

# CAPÍTULO 1

## INTRODUCCION

### 1.1 Antecedentes

En el año de 1981, se inició en el departamento de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, una investigación sistemática encaminada al estudio de los componentes presentes en las plantas del género *Karwinskia*, inicialmente en la *K. humboldtiana* y posteriormente en otras especies<sup>1</sup>.

El género *Karwinskia*, taxonómicamente se encuentra clasificado dentro del orden de las Rhamnaceas e incluye 15 especies de las cuales por lo menos 11 se encuentra en México<sup>1</sup>.

El objetivo inicial de dicho proyecto fue el de identificar los efectos tóxicos producidos por los compuestos presentes en la planta, que en general han sido descritos como antracenas dimericas. La descripción de la toxicidad de estos compuestos se remonta al siglo XVIII en el que el sacerdote jesuita Francisco Javier Clavijero describe los efectos producidos al ingerir el fruto de estos compuestos<sup>2</sup>. Actualmente se sabe que la planta contiene compuestos

que producen, además de los efectos neurotóxicos, necrosis de hígado y hemorragia pulmonar entre otros<sup>1,3,4</sup>.

En 1990, Piñeyro López<sup>5,6</sup> encontró que uno de estos compuestos, el cual en 1975 había sido denominado por Dreyer y colaboradores como T- 514 por su peso molecular<sup>7</sup>, tenía actividad citotóxica selectiva *in vitro* sobre células neoplásicas. Estos resultados fueron corroborados en la Universidad de Friburgo y en Berlín, República de Alemania y en el Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos<sup>1</sup>. Dicho hallazgo motivó a otros investigadores, a estudiar más profundamente su mecanismo de acción. Actualmente, su evaluación como agente antineoplásico se encuentra en la etapa de fase clínica I y ya se han otorgado patentes para su uso<sup>1</sup>.

Entre los intentos por encontrar el mecanismo de acción, se encuentran los hallazgos de Garza Ocañas y colaboradores<sup>8</sup>, quienes demostraron que este compuesto tiene efecto sobre la lipidoperoxidación microsomal hepática. Sepúlveda demostró que la T-514 produce daño selectivo e irreversible sobre los peroxisomas de levaduras metilotróficas<sup>9</sup>, por lo que su nombre fue substituido por el de Peroxisomicina A1 (PA1). Moreno y colaboradores<sup>10</sup> demostraron, en estudios realizados *in vitro*, una inhibición no competitiva de la Catalasa por la PA1 y algunos de sus isómeros. Recientes estudios realizados por Martínez y colaboradores, han mostrado que la PA1 actúa como un potente agente inductor de apoptosis, a través de la inhibición de la Topoisomerasa II del DNA, del PARP (polimerasa de la adenina ribosa) y de las caspasas 3 y 8, iniciadores de la vía de transducción de este mecanismo<sup>11,12</sup>.

La asignación "A" para la PA1 fue establecida según la nomenclatura de Steglich y Gill<sup>13</sup>, que toma en cuenta la curva de dicroísmo circular. En este sentido, tanto la PA1 como sus isómeros, muestran un efecto Cotton positivo a una longitud de onda de 270 nm y un efecto Cotton negativo a longitudes de onda mayores<sup>1,14</sup>, lo cual coincide con la asignación "A" según la nomenclatura de Steglich.

Además de la T-514, ahora llamada PA1, Dreyer<sup>7</sup> caracterizó en 1975 otras tres antracenonas diméricas extraídas del fruto de *K. humboldtiana* a las que denominó por su peso molecular T- 544, T-516 y T-496, (Figura 1). De estos compuestos, Bermúdez encontró que la T-544 es la responsable de la neurotoxicidad del fruto y la T-496 tiene un intenso efecto catártico<sup>3</sup>.

Waksman y colaboradores<sup>15</sup> en 1992, obtuvieron y caracterizaron de *K. parvifolia*, tres compuestos: la PA1 y la T-496, ya descritos por Dreyer en los frutos de *K. humboldtiana*; y un diastereoisómero de la T- 514, actualmente denominado Peroxisomicina A2 (PA2) (Figura 1).

Rivas<sup>16</sup> en 1995, aisló, purificó y caracterizó, de los extractos del fruto de *K. parvifolia*, el compuesto descrito por Dreyer como T-516. También aisló y caracterizó otros dos compuestos no reportados previamente en la literatura a los que denominó compuesto Y y X. Posteriormente Rivas demostró que Y era un diastereoisómero de la PA1, distinto al citado previamente, al cual denominó Peroxisomicina A3 (PA3) y el compuesto X correspondía a un isómero de posición de PA1; al que denominó Isoperoxisomicina A1<sup>1</sup> (IsoPA1) (Figura 1).

La composición química de las distintas especies es muy variada, y depende entre otros, de factores como la humedad, el sitio y la época de recolección<sup>17</sup>. La *K. parvifolia*, es una de las especies que contiene mayor porcentaje de PA1, su contenido es menos variable y además, el proceso de purificación se ha facilitado debido a que no contiene T-544<sup>18</sup>.

A partir de 1987, los métodos de extracción y purificación de estos compuestos<sup>19,20,21</sup>, principalmente de la PA1, se han ido mejorando; esto con el propósito de obtener mayor cantidad del producto y con un alto nivel de pureza.

Una de las dificultades que se tienen durante el proceso de obtención de los compuestos y durante su vida de almacenaje, es la facilidad con la que se descomponen<sup>22,23</sup>, así como la presencia de impurezas naturales que son co-extraídas durante los procesos de obtención y purificación.

Actualmente se utilizan para el control de calidad de la PA1, ensayos biológicos y fisicoquímicos. Dentro de las pruebas fisicoquímicas se incluye: el punto de fusión inicial y final; la cromatografía en capa delgada en fase normal y en fase reversa; el análisis espectrofotométrico UV-Visible y el análisis por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR)<sup>24</sup>. Para la realización del análisis espectrofotométrico UV-Visible, se obtienen los cociente de las absorbancias del compuesto a cuatro longitudes de onda: 430/415, 270/415, 270/222 nm y se comparan con el cociente de los datos obtenidos de un estándar.

Los criterios de pureza por CLAR se basan en primer lugar en la existencia de una sola señal cromatográfica. Posteriormente, se realiza el análisis espectral de la señal, generada por un detector de arreglo de diodos, a un intervalo de longitud de onda de 220 a 500 nm. El análisis de pureza espectral se realiza por sobreposición de espectros y por el cociente de señales a las longitudes de onda de 269, 310 y 410 nm.

Durante el análisis de pureza espectral de la PA1 por CLAR, han surgido algunas complicaciones, ya que existen factores que influyen notoriamente en los resultados del análisis. Ensayos preliminares mostraron que factores tales como la concentración del analito y la selección de los espectros de referencia, afectan significativamente los resultados, mientras que otros factores, como pequeñas variaciones en la composición de la fase móvil y el pH no afectan significativamente los resultados del análisis<sup>25</sup>.

En 1987, Molina realizó un estudio para determinar los límites de detección de los contaminantes naturales, que con mayor frecuencia se presentan en los lotes de PA1<sup>26</sup>. Este estudio lo realizó para cada una de las pruebas fisicoquímicas incluidas en el control de calidad de la PA1. Los compuestos considerados en el estudio fueron: la Peroxisomicina A<sub>3</sub>, la IsoPA1 y la T-516, compuestos que en CLAR-fase reversa, método que actualmente se emplea como etapa final en el proceso de purificación, tienen tiempos de retención muy cercanos a los de la PA1. Entre los resultados obtenidos de dicha investigación, se encontró que CLAR-fase reversa presentaba la mayor sensibilidad para detectar PA3, a partir de concentraciones de 1.8%. IsoPA<sub>1</sub>,

podía ser detectada como impureza, por espectroscopia UV-Visible en un cociente de absorbancia de 280/437 nm a partir de una concentración de 1.25%. Para el compuesto conocido como T-516 la mayor sensibilidad se encontró cuando se trabajó con espectroscopia UV-Visible empleando el cociente de absorbancias de 270/222, donde se pudo detectar la impureza a concentraciones de 0.8%.

De los contaminantes naturales mencionados anteriormente que son co-extraídos junto con la PA1, la isoPA1 es la que presenta mayor dificultad para su separación. Su identificación por CLAR se dificulta debido a que su tiempo de retención varía mucho durante la vida de la columna<sup>26,27</sup>, aún bajo las mismas condiciones de elución. En cierto momento de la vida de la columna, la señal correspondiente a este compuesto se sobrepone con el de la PA1 por lo que su identificación y cuantificación se dificultan.

En la actualidad, la mayoría de los lotes que se han obtenido presentan una pequeña cantidad de ese compuesto; sin embargo pasan la pruebas de control biológico establecidas. Nuestro interés se enfoca más que a eliminar completamente la impureza, poder conocer exactamente su concentración en los lotes y de esta manera establecer un parámetro de control de calidad para aceptar o rechazar el producto.

## 1.2 Métodos Alternos para el Control de Calidad

Con el propósito de caracterizar, cuantificar y llevar a cabo el control de calidad de los compuestos extraídos, ha surgido la necesidad de mejorar los métodos de análisis existentes; y a la vez implementar nuevos métodos que permitan complementarlos.

Para el control de calidad de la PA1, actualmente se emplean la espectroscopia UV-Visible y CLAR, las cuales se aplican de manera cualitativa. Para este trabajo, se propone buscar alternativas para mejorarlas, a través de recursos que permitan aumentar su sensibilidad y selectividad.

Por otro lado, también se considera la posibilidad de introducir otras técnicas que al momento no han sido exploradas, tales como la espectroscopia de Infrarrojo (IR), la resonancia magnética nuclear de hidrógeno ( $^1\text{HRMN}$ ) y la polarimetría.

La espectroscopia de IR, es una técnica que en la actualidad permite, además de identificar compuestos, realizar su cuantificación bajo condiciones apropiadas<sup>28,29,30</sup>, ya que al igual que en UV-Vis, la absorbancia de las señales espectrales, obedece la ley de Beer<sup>28</sup>. El empleo de las transformadas de Fourier ha contribuido en gran medida al procesamiento de las señales analíticas así como a la resolución de bandas sobrepuestas.

La RMN es una herramienta analítica que ha sido reconocida por su utilidad en la elucidación de estructuras. El advenimiento de instrumentos de

alta sensibilidad ha permitido su empleo en análisis cuantitativos<sup>31,32</sup> a través de la integración de las señales, la cual es directamente proporcional a la concentración molar de los compuestos. La pureza de un compuesto puede ser establecida por relación entre el área de una señal de hidrógeno bien definida del compuesto principal con el área de otra señal correspondiente al contaminante, con la condición de que las señales no se superpongan. Las características de los espectros de <sup>1</sup>HRMN de la PA1 y de las otras antracenas, permite predecir que esta técnica también podría ser de utilidad para el control de calidad del compuesto de interés.

La rotación óptica de un compuesto puro bajo condiciones específicas proporciona una constante física que se utiliza como parámetro de control de calidad en industrias farmacéuticas y de alimentos<sup>33</sup>. Se emplea para evaluar la pureza de compuestos ópticamente activos, que presentan la característica de desviar el plano de luz polarizada; esta es una característica de muchas sustancias naturales tales como aminoácidos, esteroides, alcaloides, carbohidratos, etcétera. La naturaleza quiral de la peroxisomicina nos permite predecir la posibilidad de emplear la técnica como un parámetro de pureza, adicional a los métodos establecidos. Una variación en la rotación óptica indicaría la presencia de impurezas en la muestra.



### **1.2.1 Métodos Quimiométricos de Análisis**

La Química Analítica se ha desarrollado notoriamente en los últimos años, con la introducción de los métodos quimiométricos. La quimiometría es un recurso de la Química Analítica basado en el tratamiento matemático indirecto de datos observados. Su aplicación incluye el diseño de experimentos, la optimización y validación de métodos, el procesamiento de señales, la calibración multivariante, estudios de relación de estructura-actividad, etcétera. La mayoría de estas técnicas son aplicadas en la actualidad por los espectroscopistas.

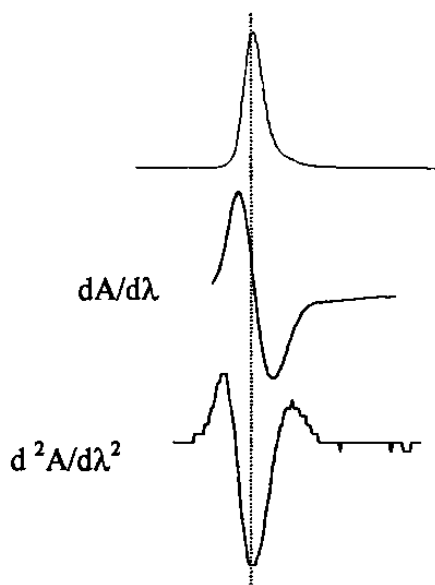
#### **1.2.1.1 Derivadas**

Entre los métodos empleados para el procesamiento de señales, la espectroscopia de derivadas<sup>34-41</sup> es una técnica que se ha empleado para el análisis de compuestos cuyos patrones espectroscópicos son muy complejos, por lo que el tratamiento cuantitativo de los espectros de orden cero es difícil o imposible.

La técnica consiste en graficar la 1a, 2a, o n derivada de la respuesta, respecto a la longitud de onda (Figura 2).

Cuando se tiene un espectro con una banda de absorción simple, los dos puntos de inflexión y el máximo de absorción poseen una longitud de onda característica, independiente de la concentración. Por consiguiente, la función

$dA/d\lambda$ , correspondiente a la primera derivada, pasa por un máximo y un mínimo en los puntos de inflexión, mientras que en el máximo del espectro, la diferencia de absorbancia es cero. La segunda derivada presenta dos máximos, correspondientes a los puntos de inflexión del espectro de la primera derivada y un mínimo que corresponde al máximo del espectro original.



**Figura 2**

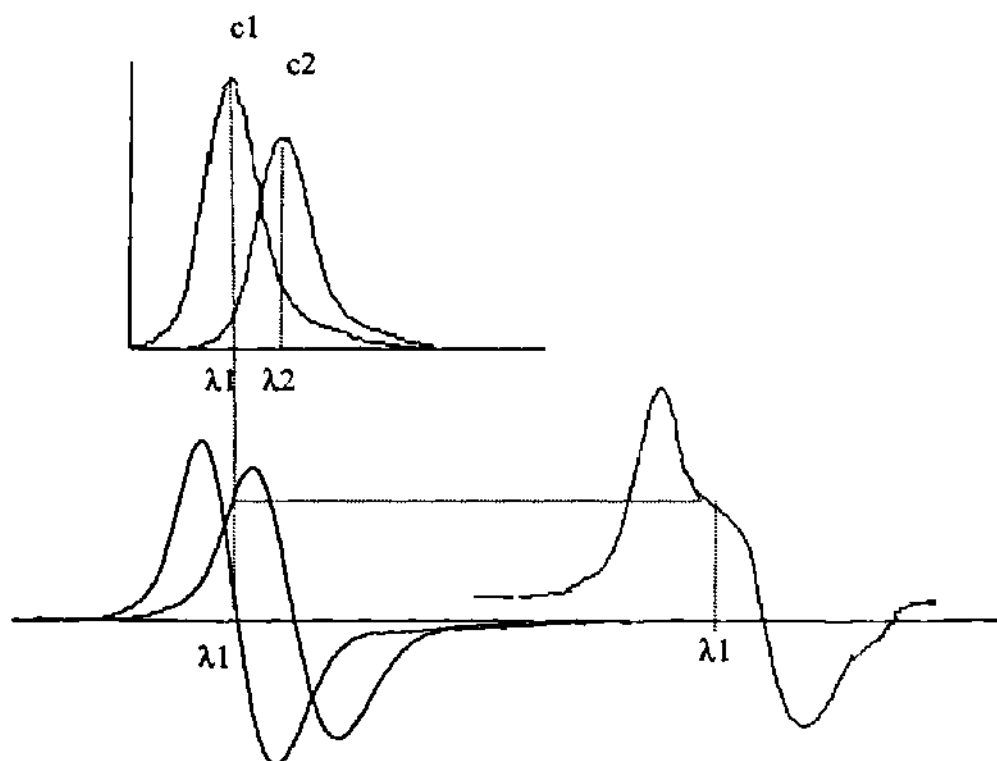
**Espectros de absorción de orden cero (superior) y primera (centro) y segunda derivada (inferior) de una señal. El máximo de la señal corresponde al cero en 1ª derivada y al mínimo en 2ª derivada.**

La espectroscopia de derivadas aumenta la estructura fina de las curvas espectrales, por lo que también se emplea para la detección de características espectrales de componentes no resueltos. La técnica incrementa notablemente

la sensibilidad y la selectividad lo que permite la resolución de forma directa sin tener que efectuar separaciones. La diferenciación también discrimina bandas estrechas frente a las bandas anchas; la amplitud de la derivada de orden  $n$  ( $D_n$ ), considerada como la distancia vertical entre un máximo y un mínimo, está relacionada con la  $n$ -ésima potencia de la inversa del ancho de la banda ( $W$ ) del espectro de orden cero:  $D_n \propto (1/W)^n$ ; por lo que la presencia de un componente de la matriz que se encuentre en exceso y que origina un espectro ancho, presentará una banda de amplitud mucho menor que la del componente que presente la banda estrecha, lo cual facilita su cuantificación. Este es el caso de un solvente, o algún componente de la matriz que se encuentre en gran cantidad y que origine un espectro ancho.

Una de las técnicas más empleadas para la cuantificación en espectroscopia de derivadas es la técnica de cruce al cero<sup>34,42</sup>, la cual consiste en seleccionar una longitud de onda a la que el componente que no se desea cuantificar dé respuesta de cero en el espectro derivado y que el componente que se pretende analizar, sí presente respuesta (Figura 3).

La medición realizada en la mezcla a esa longitud de onda, estará en función únicamente de la concentración del componente que se analiza.



**Figura 3**

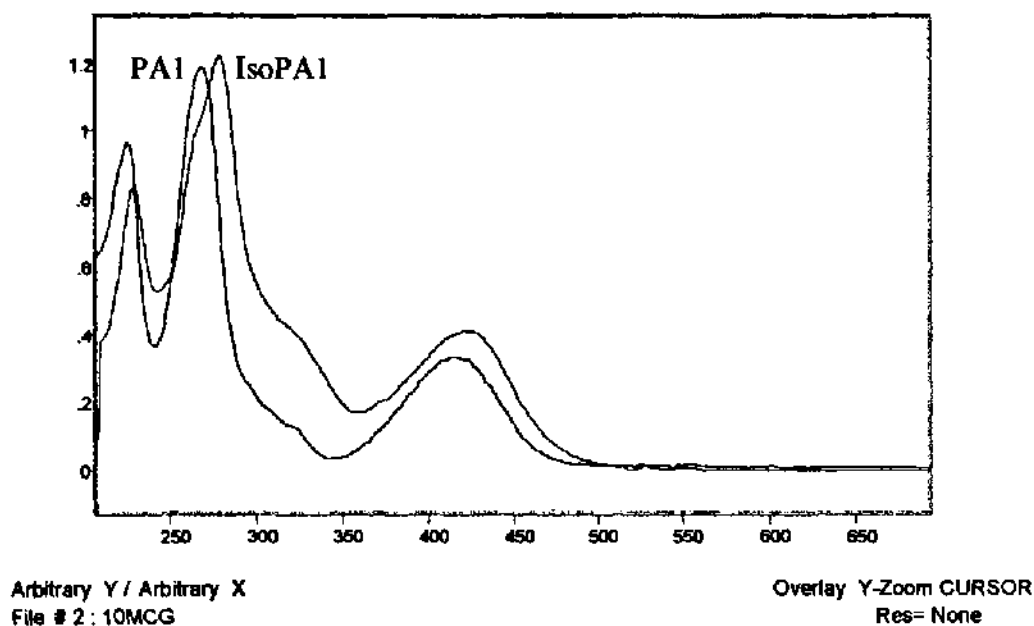
**Aplicación de la técnica de cruce al cero para realizar la cuantificación mediante el empleo de derivadas**

### **1.2.1.2 Calibración Multivariante**

En ocasiones, cuando se tienen mezclas complejas, también se recurre a una resolución matemática de mezclas, la cual se emplea cuando los procedimientos físicos y químicos son difíciles de realizar. Es una alternativa rápida y precisa. Los métodos de calibración multivariante, han tenido gran aplicación en los últimos años para el análisis cuantitativo de compuestos<sup>35,43-50</sup>.

La ventaja que tienen los métodos de calibración multivariante sobre los tradicionales, es que en lugar de emplear un solo punto del espectro para la cuantificación, se pueden emplear diferentes puntos espectrales, incluso todo un intervalo del espectro, lo cual permite la investigación de sistemas complejos. La calibración multivariante se emplea en el análisis de sistemas con interferencias químicas, aunque no se encuentren definidas, sin necesidad de manipular excesivamente la muestra<sup>43</sup>.

En el caso de la PA1, los espectros UV-Visible de los posibles contaminantes naturales son muy similares (Figura 4), por lo que la identificación y cuantificación de los contaminantes por la técnica tradicional de análisis univariable es de poca o nula utilidad.



**Figura 4**  
**Espectro UV-Visible de PA1 e IsoPA1**

El diseño de un experimento para la cuantificación de la peroxisomicina por espectroscopia UV-Visible, con empleo de métodos de calibración multivariante, nos facilitaría identificar la presencia de contaminantes y determinar la concentración a la cual se encuentran.

Al igual que en la espectrofotometría UV-Visible, en la espectroscopia de IR, las técnicas de calibración multivariante, así como el empleo de derivadas se han utilizado en la resolución de mezclas de compuestos con espectros muy semejantes, que bajo condiciones de orden cero son difícil de resolver<sup>29,34,43,48</sup>.

### **1.2.2 Aplicación de Derivadas y Análisis de Pureza en Cromatografía**

Recientemente, algunos autores han reportado el empleo de diversos algoritmos matemáticos para el análisis de picos no resueltos en cromatografía<sup>51-54</sup>. Dentro de ellos el método de derivación matemática de los cromatogramas, se recomienda en los casos en los que se tienen cromatogramas con señales no resueltas<sup>51</sup>. Un cromatograma derivado es la representación gráfica del cociente diferencial  $dA/dt$ , donde "A" representa la respuesta del detector y "t" el tiempo de elución. Cabe recordar que en la primera derivada, los máximos de la señal cromatográfica se convierten en puntos donde  $dA/dt = 0$ , mientras que los puntos de inflexión se convierten en máximos o mínimos. Dadas las dificultades que se han presentado durante los procesos de separación, se consideró que el empleo de derivadas pudiera mejorar los resultados de cuantificación de isoPA1 en lotes de PA1.

El análisis de pureza espectral de un pico cromatográfico, mediante el empleo de detectores de arreglo de diodos, se lleva a cabo por diferentes técnicas<sup>55,56</sup>. Entre ellas: la sobreposición de espectros normalizados en diferentes puntos del pico cromatográfico, la sobreposición de cromatogramas obtenidos a diferentes longitudes de onda y la relación de absorbancias a diferentes longitudes de onda a través de la señal cromatográfica. La eficacia de los resultados obtenidos con las técnicas mencionadas, depende del control de algunos factores que influyen en el análisis, tales como la composición de la fase móvil, la concentración de los analitos, el intervalo espectral, el número de espectros por pico y las longitudes de onda tomadas en la relación de absorbancias<sup>26</sup>. Por este motivo, otro de los propósitos de este trabajo ha sido optimar parámetros para este análisis.

De esta manera, dadas las características fisicoquímicas de los compuestos de interés, la necesidad de mejorar los métodos de control de calidad de la PA1 y las ventajas atribuibles a los métodos quimiométricos, nos propusimos la siguiente hipótesis de trabajo:

## **HIPÓTESIS**

**El Análisis de Pureza de la Peroxisomicina A1 podrá ser mejorado  
mediante el Tratamiento Matemático de Datos**



## **OBJETIVO GENERAL**

**Desarrollar y Validar Nuevos Métodos Analíticos para el Control de  
Calidad de la Peroxisomicina A1**

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Establecer criterios de pureza espectral UV-Visible para PA1, mediante el empleo de derivadas y el análisis multicomponente.
- 2) Establecer los parámetros de pureza cromatográfica y espectral para PA1 mediante CLAR - arreglo de diodos.
- 3) Realizar el análisis y establecer parámetros para la cuantificación y/o análisis de pureza de PA1 e IsoPA1 por espectroscopia de IR.
- 4) Establecer parámetros de pureza de PA1 a través de la medida del poder óptico rotatorio de los compuestos.
- 5) Establecer los parámetros de pureza para la PA1 por  $^1\text{HRMN}$
- 6) Evaluar los resultados obtenidos de los objetivos 1 al 5 y proponer nuevos parámetros fisicoquímicos de control de calidad para la PA1.

\*

## **CAPÍTULO 2**

### **MATERIAL Y MÉTODOS**

#### **2.1 Material y Equipo**

##### **2.1.1 Equipo Analítico**

Espectrofotómetro Beckman DU 7500 de arreglo de diodos con celdas de cuarzo de 1 mL de capacidad, 1 cm de trayecto óptico.

Espectrofotómetro Infrarrojo (FT-IR) Bruker Modelo Vector 22, celda con ventanas de  $\text{CaF}_2$

Cromatógrafo de Líquidos HP 1090 con detector de arreglo de diodos.

Columna Fase reversa Hypersil ODS de 100 x 2.1 mm, tamaño de partícula 5  $\mu\text{m}$ .

Polarímetro Perkin Elmer modelo 341 con filtros de diferentes longitudes de onda.

Espectrómetro de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) modelo DPX 400

Balanza analítica Sartorius modelo Ba 1105

Potenciómetro Beckman modelo 3500 con electrodo de vidrio, para la medición de pH.

### **2.1.2 Programas Computacionales**

Para el procesamiento de señales y Análisis Multicomponente (AMC) se empleó el programa de cómputo Galactic Grams 32 v5, de la casa comercial Galactic, Salem, N. H.

Para el procesamiento estadístico de los datos se emplearon los programas Microsoft Office Excel 97 y el Paquete Estadístico Dr. Emilio Olivares.

Para el Análisis de Pureza de pico cromatográfico: HP HPLC 3D Chem Station.

### **2.1.3 Material General y de Vidrio**

Pipetas automáticas de volumen variable: 10 a 100  $\mu\text{L}$  y de 100 a 100  $\mu\text{L}$  y puntillas apropiadas.

Viales: de 2 y 4 mL con tapón de rosca y sello de teflón.

Equipo de Filtración de Solventes y muestras para Cromatografía Millipore,

Filtros Millipore HVLP de porosidad 0.45  $\mu\text{m}$  tanto para muestras como para solventes empleados en cromatografía.

#### 2.1.4 Estándares

Los estándares de la PA1 fueron proporcionados por el laboratorio de producción del departamento de Farmacología y Toxicología. Algunos de ellos repurificados en el laboratorio de extracción, mediante cromatografía de exclusión molecular en columna gravitacional con Sephadex LH-20, fase móvil Metanol con 0.1% de Acido Acético<sup>57</sup>. La IsoPA1 fue proporcionada por laboratorio de extracción del mismo departamento<sup>16</sup>.

#### 2.1.5 Reactivos

Agua, Metanol y Acetonitrilo Grado CLAR, Merck

Tetracloruro de carbono

Cloroformo y cloruro de metileno *Suprasov* (para análisis orgánico de trazas),

Merck

Ac. Acético

Agua grado CLAR

DMSO- d6

## **2.2 Métodos**

### **2.2.1 Espectroscopia UV - Visible**

En todos los casos, los análisis fueron realizados en el espectrofotómetro Beckman DU 7500 de arreglo de diodos y los datos fueron transformados a formato ASCII y exportados posteriormente al Programa GRAMS 32 v5.

#### **2.2.1.1 Determinación de los Límites de Detección y Cuantificación Instrumentales**

Para establecer los límites de detección y cuantificación instrumentales, se empleó como blanco agua grado CLAR. Posteriormente se hicieron lecturas repetidas ( $n=20$ ), de una misma muestra de metanol (solvente que se empleó en las determinaciones) a diferentes longitudes de onda. Se calculó la desviación estándar de las absorbancias del metanol. Se establecieron los LD y LC instrumentales (3 y 10 veces la desviación estándar de las señales de metanol respectivamente<sup>58</sup>).

### 2.2.1.2 Cuantificación con Espectros de Orden Cero

Para la cuantificación de la PA1 así como de la IsoPA1, se prepararon 5 soluciones estándares, en concentraciones cuyas lecturas de absorbancia para la señal de mayor intensidad, estuviera entre 0.2 y 1.2 unidades. Las soluciones se prepararon a partir de una solución de 1 mg en 10 mL, preparada en metanol. El intervalo espectral que se empleó fue de 220 a 600 nm. El intervalo de concentraciones fue para la PA1 de 1 a 12 µg/mL y para la IsoPA1 de 0.8 a 10 µg/mL. Todas las diluciones se hicieron por triplicado.

Las curvas de calibración de la PA1 se realizaron a las siguientes longitudes de onda: 225, 270 y 420 nm. Las curvas de calibración de la IsoPA1 se realizaron a 228, 280, 322 y 425 nm. Se determinó el factor de respuesta promedio de todos los niveles de concentración de cada curva de calibración. El cálculo del factor de respuesta se realizó mediante el siguiente criterio:

$$F R = \frac{\text{absorbancia}}{\text{Concentración}}$$

### 2.2.1.3 Precisión

Con los datos espectrales que se obtuvieron, se calcularon los cocientes de absorbancia a diferentes longitudes de onda, en las distintas concentraciones a las que se trabajó y se calcularon los coeficiente de

variación de los resultados. Las longitudes de onda para la PA1 fueron: 225/420, 270/415, 225/270, 225/415, 270/420 Las longitudes de onda para IsoPA1 fueron: 280/322, 425/225, 425/280 y 280/228.

#### **2.2.1.4 Obtención de los Espectros Derivados**

Los espectros de los estándares de PA1 e IsoPA1 obtenidos previamente, fueron procesados para obtener la 1ª y 2ª derivada. Para ello se optimaron los parámetros de suavizado espectral y el  $\Delta\lambda$  (incremento de longitud de onda) para la obtención de los espectros derivados. Para ello se empleó el algoritmo de Savitski y Golay<sup>59,60</sup>.

#### **2.2.1.5 Calibración con Espectros Derivados (Técnica de Cruce al Cero)**

Se buscaron las longitudes de respuesta cero en los espectros derivados (1ª y 2ª derivada) de los estándares de la PA1 e IsoPA1, para así determinar las longitudes de onda de análisis (técnica del cruce al cero). A las longitudes de onda seleccionadas se construyeron curvas de calibración y se realizó el análisis de regresión de las mismas.



### **2.2.1.6 Calibración Multivariante**

Con los intervalos de linealidad del método para ambos compuestos, se construyó un diseño experimental para la cuantificación de IsoPA1 y PA1 en mezclas. El diseño experimental propuesto se estableció para dos componentes (PA1 e IsoPA1) y 20 experimentos de diferentes concentraciones en los intervalos de linealidad establecidos (Tabla I). Se seleccionaron los intervalos espectrales óptimos para el análisis y el número óptimo de factores en base al Valor mínimo de PRESS<sup>60</sup>. Las muestras se analizaron por el método de calibración "Regresión por Mínimos Cuadrados Parciales" (PLS1)<sup>60</sup>.

### **2.2.1.7 Técnica de Adición de Estándar: Cociente de Respuestas a dos Longitudes de Onda con Espectros en 1ª Derivada.**

Se preparó una curva de calibración de IsoPA1 en una matriz preparada con 1 mg de PA1 disuelto en 10 mL de metanol. Las concentraciones de IsoPA1 en la solución fueron de 0, 1, 2, 3, 4, 6, 8 y 10 µg/mL correspondientes a 0, 1, 2, 3, 4, 6, 8 y 10% respecto a PA1. Se obtuvo la primera derivada de los espectros y con los datos obtenidos se construyó una curva de calibración, donde el eje "y" correspondió al cociente de la respuesta de los espectros a las longitudes de onda 285/277 nm. La concentración de IsoPA1 en muestras de PA1 no adicionadas se calculó por extrapolación al eje x en la curva de calibración.

La precisión del método se evaluó mediante el cálculo de los coeficientes de variación para el cociente de las señales 285/277, en un lote de PA1 sin adición que se preparó a diferentes concentraciones .

**Tabla I**

**Diseño experimental empleado para la cuantificación de PA1 e IsoPA1.  
Método de Mínimos Cuadrados Parciales (PLS 1)**

Muestra	Concentración PA1 $\mu\text{g/mL}$	Concentración IsoPA1 $\mu\text{g/mL}$
Mezcla 1	3.0	1.6
Mezcla 2	5.0	0.8
Mezcla 3	2.0	1.2
Mezcla 4	4.0	6.0
Mezcla 5	2.0	6.0
Mezcla 6	4.0	1.2
Mezcla 7	4.0	1.6
Mezcla 8	6.0	4.0
Mezcla 9	8.0	1.6
Mezcla 10	5.0	6.0
Mezcla 11	1.0	1.6
Mezcla 12	6.0	8.0
Mezcla 13	1.0	8.0
Mezcla 14	2.0	0.8
Mezcla 15	6.0	0.8
Mezcla 16	5.0	4.0
Mezcla 17	3.0	4.0
Mezcla 18	1.0	4.0
Mezcla 19	3.0	0.8
Mezcla 20	1.0	0.8

### **2.2.1.8 Cuantificación de IsoPA1 en Lotes de PA1**

Se realizó mediante dos técnicas: Calibración Multivariante y Adición de Estándar. En la técnica de adición de estándar se construyó la gráfica de calibración con el cociente de las señales de los espectros derivados, a las longitudes de onda 285/277, en función del porcentaje de IsoPA1 adicionado.

## **2.2.2 Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución**

### **2.2.2.1 Condiciones de Trabajo**

Se trabajó en un Cromatógrafo de Líquidos HP modelo 1090, con detector de arreglo de diodos. Las longitudes de onda seleccionadas para la cuantificación fueron: 269, 310 y 410 nm. Columna: Fase reversa ODS 5  $\mu\text{m}$  (100 x 2.1 mm). Eluentes: A: metanol B: agua: acetonitrilo: ácido acético (60:40:1.6). Flujo: 0.4 mL/ minuto. El gradiente de elución se presenta en la Tabla II. Las soluciones de los estándares fueron preparados en metanol grado CLAR.

Tabla II

Gradiente de elución empleado en la separación de peroxisomicinas por CLAR

Tiempo (min)	Composición de Fase Móvil		Flujo (mL/min)
	% A	% B	
0	60	60	0.4
6	60	40	0.4
9	100	0	0.4
11	100	0	0.4
13	60	40	0.4

*Osorio Pérez (1998)<sup>27</sup>*

#### 2.2.2.2 Método de Calibración con Estándar Externo

A partir de una solución stock de IsoPA1 de 1 mg/mL, se preparó una curva de calibración de IsoPA1 en metanol en concentraciones de 1, 5, 10, 20 y 40  $\mu\text{g/mL}$ . Se inyectaron en el cromatógrafo de líquidos 5  $\mu\text{L}$  de cada uno de los estándares y posteriormente se construyeron curvas de calibración con los datos de los cromatogramas obtenidos a las longitudes de onda de 269, 310 y 410 nm.

### **2.2.2.3 Método de Adición de Estándar**

Se preparó una solución de 100 µg/mL de PA1 en metanol. Esta solución fue empleada como matriz para preparar la curva de calibración de IsoPA1 en concentraciones de 1, 2, 3, 4 y 5% de IsoPA1 respecto a PA1. La concentración de la IsoPA1 en la matriz de PA1 se determinó por extrapolación hacia el eje x de la curva de regresión obtenida.

### **2.2.2.4 Calibración con Estándar Interno**

La cuantificación con estándar interno se realizó en soluciones preparadas en las mismas condiciones que en la técnica de adición estándar, adicionadas con 20 µL de una solución del estándar interno (PA2) preparado en una concentración de 100 µg /mL. Para la gráfica de calibración se tomó como eje "X" el % de IsoPA1 y como eje "Y" el cociente de respuesta (área) IsoPA1 / PA2.

### **2.2.2.5 Cuantificación de IsoPA1 con los Cromatogramas Derivados.**

Los cromatogramas obtenidos mediante el método de Adición de Estándar, fueron reprocesados para obtener la primera derivada. Se construyeron las curvas de calibración, para lo cual se probaron 3 métodos de integración de la

señal: cero al máximo, cero al mínimo y máximo a mínimo (amplitud de la derivada)<sup>34</sup>. La concentración de la IsoPA1 en la matriz de PA1 se determinó:

- por extrapolación hacia el eje x de las curvas de regresión obtenida.
- Mediante el cálculo del factor de respuesta promedio obtenido de los diferentes niveles de la curva de calibración.

$$\% \text{ de IsoPA1} = \frac{\text{Integración de la señal}}{\text{Promedio del F. de R.}}$$

#### **2.2.2.5.1 Sensibilidad del Método**

Los límites de detección y cuantificación se calcularon a partir de los datos de las curvas de calibración bajo el siguiente criterio<sup>61</sup>:

Límite de detección: 3.3 (s del intercepto / pendiente)

Límite de cuantificación : 10 (s del intercepto /pendiente)

#### **2.2.2.5.2 Precisión y Exactitud del Método**

Para determinar la precisión del método se calcularon los coeficientes de variación obtenidos para 2 lotes de diferente concentración de IsoPA1. La exactitud del método se valoró mediante la cuantificación de IsoPA1 en lotes de

PA1 naturalmente contaminado. Los resultados se compararon con los reportados por  $^1\text{HRMN}^{61}$ .

#### **2.2.2.6 Análisis de Pureza de PA1 por CLAR - Arreglo de Diodos.**

Se analizó en primer lugar la existencia de una sola señal cromatográfica y posteriormente, a la señal cromatográfica se le practicó el análisis de pureza espectral.

Para determinar la pureza cromatográfica, a los cromatogramas de los estándares se les realizó una gráfica de isoabsorbancia, en el intervalo de 220 a 600 nm. Las soluciones de los estándares fueron inyectadas 6 veces para asegurar la repetibilidad de los resultados. Los cromatogramas fueron obtenidos a 3 longitudes de onda diferentes: 269, 310 y 410 nm. El análisis de pureza se realizó por sobreposición de espectros en 7 puntos del cromatograma, tres antes del máximo del pico, uno en el máximo y tres posteriores al máximo, por el cociente de absorbancias a través del pico y la sobreposición de cromatogramas a las 3 longitudes de onda establecidas. Para la corrección de los espectros se empleó como referencia los espectros de la línea base al inicio y al final de la integración del pico. El umbral de absorbancia inicial fue de 10 mUA (miliunidades de absorbancia). La sensibilidad del método se realizó por comparación de los porcentajes de pureza obtenido de las muestras adicionadas respecto al estándar no adicionado.

### **2.2.2.7 Robustez del Método de Análisis de Pureza**

Se evaluó el efecto de algunos factores en el análisis de pureza. Los factores externos considerados fueron: la composición del solvente, el efecto del pH y la masa inyectada. Para evaluar los factores instrumentales se construyó un diseño experimental según Plackett y Burman<sup>62</sup>. Las variables consideradas y sus valores se presentan en la Tabla III. El parámetro de evaluación fue el porcentaje (%) de pureza.

## **2.2.3 Espectroscopia Infrarrojo**

### **2.2.3.1 Optimización de las Condiciones de Análisis.**

Las condiciones que se optimaron fueron: Solvente, concentración, espesor de la celda, intervalo espectral y número de barridos. La selección del solvente se hizo en función de la solubilidad y la no interferencia espectral con los componentes a analizar. Para ello se probaron diferentes solventes:



**Tabla III**  
**Variabes consideradas en la evaluación de la robustez del análisis de**  
**pureza espectral del pico cromatográfico**

<b>Parámetro</b>	<b>Valor establecido</b>	<b>Valor alto</b>	<b>Valor bajo</b>
Intervalo de longitud de onda (L/l)	230 - 500	550	220
Espectros por pico (E/e)	7	11	5
Espectros de Referencia(R/r)	Línea base del pico	Cercano a la línea base	En el apex del pico
Suavizado del espectro (S/s)	5 puntos	10 puntos	0 puntos
Espectro referencia para cálculo de nivel de pureza (N/n)	Espectro del ápex	Todos los espectros del pico	Promedio de los espectros del pico
No. de espectros para el cálculo de umbral (U/u)	7	11	5
Tiempo de muestreo Espectral (C/c)	4	8	1

Nota: las iniciales mayúsculas corresponden a los valores altos y las minúsculas a los valores bajos respecto al valor establecido en el método.

metanol, acetonitrilo, tetracloruro de carbono, cloruro de metileno y cloroformo.

El intervalo espectral se seleccionó en base a las características de las ventanas de la celda (CaF<sub>2</sub>).

### **2.2.3.2 Cuantificación de PA1 e IsoPA1 en Espectros de Orden Cero.**

Para la cuantificación de la PA1 y de la IsoPA1, se prepararon soluciones de 1 mg/mL en cloroformo y de ellas se tomaron 6 alícuotas de 100, 200, 300, 400, 500 y 1000  $\mu\text{L}$ , las cuales fueron transferidas a viales de 4 mL con tapón de rosca y evaporadas a sequedad con  $\text{N}_2$ . Al momento del análisis espectral, las muestras fueron reconstituidas con 1 mL de cloroformo. La curva de calibración de PA1 se realizó a  $1629\text{ cm}^{-1}$ . La curva de calibración de IsoPA1 se realizó a  $1603\text{ cm}^{-1}$ .

### **2.2.3.3 Obtención de Espectros Derivados**

Los espectros de los estándares de PA1 e IsoPA1 obtenidos previamente, fueron convertidos a formato J-CAMP y exportados al programa GRAMS 32 v5 para procesarse y obtener de ellos la 1ª y 2ª derivada. Para ello se optimaron los parámetros de suavizado espectral y el número de puntos para hacer la derivada mediante el algoritmo de Savitski y Golay<sup>59</sup>.

### **2.2.3.4 Calibración con Espectros Derivados (Técnica de cruce al cero)**

En los espectros derivados (1ª y 2ª derivada) de los estándares de la PA1 e IsoPA1, se buscaron los números de onda de respuesta cero, para así

determinar los números de onda de análisis (técnica del cruce al cero). Se construyeron curvas de calibración y se realizó el análisis de regresión de las mismas.

#### **2.2.3.4 Calibración Multivariante**

Para cuantificar PA1 e IsoPA1 en mezclas, se diseñó una matriz de calibración con 20 ensayos y 2 componentes (PA1 e IsoPA1) en concentraciones dentro del intervalo de linealidad probado previamente (100 a 1000  $\mu\text{g/mL}$ ), donde la proporción de los componentes en cada ensayo se determinó al azar. El análisis de los datos espectrales se realizó con el programa GRAMS 32 v5. Para la cuantificación se empleó el método de calibración de Mínimos Cuadrados Parciales en su versión algorítmica de tipo 1 (PLS 1)<sup>60</sup>. La región espectral utilizada comprende entre 1700 y 1300  $\text{cm}^{-1}$  (dando origen a 208 puntos experimentales). En la selección del número óptimo de factores se aplicó el criterio del mínimo PRESS. Se estimó la capacidad de predicción de la técnica para cada componente, mediante el cálculo y evaluación del porcentaje de error de las predicciones efectuadas, las cuales se compararon con el valor real del componente en el ensayo.

## 2.2.4 Medida del Poder Óptico Rotatorio

### 2.2.4.1 Condiciones de Análisis

Se trabajó con un polarímetro Perkin Elmer Modelo 341 con controlador de temperatura. Las muestras de PA1 e IsoPA1 fueron disueltas en una solución de dimetilsulfóxido al 5% en acetonitrilo, en una concentración de 1 mg/mL. Para la medición del poder óptico rotatorio se emplearon lámparas de sodio con filtro de 589 nm y de mercurio con filtro de 578 nm. El trayecto óptico de la celda fue de un decímetro.

### 2.2.4.2 Precisión del Método

Para establecer la precisión del método se prepararon muestras por quintuplicado de soluciones de PA1 adicionadas con los siguientes porcentajes de IsoPA1: 0, 5, y 10%. Se determinaron las rotaciones ópticas de las soluciones y se calculó la rotación específica correspondiente:

$$[\alpha] = \frac{\alpha}{l * c}$$

donde  $[\alpha]$  es la rotación específica a 20°C, a las longitudes de onda trabajadas (589 y 578 nm respectivamente para las líneas del sodio y mercurio),  $\alpha$  es la

rotación óptica obtenida experimentalmente,  $l$  el trayecto óptico y  $c$  la concentración de la solución expresada en g/mL.

La precisión del método se estableció en función de los coeficientes de variación de las lecturas a cada una de las concentraciones.

#### **2.2.4.3 Sensibilidad del Método**

Para establecer la sensibilidad del método, se sometieron los datos de rotación específica obtenidos tanto de las muestras sin adicionar, como adicionadas con 5, y 10% de IsoPA1, a un análisis de varianza y de correlación, para evaluar si existía diferencia significativa entre los datos obtenidos con las diferentes concentraciones del contaminante.

#### **2.2.4.4 Medida del Poder Óptico Rotatorio en Lotes de PA1**

Se determinó la medida del poder óptico rotatorio, tanto en lotes de PA1 repurificados<sup>57</sup>, que contenían concentraciones de IsoPA1 entre 0.7 y 1.8 % como en lotes no repurificados que contenían mayor cantidad de IsoPA1 ( 4 a 6%). Se determinó la correlación entre los resultados obtenidos de la medida del poder óptico rotatorio y las concentraciones de IsoPA1 en los lotes. El análisis de cada lote se realizó por quintuplicado.

## 2.2.5 Resonancia Magnética Nuclear

### 2.2.5.1 Condiciones de Análisis

Se trabajó con un Espectrofotómetro Bruker DPX-400 de 400MHz para  $^1\text{H}$ . Los espectros de PA1 e IsoPA1 fueron obtenidos con desacople de  $^{13}\text{C}$ , el número de pulsos fue de 514 y se empleó para el muestreo una sonda inversa. Como solvente se empleó DMSO- $d_6$ . Los análisis se realizaron con 15 mg de muestra en 0.5 mL de solvente deuterado<sup>63</sup>.

### 2.2.5.2 Límites de Detección y Cuantificación Instrumentales

Para establecer los límites de detección y cuantificación instrumentales<sup>58</sup>, se calculó la desviación estándar del blanco (500 puntos de línea base) y se relacionó con el % de área de la señal relativa a la de la PA1

- Límite de detección: 3 veces la desviación estándar del blanco
- Límite de cuantificación : 10 veces la desviación estándar el blanco

### 2.2.5.3 Cuantificación de IsoPA1 por RMN

Para la cuantificación de IsoPA1 en los lotes de PA1 se tomaron 2 señales con desplazamientos químicos 7.25 y 7.15 ppm correspondientes al H-10 de la PA1 y a los H 10 y 10' de la IsoPA1 respectivamente. La cuantificación se realizó mediante la relación de áreas de las señales de ambos compuestos. La señal de la PA1 (H-10), fue considerada el 100%. En el caso de la IsoPA1, dado que la señal elegida corresponde a 2 H, el resultado del área relativa fue dividido entre 2, para mantener la relación molar de los compuestos.

$$\% \text{ IsoPA1} = \frac{\text{Área de IsoPA1}}{\text{Área de PA1}} \times 100$$

Se prepararon soluciones de IsoPA1 en PA1 para obtener concentraciones de 0.5, 1, 1.5 y 2%.

Para la cuantificación se compararon 2 métodos:

- a) **Cuantificación directa** de IsoPA1 en lotes de PA1, por la relación de áreas de los singuletes a 7.25 y 7.15 ppm, en el espectro original.
- b) **Método de adición de estándar.** Para la cuantificación mediante el método de adición de estándar, se construyó una gráfica de calibración con la

relación de áreas de las señales en concentraciones de 0, 0.5, 1, 1.5 y 2% de IsoPA1. La concentración de IsoPA1 en la muestra de PA1 no adicionada, se obtuvo por extrapolación hacia el eje X ( $Y=0$ ). Con esta misma curva de calibración se valoró la linealidad del método

#### **2.2.5.4 Límites de Detección y Cuantificación del Método**

Los límites de detección y cuantificación del método se determinaron en base a los resultados de curvas de calibración en muestras de PA1 adicionadas con IsoPA1 en diferentes proporciones<sup>61</sup>.

- Límite de detección: 3.3 (s del intercepto/pendiente)
- Límite de cuantificación : 10 (s del intercepto./pendiente)

#### **2.2.5.5 Cuantificación con Espectros Derivados**

Los espectros de las muestras obtenidos previamente, fueron procesados para obtener la 1ª derivada. Se integraron las señales de las derivadas correspondientes a las señales de PA1 e IsoPA1 mediante 3 técnicas de integración: cero al máximo, de cero al mínimo y de máximo a mínimo (amplitud de la señal).



Los resultados de la cuantificación mediante esta técnica se comparó con los datos obtenidos previamente de la cuantificación en espectros de orden cero.

En todos los casos los análisis se realizaron por triplicado y se determinó la precisión de los métodos mediante el cálculo de los coeficientes de variación.

#### **2.2.5.6 Análisis Estadístico para la Comparación de los Métodos**

Para establecer si existía diferencia significativa entre las distintas técnicas de integración de la señal, los datos, tanto de los resultados de la cuantificación con espectros de orden cero, como los derivados en las diferentes formas de integración, se analizaron mediante un diseño completamente al azar con arreglo factorial A x B<sup>64</sup>,

#### **2.2.6 Comparación de los Métodos de Análisis**

La comparación de los métodos analíticos para la detección y/o determinación cuantitativa de IsoPÁ1 en lotes de PA1 se estableció en función a dos parámetros: Sensibilidad y Precisión.

### **2.2.6.1 Sensibilidad**

La sensibilidad se estableció en función de los límites de detección y cuantificación de IsoPA1 como contaminante en los lotes de PA1.

### **2.2.6.2 Precisión**

La precisión se estableció en función de los Coeficientes de Variación de cada uno de los métodos.

## CAPÍTULO 3

### RESULTADOS

#### 3.1 Espectroscopia UV - Visible

##### 3.1.1 Límites de Detección y Cuantificación Instrumentales

En la Tabla IV se presentan los resultados, en unidades de absorbancia, de límites de detección y cuantificación instrumentales a diferentes longitudes de onda.

**Tabla IV**

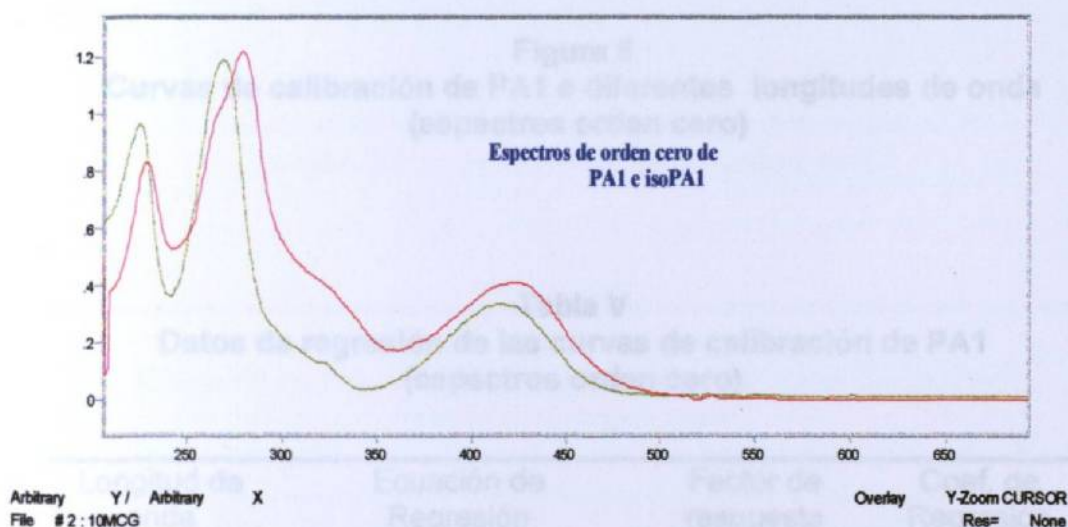
**Límites de detección y cuantificación instrumentales a diferentes longitudes de onda**

	228	280	270	322	425
*L.D.	0.071	0.077	0.083	0.091	0.028
*L.C.	0.220	0.265	0.279	0.302	0.095

\*unidades de absorbancia

### 3.1.2 Cuantificación con Espectros de Orden Cero

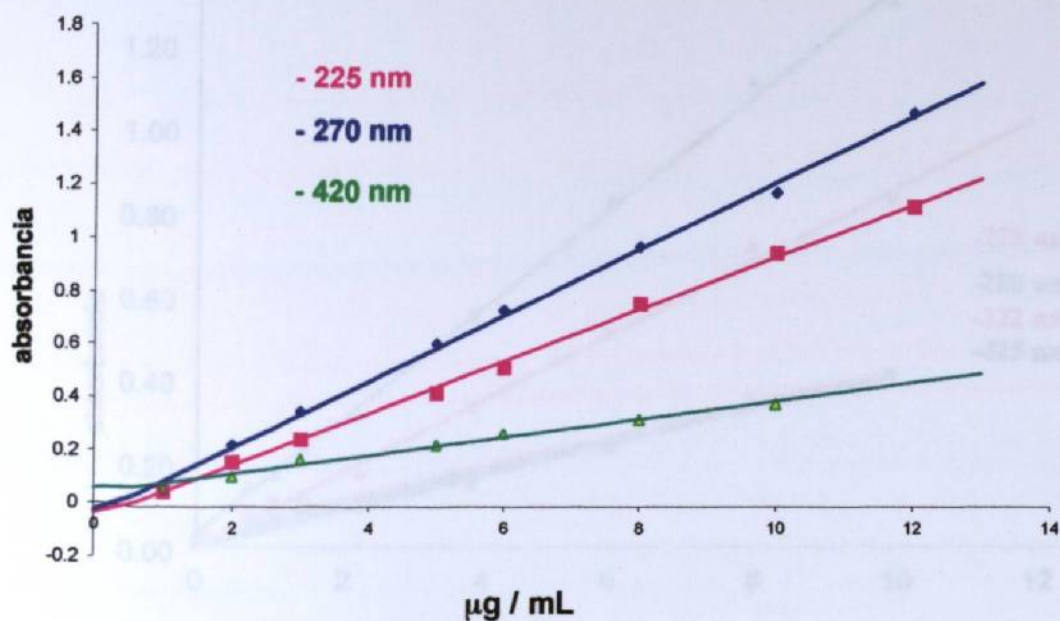
La Figura 5 corresponde a los espectros sobrepuestos de PA1 e IsoPA1. En la Figura 6 se presentan las curvas de calibración de PA1 a distintas longitudes de onda y las ecuaciones de regresión lineal correspondientes se presentan en la Tabla V. La Figura 7 corresponde a la curva de calibración de la IsoPA1 y los datos de las ecuaciones se presentan en la Tabla VI



**Figura 5**  
**Espectros UV - Visible sobrepuestos de PA1 e IsoPA1**

225	$Y = 0.0908X - 0.0476$	0.0345	0.589
270	$Y = 0.1250X - 0.0213$	0.1150	0.396
420	$Y = 0.0326X + 0.0104$	0.0308	0.893

n = 3  
Y = absorbancia  
X = concentración de PA1



**Figura 6**  
Curvas de calibración de PA1 a diferentes longitudes de onda  
(espectros orden cero)

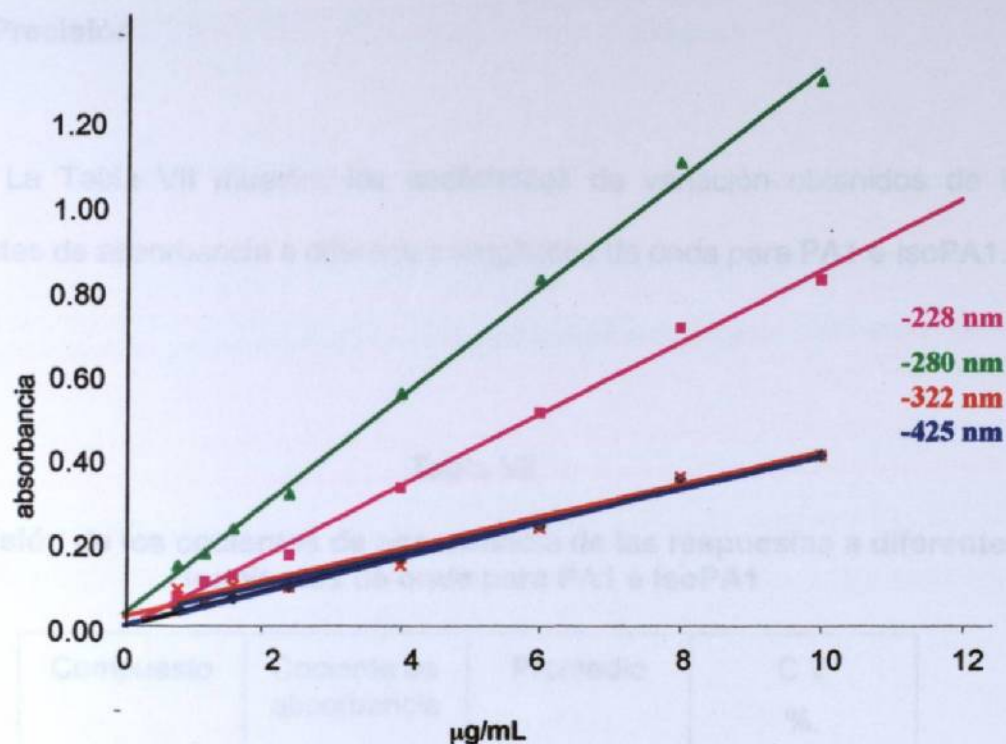
**Tabla V**  
Datos de regresión de las curvas de calibración de PA1  
(espectros orden cero)

Longitud de onda (nm)	Ecuación de Regresión	Factor de respuesta promedio	Coef. de Regresión lineal (r)
IsoPA1			
225	$Y = 0.0998X - 0.0476$	00848	0.999
270	$Y = 0.1250X - 0.0246$	0.1150	0.996
420	$Y = 0.0326X + 0.0104$	0.0338	0.993

n = 3

Y = abs

X = concentración de PA1



**Figura 7**  
Curvas de calibración de IsoPA1 a diferentes longitudes de onda (espectros orden cero)

**Tabla VI**  
Datos de regresión de las curvas de calibración de IsoPA1 (espectros orden cero)

Longitud de onda (nm)	Ecuación de Regresión	Factor de respuesta promedio	Coef. de Regresión lineal (r)
IsoPA1			
228	$Y = 0.086X - 0.0079$	0.0831	0.998
280	$Y = 0.125X + 0.0395$	0.1430	0.998
322	$Y = 0.086X - 0.0079$	0.0526	0.984
425	$Y = 0.041X - 0.0030$	0.0425	0.997

n = 3

Y = abs X = Concentración de IsoPA1

### 3.1.3 Precisión

La Tabla VII muestra los coeficientes de variación obtenidos de los cocientes de absorbancia a diferentes longitudes de onda para PA1 e IsoPA1.

**Tabla VII**

**Precisión de los cocientes de absorbancia de las respuestas a diferentes longitudes de onda para PA1 e IsoPA1**

Compuesto	Cociente de absorbancia	Promedio	C V %.
IsoPA1	280/322	0.3	15.6
	425/228	0.5	8.2
	425/280	0.3	6.1
	280/228	1.7	11.2
PA1	225/420	2.5	13.3
	225/270	3.6	10.5
	270/420	0.7	7.4
	225/415	2.6	9.3
	270/420	3.4	7.2

n = 5

### 3.1.4 Límites de Detección y Cuantificación del Método

En las Tablas VIII y IX se encuentran los resultados del cálculo de límites de detección y cuantificación del método para PA1 e IsoPA1 a diferentes longitudes de onda, obtenidos con espectros de orden cero.

**Tabla VIII**

**Límites de detección y cuantificación de PA1 a diferentes longitudes de onda en espectros de orden cero**

	228	270	425
*L.D.	1.38	0.86	0.61
*L.C.	3.50	2.41	2.79

\* $\mu\text{g/mL}$

**Tabla IX**

**Límites de detección y cuantificación de IsoPA1 a diferentes longitudes de onda en espectros de orden cero**

	228	280	322	425
*L.D.	1.15	0.47	2.67	0.69
*L.C.	3.62	2.10	10.27	2.30

\* $\mu\text{g/mL}$



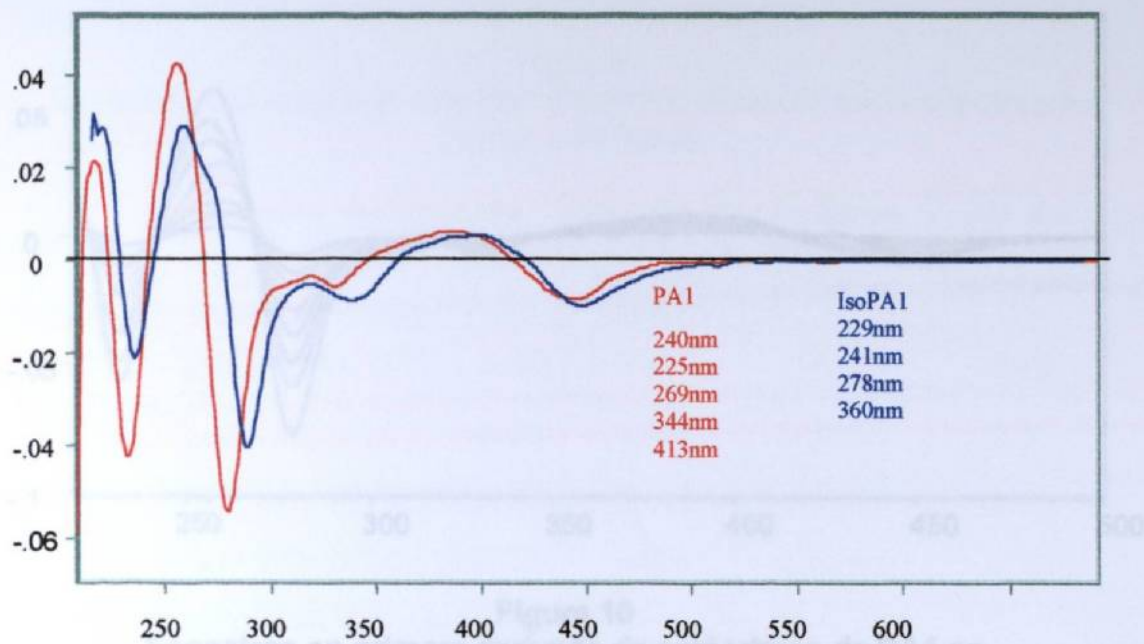
### **3.1.5 Obtención de Espectros Derivados**

En las Figuras 8 y 9 se muestran los espectros suavizados (15 puntos) y derivados en 1ª y 2ª derivada de estándares de PA1 e IsoPA1; en ellos se indican las longitudes de onda correspondientes a respuestas de cero.

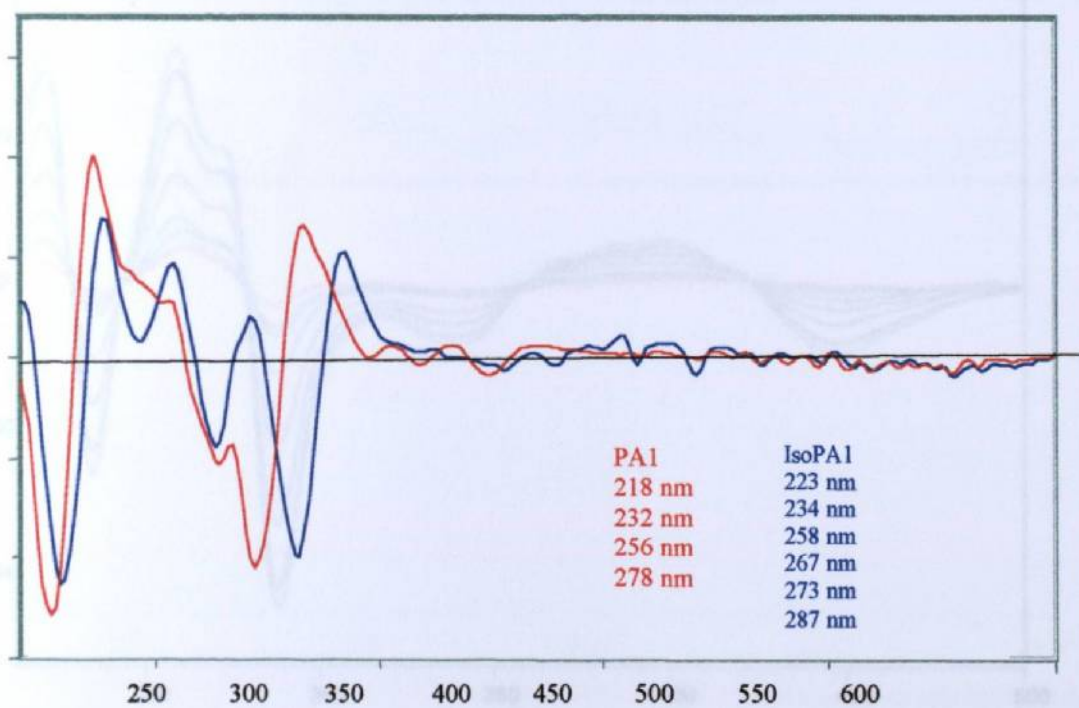
### **3.1.6 Cuantificación con Espectros Derivados (Técnica de Medida del Cruce al Cero)**

De las longitudes de onda de cruce al cero encontradas en los espectros derivados de primer orden para los compuestos, se seleccionaron las adecuadas para la cuantificación: para la PA1, la longitud de onda de 278nm, y para la IsoPA1 fueron 3 las longitudes de onda útiles: 225, 270 y 245nm. Las Figuras 10 y 11 corresponden a espectros sobrepuestos de estándares de la PA1 y la IsoPA1 respectivamente, obtenidos en primera derivada.

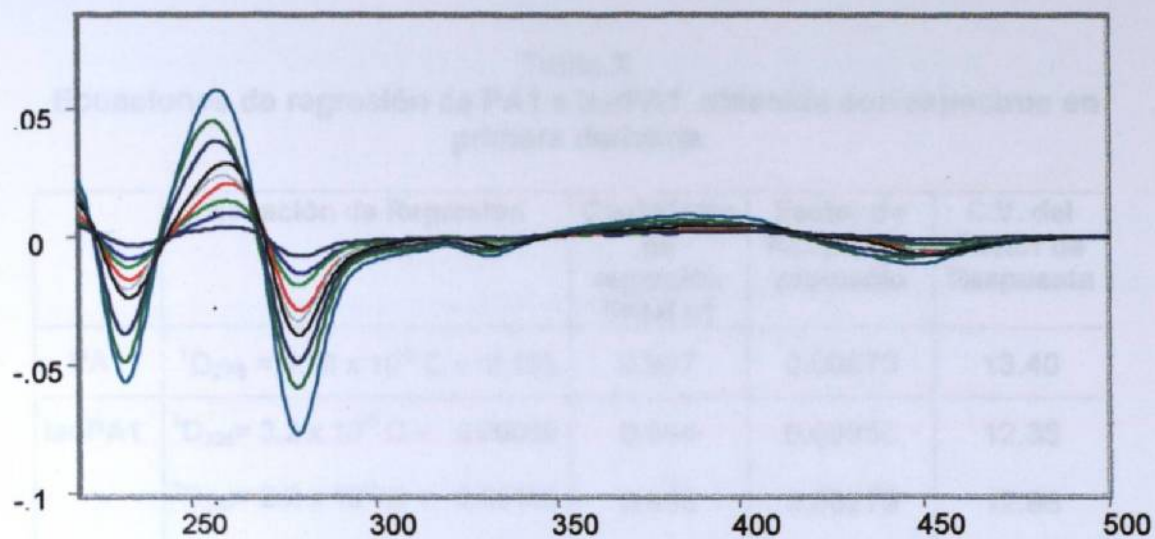
En la Tabla X se presentan las ecuaciones de regresión de las curvas de calibración de los espectros en primera derivada para ambos compuestos. Los espectros de los estándares de IsoPA1 y los datos de regresión para la cuantificación en 2ª derivada se muestran en la Figura 11 y en la Tabla XI.



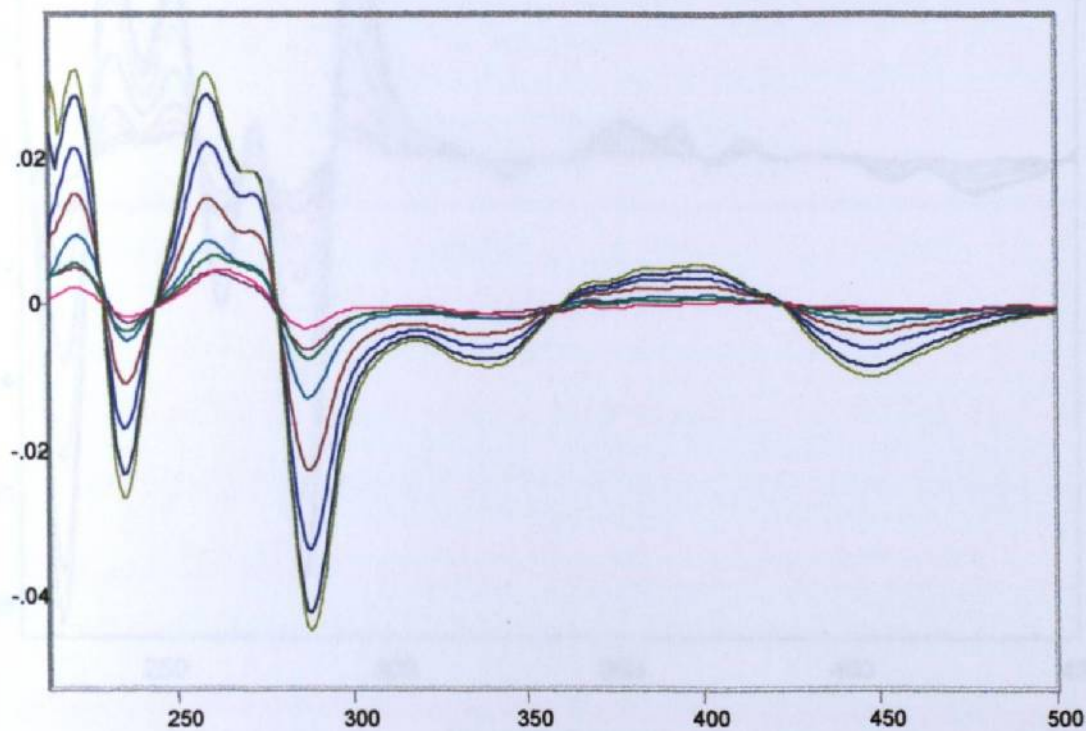
**Figura 8**  
Cruce al 0 de PA1 e IsoPA1 1a derivada



**Figura 9**  
Cruce al 0 de PA1 e IsoPA1 en 2a derivada



**Figura 10**  
**Espectros en primera derivada de estándares de PA1 en**  
**concentraciones de 1 a 12 µg/mL**

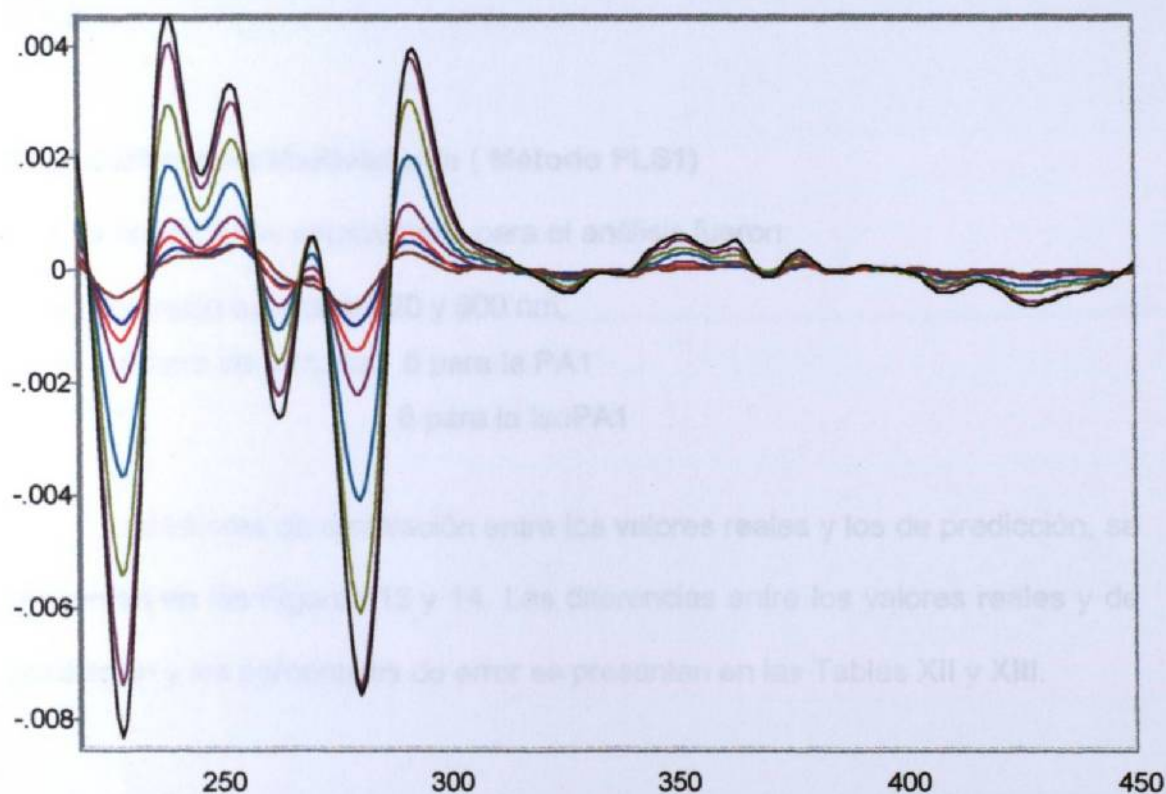


**Figura 11**  
**Espectros en primera derivada de estándares de IsoPA1 en**  
**concentraciones de 0.8 a 10 µg/mL**

**Tabla X**  
**Ecuaciones de regresión de PA1 e IsoPA1 obtenida con espectros en primera derivada**

	Ecuación de Regresión	Coefficiente de regresión lineal (r)	Factor de Respuesta promedio	C.V. del Factor de Respuesta
<b>PA1</b>	${}^1D_{278} = 5.78 \times 10^{-3} C + 0.193$	0.997	0.00670	13.40
<b>IsoPA1</b>	${}^1D_{225} = 3.2 \times 10^{-3} C + 0.00099$	0.994	0.00350	12.35
	${}^1D_{269} = 2.2 \times 10^{-3} C + 0.00105$	0.993	0.00279	12.86
	${}^1D_{241} = 1.7 \times 10^{-3} C + 0.00120$	0.987	-0.00103	26.50

C = Concentración de PA1 e IsoPA1



**Figura 12**  
**Espectros de absorción de IsoPA1 en 2ª derivada**  
**Concentraciones de 0.8 a 10  $\mu\text{g/mL}$**

**Tabla XI**  
**Ecuaciones de regresión para IsoPA1 obtenidas con espectros en 2ª**  
**derivada (cruce al cero)**

Ecuación de Regresión	Coef. de regresión (r)	Factor de Respuesta Promedio	C V (%) del factor de respuesta
${}^2D_{218} = 3.1 \times 10^{-4}C + 4.28 \times 10^{-5}$	0.992	$3.2 \times 10^{-4}$	22.1
${}^2D_{232} = 1.6 \times 10^{-5}C + 5.13 \times 10^{-5}$	0.994	$6.0 \times 10^{-4}$	13.4
${}^2D_{256} = 2.3 \times 10^{-4}C + 2.20 \times 10^{-5}$	0.993	$3.3 \times 10^{-4}$	18.5
${}^2D_{278} = 7.4 \times 10^{-3}C + 7.60 \times 10^{-5}$	0.996	$7.4 \times 10^{-4}$	9.9

n = 3

### 3.1.7 Calibración Multivariante ( Método PLS1)

Las condiciones establecidas para el análisis fueron:

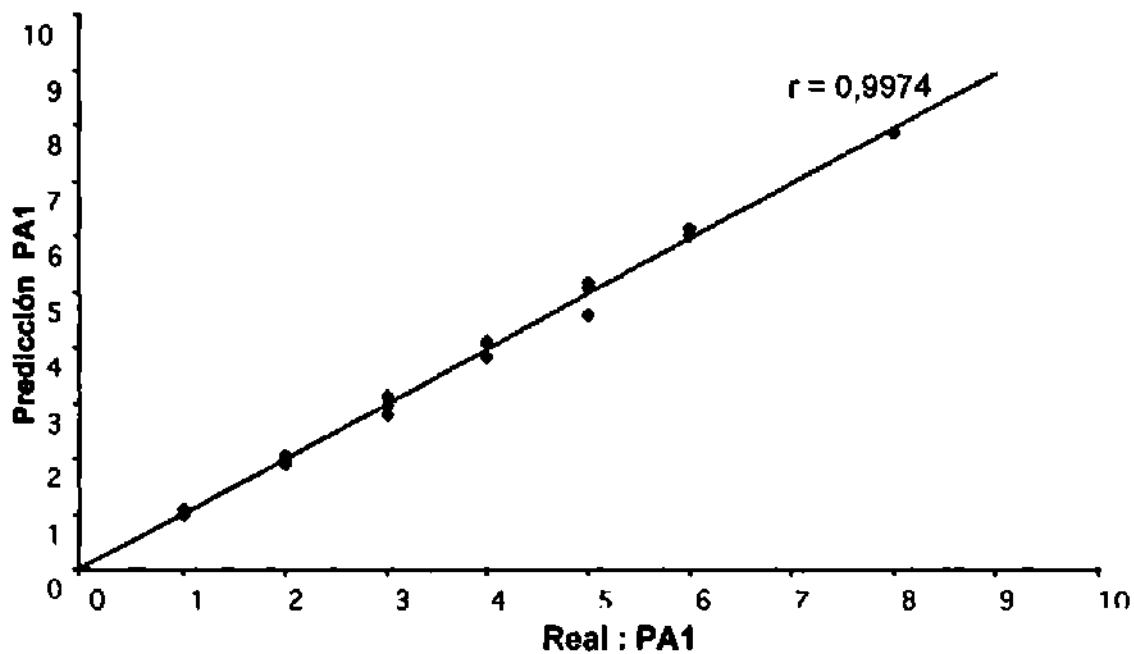
- intervalo espectral 220 y 600 nm,
- número de factores: 5 para la PA1  
6 para la IsoPA1

Los valores de correlación entre los valores reales y los de predicción, se presentan en las Figuras 13 y 14. Las diferencias entre los valores reales y de predicción y los porcentajes de error se presentan en las Tablas XII y XIII.

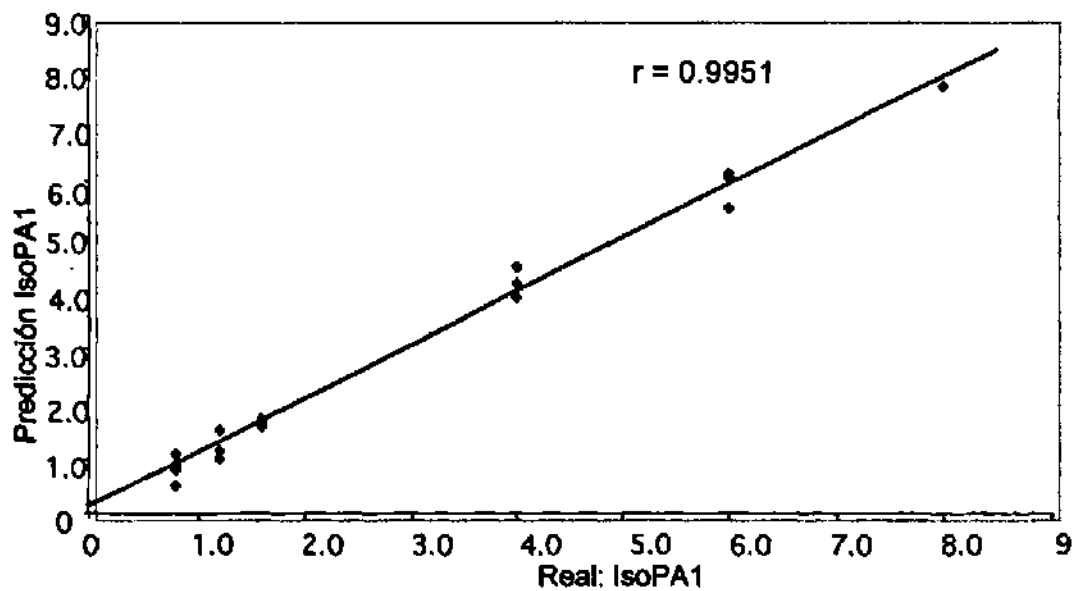
### **3.1.8 Técnica de Adición de Estándar. Cociente de las Respuestas a dos Longitudes de Onda en Espectros Derivados**

La Figura 15 corresponde al análisis de regresión de la curva de calibración de IsoPA1 en matriz de PA1. Los datos de "y" corresponden al cociente de las respuestas a 285/277nm, de los espectros en primera derivada.

En la Tabla XIV se muestran los valores de precisión obtenidos mediante esta técnica. Los límites de detección y cuantificación obtenidos de la curva de calibración se presentan en la Tabla XV.



**Figura 13**  
**Análisis Multicomponente para PA1**  
**PLS1 (5 Factores)**



**Figura 14**  
**Análisis Multicomponente para IsoPA1**  
**PLS 1(6 factores)**

**Tabla XII**  
**Resultados del análisis multicomponente para PA1**

<b>exp No.</b>	<b>actual</b>	<b>predicción</b>	<b>Diferencia</b>	<b>% error</b>
1	3.0	2.9	0.1	3.3
2	5.0	5.0	-	-
3	2.0	2.0	-	-
4	4.0	4.1	-	-
5	2.0	1.9	0.1	5.0
6	4.0	3.8	0.2	5.0
7	4.0	4.1	-	-
8	6.0	6.1	-	-
9	8.0	7.8	0.2	2.2
10	5.0	4.5	0.4	8.0
11	1.0	0.9	0.1	10.0
13	1.0	1.0	-	-
14	2.0	1.9	0.1	5.0
15	6.0	6.0	-	-
16	5.0	5.1	0.1	2.0
17	3.0	3.1	0.1	3.3
18	1.0	0.9	0.1	10.0
19	3.0	2.8	0.2	6.6
20	1.0	1.0	-	-

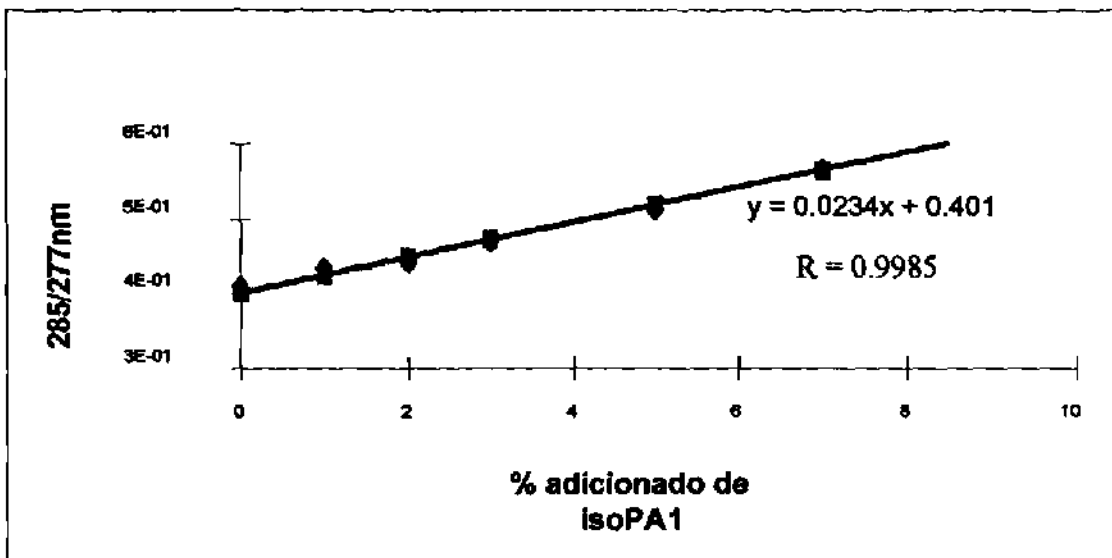
No. de factores calculado en base al mínimo PRESS = 5



**Tabla XIII**  
**Resultados del análisis multicomponente para IsoPA1**

exp No.	actual	Predicción	Diferencia	% error
1	1.6	1.70	0.11	6.0
2	0.8	1.08	0.28	35.0
3	1.2	0.99	-0.21	17.6
4	6.0	5.52	-0.48	-8.0
5	6.0	6.16	0.16	2.6
6	1.2	1.12	-0.01	6.6
7	1.6	1.57	-0.03	1.9
8	4.0	3.89	-0.11	2.7
9	1.2	1.51	0.31	25.8
10	6.0	6.08	0.08	1.3
11	1.6	1.61	0.01	0.6
13	8.0	7.71	-0.29	3.6
14	0.8	0.87	0.07	8.7
15	0.8	0.91	0.11	13.7
16	4.0	4.15	0.15	3.7
17	4.0	3.90	-0.10	2.5
18	4.0	4.45	0.45	11.2
19	0.8	0.79	-0.01	1.2
20	0.8	0.49	-0.31	38.7

No. de factores calculado en base al mínimo PRESS = 5



**Figura 15**  
**Curva de regresión ajustada del cociente de la respuesta 285/277**  
**en 1a derivada por adición de estándar**

**TABLA XIV**  
**Coefficientes de variación para el cociente de las respuestas en espectros**  
**en primera derivada**

$\mu\text{g/mL}$	respuesta 277nm	respuesta 285nm	cociente 285/277
1	-0.0104	-0.0045	0.4348
2	-0.0305	-0.0131	0.4278
3	-0.0411	-0.0177	0.4316
4	-0.0411	-0.0177	0.4316
6	-0.0602	-0.0259	0.4294
8	-0.0797	-0.0344	0.4320
10	-0.0991	-0.0429	0.4332
		Promedio	0.43146
		s	0.00253
		CV (%)	0.59

**Tabla XV**  
**Sensibilidad de la técnica de cuantificación para IsoPA1 en lotes de PA1**  
**en 1ª derivada**  
**(cociente de respuesta 285/277nm)**

<p><b>Limite de Detección = 0.35 <math>\mu\text{g/mL}</math></b> <b>Limite de Cuantificación = 1.06 <math>\mu\text{g/mL}</math></b></p>
---

- Límite de detección: 3.3 (s del blanco /pendiente)  
Límite de cuantificación : 10 (s del blanco/pendiente)

### **3.1.9 Cuantificación de IsoPA1 en Lotes de PA1**

La cuantificación de IsoPA1 en lotes de PA1 se realizó mediante 2 técnicas: Calibración multivariante con espectros derivados y adición estándar, mediante el cociente de las señales 285/277 en primera derivada. La Tabla XVI corresponde a los resultados de la determinación de IsoPA1 en 3 lotes de PA1. En la misma Tabla se presentan los resultados de cuantificación obtenidos por  $^1\text{HRMN}$ . En la Tabla XVII se presentan las diferencias entre los valores predictivos y reales, obtenidos mediante análisis multicomponente (PLS1) en un lote de PA1 adicionado con diferentes cantidades de IsoPA1.

**Tabla XVI**  
**Cuantificación de IsoPA1 en distintos lotes de PA1**  
**(Cociente de la respuesta 285/277 en 1ª. derivada)**

	<b>cociente</b>	<b>% IsoPA1</b>	
	<b>285/277</b>	<b>UV</b>	<b>RMN</b>
<b>lote 3</b>	<b>0.4315</b>	<b>1.02</b>	<b>0.77</b>
<b>lote 4</b>	<b>0.4790</b>	<b>3.01</b>	<b>1.68</b>
<b>lote 5</b>	<b>0.4518</b>	<b>1.87</b>	<b>1.31</b>
	<b>Fcalc &lt; Ftab</b>		
	<b>1.26 &lt; 7.70</b>		<b>p &lt; 0.05</b>

**Tabla XVII**  
**Comparación entre los valores reales y predictivos para la cuantificación**  
**por AMC(PLS1) en lotes de PA1 adicionados con IsoPA1 (1ª. derivada)**

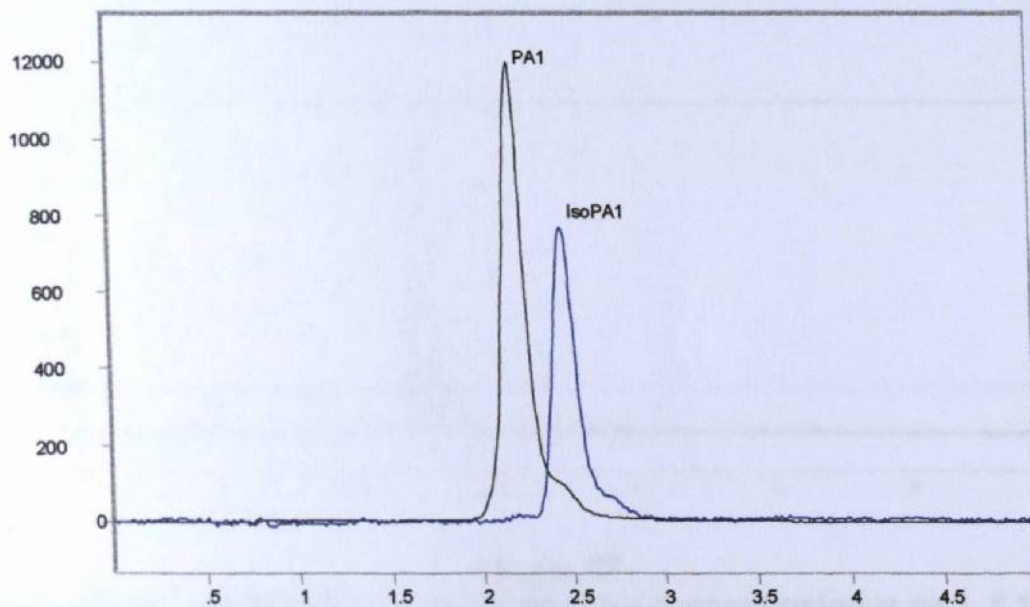
		<b>*Pred</b>	<b>*[real ]</b>	<b>*Pred</b>	<b>diferencia</b>
<b>0</b>	<b>20</b>	<b>8.47</b>	<b>0.00</b>	<b>0.175</b>	
<b>1</b>	<b>20</b>	<b>8.77</b>	<b>0.25</b>	<b>0.360</b>	<b>-0.11</b>
<b>2</b>	<b>20</b>	<b>7.39</b>	<b>0.50</b>	<b>0.460</b>	<b>0.04</b>
<b>3</b>	<b>20</b>	<b>7.88</b>	<b>0.75</b>	<b>0.620</b>	<b>0.13</b>
<b>4</b>	<b>20</b>	<b>9.13</b>	<b>1.00</b>	<b>0.770</b>	<b>0.23</b>
<b>5</b>	<b>20</b>	<b>9.01</b>	<b>1.25</b>	<b>1.240</b>	<b>0.01</b>
<b>7</b>	<b>20</b>	<b>9.08</b>	<b>1.75</b>	<b>1.800</b>	<b>-0.05</b>
<b>10</b>	<b>20</b>	<b>8.52</b>	<b>2.50</b>	<b>2.860</b>	<b>-0.36</b>

\*Conc

## 3.2 Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución

### 3.2.1 Separación de los compuestos.

La figura 16 corresponde a los cromatogramas de estándares de PA1 e IsoPA1 obtenidos bajo las condiciones trabajadas. Los  $t_R$  de PA1 e IsoPA1 obtenidos bajo estas condiciones fueron 2.26 y 2.54 minutos respectivamente.

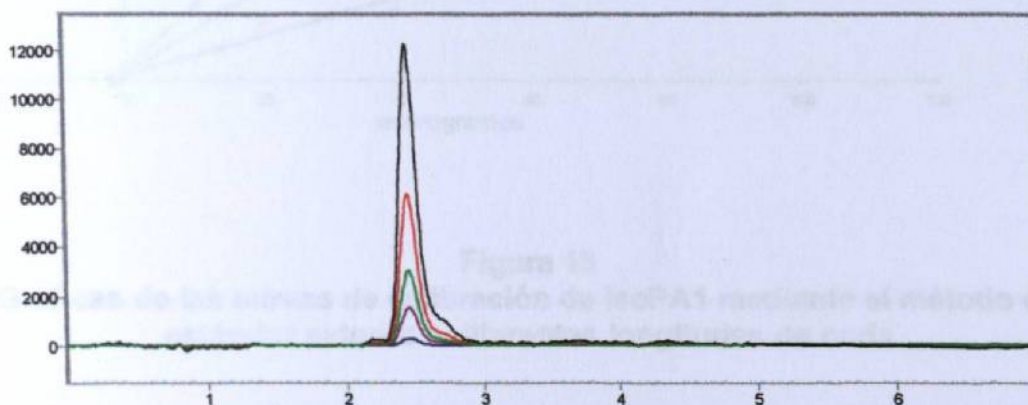


**Figura 16**  
Cromatogramas sobrepuestos de PA1 e ISO PA1 a 410 nm

### 3.2.2 Cuantificación de IsoPA1

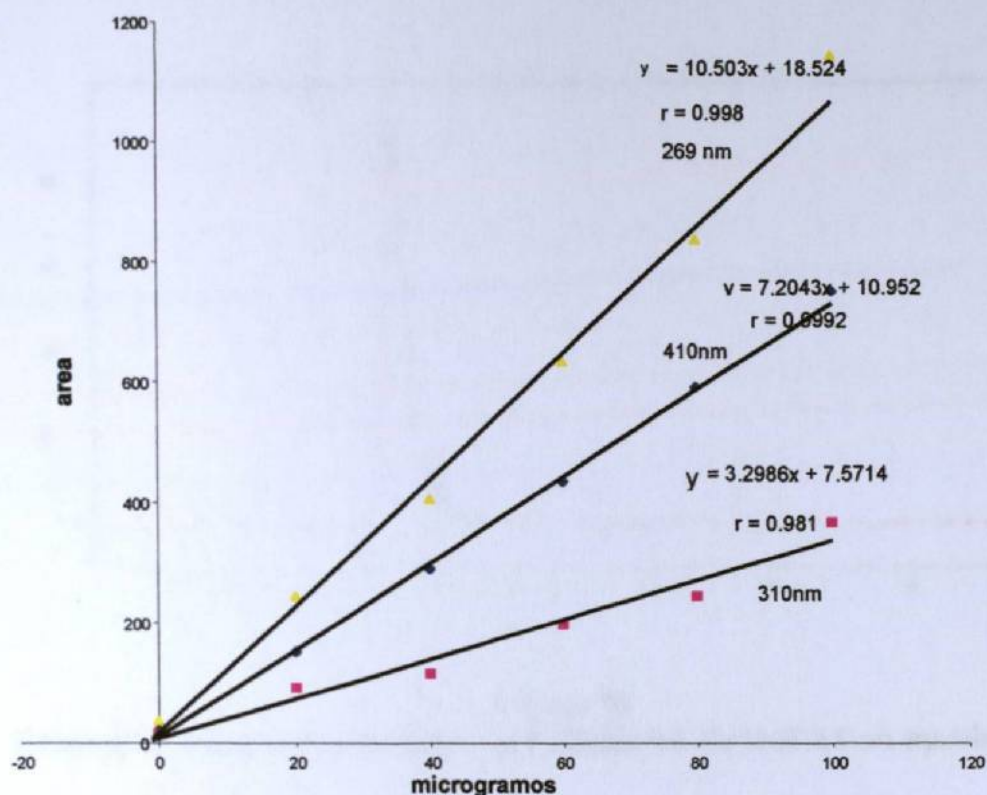
#### 3.2.2.1 Método de Estándar Externo

En la figura 17 se muestran los cromatogramas sobrepuestos de estándares de IsoPA1 empleados para la cuantificación mediante el método de estándar externo. Las Curvas de calibración a longitudes de onda de 410, 269 y 310nm se presentan en la figura 18



**Figura 17**  
**Cromatogramas de estándares de IsoPA1 a concentraciones de 1, 5, 10, 20 y 40 µg/mL**

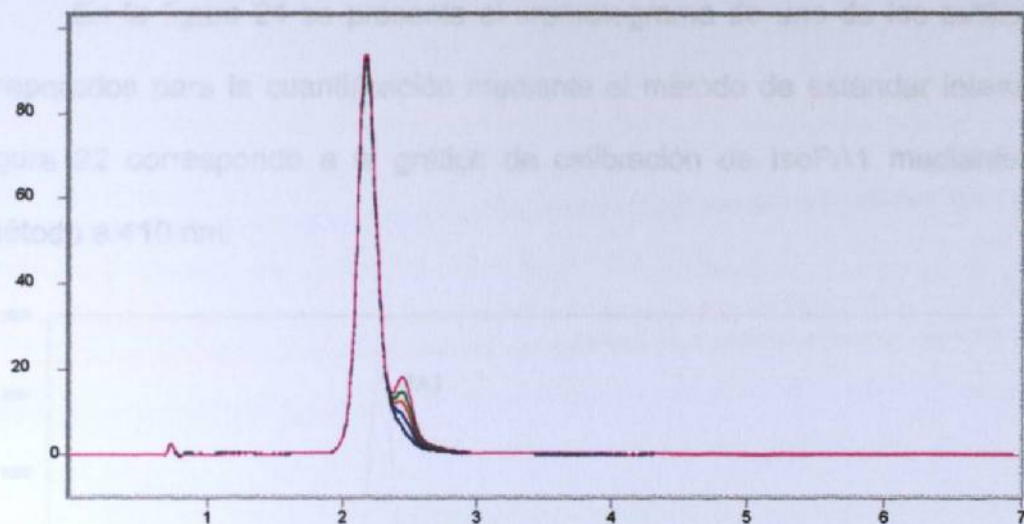
En la figura 18 se muestran los cromatogramas sobrepuestos empleados para construir la curva de calibración de IsoPA1 por el método de adición de estándar. La curva de calibración correspondiente se presenta en la figura 19.



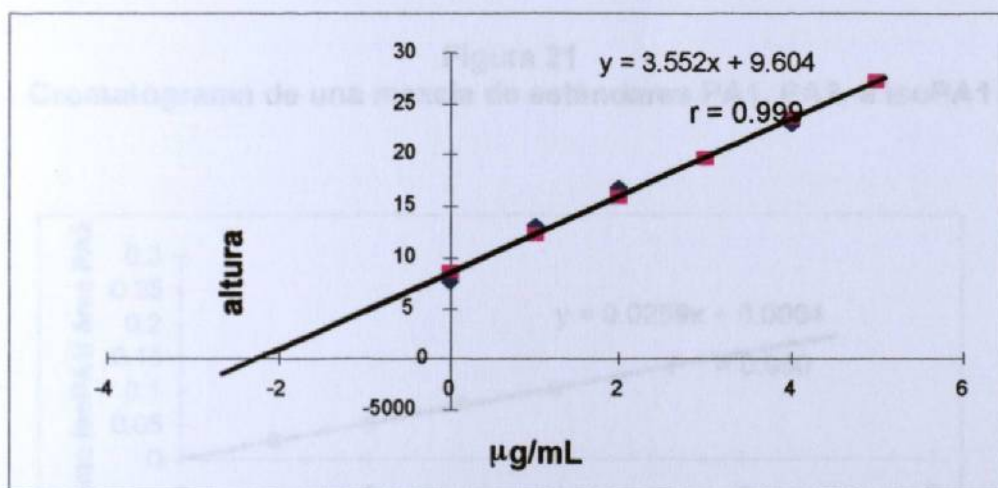
**Figura 18**  
**Graficas de las curvas de calibración de IsoPA1 mediante el método de estándar externo a diferentes longitudes de onda**

### 3.2.2.2 Método de Adición de Estándar

En la figura 19 se presentan los cromatogramas sobrepuestos empleados para construir la curva de calibración de IsoPA1 por el método de adición de estándar. La curva de calibración correspondiente se presenta en la figura 20.



**Figura 19**  
Cromatogramas sobrepuestos de estándares de IsoPA1 en matriz de PA1

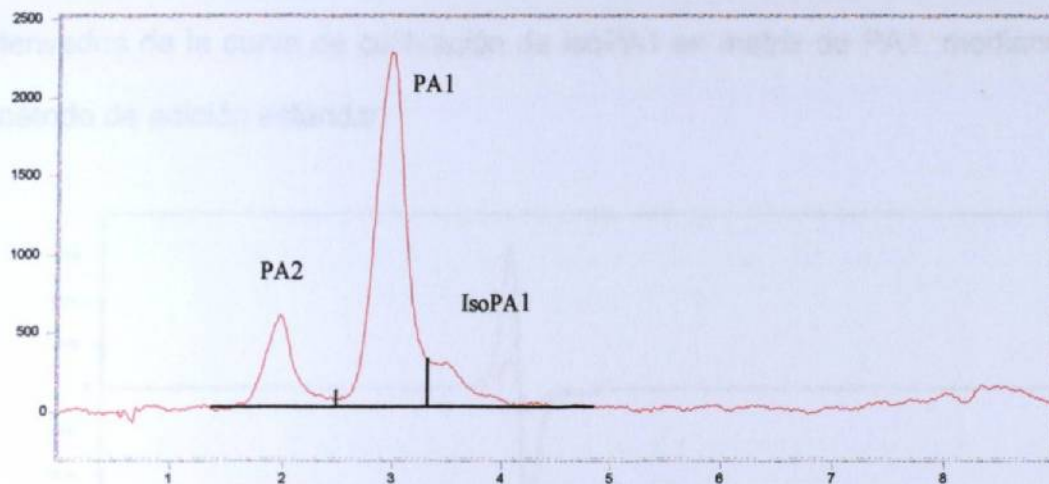


**Figura 20**  
Curva de calibración de IsoPA1 en matriz de PA1.  
Método de adición de estándar.

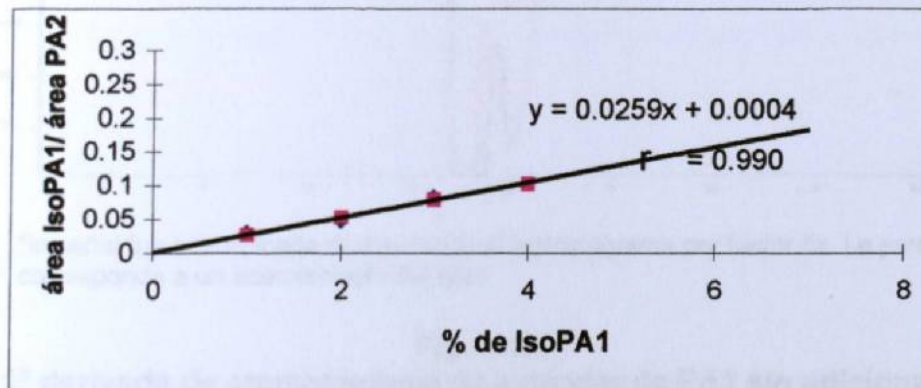


### 3.2.2.3 Método de Estándar Interno

En la figura 21 se presenta el cromatograma de uno de los estándares preparados para la cuantificación mediante el método de estándar interno. La figura 22 corresponde a la gráfica de calibración de IsoPA1 mediante este método a 410 nm.



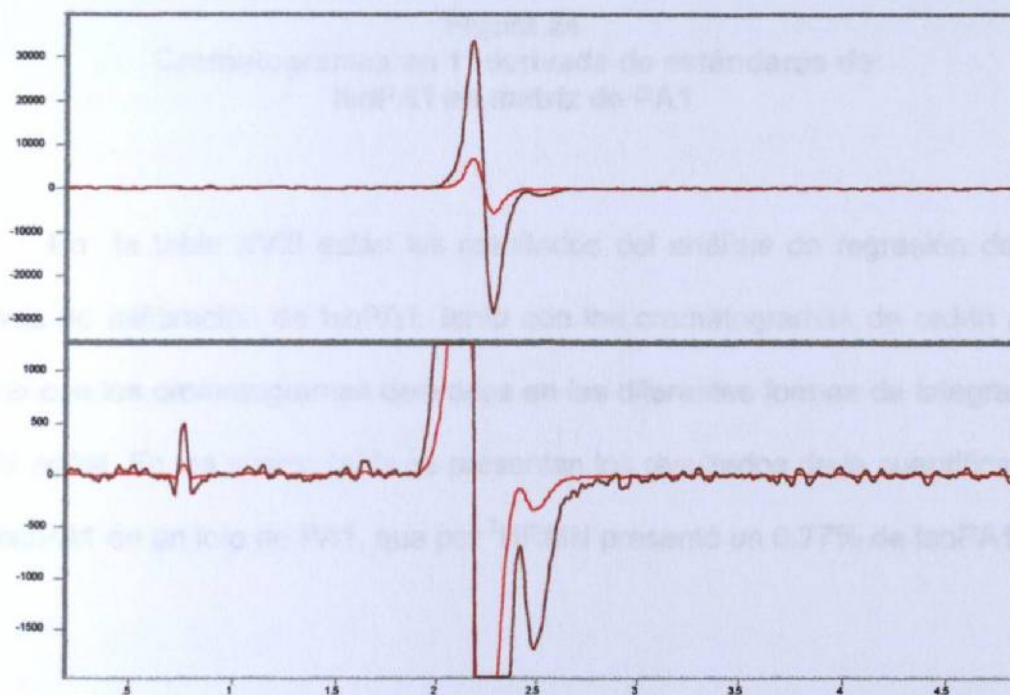
**Figura 21**  
Cromatograma de una mezcla de estándares PA1, PA2, e IsoPA1



**Figura 22**  
Curva de Calibración empleada para la cuantificación de IsoPA1 mediante la técnica de estándar interno (el estándar interno empleado es la PA2)

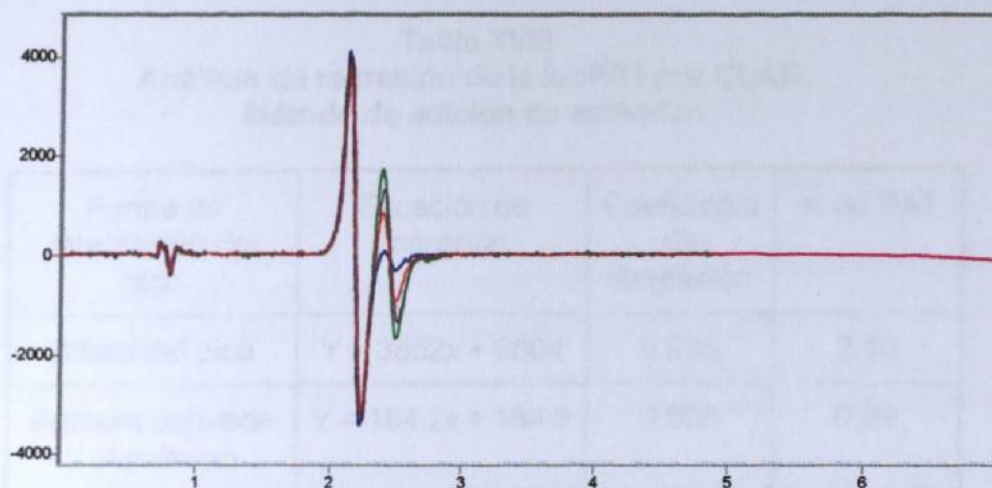
### 3.2.2.4 Cuantificación de IsoPA1 con Cromatogramas Derivados

En la figura 23 se muestra el cromatograma en 1ª derivada de un lote de PA1 sin adicionar, en el cual se intensificó la señal en un factor de 5 para detectar la presencia de IsoPA1. La figura 24 corresponde a cromatogramas derivados de la curva de calibración de IsoPA1 en matriz de PA1, mediante el método de adición estándar.



\*la señal fue intensificada multiplicando el cromatograma por factor 5x. La parte inferior corresponde a un acercamiento del área

**Figura 23**  
**1ª derivada de cromatograma de estándar de PA1 sin adicionar\***



**Figura 24**  
**Cromatogramas en 1ª derivada de estándares de IsoPA1 en matriz de PA1**

En la tabla XVIII están los resultados del análisis de regresión de las curvas de calibración de IsoPA1, tanto con los cromatogramas de orden cero como con los cromatogramas derivados en las diferentes formas de integración de la señal. En la misma tabla se presentan los resultados de la cuantificación de IsoPA1 en un lote de PA1, que por  $^1\text{HRMN}$  presentó un 0.77% de IsoPA1.

#### 3.2.2.4.1 Sensibilidad del Método

Los datos de los límites de detección y cuantificación del método, obtenidos de las curvas de calibración, son presentados en la tabla XIX.

**Tabla XVIII**  
**Análisis de regresión de la IsoPA1 por CLAR.**  
**Método de adición de estándar.**

Forma de integración del pico	Ecuación de regresión	Coefficiente de Regresión	% de PA1
Altura del pico	$Y = 3552x + 9604$	0.998	2.10
Primera derivada 0 al máximo	$Y = 184.2x + 164.3$	0.998	0.89
Primera derivada 0 al mínimo	$Y = 160x + 316.4$	0.998	1.27
Primera derivada máximo - mínimo	$Y = 345x + 152$	0.996	0.44

El porcentaje de IsoPA1 reportado por <sup>1</sup>HRMN para el lote fue de 0.7%

**Tabla XIX**  
**Límites de detección y cuantificación del método de adición de estándar por CLAR, cromatogramas en 1a derivada**

<b>Límite de detección</b>	<b>=</b>	<b>0.6 ng</b>
<b>Límite de cuantificación</b>	<b>=</b>	<b>2 ng (C.V. 18%)</b>
<b>n</b>	<b>=</b>	<b>3</b>
<b>s</b>	<b>=</b>	<b><math>5.8 e^{-4}</math></b>
<b>pendiente</b>	<b>=</b>	<b><math>3e^{-4}</math></b>

- Límite de detección: 3.3 (s del intercepto/pendiente)
- Límite de cuantificación: 10 (s del intercepto/pendiente)

Swartz M. LC-GC, Vol. 15 No.6 1997

### 3.2.2.4.2 Precisión y Exactitud del Método

La tabla XX corresponde a los datos de precisión del método de cuantificación de IsoPA1, obtenidos para dos lotes de PA1 de diferente concentración, por el método de adición estándar con cromatogramas en 1a derivada. Los datos de exactitud del método se presentan en la tabla XXI, en donde se comparan los resultados de cuantificación de IsoPA1 por HPLC con los obtenidos por <sup>1</sup>HRMN, para un lote de PA1. La tabla incluye los resultados obtenidos por extrapolación al eje x en la curva de regresión y utilizando en factor de respuesta.

**Tabla XX**  
**Determinación de la precisión del método de**  
**Cuantificación por HPLC (1ª. derivada)**

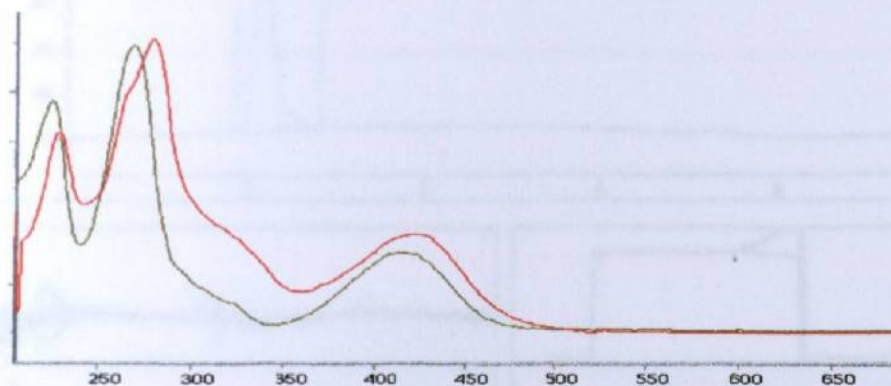
lote 1 (0.78% RMN)		lote 86 (6.6% RMN)	
m1	0.60	m1	7.0
m2	0.86	m2	7.2
m3	1.02	m3	7.7
m4	0.94	m4	7.1
promedio	0.86	promedio	7.3
s	0.16	s	0.3
CV	18.45	CV %	4.6

**Tabla XXI**  
**Determinación del porcentaje de IsoPA1 en lotes de PA1**  
**(cromatogramas en 1a derivada)**

	lote 5	lote 6	lote 86
intercepto en X	3.3	5.0	8.0
Factor de respuesta	1.4	1.3	7.3
Concentración RMN (%)	1.3	1.4	6.6

### 3.2.3 Análisis de Pureza de PA1 por CLAR - Arreglo de Diodos

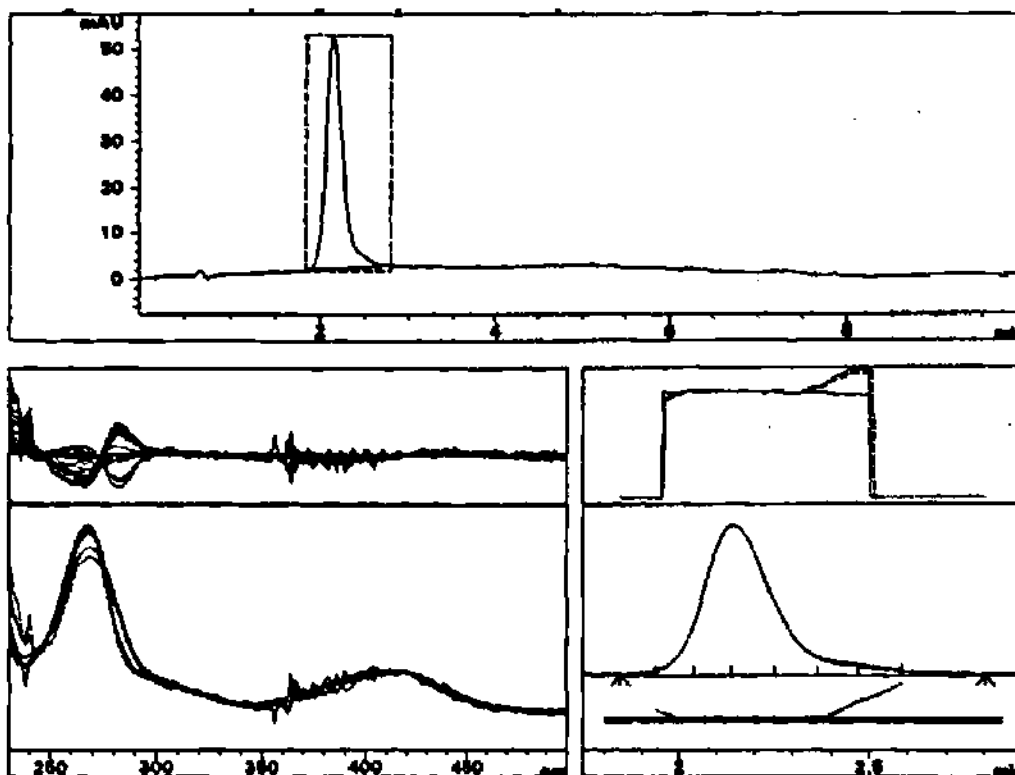
En la figura 25 se muestran los espectros de ambos compuestos, donde se observan las diferencias en los máximos de absorbancia a 269 y 410 nm, además de una señal a 310 nm que predomina en la isoperoxisomicina A1.



**Figura 25**  
**Espectros sobrepuestos de PA1 e IsoPA1 obtenidos de los máximos de las señales cromatográficas de estándares**

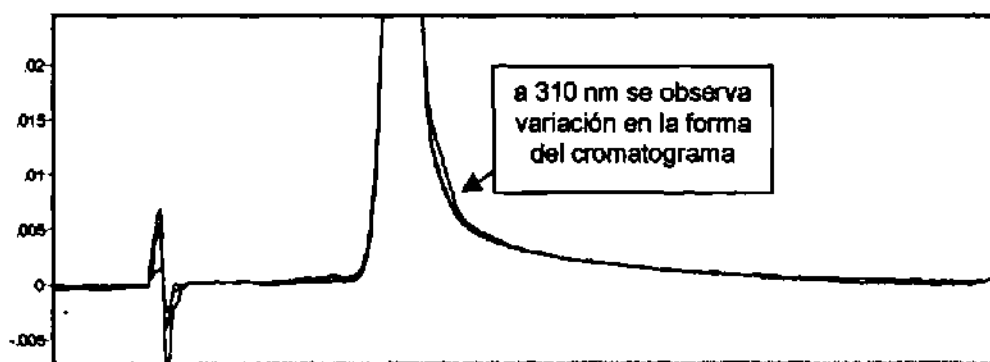
Las gráficas de isoabsorbancia realizada a los lotes de PA1, en el intervalo de 220 a 600 nm de longitud de onda, mostró la presencia de una sola señal cromatográfica, no revelando la presencia de contaminantes.

La figura 26 corresponde a los datos del análisis de pureza de un lote de PA1. La parte inferior izquierda corresponde a espectros normalizados sobrepuestos en 7 puntos del pico cromatográfico, en el centro a la izquierda, se muestran las diferencias espectrales, en la parte inferior derecha se presentan los cromatogramas sobrepuestos a 3 longitudes de onda diferentes; en el centro a la derecha, las relaciones de absorbancia a las 4 longitudes de onda del análisis: 269, 280, 310 y 410 nm.



**Figura 26**  
**Análisis de pureza de un lote de PA1**

Se logró ver la presencia de IsoPA1 como contaminante en el estándar sin adicionar, tanto en la gráfica de espectros sobrepuestos como en la gráfica de relación de absorbancias a las longitudes de onda 269, 280,310 y 410 nm (ver figura 26). Las mayores diferencias espectrales se observaron en el intervalo de 260 a 310 nm. En la figura 27 se presentan los cromatogramas normalizados y sobrepuestos obtenidos a longitudes de onda de 269, 310 y 410 nm, donde se muestra la variación en la forma del cromatograma a 310nm. En algunas de las muestras se observó una variación en el  $t_R$  para un mismo cromatograma obtenido a las distintas longitudes de onda



**Figura 27**  
**Cromatogramas de PA1 normalizados y sobrepuestos obtenidos a longitudes de onda de 269, 310 y 410 nm**



### **3.3.2.1 Robustez del método de análisis de pureza**

El efecto de los factores externos en el análisis de pureza se presentan en la tabla XXII, encontrándose que solamente la cantidad de masa inyectada es la que afecta significativamente el análisis. Los experimentos se repitieron 5 veces con la misma muestra obteniéndose coeficientes de variación menores de 5.4%.

En la tabla XXIII se presenta el diseño experimental de Plackett y Burman empleado para la evaluación de factores instrumentales, donde se incluyen los resultados del porcentaje de pureza espectral del pico cromatográfico, obtenido en cada experimento. El análisis de los datos, mostró que el intervalo de longitud de onda incluidas en el espectro, el número de espectros por pico, el número de puntos empleado para el suavizado y la ubicación de la longitud de onda de referencia, son los que afectan significativamente el análisis de pureza (Tabla XXIV).

### **3.2.3.2 Sensibilidad del método de análisis de pureza espectral.**

La adición de cantidades crecientes de IsoPA1 a un lote de PA1, no mostró una correlación directa entre el % de pureza espectral y la cantidad de IsoPA1 adicionada (tabla XXV)

**Tabla XXII**  
**Determinación del efecto de factores externos en el análisis de**  
**pureza de PA1**

Factor	Condición	Nivel de pureza espectral promedio	C.V.
Masa inyectada	500 microgramos	97.9	2.7
	100 microgramos	95.5	4.6
pH de la fase acuosa	3.2 (3.2% de ácido acético)	97.2	3.5
	5.8 (0% ac.acético)	97.6	5.4
Composición de la Fase Móvil	65% metanol	97.3	3.0
	60% metanol	97.6	4.6

N = 5

**Tabla XXIII**  
**Diseño experimental para la optimización de parámetros de análisis de**  
**pureza espectral por CLAR con detector de arreglo de diodos**

Variable / Essay	1	2	3	4	5	6	7	8
Longitud de onda (Ll)	L	L	L	L	l	l	l	l
Espectros por pico (E/e)	E	E	e	e	E	E	e	e
Espectros de Referencia (R/r)	R	r	R	r	R	r	R	r
Suavizado del espectro (S/s)	S	S	s	s	s	s	S	S
Espectro referencia (N/n)	N	n	N	n	n	N	n	N
No. de espectros para cálculo de umbral (U/u)	U	u	u	U	U	u	u	U
Tiempo de muestreo Espectral (C/c)	C	c	c	C	c	C	C	c
Resultados (% de nivel de pureza)	97.8	99.9	97.4	99.9	84.45	94.9	96.8	98.7

**Tabla XXIV**  
**Cálculo de las diferencias de las respuestas para cada parámetro**  
**evaluado en el análisis de pureza espectral**

	Mayor	menor	diferencia
Longitud de onda	98.42	93.71	4.71
Espectros por pico	94.21	97.92	-3.71
Espectros de Referencia	94.06	98.07	-4.01
Suavizado del espectro	98.25	93.88	4.36
Espectro referencia para cálculo de nivel de pureza	97.15	94.98	2.16
cálculo de umbral	94.88	97.25	-2.36
Tiempo de muestreo Espectral	97.02	95.11	1.91

Promedio de precisión = 96.92

s = 1.75

Si  $|V|$  es mayor que  $s \cdot 2^{1/2}$ , la diferencia es significativa<sup>62</sup>

**Tabla XXV**  
**Correlación entre la concentración de IsoPA1**  
**y el % de pureza espectroscópica del pico.**

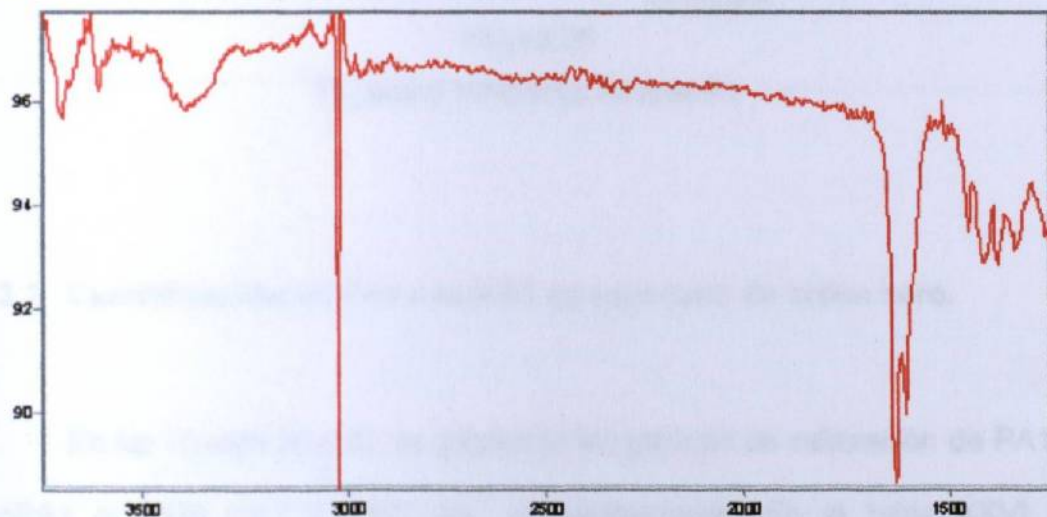
% IsoPA1 adicionado	% Pureza
0	97.0
2	96.4
4	88.4
6	88.0
8	88.6
10	85.0

*Umbral = 10 mAU*

### 3.3 Espectroscopia Infrarrojo

#### 3.3.1 Optimización de las condiciones de análisis

De los solventes probados, el cloroformo fue el que ofreció más ventajas en cuanto a la solubilidad de los compuestos e interferencias. Las otras condiciones de análisis establecidas fueron: espesor de celda de 1 mm, ventanas de  $\text{CaF}_2$ , el intervalo del número de onda para la obtención de espectros fue  $4000$  a  $1100 \text{ cm}^{-1}$ , con una frecuencia de muestreo espectral de  $2 \text{ cm}^{-1}$ , número de barridos: 15, intervalo de concentraciones de  $100$  a  $1000 \mu\text{g/mL}$ . Las figuras 28 y 29 corresponden a espectros de PA1 e IsoPA1 obtenidos mediante la sustracción de solvente.



Transmittance / Wavenumber (cm-1)

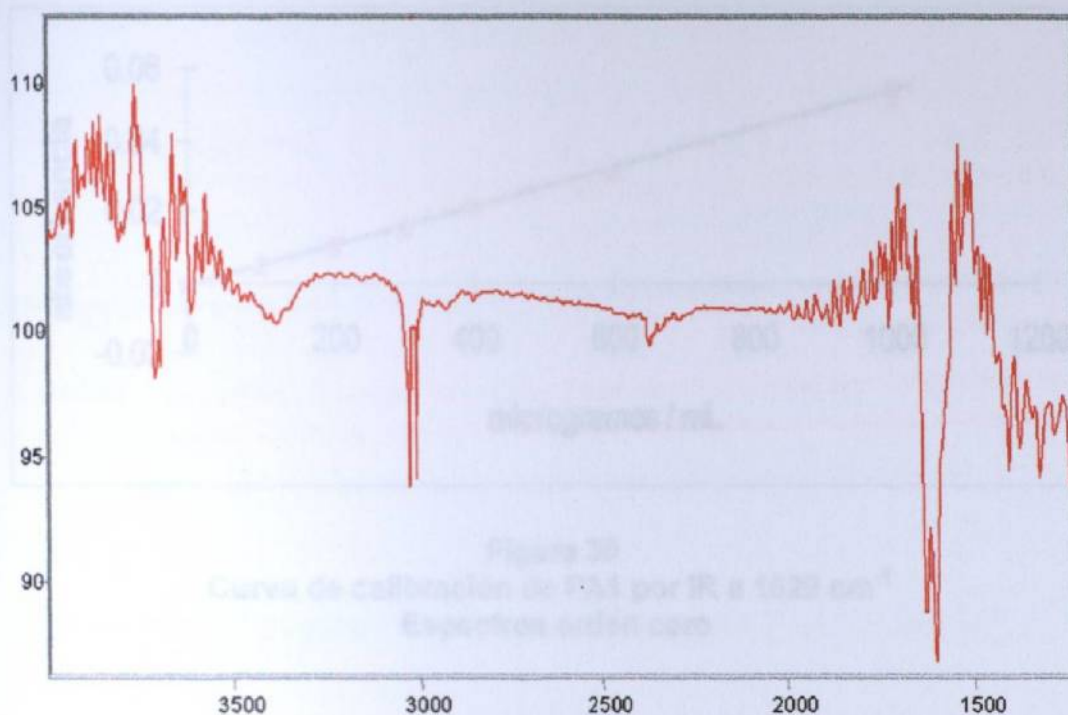
Overlay Y-Zoom CURSOR

Solvente: cloroformo  
Celda con ventanas de  $\text{CaF}_2$

Nota: el espectro corresponde al resultado de la sustracción del espectro del cloroformo

**Figura 28**

**Espectro Infrarrojo de PA1**



Transmittance / Wavenumber (cm-1)

Solvente: cloroformo  
Celda con ventanas de CaF<sub>2</sub>

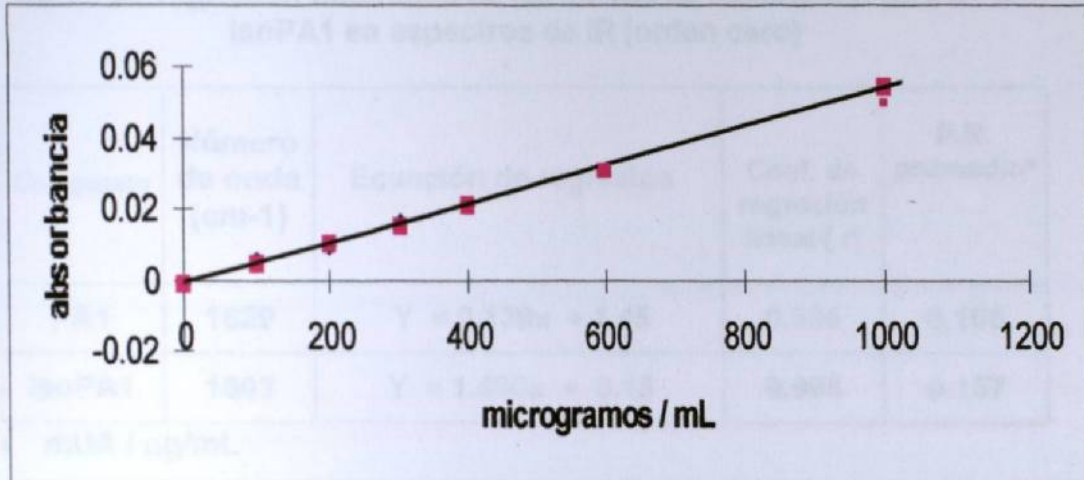
Nota: el espectro corresponde al resultado de la sustracción del espectro del cloroformo

**Figura 29**

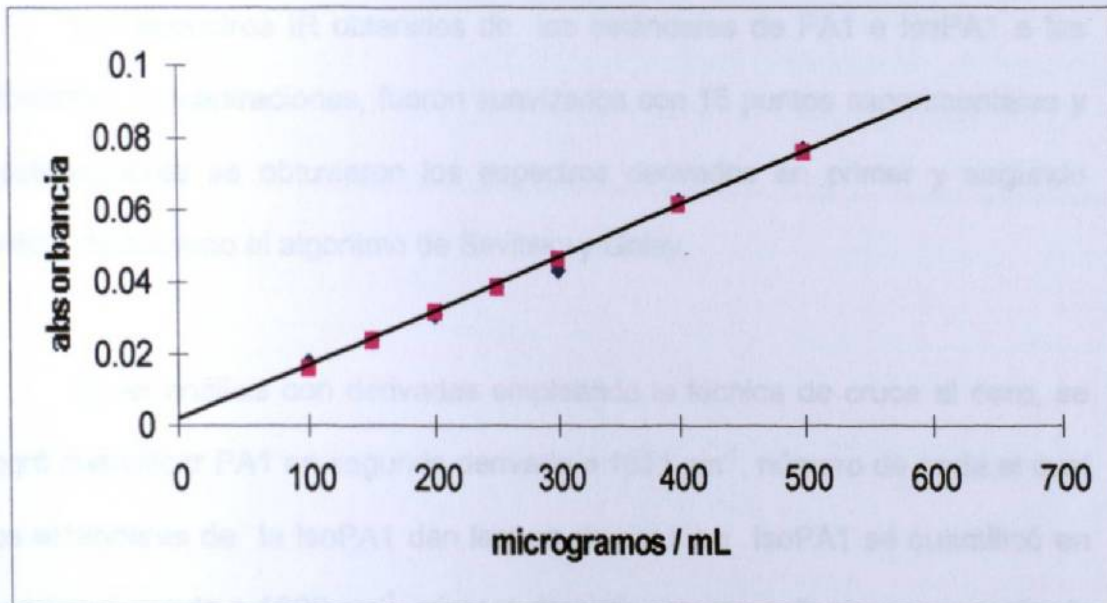
### **Espectro infrarrojo de IsoPA1**

#### **3.3.2 Cuantificación de PA1 e IsoPA1 en espectros de orden cero.**

En las figuras 30 y 31 se presentan las gráficas de calibración de PA1 e IsoPA1 a 1629 cm<sup>-1</sup> y 1603 cm<sup>-1</sup> respectivamente. En la tabla XXVI se presentan los datos de regresión obtenidos de las curvas de calibración.



**Figura 30**  
**Curva de calibración de PA1 por IR a 1629 cm<sup>-1</sup>**  
**Espectros orden cero**



**Figura 31**  
**Curva de calibración de IsoPA1 por IR**  
**a 1603 cm<sup>-1</sup> en espectros orden cero**

**Tabla XXVI**  
**Datos de regresión obtenidos de las curvas de calibración de PA1 e IsoPA1 en espectros de IR (orden cero)**

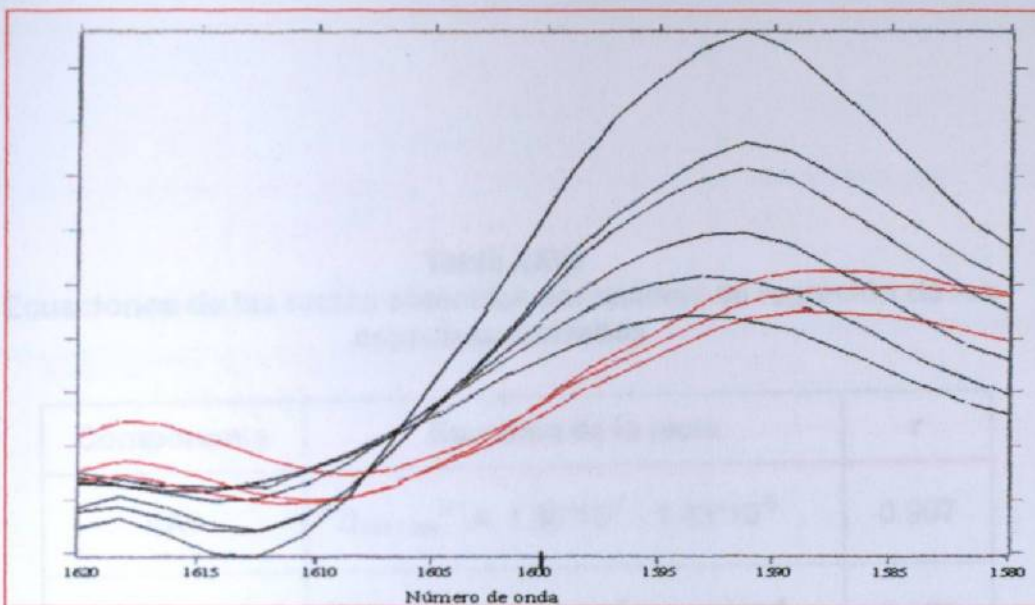
Compuesto	Número de onda (cm-1)	Ecuación de regresión	Coef. de regresión lineal ( r )	F.R. promedio*
PA1	1629	$Y = 0.139x + 1.45$	0.996	0.105
IsoPA1	1603	$Y = 1.490x + 0.15$	0.998	0.157

• mUA /  $\mu$ g/mL

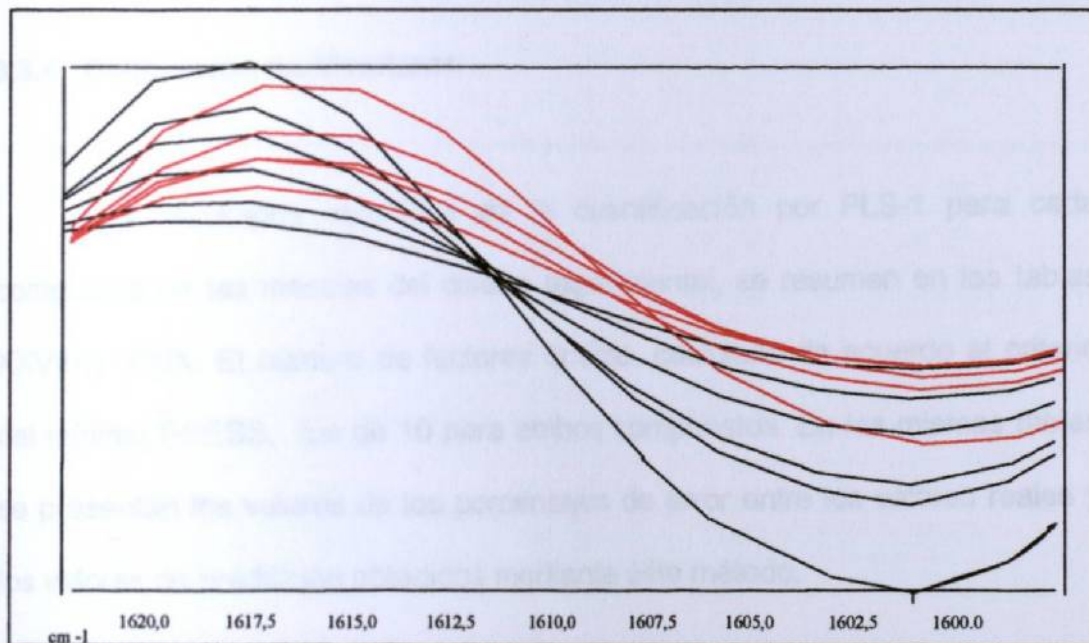
### 3.3.3 Obtención de espectros derivados y Calibración con espectros derivados (Técnica de cruce al cero)

Los espectros IR obtenidos de los estándares de PA1 e IsoPA1 a las diferentes concentraciones, fueron suavizados con 15 puntos experimentales y posteriormente se obtuvieron los espectros derivados en primer y segundo orden, de acuerdo al algoritmo de Savitsky y Golay.

En el análisis con derivadas empleando la técnica de cruce al cero, se logró cuantificar PA1 en segunda derivada a  $1611 \text{ cm}^{-1}$ , número de onda al cual los estándares de la IsoPA1 dan lectura de cero. La IsoPA1 se cuantificó en primera derivada a  $1600 \text{ cm}^{-1}$ , número de onda correspondiente a respuesta de cero de los estándares de PA1, (figuras 32 y 33 ). Los resultados del análisis de regresión realizado a las curvas correspondientes se muestran en la tabla XXVII.



**Figura 32**  
**Cuantificación de IsoPA1 en primera derivada a  $1600\text{cm}^{-1}$**   
**(correspondiente al cero de PA1)**



**Figura 33**  
**Cuantificación de PA1 en primera derivada a  $1611\text{cm}^{-1}$**   
**(correspondiente al cero de IsoPA1)**



**Tabla XXVII**  
**Ecuaciones de las rectas obtenidas por análisis de regresión de los**  
**espectros derivados.**

Componente	Ecuación de la recta	r
PA1	${}^2D_{1611\text{ cm}^{-1}} = 1.38 \cdot 10^{-7} - 1.43 \cdot 10^{-5}$	0.997
IsoPA1	${}^1D_{1600\text{ cm}^{-1}} = 2.16 \cdot 10^{-6} + 1.69 \cdot 10^{-4}$	0.996

### 3.3.4 Calibración multivariante

Los resultados obtenidos de la cuantificación por PLS-1 para cada compuesto en las mezclas del diseño experimental, se resumen en las tablas XXVIII y XXIX. El número de factores óptimo, calculado de acuerdo al criterio del mínimo PRESS, fue de 10 para ambos compuestos. En las mismas tablas se presentan los valores de los porcentajes de error entre los valores reales y los valores de predicción obtenidos mediante este método.

**Tabla XXVIII**  
**Comparación de los resultados reales y predictivos obtenidos por PLS1**  
**para IsoPA1 en mezclas experimentales**

Mezcla	Concentración IsoPA1 (c)	Predicción (p)	Diferencia (d) (d = c - p)	% error (%d = d*100/c)
1	100	97.40	2.60	2.60
2	150	153.70	-3.70	-2.47
3	200	202.10	-2.10	-1.05
4	150	147.73	2.27	1.51
5	250	249.76	0.24	0.10
6	300	299.36	0.64	0.21
7	350	349.22	0.78	0.22
8	300	300.56	-0.56	-0.19
9	250	246.18	3.82	1.53
10	100	101.30	-1.30	-1.30
11	100	98.94	1.06	1.06
12	150	152.65	-2.65	-1.77
13	200	193.48	6.52	3.26
14	100	104.29	-4.29	-4.29
15	100	94.38	5.62	5.62
16	150	155.79	-5.79	-3.86
17	250	255.46	-5.46	-2.18
18	300	300.10	-0.10	-0.03
19	250	248.49	1.51	0.60
20	150	149.20	0.80	0.53

**Tabla XXIX**  
**Comparación de los resultados reales y predictivos obtenidos por PLS1**  
**para IsoPA1 en mezclas experimentales**

Mezcla	Concentración PA1 ( $c''$ )	Predicción ( $p''$ )	Diferencia ( $d''$ ) ( $d'' = c'' - p''$ )	% Error ( $\%d'' = d'' \cdot 100 / c''$ )
1	100	99.60	0.40	0.40
2	200	202.50	-2.50	-1.25
3	250	250.00	0.00	0.00
4	300	298.91	1.09	0.36
5	150	148.66	1.34	0.89
6	150	148.44	1.56	1.04
7	100	101.86	-1.86	-1.86
8	100	100.28	-0.28	-0.28
9	250	249.45	0.55	0.22
10	350	349.97	0.03	0.01
11	250	249.76	0.24	0.10
12	250	250.35	-0.35	-0.14
13	100	101.11	-1.11	-1.11
14	150	149.11	0.89	0.59
15	300	301.27	-1.27	-0.42
16	150	148.52	1.48	0.99
17	200	201.95	-1.95	-0.97
18	200	198.08	1.92	0.96
19	100	100.50	-0.50	-0.50
20	100	99.47	0.53	0.53

### 3.4 Medida del Poder Óptico Rotatorio

#### 3.4.1 Precisión del Método

En la Tabla XXX se muestran los resultados del análisis de precisión del método, obtenidos para un lote de PA1 sin adicionar y adicionado con IsoPA1 en concentraciones de 5 y 10%. Los coeficientes de variación obtenidos fueron de 2.44, 2.88 y 11.70% para las soluciones de PA1 adicionadas con 0, 5 y 10% de isoPA1 respectivamente.

**Tabla XXX**  
**Análisis de precisión del método polarimétrico**

% isoPA1	$[\alpha]_D^{20}$	Varianza	s	C.V.
0%	82	4	2	2.44
5%	79	5.2	2.28	2.88
10%	70	68	8.25	10.24
n = 5 para cada nivel de concentración				

### 3.4.2 Sensibilidad del Método Polarimétrico

En la tabla XXXI se presentan los datos del análisis de varianza de las muestras sin adicionar y adicionadas con 5 y 10 % de IsoPA1. Los resultados mostraron que existe una diferencia significativa ( $p < 0.01$ ), entre los valores de la rotación específica a las diferentes concentraciones trabajadas. El mismo análisis en muestras adicionadas con concentraciones menores de 5% de isoPA1 no presentó diferencias significativas respecto a la muestra sin adicionar.

**Tabla XXXI**  
**Análisis de varianza de los valores de rotación específica de las soluciones de PA1 adicionadas con IsoPA1 a concentraciones de 0, 5 y 10%**

Análisis de Varianza

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probab.</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	394.1	2	197.07	7.66	0.0072	3.89
Dentro de los grupos	308.8	12	25.73			
Total	702.9	14				

(0.7%). También se presentan los datos obtenidos de la medida del poder rotatorio de la IsoPA1.

**Tabla XXXII**  
**Rotación específica de distintos lotes de PA1**

Lote	%isoPA1	[α] <sub>D</sub>
1	0.78	-78.8
2	1.01	-90.7
3	0.72	-93.0
4	1.68	-99.0
n = 5 para cada lote		

**Tabla XXXIII**  
**Valores de rotación específica para diferentes lotes de PA1 e IsoPA1**

Sustancia	Lectura 589 nm	Lectura 546 nm
PA1 (5% isopA1)	66±5 n = 11	64±5 n = 11
PA1 (4.5% isopA1)	63±4 n = 5	61±4 n = 5
PA1 (0.7% isopA1)	95±3 n = 9	94±6 n = 9
IsopA1	5±0.1 n = 4	5±1 n = 4

**Tabla XXXIV**  
**Límites de detección y cuantificación instrumentales**

<p><b>Límite de detección = 0.04%</b>  <b>Límite de cuantificación = 0.13 %</b></p> <p><b>n = 500</b>  <b>s = 1.77 x 10<sup>-4</sup>      C.V. = 0.01%</b></p>
--

### 2.5.3 Cuantificación de IsoPA1 por RMN

En la Tabla XXXV se presentan los resultados de la cuantificación de IsoPA1 obtenidos tanto por relación de áreas, como por la técnica de adición estándar. En la misma Tabla se presentan los datos de precisión de ambos métodos. La curva de calibración y los datos de regresión obtenidos se presentan en la Figura 38.

**Tabla XXXV**  
**Determinación del % de IsoPA1 en muestras de PA1**

<b>Método</b>	<b>M1</b>	<b>M2</b>	<b>M3</b>	<b>s</b>	<b>CV(%)</b>
Relación de áreas	4.58	4.64	4.71	0.065	1.40
Adición estándar	3.61	3.50	3.80	0.146	4.02

En la Tabla XXXVII se presentan los resultados de la cuantificación de IsoPA1 tanto en espectro de orden cero como en primera derivada, en las distintas formas de integración de la señal. También se presentan los CV promedio de cada técnica, siendo la forma de integración de cero al mínimo la que presentó mayor variación.

**Tabla XXXVII**  
**Comparación de las técnicas de integración de la señal, en espectros de orden cero y derivados**

% isoPA1	orden 0	d e r i v a d o s		
		máx-min	positiva	negativa
0.0	4.80	4.28	4.30	4.80
0.5	5.09	4.63	4.61	4.66
1.0	5.81	5.22	5.20	5.26
1.5	6.44	5.84	5.68	6.02
2.0	7.04	6.80	6.80	6.80
C.V.	5.60	7.16	7.28	11.46

\* los datos son promedio de 3 mediciones para cada concentración



## 2.5.6 Análisis Estadístico para la Comparación de los Métodos de Integración de las Señales

En la Tabla XXXVIII se presentan los datos del análisis estadístico empleado en la evaluación de las diferentes técnicas de integración de las señales espectrales. Se encontró que la cuantificación empleando espectros orden cero es significativamente diferente a la cuantificación empleando derivadas mediante las primeras 2 formas de integración, no así para la integración del cero al mínimo.

**Tabla XXXVIII**

**Análisis de datos en diseño completamente al azar, (arreglo factorial A x B), para la comparación de los distintos métodos de integración a diferentes niveles de concentraciones**

<b>Forma de integración de la señal</b>	<b>Patrón de Similitud</b>
<b>Espectro de orden cero:</b>	
Área	A
<b>Primera derivada:</b>	
máximo-mínimo	B
Cero a máximo	B
Cero a mínimo	A B

Nivel de significancia 0.05  
DMS: 0.344

Olivares Sáenz E.  
*Diseños Experimentales*

## 2.6 Comparación de los Métodos de Análisis

En la Tabla XXXIX se presentan los datos de sensibilidad y precisión de los métodos estudiados durante este trabajo: Polarimetría, Infrarrojo, UV-Visible, cromatográficos y de RMN.

**Tabla XXXIX**

**Comparación de métodos analíticos para la cuantificación de IsoPA1 en presencia de PA1**

Técnica Analítica		Sensibilidad		Precisión % C.V.
		Límite de Detección	Límite de Cuantificación	
UV - Visible	Relación de respuestas 285/277 (derivadas)	0.35 µg/mL (0.7%)	1.06 µg/mL (2.0%)	0.6
	PLS1 (derivadas)	0.25 µg/mL (0.5%)	0.74 µg/mL (1.4%)	26.0
CLAR	Adición estándar (cromatogramas derivados)	0.6 ng (0.3%)	2.0ng (1.0%)	18.0
	Análisis de Pureza	< 1.7%	-	-
RMN <sup>1</sup> H	% Relativo a PA1	0.17%	0.50%	5.6
Polarimetría		> 5%	-	11.0
Infrarrojo (derivadas y AMC)		--	100µg/mL	-

## CAPÍTULO 4

### DISCUSIÓN

Las técnicas empleadas al momento para el control de calidad de la Peroxisomicina A1, han permitido detectar, en los lotes purificados en el laboratorio de producción, la presencia de algunos de los contaminantes naturales que existen en el fruto de la planta. Sin embargo, sólo se ha reportado el análisis cualitativo de los mismos. El propósito del presente trabajo ha sido optimar algunas de las técnicas en uso, para realizar la cuantificación apropiada de uno de los contaminantes que con mayor frecuencia se encuentra en los lotes de PA1. Se trata de la IsoPA1. Al mismo tiempo se ha buscado desarrollar nuevos métodos analíticos que pudieran complementar los existentes, muchas de ellos apoyados en métodos quimiométricos.

Los métodos considerados fueron: Espectroscopia UV-Visible, Espectroscopia Infrarrojo, Polarimetría, CLAR y <sup>1</sup>HRMN. Para establecer los parámetros de precisión y sensibilidad y en los casos que fue posible, de cuantificación, inicialmente se trabajó con estándares tanto de PA1 como de IsoPA1, y mezclas de éstos. Los métodos se compararon, se seleccionaron

aquellos que presentaron mayor sensibilidad y con ellos posteriormente se trabajó con estándares de PA1 no adicionados, así como mezclas de PA1-IsoPA1 en proporciones equivalentes a las reales.

#### **4.1 Espectrofotometría UV - Visible**

Se establecieron los intervalos de linealidad para ambos compuestos, empleando para ello los espectros de orden cero. Como se observa en la Figura 5, tanto la PA1 como la IsoPA1 presentan dos máximos de absorción distintivos uno en la región UV (270 -280 nm) y otro en el visible (410 - 425 nm), además de que la IsoPA1 presenta una señal adicional a 310 nm que lo distingue de la PA1.

Con los espectros de orden cero, se construyeron curvas de calibración para PA1 e IsoPA1, a diferentes longitudes de onda dentro del intervalo espectral, obteniéndose en todos los casos coeficientes de regresión lineal satisfactorios, excepto en el caso de la IsoPA1 a 322 nm, (Tabla VI). Los intervalos de concentración seleccionados para el análisis fueron aquellos en los que las lecturas de absorbancia para la señal de mayor intensidad (270 nm para PA1 y 280 nm para IsoPA1) estuvieron entre los 0.2 y 1.2 unidades. En un principio se trabajó con concentraciones de hasta 100  $\mu\text{g/mL}$ , sin embargo, se observó tanto para PA1 como para IsoPA1, que cuando se trabajaba en concentraciones superiores a los 20  $\mu\text{g/mL}$ , las señales a 270 y 280 nm

respectivamente, sufrían alteraciones, aún cuando las señales en el visible respondían correctamente a la ley de Beer. Por este motivo y dado que para la cuantificación se pretendía trabajar con todo el intervalo espectral tanto para la selección de las longitudes de análisis en derivadas como en análisis de calibración multivariante, se optó por no incluir concentraciones que presentaran desviaciones a la ley de Beer en alguna fracción del espectro.

Para evaluar la precisión del método, con los datos espectrales obtenidos se calcularon las relaciones de absorbancia a diferentes longitudes de onda. Dadas las concentraciones a las que se trabajó, los valores de los coeficiente de variación se consideran aceptables de acuerdo a la literatura<sup>63</sup>. En el caso de la isoperoxisomicina A1, las mayores variaciones espectrales se observaron a 322 nm, lo cual también se reflejó en los resultados de las curvas de calibración, como se mencionó previamente.

Con los datos de las curvas de regresión de ambos compuestos se calcularon los límites de detección y cuantificación en  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Para la PA1, la mayor sensibilidad se obtuvo a 270 nm, con un límite de detección de  $0.85\mu\text{g}/\text{mL}$  y de cuantificación de  $2.41\mu\text{g}/\text{mL}$ . Para la IsoPA1, la mayor sensibilidad se obtuvo a 280 nm con límites de detección y cuantificación de 0.47 y  $2.10\mu\text{g}/\text{mL}$  respectivamente (Tablas VIII y IX).

Los parámetros de intervalo de linealidad, precisión y límites de detección y cuantificación, fueron obtenidos para ambos compuestos en los espectros de orden cero; sin embargo, considerando que el objetivo del trabajo fue realizar la cuantificación en mezclas y dadas las semejanzas espectrales de los compuestos, fue necesario recurrir al empleo de derivadas para la resolución de las señales.

Para la cuantificación mediante el empleo de derivadas, los espectros obtenidos tanto en primera como en segunda derivada, fueron suavizados con 15 puntos, mediante el algoritmo matemático de Savitsky y Golay<sup>59</sup>. Para la obtención de la derivada también se empleó el algoritmo de Savitski y Golay: para todo el intervalo espectral (220 a 600 nm) se aplicó un ajuste mediante una función de segundo grado y  $\Delta\lambda$  de 5 nm. Con la selección del número de puntos tanto del suavizado como para la derivada, se buscó disminuir el factor ruido, sin perder resolución y sensibilidad de las señales.

En principio, con los espectros de los estándares se construyeron curvas de calibración tanto en primera como en segunda derivada, mediante la técnica de cruce al cero, sin embargo al momento de realizar la cuantificación de IsoPA1 en muestra de PA1 adicionadas con diferentes porcentajes de IsoPA1, los resultados no fueron satisfactorios, ya que el análisis arrojó poca precisión. Por tal motivo se decidió, con los mismos espectros derivados, buscar un procedimiento para mejorar la precisión de los datos, mediante la técnica de

adición de estándar. Se construyeron las curvas de calibración (Figura 15), en donde el eje de las X corresponde al % de IsoPA1 adicionado y en el eje Y se consideró el cociente de respuesta en los espectros derivados a 2 longitudes de onda. Los estándares se prepararon en una matriz de PA1 (1mg/mL), la cual contenía 0.7% de IsoPA1, dato obtenido por RMN. El análisis de precisión del método desarrollado, mostró un C.V. de 0.58% (Tabla XIV). La cuantificación de IsoPA1 en varios lotes de PA1 se comparó con los resultados obtenidos por RMN; aunque en la mayoría de los casos los datos de concentración obtenidos fueron mayores por UV-Visible que por <sup>1</sup>HRMN, el análisis estadístico no mostró diferencia significativa entre las poblaciones (Tabla XVI).

Como se mencionó en la Introducción, los métodos de calibración multivariante, son una excelente herramienta para la cuantificación en mezclas donde los componentes poseen espectros muy semejante o en casos en los que existen fuertes interferencias de matriz. En nuestro caso, los diseños experimentales incluidos para construir la calibración multivariante, permitieron la cuantificación de la IsoPA1 en los lotes de PA1 (Tabla XVII), con diferencias entre los valores predictivos y reales entre 0.8 y 23%. Bajo las mismas condiciones, no fue posible cuantificar la PA1: se observó una notoria sub-valoración de los datos de concentración (Tabla XVII), esto debido con toda seguridad, a la falta de linealidad del método a las concentraciones de PA1 a las que se trabajó. Los espectros empleados en el diseño de calibración multivariante, fueron suavizados y derivados con los mismos parámetros empleados en la cuantificación por derivadas, mediante la técnica de adición de estándar.

De acuerdo con lo anterior se puede establecer que el método de adición de estándar, mediante el cociente de respuestas 285/277 en espectros derivados (Tabla XIV), resultó ser el más preciso de los métodos UV-Visible desarrollados para la cuantificación de IsoPA1 con un C.V.= 0.59%; sin embargo, la técnica de calibración multivariante, aunque presenta coeficientes de variación mayores, tiene la ventaja de que una vez que se establece el experimento de calibración, se puede realizar la cuantificación en cualquier muestra, aún que en ese momento no se disponga de estándares del compuesto.

## **4.2 Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución**

### **4.2.1 Cuantificación de IsoPA1**

Las condiciones cromatográficas a las que se trabajó fueron las previamente descritas por Osorio<sup>27</sup>. Las técnicas de separación por CLAR desarrolladas para resolver la PA1 de los demás compuestos hidroxiantracénicos<sup>25,27</sup>, emplean columnas de fase reversa C18 o C8, bajo diferentes condiciones de elución. Ya se han descrito<sup>26,27</sup>, las dificultades que se presentan para la separación de PA1 e IsoPA1, a lo largo de la vida de la columna, debidas a la facilidad con que se producen cambios en el orden de



elución de estos compuestos. Si bien lo ideal para un análisis cromatográfico, es partir de cromatogramas donde los picos estén bien resueltos, en casos como éste y otros en donde la complejidad de los cromatogramas es alta, o donde el tiempo es un factor limitante, es conveniente recurrir a métodos quimiométricos para cuantificar los compuestos cuyos picos se encuentran poco resueltos<sup>49-52</sup>.

El presente trabajo se realizó con cromatogramas donde la señal de la IsoPA1 apareció como un hombro a la derecha de la señal de la PA1 (Figuras 19 y 21). Se seleccionaron 3 longitudes de onda para realizar las curvas de calibración: 269nm que corresponde a la zona espectral de máxima absorbancias para ambos compuestos, 410nm, región espectral en donde se han encontrado menores interferencias y la de 310 nm que es la longitud de onda que permite ver con mayor facilidad la presencia de la IsoPA1 tanto en la cuantificación como durante el análisis de pureza, cuando las señales se encuentran parcialmente sobrepuestas.

Para la cuantificación mediante el método de estándar interno, se empleó como estándar interno un diastereoisómero de la PA1, la PA2, compuesto cuya respuesta es semejante a los compuestos de estudio y que no interfirió con las señales cromatográficas (presenta  $t_R$  de 1.9 minutos) (Figura 21). El uso de estándar interno se ha recomendado en cromatografía, tanto para fines cualitativos ( $t_R$  relativo), sobre todo cuando se emplea gradiente de elución, como para fines cuantitativos (regula errores de inyección y de tratamiento de la

muestra); en nuestro caso, los resultados obtenidos de la curva de calibración mediante este método, resultaron menos precisos, que empleando los métodos de estándar externo y de adición de estándar. Estas variaciones, pueden ser debidas a dos causas principalmente: errores en la adición del volumen del estándar interno y variaciones en la integración de la señal correspondiente<sup>67</sup>.

El método de estándar externo es, sin lugar a dudas, el método de cuantificación más utilizado en CLAR. Sin embargo, aún cuando los resultados del linealidad obtenidos mediante este método fueron satisfactorios (Figura 18), en nuestro caso, fue más útil trabajar con la técnica de adición de estándar. Esto debido a que se requería realizar la cuantificación de IsoPA1 en lotes de PA1 naturalmente contaminados, en los que la diferencia de concentraciones es muy grande, además de la poca resolución de los compuestos. El método de adición de estándar presenta la ventaja, sobre el método de estándar externo, que el análisis se realiza en la misma matriz donde el analito se encuentra y por lo tanto, los efectos de la matriz son eliminados. Además, en los caso de picos poco resueltos, se asegura que ocurre la separación.

La isoperoxisomicina contenida como contaminante en los lotes de PA1, se cuantificó con el método de adición de estándar. Dada la baja concentración de ésta en los lotes, se probó adicionalmente realizar la cuantificación mediante la misma técnica de adición de estándar pero con los cromatogramas derivados. La aplicación de la primera derivada a los cromatogramas, mejoró la resolución de la señal de la IsoPA1 (Figura 23).

Para la cuantificación de la IsoPA1 en los cromatogramas en primera derivada se utilizaron tres técnicas distintas de integración de la señal. Los resultados obtenidos, así como los datos de la cuantificación en los cromatogramas sin derivar son presentados en la Tabla XVIII, donde se puede observar una sobrevaloración de los resultados en la cuantificación en los cromatogramas sin derivar, debido probablemente a la falta de resolución de la señal. Por otro lado en algunos cromatogramas, en donde la señal de la IsoPA1 no se resolvió completamente aún en primera derivada, no fue posible la integración de cero al máximo (Figura 23). De esta manera en lo sucesivo se decidió trabajar solamente por integración de la señal al mínimo.

Los límites de detección y cuantificación de la técnica de adición de estándar con los cromatogramas en primera derivada fueron de 0.6 y 2 ng respectivamente. El C.V. que se obtuvo de los factores de respuesta a los diferentes niveles en la curva de calibración fue de 18%. (Tabla XIX) La precisión del método también fue evaluada a través de la cuantificación repetida ( $n = 4$ ) de IsoPA1 en dos lotes de PA1 con diferentes porcentajes de impureza, (Tabla XX), donde los coeficientes de variación fueron mayores en los resultados obtenidos con el lote con menor contenido de IsoPA1. Esto debido a que este valor se encuentra por abajo del límite de cuantificación establecido de 1%.

La exactitud del método de adición de estándar, se estableció al comparar los resultados obtenidos de la cuantificación de IsoPA1 en varios lotes de PA1, con los resultados obtenidos por RMN (Tabla XXI). La cuantificación de IsoPA1 en los lotes se realizó de dos maneras: mediante el factor de respuesta promedio de los diferentes niveles de la curva de calibración y por extrapolación de la línea de calibración al eje X (técnica propiamente utilizada en el método de adición de estándar). En todos los casos se observó una sobrevaloración en el método de extrapolación al eje X. Una posible explicación a este fenómeno sería la persistencia de un efecto de matriz de tipo aditivo consistente en un desplazamiento positivo del cero en presencia de la matriz<sup>62</sup>.

#### **4.2.2 Análisis de Pureza por CLAR - arreglo de diodos**

El empleo del detector de arreglo de diodos, permite la realización del análisis de pureza espectral de un pico cromatográfico, siempre y cuando el espectro de la impureza sea lo suficientemente diferente como para ser detectado. El nivel de impureza que puede ser detectado mediante este método depende de las diferencias espectrales que presenten los compuestos y la resolución que exista entre ellos<sup>53,68</sup>. En nuestro caso las diferencias espectrales de la IsoPA1 y la PA1 nos permitieron realizar el análisis de pureza de PA1 mediante este método.

Antes de realizar el análisis de pureza, se realizó una gráfica de isoabsorbancia al cromatograma, con el fin de asegurar la ausencia de señales en tiempos de retención distintos al de la señal de la PA1. Las gráficas de isoabsorbancia no revelaron la presencia del contaminante en los lotes de PA1. El análisis de pureza espectral se realizó mediante 3 procedimientos: sobreposición de espectros en diferentes posiciones del pico, cociente de absorbancias a diferentes longitudes de onda a lo largo del pico cromatográfico y sobreposición de cromatogramas tomados a diferentes longitudes de onda. La presencia del contaminante se pudo observar tanto en las gráficas de espectros sobrepuestos como en las gráficas de cociente de absorbancias a las longitudes de onda de 269, 280, 410 y 310 (Figura 26b). Las mayores diferencias espectrales se lograron ver en el intervalo de 280 a 310 nm (Figura 26 a y c), zona espectral característica para la IsoPA1. El análisis de los cromatogramas normalizados y sobrepuestos a estas mismas longitudes de onda, reveló también la presencia del contaminante (Figura 27), observándose una ligera variación en la forma del pico cromatográfico y en algunos casos, sobre todo en los cromatogramas en los que los IsoPA1 se encontró más sobrepuesta por la PA1, se encontró una ligera variación en los tiempos de retención en el cromatograma obtenido a 310nm.

En cuanto a los ensayos de robustez del análisis de pureza, se encontró que de los factores externos estudiados, únicamente la cantidad de masa inyectada afecta significativamente el análisis de Pureza. (Tabla XXII). Por otro lado, el diseño de Plackett y Burman para la evaluación de los factores

instrumentales (Tabla XXIV), reveló que el intervalo de longitudes de onda incluido en el espectro, el número de espectros por pico, y la ubicación de la longitud de onda de referencia, son los que más afectan el análisis de pureza.

Si bien es posible detectar la presencia de IsoPA1 en los lotes de PA1, mediante el análisis del cociente de absorbancias a lo largo del pico cromatográfico, aún en concentraciones de 0,7%, al adicionar cantidades crecientes de IsoPA1 a un mismo lote de PA1, no se encontró una correlación directa entre el % de pureza espectral y la cantidad de IsoPA1 adicionada. (Tabla XXV), por lo que no se puede considerar este método adecuado para establecer cuantitativamente la presencia del contaminante.

#### **4.3 Espectroscopia Infrarroja**

Por espectroscopia IR se logró establecer dos métodos para la cuantificación de PA1 e IsoPA1 en mezclas: la calibración multivariante y el análisis por derivadas.

Para establecer las condiciones de análisis primeramente se seleccionó el solvente adecuado; se buscó aquellos en los que los compuestos fueran solubles y que sus señales no interfirieran con el análisis. De los solventes probados, el tetracloruro de carbono fue con el que se obtuvieron menores interferencias; sin embargo, dada la poca solubilidad de las muestras en este solvente y la alta toxicidad, se optó por emplear cloroformo o cloruro de

metileno (ambos grado análisis de trazas). De éstos, se seleccionó el cloroformo, por ser un reactivo menos volátil, lo que facilitó la manipulación de las muestra.

Los métodos cuantitativos de absorción en el infrarrojo difieren de los métodos de espectroscopia molecular UV-Visible, debido a la mayor complejidad de los espectros, lo que implica superposición parcial de picos y a la estrechez de las bandas de absorción que conduce a mayores limitaciones instrumentales de la ley de Beer, principalmente de los equipos dispersivos. Los instrumentos que utilizan transformadas de Fourier, presentan una mejor relación señal / ruido que la de los instrumentos dispersivos. Además presentan mayor resolución espectral y una elevada exactitud y reproducibilidad en la determinación del número de onda, propiedad que es particularmente útil cuando se restan espectros para las correcciones de fondo<sup>70</sup>.

En un principio se trabajó con un sistema de Reflectancia Total Atenuada (ATR) para la obtención de los espectros. A pesar de que en la literatura se menciona que la técnica es aplicable para análisis cuantitativo<sup>29</sup>, en nuestro caso no se encontró reproducibilidad en las intensidades de las señales; por tal motivo se optó por trabajar con la técnica de transmitancia. Se emplearon ventanas de CaF<sub>2</sub>, dado que éstas no son higroscópicas y por lo tanto no se opacan con facilidad como las ventanas de NaCl. La limitante de estos cristales es que la región transparente está por arriba de los 1100cm<sup>-1</sup>.

Para la cuantificación de PA1 e IsoPA1 en espectroscopia de infrarrojo, los espectros de ambos compuestos, que inicialmente fueron obtenidos en transmitancia, fueron convertidos a absorbancia y se construyeron curvas de calibración tanto para la PA1 ( $1629\text{ cm}^{-1}$ ) como para la IsoPA1 ( $1603\text{ cm}^{-1}$ ) a un número de onda correspondiente al máximo de absorbancia del espectro. Esto nos permitió encontrar el intervalo de linealidad del método el cual resultó ser de 100 a 1000  $\mu\text{g/mL}$ . El límite de cuantificación fue de  $100\mu\text{g/mL}$ ; los resultados obtenidos con concentraciones por abajo de este valor fueron menos precisos y se salieron del intervalo de linealidad de la curva de calibración.

Dado que se pretendía realizar la cuantificación de ambos compuestos en mezcla y debido a que los espectros IR son muy semejantes, se buscó como alternativa realizar la cuantificación de ambos compuestos tanto por el método de derivadas (técnica de cruce al cero) como mediante el método de calibración multicomponente ( PLS1).

Con los espectros procesados anteriormente para la calibración en orden cero, se calculó también la primera y la segunda derivada, con el propósito de buscar los números de onda adecuados para la cuantificación mediante la técnica de cruce al cero. En el caso de la IsoPA1, se logró cuantificar en 1ª derivada a  $1600\text{cm}^{-1}$ , región correspondiente al cero de la PA1 (Figura 32, Tabla XXVII) y la PA1 se cuantificó en 2ª derivada a  $1611\text{cm}^{-1}$ , correspondiente al cero de la IsoPA1 (Figura 33, Tabla XXVII).



El diseño de calibración multivariante fue construido con 20 experimentos en concentraciones dentro del intervalo de linealidad establecido previamente. El cálculo de los porcentajes de error de las diferencias entre el valor predictivo y el valor real obtenido del experimento fueron menores de 6% para la IsoPA1 e inferiores a 2% para la PA1 como se muestra en las Tablas XXVIII y XIX.

Si bien con los resultados obtenidos se estableció que es posible cuantificar tanto la PA1 como la IsoPA1 mediante espectroscopia de IR medio, la baja sensibilidad de esta técnica, no nos permitió realizar la cuantificación de IsoPA1 en muestras reales, que fue el objetivo principal del trabajo.

#### **4.4 Medida del Poder Óptico Rotatorio**

Dadas las características quirales de la PA1, se consideró en principio que la medida del poder óptico rotatorio sería particularmente útil para el análisis de pureza<sup>31</sup>; sin embargo, los resultados obtenidos mediante esta técnica, mostraron una baja sensibilidad del método, ya que las diferencias significativas en el cambio de rotación específica se presentaron únicamente cuando las concentraciones de IsoPA1 en las muestras superaron al 5%. (Tabla XXXI). Cuando se analizaron lotes de PA1, de diferentes concentraciones de IsoPA1, obtenidos bajo procedimiento iguales de purificación, no se observó una correlación entre el contenido de IsoPA1 y el valor de la rotación específica

(Figura 34); adicionalmente, al comparar el poder rotatorio de estos lotes, con otros lotes obtenidos que contenían mayor porcentaje de IsoPA1 (Tabla XXXII), el valor de la Rotación Específica fue mayor para los lotes de menor contenido de IsoPA1. Sin embargo, la disminución del poder rotatorio no se evidenció al agregar cantidades de IsoPA1 en proporciones correspondientes al % que contenían las muestras. Esta observación pudiera ser indicativa de la presencia de otra u otras impurezas, que afectan la rotación óptica de la solución, en aquellos lotes de mayor contenido de IsoPA1. En cuanto a la IsoPA1, es probable que su efecto se deba básicamente a la disminución de la concentración de PA1 en la solución, por lo que se podría deducir la poca especificidad del método<sup>69</sup>.

#### **4.5 Resonancia Magnética Nuclear**

La caracterización espectral por <sup>1</sup>HRMN tanto para PA1 como para IsoPA1 fue previamente reportada por Waksman<sup>1</sup>. Para la cuantificación de IsoPA1 en los lotes de PA1 se tomaron 2 señales con desplazamientos químicos 7.25 y 7.15 ppm correspondientes al H-10 de la PA1 y a los H 10 y 10' del compuesto IsoPA1 respectivamente<sup>63</sup>. Ambas son señales singulete y están bien separadas, por lo que su integración resulta fácil (Figura 37).

Para el cálculo del porcentaje de IsoPA1 en lotes de PA1, se partió de la consideración de que la intensidad de las señales de resonancia es

proporcional al número de núcleos de hidrógeno y que el método es específico para la sustancia. Dado que en el caso de los compuestos en estudio, la señal correspondiente a la PA1 corresponde a 1 hidrógeno por molécula, mientras que la de la IsoPA1 la señal corresponde a 2 hidrógenos por molécula, fue necesario hacer la corrección en las mediciones dividiendo los resultados de la integración de ésta última entre 2.

La linealidad del método se probó al medir el porcentaje de área relativa en función del porcentaje adicionado de IsoPA1 a la solución de PA1 (Figura 38). Los límites de detección y cuantificación del método se obtuvieron a partir de los datos de esta curva (Tabla XXXVI), obteniéndose resultados comparables a los obtenidos en la literatura para otros compuestos<sup>31</sup>.

La exactitud de los resultados de cuantificación por RMN depende de la selección de la señal del analito, la cual debe estar libre de impurezas que se traslapen con ésta, además de la correcta integración de la señal a medir<sup>31</sup>. La mayoría de los espectros obtenidos de los lotes de PA1, mostraron una pequeña señal correspondiente a una impureza, al momento desconocida, que se sobrepone a la señal de la PA1 empleada para la cuantificación. Por este motivo fue necesario procesar los espectros obtenidos y determinar su derivada (de primer orden). De esta manera fue posible integrar con mayor facilidad la señal de la PA1 al evitar la interferencia de la señal del contaminante (Figura 39).

Para comparar los resultados obtenidos de la cuantificación por  $^1\text{HRMN}$  al emplear tanto los espectros de orden cero como los derivados en las distintas formas de integración, se utilizó un diseño factorial A x B, completamente al azar (Tabla XXXVIII). Esto nos permitió demostrar que existe diferencia significativa entre los resultados obtenidos mediante la integración de la señal sin derivar, respecto a los obtenidos al emplear las señales derivadas; excepto en la integración del cero al mínimo. En este caso, además se obtuvieron los coeficientes de variación mayores (Tabla XXXVII), debido probablemente a que aún en el espectro derivado, existía efecto de la señal del contaminante.

#### **4.6 Comparación de los métodos de análisis**

En la Tabla XXXIX se resumen los resultados de la comparación de los métodos analíticos evaluados.

La polarimetría solamente permitió detectar concentraciones mayores al 5% con C.V. menores a 11, por lo que no fue posible realizar la cuantificación de IsoPA1 mediante este método.

En el caso de la espectroscopia de IR, los límites de detección y cuantificación obtenidos mediante esta técnica, no permitieron el análisis de la IsoPA1 en los lotes de PA1; sin embargo, se logró desarrollar dos métodos de cuantificación por esta técnica, con resultados de precisión aceptables, los

cuales pueden ser aplicados para la cuantificación de PA1 e IsoPA1, en los casos en los que la sensibilidad requerida sea menor. Los métodos desarrollados pueden ser utilizados, con las correspondientes adecuaciones, para cuantificación por IR de otros compuestos.

Tanto con la espectrofotometría UV- Visible, como con CLAR y <sup>1</sup>HRMN fue posible llevar a cabo la cuantificación de IsoPA1 en los lotes de PA1, con resultados de precisión y sensibilidad semejantes (Tabla XXXIX). En los tres casos, el empleo de derivadas favoreció la resolución de los compuestos y la cuantificación de la IsoPA1.

Si bien es cierto que la RMN permite cuantificar mejor IsoPA1 cuando está presente en proporciones pequeñas, al momento la cantidad de masa utilizada (15 mg) es mayor que en los otros métodos; además, los resultados obtenidos mediante el método empleado corresponden a datos de concentración relativos, donde se parte del supuesto de que los únicos componente presentes en la muestra son la PA1 y la IsoPA1. Actualmente, se está buscando la forma de mejorar el método.

A las condiciones trabajadas, el análisis de pureza espectroscópica de la señal cromatográfica, permitió detectar la presencia de IsoPA1 en los lotes de PA1 aun en concentraciones de 0.7%. Sin embargo, no se encontró ninguna correlación entre la cantidad de IsoPA1 adicionada y el % de pureza espectroscópico de PA1.

Por esta razón y en función del control de calidad que actualmente se realiza a los lotes de PA1 se recomienda:

- Incluir la cuantificación de IsoPA1, tanto por espectroscopía UV - Visible (espectros derivados y AMC) como por CLAR (con derivadas, en los casos que se requiera) en el análisis de Pureza de la PA1.
- Implementar una técnica de cuantificación por  $^1\text{HRMN}$ , para la cuantificación absoluta de la IsoPA1.

## CONCLUSIONES

- 1. Se acepta la hipótesis planteada en este trabajo: " El análisis de pureza de la Peroxisomicina A1 podrá ser mejorado mediante el tratamiento matemático de datos"**
- 2. De los métodos comparados, la Espectrofotometría UV-Visible, CLAR y <sup>1</sup>HRMN, cubren las características de precisión y sensibilidad para cuantificar IsoPA1 en lotes de PA1, requeridos para el Control de Calidad de PA1.**
- 3. El empleo de derivadas permitió incrementar la resolución de señales y por consiguiente la precisión de los análisis en UV-Visible, IR, CLAR y RMN.**
- 4. No se encontró correlación entre la concentración de IsoPA1 como impureza y el resultado del análisis de pureza del pico cromatográfico.**

**BIBLIOGRAFÍA**

- 1 Piñeyro, A.; Waksman, N. "Chemistry, Structure and Biological Activity of Antracenones of the *Karwinskia* genus". *Studies in Natural Products (C)* First edition. Ed. Elsevier, 22: 555 - 606, (2000).
- 2 Clavijero, F.J. "Historia de la Antigua Baja California, México" 3ª. Edición, Ed. Porrúa, (1982).
- 3 Bermúdez, M.V.; González-Spencer, D.; Guerrero, M.; Waksman, N; Piñeyro, A. "Experimental intoxication with fruit and purified toxins of Buckthorn (*K. humboldtiana*)" *Toxicon*, 24: 1091, (1986).
- 4 Bermúdez-de-Rocha, M. V.; Martínez, F.J.; Salazar-Leal, M.; Waksman, N. and Piñeyro-López, A. "Experimental acute intoxication with ripe fruit of *Karwinskia humboldtiana* (tullidora) in rat guinea-pig, hamster, and dog". *Toxicon*, 30: 1493-1496, (1992).
- 5 Piñeyro López A. "Toxicidad selectiva *in vitro* de la toxina t514 de la *K. humboldtiana*". Tesis doctoral. Facultad de Medicina, UANL, Monterrey, México, (1990).
- 6 Piñeyro, A.; Martínez, L.; González-Alanís, R. "In vitro selective toxicity of toxin T514 from *K. humboldtiana* (Buckthorn) plant on various human tumor cell lines". *Toxicology*, 92: 217-227, (1994).
- 7 Dreyer, D.; Arai, I. "Toxins Gausin non inflammatory paralytic neuropathy. Isolation and Structure Elucidation" *J.Am. Chem Soc.* 97: 4894-4990, (1975).
- 8 Garza-Ocañas, L.; Hsieh, G.C.; Acosta, D.; Torres-Alanís, O. Piñeyro-López, A. "Toxicity assesment of toxins t514 and t544 of *buckthorn* (*K. humboldtiana*) in primary skin and liver cells cultures". *Toxicology* 73: 191-201, (1992).



- 9 Sepúlveda J. et al. "Studies on the effects of toxin t514 on the integrity of peroxisomes in methylotrophic yeasts". *FEMS Microbiology Letters*, 91: 207-212, (1992).
- 10 Moreno et al. "Effect of Peroxisomicine and related anthracenones on catalase activity" *Planta Médica*, 61(4): 337-340, (1995).
- 11 Martínez, F.J.; Zeng, Guo-Qing; Piñeyro, A.; Garza-Ocañas, L; Tomei, David; Umansky Samuil. Apoptosis Induction and Cell Cycle Perturbation in Established Cell Lines by Peroxisomicine A1 (T-514). *Drug and Chemical Toxicology*, 24 (3): 287-299, (2001).
- 12 Lansiaux, A.; Laine , W.; Baldeyrou, B.; Mahieu, C.; Wattez, N.; Vezin, H.; Martínez, F.; Piñeyro, A.; Bailly, C.; DNA Topoisomerase II Inhibition by Peroxisomicine A1 and its Radical Metabolite Induced Apoptotic Cell Death of HL-60 and HL.60/MX2 Human Leukemia Cells. *Chem. Res. in Toxicol.* 14(1): 16-24, (2001).
- 13 Gill, M., Steglich, W. "Pigments of fungi". *Prog. Chem. Org. Nat. Prod.*, 151-163, (1987).
- 14 Eliel Ernest L., Wilen Samuel H. *Stereochemistry of Organic Compounds*. Ed. John Willey and Sons, 1000 - 1003, (1994).
- 15 Waksman, N.; Ramírez-Durón, R. "Isolation of a new dimeric anthracenone from *Karwinskia parvifolia*". *R. Rev. Latinoamer. Quím.* 23(1) and 22(4):25-27, (1992).
- 16 Rivas-Galindo, V. "Estudio Químico de los Extractos Semipolares de Frutos de *K. parvifolia* y *K. Johnstonii*". Tesis de Maestría, Facultad de Medicina, UANL, Monterrey, (1995).
- 17 Lujan-Rangel, R. "Efecto del Período de Cosecha, tamaño de fruto, riego y especie sobre el contenido de Peroxisomicina A1 (T-514) en plantas del

- género *Karwinskia*" Tesis de Maestría, Facultad de Agronomía, U.A.N.L., Marín, N.L., (1999).
- 18 Waksman, N.; Martínez, L.; Fernández, R. "Chemical and toxicological screening in genus *Karwinskia* (México)". *Rev. Latinoam. Quím.*, 20(1): 27-29, (1989).
- 19 Guerrero, M., Piñeyro, A. and Waksman, N. "Extraction and quantification of toxins from *Karwinskia humboldtiana* (tullidora". *Toxicon*, 25: 565-568, (1987).
- 20 Salazar, M de la L., Waksman, Noemí y Piñeyro-López, A. "Aplicación de la cromatografía de líquidos de alta resolución para la obtención de un producto de interés farmacológico". *Memorias del IV COLACRO, Congreso Latinoamericano de Cromatografía*. México, D.F., Abril, (1992).
- 21 Gómez A. " Optimización de la extracción de T-514 de la semilla del fruto de *K. parvifolia*", Tesis de maestría en proceso. Facultad de Medicina, UANL
- 22 Martínez-Villarreal, L. "Estudio de las Propiedades Fisicoquímicas de Toxinas aisladas de *K. humboldtiana*". Tesis de Maestría, Facultad de Medicina, U.A.N.L., Monterrey, N.L., (1990).
- 23 Osorio-Pérez, A. "Estudio de la ecuación de velocidad de la descomposición de Peroxisomicina A1 en presencia de Isoperoxisomicina A1" Tesis de Doctorado, Facultad de Medicina, U.A.N.L., Monterrey, N.L., (2000).
- 24 Waksman, N.; Torres, M.; Salazar, M.; Piñeyro, A. "Control de Calidad de un Producto de Interés Farmacológico" *Rev. Soc. Quím. Mex.* 38: 245, (1996).
- 25 Salazar-Cavazos, M.; Piñeyro-López, A. and Waksman-de-Torres, N. "Evaluation of purity assessment of peroxisomicine by HPLC with diode array detector" Quinto Congreso de Química de América del Norte. Noviembre 11 al 15, (1997).

- 26 Molina Salinas, Gloria, "Determinación del límite de Detección de tres contaminantes Naturales en lotes de Peroxisomicina A1". Tesis de Maestría, Facultad de Medicina, U.A.N.L, Monterrey, N.L., (1998).
- 27 Osorio Pérez A., " Optimización y Validación de un Método Analítico por CLAR Fase Reversa para el Análisis de Peroxisomicinas A2 y A3 e Isoperoxisomicinas A1 y A2", Tesis de Maestría, Facultad de Medicina, UANL, Monterrey, (1998).
- 28 Skoog y Leary Análisis Instrumental, Ed. Mc. Graw Hill, 4ª edición, 330-333, (1994).
- 29 Shaw R. Anthony and Mantsch H. "Infrared Spectroscopy in Clinical and Diagnostics Analysis. Enciclopedia of Analytical Chemistry. Editor Robert A. Meyers. Ed. John Wiley and Sons, (2000).
- 30 Wetzel, David. L. "Near-Infrared Reflectance Analysis" Anal. Chem. 55 (12): 1165A -1170A (1983).
- 31 Maniara, G.; Kannan, R.; Srinivasen, R; Gerald, W. S, "Method Performance and Validation for Quantitative Analysis by  $^1\text{H}$  and  $^{31}\text{P}$  NMR Spectroscopy. Applications to Analytical Standards and Agriculture Chemicals". Anal. Chem 70(23): 4921-4928, (1998).
- 32 Wells, Robert and Cheung, Julie. Quantitative Analysis of Thechnical Grade Agrochemical By High  $^1\text{H}$  NMR Spectroscopy.  
<http://preprint.chemweb.com/analchem/103002>, (2001)
- 33 Eliel Ernest L., Wilen Samuel H. Stereochemistry of Organic Compounds. Ed. John Willey and Sons, 1071-1074, (1994).
- 34 López de Alba P. y López Martínez L. "Una Introducción a la Espectrometría de Derivadas" *Educación Química* 4 (3): 160-170 (1993).

- 35 Adams, M. J. *Chemometrics in Analytical Spectroscopy*, RSC Analytical Spectroscopy Monographs. Ed. The Royal Society of Chemistry, (1995).
- 36 Talsky G.; Lothar Mayring and Hans Kreuser " High Resolution, High-order UV-VIS Derivative Spectrophotometry". *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 17: 785-799, (1978).
- 37 Wrobel-Zasada, K.; Wrobel-Kaesmarczyk K.; López-de-Alba, P.; López-Martínez, L.; García-López, M.A. "Application of internal standard for derivative-spectrophotometric determination of azinphos-methyl in commercial formulations". *Talanta* 43:1055-1060, (1996).
- 38 Secchifri, M. Bennassi, C. Pastore, S. and Semenazato A. "Rapid Pentachlorophenol Evaluation in solid Matrixes by Second Derivative UV-Spectroscopy for Application to Wood and Leather Samples" *J. Assoc. off Anal. Chem.*, 74(4): 674-677, (1991).
- 39 Muñoz de la Peña, A. Salinas, F. and Durán M.S. "Simultaneous determination of propranolol and hidralizine by derivative synchronous spectrofluorimetry". *Anal. Chim. Acta.*, 255: 317-323, (1991).
- 40 Salinas F. Muñoz A. Durán I. " Determination of Salicylic Acid and its metabolites in Urine by Derivative Synchronous Spectrofluorimetry" *Analyst* 115: 1007- 1011, (1990).
- 41 Berzas Nevado J.J.; Salinas F. "Simultaneous determination of sulphathiazole and sulphanilamide in pharmaceuticals by derivative spectrophotometry". *Journal of Pharmaceuticl and Biomedical Analysis* Vo. 9, (2): 117-122, (1991).
- 42 Berzas J.J. and Guiberteau Cabanillas, "Spectrophotometric Resolution of ternary Mixtures of Salicylaldehyde, 3-hidroxibenzaldehyde and 4-hidroxibenzaldehyde by the derivative ratio spectrum-zero Crossing method". *Talanta*, 39 (5): 547-553, (1992).

- 43 López-de-Alba P.L.; López-Martínez, L.; Hernández, A. " Métodos de Calibración Multivariante" Rev. Soc. Quim. Mex., 41 (1): 34-44 (1996).
- 44 Frans, S. D. and Harris, J. M. "Selection of Analytical Wavelengths for Multicomponent Spectrophotometric Determinations". Analytical Chemistry, 57 (13): 2680, (1985).
- 45 López-de-Alba, P.L.; López-Martínez, L.; Wrobel-Kaczmarczyk, K.; Wrobel-Zasada, K, and Amador-Hernández, J. " The Resolution of Dye Binary Mixtures By Bivariante Calibration Using Spectrophotometric Data. Analytical Letters, 29 (3): 487 - 502, (1996).
- 46 Blanco, M., Coello, J., Iturriaga, H. MasPOCH, S., Pages, J. " NIR calibration in non-linear systems: different PLS approaches and artificial neural networks" Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, 50: 75-82,(2000).
- 47 Otto, M. and Wegscheider, W. "Spectrophotometric Multicomponent Analysis Applied to trace metal determinations". Anal Chem., 57 (1): 63-69, (1985).
- 48 López de Alba, Pedro Luis et. al. " Spectrophotometric determination of Allura Red (R40) in soft Drink powders using the Universal Calibration Matrix for Partial Least Squares Multivariate Method Analytica Chimica Acta 330: 19-29, (1996).
- 49 Faber N. M. "Exact presentation of multivariate calibration model as univariate calibration graph" Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, 50: 107-114, (2000).
- 50 López-de-Alba P.L.; López-Martínez, L.; Wrobel-Zasada, K.; , Wrobel-Kaesmarczyk K. y Hernández A. " Nuevo Método espectrofotométrico de resolución de mezclas binarias". Bol. Soc. Chil. Quim, 41: 111-119, (1996).

- 51 A. Grant and P.J. Battacharya "Application of derivative Spectroscopy to the determination of Chromatographic Peak Purity". J. of Chromatography 347 219 - 235, (1985).
- 52 S. Xueguang, Zonaghai Chen, Xinagqin Lin. " Resolution of multicomponent overlapping chromatogram using an immune algorithm and genetic algorithm", Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems 50: 91-99, (2000).
- 53 Manne Rolf "Resolution of two-way data from hyphenated chromaography by means of elementary matrix transformations". Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, 50: 35-46, (2000).
- 54 S. Xueguang, Wensheng C.; Peiyan S.; Maosen Z. and Guiwen Z. "Quantitative Determination of Components in Overlapping Chromatographic Peaks using Wavelet Transform" Anal. Chem. 69:1722-1725, (1997).
- 55 H. Fabre, A.; Le Bris, M.D.; Blanchin. "Evaluation of different techniques for purity assessment on a diode-array detector in Líquid Chromatography" J. Chromatogr., 697: 81-88, (1995).
- 56 J. Polster,; Sauerwald N.; Feucht W. Treutter D. "New methods for spectrometric peak purity analysis in chromatography" J. Chromatogr., 800: 121-137, (1998).
- 57 Cenicerros, L.; Oranday, A.; Salazar, M.L.; Waksman, N. "Purificación de Peroxisomicinas y Análisis del Efecto de Contaminantes en la Medida del Poder Optico Rotatorio" XIX Congreso Nacional de Investigación Biomédica, Fac. de Medicina, U.A.N.L., (2001).
- 58 Christian, G. D. , Analytical Chemistry, Editorial John Willey and Sons, N.Y., 5ª edición (1994).

- 59 Savitzky, A. and Golay, J.E. "Smoothing and differentiation of data by simplified last square procedures". *Analytical Chemistry*, 36 (8): 1627-1639, (1964).
- 60 PLSplus / IQ User's Guideline, Galactic Industries Corporation, Salem, N.H. (1997).
- 61 Krull, I.; Swartz, M. " Validation Viewpoint. Introduction: National and International Guidelines" *LC-LG* 15 (6): 534-540, (1997).
- 62 Quattrocchi, O. A. "Una introducción a la HPLC, aplicación y práctica". Editor: Merck. Ed. Artes Gráficas Farro, (1997).
- 63 Fernández, R. A.; Rivas G. V.; Salazar C. M.; Piñeyro L. A.; Caballero Q. A.; Waksman de T. N. "Uso de <sup>1</sup>HRMN Para el Control de Calidad de Fármacos". IV Simposio de Ciencia y Tecnología. 24 Y 25 de Mayo, (1999).
- 64 Olivares, S. E. "Diseños Experimentales con Aplicación a la Experimentación Agrícola y Pecuaria" Facultad de Agronomía, U.A.N.L., (1995).
- 65 Horwitz, W. "Evaluation of Analytical Methods used for Regulation of Food and Drugs". *Analytical Chemistry*. 1 (54) : 67A - 76<sup>a</sup>, (1982).
- 66 Salazar, M. L.; Piñeyro, A.; Waksman, N. " A Reverse Phase HPLC Method for Quantification of Peroxisomicine and other Anthracenonic Compounds". *J. of Liq. Chrom. and Rel. Techn.* 19 (9):1391-1403, (1996).
- 67 *High Performance Liquid Chromatography, Fundamental Principles and Practice*. Editores W. J. Lough and W Wainer. Blackie Academic and Professional Primera Edición. 153-156, (1995).
- 68 Huber, L. Validation of Analytical Methodos: Review and Strategy, *LC - CG*, 12: 5967, (1998).

- 69 Persson, B.A.; Vessman, J. and Mc. Dowal, R.D. "Questions of Quality. Is Your Method Specific or Just Selective?" LC-GC. 16 (6): 556-559, (1998).
- 70 Skoog, D. y Leary, J. Análisis Instrumental, Ed. Mc. Graw Hill, 4ª edición, (1994).



## **RESUMEN AUTOBIOGRAFICO**

**Ma. de la Luz Salazar Cavazos**

**Candidato para el Grado de**

**Doctor en Ciencias con Especialidad en Química Biomédica**

**Tesis: USO DE TÉCNICAS MODERNAS DE ANÁLISIS PARA EL CONTROL DE CALIDAD DE LA PEROXISOMICINA**

**Area de Estudio: Química Analítica**

**Biografía:**

**Datos Personales:** Nacida en Allende, N.L, el 9 de mayo de 1952, hija de Roberto Salazar y Elvira Cavazos. Casada con Héctor J. Leal Cavazos. Hijos: Héctor Javier y Alejandro Arturo.

**Educación:** Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grados obtenidos: Laboratorista Clínico Biólogo en 1978, Químico Clínico Biólogo en 1983, Maestría en Ciencias con Especialidad en Química Analítica Biomédica en 1993.

**Experiencia Profesional:** Personal Profesional no Docente de 1980 a 1993 en la Facultad de Medicina, de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Maestro de Tiempo Completo en la misma Facultad de 1993 a la fecha, con participación en cursos de Química en Pregrado y en Posgrado Asesor de 5 tesis de maestría. Asesor de becarios de pregrado. Investigador en las áreas de Química Analítica y Control de Calidad de Productos Farmacológicos. Publicaciones: 2 publicaciones internacionales con arbitraje y 1 publicación *in extenso* en Congreso Internacional, 38 presentaciones en Congresos Nacionales e Internacionales, 8 manuales de prácticas. Coordinador del Posgrado en Química Biomédica en el departamento de Química Analítica. Reconocimientos: mejor alumno de Maestría en 1992, mejor alumno de doctorado en 2001, premio a la mejor tesis de maestría en 1998 (asesor de tesis). Miembro de la Sociedad Química de México de 1986 a la fecha.



