utilizó una columna C18 de 100 x 2.1 µm de 3 µm de diámetro de partícula.

La determinación del peso se realizó en una balanza analítica marca Sartorius Basic, modelo 110 S, con sensibilidad hasta las diezmilésimas de gramo.

El metanol, el acetonitrilo y el agua fueron grado CLAR.

## **2.2. Obtención de los Compuestos Peroxisomicina A1 e isoperoxisomicina A1 Puros**

### **2.2.1. Extracción, Fraccionamiento y Purificación**

Las muestras de PA1 que se utilizaron se fueron del Laboratorio de Producción del Departamento Farmacología y Toxicología, las cuales se sometieron a proceso de repurificación por cromatografía de líquidos de alta resolución preparativa.

La repurificación de los lotes de PA1 se intentó por cromatografía de líquidos de alta resolución preparativa y se probaron distintas condiciones de elución utilizando dos columnas fase reversa: una C8 Nova Pack (Radial Pack) de 100 mm x 8 mm, y otra Bondapak C18 (Guarda Pack) de 100 mm x 40 mm con diferente proporción de los solventes en la fase móvil: metanol, agua y acetonitrilo. Se recolectaron fracciones cada 10-15 mL y posteriormente se analizaron estas por cromatografía de líquidos de alta resolución analítica.

La isoperoxisomicina A1 que se utilizó como estándar se obtuvo pura a partir de

extractos semipolares de *K. parvifolia*, utilizando el método descrito por Rivas G. V. y cols. ilustrado en la Figura 3 (11, 17), para lo que se realizaron extracciones y precipitaciones sucesivas con acetato de etilo y éter de petróleo, entre otros, además de cromatografía en columna flash, gravitacional y CLAR preparativo; la pureza se determinó de acuerdo a parámetros ya establecidos de punto de fusión y mediante el comportamiento cromatográfico por CLAR.

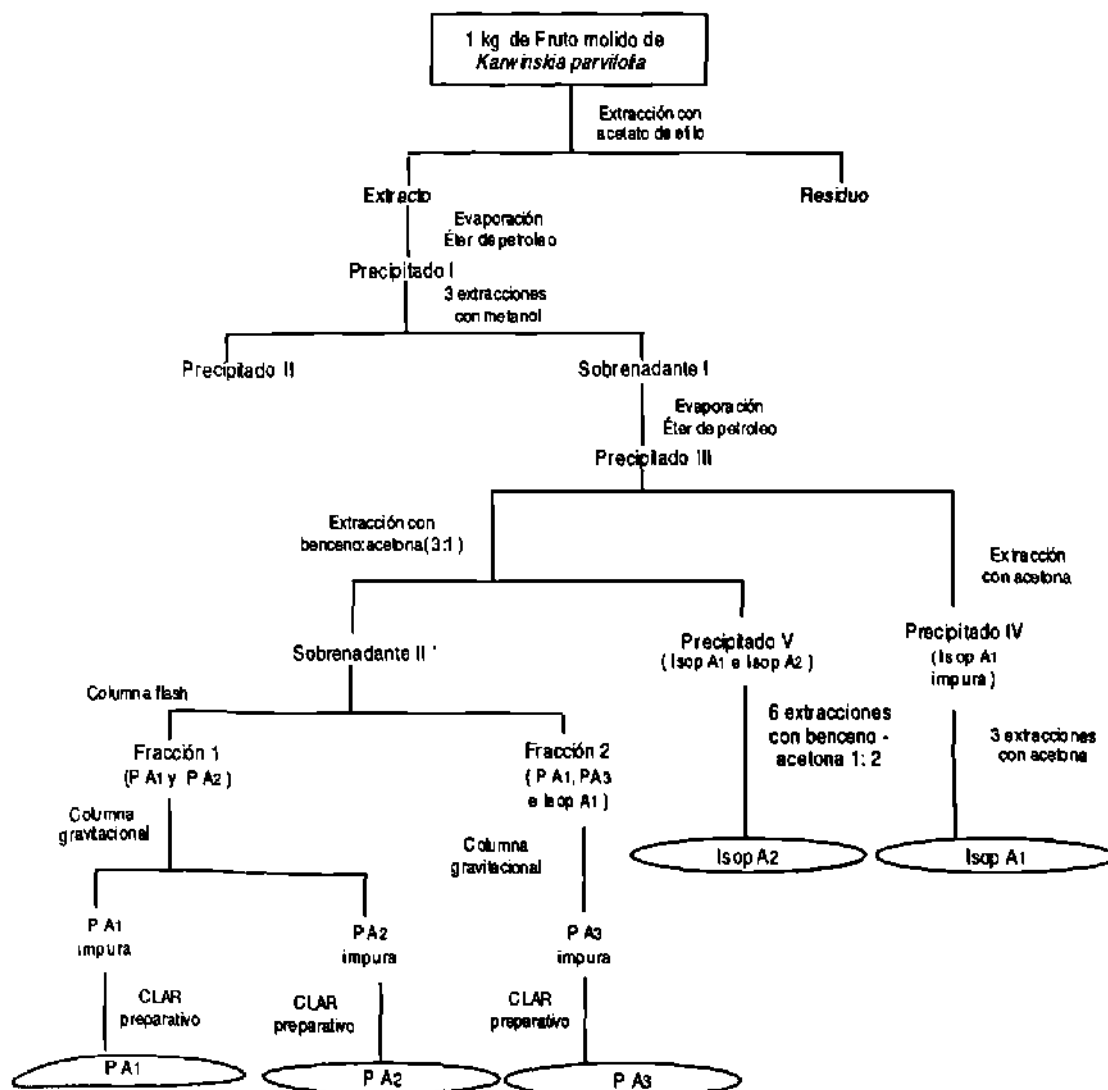


Figura 3.- Procedimiento Descrito para la Obtención de PA1, PA2, PA3, isopA1 e isopA2.



Antes de ser pesada la PA1 e la isopA1 se secaron en pistola de desecación, utilizando pentóxido de fósforo como desecante, durante 2 horas a 35 °CC a presión reducida y la succión para vacío que se aplicó durante 60 segundos.

### **2.3. Determinación de las Condiciones Apropriadas para Realizar la Cuantificación de PA1 en Presencia de Cantidades Pequeñas de isopA1**

A.- A partir del método preestablecido se optimizó la resolución de la separación analítica de una solución de PA1 a 10 y 60 ng/ $\mu$ L, probando distintas proporciones de los solventes ( A= metanol; B= agua:acetonitrilo:ácido acético 30:70:1,6).

B.- Se determinó la precisión del sistema al inyectar 5 veces una solución de PA1 60 ng/ $\mu$ L y se calculó el coeficiente de variación de la señal obtenida.

C.- Se determinó la linealidad de la respuesta de la señal de PA1 en el intervalo de concentraciones de 1 a 20 ng/ $\mu$ L; con los datos obtenidos se calculó la precisión del método en este intervalo de concentraciones mediante el coeficiente de variación del factor de calibración.

D.- Se determinó la linealidad de la respuesta de la señal de PA1 en el intervalo de concentraciones de 20 a 100 ng/ $\mu$ L; con los datos obtenidos se calculó la precisión del método en este intervalo de concentraciones mediante el coeficiente de variación del factor de calibración.

**2.4.-Obtención de la Ecuación de Velocidad de la Degradación de Dos Lotes de PA1 con Diferente Contenido de Isoperoxisomicina A1 cada Uno, en Estado Sólido, a - 22°C y - 4°C, en Oscuridad bajo Condiciones Aeróbicas.**

**2.4.1.- Determinación de la Estabilidad de Estándares de PA1**

A.- Se prepararon 15 mL de una solución de PA1 de concentración 60 ng/ $\mu$ L.

B.- Se dividió la solución preparada en alícuotas de 1 mL cada una, manteniéndose en tubos Eppendorf.

C.- Los tubos se colocaron en un congelador horizontal a la temperatura de - 22°C.

D.- Semanalmente se descongeló una muestra y se determinó la concentración de PA1 por CLAR.

E.- La concentración obtenida semanalmente se graficó en la carta control de Schwart (34, 59, 60).

F.- La carta control de Schwart se elaboró con los resultados de la concentración obtenida a 60 ng/ $\mu$ L del estudio de linealidad. Con el promedio de esta respuesta se calculó el promedio y la desviación estándar con los que se graficó la línea central  $\bar{X}$ , las líneas de alerta  $\bar{X} \pm 2s / (n)^{1/2}$  y de acción  $\bar{X} \pm 3s / (n)^{1/2}$ .

G.- La concentración de cada muestra se determinó con una curva de calibración de reciente, el diseño experimental para elaborar la curva de calibración se puede ver en la Tabla 7, la carta control de Shewhart está reportada en la figura 4.

TABLA 7

DISEÑO EXPERIMENTAL PARA LA ELABORACIÓN POR CLAR DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN INICIAL DE PA1

ng/ $\mu$ L	Altura (mAU)			X'	dst	CV	FC
	1	2	3				
Conc 1							
Conc 2							
Conc 3							
Conc 4							
Conc 5							

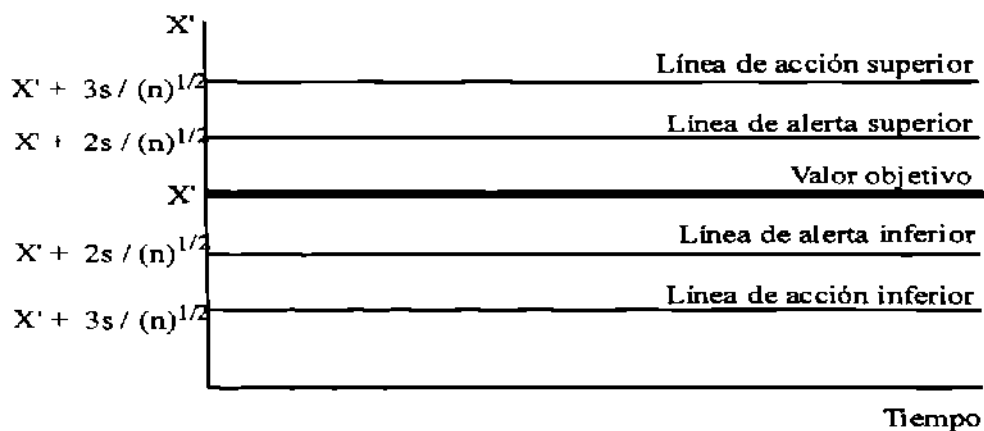


Figura 4.- Carta Control de Shewhart

#### **2.4.2.- Estudio de la Cinética de Degradación Acelerada a 25°C, 30°C y 50°C.**

A.- Se guardaron 20 muestras de 1 mg de PA1 a cada de las siguientes temperaturas: 25, 30 y 50°C .

B.- En el intervalo de tiempo apropiado, se determinó por duplicado la concentración correspondiente; para ello se preparó a partir de las muestras en estudio una solución metanólica de concentración 60 ng/ $\mu$ L y se determinó la concentración de PA1 por CLAR con una curva de calibración con PA1 reciente.

C.- Se determinó el orden de reacción de cada cinética obtenida graficando respectivamente la concentración y el logaritmo natural de ésta contra el tiempo. La evaluación de estas gráficas se realizó comparando el coeficiente de correlación obtenido.

D.- Con la ecuación de regresión se calculó el tiempo de vida media de cada cinética en estudio.

E. Se graficó el tiempo de vida media obtenida contra el inverso de la temperatura absoluta en que fue obtenido el valor de vida media. Este gráfico se conoce ordinariamente como gráfico de Arrhenius (23, 37, 38, 39, 41, 42, 44, 48, 49, 50).

F.- Se ajustaron los datos graficados mediante el programa Cricket Graph, y con la ecuación de regresión se extrapoló la vida media a las temperaturas de interés, - 4°C y - 22°C, estas temperaturas son a las que se realizará el estudio de degradación de PA1 bajo condiciones normales de almacenado de PA1.

### 2.4.3.- Estudio de la Cinética de Descomposición de Peroxisomicina A1 en Estado Sólido

A.- El diseño factorial (34, 59, 61, 62, 63, 64) para realizar el estudio de degradación de PA1 en estado sólido aparece en la Tabla 8.

TABLA 8

#### DISEÑO EXPERIMENTAL PARA EL ESTUDIO DEL EFECTO DE ISOPA1 EN EL PROCESO DE DEGRADACIÓN DE PA1

Experimento	Temperatura	Lote	Intervalo de toma de muestras en función de los resultados de la degradación acelerada				
A	- 22°C	82					
B	- 22°C	83					
C	- 4°C	82					
D	- 4°C	83					

Lote 82 de PA1 contiene 4,85 % de isoPA1; lote 83 de PA1 contiene 3,69 % de isopA1.  
Cada experimento se realizó por duplicado.

B.- Las cinéticas de degradación se estudiaron a - 22°C y - 4°C, que son las temperaturas a las que se almacena PA1.

C.- Los experimentos a - 22°C se realizaron en el congelador y la temperatura se controló con el termostato de éste; la temperatura se conoció con un termómetro de intervalo amplio, de -80 a 100°C.

D.- Los experimentos que se realizaron a - 4°C se llevaron a cabo en un refrigerador y la temperatura se controló con el termostato de éste; se conoció la temperatura con un termómetro de -10 a 100°C.

E.- La concentración de PA1 se determinó preparando una solución metanólica de 10 ng/ $\mu$ L de la muestra respectiva y cuantificando por CLAR. Se utilizó una curva de

calibración preparada a partir de una solución metanólica concentrada de PA1 dentro del periodo de estabilidad establecido.

F.- Para proponer el tiempo de realización de las determinaciones de PA1 se utilizaron los resultados del estudio previo de degradación acelerada.

**2.5.- Determinación del Efecto de la Adición de isoPA1, Ácido Ascórbico y Bisulfito de Sodio sobre la Velocidad de Degradación de un Lote de PA1 en: Metanol, Buffer de Fosfatos pH 7,4, en Suero y en Acetato de Etilo, a -4°C, 25°C y 37°C en Oscuridad y en Condiciones Aeróbicas.**

A.- La cinética de degradación en solución se estudió utilizando un diseño factorial completo (34, 59, 61, 62, 63, 64) bajo condiciones de oscuridad a: - 4°C (temperatura de refrigeración); 25°C (temperatura de laboratorio) y 37°C (temperatura corporal); los solventes en los que se estudio la degradación de PA1 fueron: metanol, buffer de fosfatos a pH 7,4 (0,01 M), suero y acetato de etilo.

B.- Se preparó para cada caso un volumen de 100 mL de una solución de PA1 de concentración 50 µg/mL y esta cantidad se dividió como está señalado en la tabla 9 para cada condición experimental de interés, en cada uno de los estudios de degradación efectuados en los distintos solventes y temperaturas.

C.- Cada uno de los experimentos se dividió en 30 alícuotas de 400 µL. Para el estudio de las muestras bajo condiciones aeróbicas, se colocaron éstas en viales de uso en CLAR de ensayo con suficiente espacio para aerearlas y cerradas herméticamente para evitar la evaporación del solvente.

D.- La solución restante de PA1, preparada como se señaló en el punto B, se dividió en alícuotas de 1 mL que posteriormente sirvieron para elaborar la curva de calibración para cuantificar PA1.

E.- Se preparó una solución de concentración 10 ng/μL y se determinó por CLAR. La cuantificación se realizó con una curva de calibración realizada en un intervalo de concentraciones de 1 a 10 ng/μL. Los estándares fueron preparados utilizando las mismas cantidades de solventes que las muestras. Los intervalos de tiempo de muestreo se proyectaron utilizando los resultados del estudio de degradación en solución efectuados por Martínez V. L. Tabla 10 (22).

TABLA 9

CANTIDADES DE LAS SOLUCIONES UTILIZADAS PARA EL ESTUDIO DE LA DEGRADACIÓN DE PA1 EN SOLUCIÓN

Experimento	PA1 (5 mg/mL)	IsopA1 (1 mg/mL)	Ác.ascórbico (1 mg/mL)	Bisulfito de sodio (1 mg/mL)	DMSO (μL)
A	13 mL				8,9
B	13 mL	22,16 μL			
C	13 mL	22,16 μL			
D	13 mL		44,2μL		8,9
E	13 mL	22,16 μL	44,2μL	44,2 μL	
F	13 mL			44,2 μL	8,9

La solución de isopA1 fue preparada predisolviendo en 400 μL de DMSO y agregando después 600 μL de metanol. Ácido ascórbico y bisulfito de sodio fueron preparados disolviendo éstos en el solvente en estudio.

F.- Se obtuvo el orden de reacción de cada una de las cinéticas estudiadas, utilizando la rutina de ajuste por mínimos cuadrados incluida en el programa Cricket Graph de Macintosh.

G.- El parámetro que se utilizó para la evaluación de los resultados fue la constante de velocidad (34).

H.- El análisis de varianza de las constantes de velocidad fue realizado utilizando el Paquete de Diseños Experimentales elaborado por Olivares Sáenz, E. Versión 2,5, FAUNL.

I.- La comparación de medias, cuando los resultados del análisis de varianza lo obligaron, se realizó utilizando la distribución de probabilidad t student con un 95 % de confianza y graficando los intervalos de confianza en el programa Excel de Macintosh.

TABLA 10

TIEMPO DE VIDA MEDIA DE PA1 A PH 6,0  
(HORAS) (22)

°C	Luz	Oscuridad
25	85	169
37	60	70



## **CAPITULO 3**

### **RESULTADOS**

#### **3.1.- Obtención de Peroxisomicina A1 e Isoperoxisomicina A1, Identificación y Comprobación de su Pureza**

La peroxisomicina A1 fue proporcionada por el Laboratorio de Producción del Departamento de Farmacología; se intentó su repurificación mediante cromatografía de líquidos de alta resolución utilizando distinta fuerza de elución de la fase móvil.

En las figuras 5, 6, 7, 8 y 9 se encuentran cromatogramas de distintas fracciones obtenidas con el CLAR preparativo, utilizando distintas condiciones de elución, como: distintas columnas, proporción de solventes en la fase móvil, lote y cantidad inyectada.

Los espectros de  $^1\text{HRMN}$  de isopA1 y PA1 se encuentran reportados en la figura 10.

El contenido de isopA1 de distintos lotes del Laboratorio de Producción, fueron cuantificados por  $^1\text{HRMN}$ , se tabularon en la Tabla 11.

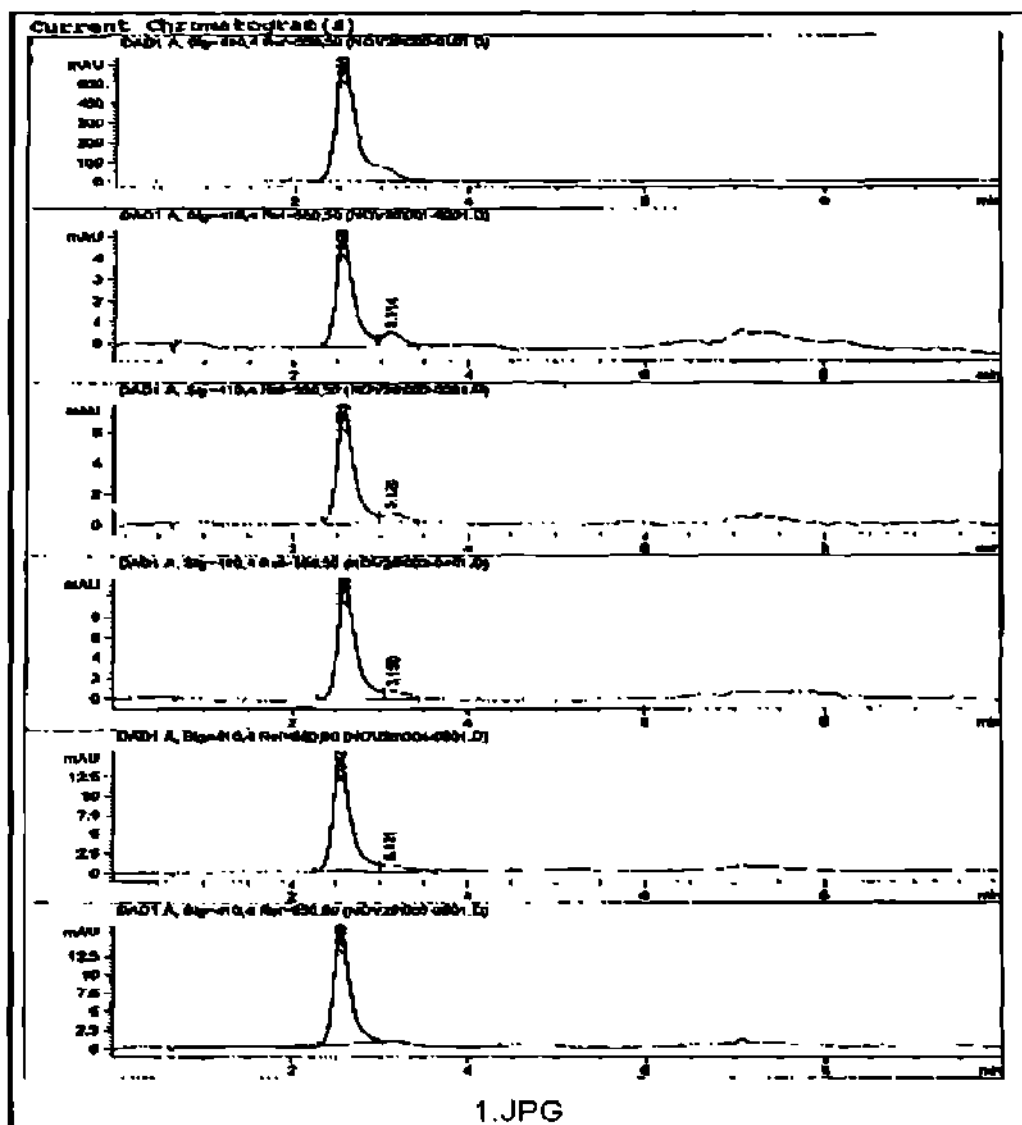


Figura 5. Cromatogramas de Distintas Fracciones de la Separación Preparativa en Columna C8, 100 x 8 mm, Fase Móvil: Metanol 50%, Agua 50%, Flujo 4 mL/min, Lote 1, Volumen de Inyección 200  $\mu$ L (20 mg/mL).

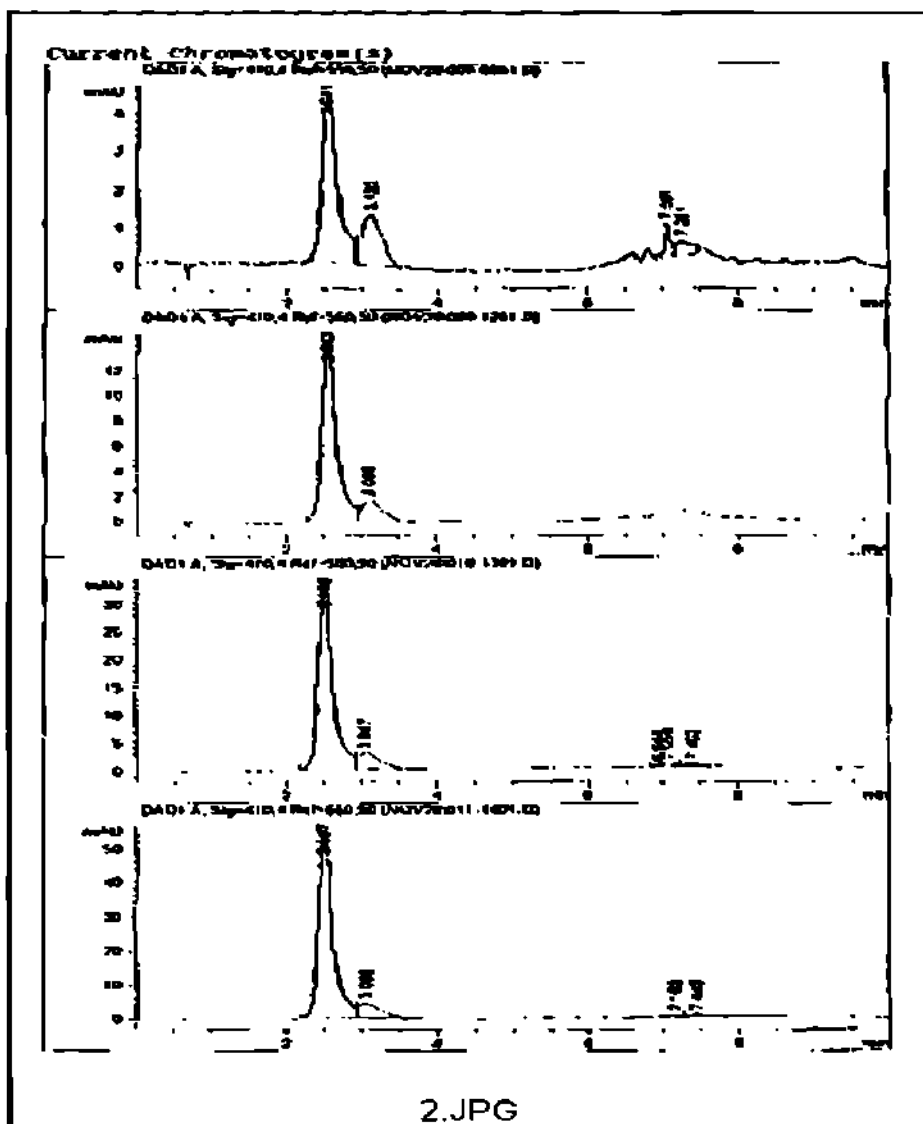


Figura 6. Cromatogramas de Distintas Fracciones de la Separación Preparativa en Columna C8 (100 x 8 mm), Fase Móvil:Metanol 55%, Agua 45%, Flujo 4 mL/min, Lote 1, Volumen de inyección 200  $\mu$ L (20 mg/mL).

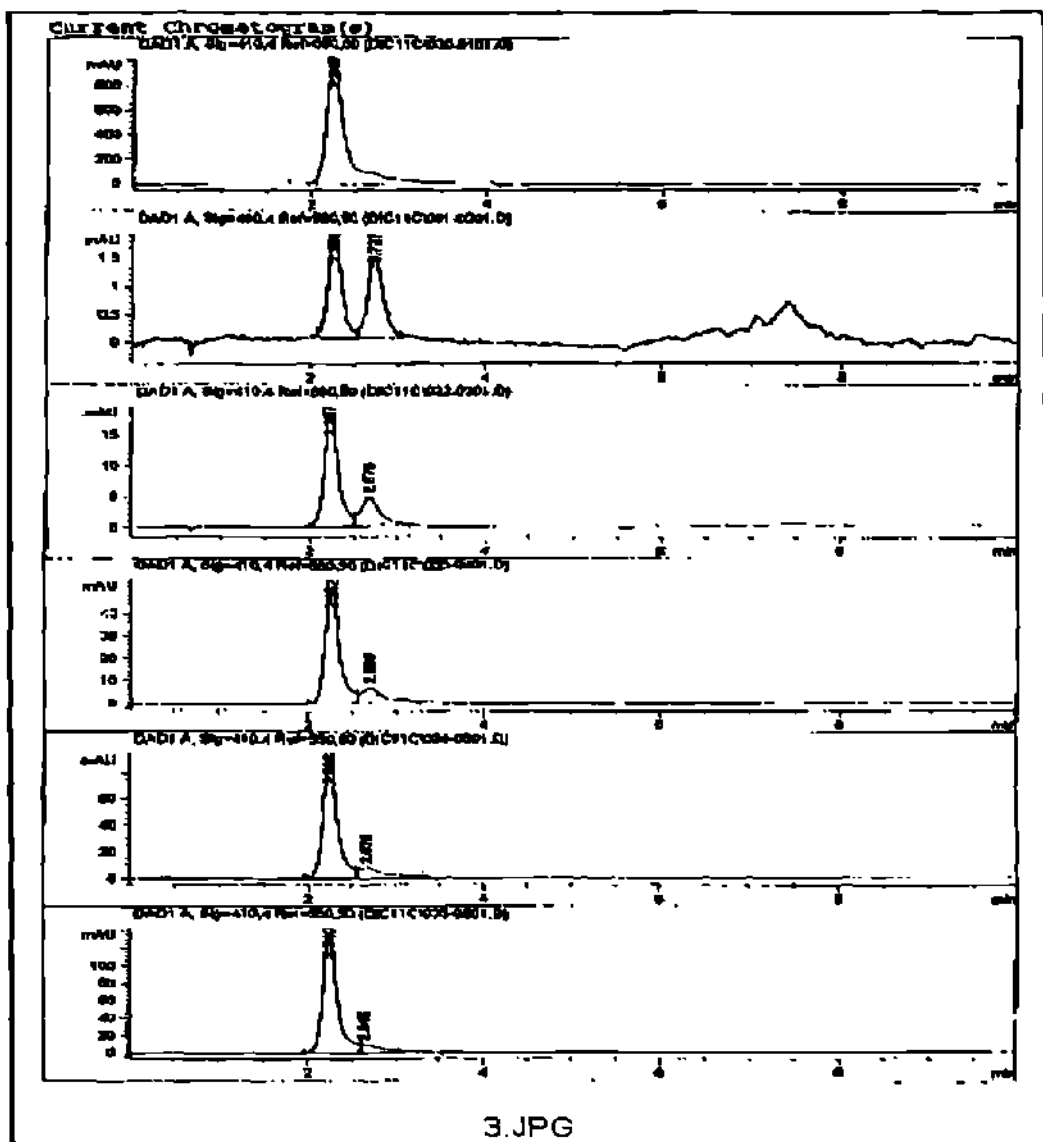


Figura 7. Cromatogramas de Distintas Fracciones de la Separación Preparativa en Columna C18 (100 x 40 mm), Fase Móvil: Metanol 55%, Agua 45%, Flujo 60 mL/min, Lote 80, Volumen de Inyección 3 mL (80 mg/mL).

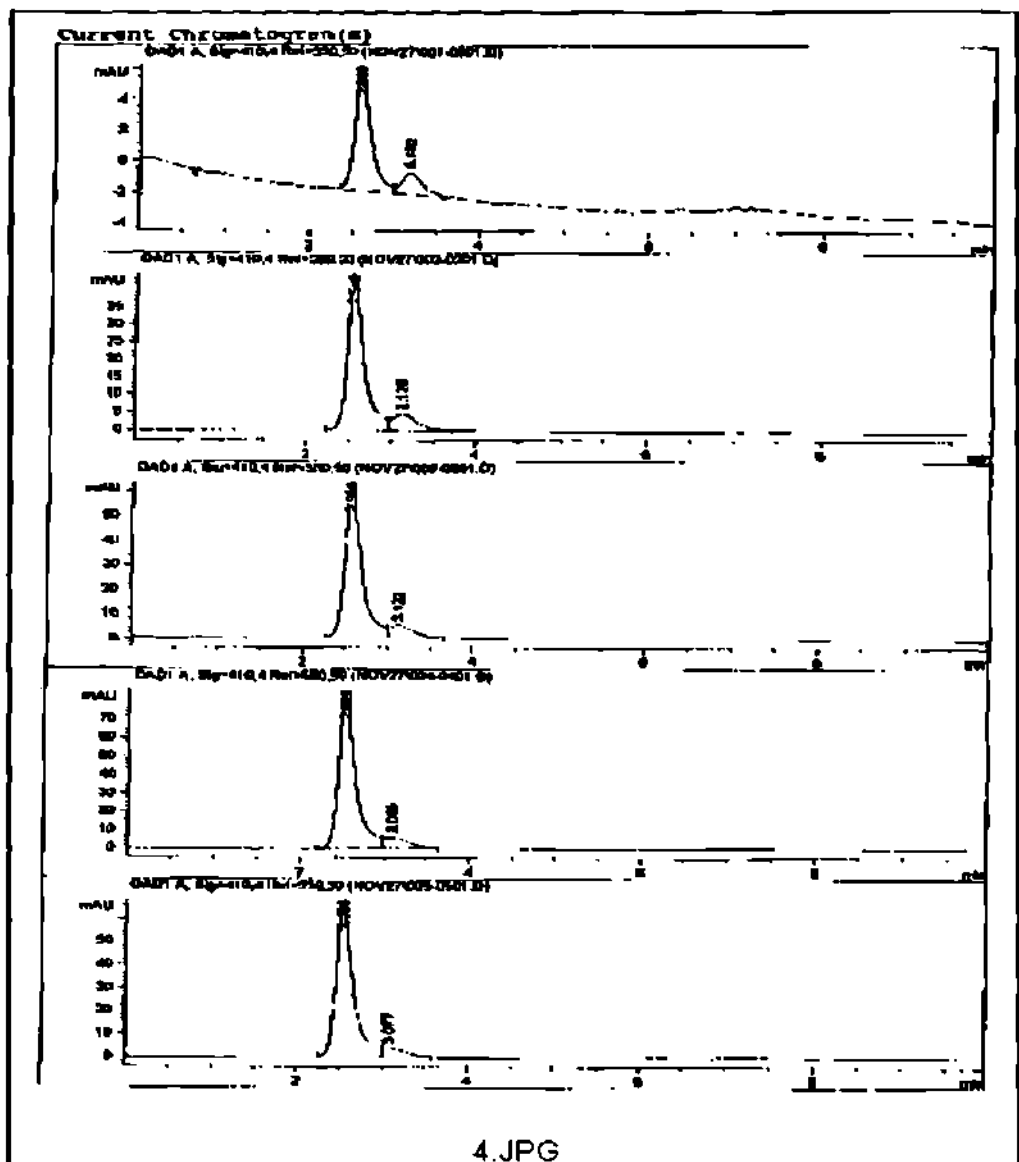


Figura 8. Cromatogramas de Distintas Fracciones de la Separación Preparativa en Columna C8 (100 x 8 mm), Fase Móvil: Metanol 50%, Agua 50%, 1 % Acetonitrilo, Flujo 4 mL/min, Lote 1, Vol. de Inyección 200  $\mu$ L (20 mg/mL).

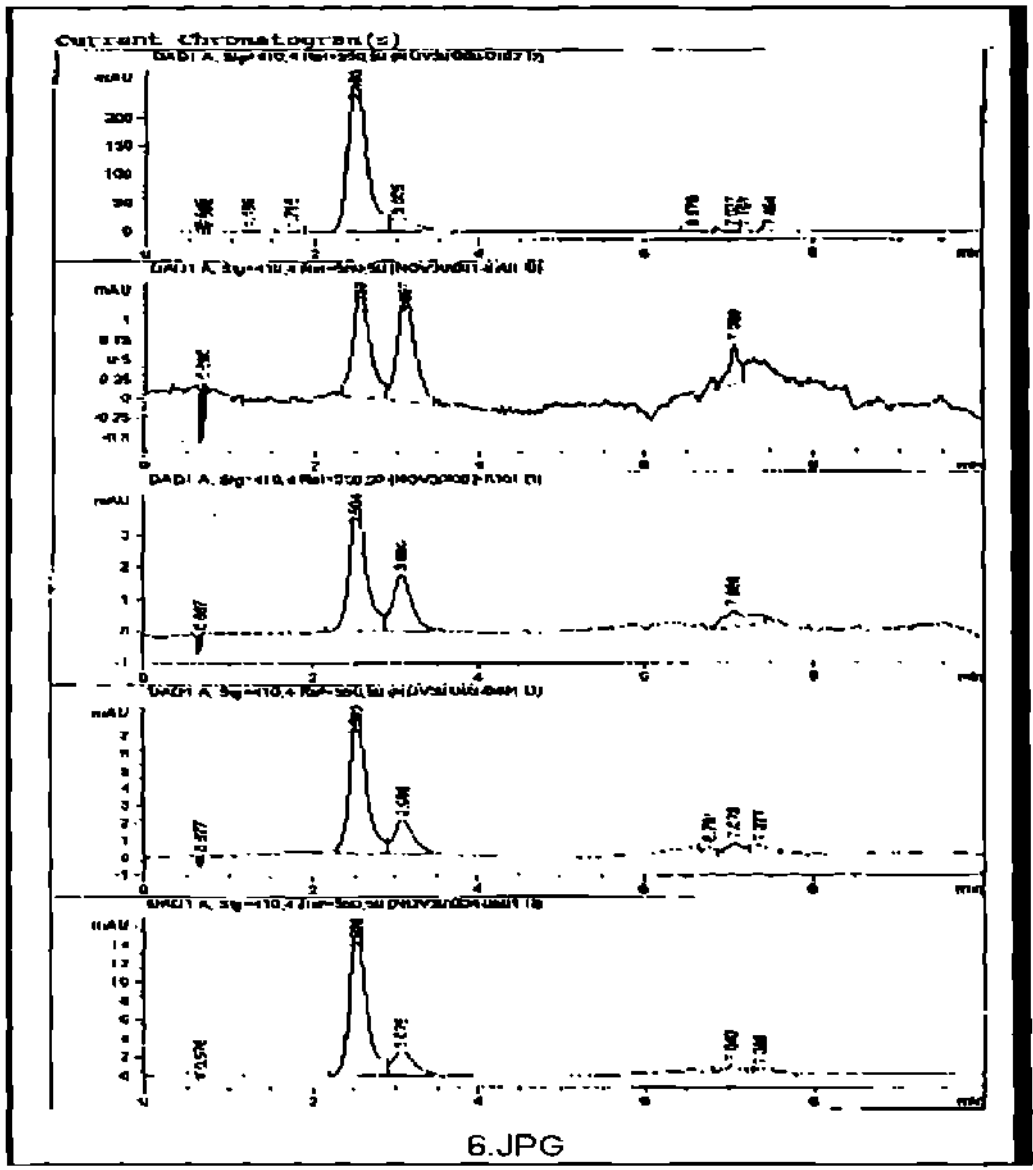
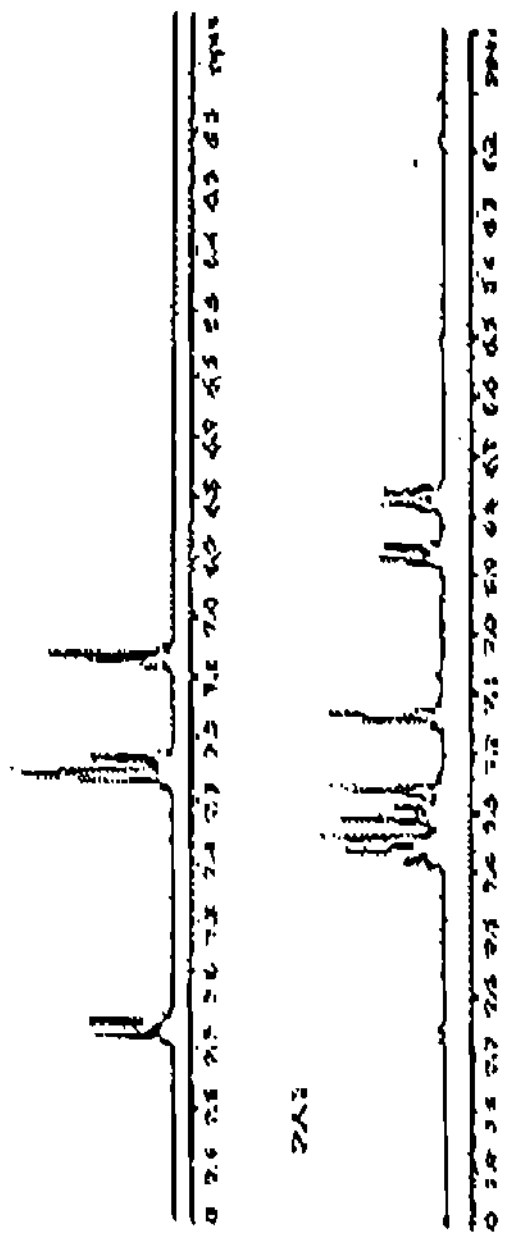


Figura 9. Cromatogramas de Distintas Fracciones de la Separación Preparativa en Columna C18 (100 x 40 mm), Fase Móvil: Metanol 55%, Agua 45%, Flujo 60 mL/min, Lote 1, Volumen de Inyección 3 mL (80 mg/mL).



Fernández Ramírez, A., IV Simposio de Ciencia y Tecnología, 1999.

Figura 10. Espectro de isoperroxisomicina A1 (arriba) y de Peroxisomicina A1 (abajo). La Señal a 7,03 ppm Permite Asegurar la Selectividad Adecuada para la Cuantificación de Isoperoxisomicina A1.

TABLA 11

CONTENIDO DE ISOPA1 EN LOTES DE PA1  
 CUANTIFICADOS POR <sup>1</sup>HRMN (67)

Lote	% isoPA1
80	4,58
81	3,41
82	4,76
83	3,67



### **3.2.- Establecimiento de las Condiciones Apropriadas para Realizar la Cuantificación de Peroxisomicina A1 en Presencia de Cantidades Pequeñas de Isoperoxisomicina A1**

En la tabla 12 se reportan las condiciones de elución con las cuales trabajamos en el estudio de estabilidad de PA1, las cantidades de PA1 e isopA1 son semejantes a las existentes en los lotes de PA1 del Laboratorio de Producción.

La mejor resolución de la separación obtenida con las condiciones de elución de la tabla 12 se aprecia en la figura 11, la repetitividad de la separación se halla en la figura 12 y la proporcionalidad de la respuesta se muestra en la figura 13.

En las tablas 13 y 14 se encuentran los valores de la respuestas obtenidas en la determinación de la linealidad de la respuesta, en el intervalo de concentraciones de 1-20 ng/ $\mu$ L y de 20-100 ng/ $\mu$ L, y el coeficiente de variación del factor de calibración respectivo.

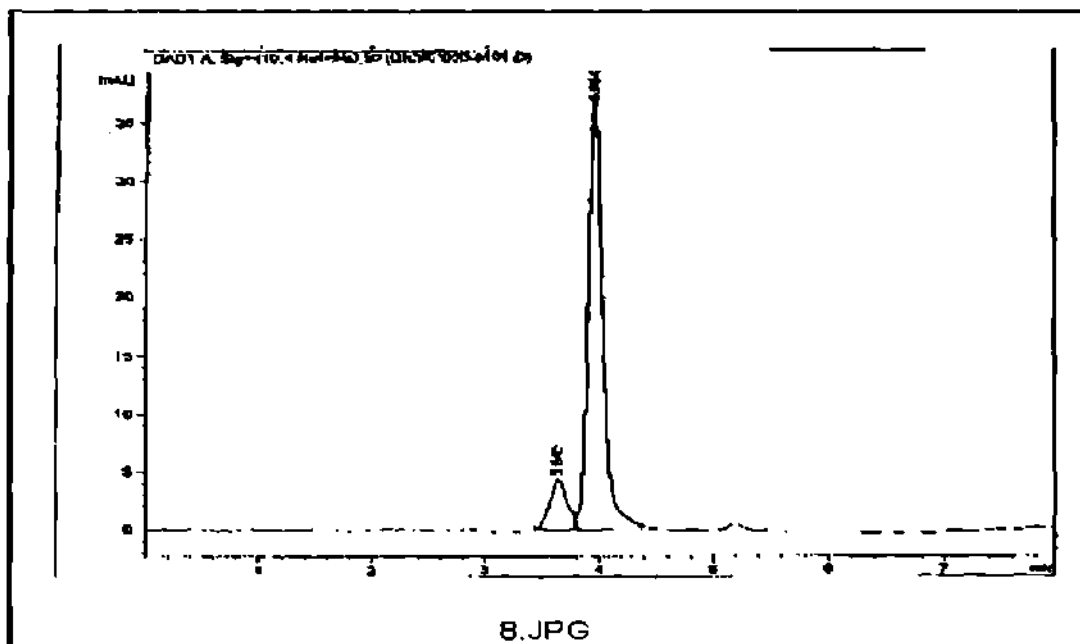


Figura 11. Separación Analítica Obtenida con las Condiciones de Elución Encontradas en este Estudio.

TABLA 12

CONDICIONES DE ELUCIÓN PARA LA SEPARACIÓN DE PA1 EN PRESENCIA DE UNA PROPORCIÓN DEL 5 % DE ISOPA1

min	%A	%B	mL/min
5	60	40	0,4
7	100	0	0,4
9	100	0	0,4
10	100	0	0,4
11	60	40	0,4

A = metanol; B = agua:acetonitrilo:ácido acético ( 70:30:1,6)

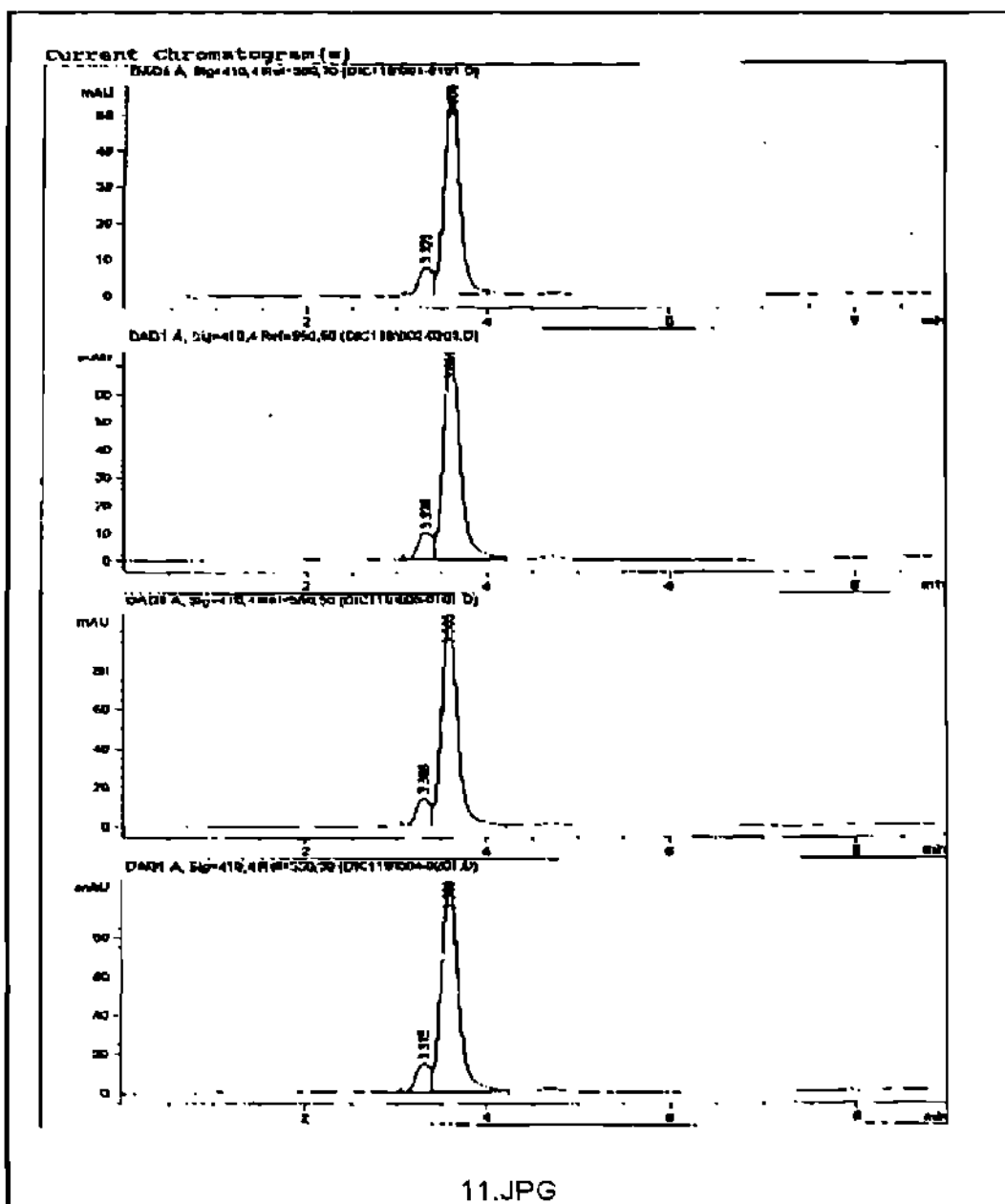


Figura 12. Cromatogramas que Muestran la Repetibilidad de la Separación Analítica Obtenida con las Condiciones de Elución de este Estudio.

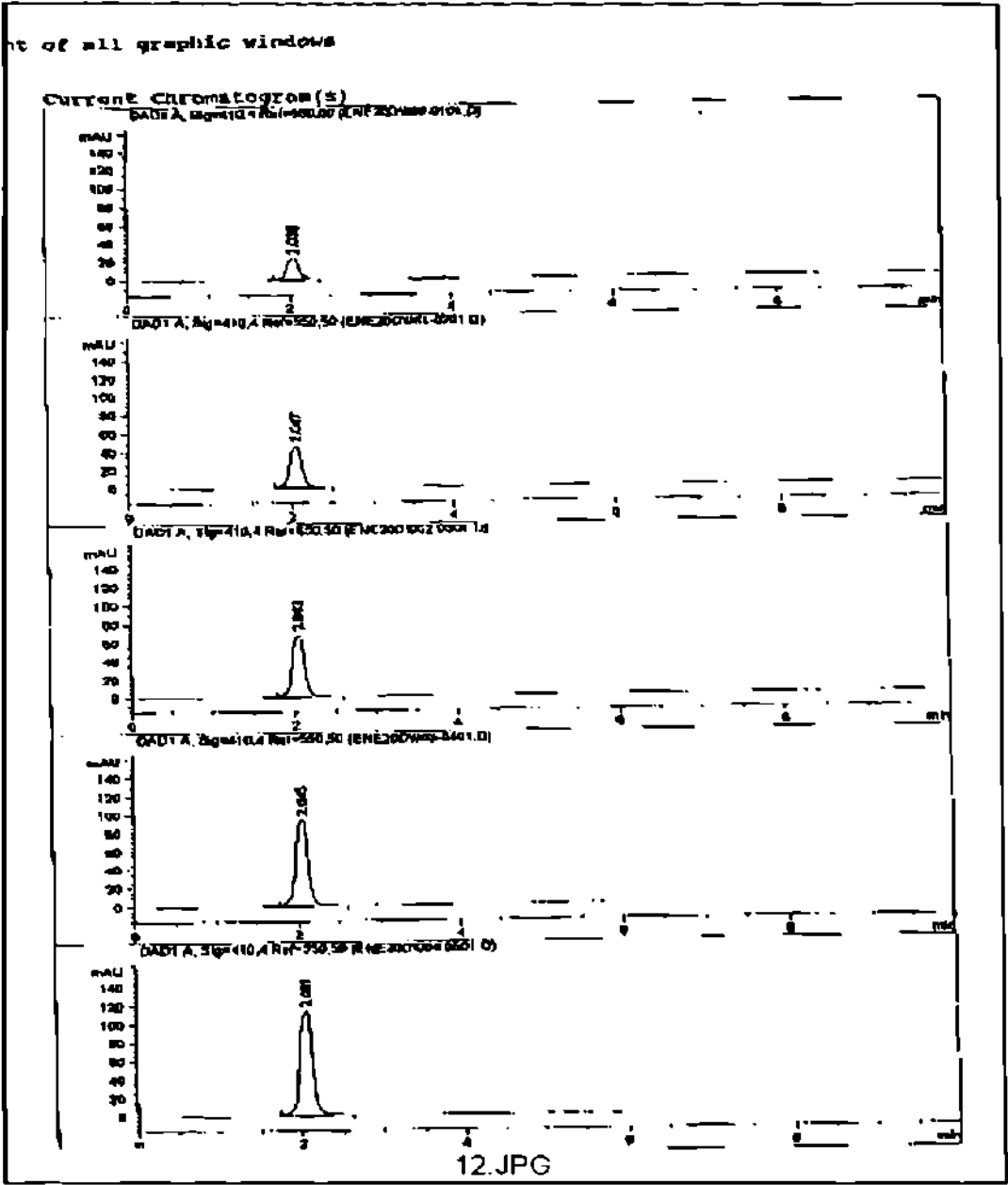


Figura 13. Cromatogramas en los que se aprecia la Proporcionalidad de la Respuesta en un Intervalo de Concentración de 60 ng/μL.

TABLA 13

LINEALIDAD DE LA RESPUESTA  
1 – 20 ng/μL

ng/μL	Altura (mAU)			X'	s	CV	FC
	1	2	3				
1	1,01	1,08	0,96	1,02	0,06	5,88	1,02
5	4,48	4,56	5,24	4,76	0,42	8,82	0,95
10	9,80	9,05	9,84	9,56	0,45	4,71	0,96
15	14,29	12,89	13,06	13,41	0,76	5,67	0,89
20	20,04	17,89	21,78	19,90	1,95	9,80	0,99
					<b>CV</b>	<b>6,98</b>	<b>5,10</b>

TABLA 14

LINEALIDAD DE LA RESPUESTA  
20 – 100 ng/μL

ng/μL	Altura (mAU)			X'	s	CV	FC
	1	2	3				
20	14,20	18,16	17,37	16,58	2,10	12,66	0,83
40	33,94	35,91	34,97	34,94	0,99	2,83	0,87
60	48,84	49,50	49,82	49,39	0,50	1,01	0,82
80	62,96	66,23	65,62	64,94	1,74	2,68	0,81
100	80,91	91,30	86,24	86,15	5,20	6,04	0,86
					<b>CV</b>	<b>5,04</b>	<b>3,57</b>

**3.3.- Obtención de la Ecuación de Velocidad de la Degradación de Dos Lotes de Peroxisomicina A1 con Diferente Contenido de Isoperoxisomicina A1 Cada Uno, en Estado Sólido a - 22°C y -4°C en Oscuridad.**

**3.3.1. Estudio de Estabilidad de Estándares**

En la tabla 15 están tabulados el promedio, el límite superior e inferior de prevención, el límite superior e inferior de control y el comportamiento de la concentración de las muestras colocadas a - 22°C, en el estudio de estabilidad de PA1.

Con los datos de la tabla 15 se elaboró la curva control de Schewart que se encuentra en la figura 14.

**TABLA 15**

**DATOS DE LA ESTABILIDAD DE ESTÁNDARES DE PA1**

Semana	ng/μL	LSC	LSP	Promedio	LIP	LIC
17-feb-99	59,15	63,81	61,91	58,08	54,26	52,35
25-feb-99	60,36	63,81	61,91	58,08	54,26	52,35
3-mar-99	57,85	63,81	61,91	58,08	54,26	52,35
10-mar-99	59,44	63,81	61,91	58,08	54,26	52,35
17-mar-99	53,13	63,81	61,91	58,08	54,26	52,35
24-mar-99	58,12	63,81	61,91	58,08	54,26	52,35
7-abr-99	62,88	63,81	61,91	58,08	54,26	52,35
14-abr-99	66,05	63,81	61,91	58,08	54,26	52,35
20-abr-99	75,80	63,81	61,91	58,08	54,26	52,35

LSC= límite superior de control; LSP= límite superior de prevención; LIP= Límite inferior de prevención; LIC= límite inferior de control.

### Estabilidad de Estándares de PA1

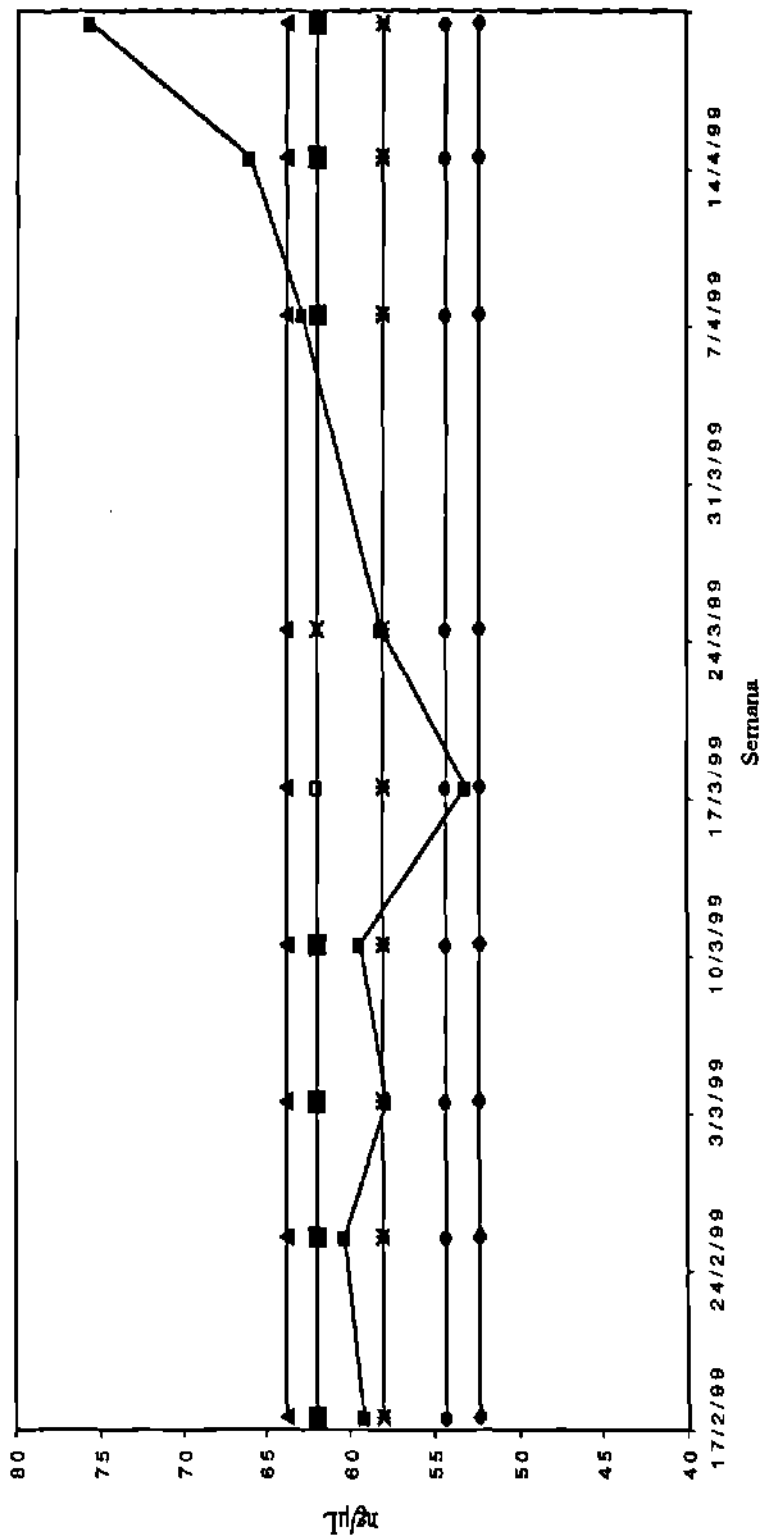


Figura 14. Gráfica de Control de Schewart para el Control de la Estabilidad de Estándares de PA1.

### **3.3.2 Degradación Acelerada**

Los valores de la concentración con respecto al tiempo a 25°C, 30°C y 50°C se encuentran en la tablas 16, 17 y 18.

En las figuras 15, 16 y 17 se encuentran la gráficas de la cinética de primer orden de la degradación acelerada a 25°C, 30°C y 50°C.

Las ecuaciones de regresión están tabuladas en la tabla 19 y la vida media calculadas con las ecuaciones de regresión del modelo cinético de primer orden se encuentra en la tabla 20.

La gráfica de Arrhenius se puede observar en la figura 18. En la tabla 21 se encuentran los valores de la vida media a  $-4^{\circ}\text{C}$  y  $-22^{\circ}\text{C}$



TABLA 16

DEGRADACIÓN DE PAI SÓLIDO A 25°C

Días	ng/μL	ln ng/μL
0	13,46	2,600
4	12,42	2,519
11	11,6	2,403
33	9,71	2,273
54	7,98	2,186

TABLA 17

DEGRADACIÓN DE PAI SÓLIDO A 30°C

Días	ng/μL	ln ng/μL
0	13,46	2,600
1	12,93	2,560
5	12,92	2,559
7	12,78	2,548
12	12,17	2,449
23	10,96	2,376
33	8,90	2,186

**TABLA 18**  
**DEGRADACIÓN DE PA1 SÓLIDO A 50°C**

Días	ng/ $\mu$ L	ln ng/ $\mu$ L
0	13,46	2,600
4	11,77	2,466
8	10,50	2,351
12	9,32	2,232
25	4,25	1,447
33	2,42	0,887

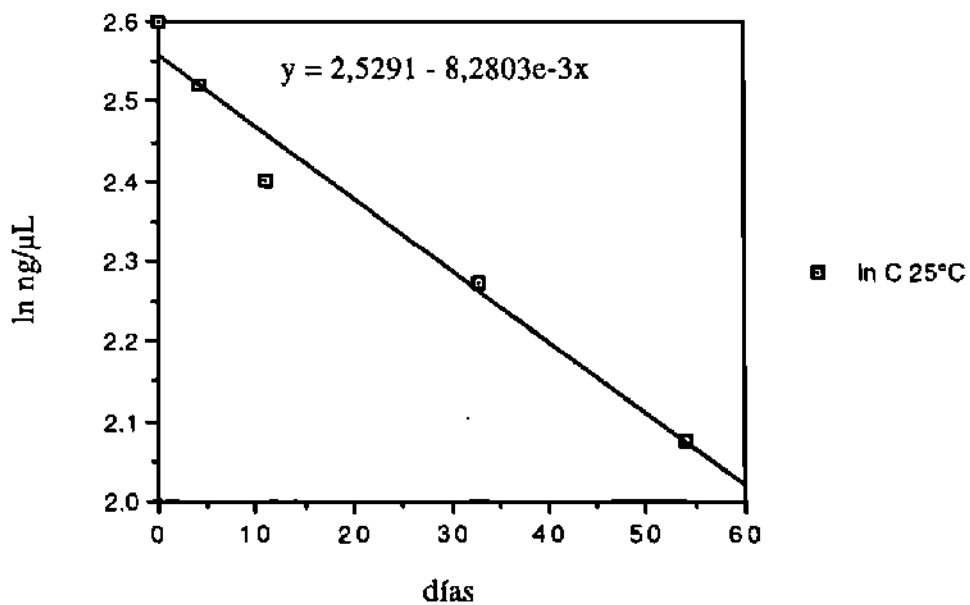


Figura 15. Cinética de Primer Orden de la Degradación Acelerada de PA1 a 25°C

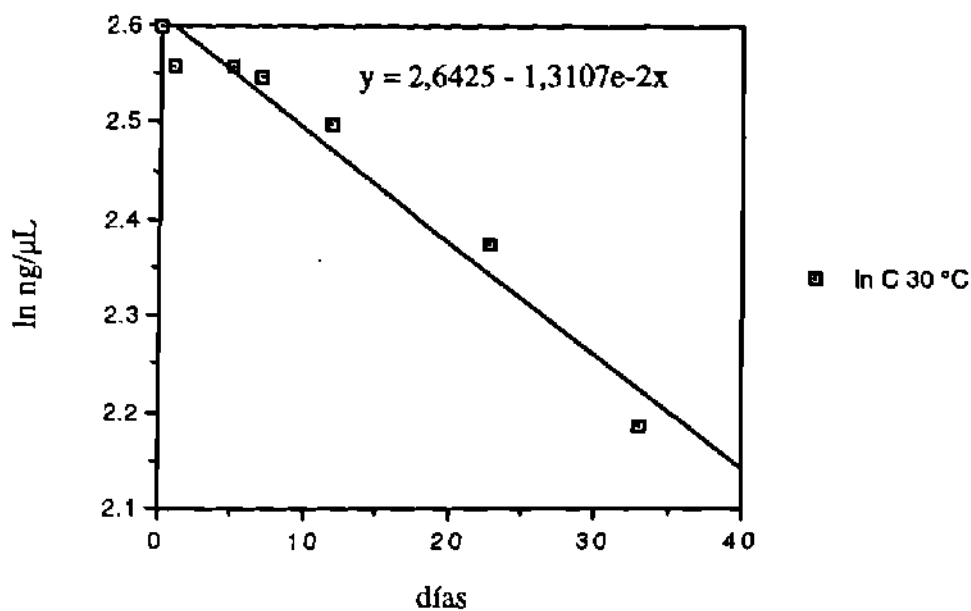


Figura 16. Cinética de Primer Orden de la Degradación Acelerada de PA1 a 30°C

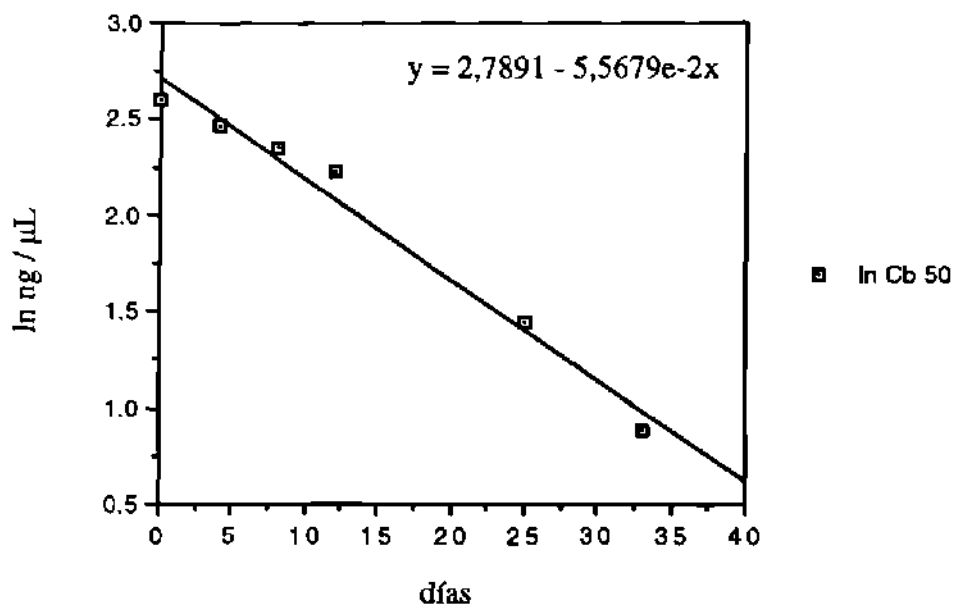


Figura 17. Cinética de Primer Orden de la Degradación Acelerada de PA1 a 50°C

TABLA 19

ECUACIONES DE REGRESIÓN DE GRADACIÓN ACCELERADA DE PA1  
(CINÉTICAS DE PRIMER ORDEN)

°C	Ecuación
25	$Y = 2,5291 - 8,2803 E - 3 X$
30	$Y = 2,6425 - 1,3107 E - 2 X$
50	$Y = 2,7891 - 5,5679 E - 2 X$

TABLA 20

VIDA MEDIA (t 1/2) DE PA1 A DIFERENTES TEMPERATURAS

(°C)	K	1/K	t 1/2	
			días	meses
25	298	3,356E-3	111,12	3,70
30	303	3,300E-3	78,85	2,63
50	323	3,096E-3	21,19	0,71

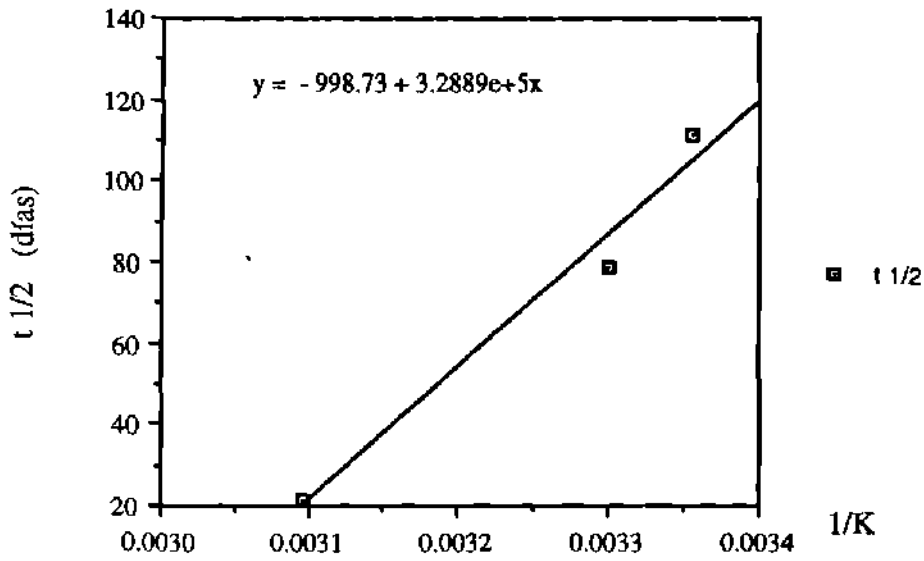


Figura 18. Gráfica de Arrhenius

TABLA 21

EXTRAPOLACIÓN DE LA VIDA MEDIA DE PA1  
A - 22°C Y - 4°C

°C	t 1/2	
	Días	Meses
-4	223,9	7,46
-22	311,6	10,38

### **3.3.3 Obtención de la Ecuación de Velocidad de la Degradación de Dos lotes de Peroxisomicina A1 con Diferente Contenido de Isoperoxisomicina A1 Cada Uno, en Estado Sólido, a $-22^{\circ}\text{C}$ y $-4^{\circ}\text{C}$ , en Oscuridad.**

Los datos de las cinéticas de degradación de PA1 en estado sólido se encuentran en las tablas 22 y 23. En la primera de ellas se encuentran los datos de dos réplicas de la variación de la concentración con respecto al tiempo. En la tabla 23 está tabulado el logaritmo natural de la concentración de la solución de PA1, dos réplicas, con respecto al tiempo.

En las figuras 19, 20, 21 y 22 están las gráficas de las cinéticas de primer orden, por duplicado, de los experimentos numerados como: A, B, C, D.

En la tabla 24 se encuentran las constantes de velocidad calculadas con los resultados del estudio de degradación de PA1.

TABLA 22

DATOS DE LAS CINÉTICAS DE DEGRADACIÓN DE PAI SÓLIDA  
(ng/ $\mu$ L)

Días	ng/ $\mu$ L							
	Experimento							
	A1	A2	B1	B2	C1	C2	D1	D2
0	12,092	12,092	12,092	12,092	12,092	12,092	12,092	12,092
95	12,807	11,134	10,176	11,023	12,409	11,246	11,588	10,697
159	11,134	10,176	10,381	10,381	11,473	10,381	10,913	9,875
236	9,777	9,025	9,583	9,583	9,875	9,488	9,875	9,025
347	8,166	8,085	8,758	8,415	9,300	8,449	8,935	8,166
414	8,248	7,136	8,585	8,331	8,935	8,331	8,758	8,758
440	7,099	7,538	8,004	8,004	8,248	8,085	8,415	7,463

Experimento: A = - 22°C, lote 82 (4,85 % isoPA1); B = - 22°C, lote 83 (3,69% isoPA1); C = -4°C, lote 82 (4,85 % isoPA1); D = - 4°C, lote 83 (3,69% isoPA1)

TABLA 23

DATOS DE LAS CINÉTICAS DE DEGRADACIÓN DE PAI SÓLIDA  
(ln ng/ $\mu$ L)

Días	ln ng/ $\mu$ L							
	Experimento							
	A1	A2	B1	B2	C1	C2	D1	D2
0	2,49	2,49	2,49	2,49	2,49	2,49	2,49	2,49
95	2,41	2,41	2,32	2,40	2,52	2,42	2,45	2,37
159	2,35	2,32	2,34	2,34	2,44	2,34	2,39	2,29
236	2,28	2,20	2,26	2,24	2,29	2,25	2,29	2,20
347	2,10	2,09	2,17	2,13	2,23	2,14	2,19	2,10
414	2,11	1,99	2,15	2,12	2,19	2,12	2,17	2,17
440	1,96	2,02	2,08	2,08	2,11	2,09	2,13	2,01

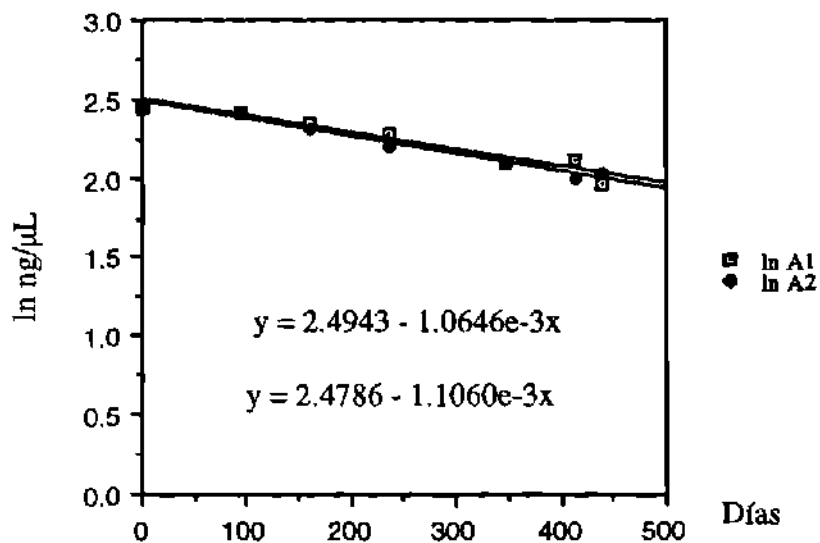


Figura 19 . Gráfica de la Cinética de Primer Orden Bajo las Condiciones del Experimento A

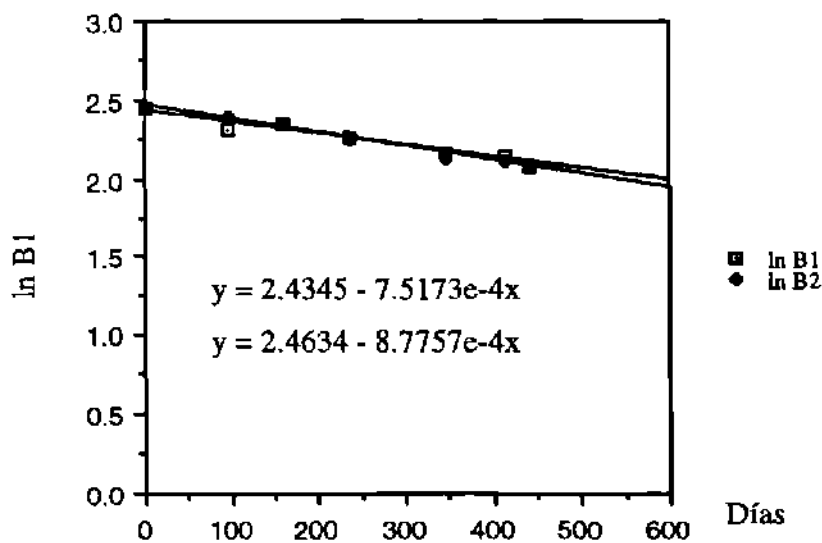


Figura 20 . Gráfica de la Cinética de Primer Orden Bajo las Condiciones del Experimento B.



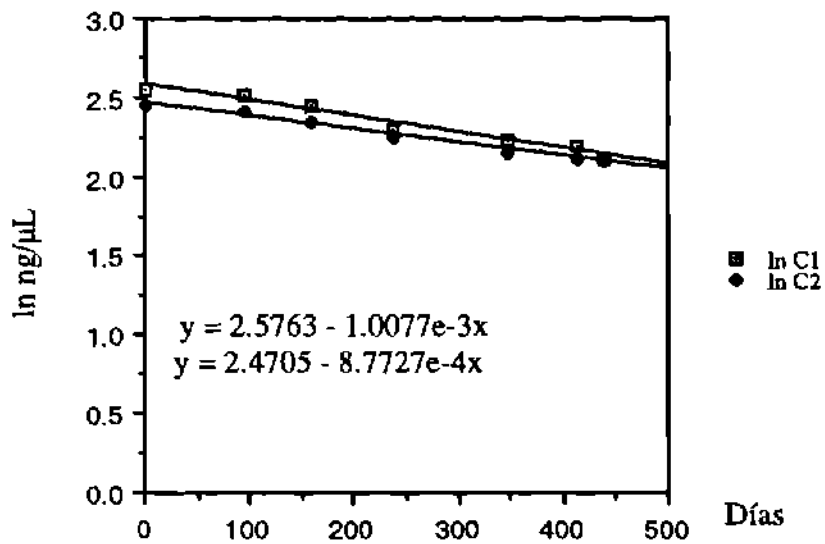


Figura 21. Gráfica de la Cinética de Primer Orden Bajo las Condiciones del Experimento C

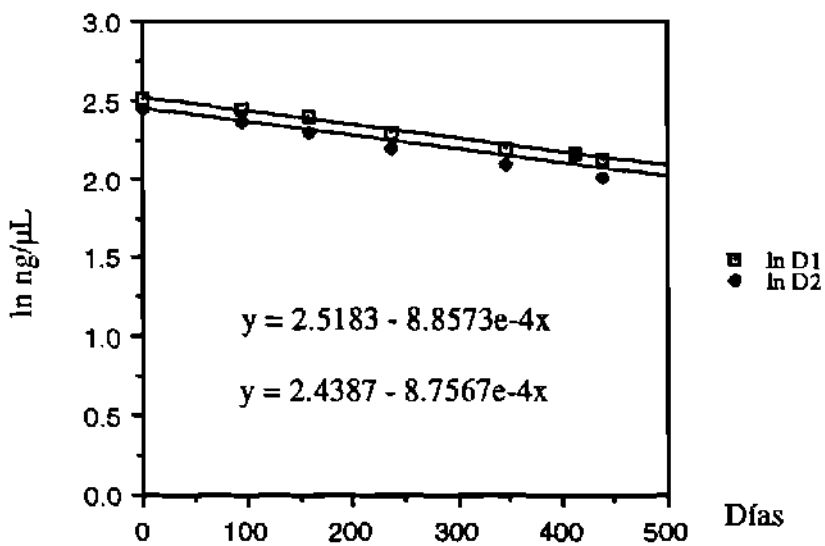


Figura 22. Gráfica de la Cinética de Primer Orden Bajo las Condiciones del Experimento D

TABLA 24

CONSTANTES DE VELOCIDAD DEL ESTUDIO DE DEGRADACIÓN DE PA1  
EN ESTADO SÓLIDO

Experimento	k(E3) (dias-1)	
	1	2
A	1,0646	1,1060
B	0,7518	0,8776
C	1,0077	0,8773
D	0,8857	0,8757

**3.4 Determinación del Efecto de la Adición de isoPeroxisomicina A1, Ácido Ascórbico y Bisulfito de Sodio, sobre la Velocidad de Degradación de un Lote de PA1 en: Metanol, Buffer de Fosfatos de pH 7,4, Suero y Acetato de Etilo a – 4°C, 25°C y 37°C en Oscuridad a Condiciones Aeróbicas.**

En las secciones: 3.4.1, 3.4.2 y 3.4.3 se encuentran las tablas y las figuras con los datos y las gráficas del estudio de degradación de PA1 en metanol a – 4°C, 25 °C y 37°C a las condiciones experimentales señaladas en la tabla 9 de la sección 2.5.

En las secciones: 3.4.4, 3.4.5 y 3.4.6 se encuentran las tablas y las figuras con los datos y las gráficas del estudio de degradación de PA1 en buffer de fosfatos a pH 7,4, a : – 4°C; 25°C y 37°C, a las condiciones experimentales de la tabla 9.

En las secciones: 3.4.7, 3.4.8 y 3.4.9 se encuentran las tablas y las figuras con los datos y las gráficas del estudio de degradación de PA1 en suero a : – 4°C; 25°C y 37°C, a las condiciones experimentales de la tabla 9.

En las secciones: 3.4.10, 3.4.11 y 3.4.12 se encuentran las tablas y las figuras con los datos y las gráficas del estudio de degradación de PA1 en acetato de etilo a : – 4°C; 25°C y 37°C, a las condiciones experimentales de la tabla 9.

### **3.4.1 Degradación de PA1 en Metanol**

#### **3.4.1.1 Degradación de PA1 en Metanol a $-4^{\circ}\text{C}$**

En la tabla 25 están tabulados los datos del estudio de degradación de PA1 en metanol a  $-4^{\circ}\text{C}$  en  $\text{ng}/\mu\text{L}$ . En la tabla 26 se tabuló el logaritmo natural de los datos de la tabla 25.

En las figuras 23, 24, 25, 26, 27 y 28 se graficaron las cinéticas de la tabla 26, las cuales corresponden con un modelo cinético de primer orden.

En la figura 23 se graficaron los resultados del experimento A: degradación de PA1 sin agregar deliberadamente ningún otro compuesto.

La figura 24 corresponde con la grafica de los datos de la degradación obtenida en el experimento B, en el que se agregó además de PA1, isopA1.

La figura 25 corresponde con la gráfica de la degradación de PA1 cuando se le agregó isopA1 y ácido ascórbico, este fue el experimento C.

La figura 26 es la gráfica de la degradación de PA1 en presencia de ácido ascórbico, experimento D.

Las figuras 27 y 28 corresponden con la degradación de PA1 en presencia de isopA1 y bisulfito de sodio para la primera y con bisulfito para la segunda, los experimentos son los E y F respectivamente.

TABLA 25

DATOS DEL ESTUDIO DE DEGRADACIÓN DE PAI EN METANOL A -4°C  
(ng/μL)

h	A			B			C			D			E			F		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
0	9,51	9,51	9,51	9,51	9,51	9,51	9,51	9,51	9,51	9,51	9,51	9,51	9,51	9,51	9,51	9,51	9,51	9,51
99	8,71	9,67	9,85	8,65	9,59	10,19	8,63	9,67	10,20	8,73	9,40	9,94	8,92	9,70	10,27	9,16	9,61	10,33
193	8,60	9,37	8,98	9,05	8,94	9,49	9,18	8,97	9,14	8,46	8,79	9,41	9,16	8,87	9,72	8,94	9,12	9,03
313	8,25	8,03	8,46	8,27	7,99	8,13	7,82	7,81	8,61	7,88	8,02	8,30	8,40	8,41	8,87	8,05	8,13	8,80
434	7,77	7,77	7,42	8,14	7,59	7,43	8,04	7,24	7,18	7,77	7,16	6,80	7,60	7,19	6,45	7,50	7,60	7,02
598	6,65	5,51	6,12	6,19	5,85	6,20	6,34	5,63	5,49	5,62	5,97	5,67	6,13	6,00	6,00	6,32	6,02	6,12

Condiciones experimentales: A = PAI; B = PAI + isoPAI; C = PAI + isoPAI + ácido ascórbico; D = PAI + ácido ascórbico; E = PAI + isoPAI + bisulfito de sodio F = PAI + bisulfito de sodio

TABLA 26

DATOS DE LA DEGRADACIÓN DE PA1 EN METANOL A -4°C  
(ln ng/μL)

h	A			B			C			D			E			F		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
0	2,25	2,25	2,25	2,25	2,25	2,25	2,25	2,25	2,25	2,25	2,25	2,25	2,25	2,25	2,25	2,25	2,25	2,25
99	2,16	2,27	2,29	2,16	2,27	2,32	2,16	2,27	2,32	2,17	2,24	2,30	2,19	2,27	2,33	2,21	2,26	2,34
193	2,15	2,24	2,19	2,20	2,19	2,25	2,22	2,19	2,21	2,14	2,17	2,24	2,21	2,18	2,27	2,19	2,21	2,20
313	2,11	2,08	2,14	2,11	2,08	2,10	2,06	2,06	2,15	2,06	2,08	2,12	2,13	2,13	2,18	2,09	2,10	2,17
434	2,05	2,05	2,00	2,10	2,03	2,01	2,08	1,98	1,97	2,05	1,97	1,92	2,03	1,97	1,86	2,01	2,03	1,95
598	1,89	1,71	1,81	1,82	1,77	1,82	1,85	1,73	1,70	1,73	1,79	1,74	1,81	1,79	1,79	1,84	1,80	1,81

Condiciones experimentales: A = PA1; B = PA1 + isoPA1; C = PA1 + isoPA1 + ácido ascórbico; D = PA1 + ácido ascórbico; E = PA1 + isoPA1 + bisulfito de sodio F = PA1 + bisulfito de sodio

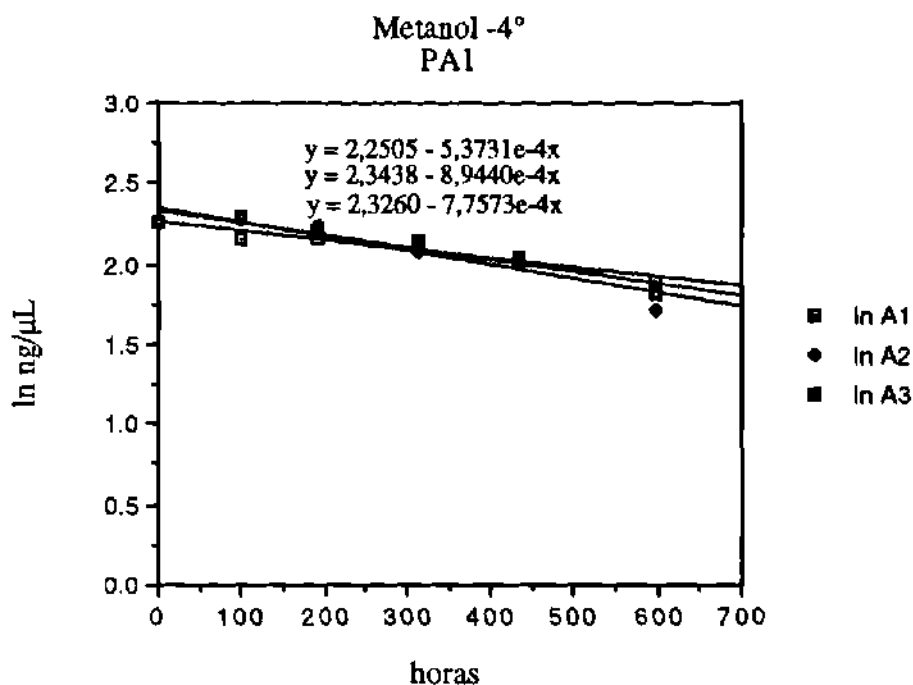


Fig 23. Cinéticas de Primer Orden de la Degradación de PA1 en Metanol a  $-4^{\circ}\text{C}$ . Experimento A.

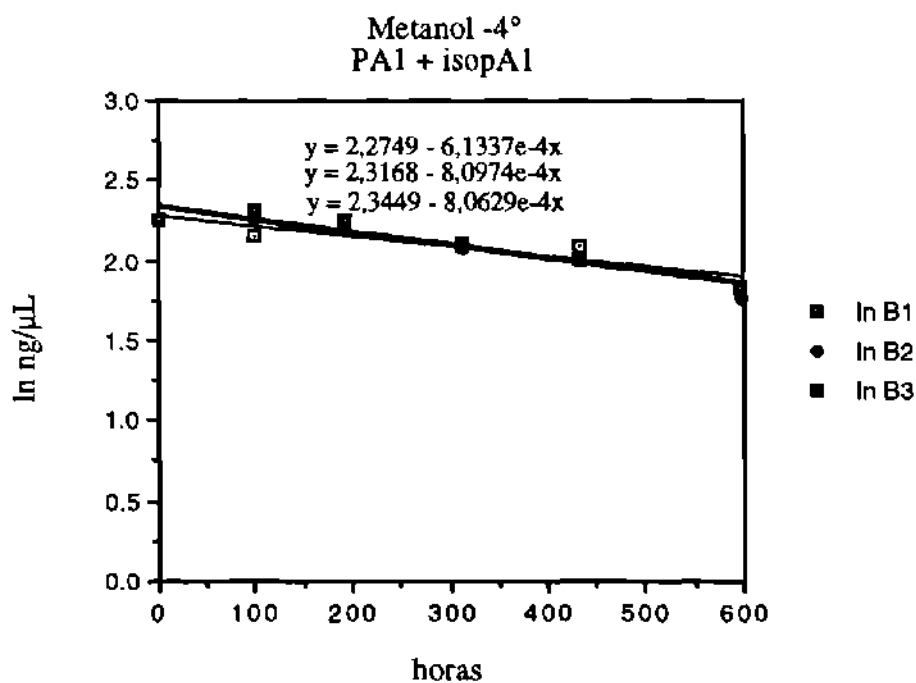


Fig 24. Cinéticas de Primer Orden de la Degradación de PA1 en Metanol a  $-4^{\circ}\text{C}$ . Experimento B.

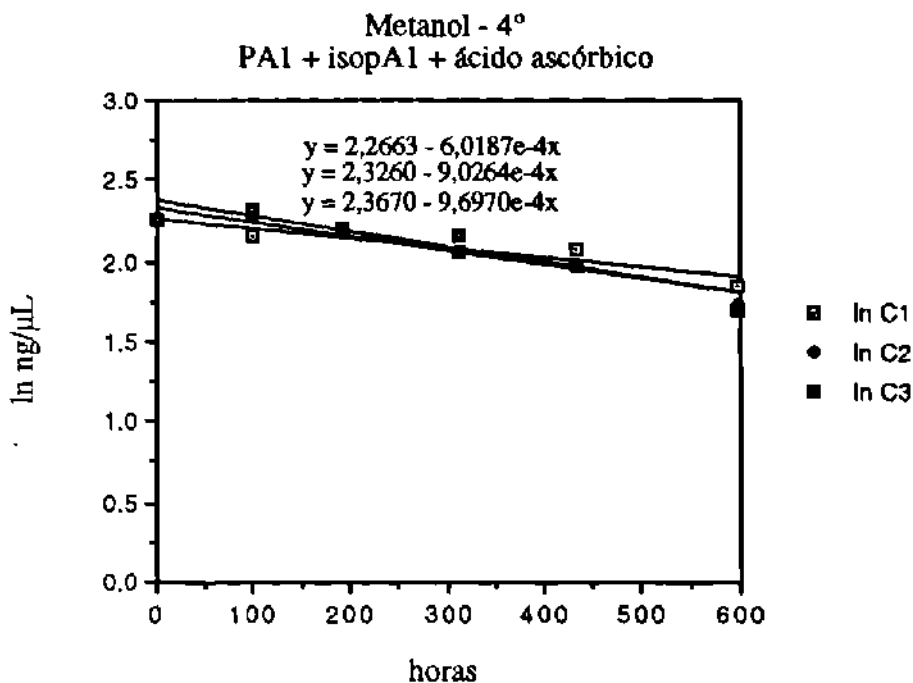


Fig 25. Cinéticas de Primer Orden de la Degradación de PA1 en Metanol a  $-4^{\circ}\text{C}$ . Experimento C.

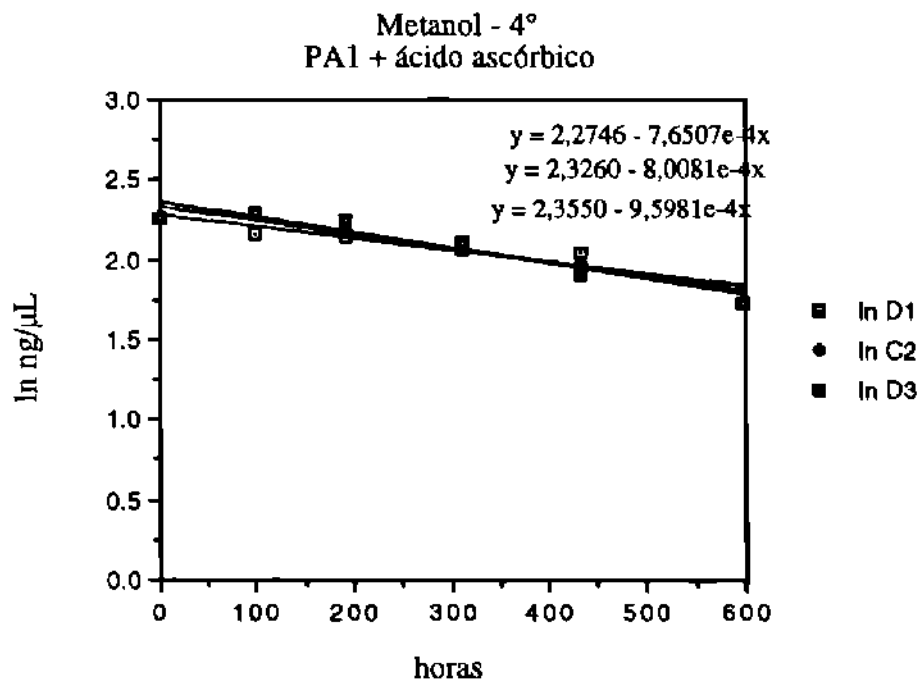


Fig 26. Cinéticas de Primer Orden de la Degradación de PA1 en Metanol a  $-4^{\circ}\text{C}$ . Experimento D.



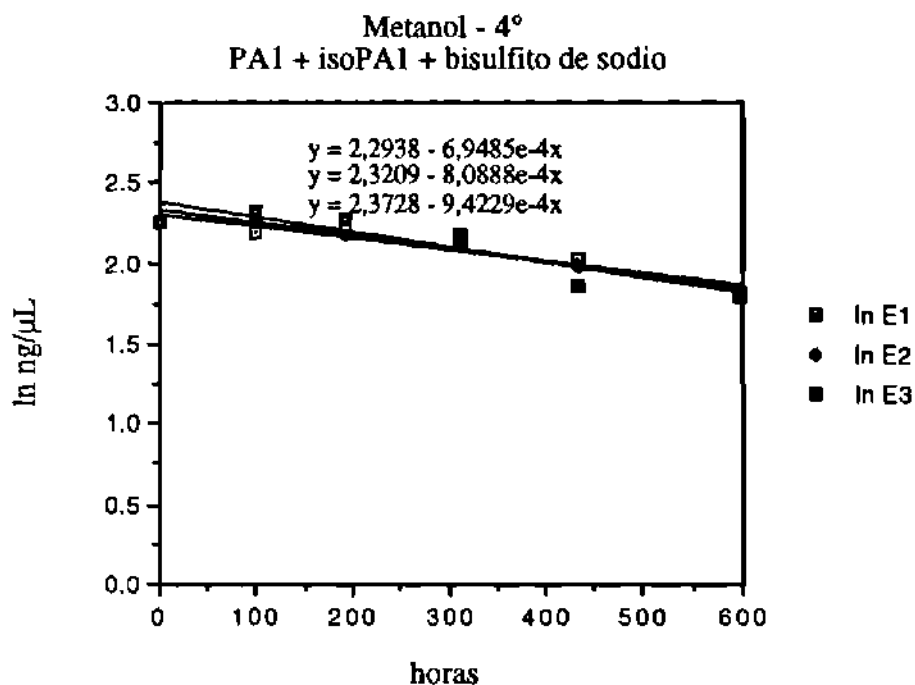


Fig 27. Cinéticas de Primer Orden de la Degradación de PA1 en Metanol a -4°C. Experimento E.

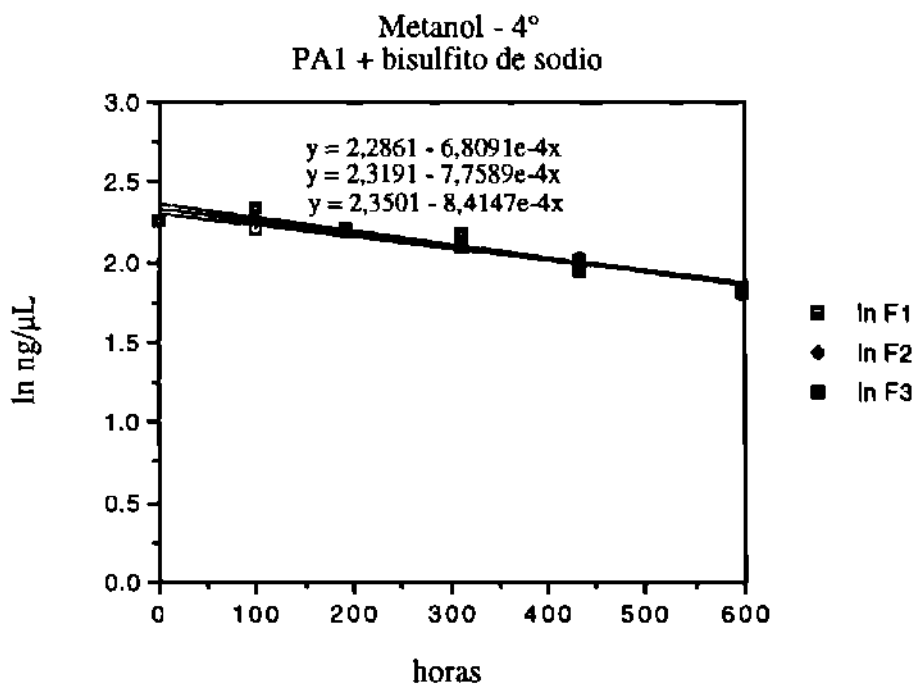


Fig 28. Cinéticas de Primer Orden de la Degradación de PA1 en Metanol a -4°C. Experimento F.

### **3.4.1.2 Degradación de PA1 en Metanol a 25°C**

En la tabla 27 están tabulados los datos del estudio de degradación de PA1 en metanol a  $-25^{\circ}\text{C}$  en  $\text{ng}/\mu\text{L}$ . En la tabla 28 se tabuló el logaritmo natural de los datos de la tabla 27.

En las figuras 29, 30, 31, 32, 33 y 34 se graficaron las cinéticas de la tabla 28, los cuales corresponden con un modelo cinético de primer orden.

En la figura 29 se graficaron los resultados del experimento A: degradación de PA1 sin agregar deliberadamente ningún otro compuesto.

La figura 30 corresponde con la gráfica de los datos de la degradación obtenida en el experimento B, en el que se agregó además de PA1, isopA1.

La figura 31 corresponde con la gráfica de la degradación de PA1 cuando se le agregó isopA1 y ácido ascórbico, éste fue el experimento C.

La figura 32 es la gráfica de la degradación de PA1 en presencia de ácido ascórbico, experimento D.

Las figuras 33 y 34 corresponden con la degradación de PA1 en presencia de isopA1 y bisulfito de sodio para la primera y con bisulfito para la segunda, estos son los experimentos E y F respectivamente.

TABLA 27

DATOS DE LA CINÉTICAS DE DEGRADACIÓN DE PAI EN METANOL A 25°C  
ng/ $\mu$ L

h	A			B			C			D			E			F		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
0	7,10	7,10	7,10	7,10	7,10	7,10	7,10	7,10	7,10	7,10	7,10	7,10	7,10	7,10	7,10	7,10	7,10	7,10
24	6,27	7,13	6,30	7,02	6,23	6,55		6,29	6,96	6,17	6,46	6,79	6,62	6,82	6,55	7,17	6,96	7,03
46		6,42	5,92	6,89			6,62	5,64	6,36	6,86	6,52	4,97	6,65	7,32	6,47	7,00	6,80	6,81
72	6,44	6,32	5,71		5,53	6,11	6,36		5,98	5,98	5,94	6,25	6,32	6,57	6,43	6,13	7,32	6,30
98	5,21	5,27	4,92	7,12	5,42	5,73	6,88	5,44	5,79	5,78	4,20	4,26	5,25	5,17	5,32	5,47	6,77	6,32
169	5,29	2,48	3,00	4,10	4,21	4,58	5,84	4,28	5,27	3,45	5,93		4,19	4,71	4,57	4,89	4,63	5,12
241	3,65	3,17	2,25	4,88	1,93	2,93	4,88	4,27	3,93	3,54	3,70	1,26	3,92	3,89	3,23	4,52	3,38	4,07
408	2,59	1,14	1,24	3,30	2,38	2,23	3,40	2,21	2,67	0,98	1,02	1,13		1,48	2,19	3,31	2,47	2,17
505	2,34	0,91	0,71	1,61	2,14	1,12	1,38	1,87	1,70		0,82	0,80	1,38	1,76	0,67	1,35	1,05	
551	0,34	0,34	0,34	0,56	0,56	0,56	1,20	1,20	1,20	0,28	0,28	0,28	0,44	0,44	0,44	2,07	2,07	2,07

Condiciones experimentales: A = PAI; B = PAI + isoPAI; C = PAI + isoPAI + ácido ascórbico; D = PAI + ácido ascórbico; E = PAI + isoPAI + bisulfito de sodio F = PAI + bisulfito de sodio. Los datos de los espacios en blanco fueron descartados ya que los valores no coincidían con el comportamiento observado.

TABLA 28

DATOS DE LA CINÉTICAS DE DEGRADACIÓN DE PAI EN METANOL A 25°C  
(ln ng/μL)

h	A			B			C			D			E			F		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
0	1,96	1,96	1,96	1,96	1,96	1,96	1,96	1,96	1,96	1,96	1,96	1,96	1,96	1,96	1,96	1,96	1,96	1,96
24	1,84	1,96	1,84	1,95	1,83	1,88		1,84	1,94	1,84	1,82	1,87	1,92	1,89	1,92	1,88	1,97	1,94
46		1,86	1,78	1,93			1,89	1,73	1,85	1,85	1,93	1,87	1,60	1,89	1,99	1,87	1,95	1,92
72	1,86	1,84	1,74		1,71	1,81	1,85		1,79	1,79	1,79	1,78	1,83	1,84	1,88	1,86	1,81	1,99
98	1,65	1,66	1,59	1,96	1,69	1,75	1,93	1,69	1,76	1,76	1,75	1,44	1,45	1,66	1,64	1,67	1,70	1,91
169	1,67	0,91	1,10	1,41	1,44	1,52	1,76	1,45	1,66	1,66	1,24	1,78	1,11	1,43	1,55	1,52	1,59	1,53
241	1,29	1,15	0,81	1,59	1,08	1,08	1,59	1,45	1,37	1,37	1,26	1,31	0,23	1,37	1,36	1,17	1,51	1,22
408	0,95	0,13	0,22	1,19	0,80	0,80	1,22	0,79	0,98	0,98	-0,02	0,02	0,12		0,39	0,78	1,20	0,90
505	0,85	-0,09	-0,34	0,48	0,11	0,11	0,32	0,63	0,53	0,53		-0,20	-0,22	0,32	0,57	-0,40	0,30	0,05
551	-1,08	-1,08	-1,08	-0,58	-0,58	-0,50	0,18	0,18	0,18	0,18	-1,27	-1,27	-1,27	-0,82	-0,82	-0,82	0,73	0,73

Condiciones experimentales: A = PAI; B = PAI + isoPAI; C = PAI + isoPAI + ácido ascórbico; D = PAI + ácido ascórbico; E = PAI + isoPAI + bisulfito de sodio F = PAI + bisulfito de sodio. Los datos de los espacios en blanco fueron descartados ya que los valores no coincidían con el comportamiento observado

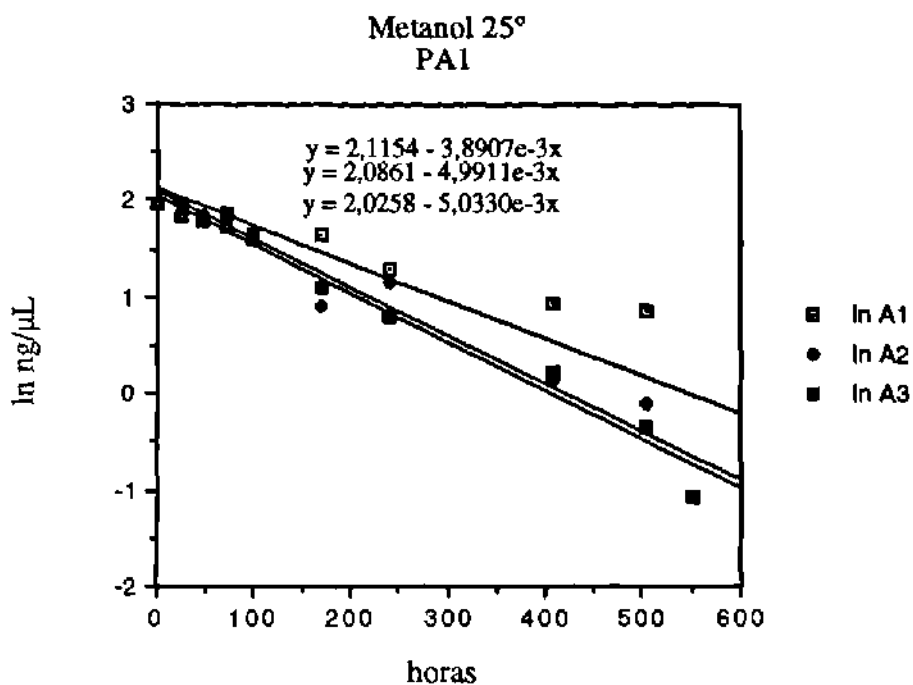


Fig 29. Cinéticas de Primer Orden de la Degradación de PA1 en Metanol a 25°C.  
Experimento A.

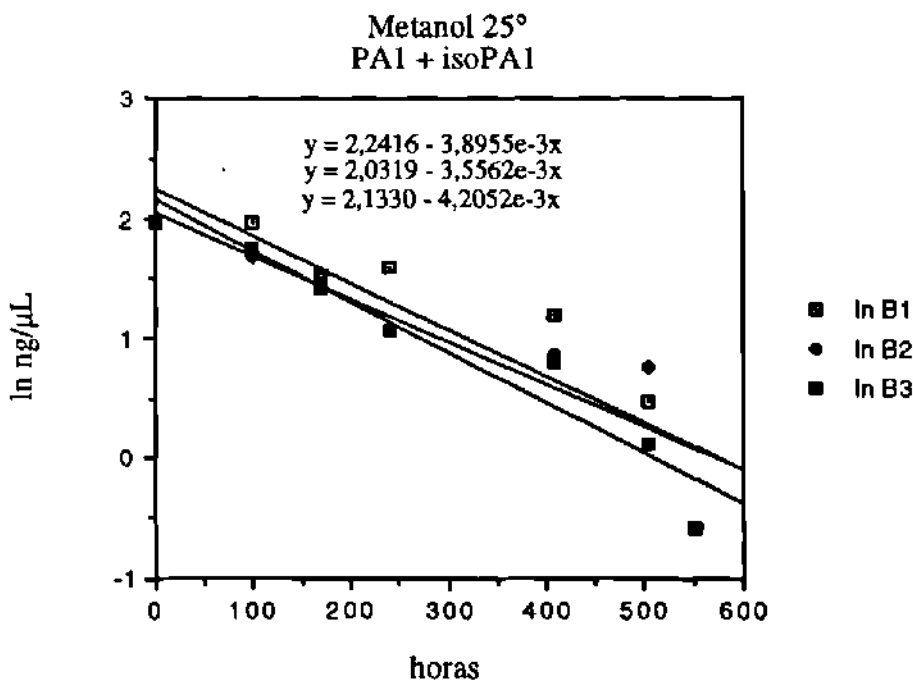


Fig 30. Cinéticas de Primer Orden de la Degradación de PA1 en Metanol a 25°C.  
Experimento B.

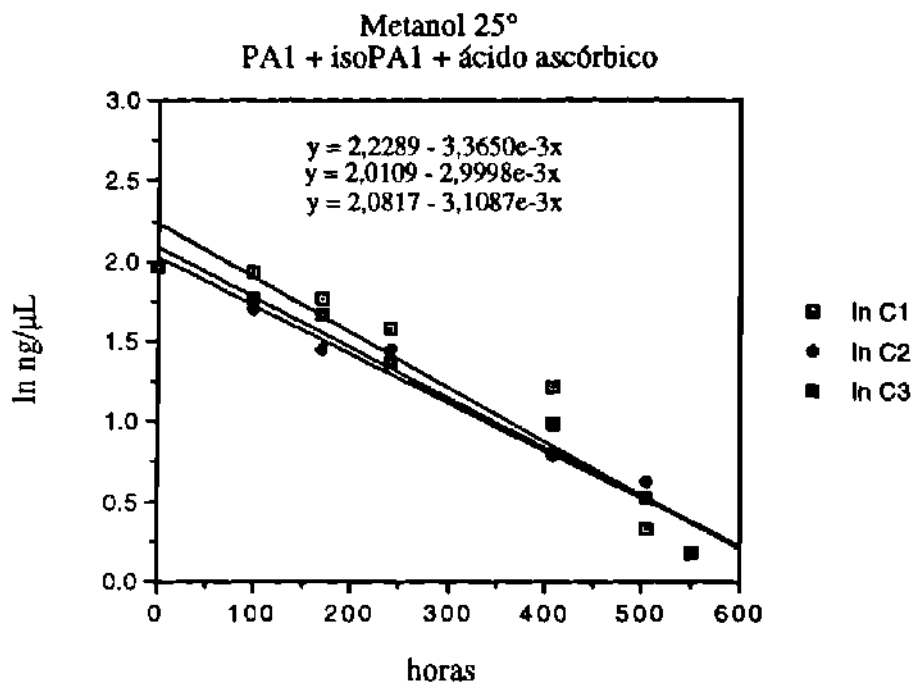


Fig 31. Cinéticas de Primer Orden de la Degradación de PA1 en Metanol a 25°C. Experimento C.

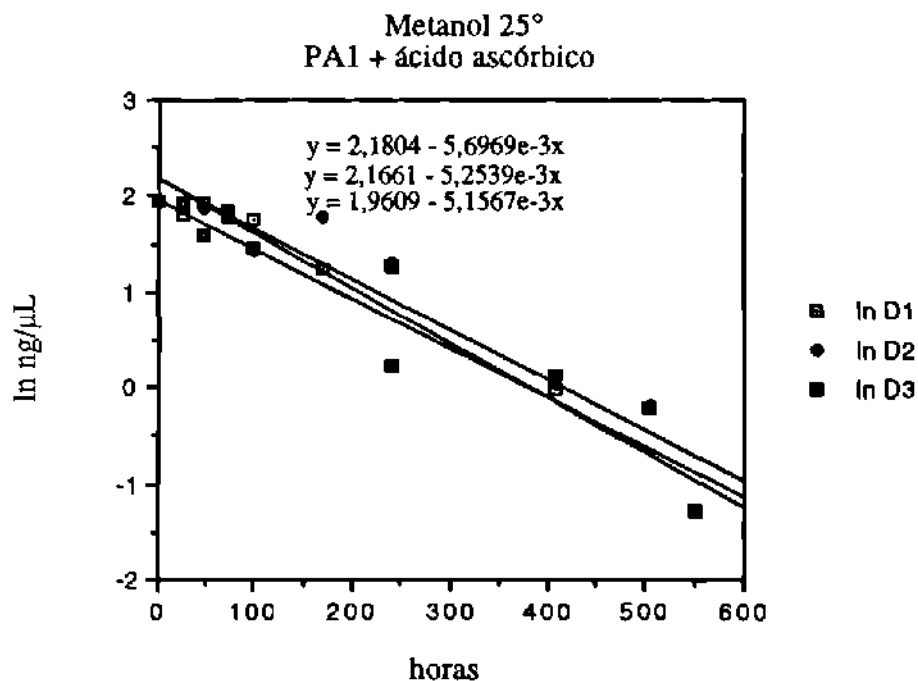


Fig 32. Cinéticas de Primer Orden de la Degradación de PA1 en Metanol a 25°C. Experimento D.

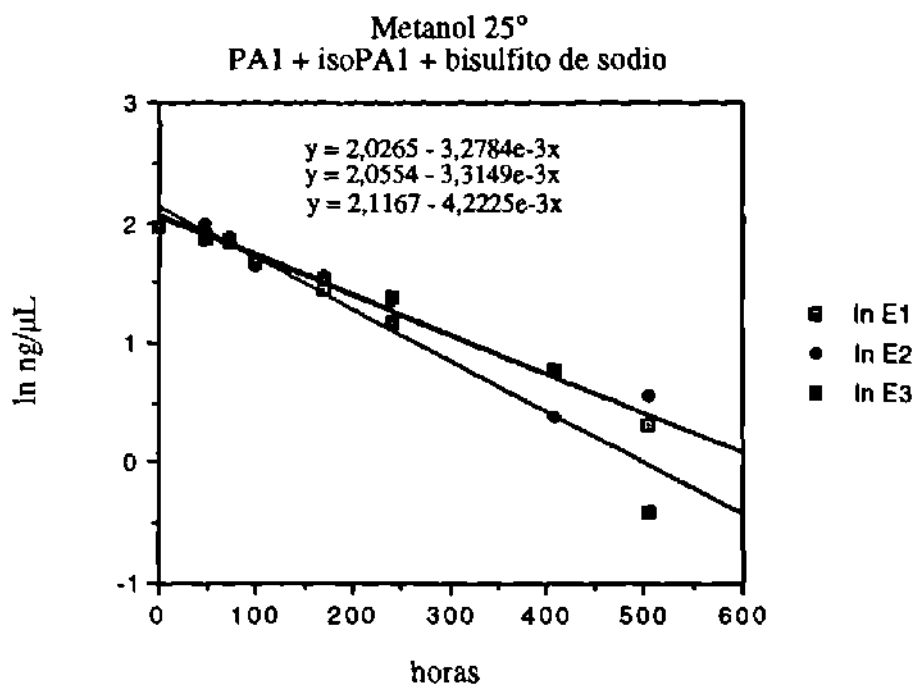


Fig 33. Cinéticas de Primer Orden de la Degradación de PA1 en Metanol a 25°C. Experimento E.

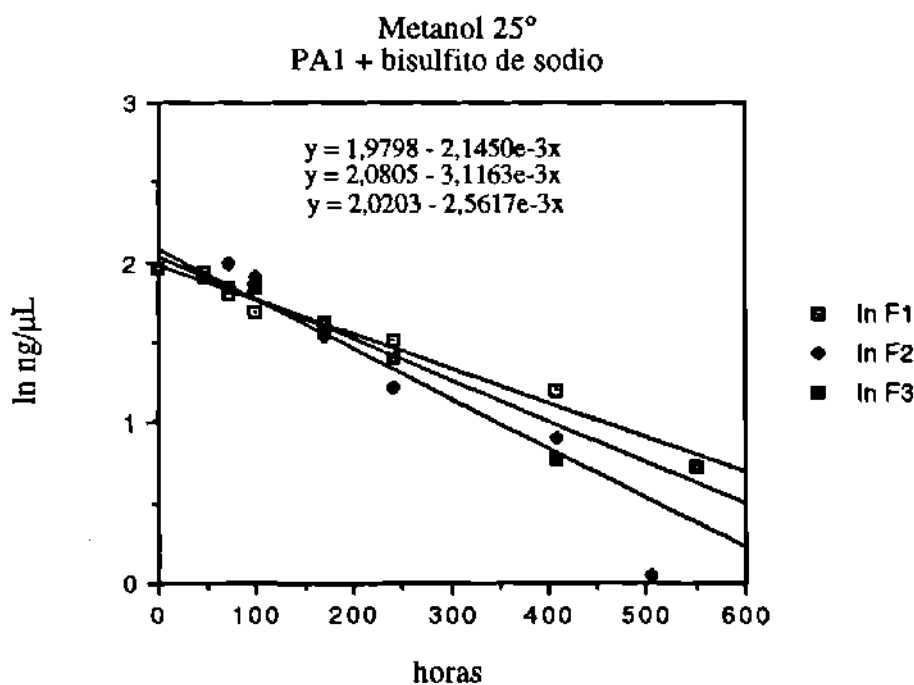


Fig 34. Cinéticas de Primer Orden de la Degradación de PA1 en Metanol a -25°C. Experimento F.

### **3.4.1.3. Degradación de PA1 en Metanol a 37°C**

En la tabla 29 están tabulados los datos del estudio de degradación de PA1 en metanol a 37°C en ng/μL. En la tabla 30 se tabuló el logaritmo natural de los datos de la tabla 29.

En las figuras 35, 36, 37, 38, 39 y 40 se graficaron las cinéticas de la tabla 30, las cuales corresponden con un modelo cinético de primer orden.

En la figura 35 se graficaron los resultados del experimento A: degradación de PA1 sin agregar deliberadamente ningún otro compuesto.

La figura 36 corresponde con la grafica de los datos de la degradación obtenida en el experimento B, en el que se agregó además de PA1, isopA1.

La figura 37 corresponde con la gráfica de la degradación de PA1 cuando se le agregó isopA1 y ácido ascórbico, éste fue el experimento C.

La figura 38 es la gráfica de la degradación de PA1 en presencia de ácido ascórbico, experimento D.

Las figuras 39 y 40 corresponden con la degradación de PA1 en presencia de isopA1 y bisulfito de sodio para la primera y con bisulfito para la segunda, estos son los experimentos E y F respectivamente.



TABLA 29

DATOS DE LAS CINÉTICAS DE DEGRADACIÓN DE PAI EN METANOL A 37°C  
(ng/ $\mu$ L)

h	A			B			C			D			E			F		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
0	11,07	11,07	11,07	11,07	11,07	11,07	11,07	11,07	11,07	11,07	11,07	11,07	11,07	11,07	11,07	11,07	11,07	11,07
11	9,61	9,19	10,88	10,15	9,98	10,15	10,59	11,35	10,08	9,94	9,65	9,78	9,97	7,26	7,61	6,67	8,18	8,18
21	8,48	9,81	7,67	8,13	8,02	9,60	10,22	10,68	8,90	8,92	9,15	8,89	6,66	6,04	6,86	6,40	7,41	6,18
46	5,13	5,20	4,98	6,42	5,69	9,40	9,32	8,09	8,88	7,87	8,11	8,42	4,23	3,94	5,23	4,34	3,93	4,48
118		3,96	2,26	3,37	2,90	2,64	4,35	4,32	5,00	3,27	4,59	5,09	2,06	1,53	1,59	1,71	1,38	1,50
143	1,60	1,80		1,91	2,28	3,92	4,24	4,09	4,80	3,59	4,15	3,54	1,89	1,43	1,34	1,48	0,92	1,42
168	0,96		1,03	1,77	1,70	1,78	2,97	3,23	3,51	3,57	3,72	3,32	0,66	0,79	0,87	0,79	0,64	0,80

Condiciones experimentales: A = PAI; B = PAI + isoPAI; C = PAI + isoPAI + ácido ascórbico; D = PAI + ácido ascórbico; E = PAI + isoPAI + bisulfito de sodio F = PAI + bisulfito de sodio. Los datos de los espacios en blanco fueron descartados ya que los valores no coincidían con el comportamiento observado.

TABLA 30

DATOS DE LAS CINÉTICAS DE DEGRADACIÓN DE PAI EN METANOL A 37°C  
(In ng/ $\mu$ L)

h	A			B			C			D			E			F		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
0	2,40	2,40	2,40	2,40	2,40	2,40	2,40	2,40	2,40	2,40	2,40	2,40	2,40	2,40	2,40	2,40	2,40	2,40
11	2,26	2,22	2,39	2,31	2,30	2,32	2,36	2,43	2,31	2,30	2,27	2,28	2,30	1,98	2,03		1,90	2,10
21	2,14	2,28	2,04	2,09	2,08	2,26	2,32	2,37	2,19	2,19	2,21	2,18	1,90	1,80	1,93	1,86	2,00	1,82
46	1,64	1,65	1,61	1,86	1,74	1,90	2,23	2,09	2,18	2,06	2,09	2,13	1,44	1,37	1,65	1,47	1,37	1,50
118		1,38	0,82	1,21	1,06	1,19	1,47	1,46	1,61	1,18	1,52	1,63	0,72	0,43	0,46	0,54	0,32	0,41
143	0,47	0,59		0,65	0,82	0,92	1,44	1,41	1,57	1,28	1,42	1,26	0,64	0,36	0,29	0,39	-0,08	0,35
168	-0,04		0,03	0,57	0,53	0,58	1,09	1,17	1,26	1,21	1,31	1,20	-0,42	-0,24	-0,14	-0,24	-0,45	-0,2

Condiciones experimentales: A = PAI; B = PAI + isoPAI; C = PAI + ácido ascórbico; D = PAI + ácido ascórbico; E = PAI + isoPAI + bisulfito de sodio F = PAI + bisulfito de sodio. Los datos de los espacios en blanco fueron descartados ya que los valores no coincidían con el comportamiento observado.

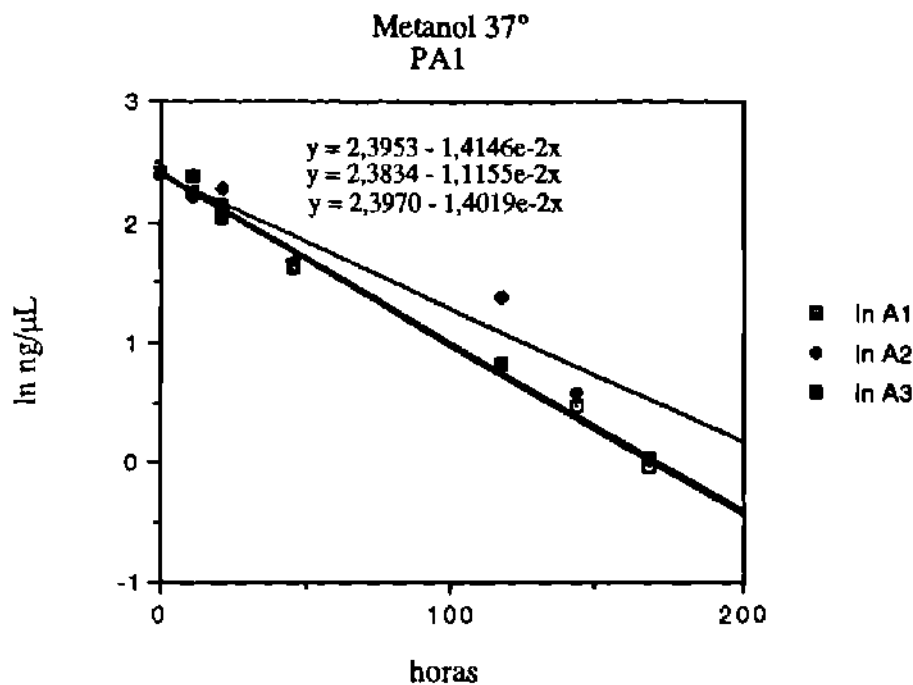


Fig 35. Cinéticas de Primer Orden de la Degradación de PA1 en Metanol a 37°C.  
Experimento A.

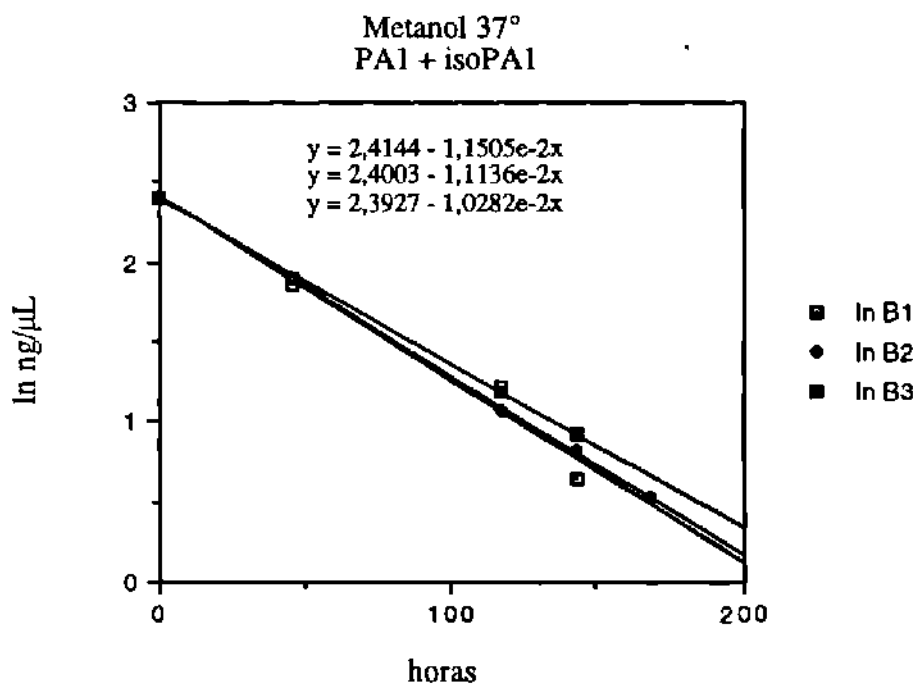


Fig 36. Cinéticas de Primer Orden de la Degradación de PA1 en Metanol a 37°C.  
Experimento B.

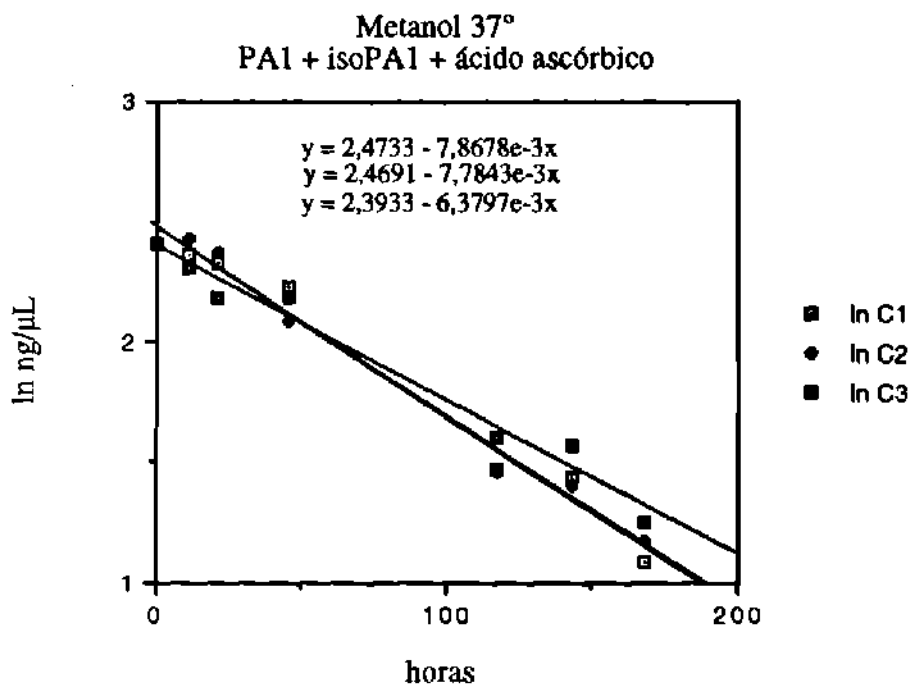


Fig 37. Cinéticas de Primer Orden de la Degradación de PAI en Metanol a 37°C. Experimento C.

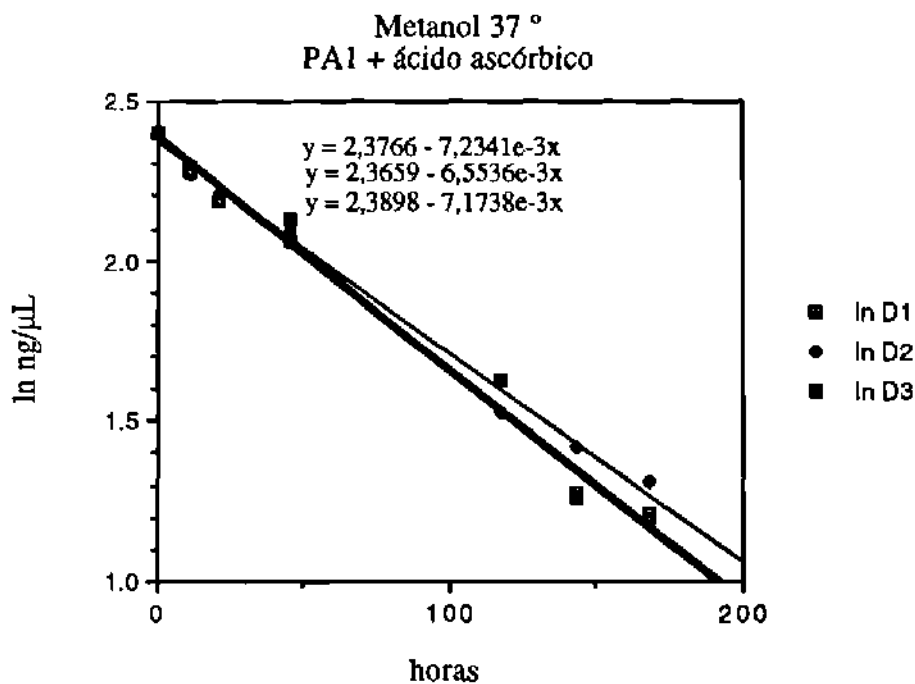


Fig 38. Cinéticas de Primer Orden de la Degradación de PAI en Metanol a 37°C. Experimento D.

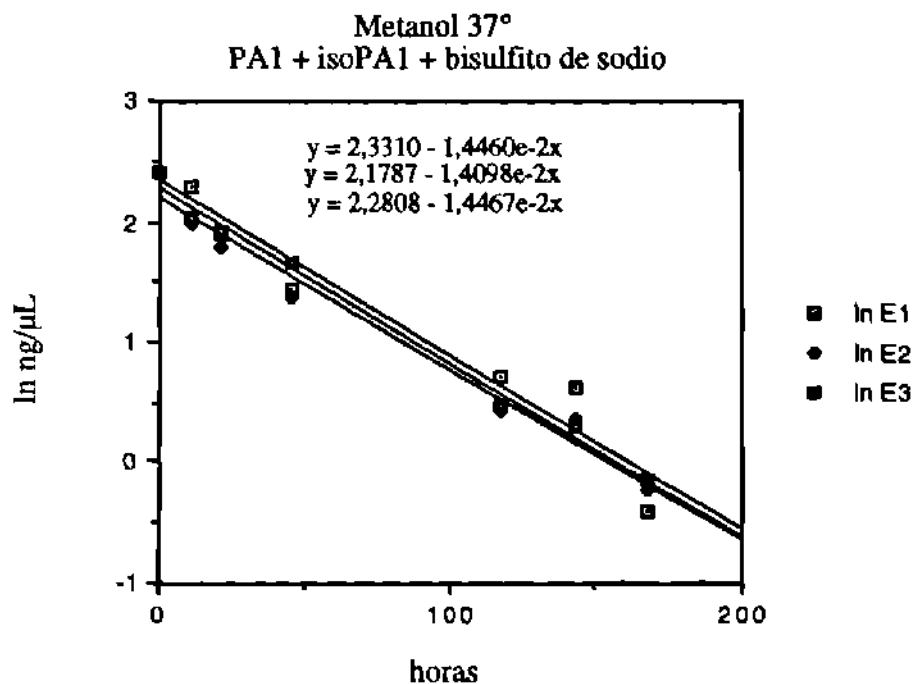


Fig 39. Cinéticas de Primer Orden de la Degradación de PA1 en Metanol a 37°C.  
Experimento E.

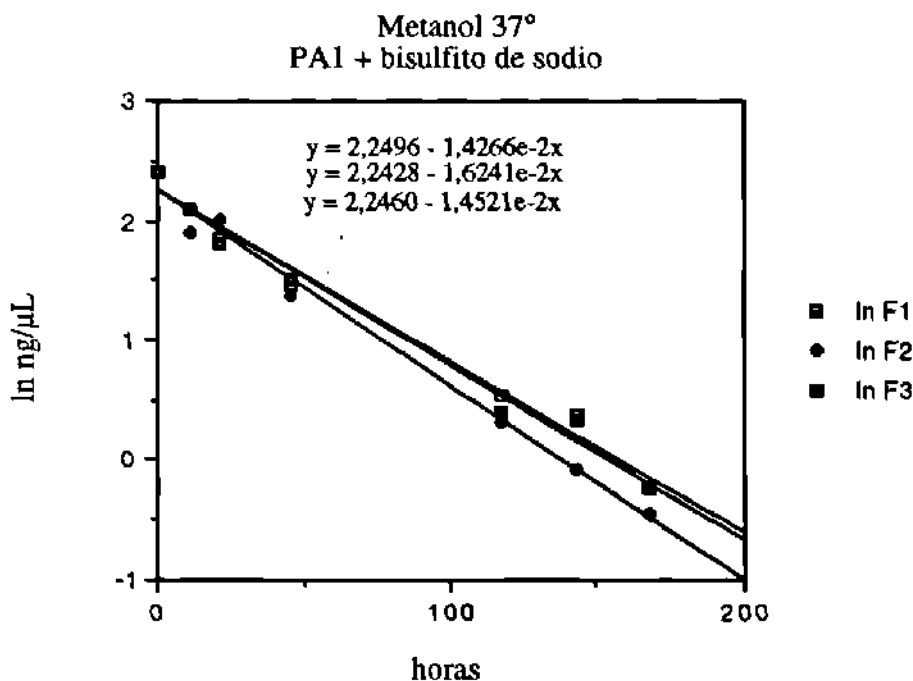


Fig 40. Cinéticas de Primer Orden de la Degradación de PA1 en Metanol a 37°C.  
Experimento F.

### **3.4.2 Degradación de PA1 en Buffer de Fosfatos pH 7,4**

#### **3.4.2.1 Degradación de PA1 en Buffer de Fosfatos pH 7,4 a -4°C**

En la tabla 31 están tabulados los datos del estudio de degradación de PA1 en buffer de fosfatos a - 4°C en ng/μL. En la tabla 32 se tabuló el logaritmo natural de los datos de la tabla 31.

En la figura 41, 42, 43, 44, 45 y 46 se graficaron las cinéticas de la tabla 32 , los cuales corresponden con un modelo cinético de primer orden.

En la figura 41 se graficaron los resultados del experimento A: degradación de PA1 sin agregar deliberadamente ningún otro compuesto.

La figura 42 corresponde con la grafica de los datos de la degradación obtenida en el experimento B, en el que se agregó además de PA1, isopA1.

La figura 43 corresponde con la gráfica de la degradación de PA1 cuando se le agregó isopA1 y ácido ascórbico, éste fue el experimento C.

La figura 44 es la gráfica de la degradación de PA1 en presencia de ácido ascórbico, experimento D.

Las figuras 45 y 46 corresponden con la degradación de PA1 en presencia de isopA1 y bisulfito de sodio para la primera y con bisulfito para la segunda, estos son los experimentos E y F respectivamente.

TABLA 31

DATOS DEL ESTUDIO DE DEGRADACIÓN DE PAI EN BUFFER DE FOSFATOS pH 7,4 A - 4°C  
(ng/μL)

h	A			B			C			D			E			F		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
0	10,44	10,44	10,44	10,44	10,44	10,44	10,44	10,44	10,44	10,44	10,44	10,44	10,44	10,44	10,44	10,44	10,44	10,44
263	6,60	5,52	6,21	8,92	5,46	5,52	6,57	6,76	6,40	6,39	6,46	6,20	5,99	6,09	6,09	6,09	5,72	6,26
462	5,29	4,75	5,25	5,19	4,51	4,69	5,01	5,42	5,10	5,27	4,67	4,25	4,90	4,96	4,70	4,50	4,55	4,55
539	3,95	4,02	3,98	3,86	3,82	3,83	3,92	4,03	3,67	4,48	3,87	3,60	4,00	4,04	4,00	3,83	3,74	3,74
779	3,71	3,78	3,74	3,92	3,99	3,95	4,03	3,90	4,55	4,27	4,21	3,66	3,71	3,80	3,74	3,92	4,13	4,13
1040	3,86	3,89	3,71		3,83	3,77	4,09	3,73	4,41	3,83	3,87	3,60	3,68	3,69	3,62	3,63	3,75	3,75

Condiciones experimentales: A = PAI; B = PAI + isoPAI; C = PAI + isoPAI + ácido ascórbico; D = PAI + ácido ascórbico; E = PAI + isoPAI + bisulfito de sodio F = PAI + bisulfito de sodio. Los datos de los espacios en blanco fueron descartados ya que los valores no coincidían con el comportamiento observado.

TABLA 32

DATOS DEL ESTUDIO DE DEGRADACIÓN DE PAI EN BUFFER DE FOSFATOS pH 7,4 A - 4°C  
(ln ng/ $\mu$ L)

h	A			B			C			D			E			F		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
0	2,35	2,35	2,35	2,35	2,35	2,35	2,35	2,35	2,35	2,35	2,35	2,35	2,35	2,35	2,35	2,35	2,35	2,35
263	1,89	1,71	1,83	2,19	1,70	1,71	1,88	1,91	1,88	1,85	1,86	1,87	1,82	1,79	1,81	1,81	1,74	1,83
462	1,67	1,56	1,66	1,65	1,51	1,55	1,61	1,69	1,72	1,66	1,63	1,54	1,45	1,59	1,60	1,55	1,50	1,52
539	1,37	1,39	1,38	1,35	1,34	1,34	1,37	1,39	1,41	1,50	1,52	1,35	1,28	1,39	1,40	1,39	1,34	1,32
779	1,31	1,33	1,32	1,35	1,38	1,37	1,39	1,36	1,41	1,45	1,48	1,44	1,30	1,31	1,34	1,32	1,37	1,42
1040	1,35	1,36	1,31		1,34	1,33	1,41	1,32	1,31	1,34	1,30	1,35	1,28	1,30	1,31	1,29	1,29	1,32

Condiciones experimentales: A = PAI; B = PAI + isoPAI; C = PAI + ácido ascórbico; D = PAI + ácido ascórbico; E = PAI + isoPAI + bisulfito de sodio F = PAI + bisulfito de sodio.



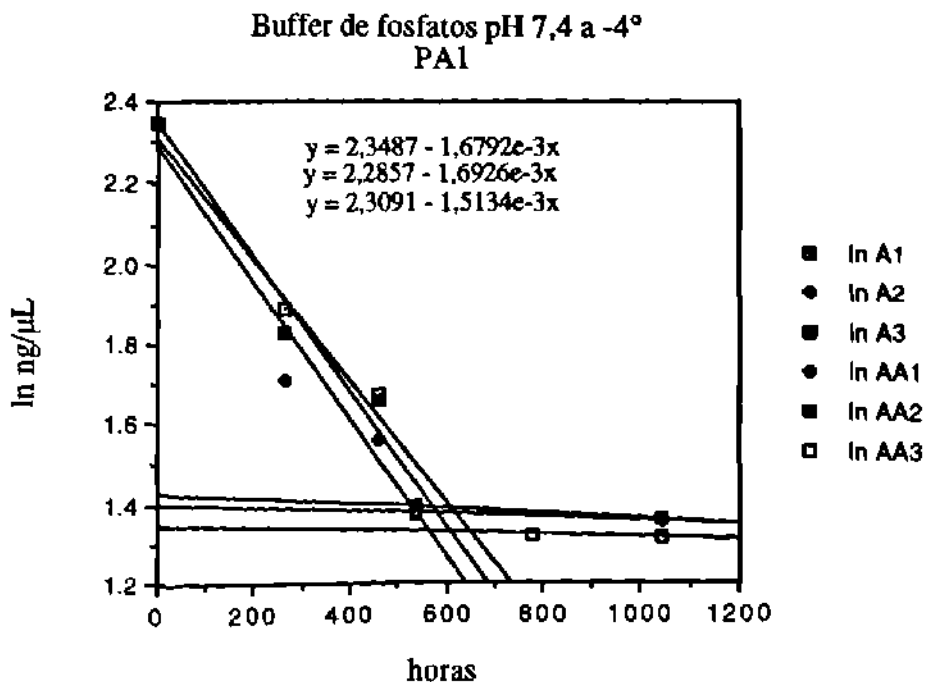


Fig 41. Cinéticas de Primer Orden de la Degradación de PA1 en Buffer a -4°C. Experimento A.

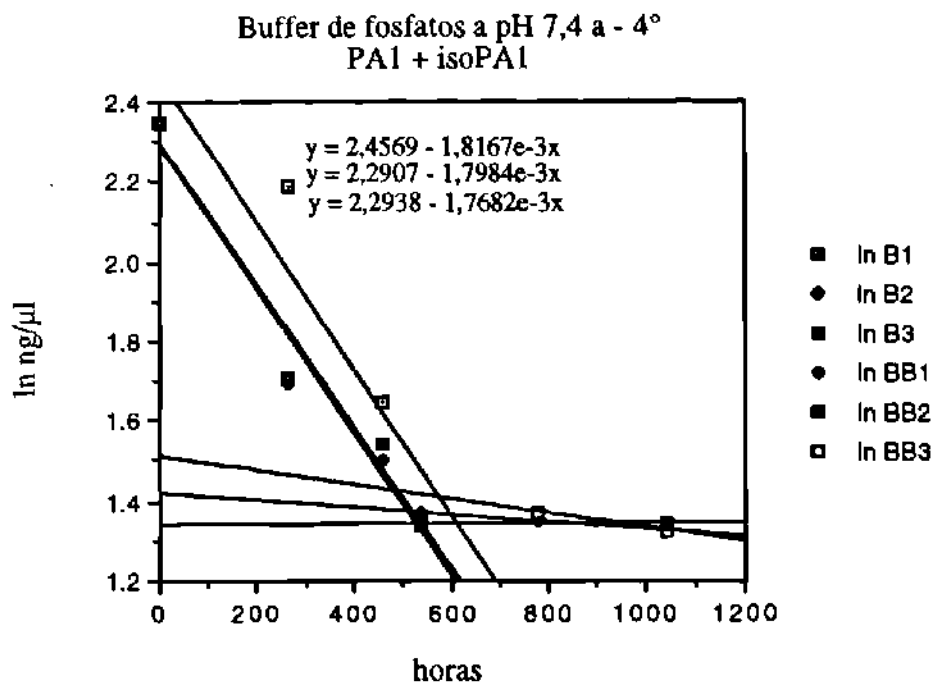


Fig 42. Cinéticas de Primer Orden de la Degradación de PA1 en Buffer a -4°C. Experimento B.

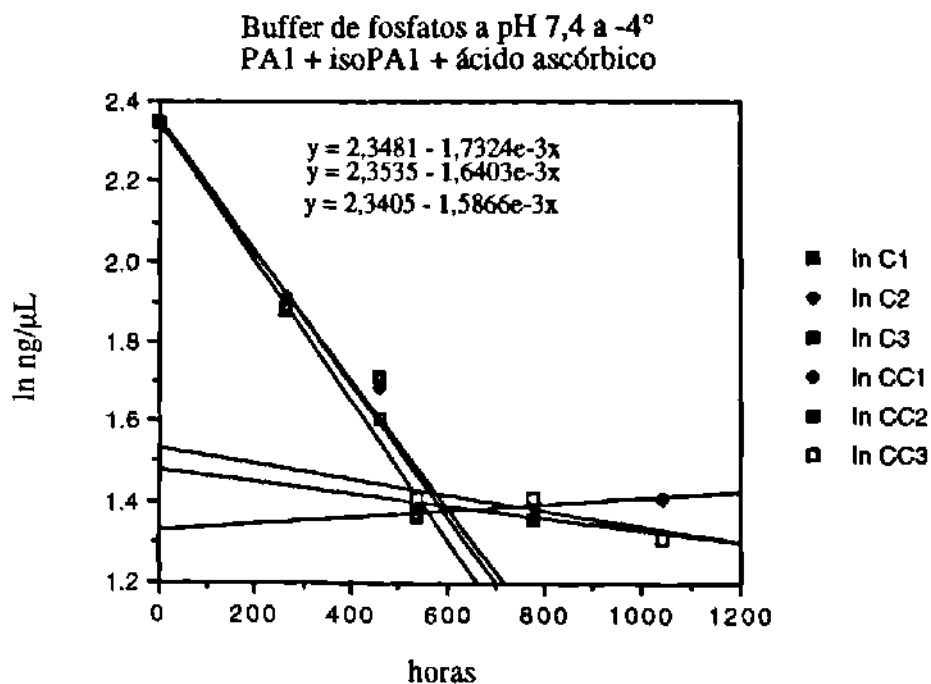


Fig 43. Cinéticas de Primer Orden de la Degradación de PA1 en Buffer a -4°C.  
Experimento C.

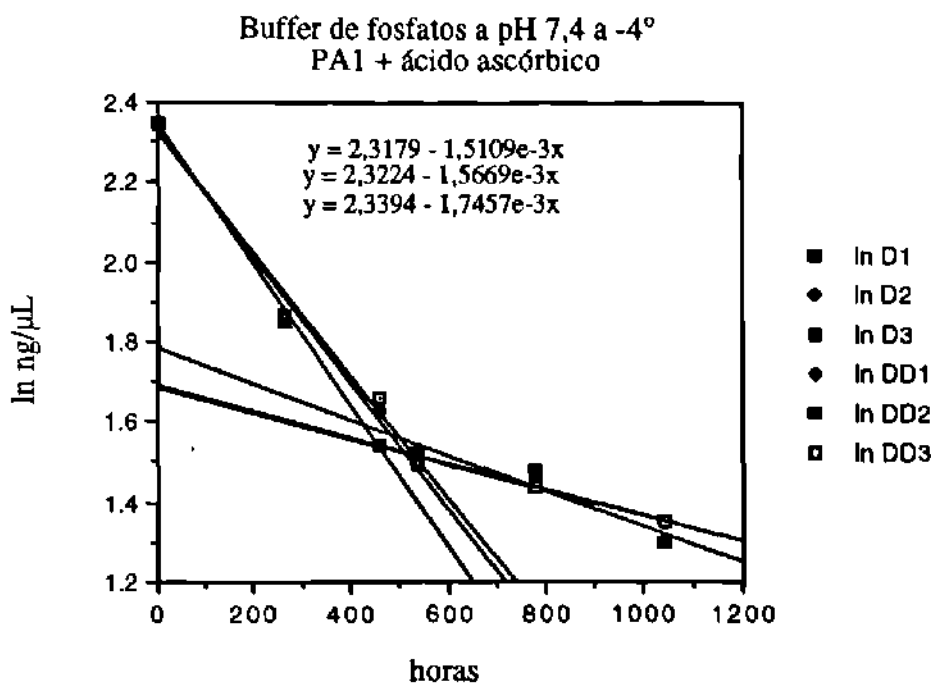


Fig 44. Cinéticas de Primer Orden de la Degradación de PA1 en Buffer a -4°C.  
Experimento D.

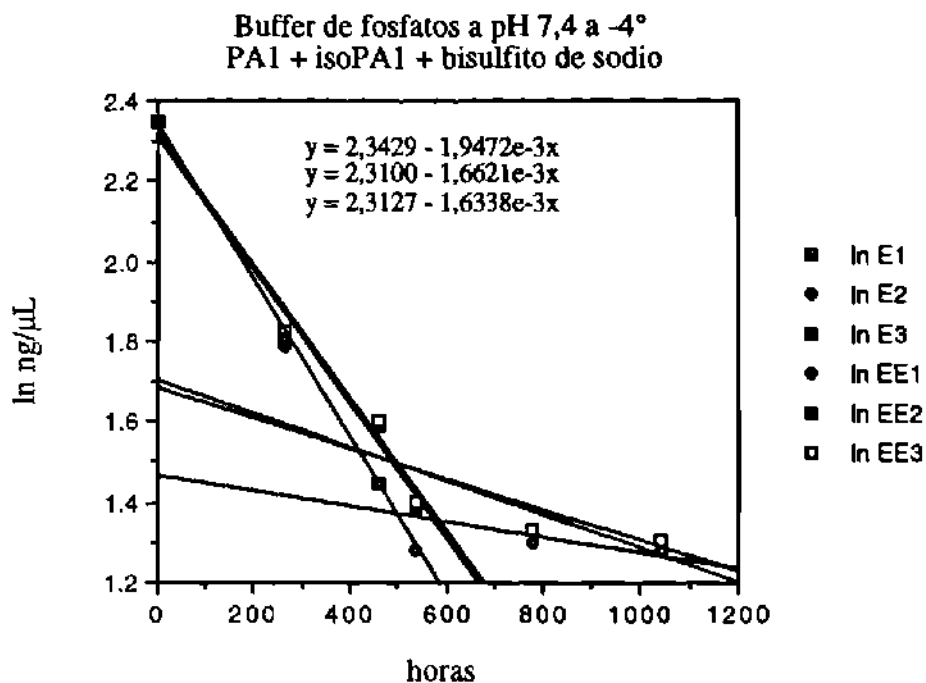


Fig 45. Cinéticas de Primer Orden de la Degradación de PA1 en Buffer a -4°C.  
Experimento E.

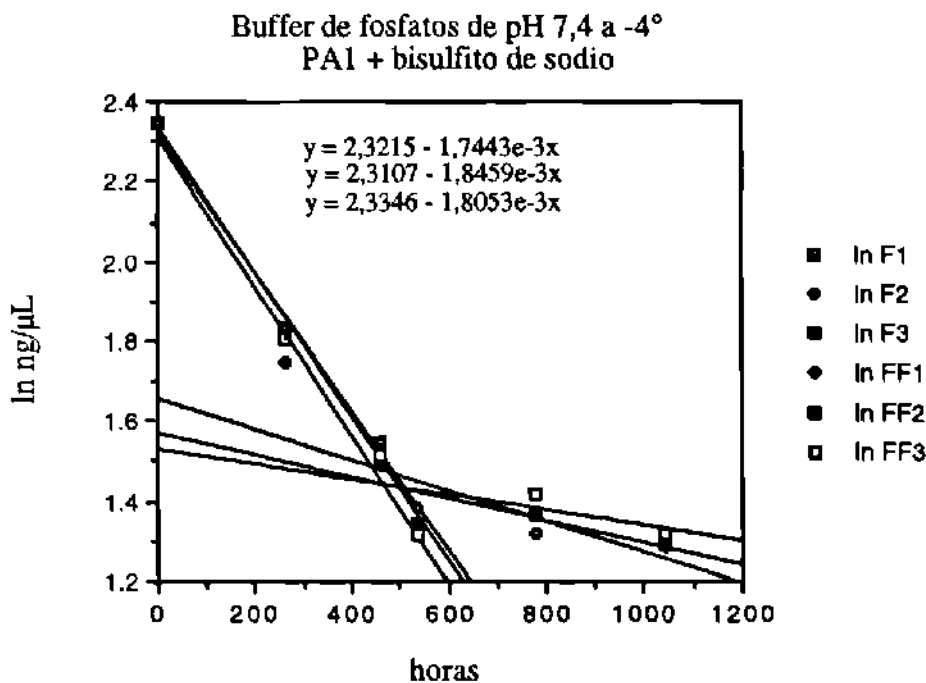


Fig 46. Cinéticas de Primer Orden de la Degradación de PA1 en Buffer a -4°C.  
Experimento F.

### **3.4.2.2 Degradación de PA1 en Buffer de Fosfatos pH 7,4 a 25°C**

En la tabla 33 están tabulados los datos del estudio de degradación de PA1 en buffer de fosfatos a 25°C en ng/ $\mu$ L. En la tabla 34 se tabuló el logaritmo natural de los datos de la tabla 33.

En las figuras 47, 48, 49, 50, 51 y 52 se graficaron las cinéticas de la tabla 34, los cuales corresponden con un modelo cinético de primer orden.

En la figura 47 se graficaron los resultados del experimento A: degradación de PA1 sin agregar deliberadamente ningún otro compuesto.

La figura 48 corresponde con la grafica de los datos de la degradación obtenida en el experimento B, en el que se agregó además de PA1, isopA1.

La figura 49 corresponde con la gráfica de la degradación de PA1 cuando se le agregó isopA1 y ácido ascórbico, éste fue el experimento C.

La figura 50 es la gráfica de la degradación de PA1 en presencia de ácido ascórbico, experimento D.

las figuras 51 y 52 corresponden con la degradación de PA1 en presencia de isopA1 y bisulfito de sodio para la primera y con bisulfito para la segunda, estos son los experimentos E y F respectivamente.

TABLA 33

DATOS DE LA DEGRADACIÓN DE PAI EN BUFFER DE FOSFATOS DE pH 7,4 A 25°C  
ng/μL

H	A			B			C			D			E			F		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
0	13.38	13.38	13.38	13.38	13.38	13.38	13.38	13.38	13.38	13.38	13.38	13.38	13.38	13.38	13.38	13.38	13.38	13.38
47	9.58	9.34	9.16	9.28	9.55	10.13	10.59	10.57	10.09	9.83	9.67	9.40	9.17	9.67	9.65	9.70	9.74	9.65
70	9.05	8.75	8.75	8.85	9.09	8.92	9.04	8.94	8.95	8.88	8.65	8.51	8.76	8.66	8.80	8.42	8.59	8.68
94	7.24	7.03	8.06	8.15	8.10	8.42	8.05	8.18	8.22	8.07	8.18	8.07	8.25	7.86	8.22	7.67	7.91	7.98
119	7.66	7.81	7.62	7.69	7.77	7.79	7.59	7.59	7.69	7.59	7.59	8.45	7.57	7.20	8.00	7.71	7.79	7.69
144	7.11	7.59	7.81	7.81	7.96	7.88	7.89	8.12	8.39	7.79	8.07	7.71	7.47	7.84	7.79	7.67	7.91	7.59
168	3.33	3.41	6.46	3.50	3.53	3.41	4.16	4.42	4.76	3.60	3.95		3.60	3.36	3.50	3.75	3.77	3.58
187	3.58	3.01	2.92	3.11		3.65	2.93	3.28	3.46	3.15	3.22	3.65	3.41	3.55	3.06		3.26	3.19
211	3.06	2.69	3.21	3.16	2.79		3.72	3.06	3.45	3.06	3.16	3.21	2.72	3.28	3.28	3.01	3.23	2.97

Condiciones experimentales: A = PAI; B = PAI + isoPAI; C = PAI + isoPAI + ácido ascórbico; D = PAI + ácido ascórbico; E = PAI + isoPAI + bisulfito de sodio F = PAI + bisulfito de sodio.

TABLA 34

DATOS DE LA DEGRADACIÓN DE PA1 EN BUFFER DE FOSFATOS DE pH 7,4 A 25°C  
In ng/μL

h	A			B			C			D			E			F		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
0	2.59	2.59	2.59	2.59	2.59	2.59	2.59	2.59	2.59	2.59	2.59	2.59	2.59	2.59	2.59	2.59	2.59	2.59
47	2.26	2.23	2.21	2.23	2.26	2.32	2.36	2.36	2.31	2.27	2.24	2.27	2.22	2.27	2.27	2.27	2.28	2.27
70	2.20	2.17	2.17	2.18	2.21	2.19	2.20	2.19	2.19	2.16	2.14	2.17	2.17	2.16	2.17	2.13	2.11	2.16
94	1.98	1.95	2.02	2.10	2.09	2.13	2.09	2.10	2.11	2.09	2.10	2.09	2.11	2.06	2.11	2.04	2.07	2.08
119	2.04	2.06	2.03	1.83	1.91	1.74	2.03	2.03	2.04	2.03	2.03	2.03	1.70	1.69	1.73	1.63	1.78	1.17
144	1.82	1.79	1.80	1.53	1.49	1.56	1.71	1.68	1.61	1.63	1.52	1.57	1.51	1.56	1.49	1.50	1.56	1.49
168	1.28	1.23	1.24	1.25	1.26	1.23	1.52	1.49	1.56	1.28	1.37	1.37	1.28	1.21	1.25	1.32	1.33	1.28
187	1.20	1.10	1.07	1.13	1.13	1.29	1.07	1.19	1.24	1.15	1.17	1.29	1.23	1.27	1.12	1.18	1.16	1.16
211	1.12	0.99	1.17	1.15	1.03	1.29	1.31	1.12	1.24	1.12	1.15	1.17	1.00	1.19	1.19	1.10	1.17	1.09

Condiciones experimentales: A = PA1; B = PA1 + isoPA1; C = PA1 + isoPA1 + ácido ascórbico; D = PA1 + ácido ascórbico; E = PA1 + isoPA1 + bisulfito de sodio F = PA1 + bisulfito de sodio. Los datos de los espacios en blanco fueron descartados ya que los valores no coincidían con el comportamiento observado.

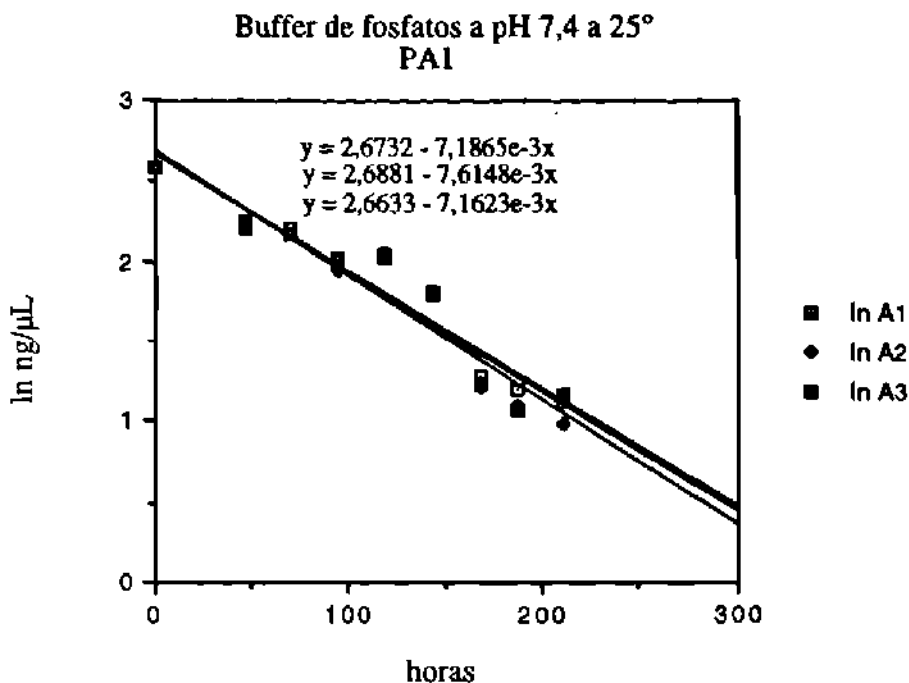


Fig 47. Cinéticas de Primer Orden de la Degradación de PA1 en Buffer a 25°C Experimento A.

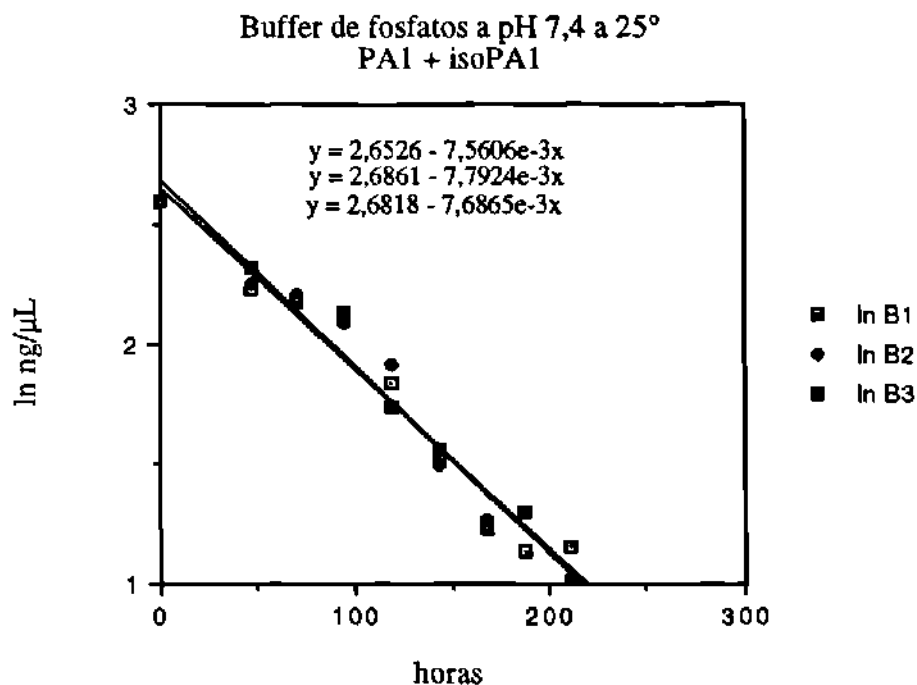


Fig 48. Cinéticas de Primer Orden de la Degradación de PA1 en Buffer a 25°C Experimento B.

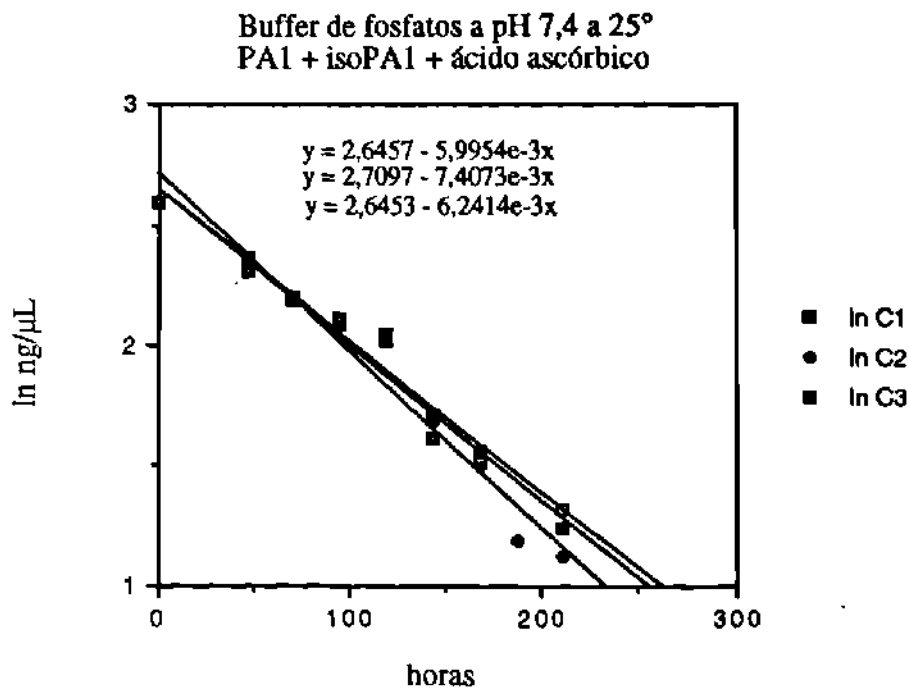


Fig 49. Cinéticas de Primer Orden de la Degradación de PA1 en Buffer a 25°C Experimento C.

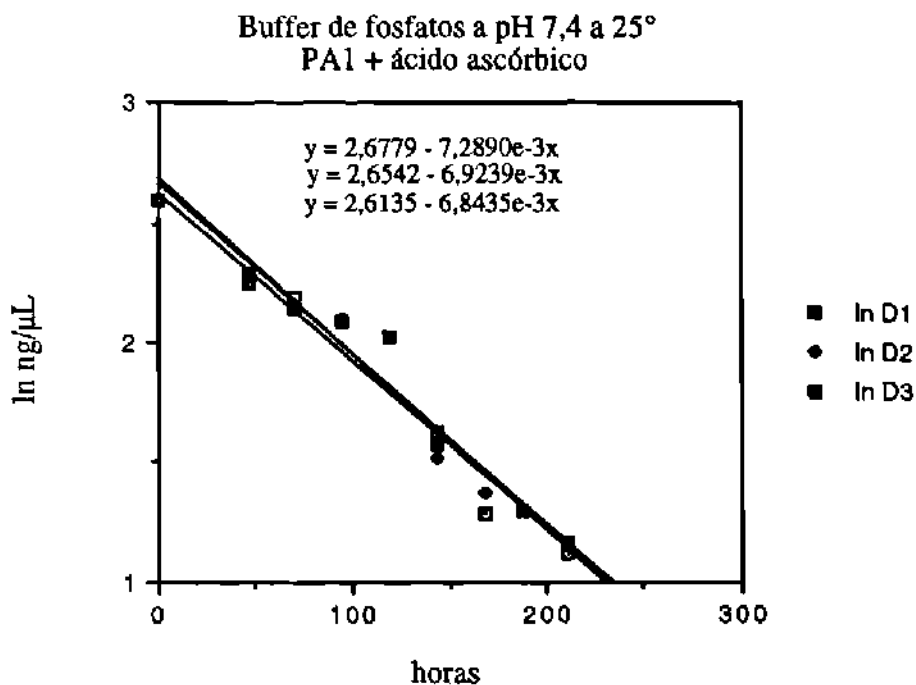


Fig 50. Cinéticas de Primer Orden de la Degradación de PA1 en Buffer a 25°C Experimento D.



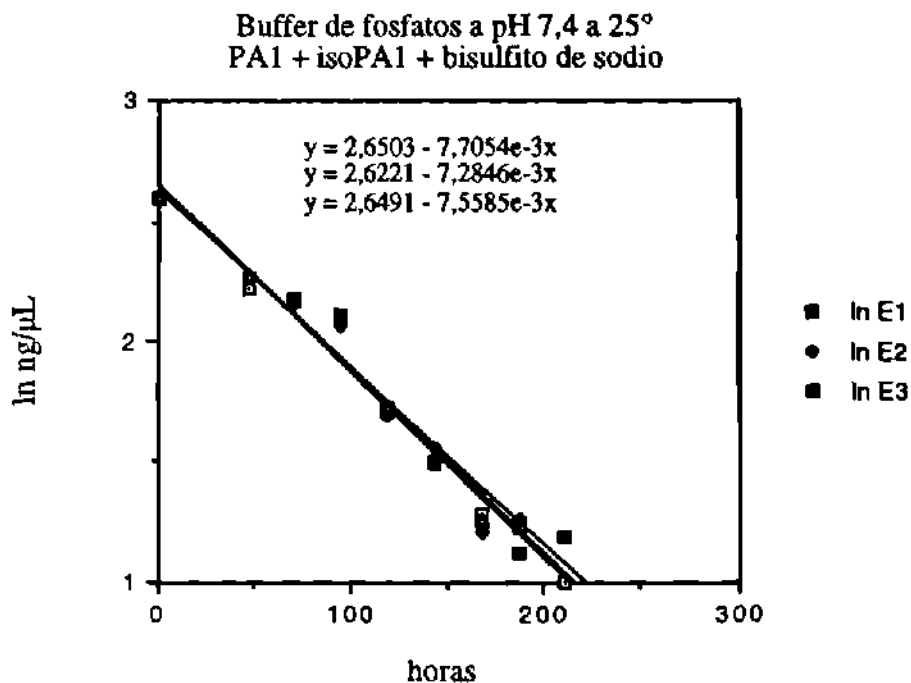


Fig 51. Cinéticas de Primer Orden de la Degradación de PA1 en Buffer a 25°C Experimento E.

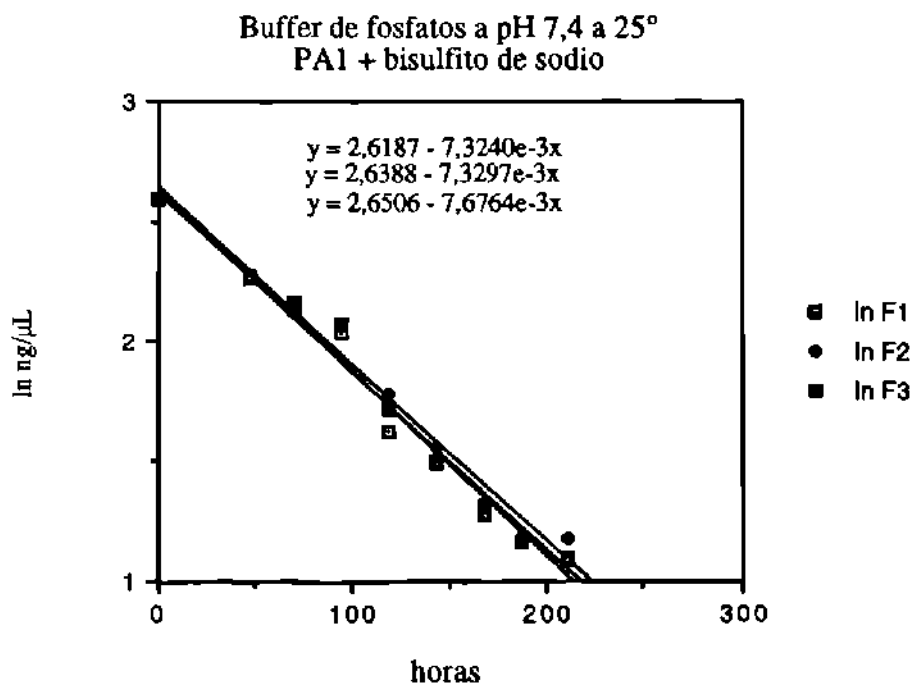


Fig 52. Cinéticas de Primer Orden de la Degradación de PA1 en Buffer a 25°C Experimento F.

### **3.4.2.3 Degradación de PA1 en Buffer de Fosfatos pH 7,4 a 37°C**

En la tabla 35 están tabulados los datos del estudio de degradación de PA1 en buffer de fosfatos a 37°C en ng/μL. En la tabla 36 se tabuló el logaritmo natural de los datos de la tabla 35.

En la figura 53, 54, 55, 56, 57 y 58 se graficaron las cinéticas de la tabla 36, los cuales corresponden con un modelo cinético de primer orden.

En la figura 53 se graficaron los resultados del experimento A: degradación de PA1 sin agregar deliberadamente ningún otro compuesto.

La figura 54 corresponde con la grafica de los datos de la degradación obtenida en el experimento B, en el que se agregó además de PA1, isopA1.

La figura 55 corresponde con la gráfica de la degradación de PA1 cuando se le agregó isopA1 y ácido ascórbico, éste fue el experimento C.

La figura 56 es la gráfica de la degradación de PA1 en presencia de ácido ascórbico, experimento D.

Las figuras 57 y 58 corresponden con la degradación de PA1 en presencia de isopA1 y bisulfito de sodio para la primera y con bisulfito para la segunda, estos son los experimentos E y F respectivamente.

TABLA 35

DATOS DEL ESTUDIO DE DEGRADACIÓN DE PAI EN BUFFER DE FOSFATOS pH 7,4 A 37°C  
ng/ $\mu$ L

h	A			B			C			D			E			F		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
0	9,74	9,74	9,74	9,74	9,74	9,74	9,74	9,74	9,74	9,74	9,74	9,74	9,74	9,74	9,74	9,74	9,74	9,74
25	4,01	3,99	4,46	3,90	3,76	3,31	3,46	3,52	3,61	3,42	3,83	3,48	3,14	2,97	3,31	3,33	3,05	3,10
44	2,09	1,72	2,27	1,76	1,90	2,11	2,26	2,25	2,21	2,19	2,08	1,84	2,04	1,78	2,15	2,22	1,94	2,29
70	1,38	1,30	1,43	1,53	1,74	1,55	1,38	1,63	1,50	1,76	1,70	1,54	1,58	1,13	1,96	1,61	1,51	1,43
89	1,24	1,09	1,33	1,11	1,15	1,08	1,34	1,32	1,86	1,39	1,49	1,41	1,72	1,32	1,43	1,66	1,80	2,15
99	1,35	1,47	1,49	1,37	1,54	1,72	1,49	1,58	1,52	1,64	1,51	1,77	1,38	1,55	1,42	1,58	1,57	1,52
115	1,36	1,45	1,40	1,31	1,32	1,25	1,35	1,40	1,61	1,38	1,46	1,46	1,34	1,51	1,32	1,52	1,20	1,29
124	1,63	1,49	1,29	1,26	1,32	1,11	1,00	1,23	1,33	1,56	1,19	1,01	0,87	0,91	0,88	1,08	1,11	1,10
164	1,19	1,06	1,06	1,04	1,17	1,08	1,19	1,08	1,23	1,29	1,19	1,21	1,18	0,94	1,08	1,30	0,96	1,17

Condiciones experimentales: A = PAI; B = PAI + isoPAI; C = PAI + isoPAI + ácido ascórbico; D = PAI + ácido ascórbico; E = PAI + isoPAI + bisulfito de sodio F = PAI + bisulfito de sodio.

TABLA 36

DATOS DEL ESTUDIO DE DEGRADACIÓN DE PAI EN BUFFER DE FOSFATOS pH 7,4 A 37°C  
(ln ng/ $\mu$ L)

h	A			B			C			D			E			F		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
0	2,28	2,28	2,28	2,28	2,28	2,28	2,28	2,28	2,28	2,28	2,28	2,28	2,28	2,28	2,28	2,28	2,28	2,28
25	1,39	1,38	1,50	1,36	1,32	1,20	1,24	1,26	1,28	1,23	1,34	1,25	1,14	1,09	1,20	1,20	1,12	1,13
44	0,74	0,54	0,82	0,57	0,64	0,75	0,82	0,81	0,79	0,78	0,73	0,61	0,71	0,58	0,77	0,80	0,66	0,83
70	0,32	0,26	0,36	0,43	0,55	0,44	0,32	0,49	0,41	0,57	0,53	0,43	0,46	0,12	0,67	0,48	0,41	0,36
89	0,22	0,19	0,29	0,10	0,14	0,08	0,29	0,28	0,62	0,33	0,40	0,34	0,54	0,28	0,36	0,51	0,59	0,77
99	0,30	0,39	0,40	0,31	0,43	0,54	0,40	0,46	0,42	0,49	0,41	0,57	0,32	0,44	0,35	0,46	0,45	0,42
115	0,31	0,37	0,34	0,27	0,28	0,22	0,30	0,34	0,48	0,32	0,38	0,38	0,29	0,41	0,28	0,42	0,18	0,25
124	0,49	0,40	0,25	0,23	0,28	0,10	0,00	0,21	0,29	0,44	0,17	0,00	-0,14	-0,09	-0,13	0,08	0,10	0,10
164	0,17	0,16	0,16	0,14	0,16	0,08	0,17	0,08	0,21	0,25	0,17	0,19	0,17	-0,06	0,08	0,26	-0,04	0,16

Condiciones experimentales: A = PAI; B = PAI + isoPAI; C = PAI + isoPAI + ácido ascórbico; D = PAI + ácido ascórbico; E = PAI + isoPAI + bisulfito de sodio F = PAI + bisulfito de sodio.

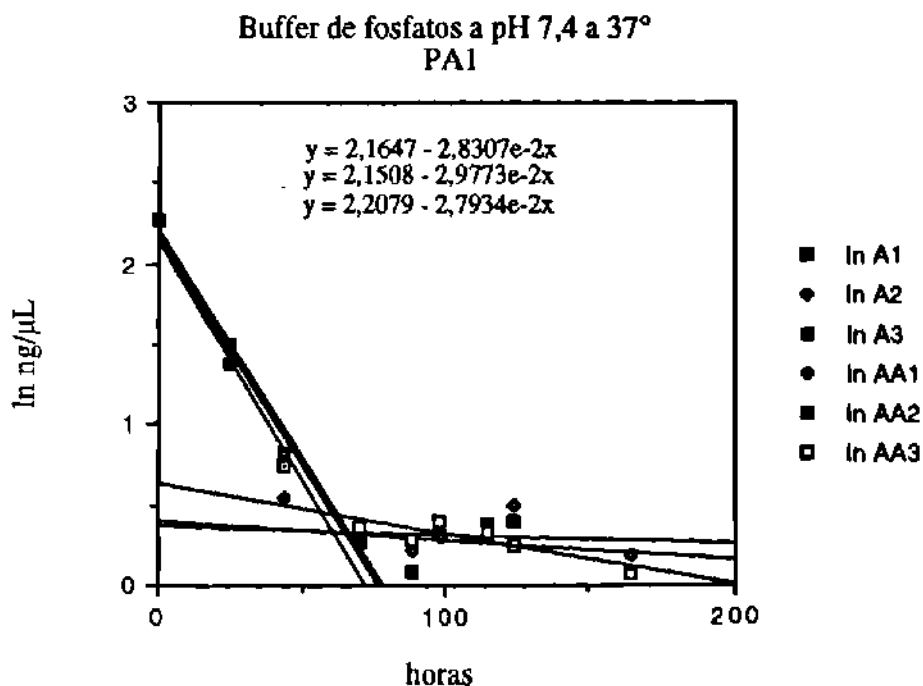


Fig 53. Cinéticas de Primer Orden de la Degradación de PA1 en Buffer 37°C Experimento A.

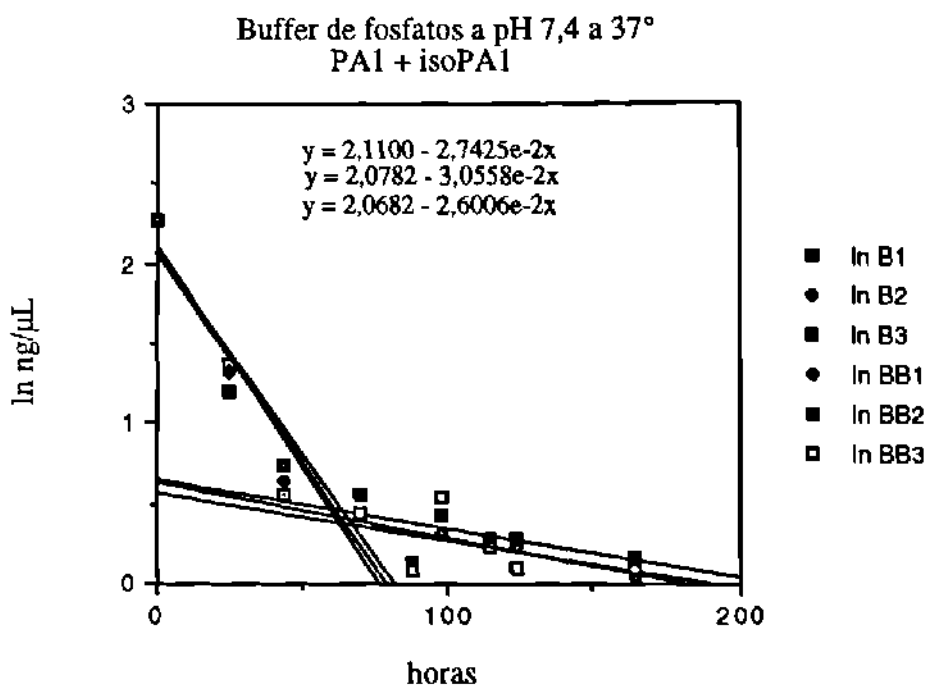


Fig 54. Cinéticas de Primer Orden de la Degradación de PA1 en Buffer 37°C Experimento B.

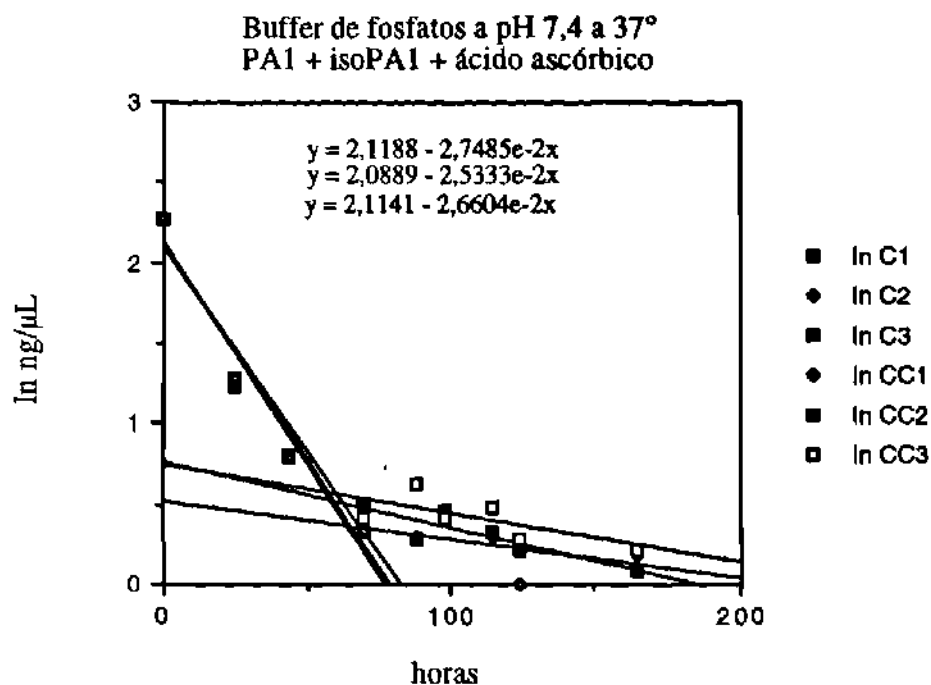


Fig 55. Cinéticas de Primer Orden de la Degradación de PA1 en Buffer 37°C Experimento C.

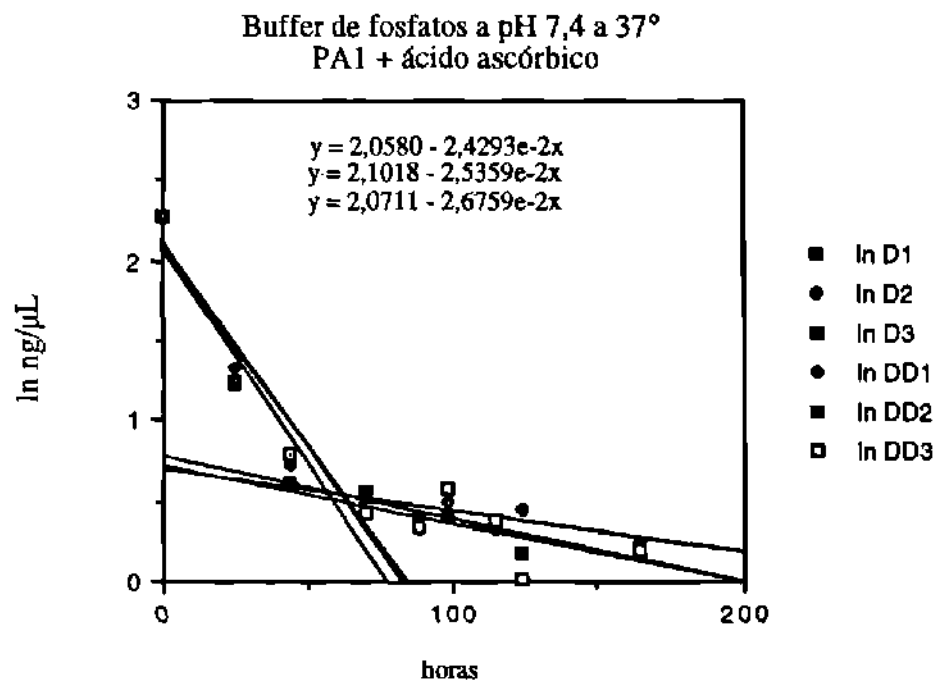


Fig 56. Cinéticas de Primer Orden de la Degradación de PA1 en Buffer 37°C Experimento D.

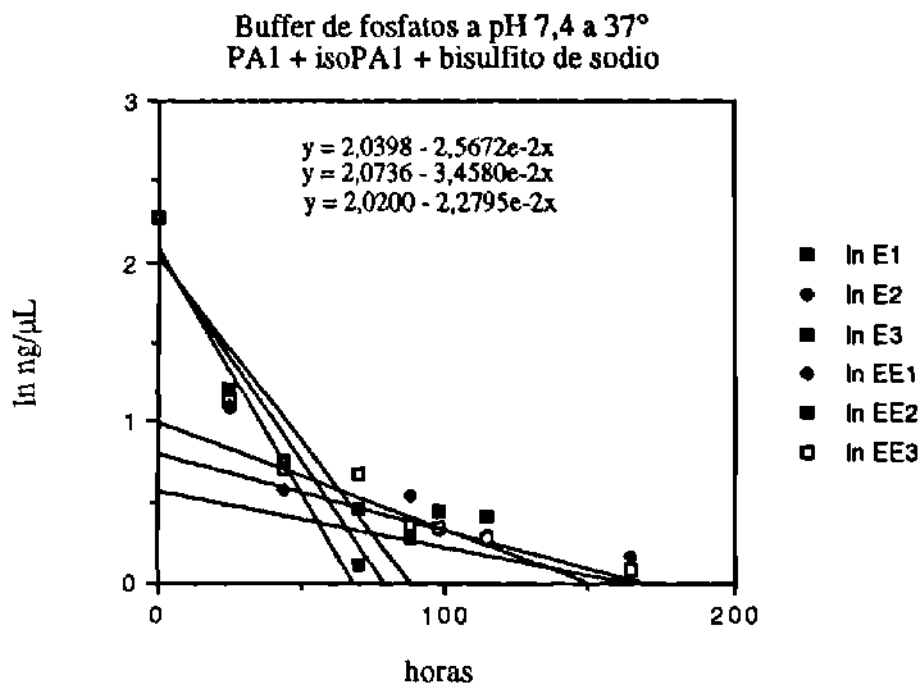


Fig 57. Cinéticas de Primer Orden de la Degradación de PA1 en Buffer 37°C Experimento E.

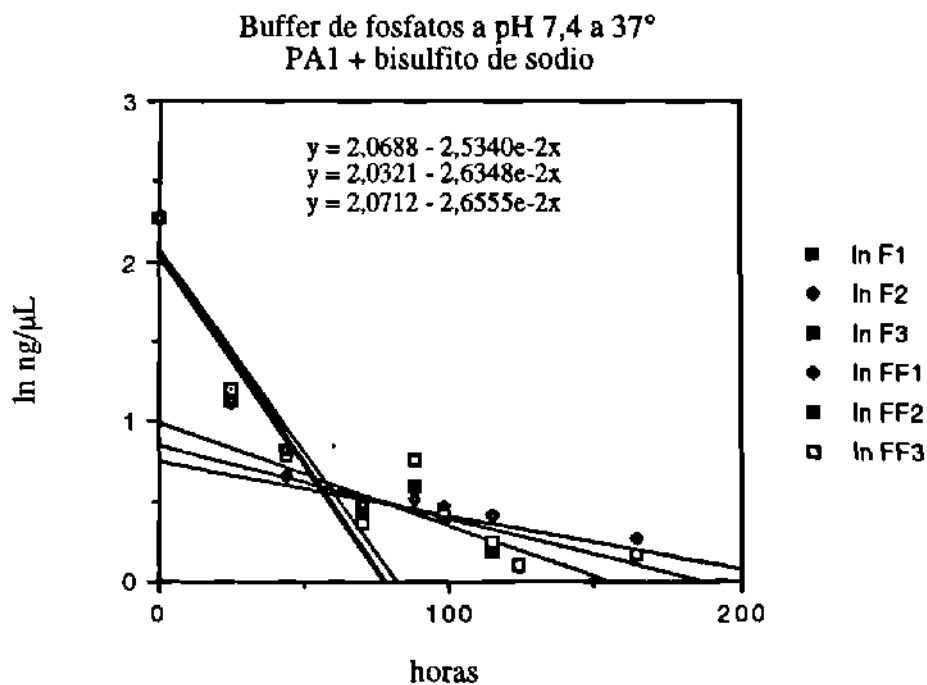


Fig 58. Cinéticas de Primer Orden de la Degradación de PA1 en Buffer 37°C Experimento F.

### **3.4.3.1 Degradación de PA1 en Suero**

#### **3.4.3.1 Degradación de PA1 en Suero a -4°C**

En la tabla 37 están tabulados los datos del estudio de degradación de PA1 en suero a - 4°C en ng/μL. En la tabla 38 se tabuló el logaritmo natural de los datos de la tabla 37.

En las figuras 59, 60, 61, 62, 63 y 64 se graficaron las cinéticas de la tabla 38, los cuales corresponden con un modelo cinético de primer orden.

En la figura 59 se graficaron los resultados del experimento A: degradación de PA1 sin agregar deliberadamente ningún otro compuesto.

La figura 60 corresponde con la grafica de los datos de la degradación obtenida en el experimento B, en el que se agregó además de PA1, isopA1.

La figura 61 corresponde con la gráfica de la degradación de PA1 cuando se le agregó isopA1 y ácido ascórbico, éste fue el experimento C.

La figura 62 es la gráfica de la degradación de PA1 en presencia de ácido ascórbico, experimento D.

Las figuras 63 y 64 corresponden con la degradación de PA1 en presencia de isopA1 y bisulfito de sodio para la primera y con bisulfito para la segunda, estos son los experimentos E y F respectivamente.



TABLA 37

DATOS DEL ESTUDIO DE DEGRADACIÓN DE PAI EN SUERO A -4°C  
ng/μL

h	A			B			C			D			E			F		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
0	11,93	11,93	11,93	11,93	11,93	11,93	11,93	11,93	11,93	11,93	11,93	11,93	11,93	11,93	11,93	11,93	11,93	11,93
48	12,26	11,54	11,11		11,81	12,05	11,94	10,05	11,75	12,42	10,69	11,78	11,65	11,64	11,97	11,54	10,74	10,40
144	11,17	12,02	10,31	11,78	11,49	11,25	10,42	10,66	9,89	11,57	10,82	10,10	11,49	10,13	9,22	11,22	11,54	9,63
238	9,60	12,60	10,31	10,74	10,34	8,91	9,12	9,43	9,39	10,93	9,92	9,07	10,61	10,08	8,96	9,89	10,40	10,37
333	9,36	8,34	9,10	9,08	9,74	9,86	9,60	9,15	9,68	9,36	9,86	9,12	8,84	8,77	10,00	7,82	9,31	9,00
435	8,10	8,63	9,15	8,53	9,05	8,91	8,29	8,15	8,18	8,53	8,81	9,03	8,29	7,35	7,80	5,85	9,24	9,98
574	7,99	6,87	7,63	7,25	7,23	8,46	7,25	6,73	7,73	7,16	7,58	7,89	6,30	7,42	8,91	6,94	7,84	7,61
730				4,57	4,52	4,43	4,57	4,85	4,66	3,38	3,67	3,49	4,39	4,66	4,53	4,71	4,14	4,01
933	2,46	2,36	2,26	2,56	2,46	2,36	1,92	2,02	2,12	1,70	1,80	1,90	1,68	1,78	1,88	1,77	1,87	1,97
1148	1,76	1,82	1,77	2,21	2,31	2,41	1,92	2,02	2,12	1,14	1,95	1,54	1,70	1,68	1,69	1,82	2,02	1,92
1338	1,24	1,34	1,44	1,68	2,04	2,14	1,63	1,75	1,69	1,36	1,46	1,56				1,48	1,58	1,68

Condiciones experimentales: A = PAI; B = PAI + isoPAI; C = PAI + isoPAI + ácido ascórbico; D = PAI + ácido ascórbico; E = PAI + isoPAI + bisulfito de sodio F = PAI + bisulfito de sodio.. Los datos de los espacios en blanco fueron descartados ya que los valores no coincidían con el comportamiento observado.

TABLA 38

DATOS DEL ESTUDIO DE DEGRADACIÓN DE PAI EN SUERO A -4°C  
(ln ng/μL)

h	A			B			C			D			E			F		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
0	2,48	2,48	2,48	2,48	2,48	2,48	2,48	2,48	2,48	2,48	2,48	2,48	2,48	2,48	2,48	2,48	2,48	2,48
48	2,51	2,45	2,41		2,47	2,49	2,46	2,31	2,46	2,37	2,47	2,46	2,45	2,45	2,48	2,45	2,37	2,34
144	2,41	2,49	2,33	2,40	2,44	2,42	2,34	2,37	2,29	2,45	2,38	2,44	2,32	2,42	2,22	2,42	2,45	2,34
238	2,26	2,53	2,33	2,37	2,34	2,35	2,21	2,24	2,24	2,39	2,29	2,36	2,31	2,29	2,19	2,29	2,34	2,26
333	2,24	2,12	2,21	2,21	2,28	2,29	2,26	2,21	2,27	2,24	2,29	2,18	2,17	2,28	2,30	2,28	2,23	2,20
435	2,09	2,16	2,21	2,14	2,20	2,19	2,12	2,10	2,10	2,14	2,18	2,20	1,99	2,20	2,05	2,20	2,22	2,18
574	2,08	1,93	2,03	1,98	1,98	2,14	1,98	1,91	2,05	1,97	2,03	2,07	2,00	1,94	2,19	1,94	2,06	2,03
730				1,52	1,51	1,49	1,52	1,58	1,54	1,22	1,30	1,25	1,48	1,54	1,51	1,55	1,42	1,39
933	0,90	0,86	0,82	0,94	0,90	0,86	1,20	1,22	1,63	0,98	0,86	0,91	0,76	0,84	0,92	0,83	0,94	0,96
1148	0,55	0,60	0,57	0,79	0,84	0,88	0,65	0,70	0,75	0,13	0,67	0,43	0,31	0,42	0,48	0,60	0,70	0,65
1338	0,22	0,29	0,36	0,52	0,54	0,50	0,49	0,56	0,52	0,31	0,38	0,44				0,39	0,46	0,52

Condiciones experimentales: A = PAI; B = PAI + isoPAI; C = PAI + isoPAI + ácido ascórbico; D = PAI + ácido ascórbico; E = PAI + isoPAI + bisulfito de sodio F = PAI + bisulfito de sodio. Los datos de los espacios en blanco fueron descartados ya que los valores no coincidían con el comportamiento observado.

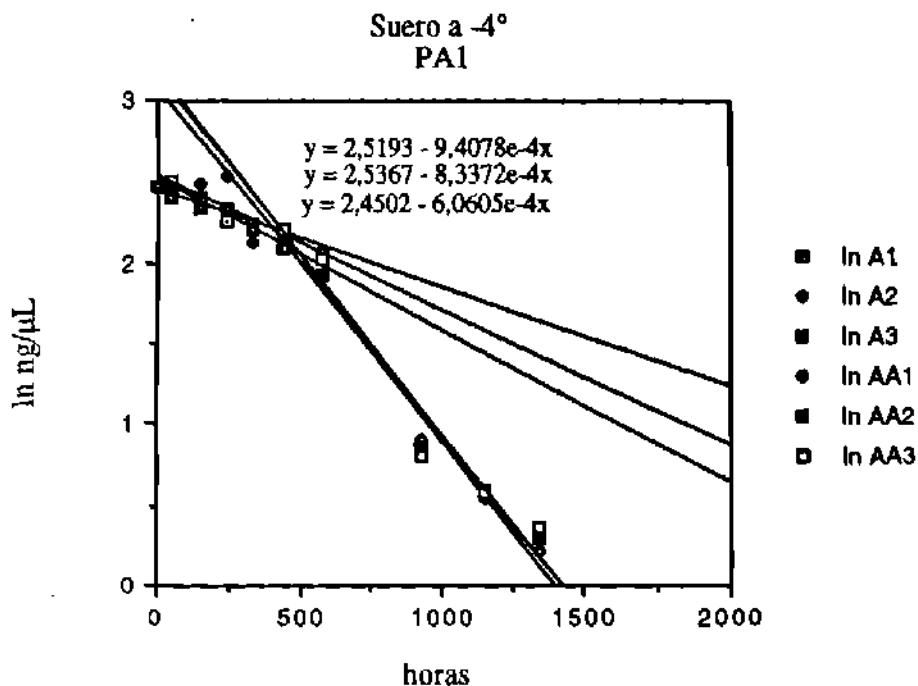


Fig 59. Cinéticas de Primer Orden de la Degradación de PA1 en Suero a -4°C.

Experimento A.

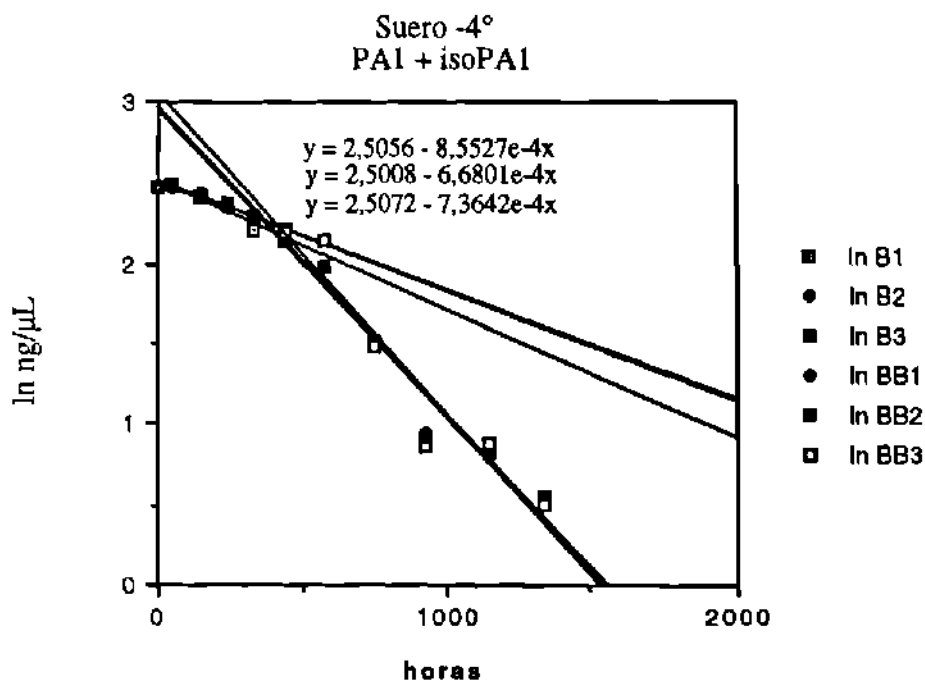


Fig 60. Cinéticas de Primer Orden de la Degradación de PA1 en Suero a -4°C.  
Experimento B.

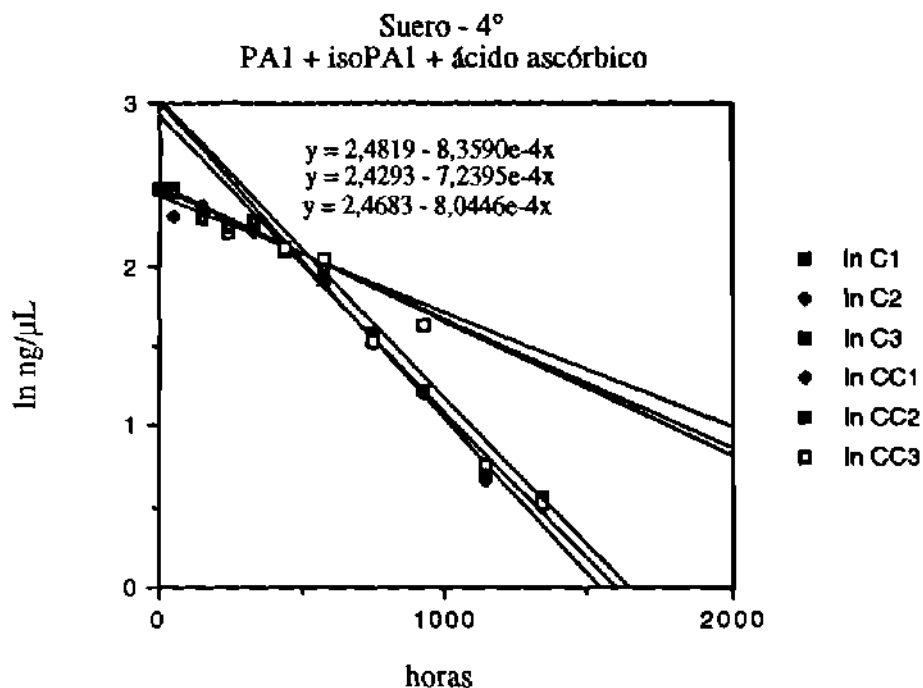


Fig 61. Cinéticas de Primer Orden de la Degradación de PA1 en Suero a  $-4^{\circ}\text{C}$ . Experimento C.

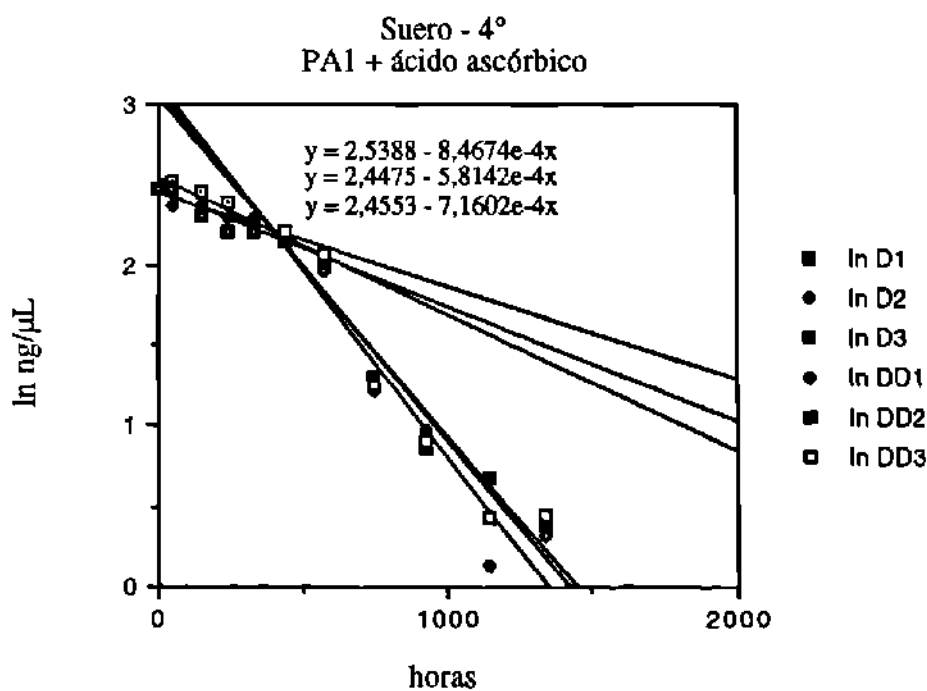


Fig 62. Cinéticas de Primer Orden de la Degradación de PA1 en Suero a  $-4^{\circ}\text{C}$ . Experimento D.

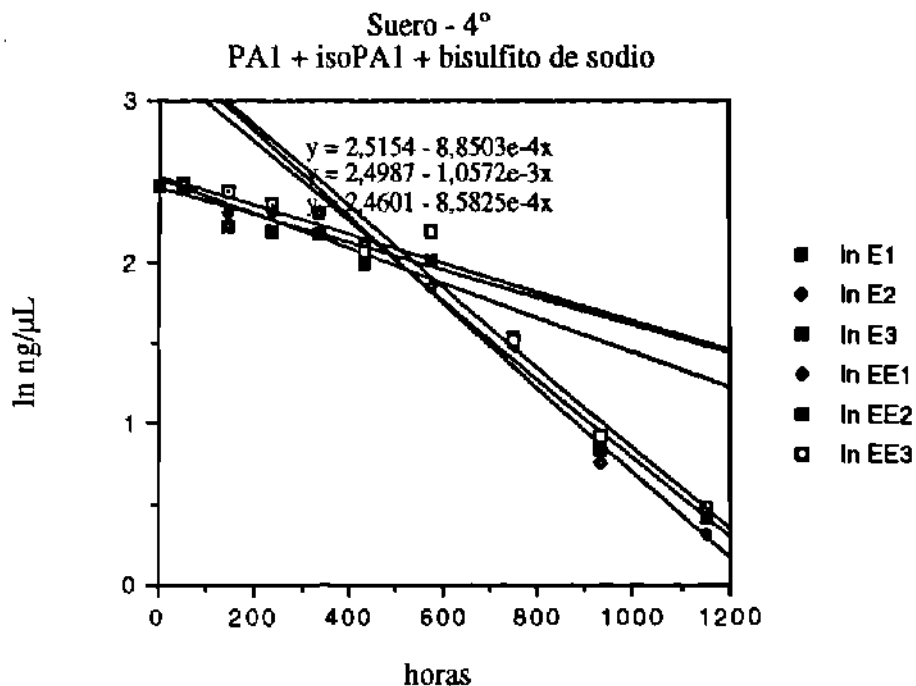


Fig 63. Cinéticas de Primer Orden de la Degradación de PA1 en Suero a  $-4^{\circ}\text{C}$ . Experimento E.

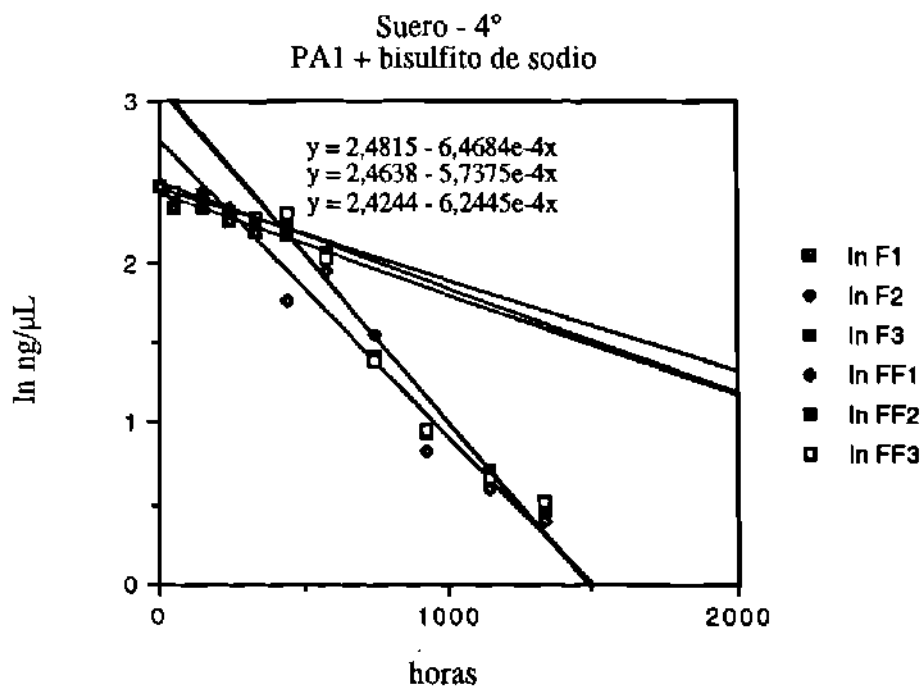


Fig 64. Cinéticas de Primer Orden de la Degradación de PA1 en Suero a  $-4^{\circ}\text{C}$ . Experimento F.

### 3.4.3.2 Degradación de PA1 en Suero a 25°C

En la tabla 39 están tabulados los datos del estudio de degradación de PA1 en suero a 25°C en ng/μL. En la tabla 40 se tabuló el logaritmo natural de los datos de la tabla 39.

En las figuras 65, 66, 67, 68, 69 y 70 se graficaron las cinéticas de la tabla 40, los cuales corresponden con un modelo cinético de primer orden.

En la figura 65 se graficaron los resultados del experimento A: degradación de PA1 sin agregar deliberadamente ningún otro compuesto.

La figura 66 corresponde con la grafica de los datos de la degradación obtenida en el experimento B, en el que se agregó además de PA1, isopA1.

La figura 67 corresponde con la gráfica de la degradación de PA1 cuando se le agregó isopA1 y ácido ascórbico, éste fue el experimento C.

La figura 68 es la gráfica de la degradación de PA1 en presencia de ácido ascórbico, experimento D.

Las figuras 69 y 70 corresponden con la degradación de PA1 en presencia de isopA1 y bisulfito de sodio para la primera y con bisulfito para la segunda, estos son los experimentos E y F respectivamente.

TABLA 39

DATOS DEL ESTUDIO DE DEGRADACIÓN DE PAI EN SUERO 25°C  
(ng/ $\mu$ L)

h	A			B			C			D			E			F		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
0	11,86	11,86	11,86	11,86	11,86	11,86	11,86	11,86	11,86	11,86	11,86	11,86	11,86	11,86	11,86	11,86	11,86	11,86
18	11,20	10,95	11,24	11,22	11,81	10,09	9,98	11,02	11,56	11,61	13,95	9,89	8,59	10,59	10,53	9,94	10,94	10,10
68	8,41	10,16	9,30	9,50	8,94	9,23	8,92	9,34	9,14	9,96	10,36	10,16	8,90	8,31	8,61	9,91	8,01	8,97
138	5,24	8,75	7,09	7,60	9,20	8,15	7,86	9,38	9,31	7,64	6,53	9,42	7,84	6,70	8,68	8,07	6,61	8,92
259	5,96	7,82	7,05	6,27	7,20	6,91	5,59	6,80	5,02	5,25	8,28	7,47	4,87	5,26	5,38	4,86	6,60	6,31
382	6,05	4,47	4,97	5,06	5,89	3,87	4,74	4,57	4,42	4,26	5,61	3,23	3,27	4,90	5,61	3,38	4,41	3,18
451	3,73	3,54	2,94	3,20	3,38	5,11	5,40	3,28	3,31	3,19	2,73	2,56	2,85	3,10	5,10	2,82	2,56	2,52
550	3,58	2,95	3,96	3,74	2,03	3,66	3,07	2,55	2,33	2,24	2,75	3,23	2,42	2,42	1,98	1,88	2,11	1,98

Condiciones experimentales: A = PA1; B = PA1 + isoPA1; C = PA1 + isoPA1 + ácido ascórbico; D = PA1 + ácido ascórbico; E = PA1 + isoPA1 + bisulfito de sodio F = PA1 + bisulfito de sodio.

TABLA 40

DATOS DEL ESTUDIO DE DEGRADACIÓN DE PAI EN SUERO 25°C  
(In ng/ $\mu$ L)

h	A			B			C			D			E			F		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
0	2,47	2,47	2,47	2,47	2,47	2,47	2,47	2,47	2,47	2,47	2,47	2,47	2,47	2,47	2,47	2,47	2,47	2,47
18	2,42	2,39	2,42	2,42	2,47	2,31	2,30	2,40	2,45	2,64	2,29	2,29	2,15	2,36	2,35	2,30	2,39	2,31
68	2,13	2,32	2,23	2,25	2,19	2,22	2,19	2,23	2,21	2,34	2,32	2,34	2,19	2,12	2,15	2,29	2,08	2,19
138	1,66	2,17	1,96	2,03	2,22	2,10	2,06	2,24	2,23	1,88	2,24	2,03	2,06	1,90	2,16	2,09	1,89	2,19
259	1,79	2,06	1,95	1,84	1,97	1,93	1,72	1,92	1,61	1,66	2,11	1,66	1,58	1,66	1,68	1,58	1,89	1,84
382	1,80	1,50	1,60	1,62	1,77	1,35	1,69	1,52	1,49	1,72	1,17	1,45	1,18	1,59	1,45	1,22	1,48	1,16
451	1,32	1,26	1,08	1,32	1,22	1,63	1,56	1,19	1,20	1,16	1,00	1,16	1,05	1,13	1,20	1,04	0,94	0,92
550	1,28	1,08	1,38	1,16	0,71	1,30	1,12	0,94	0,85	0,81	1,01	1,17	0,88	0,88	0,68	0,63	0,75	0,68

Condiciones experimentales: A = PA1; B = PA1 + isoPA1; C = PA1 + isoPA1 + ácido ascórbico; D = PA1 + ácido ascórbico; E = PA1 + isoPA1 + bisulfito de sodio F = PA1 + bisulfito de sodio.



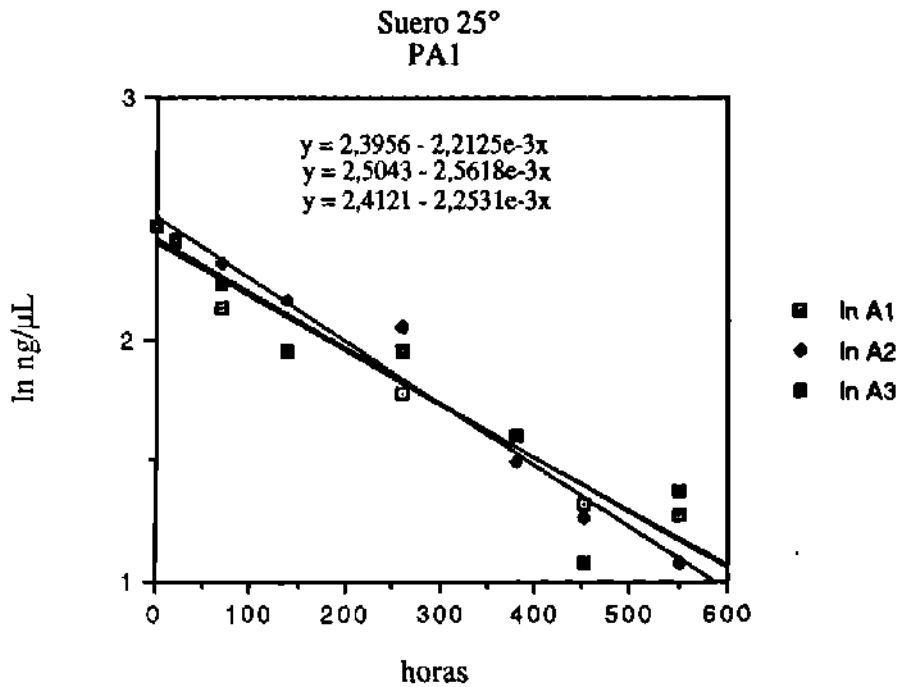


Fig 65. Cinéticas de Primer Orden de la Degradación de PA1 en Suero a 25°C. Experimento A.

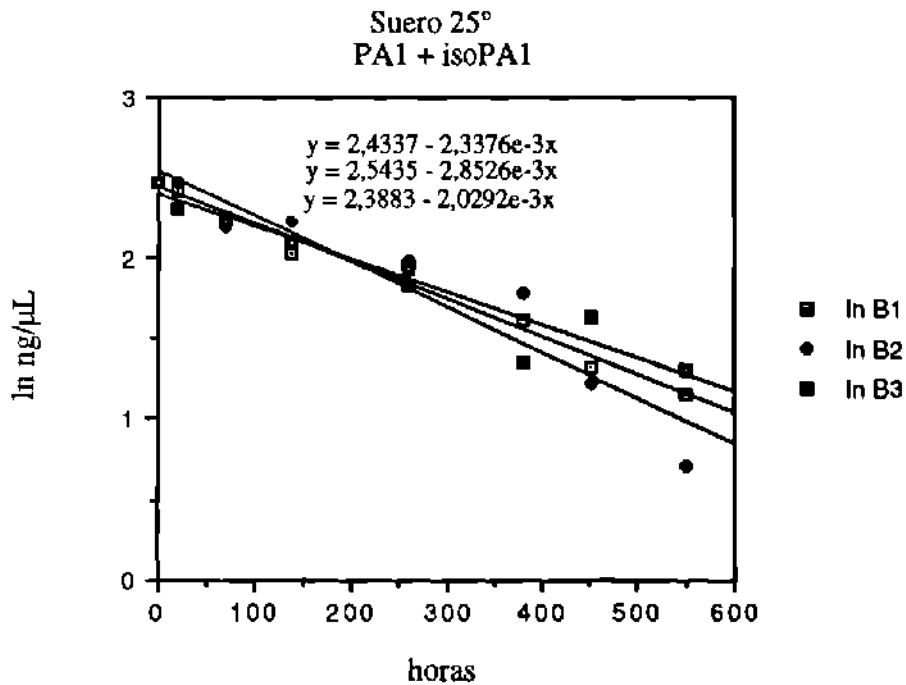


Fig 66. Cinéticas de Primer Orden de la Degradación de PA1 en en Suero a 25°C Experimento B.

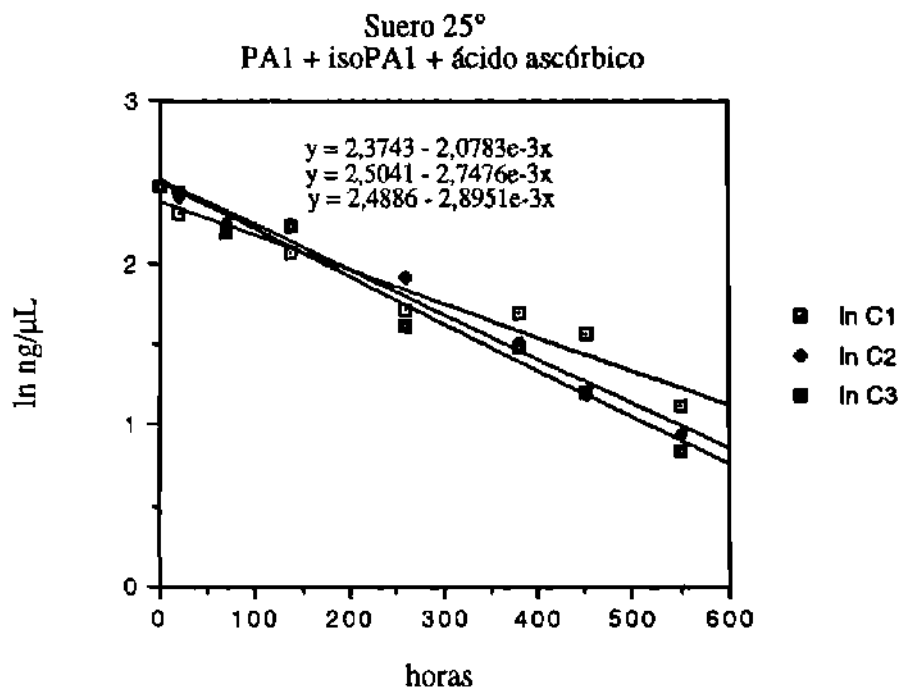


Fig 67. Cinéticas de Primer Orden de la Degradación de PA1 en en Suero a 25°C Experimento C.

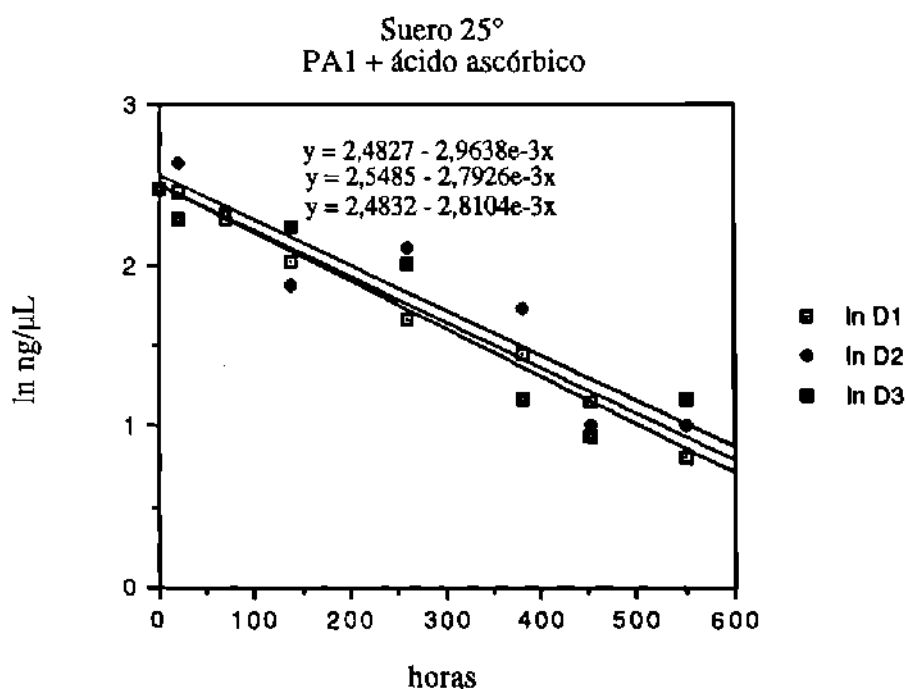


Fig 68. Cinéticas de Primer Orden de la Degradación de PA1 en en Suero a 25°C Experimento D.

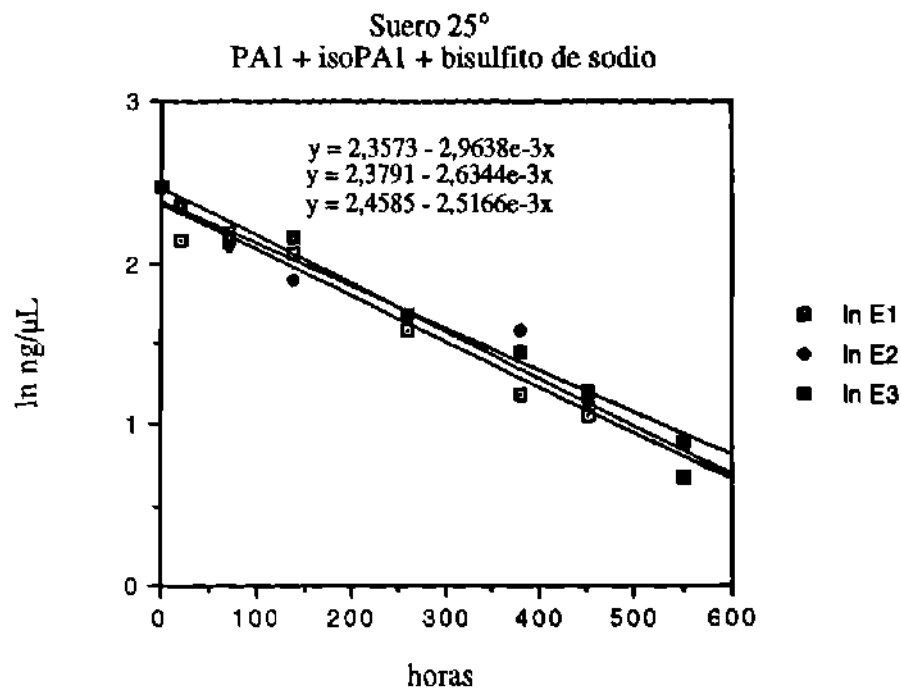


Fig 69. Cinéticas de Primer Orden de la Degradación de PA1 en en Suero a 25°C Experimento E.

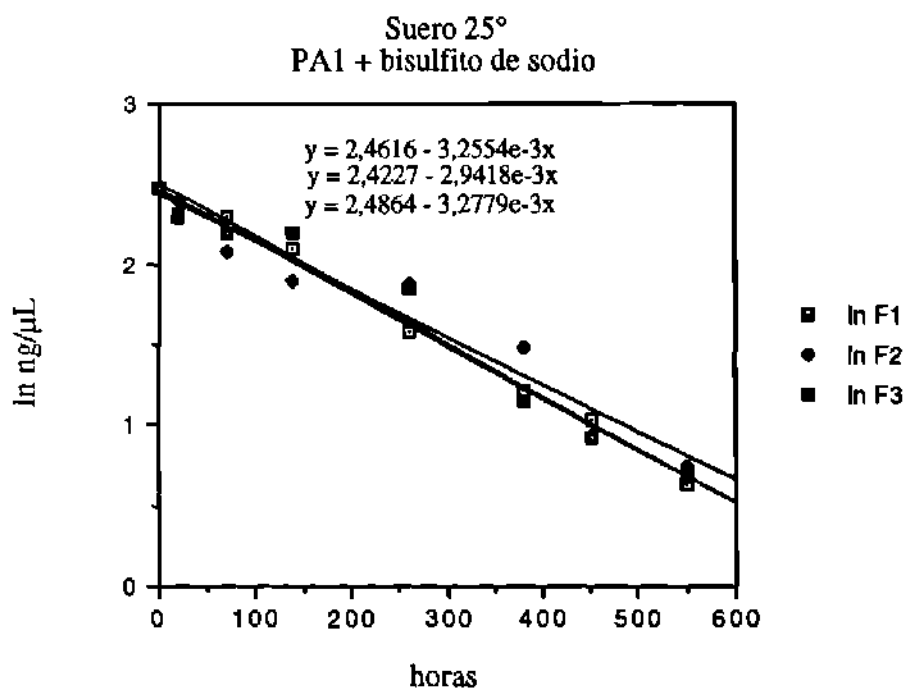


Fig 70. Cinéticas de Primer Orden de la Degradación de PA1 en en Suero a 25°C Experimento F.

### **3.4.3.3 Degradación de PA1 en Suero 37°C**

En la tabla 41 están tabulados los datos del estudio de degradación de PA1 en suero a 37°C en ng/μL. En la tabla 42 se tabuló el logaritmo natural de los datos de la tabla 41.

En las figuras 71, 72, 73, 74, 75 y 76 se graficaron las cinéticas de la tabla 42 , los cuales corresponden con un modelo cinético de primer orden.

En la figura 71 se graficaron los resultados del experimento A: degradación de PA1 sin agregar deliberadamente ningún otro compuesto.

La figura 72 corresponde con la grafica de los datos de la degradación obtenida en el experimento B, en el que se agregó además de PA1, isopA1.

La figura 73 corresponde con la gráfica de la degradación de PA1 cuando se le agregó isopA1 y ácido ascórbico, éste fue el experimento C.

La figura 74 es la gráfica de la degradación de PA1 en presencia de ácido ascórbico, experimento D.

Las figuras 75 y 76 corresponden con la degradación de PA1 en presencia de isopA1 y bisulfito de sodio para la primera y con bisulfito para la segunda, estos son los experimentos E y F respectivamente.

TABLA 41

DATOS DEL ESTUDIO DE DEGRADACIÓN DE PAI EN SUERO 37°C  
(ng/ $\mu$ L)

h	A			B			C			D			E			F		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
0	8,86	8,86	8,86	8,86	8,86	8,86	8,86	8,86	8,86	8,86	8,86	8,86	8,86	8,86	8,86	8,86	8,86	8,86
20	6,40	8,11	8,16	8,72	7,57	8,71	6,65	7,84	8,42	8,08	8,24	8,42	7,85	8,52	8,55	8,96	8,29	7,74
45	6,83	5,24	4,59	6,16	5,70	4,50	7,63	6,82	6,13	4,42	4,42	5,13	5,22	6,34	6,00	5,31	5,04	5,44
53	5,75	4,10	6,73	5,48	5,41	5,16				4,81	4,70	4,05	5,84	3,62	5,28	4,43	4,16	5,70
70	6,28	4,03	4,20	5,46	5,11	5,09	5,97	4,33	6,13	3,65	4,98	4,12	4,82	4,79	4,80	4,72	4,64	4,81
78	4,80	4,46	3,39	5,39	4,38	5,31	3,90	3,61	3,96	3,31	4,27	4,30	5,36	4,36	2,84	3,33	3,69	4,29
95	3,03	3,34	3,67	4,50	2,80	3,37	3,68	4,49	2,88	2,61	3,06	3,83	2,68	3,56	3,08	3,50	3,15	3,23
102	3,06	3,15	3,44	4,67	2,72	3,00	2,75	3,25	2,66	2,99	3,40	2,59	1,40	3,48	3,58	3,08	3,15	3,51
168	1,63	2,02	1,82	2,42	1,90	2,16	3,08	2,97	2,91	1,21	2,23	1,72	4,70	2,05	2,05	2,29	2,09	2,18
199	1,31	2,15	1,72	2,31	0,88	1,59	1,60	2,17	1,88	1,87	2,02	1,94	2,14	0,84	1,49	1,93	1,67	1,80
248	0,44	0,54	0,64	0,69	1,12	0,87	0,97	0,81	0,89	1,00	1,11	1,05	1,00	1,11	1,05	0,95	1,18	1,06

Condiciones experimentales: A = PAI; B = PAI + isoPAI; C = PAI + ácido ascórbico; D = PAI + ácido ascórbico; E = PAI + isoPAI + bisulfito de sodio F = PAI + bisulfito de sodio.. Los datos de los espacios en blanco fueron descartados ya que los valores no coincidían con el comportamiento observado

TABLA 42

DATOS DEL ESTUDIO DE DEGRADACIÓN DE PAI EN SUERO 37°C  
(ln ng/ $\mu$ L)

h	A			B			C			D			E			F		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
0	2,18	2,18	2,18	2,18	2,18	2,18	2,18	2,18	2,18	2,18	2,18	2,18	2,18	2,18	2,18	2,18	2,18	2,18
20	1,86	2,09	2,10	2,17	2,02	2,16	1,89	2,06	2,13	2,09	2,11	2,13	2,06	2,14	2,15	2,19	2,12	2,05
45	1,92	1,66	1,52	1,82	1,74	1,50	2,03	1,92	1,81	1,49	1,49	1,64	1,65	1,85	1,79	1,67	1,62	1,69
53	1,75	1,41	1,91	1,70	1,69	1,64				1,57	1,55	1,40	1,76	1,29	1,66	1,49	1,43	1,74
70	1,84	1,39	1,44	1,70	1,63	1,63	1,79	1,47	1,81	1,29	1,61	1,42	1,57	1,57	1,57	1,55	1,53	1,57
78	1,57	1,50	1,22	1,68	1,48	1,67	1,36	1,28	1,38	1,20	1,45	1,46	1,68	1,47	1,04	1,20	1,31	1,46
95	1,11	1,21	1,30	1,50	1,03	1,21	1,30	1,50	1,06	0,96	1,12	1,34	1,55	1,27	1,12	1,25	1,15	1,17
102	1,12	1,15	1,24	1,54	1,00	1,10	1,01	1,18	0,98	1,10	1,22	0,95	0,99	1,25	1,28	1,12	1,14	1,26
168	0,49	0,70	0,60	0,88	0,64	0,77	1,12	1,09	1,07	0,19	0,80	0,54	0,76	0,72	0,72	0,83	0,74	0,78
199	0,27	0,25	0,30	0,84	-0,13	0,46	0,47	0,77	0,63	0,63	0,70	0,66	0,34	-0,17	0,40	0,66	0,51	0,59
248	-0,82	-0,62	-0,45	-0,37	0,11	-0,14	-0,03	-0,21	-0,12	0,00	0,10	0,05	0,00	0,10	0,05	-0,05	0,17	0,06

Condiciones experimentales: A = PAI; B = PAI + isoPAI; C = PAI + ácido ascórbico; D = PAI + ácido ascórbico; E = PAI + isoPAI + ácido ascórbico; F = PAI + isoPAI + bisulfito de sodio F = PAI + bisulfito de sodio. Los datos de los espacios en blanco fueron descartados ya que los valores no coincidían con el comportamiento observado.

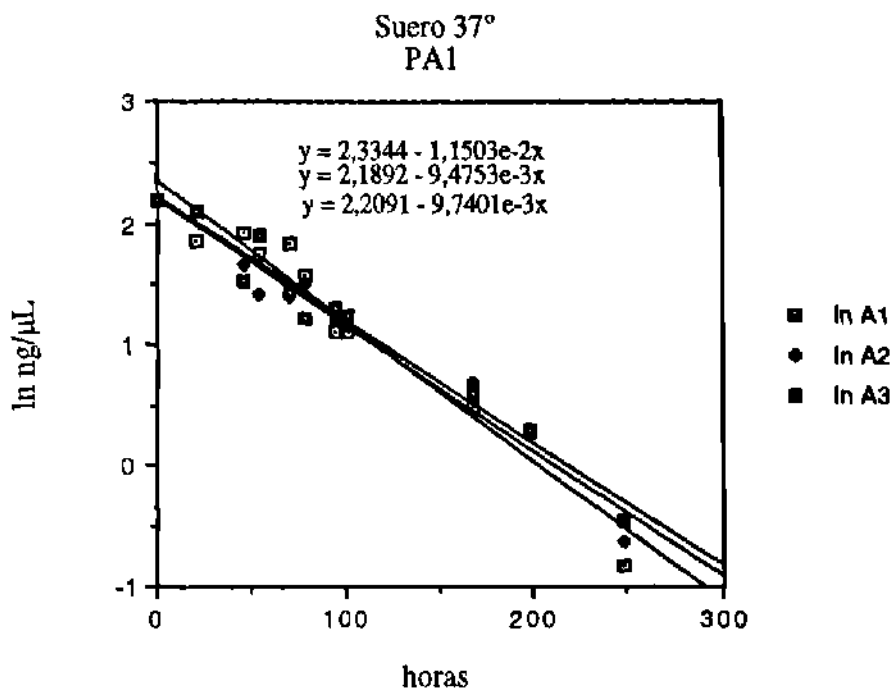


Fig 71. Cinéticas de Primer Orden de la Degradación de PA1 en en Suero a 37°C. Experimento A.

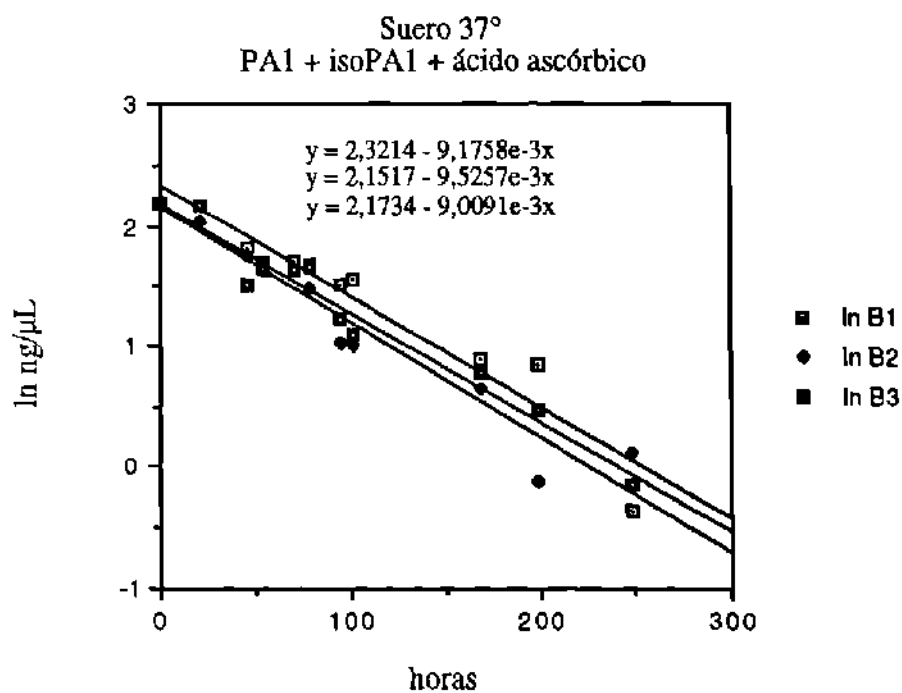


Fig 72. Cinéticas de Primer Orden de la Degradación de PA1 en Suero a 37°C. Experimento B.

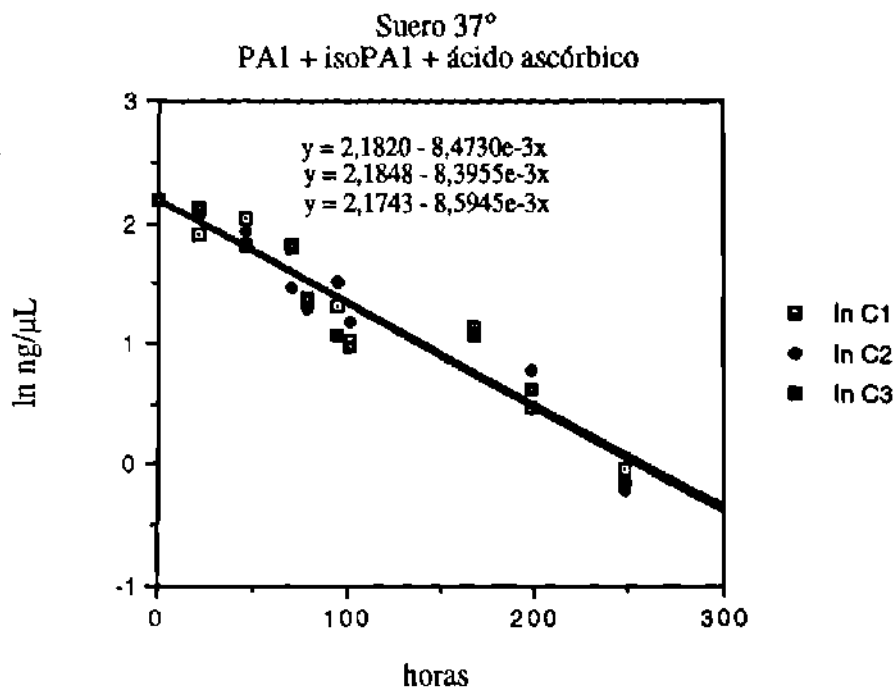


Fig 73. Cinéticas de Primer Orden de la Degradación de PA1 en Suero a 37°C.  
Experimento C.

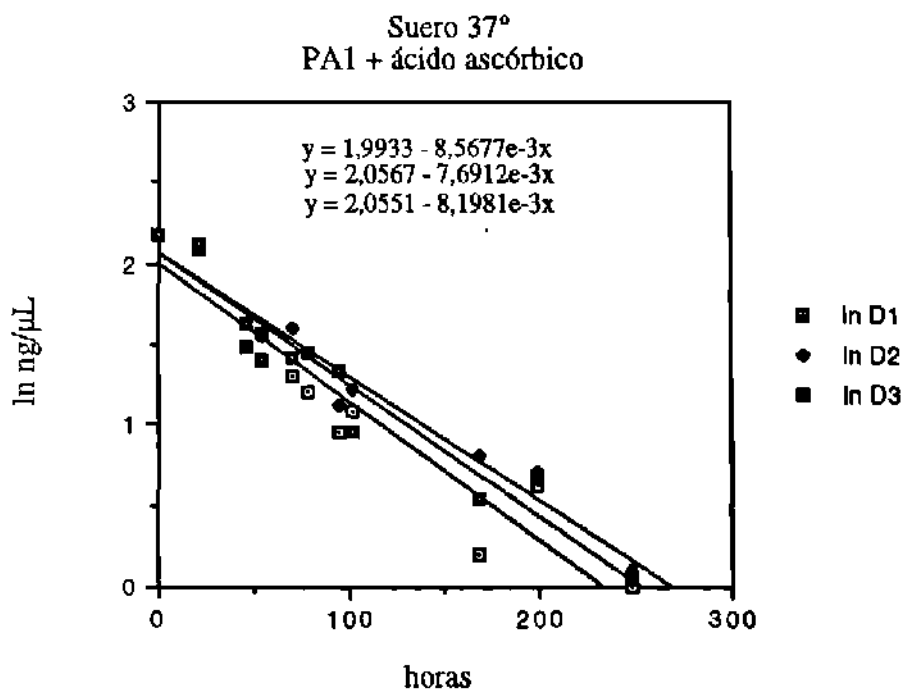


Fig 74. Cinéticas de Primer Orden de la Degradación de PA1 en Suero a 37°C.  
Experimento D.



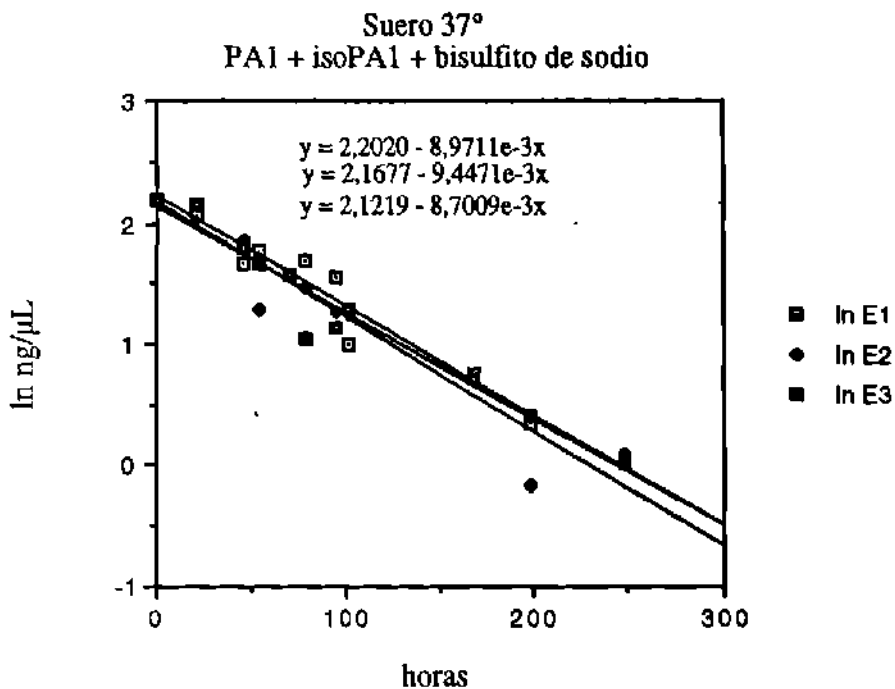


Fig 75. Cinéticas de Primer Orden de la Degradación de PAI en Suero a 37°C.  
Experimento E.

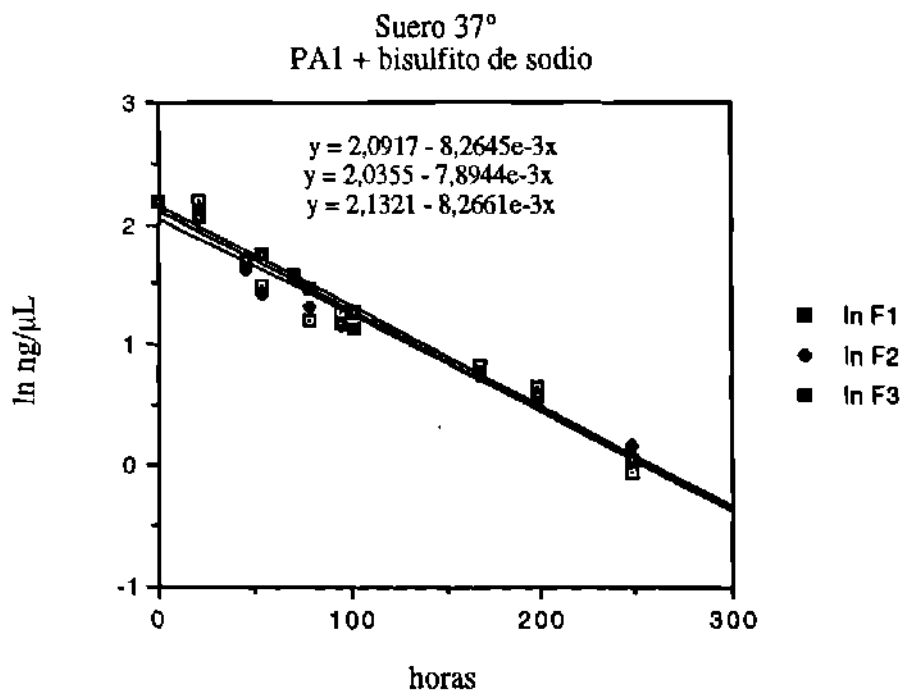


Fig 76. Cinéticas de Primer Orden de la Degradación de PAI en Suero a 37°C.  
Experimento F.

### **3.4.4 Degradación de PA1 en Acetato de Etilo**

#### **3.4.4.1 Degradación de PA1 en Acetato de Etilo a -4°C**

En la tabla 43 están tabulados los datos del estudio de degradación de PA1 en acetato de etilo a - 4°C en ng/ $\mu$ L. En la tabla 44 se tabuló el logaritmo natural de los datos de la tabla 43.

En las figuras 77, 78, 79 y 80 se graficaron las cinéticas de la tabla 44 , los cuales corresponden con un modelo cinético de primer orden.

En la figura 77 se graficaron los resultados del experimento A: degradación de PA1 sin agregar deliberadamente ningún otro compuesto.

La figura 78 corresponde con la grafica de los datos de la degradación obtenida en el experimento B, en el que se agregó además de PA1, isopA1.

La figura 79 corresponde con la gráfica de la degradación de PA1 cuando se le agregó isopA1 y ácido ascórbico, éste fue el experimento C.

La figura 80 es la gráfica de la degradación de PA1 en presencia de ácido ascórbico, experimento D.

TABLA 43

DATOS DEL ESTUDIO DE DEGRADACIÓN DE PAI EN ACETATO DE ETILO A -4°C  
(ng/μL)

h	A			B			C			D		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
0	11,77	11,77	11,77	11,77	11,77	11,77	11,77	11,17	11,17	11,17	11,17	11,17
309	10,07	9,44	8,81	8,64	8,34	8,04	10,31	9,94	9,57	10,47	10,37	10,21
693	8,18	7,93	8,01	7,69	7,02	6,35	9,53	8,97	8,41	9,11	8,86	8,61
1059	7,00	7,11	7,26	6,47	6,53	6,59	8,54	8,05	7,45	8,34	6,67	8,25
1251	6,37	6,71	5,96	6,48	5,85	5,78	7,86	6,55	7,11	6,45	6,09	6,87
1387	5,72	6,21	5,64	6,13	4,04	5,22	6,42	6,32	6,46	6,37	6,32	6,31
1701	4,08	5,09	3,86	4,77	4,79	4,64	4,97	5,03	4,61	4,87	4,76	4,42
2014	3,50	3,17	3,33	3,33	3,48	3,15	3,79	3,03	3,56	3,55	3,14	2,93

Condiciones experimentales: A = PAI; B = PAI + isoPAI; C = PAI + isoPAI + ácido ascórbico; D = PAI + ácido ascórbico;

TABLA 44

DATOS DEL ESTUDIO DE DEGRADACIÓN DE PAI EN ACETATO DE ETILO A -4°C  
(ln ng/ $\mu$ L)

h	A			B			C			D		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
0	2,47	2,47	2,47	2,47	2,47	2,47	2,47	2,47	2,47	2,47	2,47	2,47
309	2,31	2,24	2,18	2,16	2,12	2,08	2,33	2,30	2,26	2,35	2,34	2,32
693	2,10	2,07	2,08	2,04	1,95	1,85	2,25	2,19	2,13	2,21	2,18	2,15
1059	1,95	1,96	1,98	1,87	1,88	1,59	2,14	2,09	2,01	2,12	1,89	2,11
1251	1,85	1,90	1,79	1,87	1,77	1,75	2,06	1,88	1,96	1,86	1,81	1,93
1387	1,74	1,83	1,73	1,81	1,57	1,65	1,86	1,84	1,87	1,85	1,84	1,84
1701	1,41	1,63	1,35	1,56	1,40	1,53	1,60	1,62	1,53	1,58	1,56	1,49
2014	1,25	1,15	1,20	1,20	1,25	1,15	1,33	1,11	1,27	1,27	1,14	1,08

Condiciones experimentales: A = PAI; B = PAI + isoPAI; C = PAI + ácido ascórbico; D = PAI + ácido ascórbico;

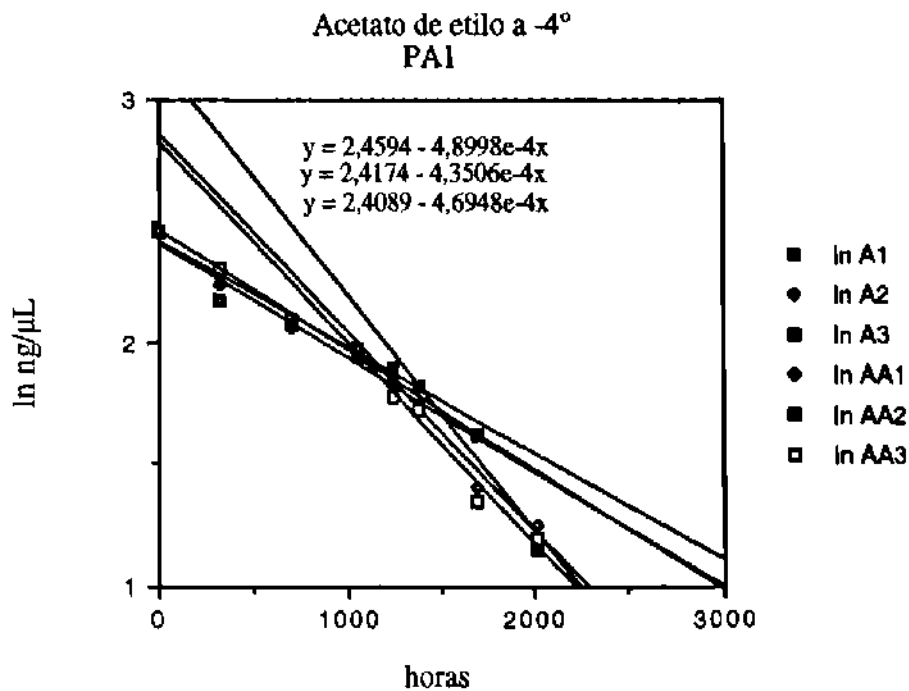


Fig 77. Cinéticas de Primer Orden de la Degradación de PA1 en AcOEt a -4°C.  
Experimento A.

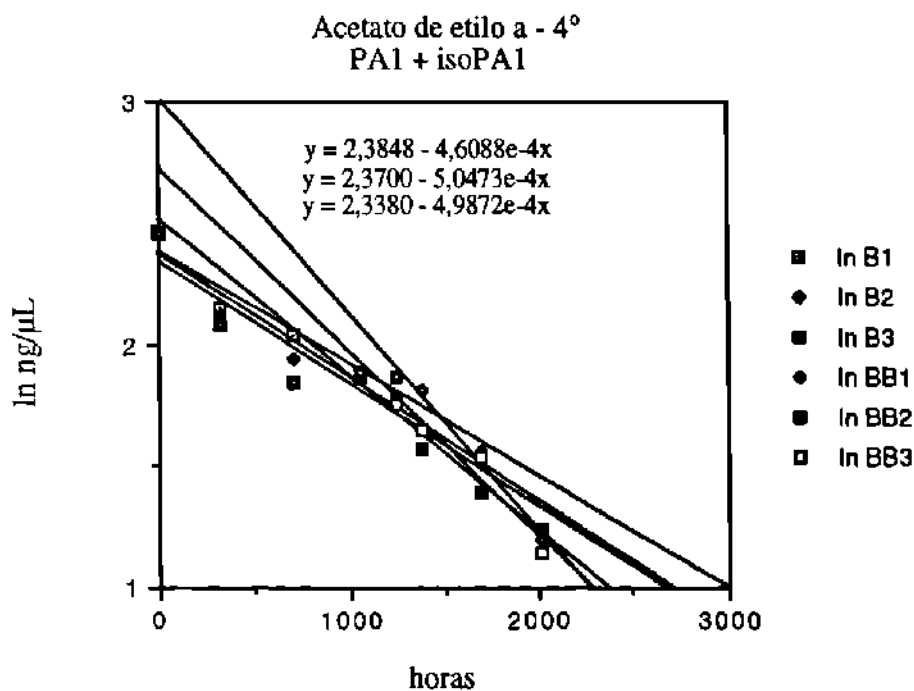


Fig 78. Cinéticas de Primer Orden de la Degradación de PA1 en AcOEt a -4°C.  
Experimento B.

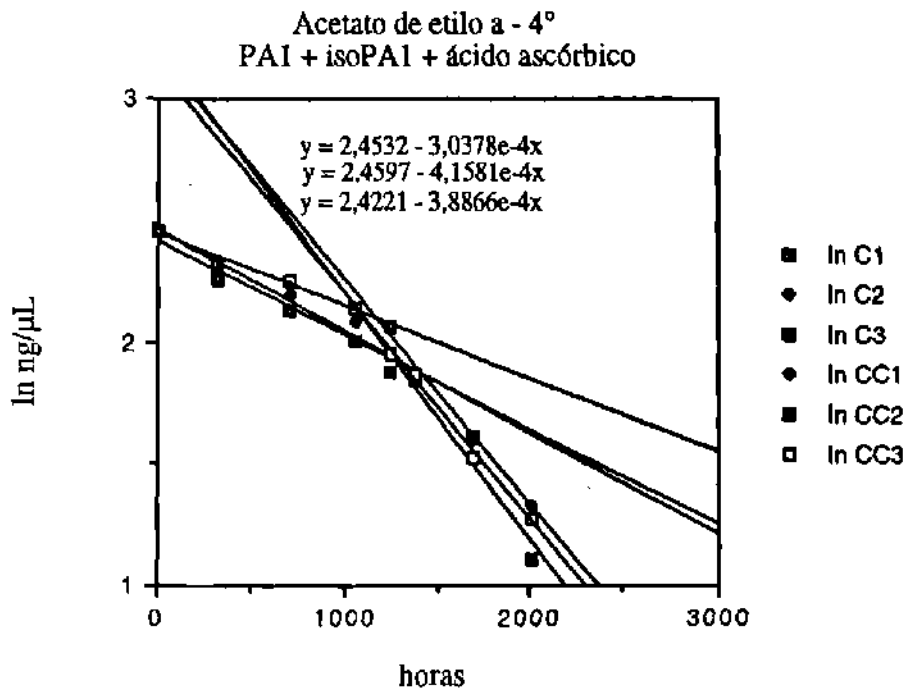


Fig 79. Cinéticas de Primer Orden de la Degradación de PAI en AcOEt a -4°C. Experimento C.

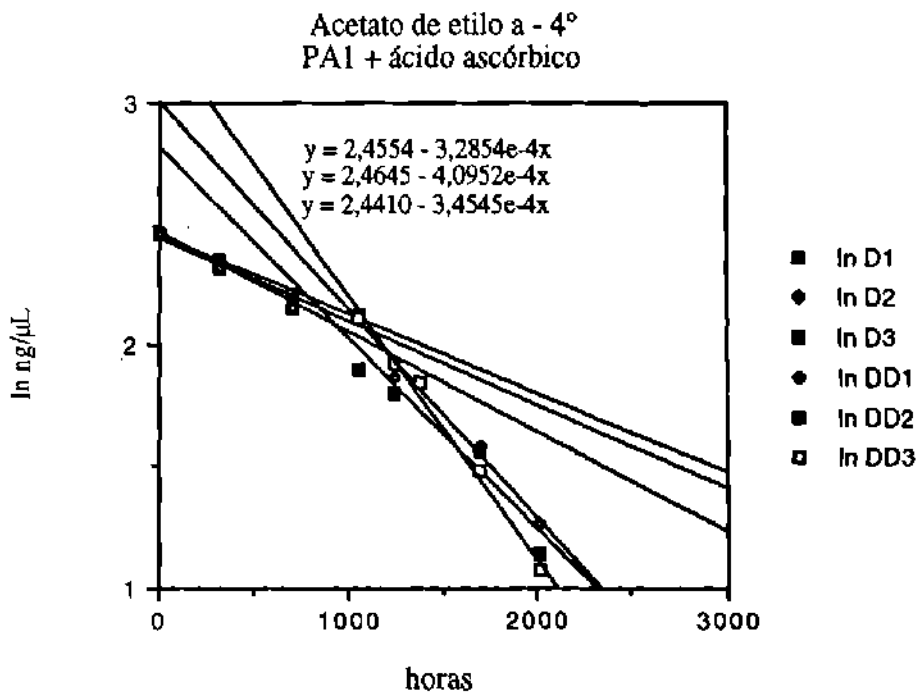


Fig 80. Cinéticas de Primer Orden de la Degradación de PAI en AcOEt a -4°C. Experimento D.

#### **3.4.4.2 Degradación de PA1 en Acetato de Etilo a 25°C**

En la tabla 45 están tabulados los datos del estudio de degradación de PA1 en acetato de etilo a 25°C en ng/μL. En la tabla 46 se tabuló el logaritmo natural de los datos de la tabla 45.

En las figuras 81, 82, 83 y 84 se graficaron las cinéticas de la tabla 46 , los cuales corresponden con un modelo cinético de primer orden.

En la figura 81 se graficaron los resultados del experimento A: degradación de PA1 sin agregar deliberadamente ningún otro compuesto.

La figura 82 corresponde con la grafica de los datos de la degradación obtenida en el experimento B, en el que se agregó además de PA1, isopA1.

La figura 83 corresponde con la gráfica de la degradación de PA1 cuando se le agregó isopA1 y ácido ascórbico, éste fue el experimento C.

La figura 84 es la gráfica de la degradación de PA1 en presencia de ácido ascórbico, experimento D.

TABLA 45

DATOS DEL ESTUDIO DE DEGRADACIÓN DE PAI EN ACETATO DE ETILO A -25°C  
(ng/ $\mu$ L)

h	A			B			C			D		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
0	10,06	10,06	10,06	10,06	10,06	10,06	10,06	10,06	10,06	10,06	10,06	10,06
309	5,70	7,07	6,38	6,27	7,21	7,21	5,80	6,05	6,55	6,72	6,38	7,61
548	5,15	4,62	5,43	6,37	5,75	5,51	6,69	6,86	6,71	5,51	6,43	6,88
622	4,71	4,26	4,47	3,75	5,02	4,51	5,56	5,36	5,28	6,36	5,13	5,60
671	3,60	3,91	5,20	4,21	4,38	4,59	4,58	4,50	3,95	4,29	3,88	3,48
741	4,06	2,70	5,33	4,95	3,58	3,96	4,25	4,36	4,29	2,91	4,27	3,59
788	3,73	4,21	2,67	3,36	4,60	4,50	3,85	4,12	4,21	3,88	4,28	4,01
883	3,37	3,98	3,07	3,71	3,45	3,20	2,94	3,89	4,17	3,49	3,25	3,37
978	3,13	3,83	3,89	3,60	3,67	3,64	3,83	3,31	3,44	2,65	3,34	4,06
1059	3,86	2,73	3,29	3,92	2,71	3,63	2,66	2,87	2,76	3,44	3,30	3,24
1387	1,81	2,18	3,48	2,00	1,65	1,68	1,95	2,61	3,27	2,21	1,79	1,72

Condiciones experimentales: A = PAI; B = PAI + isoPAI; C = PAI + isoPAI + ácido ascórbico; D = PAI + ácido ascórbico;



TABLA 46

DATOS DEL ESTUDIO DE DEGRADACIÓN DE PAI EN ACETATO DE ETILO A 25°C  
(In ng/ $\mu$ L)

h	A			B			C			D		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
0	2,31	2,31	2,31	2,31	2,31	2,31	2,31	2,31	2,31	2,31	2,31	2,31
309	1,74	1,96	1,85	1,84	1,98	1,98	1,76	1,80	1,88	1,91	1,85	2,03
548	1,64	1,53	1,69	1,85	1,75	1,71	1,90	1,93	1,90	1,71	1,82	1,79
622	1,55	1,45	1,50	1,32	1,61	1,51	1,72	1,68	1,66	1,63	1,64	1,72
671	1,28	1,36	1,65	1,44	1,48	1,52	1,52	1,50	1,37	1,46	1,36	1,23
741	1,40	0,99	1,67	1,60	1,28	1,38	1,45	1,47	1,46	1,38	1,45	1,28
788	1,32	1,44	0,98	1,21	1,53	1,50	1,35	1,42	1,44	1,36	1,45	1,39
883	1,21	1,38	1,12	1,31	1,24	1,16	1,08	1,36	1,43	1,25	1,18	1,21
978	1,14	1,34	1,36	1,28	1,30	1,29	1,34	1,20	1,24	1,21	1,21	1,40
1059	1,35	1,00	1,19	1,37	1,00	1,29	0,98	1,05	1,02	1,19	1,19	1,18
1387	0,59	0,78	1,24	0,69	0,50	0,52	0,67	0,96	1,18	0,79	0,58	0,54

Condiciones experimentales: A = PAI; B = PAI + isoPAI; C = PAI + isoPAI + ácido ascórbico; D = PAI + ácido ascórbico;

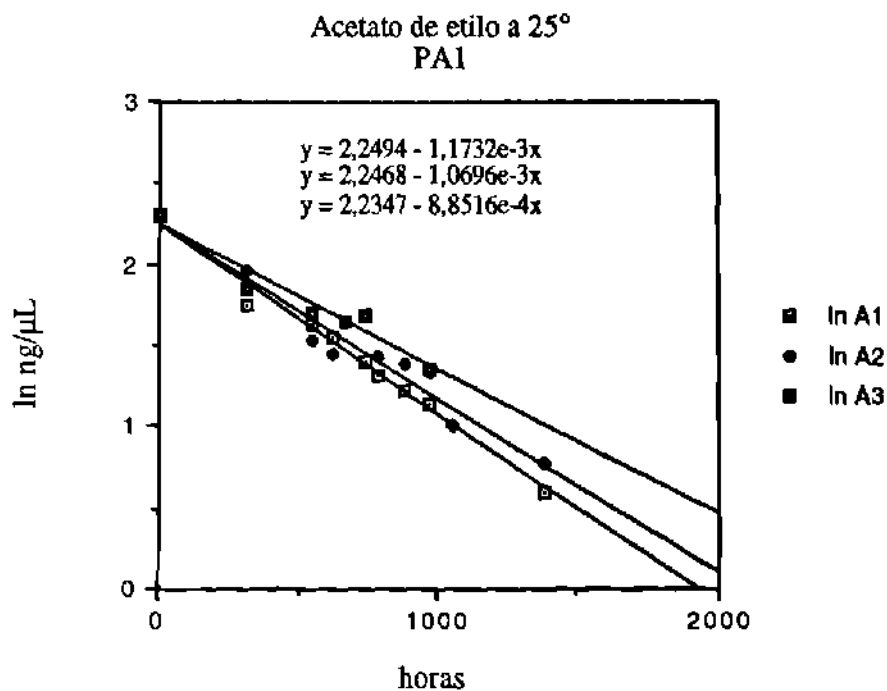


Fig 81. Cinéticas de Primer Orden de la Degradación de PA1 en AcOEt a 25°C.  
Experimento A.

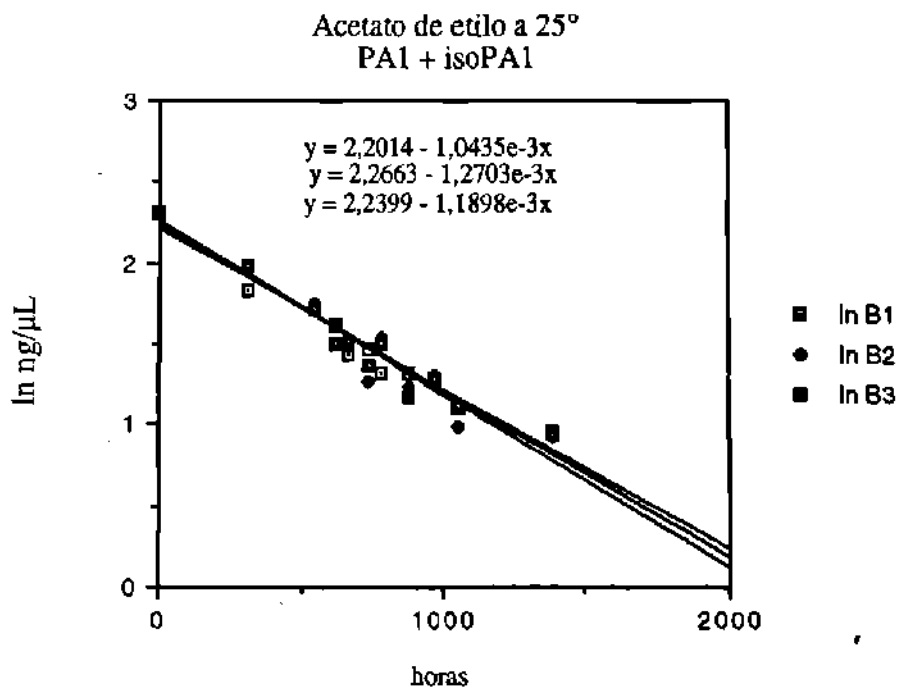


Fig 82. Cinéticas de Primer Orden de la Degradación de PA1 en AcOEt a 25°C.  
Experimento B.

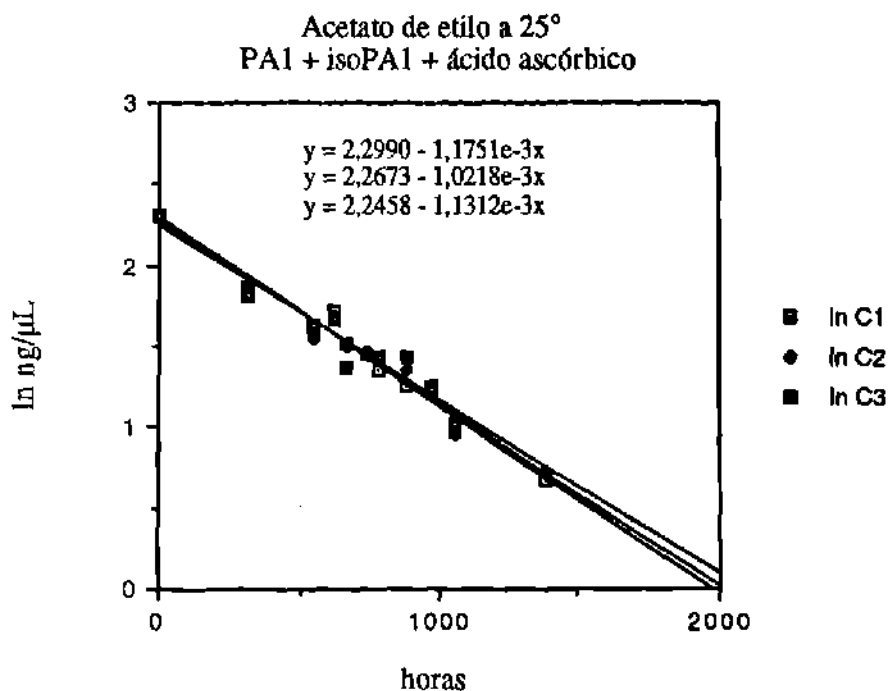


Fig 83. Cinéticas de Primer Orden de la Degradación de PA1 en AcOEt a 25°C.  
Experimento C.

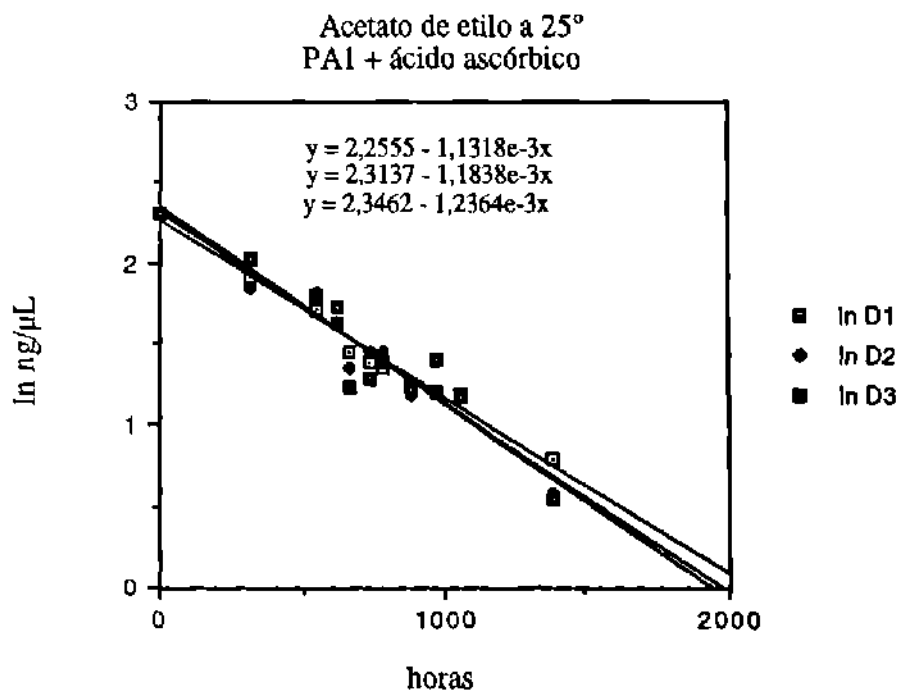


Fig 84. Cinéticas de Primer Orden de la Degradación de PA1 en AcOEt a 25°C.  
Experimento D.

### **3.4.4.3 Degradación de PA1 en Acetato de Etilo a 37°C**

En la tabla 47 están tabulados los datos del estudio de degradación de PA1 en acetato de etilo a 37°C en ng/ $\mu$ L. En la tabla 48 se tabuló el logaritmo natural de los datos de la tabla 47.

En las figuras 85, 86, 87 y 88 se graficaron las cinéticas de la tabla 48 , los cuales corresponden con un modelo cinético de primer orden.

En la figura 85 se graficaron los resultados del experimento A: degradación de PA1 sin agregar deliberadamente ningún otro compuesto.

La figura 86 corresponde con la grafica de los datos de la degradación obtenida en el experimento B, en el que se agregó además de PA1, isopA1.

La figura 87 corresponde con la gráfica de la degradación de PA1 cuando se le agregó isopA1 y ácido ascórbico, éste fue el experimento C.

La figura 88 es la gráfica de la degradación de PA1 en presencia de ácido ascórbico, experimento D.

TABLA 47

DATOS DEL ESTUDIO DE DEGRADACIÓN DE PAI EN ACETATO DE ETILO A 37°C  
(ng/ $\mu$ L)

h	A			B			C			D		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
0	10,06	10,06	10,06	10,06	10,06	10,06	10,06	10,06	10,06	10,06	10,06	10,06
95	9,55	9,12	8,69	9,64	8,86	8,08	8,24	7,24	6,24	8,71	8,60	8,50
170	7,67	7,24	6,81	7,38	6,60	5,82	6,46	5,46	4,46	7,30	7,16	7,05
309	5,83	5,95	5,09	5,31	5,61	4,05	2,48	3,12	3,48	4,09	4,32	6,28
408	3,62	3,56	3,50	4,13	3,73	3,33	2,79	2,65	2,51	4,68	3,43	2,18
500	3,12	3,18	3,06	4,03	3,23	3,28	2,32	2,04	2,03	2,37	4,87	2,38
623	2,21	2,39	2,56	1,52	2,19	2,46	1,64	2,45	0,64	2,24	2,07	3,11
646	1,28	2,69	1,31	1,50	2,50	2,06	1,63	1,54	1,46	0,40	1,53	2,66
668	1,38	1,68	2,14	2,26	1,94	1,62	1,80	0,93	1,71	1,47	1,55	1,51
766	1,45	1,26	1,06	0,76	0,95	1,14	0,79	0,56	1,16	0,81	0,36	1,38

Condiciones experimentales: A = PAI; B = PAI + isoPAI; C = PAI + isoPAI + ácido ascórbico; D = PAI + ácido ascórbico;

TABLA 48

DATOS DEL ESTUDIO DE DEGRADACIÓN DE PAI EN ACETATO DE ETILO A 37°C  
(ln ng/μL)

h	A			B			C			D		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
0	2,31	2,31	2,31	2,31	2,31	2,31	2,31	2,31	2,31	2,31	2,31	2,31
95	2,26	2,21	2,16	2,27	2,18	2,09	2,11	1,98	1,83	2,16	2,15	2,14
170	2,04	1,98	1,92	2,00	1,89	1,76	1,87	1,70	1,50	1,99	1,97	1,95
309	1,76	1,78	1,63	1,67	1,72	1,40	0,91	1,14	1,25	1,41	1,46	1,84
408	1,29	1,27	1,25	1,42	1,32	1,20	1,03	0,97	0,92	1,54	1,23	1,13
500	1,14	1,16	1,12	1,03	0,98	1,02	0,84	0,71	0,71	0,86	1,58	0,98
623	0,79	0,87	0,94	0,42	0,49	0,52	0,49	0,90	0,54	0,81	0,73	0,87
646	0,37	0,99	0,27	0,41	0,39	0,43	0,49	0,43	0,38	0,39	0,43	0,78
668	0,35	0,52	0,76	0,37	0,31	0,36	0,59	-0,07	0,53	0,38	0,44	0,41
766	0,32	0,23	0,06	0,13	0,11	0,13	-0,24	-0,58	0,15	-0,21	-1,02	0,32

Condiciones experimentales: A = PAI; B = PAI + isoPAI; C = PAI + isoPAI + ácido ascórbico; D = PAI + ácido ascórbico;

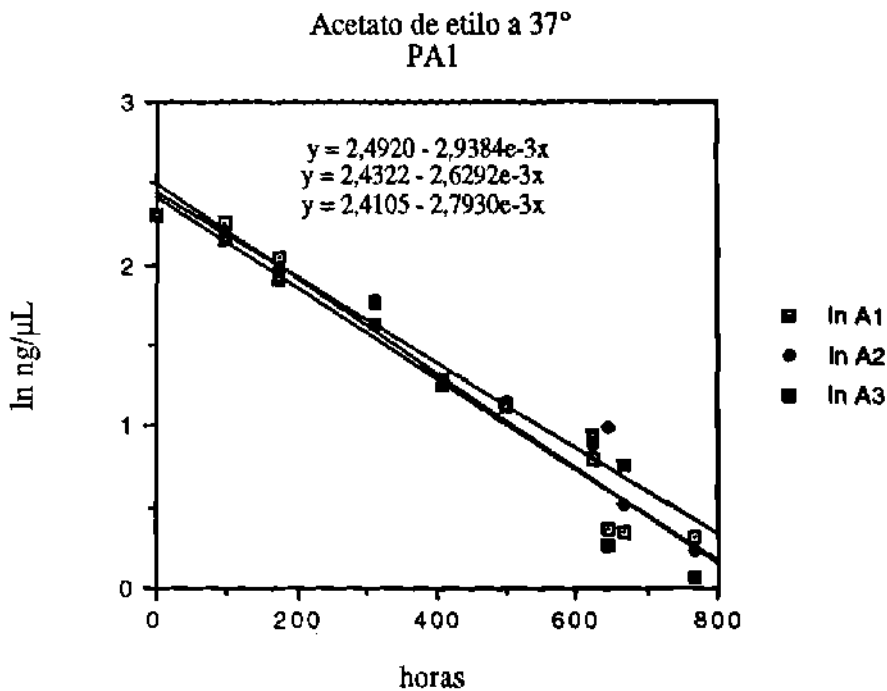


Fig 85. Cinéticas de Primer Orden de la Degradación de PA1 en AcOEt a 37°C.  
Experimento A.

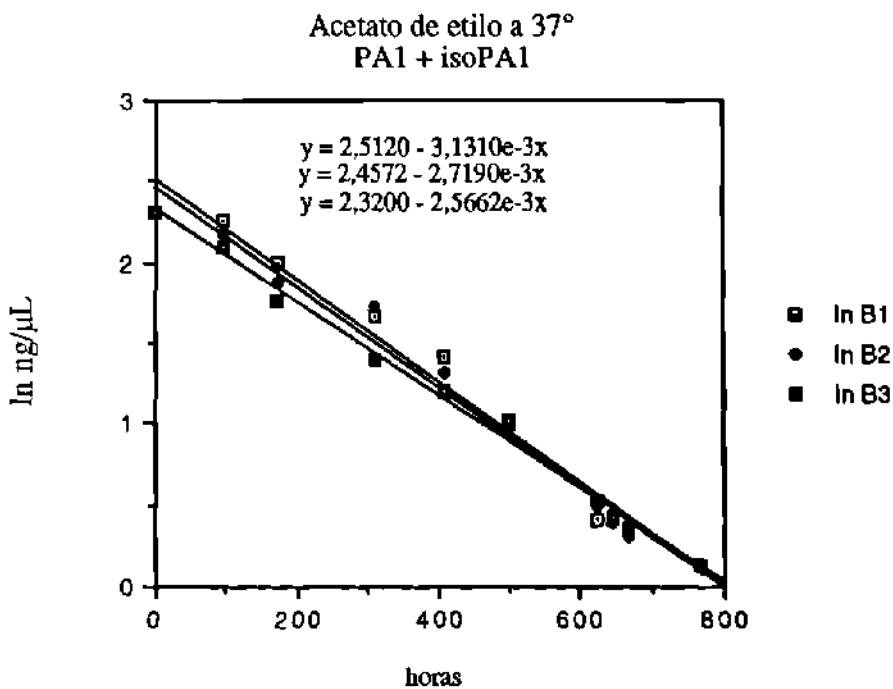


Fig 86. Cinéticas de Primer Orden de la Degradación de PA1 en AcOEt a 37°C.  
Experimento B.

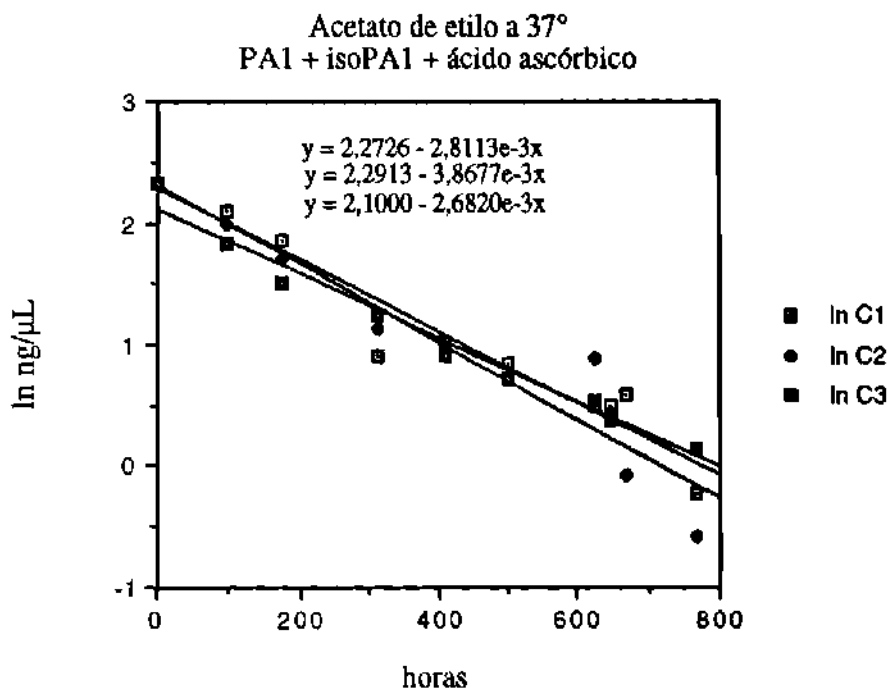


Fig 87. Cinéticas de Primer Orden de la Degradación de PA1 en AcOEt a 37°C.  
Experimento C.

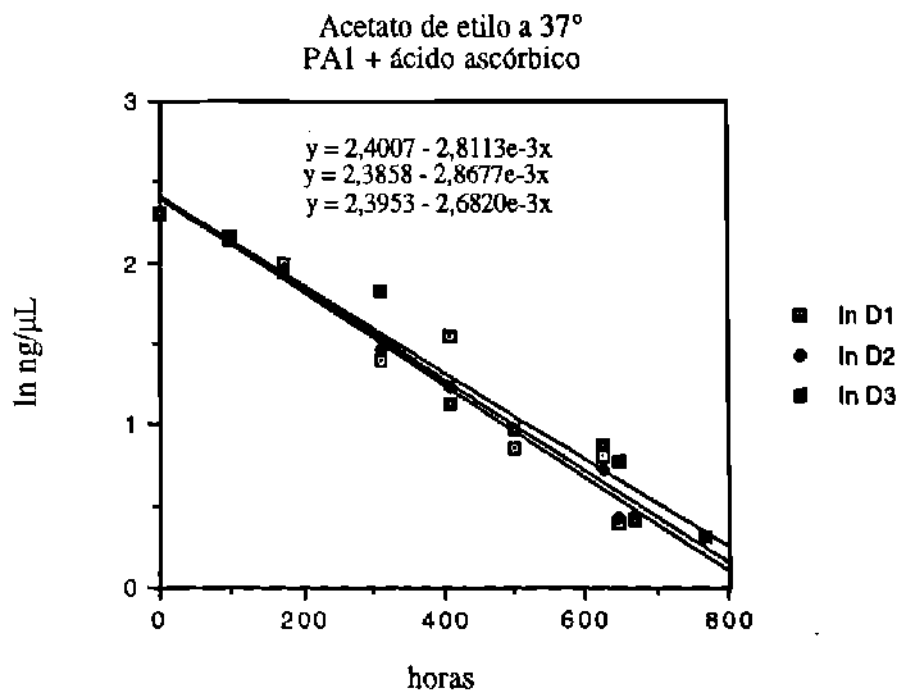


Fig 88. Cinéticas de Primer Orden de la Degradación de PA1 en AcOEt a 37°C.  
Experimento D.



### **3.5 Tablas con los Valores de las Constantes de Velocidad de la Degradación de PA1 en Metanol, Buffer de fosfatos pH 7,4, Suero y Acetato de Etilo, a -4°C, 25°C y 37°C**

En la tabla 49 se encuentra el valor de la constante de velocidad de la degradación de PA1 en metanol a - 4°C, 25°C y 37°C de las seis condiciones experimentales estudiadas.

En la tabla 50 se encuentra el valor de la constante de velocidad de la degradación de PA1 en buffer de fosfatos pH 7,4 a - 4°C, 25°C y 37°C de las seis condiciones experimentales estudiadas.

En la tabla 51 se encuentra el valor de la constante de velocidad de la degradación de PA1 en suero a - 4°C, 25°C y 37°C de las seis condiciones experimentales estudiadas.

En la tabla 49 se encuentra el valor de la constante de velocidad de la degradación de PA1 en acetato de etilo a - 4°C, 25°C y 37°C de las seis condiciones experimentales estudiadas.

TABLA 49

CONSTANTES DE VELOCIDAD DEL ESTUDIO DE DEGRADACIÓN DE PAI  
EN METANOL

A	B	C	D	E	F
-4°C k(10 <sup>4</sup> )					
5,3731	6,1337	6,0187	7,6507	6,9485	6,8091
8,8440	8,0974	9,0264	8,0081	8,0888	7,7589
7,7573	8,0629	9,6970	9,5981	9,4229	8,4147
25°C k(10 <sup>3</sup> )					
3,8907	3,8955	3,3650	5,6969	3,2784	2,1450
4,9910	3,5562	2,9998	5,2539	3,3149	3,3149
5,0330	4,2052	3,1087	5,1567	4,2225	2,5617
37°C k(10 <sup>2</sup> )					
1,4146	1,1505	0,7868	0,7234	1,4460	1,4266
1,1155	1,1136	0,7784	0,6554	1,4098	1,6241
1,4019	1,0282	0,6380	0,7174	1,4467	1,4521

Condiciones experimentales

A = PAI; B = PAI + Isop AI; C = PAI + Isop AI + Ácido ascórbico; D = PAI + Ácido ascórbico;

E = PAI + Isop AI + Bisulfito de sodio; F = PAI + Bisulfito de sodio.

TABLA 50

CONSTANTES DE VELOCIDAD DEL ESTUDIO DE DEGRADACIÓN DE PAI  
EN BUFFER PH 7,4

A	B	C	D	E	F
<b>- 4°C</b>					
<b>k(10<sup>3</sup>)</b>					
1,6792	1,8167	1,7324	1,5109	1,9472	1,7443
1,6926	1,7984	1,6403	1,5669	1,6621	1,8459
1,5134	1,7870	1,5866	1,7457	1,6338	1,8053
<b>25°C</b>					
<b>k(10<sup>3</sup>)</b>					
7,1865	7,5606	5,9954	7,2890	7,7054	7,3240
7,6148	7,7924	7,4073	6,9239	7,2846	7,3297
7,1623	7,7924	7,4073	6,9239	7,2846	7,3297
<b>37°C</b>					
<b>k(10<sup>3</sup>)</b>					
2,8307	2,7425	2,7485	2,4293	2,5672	2,5340
2,9773	3,0558	2,5333	2,5359	3,4580	2,6348
2,7934	2,6006	2,6604	2,6604	2,2795	2,6555

Condiciones experimentales

A = PAI; B = PAI + Isop A1; C = PAI + Isop A1 + Ácido ascórbico; D = PAI + Ácido ascórbico;

E = PAI + Isop A1 + Bisulfito de sodio; F = PAI + Bisulfito de sodio.

TABLA 51

CONSTANTES DE VELOCIDAD DEL ESTUDIO DE DEGRADACIÓN DE PAI  
EN SUERO

A	B	C	D	E	F
-4°C k(10 <sup>4</sup> )					
9,4078	8,5527	8,3590	8,4674	8,8503	1,5843
8,3372	6,6801	7,2395	5,8142	1,0572	5,7375
6,0605	7,3642	8,0446	7,1602	8,5825	3,7136
25°C k(10 <sup>5</sup> )					
2,2125	2,3376	2,0783	2,9638	2,7653	3,2554
2,5618	2,8526	2,7476	2,7926	2,6344	2,9418
2,2531	2,0292	2,8951	2,8104	2,5166	3,2779
37°C k(10 <sup>5</sup> )					
11,5030	9,1758	8,4730	8,5677	8,9711	8,2645
9,4753	9,5257	8,3955	9,6912	9,4471	7,8944
9,7401	9,0091	8,5945	8,1981	8,7009	8,2661

Condiciones experimentales

A= PAI; B= PAI + Isop A1; C = PAI + Ácido ascórbico; D = PAI + Ácido ascórbico;

E = PAI + Isop A1 + Bisulfito de sodio; F = PAI + Bisulfito de sodio.

TABLA 52

CONSTANTES DE VELOCIDAD DEL ESTUDIO DE DEGRADACIÓN DE PAI  
EN ACETATO DE ETILO

A	B	C	D
<b>-4°C</b>			
<b>k(10<sup>4</sup>)</b>			
4,8998	4,6088	3,0378	3,2854
4,3506	5,0473	4,1581	4,0952
4,6948	4,9872	3,8866	3,4545
<b>25°C</b>			
<b>k(10<sup>3</sup>)</b>			
1,1732	1,0435	1,1751	1,1318
1,0696	1,2703	1,0218	1,1838
8,8516	1,1898	1,1312	1,2364
<b>37°C</b>			
<b>k(10<sup>3</sup>)</b>			
2,9384	3,1310	2,9466	2,8113
2,6292	2,7190	3,2082	2,8677
2,7930	2,5662	2,6509	2,6820

• Condiciones experimentales A= PAI; B= PAI + Isop AI; C = PAI + Isop AI + Ácido ascórbico;  
D = PAI + Ácido ascórbico;

## CAPÍTULO 4

### DISCUSIÓN

La presente investigación tuvo como fin determinar el efecto que isopA1 podría tener sobre la degradación de PA1. Las propiedades cromatográficas de isopA1 son semejantes a las de PA1, y ya que la cromatografía de Líquidos es la técnica que se emplea para purificar PA1, los lotes de éste se obtuvieran con una pequeña cantidad de isopA1 si bien no alterará la citotoxicidad de PA1, no se tiene información acerca de si este contaminante pudiera influir en la degradación de PA1.

La descomposición de PA1 es un fenómeno indeseable ya que debido a él la vida útil de PA1 disminuye y la presencia de los productos de degradación pueden tal vez complicar el mecanismo de acción de este compuesto, por lo que los resultados ofrecen información que contribuyen para la vida útil de este compuesto.

Para llevar a cabo este trabajo inicialmente se consideró utilizar como control PA1 completamente pura, por lo que se intentó desarrollar un método para la repurificación de PA1, las pruebas que se realizaron fueron infructuosas ya que en los cromatogramas obtenidos en CLAR analítico de las fracciones eluidas por CLAR preparativo se observó una señal pequeña junto a la señal de PA1 que corresponde a isopA1, figuras 5, 6, 7, 8 y 9.

Lo anterior obligó a rediseñar los experimentos: se determinó la velocidad de reacción de la degradación de PA1 de una solución a la que deliberadamente se le agregó una cantidad de isopA1 hasta completar el 6 %, con respecto a la cantidad de PA1 presente, y se comparó la constante de velocidad obtenida con la obtenida al estudiar la degradación de la solución de PA1 a la que no se le agregó isopA1; esta

última sirvió como control y referencia de los experimentos efectuados en los distintos solventes y temperaturas.

El efecto de ácido ascórbico y bisulfito de sodio se estudió de la misma manera: a una solución de PA1 se le agregó el 6 % de antioxidante, con respecto a la cantidad de PA1 presente en la solución, se determinó la constante de velocidad y se comparó con la constante de velocidad obtenida del estudio de degradación de la solución de PA1 sin el antioxidante.

La cuantificación de isopA1 se determinó por <sup>1</sup>HRMN, ya que por CLAR analítico las señales de PA1 e isopA1 se traslapan y la resolución entre ambos es relativamente pobre, lo cual afecta de manera importante los resultados de la cuantificación de isopA1. Sin embargo, por <sup>1</sup>HRMN la selectividad de la señal analítica obtenida a 7,03 ppm, adjudicable a isopA1, figura 10, permite cuantificar el contaminante natural presente en los lotes de PA1 de la mejor manera posible. En la tabla 11 (página 38) se encuentran la proporción de isopA1, determinada por <sup>1</sup>HRMN, presente en algunos lotes de PA1.

Se puede ver que la proporción de isopA1 presente en los lotes de PA1 del Laboratorio de Producción está alrededor del 4 % con respecto al contenido de PA1, por lo que en los experimentos para estudiar la degradación de PA1 se realizaron teniendo una proporción del 6 % de isopA1, como se mencionó antes.

El efecto de isopA1 sobre el proceso de degradación de PA1 en estado sólido se estudió cuantificando la concentración residual de dos lotes de PA1 con diferente contenido de isopA1, por CLAR, a distintos tiempos. Se utilizó CLAR para la determinación de la concentración residual de PA1 ya que, a diferencia de isopA1, su señal analítica es relativamente grande, con lo que se obtiene la respuesta adecuada para su cuantificación.

Ya que que la resolución en la separación de dos compuestos depende de la concentración de éstos, y que ésta influye de manera importante en su cuantificación. antes de iniciar el estudio de descomposición de PA1 se desarrolló un método para la separación analítica de PA1 e isopA1 por CLAR, en donde el parámetro a mejorar fue la resolución entre ambas señales. Para ello se utilizaron soluciones de PA1 utilizando cantidades de isopA1 y PA1 en la misma proporción en que se encuentran en los lotes del Laboratorio de Producción.

El interés de desarrollar un método analítico, aún y que ya existe un método para la cuantificación de PA1 es que para la validación de este último se utilizaron cantidades equimoleculares de los compuestos de interés (21).

Se probaron distintas proporciones y programas de elución, se utilizó una columna C18-3  $\mu\text{m}$ . Las condiciones de elución obtenidas se encuentran en la tabla 12, en donde a una concentración de 60  $\text{ng}/\mu\text{L}$  se puede apreciar una buena resolución para la cuantificación de PA1. Con el desarrollo de este método se minimizó el traslapamiento de las señales y se realizó la cuantificación de PA1 de manera apropiada.

Se determinaron algunos parámetros de validación como la linealidad de la respuesta del método en los intervalos de concentraciones: 1 – 20  $\text{ng}/\mu\text{L}$  y 20 – 100  $\text{ng}/\mu\text{L}$ . El coeficiente de variación del factor de calibración en estos intervalos de 5, 10 y 3,57%, como se observa en las tablas 13 y 14 (pág 43) respectivamente, fue adecuado para los fines de nuestro trabajo (60).

Para la optimización de los recursos asignados a la presente investigación fue necesario realizar un estudio de estabilidad de estándares de PA1.

Con este estudio se pudo establecer que durante cinco semanas podíamos usar alícuotas de PA1, previamente puestas en solución, guardadas a  $-22^{\circ}\text{C}$ , ya que la concentración de PA1 durante este período se mantenía estable.



Con el fin de optimizar la cantidad de PA1 disponible para su uso como estándar, para la cuantificación de PA1 residual en los estudios de degradación tanto en sólido como en solución se realizó un estudio de estabilidad de estándares.

Para ello se preparó una solución stock de PA1 y se dividió en alícuotas que se colocaron a las mismas condiciones del estudio; estas sirvieron dentro de los límites de estabilidad como estándares para la cuantificación de PA1.

Esto significó un ahorro considerable de este compuesto ya que el número de veces que se cuantificó PA1 en los experimentos del estudio de degradación de PA1 fue considerable.

El análisis de la gráfica de Schewart, mostró, además del periodo de estabilidad de los estándares, que bajo las condiciones del estudio, la evaporación del solvente fue un factor crítico en la conservación de los estándares, ya que en esta gráfica se aprecia que la concentración de PA1 en lugar de disminuir se incrementó. De esta manera se tomaron las debidas precauciones en los posteriores experimentos en solución; en éstos se usaron viales con tapa de teflón para minimizar la evaporación del solventes.

Para el diseño experimental del estudio de la degradación de PA1 en estado sólido se realizó primero un estudio de degradación acelerada. Para ello se estudió la degradación de PA1 a 25°C, 30°C y 50°C; los resultados de estas cinéticas coincidieron con un comportamiento de primer orden; con la ecuación de velocidad se calculó la vida media de PA1, este parámetro fue para 25°C, 30°C y 50°C: 111,12; 78,85; 21,19 días respectivamente. Con estos últimos valores se construyó una gráfica de Arrhenius, colocando en el eje de las abscisas los valores del inverso de la temperatura absoluta y en el eje de las ordenadas el valor correspondiente al tiempo de vida media calculado, se ajustaron los puntos obtenidos y se obtuvo la ecuación de regresión que se encuentra en la figura 18, con ésta se extrapolaron los valores a la temperatura de interés, en nuestro caso -4 y -22°C, el cual dió 223,9 y 311,57 días respectivamente.

El resultado anterior permitió proyectar los intervalos para realizar el estudio de degradación de PA1 en estado sólido. La determinación de PA1 se realizó cada dos meses.

En la sección 3.4 se encuentran los datos de los resultados obtenidos en el estudio de la degradación de PA1 en estado sólido. Para el análisis de estos resultados, y como lo establece la bibliografía (34), se utilizó la pendiente de las rectas ajustadas en el programa Cricket Graph, las cuales corresponden a la constante de velocidad respectiva.

El análisis de varianza de las constantes de velocidad de la degradación de PA1, en estado sólido, tabla 53 (pág 137), muestra que no existe variación estadísticamente significativa en las constantes de velocidad de la degradación de los lotes de PA1 en los renglones de todos los factores estudiados.

En el renglón correspondiente a los lotes, se observa que no hay variación en las constantes de velocidad de la degradación de los lotes de PA1 con diferente contenido de isopA1. Ya que  $P > F$  es mayor que 0,001 se puede afirmar, con un 99% de confianza, que la diferencia en el contenido de isopA1 en los lotes estudiados no afecta la velocidad de degradación de PA1.

Esto significa el rechazo de la hipótesis establecida al inicio de este estudio con respecto a la degradación de PA1 en estado sólido, en la que se estableció que isopA1 influiría en la velocidad de degradación de PA1, y se acepta la hipótesis alternativa en la que se establece que isopA1 no influye en la degradación de PA1.

De acuerdo con lo anterior se puede anticipar que la repurificación de los lotes de PA1 no ayudará a prevenir la degradación de nuestro compuesto de interés.

Las constantes de velocidad obtenidas en el estudio de degradación de PA1 en estado sólido también se evaluaron utilizando la prueba t student bilateral para comparación de medias. Los intervalos de confianza al 95% para las constantes de velocidad mencionadas se encuentran en la tabla 54.

Al comparar los intervalos de confianza, se observa que los promedios de las constantes de velocidad de todos los experimentos efectuados pertenecen a la misma población. Por lo que es posible afirmar con un 95% de confianza que la diferencia de contenido de isopAI de los distintos lotes estudiados no afectó la velocidad de descomposición de PA1. Este resultado coincide con el obtenido en el análisis de varianza anterior.

TABLA 53

ANÁLISIS DE VARIANZA DE LAS CONSTANTES DE VELOCIDAD DE LA DEGRADACIÓN DE PA1 SÓLIDO

Fuente de variación	GL	SC	CM	F	P>F
Repeticiones	1	0,000090	0,000090	0,0156	0,904
Temperatura	1	0,002947	0,002947	0,5127	0,528
Lote	1	0,055256	0,055256	9,6140	0,152
Interacción	1	0,021812	0,021812	3,7951	0,146
Error	3	0,017242	0,005747		
Total	7	0,097348			

Con respecto al factor temperatura y a la interacción entre temperatura y lote se observó el mismo resultado: no existe influencia de la temperatura (en el intervalo de  $-22^{\circ}\text{C}$  a  $-4^{\circ}\text{C}$ ) sobre la velocidad de degradación de PA1 sólida. De acuerdo con este resultado se puede afirmar que la temperatura de guardado puede ser ya sea  $-22^{\circ}\text{C}$  o  $-4^{\circ}\text{C}$  y la velocidad de degradación de PA1 será la misma.

El fenómeno de degradación de PA1 en estado sólido es, como se mencionó con anterioridad, algo indeseable, desde el punto de vista que se desee enfocar el problema: política de buena manufactura, control de calidad, mecanismo de acción, etc. por lo que

sería conveniente profundizar aún más en estudios de degradación para relacionar éste de manera más detallada con factores que pueden estar influyendo como es la temperatura, por lo que se debe hacer un estudio más detallado del perfil de la degradación de PA1 con respecto a la temperatura, ya que este nos daría más elementos para ubicar el problema de la degradación.

TABLA 54

COMPARACIÓN DE DE LOS PROMEDIOS DE LAS CONSTANTES DE VELOCIDAD DE LA DEGRADACIÓN DE PA1 EN ESTADO SÓLIDO UTILIZANDO t STUDENT

Experimento	kpromedio	s	Intervalo de confianza
A	1,085	0,029	0,822-1,348
B	0,815	0,089	0,015-1,615
C	0,942	0,092	0,112-1,772
D	0,881	0,007	0,818-0,944

\*  $\mu = \bar{x} \pm t ((s/n)^{1/2})$ ;  $t = 12,71$  prueba de dos colas 95%

Se debe, además, estudiar la fotodegradación de PA1, esto es obtener el perfil de degradación con respecto a las diferentes longitudes de onda de radiación electromagnética a que pueden estar sometidos los lotes de PA1, ya que este es un factor íntimamente ligado a la descomposición de fármacos (41, 46, 65, 66).

Aunque el objetivo principal de este trabajo fue el estudio del efecto de isopA1 sobre el proceso de degradación de PA1 sólido, los resultados obtenidos permiten calcular el período de caducidad de PA1.

La U.S. F.D.A. ha definido este parámetro como el tiempo en que la concentración residual de un fármaco está por arriba del 90% (24, 30, 31, 32, 33, 34,) el período de caducidad es, de acuerdo con este mismo organismo, al límite inferior del intervalo de confianza del 95% del promedio de t90%, calculado con una prueba unilateral t student.

Para establecer este periodo (28, 30, 31, 43, 44, 67) se calculó la media de t90% con los valores de las constantes de velocidad obtenidas en todos los experimentos de degradación de PA1 sólida, tabla 24; se utilizó la ecuación  $t_{90\%} = 0,105/k$ ; los valores de t90% se encuentran en la tabla 55.

TABLA 55  
PERIODO DE CADUCIDAD DE PA1 SÓLIDA

t90% (días)									
A1	A2	B1	B2	C1	C2	D1	D2	X'	s
99	99	140	120	104	120	119	120	115	14

Grados de libertad = 7;  $t_{0,05} = 1,895$

Utilizando:  $X' \pm t (s/(s)1/2)$

dió un intervalo 106 - 124

El periodo de caducidad de PA1 será, según los resultados obtenidos de esta manera de 106 días.

No existe ningún antecedente de estudios efectuados para establecer el periodo de caducidad de PA1, por lo que el valor aquí obtenido es el primer intento que se realiza en ese sentido.

Este parámetro servirá como punto de referencia en los estudios posteriores que sobre este mismo fenómeno se realicen. Los esfuerzos que se hagan para aumentar el periodo de caducidad redundarán en mayor beneficio para los pacientes a quienes se les haya prescrito este fármaco, y para los estudios que con este compuesto se realizan.

Ya que no existe en la bibliografía disponible datos sobre estabilidad de antineoplásicos en estado sólido no tenemos forma de comparar el periodo de caducidad PA1 en estado sólido con el de otros antineoplásicos. Esta comparación si fue posible realizarla con los valores de estabilidad obtenidos en solución

En solución se estudió el efecto que una cantidad aproximadamente del 5% de

isopAI con respecto a la cantidad de PA1, tiene en el proceso de degradación descrito, en: metanol, buffer de fosfatos pH 7,4, suero y acetato de etilo. Se escogieron estos solventes ya que metanol y acetato de etilo se utilizan en el proceso de extracción; y con el estudio en buffer de fosfatos pH 7,4 y en suero, se trató de obtener condiciones aproximadas a los estudios biológicos que con PA1 se realizan.

Para el estudio de la cinética de degradación de PA1 en solución se determinó por CLAR la concentración residual de PA1 a distintos intervalos. La proyección de éstos se realizó considerando los resultados del Estudio de las Propiedades Físicoquímicas de Toxinas Aisladas de *Karwinskia humboldtiana* realizado por Martínez V., L. E., en el Departamento de Farmacología, en donde determinó la vida media de T514 (PA1) a en diferentes solventes y temperaturas; los resultados se encuentran en las tablas 5 y 10. En algunas cinéticas a partir de la determinación de los resultados iniciales se proyectaron los puntos cinéticos restantes. En todas las cinéticas se trató de estudiar la degradación hasta aproximadamente tres vidas medias de la concentración inicial de 50 ng de masa inyectada.

En cada uno de los solventes se determinó por triplicado la ecuación de degradación de PA1 a: - 4°C, 25°C y 37°C. Los resultados de estos estudios permiten obtener información útil de las condiciones que normalmente se utiliza en los estudios biológicos que con PA1 se realizan..

En la sección 3.5 se encuentran los datos de los resultados obtenidos en el estudio de la degradación de PA1 en solución. Para el análisis de estos resultados, y como lo establece la bibliografía respectiva (34), se utilizó la pendiente de las rectas ajustadas en el programa Cricket Graph, las cuales corresponden a la constante de velocidad respectiva.

En algunas condiciones experimentales el proceso de degradación presenta dos cinéticas, como se puede observar en la degradación en buffer de fosfatos a pH 7, 4 a -4°C y 37°C y en suero. Posiblemente esto sea debido a la existencia de dos

mecanismos de reacción. La evaluación de los resultados se realizó con la constante de velocidad de la primera de ellas, ya que para los fines de la evaluación todas las cinéticas pueden ser comparadas utilizando la constante de velocidad respectiva, lo cual no sería posible si se intentara hacerlo con el segundo comportamiento cinético; esto debido a que muchos de los resultados obtenidos no presentan este comportamiento lo cual impediría su comparación y evaluación.

Las constantes de velocidad obtenidas en los experimentos que se realizaron para estudiar el efecto de isopAl, ácido ascórbico y bisulfito de sodio en las tres temperaturas y en los cuatro solventes mencionados, que se encuentran en las tablas 49, 50, 51 y 52 (págs 128, 129, 130 y 131) se evaluaron mediante el análisis de varianza utilizando un diseño factorial  $3 \times 4 \times 6$  (3 temperaturas  $\times$  4 solventes  $\times$  6 condiciones experimentales), los datos obtenidos se encuentran en la tabla 56 (pág. 142).

En los renglones correspondientes a: temperatura, solventes, condición experimental, interacción entre la temperatura y el solvente, temperatura y condición experimental y temperatura y solventes, se observó que existe diferencia altamente significativa, esto quiere decir que existen diferencias en los resultados.

Para determinar entre cuales experimentos se encuentran estas diferencias se compararon los promedios de los resultados de cada uno de los factores por separado utilizando t student para comparación de medias.

Se compararon los intervalos de confianza calculados con la prueba t student bilateral con un 95% de confianza de los promedios entre los resultados de los experimentos: PA1 vs PA1 + isopAl; PA1 vs PA1 + ácido ascórbico; PA1 + PA1 + bisulfito de sodio.

Las gráficas de los intervalos de confianza de los promedios del estudio del efecto de isopAl a  $-4^{\circ}\text{C}$ ,  $25^{\circ}\text{C}$  y  $37^{\circ}\text{C}$  se encuentran en las figuras 89, 90 y 91.

TABLA 56

ANÁLISIS DE VARIANZA DE LOS RESULTADOS  
DEL ESTUDIO DE ESTABILIDAD DE PA1 EN SOLUCIÓN

FV	G. L.	SC	CM	F	P>F
Temperatura	2	0,005085	0,002542	3193,0784	0,000
Solventes	3	0,003496	0,001165	1463,5796	0,000
Cond. Experimental	5	0,000023	0,000005	5,8438	0,000
Temp x solvente	6	0,003030	0,000505	634,1313	0,000
Temp x con exp.	10	0,000049	0,000005	6,0971	0,000
Solv. X cond. exp.	15	0,000065	0,000004	5,4390	0,000
Temp.xsolv.x c. exp	30	0,000135	0,000004	5,6496	0,000
Error	142	0,000113	0,000001		
Total	215	0,011997			

(P>F)<0,05 (Diferencia significativa); \*\* (P>F)<0,01 (Diferencia altamente significativa)

°CEmilio Olivares Sáenz, Paquete de Diseños Experimentales Versión 2.5, FAUANL



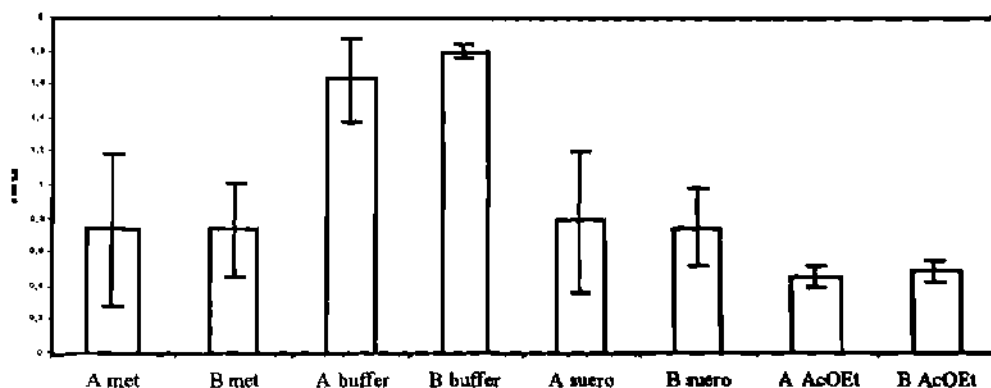


Figura 89 . Comparación de la Constante de Velocidad de Degradación de PA1 Entre Soluciones a las que No se les Agregó IsopA1 (A) y a las que Sí se les Agregó isopA1 (B), a  $-4^{\circ}\text{C}$ .

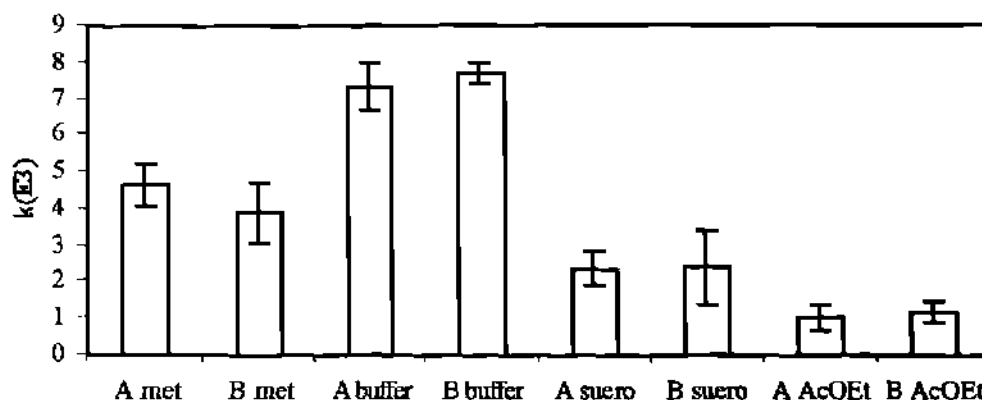


Figura 90 . Comparación de las Constante de Velocidad de Degradación de PA1 Entre Soluciones a las que No se les Agregó IsopA1 (A) y a las que Sí se les Agregó isopA1 (B), a  $25^{\circ}\text{C}$

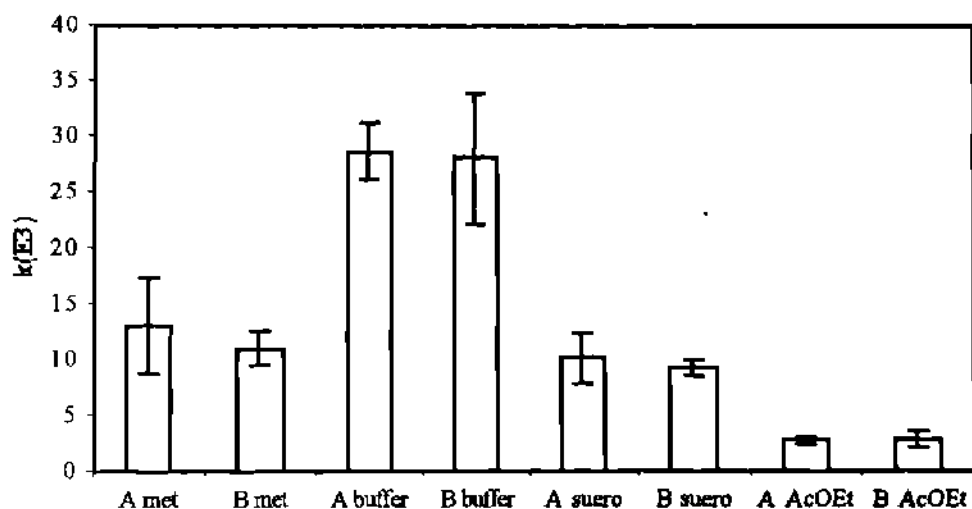


Figura 91. Comparación de las Constante de Velocidad de Degradación de PA1 Entre Soluciones a las que No se les Agregó IsopA1 (A) y a las que Sí se les agregó isopA1 (B), a 37°C

La comparación de los promedios de las constantes de velocidad de la degradación de PA1 de los experimentos A y B, en todos los solventes y en todas las temperaturas muestra que no existe diferencia significativa entre éstos, ya que los intervalos calculados con el 95% de confianza muestra que los promedios forman parte de la misma población.

En estas gráficas (figs 89, 90 y 91) se observa que la velocidad de degradación de PA1 es más rápida mientras más alta es la temperatura, por lo que el almacenamiento de PA1 en solución debe ser inferior a  $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Las gráficas de los intervalos de confianza de los promedios al estudiar el efecto de ácido ascórbico a  $-4^{\circ}\text{C}$ ,  $25^{\circ}\text{C}$  y  $37^{\circ}\text{C}$  se encuentran en las figuras 92, 93 y 94.

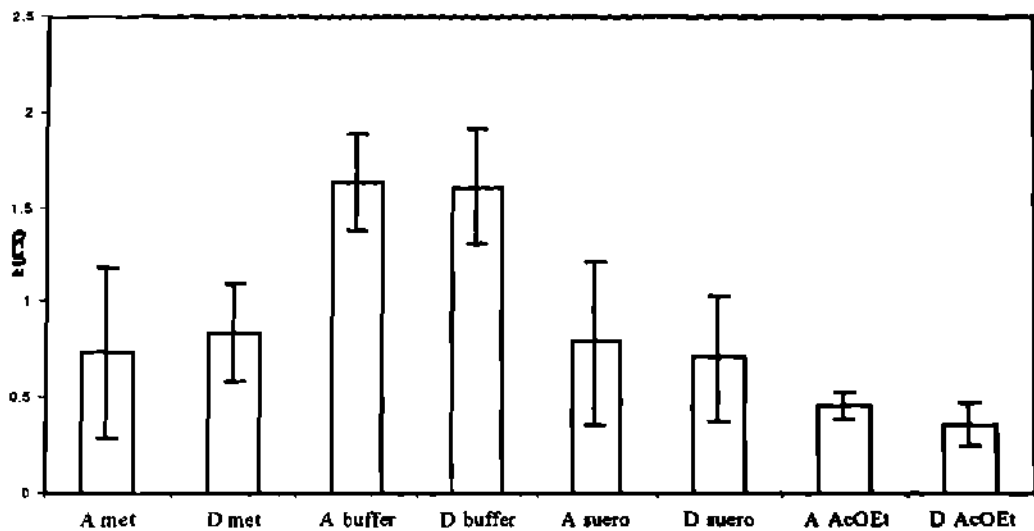


Figura 92 . Comparación de las Constante de Velocidad de Degradación de PAI Entre Soluciones a las que No se les Agregó Ácido Ascórbico (A) y a las que Sí se les Agregó Este Antioxidante (D), a  $-4^{\circ}\text{C}$

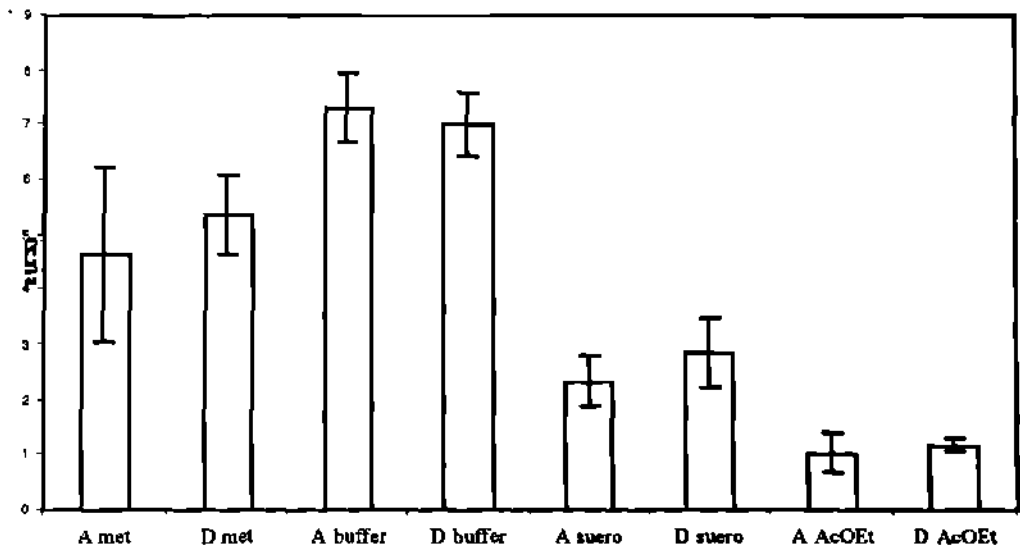


Figura 93 . Comparación de las Constante de Velocidad de Degradación de PAI Entre Soluciones a las que No se les Agregó Ácido Ascórbico (A) y a las que Sí se les Agregó Este Antioxidante (D), a  $25^{\circ}\text{C}$

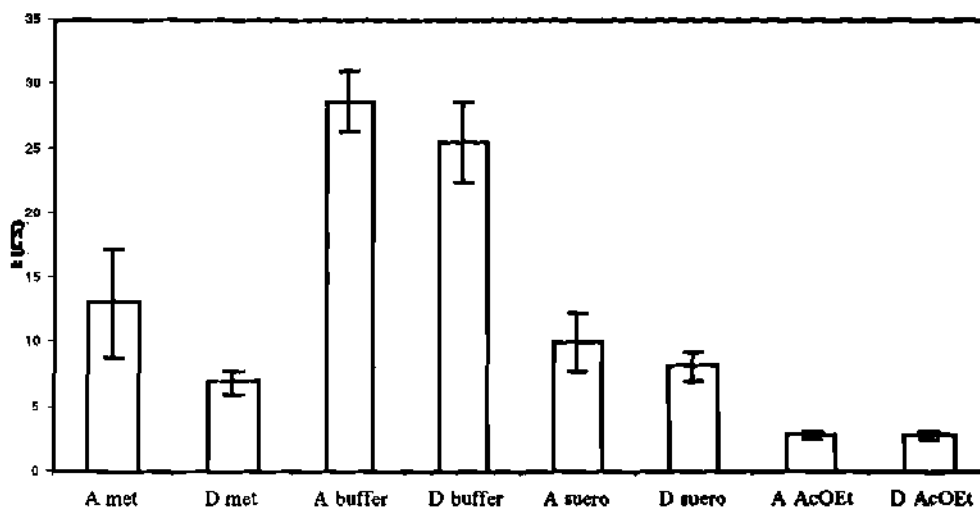


Figura 94 . Comparación de las Constante de Velocidad de Degradación de PA1 Entre Soluciones a las que No se les Agregó Ácido Ascórbico (A) y a las que Sí se les Agregó este Antioxidante (D), a 37°C

La comparación de los promedios de las constantes de velocidad de la degradación de PA1 de los experimentos A y D, en todos los solventes y en todas las temperaturas, muestra que no existe diferencia significativa entre éstos, ya que los intervalos calculados con el 95% de confianza muestra que los promedios forman parte de la misma población, excepto en los resultados de la degradación de PA1 en metanol a 37°C, en donde el intervalo de confianza de la población de A no se sobrepone con el intervalo de confianza de la población de D.

En estas gráficas también se observa que la velocidad de degradación de PA1 es más rápida mientras más alta es la temperatura.

Las gráficas de los intervalos de confianza de los promedios del estudio del efecto de bisulfito de sodio a  $-4^{\circ}\text{C}$ ,  $25^{\circ}\text{C}$  y  $37^{\circ}\text{C}$  se encuentran en las figuras 95, 96 y 97.

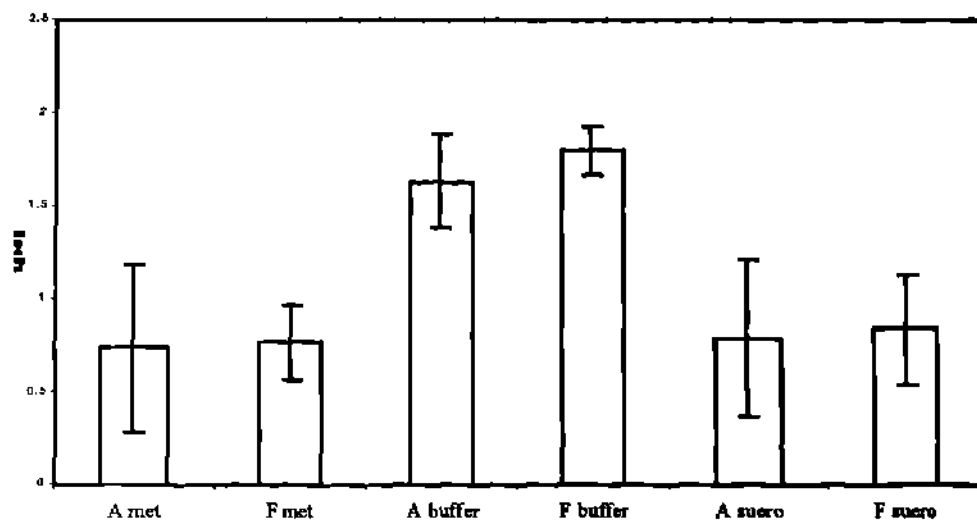


Figura 95 . Comparación de las Constante de Velocidad de Degradación de PA1 Entre Soluciones a las que No se les Agregó Bisulfito de Sodio (A) y a las que Sí se les Agregó Este Antioxidante (F), a  $-4^{\circ}\text{C}$

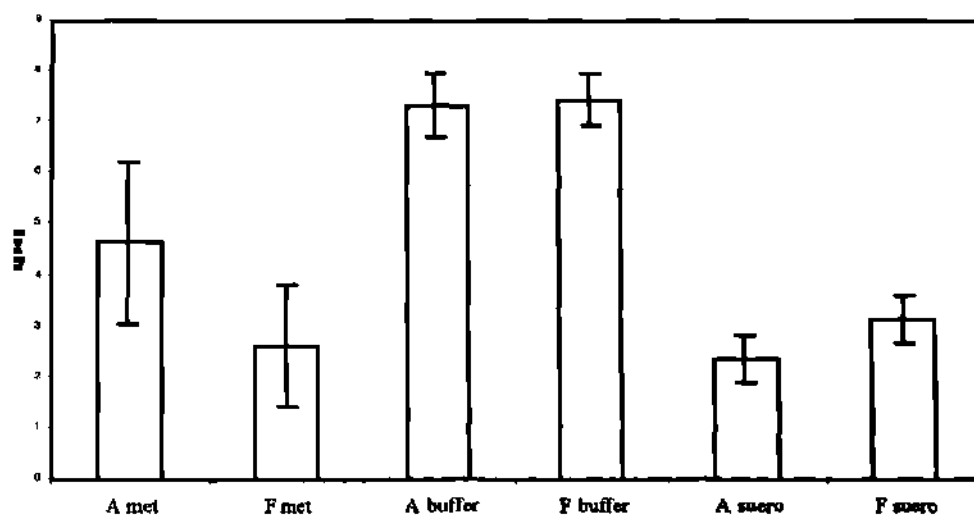


Figura 96 . Comparación de las Constante de Velocidad de Degradación de PA1 Entre Soluciones a las que No se les Agregó Bisulfito de Sodio (A) y a las que Sí se les Agregó Este Antioxidante (F), a  $25^{\circ}\text{C}$ .

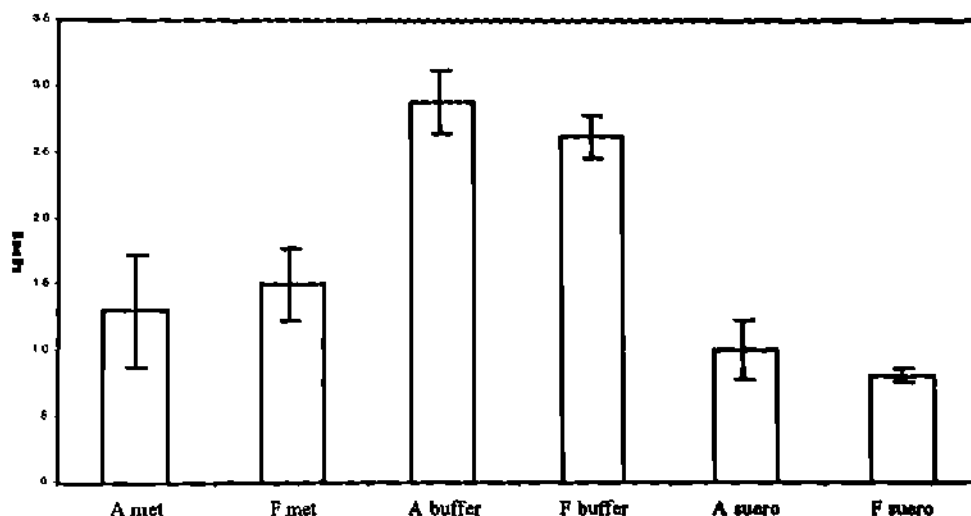


Figura 97 . Comparación de las Constante de Velocidad de Degradación de PA1 Entre Soluciones a las que No se les Agregó IsopA1 (A) y a las que Sí se les Agregó Este Antioxidante (F), a 37°C

La comparación de los promedios de las constantes de velocidad de la degradación de PA1 de los experimentos A y F, en todos los solventes y en todas las temperaturas, muestra que no existe diferencia significativa entre éstos, ya que los intervalos calculados con el 95% de confianza muestra que los promedios forman parte de la misma población.

En estas gráficas también se observa que la velocidad de degradación de PA1 aumenta mientras se incrementa la temperatura, por lo que igual que en los resultados anteriores se puede establecer que una medida para incrementar la vida útil de PA1 es almacenarla en una temperatura inferior a los  $-4^{\circ}\text{C}$ .

El efecto de bisulfito de sodio en acetato de etilo no se estudió ya que en este solvente este compuesto es insoluble.

El efecto de la temperatura en la degradación de PA1 en solución se observa en la figura 98, se puede apreciar que a medida que se incrementa la temperatura la velocidad de degradación de PA1 también lo hace.

De lo anterior se puede afirmar que la vida útil de PA1 en solución, será mayor en la medida en que se conserva a la temperatura más baja posible.

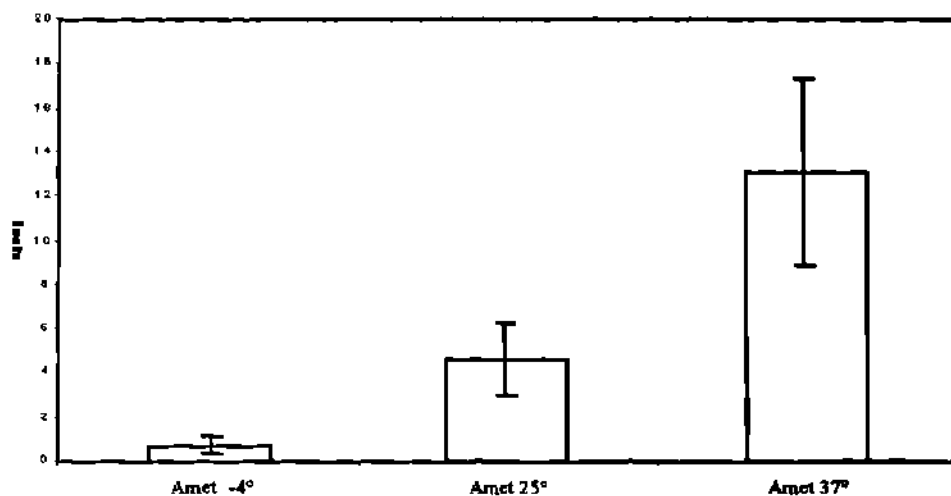


Figura 98 . Comparación de la constante de velocidad de la degradación de PA1 en metanol a  $-4^{\circ}\text{C}$ ,  $25^{\circ}\text{C}$  y  $37^{\circ}\text{C}$ .

En la figura 99 se graficaron los intervalos de confianza de los promedios de las constantes de velocidad de la degradación de PA1 en los solventes en estudio a  $25^{\circ}\text{C}$ .

La degradación de PA1 es más rápida en el buffer de fosfatos de pH 7,4; después en metanol, seguido de la degradación que ocurre en suero y por último se observa que la degradación en acetato de etilo es más lenta.

Los estudios biológicos que se lleven a cabo en buffer de fosfatos deben considerar que la degradación es importante, por lo que de ser posible sería mejor utilizar suero como solvente en éstos.

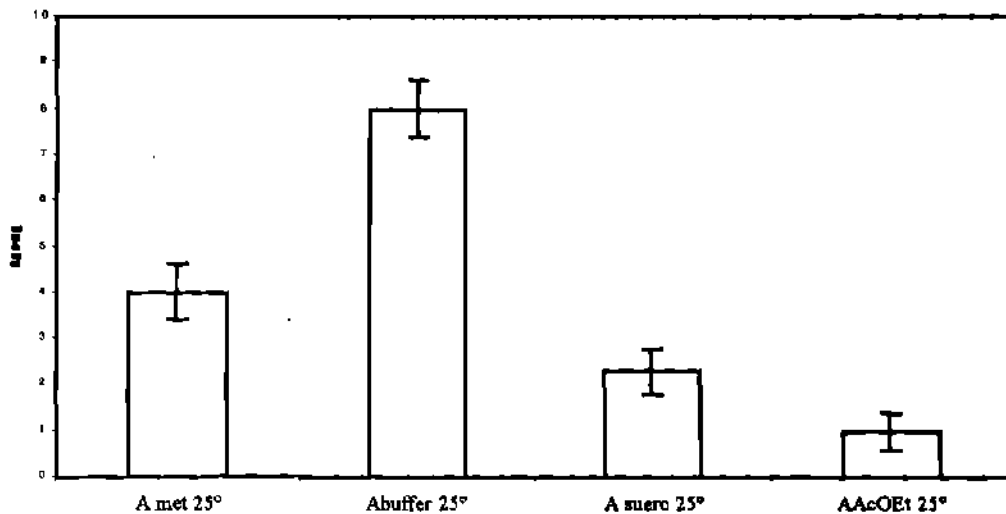


Figura 99 . Comparación de la constante de velocidad de la degradación de PA1 en Metanol, Buffer, Suero y Acetato de Etilo a 25°C.

Del resultado del estudio de degradación de PA1 en solución se desprende que isopA1 no tiene ningún efecto sobre la velocidad de degradación de PA1 por lo que la hipótesis establecida al inicio de este trabajo “isopA1 influye en la degradación de PA1” se rechaza, y se acepta la hipótesis alternativa: isopA1 no influye en la degradación de PA1.

De acuerdo con lo anterior se puede afirmar que la repurificación de los lotes de PA1 no contribuirá a detener la degradación de PA1 en solución.

Aunque el estudio realizado por Gómez A, E. (32) mostró que agregar ácido ascórbico, cuando se lleva a cabo la extracción de PA1 en distintos solventes aumenta la recuperación de este compuesto, los resultados de este trabajo muestran que la presencia de ácido ascórbico y bisulfito de sodio en metanol, buffer de fosfatos pH 7,4, suero y acetato de etilo, no tienen efecto significativo sobre la velocidad de degradación de PA1.

Con los datos de las constantes de velocidad que se encuentran en las tablas 50 y 51, que corresponden a la degradación de PA1 en buffer y suero a - 4°C, 25°C y 37°C,



respectivamente, se calculó el periodo de caducidad de PA1 (33, 35, 36, 48, 49, 70), ya que no existen antecedentes de este parámetro. Se utilizó el mismo método que para el cálculo del periodo de caducidad en estado sólido.

En la tabla 57 se encuentran los  $t_{90\%}$  de la degradación de PA1 en buffer a  $-4^{\circ}\text{C}$ ,  $25^{\circ}\text{C}$  y  $37^{\circ}\text{C}$  y en la tabla 58 se encuentran los valores de  $t_{90\%}$  de la degradación de PA1 en suero a las mismas temperaturas.

**TABLA 57**  
**VALORES DE  $t_{90\%}$  PARA LA DEGRADACIÓN DE PA1**  
**EN BUFFER DE FOSFATOS A pH 7,4.**  
**(HORAS)**

A	B	C	D	E	F
<b>- 4°C</b>					
62,5	57,8	60,61	69,5	53,9	60,2
62,0	58,4	63,87	67,0	63,2	56,9
62,4	58,8	66,18	60,0	64,3	58,2
<b>25°C</b>					
14,6	13,8	17,5	14,4	13,6	14,4
13,8	13,5	14,2	15,2	14,1	14,3
14,7	13,6	14,6	15,6	14,4	14,5
<b>37°C</b>					
3,7	3,8	3,8	4,3	4,1	4,1
3,5	3,4	4,1	4,1	3,0	4,0
3,7	4,0	3,9	3,9	4,6	3,9

$$t_{90\%} = 0,105/k1$$

Condiciones Experimentales: A = PA1; B = PA1 + isopA1; C = PA1 + isopA1 + Ácido Ascórbico; D = PA1 + Ácido Ascórbico; E = PA1 + isopA1 + Bisulfito de Sodio; F = PA1 + Bisulfito de sodio.

TABLA 58

VALORES DE  $t_{90\%}$  PARA LA DEGRADACIÓN DE PAI EN SUERO (HORAS)

A	B	C	D	E	F
<b>- 4°C</b>					
111,6	122,8	125,6	124,0	118,6	
125,9	157,2	145,0	180,6		183,0
173,2	142,6	130,5	146,6	122,3	
<b>25°C</b>					
47,5	44,9	50,5	35,4	38,0	32,2
41,0	36,8	38,2	37,6	39,9	35,7
46,6	51,7	36,3	37,4	41,7	32,0
<b>37°C</b>					
9,1	11,4	12,4	12,2	11,7	12,7
11,1	11,0	12,5	10,8	11,1	13,3
10,8	11,7	12,2	12,8	12,1	12,7

$t_{90\%} = 0,105/k1$

Condiciones Experimentales: A = PAI; B = PAI + isopAI; C = PAI + isopAI + Ácido Ascórbico; D = PAI + Ácido Ascórbico; E = PAI + isopAI + Bisulfito de Sodio; F = PAI + Bisulfito de sodio.

Con los valores de  $t_{90\%}$  se calcularon los intervalos de confianza con un 95% con una prueba de t student unilateral como lo recomienda la bibliografía (34). En la tabla 59 se encuentran estos para la degradación de PAI en el buffer y en la tabla 60 para suero.

TABLA 59

PERIODO DE CADUCIDAD DE PAI EN BUFFER DE FOSFATOS (HORAS)

$t^{\circ}C$	$t_{90\%}$ prom.	s	g. l.	t tablas	Intervalo	$t_{0,95}$
- 4	61,4	3,91	17	1,74	59,8-63,0	59,8
25	14,4	0,91	17	1,74	14,0-14,8	14,0
37	3,9	0,35	17	1,74	3,8- 4,0	3,8

S = desviación estándar; g. l. = grados de libertad;  $t_{0,95}$  = periodo de caducidad.

TABLA 60

PERIODO DE CADUCIDAD DE PA1 EN SUERO  
(HORAS)

t°C	t90% prom.	s	g. l.	t tablas	Intervalo	t0,95
- 4	140,6	23,28	14	1,76	130,0-151,2	130,0
25	40,2	5,85	17	1,74	37,8- 42,6	37,8
37	11,8	1,0	17	1,74	11,4-12,2	11,4

s = desviación estándar; g. l. = grados de libertad; t0.95 = periodo de caducidad.

La estabilidad de algunos antineoplásicos y compuestos relacionados se encuentran en la tabla 61.

TABLA 61

ESTABILIDAD DE COMPUESTOS ANTINEOPLÁSICOS COMERCIALES

Compuesto	t°C	Solvente	Ensayo	Estabilidad
Actinomicina D	- 60	a	B	13 S
Adriamicina	- 60	ss	B	10 S
BCNU	- 60	aa/a	B	14 S
Cisplatina	- 60	a	B	36 S
5-Fluoracilo	-60	a	B	37 S
Melphalam	- 60	aa/a	B	38 S
Mitomomicina C	- 60	a	B	61 S
Vinblastina	- 60	ss	B	14 S
Clor. Doxorubicina	4	a	CLAR	6 m
	20	a	CLAR	1 m
Adriamicina	TC	ss	F	20 h
	TC	a	F	1,6 h
	21	ss	CLAR	31 h
4'-Epiadrimicina	5	ss		48 h
	TC	ss		24 h
4'-Deoxiadriamicina	TC	ss		24 h
Daunorubicina	TC	ss	CLAR	40 h
Aclacinomicina	TC	ss	CLAR	52 h
Rubidazona	5	ss		5 h
	TC	ss		1,3 h

CONTINUACIÓN

Compuesto	t/°C	Solvente	Ensayo	Estabilidad
Mitoxantrona	-20	ss	B	2 S
	-70	ss	B	2 S
	5	ss	B	2 S
	TC	ss	B	48 h
Bisantreno	TC	ss	B	24 h
Bleomicina	-20	ss	B	3 S
	-70	ss	B	2 S
	5	ss	B	4 S
	TC	ss	B	14 d
Mithramicina	5	ss	CLAR	48 h
	TC	ss	B	24 h
2'-Deoxicoformicina	5	ss	B	4 d
	TC	ss	B	3 d

a = agua; ss = solución salina; aa/a = alcohol absoluto/agua; B ensayo biológico  
 CLAR = Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución, TC = Temperatura de Laboratorio; S = Semana, d = día; h = hora.

Los valores de t90% de PA1 en solución buffer y en suero a -4°C, 25°C y 37°C se encuentran en la tabla 62.

TABLA 62

RESUMEN DE LA ESTABILIDAD DE PA1 EN SOLUCIÓN BUFFER Y EN SUERO A -4°C, 25°C Y 37°C

t/°C	Solvente	Ensayo	t 0,95
-4	Buffer	CLAR	59,8
25	Buffer	CLAR	14,0
37	Buffer	CLAR	3,8
-4	suero	CLAR	130,0
25	suero	CLAR	37,8
37	suero	CLAR	11,4

Con estos resultados se puede ver que PA1 es más estable que algunos antineoplásicos que actualmente se encuentran en el comercio, especialmente cuando se utiliza suero como solvente.

A la fecha que los resultados de la presente investigación se estaban procesando,, en el Laboratorio de Extracción y Síntesis se logró obtener, con un procedimiento distinto al que se utilizó en este trabajo, un lote de PA1 con una proporción del 0,8% de contaminante. Con este lote estudiamos, a 25°C y en los mismos solventes, la velocidad de degradación de PA1.

Al comparar la constante de velocidad de la degradación de este último lote con los resultados obtenidos anteriormente, no encontramos diferencia estadísticamente significativas a un nivel del 95%. La comparación de las constantes de velocidad de la degradación obtenidas en este estudio se encuentra en la figura 100, por lo que estos últimos resultados le dan mayor validez a lo establecido anteriormente en donde isopAl no tiene efecto sobre el fenómeno estudiado.

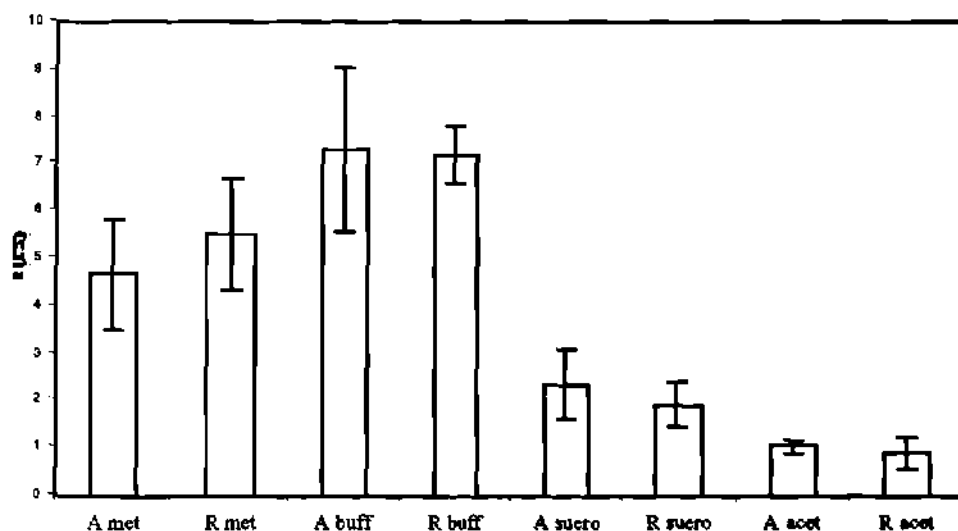


Figura 100 . Constante de Velocidad de PA1 del Estudio de la Degradación ya Descrito (A); Constante de Velocidad de PA1 Repurificada (R).

## CONCLUSIONES

1. El estudio de estabilidad de estándares de PA1 indicó un período óptimo para el uso de éstos, de 5 semanas.
2. La vida media proyectada por medio de degradación acelerada fue, a  $-4^{\circ}\text{C}$  y  $-22^{\circ}\text{C}$ , de 7 y 10 meses respectivamente.
3. El estudio de degradación de PA1 a condiciones normales de guardado en estado sólido mostró que no existe diferencia significativa en los resultados de los dos factores de variación estudiados: temperaturas ( $-22$  y  $-4^{\circ}\text{C}$ ) y contenido de isopA1.
4. En la cinética de degradación de PA1 en estado sólido se observó que la diferencia en la cantidad de isopA1 presente en los lotes estudiados no influye en el proceso de degradación estudiado.
5. El cálculo de la vida media promedio fue para el estudio de degradación a condiciones normales de guardado, de 26 y 27 meses para  $-4^{\circ}\text{C}$  y  $-22^{\circ}\text{C}$  respectivamente. Estas cifras se encuentran por arriba de las calculadas con el procedimiento de degradación acelerada, por lo que la planeación de estudios bajo condiciones aceleradas debe hacerse con mayor cuidado.
6. Se observó que no hay efecto de isopA1, ácido ascórbico y bisulfito de sodio cuando se estudió la degradación de PA1 en: metanol, buffer de fosfatos pH 7,4, suero y acetato de etilo.
7. Dados los resultados obtenidos del estudio de degradación de PA1 tanto en sólido como en solución rechazamos la hipótesis de trabajo “la presencia de isopA1 influye en el proceso de degradación de PA1” y se acepta la hipótesis alternativa “la presencia de isopA1 no influye en el proceso de degradación de PA1”.

## REFERENCIAS

1. Dreyer, D. L., Arai I., Bachman, C. D., Anderson, W. R., Smith, R. G. and Daves, G. D. "Toxins causing noninflammatory paralytic neuropathy. Isolation and structure elucidation". J. Am. Chem. Soc. 97(1975)4895-4990.
2. Piñeyro, A. Europaischen Patentblatt 95/48 (29.11.95) Patentnummer: 0467407, (1995).
3. Piñeyro, A. Bioscience patent "Pharmaceutically acceptable anthracene compounds" number 5578646.
4. Patente Japonesa No. 26551758.
5. 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(1994)217-227.
6. Sepulveda, J., Van der Klei, I. Keizer, I., Piñeyro, A., Harder W. and Veenhuis, M. "Studies on the effect of toxin T- 514 on the Integrity of Peroxisomes in Methylophilic Yeast". FEMS Microbiology Letter. 91(1992)207-212.
7. Moreno S., M.; Vargas Z., R.; Ballesteros E., R.; Piñeyro L., A.; Sepulveda S., J. "Studies on the Effect of Peroxisomicine on Catalase Activity in Albino Mice". Toxicon, 35(5)1997.
8. Salazar, R., Sepulveda S., J., Waksman de T., N., Piñeyro L., A., Moreno S., M. "Effect of peroxisomicine A2 and T544 of the genus *Karwinskia* on peroxisomes of *Candida boidinii*". FEMS, Microbiology Letters. 158(1998)255-260.
9. Moreno S., M., Vargas Z., R., Ballesteros E., R., Piñeyro L., A., Sepulveda S., J. "Studies on the effect of peroxisomicine on catalase activity in albino mice". Toxicon. 35(5)(1997)777-783.
10. Waksman, N., Martínez, L. y Fernandez, R. "Chemical and toxicological screening in genus *Karwinskia* (México)". Rev. Latinoam. Quim. 20(1)(1989)27-29.
11. Rivas, V.; Torres, R.; Waksman, N. "Dimeric anthracenones from *Karwinskia sp*". Planta Médica. 56(1990)562-563.
12. Dominguez, X. A., Temblador, S., Cedillo-L., M. E. "Estudio químico de la raíz de la Tullidora (*K. humboldtiana*)". Rev. Latinoam. Quim. 7(1976) 46-48.

13. Mitscher, L.A.; Gollapudi, S.R.; Oburn, D.S.; Drake, S. "Antimicrobial agents from higher plants: Two dimethyl benzisocromans from *K. humboldtiana*". *Phytochemistry*. 24(1985)1681-1683.
14. Yussim, L. F., Lara, O. R., Benavidez, A., Hernández, B., Fernández, R., Tamariz, J., Zepeda, G. "Anthracenones and antraquinones from roots of five species of the genus *Karwinskia sp*". *Phytochemistry*. 40(1995)1429-1431.
15. Rivas, V., Waksman, N. "Cytotoxic hydroxyanthracenones from fruits of *Karwinskia Parvifolia*". *Natural Products Letters*, in press.
16. Waksman, N., Benavides, G., and Rivas, V. "Biologically active anthracenones from roots of *Karwinskia parvifolia*". *Phytochemistry*, 50(1999)1041-1046.
17. Piñeyro L., A., Waksman, N. "The Anthracenones of the *Karwinskia* genus. Chemistry, structure and Biological Activity". *Studies in Natural Products Chemistry, Bioactive Natural Products (C)*. First edition, Elsevier, 22(2000)555-606.
18. Benavidez C., G. A. "Estudio Químico Biodirigido de la Raíz de *Karwinskia parvifolia*". Tesis de Maestría, Facultad de Medicina, U.A.N.L 1996.
19. Guerrero, M., Piñeyro, A. and Waksman, N. "Extraction and Quantification of Toxins from *Karwinskia humboldtiana* (Buckthorn)". *Toxicon*. 25(5)(1987)565-568.
20. Salazar, M. de la L., Piñeyro, A., Waksman, N. "A Reverse Phase HPLC Method for Quantification of Peroxisomicine and other Anthracenonic Compounds". *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*. 19 (9)(1996)1391-1403.
21. Osorio P., A., "Optimización y Validación de un Método Analítico para la Determinación de Peroxisomicinas A1, A2, A3, Isoperoxisomicinas A1 y A2 por CLAR Fase Reversa". Tesis. Departamento de Farmacología y Toxicología, Facultad de Medicina, U. A. N. L. 1998.
22. Martínez V., L. "Estudio de las Propiedades Fisicoquímicas de Toxinas Aisladas de *Karwinskia humboldtiana*". Tesis. Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, U.A.N.L. 1990.
23. Ansel, Howard C., *Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms, Dosage Form Design*. Third edition, Philadelphia, Lea and Febiger. 1981(78-105).
24. Braverman, J. *Bioquímica de los Alimentos, Antioxidantes*. 2a. ed., México, Ed. El Manual Moderno. (1988)259-263.
25. Bosanquet, A. G. "Stability of solutions of antineoplastic agents during preparation and storage for in vitro assays. II. Assay methods, adriamycin and the other antitumor antibiotics". *Cancer Chemother. Pharmacol.* 17(1986)1-10.



26. Bouma, J., Beinen, J. H., Bult, A. and Underberg, W. J. M. "Anthracycline antitumor agents, A review of Physicochemical, analytical and stability properties". *Pharmaceutisch Weekblad Scientific*. 8(1986)109-133.
27. U. S. F.D.A., Department of Health and Human Services, International Conference on Harmonisation; Draft Guidance on Specification: Test Procedures and Acceptance Criteria for New Drug Substances. Docket No. 97D – 0448, 1997.
28. Amin, M. I. And Bryan, J. T. "Kinetics and Factors Affecting Stability of Methylprednisolone in Aqueous Formulation". *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 62(11)(1973)1768-1771.
29. Smith, G. G., Kennedy, D. R. and Nairn, G. "Hydrolysis Kinetics of Benzocaine and Homologs in the Presence of a Noionic Surfactant". *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 63(5)(1974)712-721.
30. Blaug, S. M. and Hajratwala, B. "Kinetics of Aerobic Oxidation of Ascorbic Acid". *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 61(4)(1972)556-562.
31. Coonors, K. A., Amidon, G. Ll. And Stella, B. J., "Chemical Stability of Pharmaceuticals. Strategy and Tactics of Stability Testing". Ed. J. Willey, N. Y. (1986) 135– 159.
32. Gómez A., E. "Optimización de la Extracción de T514 de la semilla del fruto de *K. parvifolia*". Tesis de maestría en proceso. Departamento de Farmacología y Toxicología, Facultad de Medicina ,U. A. N. L. 1997.
33. *Stability Testing of Drugs Substances and Drug Products, Guidance for Industry, Food and Drug Administration*. 1998.
34. Shein-Chung Chow, Jen-Pei Liu. "Statistical Design and Analysis in Pharmaceutical Science, Validation, Process Controls, and Stability". Marcel Dekker, Inc. (1995)19.
35. U. S. F. D. A. Department of Health and Human Services, International Conference on Harmonisation; Draft Guidance on Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for New Drug Substances and New Drug Product Chemical Substances. Docket No. 97D – 0448, 1997.
36. U. S. F. D. A., Department of Health and Human Services, International Conference on Harmonisation; Draft Revised Guidance on Impurities in New Drug Substances. *Federal Register* 65(140), Docket No. 94D–0325.
37. U. S. F. D. A. Department of Health and Human Services, International Conference on Harmonisation; Draft Revised Guidance on Q1AR, Stability Testing of New Drug Substances and Products. Docket No. 93D – 0139.

38. **Stability Testing for New Veterinary Dosage Forms, International Cooperation on Harmonisation of Technical Requirements of Veterinary Medicinal Products. 1999.**
39. **Stability Testing of New Veterinary, Drug Substances and Medicinal Products, International Cooperation on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products. 1999.**
40. **ICH Harmonized Tripartite Guideline for Stability Testing of New Drug Substances and Products. September 23, 1994 (ICH Q1A).**
41. **Norma Oficial Mexicana NOM-073-SSA1-1993, Estabilidad de Medicamentos.**
42. **Hoffman, Dennis M.; Grossano, Dennis D.; Damin, LeeAnne and Woodcock Thomas. "Stability of Refrigerated and Frozen Solutions of Doxorubicin Hydrochloride". American Journal of Hospital Pharmacy. 36(1979)1536-1538.**
43. **Rossini, M. L. and Farina, M., "Stability studies with a high performance liquid chromatographic method for the determination of a new anthracycline". Journal of Chromatography. 593(1992)47-53.**
44. **Wood, M. J.; Irwin, W. J. and Scott, D. K. "Photodegradation of Doxorubicin, Daunorubicin and Epirubicin Measured by High-Performance Liquid Chromatography". Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics. 15(1990)291-300.**
45. **Sbarbati de N., N. E. "Estabilidad de medicamentos" Ed. El Ateneo, Argentina. (1975) 77-92.**
46. **Carstensen, J. T. "Pharmaceutics of Solids and Solid Dosage Forms. Stability and Dating of Solids Dosage Forms". Ed. Wiley-Interscience. (1977)182-206.**
47. **Tinoco, I. Fisicoquímica, Principios y Aplicaciones en las Ciencias Biológicas. Ed. Prentice Hall. (1980)255-329.**
48. **Mariño, E. L. and Domínguez-Gil A. "Study of accelerated inactivation of cefadroxil". International Journal of Pharmaceutics. 12(1982)209-217.**
49. **Blaug, S. M. and Hajratwala B. "Kinetics of aerobic oxidation of ascorbic acid" Journal of Pharmaceutical sciences. 61(4)(1972)556-562.**
50. **Mathews, A. Nunes and Brochmann-Hansen, E. "Hydrolysis and Epimerization Kinetics of Pilocarpine in Aqueous Solution". Journal of Pharmaceuticals Sciences. 63(5)(1974)716-721.**
51. **Boccardi, G. "Autoxidation of Drugs: Prediction of Degradation Impurities From Results of Reaction With Radical Chain Initiators". Il Farmaco. 49(6)(1994)431-435.**

52. Yoshioka, Y. A. and Yasushi T. "Statistical Evaluation of Accelerated Stability Data Obtained at a Single Temperature. I. Effect of Experimental Errors in Evaluation of Stability Data Obtained". *Chem. Pharm. Bull.* 38(6)(1990)1757-1759.
53. Franks, F. "Accelerated stability testing of bioproducts: attractions and pitfalls". *Tibtech.* 12(1994)114-117.
54. Golden, M. H., Cooper, David C., Riebe, M. T. and Carswell, K. E. "A Matrixed Approach to Long-Term Stability Testing of Pharmaceutical Products". *Journal of Pharmaceutical Sciences.* 85(2)(1996)240-245.
55. Fairweather, W. R.; Daphne Lin, T. Y. and Kelly, R. "Regulatory, Design, and Analysis Aspects of Complex Stability Studies". *Journal of Pharmaceutical Sciences.* 84(11)(1995)1322-1326.
56. Darioush, D. and Burnett, P. E. "Issues in evaluation of bioanalytical method selectivity and drug stability". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 14(1995)23-31.
57. Caviglioli, G.; Drava, G.; Cafaggi, S.; Parodi, B. and Bignardi G. "Median-Based Robust Regression Methods in Prediction of Drug Stability". *Journal of Pharmaceutical Sciences.* 85(10)(1996)1096-1104.
58. Franco, R.; Kraft, T.; Miller, T.; Popp, M. and Martelo, O. "Storage of Chemotherapy Drugs for use in the Human Tumor Stem Cell Assay". *International Journal of Cell Cloning.* 2(1984)2-8.
59. Miller, J. C., Miller, J. N. *Estadística para Química Analítica, Diagramas de Control.* Ed. Addison-Wesley, (1993)78-84.
60. Huber, L., *Validation of Analytical Methods: Review and Strategy.* LC-GC. 12-5967-5622E, 1998.
61. Olivares, S. E. *Diseños Experimentales con Aplicación a la Experimentación Agrícola y Pecuaria.* FAUANL, 1995.
62. Hínchen, J. D. *Estadística Práctica para la Investigación Química.* Ed. El Manual Moderno. (1976)52-87.
63. Cochran, W. G., Cox, G. M. *Diseños Experimentales.* Ed. Trillas, (1976)207-245.
64. Fábila C., G. *Diseño y Análisis de Experimentos Industriales. I. La Esencia del Diseño Estadístico de Experimentos. II. Diseños Avanzados. III. Análisis de Varianza Total.* (1998): 31-37, 69-77, 153-160.

65. Miller, J. M. *Basic Statistical Methods for Analytical Chemistry*. 2. Calibration and Regression Methods, *Analyst*, 116(1991)1-14.
66. Miller, J. C. and Miller, J. N., *Basic Statistical Methods for Analytical Chemistry*. 1. Statistics of Repeated Measurements, *Analyst*, 113(1988)1351-1356.
67. Fernández R., A., Rivas G., V., Salazar C., M. L., Caballero Q., A. y Waksman de T., N. "Uso de <sup>1</sup>HRMN para el Control de Calidad de Fármacos" IV Simposio de Ciencia y Tecnología, 1999.
68. Carstensen, J. T. "Stability of Solids and Solid Dosage Forms". *Journal Pharmaceutical Sciences*. 63(1)(1974)1-14.
69. Williams, B. A. and Tritton, T. "Photoinactivation of Anthracyclines". *Photochemistry and photobiology*. 43(1981)131-134.
70. Bonate, P. L. "Chromatographic Calibration Revisted". *Journal Chromatographic Science*. 28(1990)559-562).

# RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

**Amador Osorio Pérez**

**Candidato para el Grado de  
Doctor en Ciencias con especialidad en Química Biomédica**

**Título de la Tesis: OBTENCIÓN DE LA ECUACIÓN DE VELOCIDAD DE LA  
DESCOMPOSICIÓN DE PEROXISOMICINA A1 EN  
PRESENCIA DE ISOPEROXISOMICINA A1**

**Área de Estudio: Química Analítica**

**Biografía:**

**Datos Personales:**

Lugar de Nacimiento: Ejido 20 de Noviembre en Los Mochis, Sinaloa;  
Fecha de Nacimiento: 13 de septiembre de 1960; Padres: Segundo Osorio y  
Agustina Pérez, Campesinos ambos; Casado con Adriana Ayala Carrejo; Hijos:  
Adriana Delfina Osorio Ayala y H. Bohr Osorio Ayala.

**Escolaridad:**

**Licenciatura:** Carrera: Ingeniero Bioquímico: Escuela de Ciencias Químico-  
Biológicas Universidad Autónoma de Sinaloa; Culiacán, Sinaloa. **Especialidad:**  
Especialidad en Bioquímica; Escuela de Ciencias Químico-Biológicas;  
Universidad Autónoma de Sinaloa; Culiacán, Sinaloa. **Maestría:** Maestría en  
Ciencias con Especialidad en Química Analítica Biomédica; Facultad de Medicina  
de la Universidad Autónoma de Nuevo León; Monterrey, Nuevo León.  
**Doctorado:** Candidato a Doctor en Ciencias con Especialidad en Química  
Biomédica; Facultad de Medicina de la U.A.N.L.; Monterrey, Nuevo León.

**Experiencia Profesional:**

Profesor de Matemáticas en la Escuela de Biología de la U.A.S. en el ciclo escolar  
1989.; Responsable de las prácticas de laboratorio de: Físicoquímica, Análisis  
Químico Orgánico, Análisis Químico Inorgánico, Bioquímica y Edafología,  
de 1986 hasta 1995; Auxiliar del Laboratorio de Micología, Laboratorio de  
Microbiología y Laboratorio de Biología Celular, de 1986 hasta 1995, en la  
Escuela de Biología de la U.A.S.; Profesor de matemáticas Financieras,  
Matemáticas para la Toma de Decisiones e Introducción a las Matemáticas en la  
Escuela de Contabilidad y Administración de la U.A.S., de 1986 hasta 1988;  
Profesor de Matemáticas en el CONALEP 1 de Culiacán Sinaloa de 1986 hasta  
1988; Profesor de Química I, II y III, Física I y III en la Escuela Secundaria Profr.  
Rafael Osuna en Culiacán Sinaloa de 1984 hasta 1986. **Elaboración de Material  
de Apoyo a la Docencia:** Elaboré el manual de prácticas "Instructivo de Prácticas  
del Laboratorio de Análisis Químico Inorgánico", editado por la Escuela de  
Biología de la UAS en 1995, que sirve como texto para las prácticas de esta

materia, en esta escuela; elaboré, junto con otros autores, el "Manual de Prácticas de Laboratorio de Bioquímica" editado por la Escuela de Biología de la UAS en 1995, que se utiliza como texto en el Laboratorio de Bioquímica de esta escuela; elaboré, en 1993, junto con otros autores, el "Manual de Prácticas de Edafología" el cual se utiliza como apoyo para el curso práctico de Edafología en el tercer semestre del tronco común en la Escuela de Biología; participé en la elaboración del Manual de Prácticas del curso de Técnicas Analíticas de Separación, que se imparte en la Maestría en Ciencias con especialidad en Química Analítica Biomédica, en el Departamento de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L. **Congresos y Eventos Académicos:** Ponente del trabajo de investigación: "Optimización y Validación de un Método Analítico por CLAR Fase Reversa para el Análisis de Peroxisomicina A2, A3 e Isoperoxisomicina A1" en el XV Congreso Nacional de Investigación Biomédica, de la Universidad Autónoma de Nuevo León, en 1997, en el IV Congreso Regional de Estudiantes de Química, organizado por la Universidad Autónoma de Nuevo León, la Sociedad de Química de México, la SEP y CONACYT. en 1998. Ponente del trabajo de investigación: "Aplicación de un Diseño Experimental para el Ensayo de Robustez por CLAR" en el XVI Congreso Nacional de Investigación Biomédica, de la Universidad Autónoma de Nuevo León, en 1988. Ponente del trabajo de investigación: "Evaluación y Selección de Tres Técnicas Analíticas para la Determinación de Paratión en Sangre" en el XVI Congreso Nacional de Investigación Biomédica, de la Universidad Autónoma de Nuevo León, en 1988. Ponente del trabajo de investigación: "Aplicación de un Diseño Experimental para el Ensayo de Robustez por CLAR" en el XXXIII Congreso Mexicano de Química, en 1988. Ponente del trabajo de investigación: "Optimización de la Separación de Peroxisomicinas por CLAR" en el XXXIII Congreso Mexicano de Química, en 1988. Ponente de la investigación "Investigación por Espectrofotometría UV-Vis de la Constante de Ionización de Peroxisomicina A1, A2, A3, Isoperoxisomicina A1 y A2" en el XXXIV Congreso Mexicano de Química celebrado en Monterrey Nuevo León en octubre de 1999. Ponente de la investigación "Obtención de la Ecuación de Velocidad de la Descomposición de Peroxisomicina A1 en Presencia de Isoperoxisomicina A1" en el V Congreso Regional de Estudiantes de Química efectuado en la División de Estudios Superiores de la Facultad de Ciencias Químicas de la U.A.N.L. los días 11 y 12 de mayo de 2000. Ponente de la investigación "Estudio del Impacto de Isoperoxisomicina A1 en el Proceso de Degradación de Peroxisomicina A1" en el V Simposio de Ciencia y Tecnología, del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, efectuado en la Biblioteca Lic. Raúl Rangel Frías de la U.A.N.L. los días 17 y 18 de mayo del 2000. Ponente de la investigación "Estudio de Estabilidad Acelerada de un Potencial Fármaco Antineoplásico" en el XVIII Congreso Nacional de Investigación Biomédica en la Facultad de Medicina de la U.A.N.L en octubre del 2000. Ponente de la investigación "Estudio por Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno de Derivados de la Indoloquinolizina" en el XVIII Congreso Nacional de Investigación Biomédica en la Facultad de Medicina de la U.A.N.L en octubre del 2000. **Actualización Disciplinaria:** Diplomado en Enseñanza Superior (1994-

1994), Programa de Formación y Actualización Docente, Universidad Autónoma de Sinaloa. Culiacán, Sinaloa. Duración 160 horas. 1994. Curso *Diseños Experimentales en la Investigación Agropecuaria*. Impartido por la Universidad de Nuevo México U.S.A. y la Universidad Autónoma de Sinaloa. Del 25 al 30 de junio de 1994. Curso Básico de *FTIR y Manejo de Muestras con Accesorio de Reflectancia Total Atenuada*. Impartido por Perkin Elmer y la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León. 19 y 20 de marzo de 1977. Curso Práctico "Química Orgánica Funcional" Impartido por la Coordinación de la Maestría en Química Analítica Biomédica del Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León; de septiembre de 1966 a enero de 1997. Con duración de 96 horas. Curso *Espectrografía UV vs Métodos Modernos de Análisis*. Impartido por la Facultad de Medicina y el Departamento de Farmacología y Toxicología de la U.A.N.L, y la Academia de Investigación Científica. 16 de abril de 1997. Curso *Desarrollo de Separaciones Cromatográficas; Selección de Condiciones de Análisis*. Impartido por la Sociedad de Química de México sección Nuevo León y el Departamento de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L.; del 27 al 28 de mayo de 1996. Curso de *Administración Ambiental*. Impartido por el Instituto para la Protección Ambiental de Nuevo León, A.C. y la CAINTRA de Nuevo León. El 9 de mayo de 1996.. **Asociación y Sociedades en el Área de Especialidad:** Miembro activo (asociado) de la Sociedad Química de México sección Nuevo León, durante 1997-2001. **Permanencia:** Antigüedad de 14.5 años en la Universidad Autónoma de Sinaloa. Actualmente tengo el nombramiento de Profesor Investigador de Tiempo Completo en la Escuela de Biología de esta Universidad en la cual soy Profesor de: Análisis Químico Orgánico y Análisis Químico Inorgánico desde 1988 a la fecha.





