

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA**



**VALIDACION DE UN METODO DE CUANTIFICACION
POR HRMN**

POR:

ADRIAN FERNANDEZ RAMIREZ

**COMO REQUISITO PARA OPTAR AL GRADO DE
MAESTRIA EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN
QUIMICA BIOMEDICA**

AGOSTO DE 2002

c.1
2002

F4
2002

QIN
2002

KOZ
2002

281

OSIJO

DE 20002

ADRIAN

FERNANDEZ

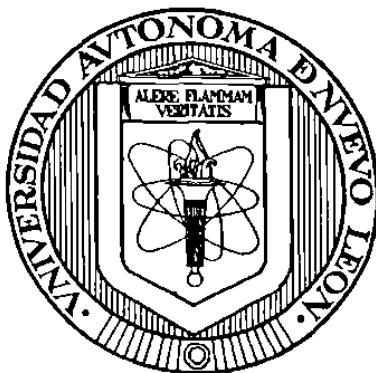
RAMIREZ



1080115949

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**VALIDACIÓN DE UN MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN POR RESONANCIA
MAGNÉTICA NUCLEAR DE HIDRÓGENO ($^1\text{HRMN}$)**

Por

Adrián Fernández Ramírez

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

AGOSTO DE 2002

TM

QP981

.K37

F4

2002



**VALIDACIÓN DE UN MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN POR RESONANCIA
MAGNÉTICA NUCLEAR DE HIDRÓGENO (¹HRMN)**

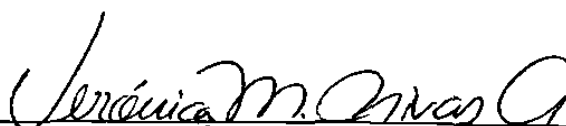
Aprobación de la Tesis:



DRA. NOEMÍ WAKSMAN DE TORRES
Director de Tesis



DRA. MARÍA DE LA LUZ SALAZAR CAVAZOS
Co-Director de Tesis



DRA. VERÓNICA MAYELA RIVAS GALINDO
Co-Director de Tesis



DR. DIONICIO A. GALARZA DELGADO
Subdirector
de Investigación y Estudios de Posgrado

**VALIDACIÓN DE UN MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN POR RESONANCIA
MAGNÉTICA NUCLEAR DE HIDRÓGENO (¹HRMN)**

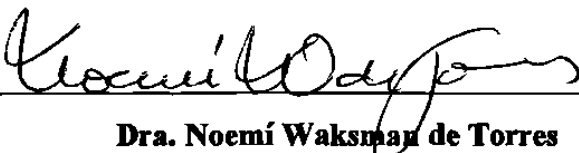
Presentado por:

Q.C.B. Adrián Fernández Ramírez

Este trabajo se realizó en los Departamentos de Química Analítica y Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la asesoría de la Dra. Noemí Waksman de Torres.

FIRMAS

Asesor



Dra. Noemí Waksman de Torres

DEDICATORIA

A MI HIJA:

Dana Eloísa

AGRADECIMIENTOS

A Dios por permitirme conocer la vida.

A mi esposa.

A mis Padres Daniel Fernández Ríos y Eloísa Gabina Ramírez Campos por su apoyo y respetar mis decisiones. Les deberé por siempre que soy.

A Daniel y Lupita por disfrutar de mis padres cuando yo no pude.

Mi sincera gratitud para la Dra. Noemí Waksman de Torres por su empatía y comprensión durante mi formación de maestría, sin olvidar claro sus observaciones justas.

A la Dra. Verónica Mayela Rivas Galindo por su apoyo en todo momento, paciencia y por enseñarme a manejar el programa del instrumento de RMN.

A la Dra. María de la Luz Salazar Cavazos por que sus consejos y observaciones.

Al Dr Adolfo Caballero Quintero por esclarecer mis dudas del manejo de instrumento de RMN.

A TLC Ivonne Carrera, Q.B.P. Lucia Cenicerros , Q.C.B. Blanca Alanis , MC. Alejandro Pérez, por su amistad sincera.

A todos ustedes “Gracias”

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
1. INTRODUCCION.....	1
1.1 Peroxisomicina A1.....	1
1.2 Resonancia Magnética Nuclear.....	7
1.3 Objetivos.....	12
1.3.1 Objetivo general.....	12
1.3.2 Objetivos específicos.....	12
2. MATERIAL Y METODOS.....	13
2.1 Material.....	13
2.1.1 Material y equipo.....	13
2.1.2 Solventes.....	13
2.1.3 Reactivos.....	14
2.2 Métodos.....	15
2.2.1 Obtención de espectro de PA1 e IPA1 y selección de señales para cuantificación.....	15
2.2.2 Selección del estándar interno.....	15
2.2.3 Repurificación de la PA1.....	15
2.2.4 Optimación de parámetros.....	16
2.2.5 Calculo del tiempo de relajación longitudinal.....	17
2.2.6 Procesamiento de los espectros.....	18
2.2.7 Cuantificación de PA1 e IPA1.....	18
2.2.8 Construcción de la gráfica de calibración.....	19
2.2.9 Determinación de los parámetros de validación del método de cuantificación	19
2.2.9.1 Linearidad.....	19

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
2.2.9.2 Precisión del instrumento.....	20
2.2.9.3 Precisión del método.....	21
2.2.9.4 Exactitud.....	21
2.2.9.5 Límite de detección.....	21
2.2.9.6 Límite de cuantificación.....	22
2.2.9.7 Estabilidad.....	22
2.2.9.8 Robustez.....	23
2.2.9.9 Condiciones para la obtención de los espectros.....	23
3. RESULTADOS.....	24
3.1 Espectros de los compuestos estudiados.....	24
3.2 Selección del estándar interno.....	26
3.3 Repurificación de PA1.....	28
3.4 Optimación de parámetros para la obtención del espectro de ¹ HRMN	30
3.5 Determinación de los parámetros de validación del método de cuantificación.....	33
3.5.1 Linearidad.....	33
3.5.2 Precisión del instrumento.....	35
3.5.3 Precisión del método.....	35
3.5.3.1 Peroxisomicina A1.....	35
3.5.3.2 Isoperoxisomicina A1.....	35
3.5.4 Exactitud.....	35
3.5.5 Límite de detección.....	36
3.5.6 Límite de cuantificación.....	36
3.5.7 Estabilidad.....	36
3.5.8 Robustez.....	39
4. DISCUSIÓN.....	41
5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	48
5.1. Conclusiones.....	48
5.2. Perspectivas.....	49
BIBLIOGRAFÍA.....	50

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I	Componentes tóxicos de la <i>K. humboldtiana</i>	1
II	Porcentaje de toxinas presentes en diferentes especies del género <i>Karwinskia</i>	3
III	Algunos de los compuestos aislados de la <i>K. parvifolia</i>	4
IV	Parámetros a evaluar en los lotes de producción de la PA1.....	5
V	Tiempos de retención de antracenosas diméricas de la <i>K. parvifolia</i>	6
VI	Medición de la relación de áreas entre la señal de PA1 respecto de la IPA1, con un valor de 100 al área del singulete de la PA1.....	10
VII	Parámetros evaluados para la robustez en la determinación de PA1.....	39
VIII	Parámetros evaluados para la robustez en la determinación de IPA1....	39
IX	Resultados obtenidos del método validado.....	40
X	Comparación del método validado frente a otros métodos de cuantificación de IPA1.....	47

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1 Cromatograma donde se muestra la separación entre la PA1 e IPA.....	6
2 Gráfico de la linealidad de la respuesta de la ¹ HRMN.....	10
3 Secuencia de pulsos de recobro de la inversión (Programa de pulsos t1ir).....	17
4 Ampliación del singulete alifático del espectro de ¹ HRMN del tereftalato de metilo.....	20
5 Espectro de ¹ HRMN de PA1 en DMSO-d6.....	24
6 Espectro de ¹ HRMN de la IPA1 en DMSO-d6.....	25
7 Espectro de ¹ HRMN del tereftaldehído.....	26
8 Espectro de ¹ HRMN del diacetilbenceno.....	26
9 Espectro de ¹ HRMN del tereftalato de metilo.....	27
10 Espectro de ¹ HRMN del diiodobenceno.....	27
11 Ampliación del espectro de ¹ HRMN de 5 mg del L-85, donde se observa el remanente de IPA1.....	29
12 Zona de interés del espectro de ¹ HRMN de 5 mg de PA1 L-85 repurificada por CEM, con su respectiva ampliación donde se aprecia el singulete de IPA1.....	29
13 Gráfico de la relación señal-ruido respecto del número de barridos (ns) para la PA1.....	30
14 Gráfico de la relación señal-ruido respecto del número de barridos para la IPA1.....	31
15 Gráfico de la relación señal-ruido (S/N) respecto del Tiempo de adquisición (AQ) para la PA1.....	31
16 Gráfico de la relación señal-ruido respecto del AQ para la IPA1.....	32
17 Gráfico de la relación señal-ruido respecto del D1 en la PA1.....	32
18 Gráfico de la relación señal-ruido respecto del D1 para la IPA1.....	33
19 Zona de interés del espectro de ¹ HRMN de 5 mg de PA1 del lote 85 con 2 mg del tereftalato de metilo en 0,5 mL de DMSO-d6.....	34
20 Gráfico de calibración para la IPA1.....	34
21 Estabilidad del tereftalato de metilo en DMSO-d6 a 25 °C.....	37
22 Estabilidad de la PA1 en DMSO-d6 a 25 °C.....	38
23 Estabilidad de la IPA1 en DMSO-d6 a 25 °C.....	38
24 Gráfico del decaimiento libre de inducción (FID) de uno de los espectros obtenidos.....	44

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

°C	Grados Celsius
¹ H RMN	Resonancia Magnética Nuclear de hidrógeno
AQ	Tiempo de adquisición
CEM	Cromatografía de Exclusión Molecular
CV	Coefficiente de Variación
D1	Valor instrumental que esta en función del T1 y sus unidades son los segundos
DAB	Diacetil benceno
DIB	Diiodo benceno
TM	Tereftalato de metilo
h	Hora
IPA1	Isoperoxisomicina A1
LC	Límite de cuantificación
LD	Límite de detección
m	Pendiente
mg	Miligramo
mL	Mililitro
ns	Número de barridos
PA1	Peroxisomicina A1
ppm	Partes por millón, unidades del desplazamiento químico en el eje X de un espectro de RMN
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
S	Desviación estándar
s	Segundos
S/N	Relación señal ruido
T1	Relajación Longitudinal
TA	Tereftaldehído
R	Coefficiente de correlación
µg/mL	Microgramo por mililitro
CLAR	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución
Acq	Adquisición
π	Pulso de 90°
π/2	Pulso de 180°
FID	Free Induction Decay
DMSO-d6	Dimetil sulfóxido deuterado
I	Número cuántico de espín
EI	Estándar interno

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

Min	Minuto
MHz	Megahertz
^{13}C	Carbono trece
zgdc	Programa de pulsos para le desacople de ^{13}C
FR	Factor de respuesta

RESUMEN

Adrián Fernández Ramírez

Fecha de Graduación: Agosto de 2002

Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Medicina

Título del estudio:

VALIDACIÓN DE UN MÉTODO
DE CUANTIFICACIÓN POR
RESONANCIA MAGNÉTICA
NUCLEAR DE HIDRÓGENO
(¹HRMN)

Número de páginas: 54

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

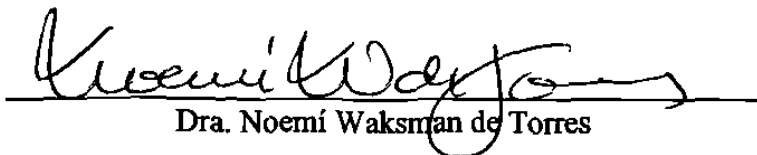
Área de Estudio: Química Analítica

Propósito y método del estudio:

La peroxisomicina A1 (PA1) es un potencial agente antineoplásico que se extrae a partir del fruto de *Karwinskia parvifolia*. Esta sustancia presenta 6 patentes para su uso como agente antineoplásico; además se encuentra en estudios de fase clínica I. Por este motivo la PA1 se encuentra sometida a un estricto programa de control de calidad que involucra varios métodos analíticos; aún es necesario contar con métodos alternativos que nos permitan conocer la cantidad de contaminantes presentes en el producto purificado de este compuesto. En la presente investigación se validó un método de cuantificación por Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno que nos permitió saber la cantidad de Isoperoxisomicina (contaminante) en los lotes de producción de PA1. El rango a evaluado fue de 0,102 a 0,362 mg/mL, $r = 0,999$, la precisión del método fue 4,3 % como C.V. de los factores de respuesta, LD 29 µg/mL, LC 87 µg/mL, y exactitud de 4,0 % medido como error absoluto. Además, se logró disminuir en un 82 % la cantidad de IPA1 por medio de CEM con una recuperación del 50 %.

Conclusiones y contribuciones. Se validó un método de cuantificación por ¹HRMN para la IPA1 en muestras de PA1. Este método contribuirá a mejorar el control de la calidad de la PA1 y sienta las bases para la cuantificación de otros compuestos por esta técnica.

FIRMA DEL ASESOR



Dra. Noemí Waksman de Torres

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Peroxisomícin A1

En el año de 1975, Dreyer y cols¹ aislaron e identificaron 4 compuestos a partir de extractos clorofórmicos de las semillas del fruto de la *Karwinskia humboldtiana*: T544, T496, T516, T514 (Tabla 1); dichas sustancias se reportaron como los principales componentes tóxicos de esta planta responsables de la neuropatía paralítica no inflamatoria progresiva y simétrica que la ingestión de la misma produce, que inicia en las extremidades inferiores y termina con parálisis respiratoria.

Tabla 1. Componentes tóxicos de la *K. humboldtiana*.

<i>Abreviatura</i>	<i>Formula Condensada</i>	<i>Compuesto</i>
T544	C ₃₂ H ₃₂ O ₈	7-[3',4-Dihidro-7',9'-dimetoxi-1',3'-dimetil-10'-hidroxi-1'H-naftol[2',3'-c'] piran-5'yl]-3,4-dihidro-3-metil-3,8,9,-trihidroxi-1(2H)-antracena
T496	C ₃₀ H ₂₄ O ₇	3,4-Dihidro-3,3'-Dimetil-1',3,8,8',9-penta hidroxi (7,10'-biantraceno)-1,9'(2H,10'H)-diona
T516	C ₃₀ H ₂₈ O ₈	7-(2'-Aceto-6',8'-dimetoxi-3'-metil-1'-hidroxinaft-4'-yl)-3,4-dihidro-3-metil-3,8,9,-trihidroxi-1(2H)-antracena
T514	C ₃₀ H ₂₆ O ₈	3,3'-dimetil-3,3', 8, 8', 9, 9'-hexahidroxi-3,3', 4, 4'-tetrahidro (7,10'-biantraceno)-1, 1'(2H,2'H) - diona

Dreyer, D., Arai, I., Bashman, C., Anderson, W., Smith, R. and Daves, D. "Toxins causing non inflammatory paralytic neuropathy. Isolation and structure elucidation". J. Am. Chem. Soc. 97. pp 4985. (1975)

Más tarde, en 1981 en el Departamento de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L., se inició una línea de investigación, la cual tenía como objetivo aislar los productos del fruto de la *K. humboldtiana* con la finalidad de analizar su posible uso terapéutico. Para realizar las diversas investigaciones planteadas en ese momento, fue necesario obtener mayor cantidad del compuesto.

Waksman y cols², investigaron desde el punto de vista químico a otras especies del género *Karwinskia* con el objetivo de conocer la especie que producía mayor cantidad de T-514 y a su vez poder aislar compuestos de estructura similar a ella. En este estudio, se demostró que las especies que resultaron con mayor cantidad de T514 fueron la *K. subcordata* y *K. parvifolia*. (Tabla 2). Estas dos plantas se evaluaron en cuanto a su contenido de T 514 y resultó ser mejor fuente de esta toxina la *K. parvifolia*³, ya que posee menor cantidad de contaminantes; razón por la que desde entonces se utiliza esta planta para dicho fin.

La toxina siguió bajo estudio y fue hasta el año de 1990 en que Piñeyro y cols.⁴, reportan que la T514, presentó toxicidad selectiva *in vitro* en células malignas de origen humano; lo anterior se logró por comparación de la toxicidad de la T514 frente a sustancias anticancerígenas conocidas, como la vincristina, 5-fluorouracilo, mitomicina, doxorubicina, y epidoxurubicina.

A partir de los resultados del trabajo anterior, la T514 ha continuado en investigaciones en el departamento de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L., para comprobar su posible uso como fármaco antineoplásico.

Se han realizado diversas investigaciones para conocer los efectos *in vitro* de la T514. Se demostró que ejerce un efecto inhibitorio sobre la lipidoperoxidación microsomal hepática estimulada por Fe^{+2} -ADP y NADPH, por lo que se sugirió una posible la formación de quelatos con Fe^{+2} y una actividad antioxidante⁵.

Por otro lado se encontró también que es un inhibidor no competitivo de la catalasa *in vitro*⁶ además de que presentó un efecto selectivo sobre la membrana peroxisomal de levaduras metilotróficas que sugirió que los Peroxisomas fueran el organelo blanco, razón por la que se le otorgó el nombre de Peroxisomicina A1 (PA1)⁷.

Tabla 2. Porcentaje de toxinas presentes en diferentes especies del género *Karwinskia*.

Especie	% de T544	% de T496	% de T514
<i>K. humboltiana</i> ^a	1,60	0,80	0,70
<i>K. humboltiana</i> ^b	0,70	0,58	0,36
<i>K. mollis</i>	1,33	1,08	0,95
<i>K. umbellata</i>	0,75	0,50	0,05
<i>K. subcordata</i>	1,51	0,98	1,07
<i>K. latifolia</i>	-	1,10	0,50
<i>K. parvifolia</i>	-	1,58	2,04
<i>K. calderonii</i>	0,75	2,00	0,70
<i>K. rzedowskii</i>	-	1,60	-
<i>K. venturae</i>	-	0,11	-
<i>K. tehuacana</i>	0,83	0,40	0,33

a) Villa de García, Nuevo León, México. b) Linares, Nuevo León, México.

Waksman, N., Martínez, L. y Fernández., R. "Screening chemical and toxicological in genus *Karwinskia* (México)". Rev. Latinoam. Quim. 20. pp 27. (1989)

En los años siguientes, con ayuda de las técnicas cromatográficas como CCF, CLAR preparativo y analítico, se descubrieron varios isómeros de la PA1 extraídos de la misma planta^{8,9}. Estos compuestos, se identificaron como antracenonas diméricas los cuales tienen estructuras químicas relacionadas entre sí, a tal grado que poseen características fisicoquímicas semejantes y esto es lo que dificulta su separación en la purificación de este compuesto.

Al principio fue alentador encontrar isómeros que eran potenciales compuesto con toxicidad selectiva, pero la existencia de varios compuestos de estructura similar originaba confusiones, de modo que se optó por resolver este problema modificando la nomenclatura usada hasta entonces.

Para los compuestos encontrados se optó utilizar el nombre de Peroxisomicina a todos los diastereoisómeros de la T514 aislada originalmente por Dreyer en 1975, es decir, compuestos que tuvieron sitios de unión 7,10'; e Isoperoxisomicina a los isómeros de posición con unión 7,7'. Por otro lado, basados en la nomenclatura establecida por Steglich y Gill¹⁰, se denominó como atropoisómero de la serie A, a aquellos que presentan efecto Cotton positivo a longitud de onda corta en las curvas de Dicroísmo Circular y como atropoisómero de la serie B, a aquellos que presentan efecto Cotton negativo a longitud de onda larga; de ahí que la letra A y B esta dada por el resultado experimental obtenido por las curvas de Dicroísmo Circular¹¹.

De acuerdo a lo antes mencionado, actualmente se conocen en el Departamento de Farmacología Toxicología de la U.A.N.L. varios isómeros aislados de *K. parvifolia* (Tabla 3.)

Tabla 3. Algunos de los compuestos aislados de la *K. parvifolia*.

<i>Abreviatura</i>	<i>Nombre trivial</i>	<i>Nombre Químico</i>	<i>Investigador</i>
PA1 (T514)	Peroxisomicina A1	3,3'-dimetil-3,3', 8, 8', 9, 9'-hexahidroxi-3,3', 4, 4'-tetrahidro (7,10'-biantraceno)-1, 1'(2H,2'H) - diona. ²	Dreyer y cols. 1975 ¹
PA2	Peroxisomicina A2	3,3'-dimetil-3,3', 8, 8', 9, 9'-hexahidroxi-3,3', 4, 4'-tetrahidro (7,10'-biantraceno)-1, 1'(2H,2'H) - diona. ²	Ramírez y cols. 1992 ⁹
PA3	Peroxisomicina A3	3,3'-dimetil-3,3', 8, 8', 9, 9'-hexahidroxi-3,3', 4, 4'-tetrahidro (7,10'-biantraceno)-1, 1'(2H,2'H) - diona. ⁵	Rivas y cols. 1995 ⁸
PA4	Peroxisomicina A4	3,3'-dimetil-3,3', 8, 8', 9, 9'-hexahidroxi-3,3', 4, 4'-tetrahidro (7,10'-biantraceno)-1, 1'(2H,2'H) - diona. ⁵	Rivas y cols. 2002
IPA1	Isoperoxisomicina A1	3,3'-dimetil-3,3', 8, 8', 9, 9'-hexahidroxi-3,3', 4, 4'-tetrahidro (7,7'-biantraceno)-1, 1'(2H,2'H) - diona. ⁵	Rivas y cols. 1995 ⁸
IPA2	Isoperoxisomicina A2	3,3'-dimetil-3,3', 8, 8', 9, 9'-hexahidroxi-3,3', 4, 4'-tetrahidro (7,7'-biantraceno)-1, 1'(2H,2'H) - diona. ⁵	Rivas y cols. 1998

De los compuestos que se mencionan en la tabla 3, la PA1 es la que se encuentra en estudios de fase clínica I y actualmente cuenta con 6 patentes para uso farmacológico; de ahí que ésta se intente purificar a gran escala.

Hoy en día la producción de la PA1 está sometida a un estricto programa de control de calidad el cual se divide en estudios Físicoquímicos y Biológicos¹¹, tal como se muestra en la Tabla 4, donde se presentan los parámetros que se evalúan y los respectivos valores esperados para contar con un lote idóneo para los proyectos de investigación.

Tabla 4. Parámetros a evaluar en los lotes de producción de la PA₁.

<i>Pruebas Físicoquímicas</i>	<i>Valores de referencia</i>
Punto de Fusión Inicial	179,24 ± 1,54 °C
Punto de Fusión Final	181,37 ± 1,20 °C
CCF-FN	Identificación Visual
CCF-FR	Identificación Visual
Pureza Espectroscópica	Absorbancia 430nm/415 nm = 1,003 ± 0,003
CLAR-FR	Registro de un solo pico y evaluación de la pureza espectroscópica
<hr/>	
<i>Pruebas Biológicas</i>	
Inhibición de la Catalasa	% Inhibición = 46,58 ± 1,32
Citotoxicidad	CT50 Chang = 56-80 µg/mL CT50 HEPLC/PRE/5 = 2,5 -10 µg/mL

Molina S., G., "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. México. (1998)

En el proceso de purificación de PA1, se ha reportado hasta la fecha que la PA2 se separa bien de la PA1 en CLAR-FR, y que la PA3 e IPA1 tienen tiempos de retención (t_R) semejantes a la PA₁ tanto en columna C₈ como en columna C₁₈; de manera que este hecho genera problemas en la purificación de la PA1¹². En la Tabla 5, se muestran los t_R encontrados para algunas de ellas.

Tabla 5. Tiempos de retención de antracenas diméricas de la *K. parvifolia*.

<i>Compuesto</i>	<i>Columna C₈ minutos</i>	<i>Columna C₁₈ minutos</i>
PA ₂	1,66	1,64
PA ₁	2,65	2,43
T516	2,85	2,42
PA ₃ (Y)	2,55	2,85
IPA ₁ (X)	3,00	3,17
T496	6,92	6,99

Salazar M. L., Piñeyro. A., Waksman, N. "A Reverse Phase HPLC Method for Quantification of Peroxisomicine and other Anthracenonic compounds". *J. Liq. Chrom. And Rel. Tech.* 19 (9), 1391-1403, (1996)

Se han reportado varios métodos para cuantificar la IPA1 presentes en los lotes de PA1 entre los cuales se encuentra UV-Vis¹¹ y CLAR.^{12,13}

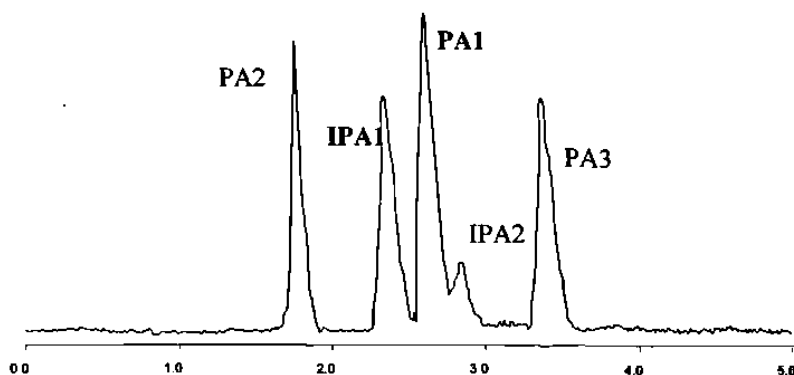


Figura 1. Cromatograma donde se muestra la separación entre la PA1 e IPA1

En la figura 1 se presenta el cromatograma obtenido por Osorio y cols¹³, donde podemos ver que las diferencias de los tiempos de retención entre la PA1, Peroxisomicina (PA2) y Peroxisomicina (PA3) son lo suficientemente grandes y no representan problemas en la separación, sin embargo la diferencia en los tiempos de retención entre la Isoperoxisomicina (IPA1) y PA1 es muy estrecho de manera que esto presenta dificultades en la separación y hace difícil remover la IPA1. Por otra parte, se presenta una situación atípica donde el t_R de la IPA1 varía conforme envejece la

columna, esto es, cuando la columna es nueva el t_R de la IPA1 es menor que de la PA1 y en etapas posteriores el t_R es mayor; por lo que dificulta su cuantificación por CLAR¹¹.

Por la razón, anterior nos vimos en la necesidad de contar con métodos alternativos que permitan realizar la medición de la IPA1 sin que se presente el problema del traslape de señales.

1.2 Resonancia Magnética Nuclear

A pesar de que se han realizado intentos para mejorar la técnica de purificación, los lotes que se obtienen actualmente aún presentan remanentes de contaminantes. En función de lo antes mencionado, se planteó la posibilidad de utilizar la Resonancia Magnética Nuclear (RMN) como técnica alternativa para cuantificar el contaminante más difícil de remover (IPA1) de los lotes purificados de la PA1, ya que aún después de la purificación quedan remanentes de IPA1 que se hacen evidentes por ¹HRMN.

Esto traería como consecuencia que el método a desarrollar se aplique al resto de los contaminantes, para que en el futuro se reporte en cada lote el porcentaje de pureza del mismo y en definitiva constituiría una prueba más que se pudiera agregar al programa de control de calidad ya existente.

La Resonancia Magnética Nuclear (RMN) es una técnica ampliamente utilizada para el análisis estructural de compuestos orgánicos; dicha técnica se fundamenta en la absorción de radiofrecuencias por un núcleo atómico ($I \neq 0$) sometido a un campo magnético.

La Resonancia es una herramienta cuantitativa desde su aparición, esto es debido a que la señal que se obtiene es directamente proporcional al número de núcleos que le dan origen; sin embargo, el limitado campo magnético provocaba que esta técnica fuera poco sensible y de baja utilidad cuantitativa frente a las técnicas de cuantificación tradicionales, como son las espectroscópicas o cromatográficas.

La literatura sobre la utilidad de la RMN en forma cuantitativa no es abundante; sin embargo, en las décadas de los años 1980 y 1990 se vio un aumento considerable acerca de este tipo de información; el hecho anterior se presentó a raíz de la aparición de instrumentos desarrollados con nueva tecnología que ha permitido que sean de mejor resolución y también de fácil operación, trayendo consigo un incremento en el uso de esta herramienta con fines cuantitativos. La aplicación cuantitativa se ha visto favorecida por el incremento de sensibilidad debido a que los instrumentos cuentan con campos magnéticos más potentes, lo cual hace que sea mayor la diferencia de energía entre núcleos a analizar y por lo tanto que la señal obtenida sea más intensa con menor cantidad de muestra; esto nos lleva a mencionar que las limitaciones tecnológicas propias de la época, mermaron el uso de la resonancia como herramienta cuantitativa aunado al alto costo de los instrumentos.

Por su parte, Wallace¹⁴ en 1984 afirmó que las mezclas de compuestos orgánicos pueden ser cuantificadas por RMN, siempre y cuando las señales de cada componente se puedan integrar. Además pone de manifiesto que las integraciones dejan de ser relativas y se convierten en absolutas cuando se utiliza un estándar interno.

En 1988, Peterson¹⁵ reporta la utilización de esta técnica como herramienta cuantitativa e ilustra los principios generales de un método. Se determina la cantidad de un analito por comparación de la razón de intensidades de las señales analito/estándar.

Por otro lado, W. Clarke¹⁶ en 1997 determina la cantidad de acetona y acetato de etilo contenidos en algunos removedores de esmaltes para uñas, obteniéndose en dicho estudio una recuperación del 96 al 98 %.

Los trabajos anteriores, carecen de información técnica sobre la obtención de los espectros, además de que no se especificaron los valores de la ecuación de la recta ni aportaron datos como la precisión, exactitud, límite de detección o de cuantificación.

Dentro de los trabajos más completos de cuantificación encontrados hasta el momento, cabe mencionar el reportado por P. P. Lankhorst y cols¹⁷ donde determinaron la cantidad de dos contaminantes en el producto de interés denominado Lovastatina, fármaco que se utiliza para disminuir la concentración del colesterol en sangre.

La Lovastatina obtenida como producto de la fermentación de cepas de *Aspergillus terreus* se purificó por cristalización. Para la cuantificación utilizaron dos instrumentos, Bruker AMX de 400 y 600 MHz, ambos equipados con una sonda de 5 mm inversa, la duración del pulso aplicado fue de 8,5 μ s correspondiente a un pulso de 90° además de utilizar 30 segundo entre pulsos, el número de barridos fue de 34 con una duración de 18 minutos. Las cantidades encontradas de Lovastatina fueron del 96 a 98 %, mientras que para la Dihidrolovastatina y Dehidrolovastatina fueron de 0,1 y 0,3 % respectivamente. La RMN les dió información cuantitativa no sólo de la Dihidrolovastatina y la Dehidrolovastatina, sino también de otros contaminantes tales como subproductos de la fermentación y residuos de solventes.

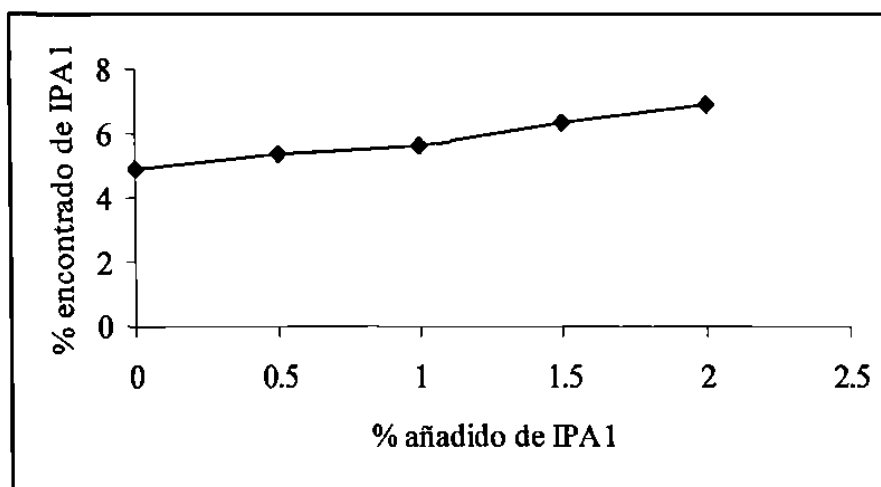
Pauli,¹⁸ comprueba que la QRMN es una manera rápida y eficiente para evaluar la pureza de productos naturales ya que se obtiene información acerca de la estructura y pureza al mismo tiempo, realizando esto en un solo paso analítico sin la necesidad de hacer múltiples análisis.

Por otro lado, Fernández y cols.¹⁹ realizaron un trabajo donde se reportaron los ensayos previos para aplicar la técnica de ¹HRMN como herramienta cuantitativa en los lotes purificados de PA1; en el cual se utilizó un equipo Bruker de 400 MHz, se probó tanto la sonda normal como la inversa, además se evaluaron solventes como DMSO-d₆ y CDCl₃. Las señales que se utilizaron en los ensayos son los singuletes a 7,13 y 7,07

ppm para la PA1 e IPA1 respectivamente. En este trabajo se probó la linealidad de esta técnica añadiendo las cantidades de 0,5%, 1,0%, 1,5%, 2,0% de IPA1 a un tubo de RMN donde previamente se tenía 15 mg de PA1. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Medición de la relación de áreas entre la señal de PA₁ respecto de la IPA₁, dando un valor de 100 al área del singulete de la PA₁

Porcentaje añadido de IPA1 al tubo de RMN	% obtenido
0	4,85
0,5	5,38
1,0	5,61
1,5	6,36
2,0	6,88



Fernández R. A., Rivas G. V., Salazar C. M., Piñeyro L. A., Caballero Q. A., Waksman de T. N.,
 "Uso de ¹H RMN para el Control de Calidad de Fármacos" IV Simposio de Ciencia
 y Tecnología. 24 y 25 de Mayo de 1999

Figura. 2. Gráfico de la linealidad de la respuesta de la RMN

Los datos de la ecuación de la recta fueron los siguientes: se obtuvo un intercepto de 4,77, una pendiente de 1,26, con un coeficiente de correlación de 0,999, todos estos con 5 niveles de concentración diferente. Además en este trabajo se propusieron dos métodos de cuantificación, uno de ellos consiste en la cuantificación directa de la IPA1 en los lotes de PA1 por medio de la medición de la razón de áreas entre los dos singuletes mencionados; mientras que en el segundo método (Adición de estándar) se agregó cinco veces una cantidad conocida de la IPA1 a un tubo de RMN donde se tenía la solución de la muestra problema. En este segundo método se obtuvo la concentración de la IPA₁ por extrapolación hacia el eje x ($y = 0$).

El trabajo antes mencionado, resultó útil para hallar la cantidad de IPA1 en lotes de PA1, pero tiene la desventaja de que las mediciones obtenidas son relativas a la señal de PA1 de manera que la medición considera la existencia de un solo contaminante situación que no es del todo real, esto además de que carece de parámetros de validación.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general

Validar un método de cuantificación por Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno ($^1\text{HRMN}$)

1.3.2 Objetivos específicos:

- 1.-Purificar la Peroxisomicina A_1 por medio de la Cromatografía de Exclusión Molecular.
- 2.-Seleccionar un estándar interno para cuantificar la PA1 e IPA1 en los lotes de PA1 del Departamento de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina de la UANL.
- 3.- Optimar los parámetros de obtención del espectro de $^1\text{HRMN}$.
- 4.-Determinar los parámetros de validación como son la linealidad, precisión del instrumento y del método, exactitud, límite de detección, límite de cuantificación, estabilidad y robustez.

CAPÍTULO 2

MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Material

2.1.1. Material y Equipo

Cromatógrafo de líquidos Hewlett-Packard Modelo 1090 con arreglo de diodos.

Columna FR ODS de 100 x 2,1 mm con tamaño de partícula de 3 μ m.

Espectrómetro de Resonancia Magnética Nuclear de 400 MHz marca Bruker modelo Avance DPX.

Sondas: 5 mm BBI, 5 mm BB0, 2,5 mm BBI.

Colector de Fracciones BIO-RAD Model 2128

Balanza analítica: Sartorius Basic BA110S

Tubos para RMN 5mm x 7 pulgadas Ultra imperial. Aldrich Chem. Co.

2.1.2. Solventes:

DMSO-d₆ 99,5 + atom % D. Aldrich Chem. Co.

Metanol grado HPLC

Acetonitrilo grado HPLC

2.1.3 Reactivos:

Terftaldehido (TA) 99 %. PM 134 g/mol. Aldrich Chem. Co.

Terftalato de metilo (TM) 99 %. PM 194 g/mol. Aldrich Chem. Co.

1,4-diacetilbenceno (DAB) 99 %. PM 162 g/mol. Aldrich Chem. Co.

1,4-diyodobenceno (DIB) 99 %. PM 329 g/mol. Aldrich Chemical Co.

PA1 e IPA1 aportadas por el laboratorio de producción de Peroxisomicina A1 del Depto. de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L.

Fase estacionaria de la CEM: Sephadex LH Aldrich Chem. Co.

2.2 Métodos

2.2.1 Obtención de espectros de PA1 e IPA1

Se realizó la obtención del espectro de $^1\text{HRMN}$ de 5 mg de PA1 e IPA1, disueltas en 0,5 mL de DMSO- d_6 .

2.2.2 Selección del estándar interno

Se utilizó el manual Aldrich Chemical Co.²⁰ de $^1\text{HRMN}$ donde se buscó compuestos que tuvieran espectros con pocas señales, con un singulete aromático cuyo desplazamiento no interfiriera en la zona de integración del singulete de la PA1 e IPA1; por otra parte, que fuera soluble en DMSO- d_6 , estable, no volátil y además accesible en el mercado.

En forma preliminar se seleccionaron: Tereftaldehído (TA), Tereftalato de metilo (TM), 1,4-diacetilbenceno (DAB), 1,4-diiodobenceno (DIB).

Para hacer la selección definitiva del estándar interno, se realizó el espectro de hidrógeno de cada compuesto y además se realizó el cálculo del T1 (Relajación Longitudinal). El mejor candidato sería aquel que no tuviera contaminantes y que su T1 fuera pequeño.

2.2.3 Repurificación de PA1

Se utilizó una columna de 10 cm de largo por 1 cm de ancho la cual se empacó en el laboratorio de la siguiente manera: Se realizó una suspensión de 10 g de Sephadex

LH en metanol, a la cual se le realizaron 3 lavados con metanol en agitación constante durante una hora cada uno.

Antes de iniciar la corrida cromatográfica se dejó estabilizar la fase estacionaria por 5 minutos con un flujo de 2 mL/min empleando para esto una solución de metanol, con 0,1 % de ácido acético. Ya estabilizada la columna, se preparó una solución de 100 mg de PA1 L-85 en 5 mL de metanol y se pasó a través de la columna. Finalmente se obtuvieron 12 fracciones de 2 mL cada una con ayuda de un colector de fracciones.

Las fracciones obtenidas, fueron monitoreadas por CLAR con el método optimado por A. Osorio y cols¹³. Posteriormente, se juntaron las fracciones que presentaron un cromatograma semejante verificando la pureza por medio de la obtención del espectro UV-VIS en diferentes regiones del pico cromatográfico.

De esta manera, se obtuvieron 3 fracciones finales, las cuales fueron evaporadas y precipitadas mediante la técnica ya estandarizada.

2.2.4 Optimación de parámetros.

La selección de señales para cuantificar tanto la PA1 como la IPA1 fueron las mismas que se utilizaron en el trabajo realizado por Fernández y cols.¹⁹. Previo a realizar la optimación de los parámetros se realizó la obtención de los espectros de ¹HRMN, de la PA1 e IPA1 en DMSO-d₆ para verificar el desplazamiento de las señales del hidrógeno 10 de la PA1 y los hidrógenos 10 y 10' de la IPA1.

La optimación de parámetros se realizó con PA1 (lote 85) en cantidad de 5 mg mezclada con una solución del estándar interno (0,021 M); se hicieron variaciones del número de barridos (ns), tiempo de adquisición (AQ) y del D1, posteriormente se midió la relación señal-ruido de las señales del hidrógeno 10 de la PA1 y de los hidrógenos 10 y 10' de la IPA1 en cada una de las variaciones; con los datos obtenidos anteriormente

se obtuvo un gráfico para cada parámetro y se escogió como valor óptimo a aquel que generó la máxima relación señal-ruido.

2.2.5 Cálculo del tiempo de relajación longitudinal.

Para calcular el T1 se empleó el programa del instrumento (Inversion Recovery Pulse Sequence²¹, Figura 3) que consiste en lo siguiente: comienza con un tiempo de espera (t_{rd}) que en nuestro caso es lo suficientemente largo para asegurar que toda la magnetización haya regresado al equilibrio (Magnetización $-Z$). Posteriormente se aplica un pulso de 180° lo cual invierte la magnetización, a esto le sigue un tiempo de espera (vd), luego se aplica un pulso final de 90° el cual convierte cualquier magnetización z en magnetización transversal observable; ésta fue detectada durante el periodo de adquisición inmediatamente después del pulso final. En este tipo de secuencia el T1 se determinó tras variaciones del tiempo de espera entre los pulsos de 90° y 180° ($vd = 0,01, 0,15, 0,25, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 10$ s).

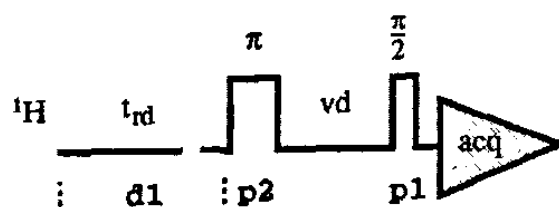


Figura 3. Secuencia de pulsos de recobro de la inversión (Programa de pulsos t1ir)

2.2.6 Procesamiento de los espectros.

Para el procesamiento de los espectros se aplicó un pulso de 90° , con un tiempo de adquisición de 0,8 s, un número de barridos de 300 y se utilizó el programa de pulsos *zgdc*. Una vez que se tuvo la FID se procedió a aplicar la transformada de Fourier para obtener el gráfico dependiente de la frecuencia, esto es, el espectro de $^1\text{HRMN}$; al cual se le corrigió la fase en forma automática. Posteriormente se calibró el espectro con la señal del solvente (DMSO- d_6) la cual se ubicó en 2,50 ppm. La integración de las señales se hizo en forma manual.

2.2.7 Cuantificación de PA1 e IPA1.

Para realizar la cuantificación por $^1\text{HRMN}$, se partió de la premisa de que la señal de resonancia es directamente proporcional a la concentración molar, y se llegó a lo siguiente:

$$g_{\text{PA1}} = (PM_a) (g_{\text{Std}}) (A_a) / (PM_{\text{Std}}) (1) = (514 \text{ g/mol}) (0,002 \text{ g}) (A_a) / (194 \text{ g/mol}) (1)$$

$$g_{\text{IPA1}} = (PM_a) (g_{\text{Std}}) (A_a) / (PM_{\text{Std}}) (2) = (514 \text{ g/mol}) (0,002 \text{ g}) (A_a) / (194 \text{ g/mol}) (2)$$

Donde:

PM_a = Peso molecular del analito

g_{Std} = gramos del estándar interno corregido con la pureza (99 %)

A_a = área de la señal del analito respecto del singulete aromático del estándar interno, calibrada a 4 hidrógenos

PM_{Std} = peso molecular del estándar interno

1 y 2 = número de hidrógenos responsables de la señal utilizada para la cuantificación en cada compuesto respectivamente.

Para que la fórmula anterior se cumpla se debe calibrar a 4 el valor del área correspondiente al singulete aromático del estándar interno.

2.2.8 Construcción de la curva de calibración.

Se preparó una solución de 4 mg del estándar interno en 1 mL de DMSO-d₆; de esta solución se tomaron 500 µL y se mezclaron con 5 mg de PA1 proveniente del lote 85 proporcionada por el laboratorio de producción del Departamento de Farmacología y Toxicología de la U.A.N.L. La mezcla antes preparada, se filtró por algodón libre de grasa y se recuperó en un tubo para RMN. A esta muestra se le realizó un espectro ¹H RMN y posteriormente se le hicieron agregados de IPA1 en cantidades que representaron un incremento del 0,5 %; se realizaron 5 agregados y se construyó un gráfico (Figura 20).

2.2.9 Determinación de los parámetros de validación del método de cuantificación

2.2.9.1 Linearidad

Se realizó por medio de la obtención de 10 agregados de IPA1 en solución a un tubo donde se tenía disuelto 5 mg de PA1 y 2 mg del tereftalato de metilo en 500 µL de DMSO-d₆. Se midió en cada agregado de IPA1 el incremento de la señal de IPA1 respecto del estándar interno, cada incremento correspondió a un 0,5 % de IPA1 respecto de la masa original de PA1. Se determinaron los valores de la ecuación de la recta y además se obtuvo el CV de los factores de respuesta. La mezcla se realizó de la siguiente manera:

- Se disolvieron 2 mg de IPA1 en 800 μL DMSO- d_6 de la cual se tomaron 10 μL para cada agregado
- Se preparó una solución de 4 mg de tereftalato de metilo en 1 mL de DMSO- d_6
- Se pesaron 5 mg de PA1 y se disolvieron con 0,5 mL de la solución del tereftalato de metilo, a esta solución se le realizó el espectro de $^1\text{HRMN}$ y después se obtuvo un espectro por cada adición (10 μL) de la solución de IPA1.

2.2.9.2 Precisión del instrumento.

Se hicieron 6 espectros de $^1\text{HRMN}$ a partir una muestra de 2 mg de tereftalato de metilo disueltos en 0,5 mL de DMSO- d_6 y se realizó la medición de las señales satélites del singulete alifático del estándar interno ubicado en 3,88 ppm, el cual fue originado por los 6 hidrógenos de los metoxilos. La medición del área de los satélites fue relativa a la señal alifática a la que se le asignó un valor de 100 (figura 4)

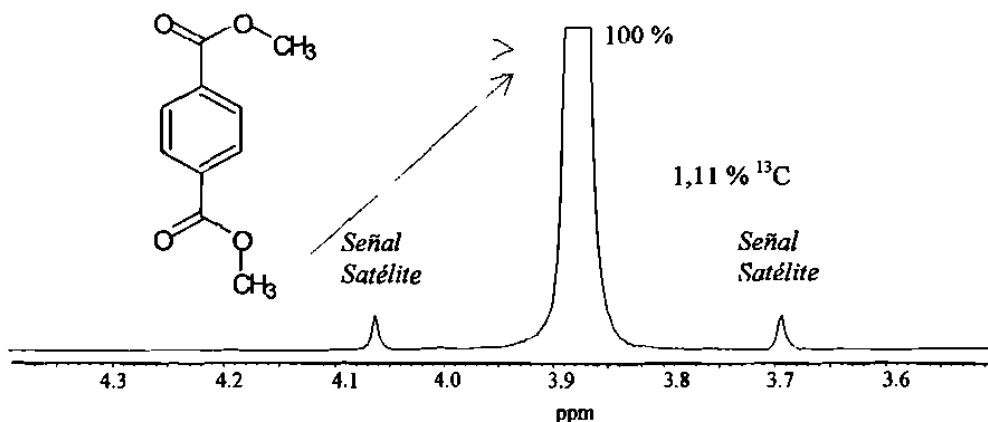


Figura 4. Ampliación del singulete alifático del espectro de $^1\text{HRMN}$ del tereftalato de metilo

2.2.9.3 Precisión del método²²

Para la IPA1, se determinó obteniendo el coeficiente de variación promedio de los factores de respuesta de cada uno de los cinco gráficos de calibración realizados. Para la PA1 se obtuvo el CV de la determinación de PA1 en 5 muestras de 5 mg cada una.

2.2.9.4 Exactitud

Se determinó el error absoluto de las mediciones de la abundancia natural del isótopo del carbono trece, calculada por la medición del área de los satélites de la señal alifática del tereftalato de metilo en el espectro de ¹HRMN (Figura 4).

En el cálculo del error absoluto, se tomó como referencia el valor de la abundancia natural de isótopo de ¹³C.

$$\% \text{ Error absoluto} = (Ve - A) * 100$$

Donde:

Ve = Valor experimental de la medición del isótopo de ¹³C en ¹HRMN

A = Abundancia natural de carbono trece reportada en la bibliografía

2.2.9.5 Límite de detección²²

Para obtener esta dato, se tomó el criterio de multiplicar 3,3 veces la desviación estándar de los interceptos entre la pendiente promedio de los cinco gráficos de calibración.

2.2.9.6 Límite de cuantificación²²

Para calcularlo, se multiplicó 10 veces la desviación estándar de los interceptos entre la pendiente promedio de los cinco gráficos de calibración.

2.2.9.7 Estabilidad

Se trabajó con una solución de 2 mg de tereftalato de metilo disuelta en 500 μ L de DMSO-d6. Se determinó el promedio de la intensidad de la señal aromática del estándar interno tras 5 repeticiones con muestras diferentes. Posteriormente se realizó la medición de la señal antes mencionada obteniendo un espectro de protón cada hora durante 10 horas.

Para la PA1 e IPA1 se determinó el promedio de la cantidad encontrada de ambas sustancias tras 5 repeticiones con muestras diferentes de PA1. Posteriormente se midió la cantidad de ambas sustancias con el método propuesto haciendo mediciones cada 30 minutos durante 10 horas.

Para hacer esto se partió de una solución de 5 mg de PA1 del lote 85 sin repurificar y se disolvieron en 500 μ L de una solución preparada con 4 mg de tereftalato de metilo disuelto en 1 mL de DMSO-d6.

Con los datos generados se construyeron las cartas control como estudio de estabilidad para el estándar interno, la PA1 y la IPA1. Se consideró que los compuestos eran estables mientras se obtuvieran valores dentro de la media \pm 2 DS.

2.2.9.8 Robustez

Para evaluar este parámetro, se realizaron variaciones con valores altos y bajos respecto de los parámetros ya optimados del método propuesto y después se realizó la cuantificación de PA1 e IPA1. Para el número de barridos se obtuvieron espectros con ns de 200 y de 400; para el D1 se utilizaron valores de 6 y 9 segundos, también se empleó una sonda menos sensible (5 mm BB0, 08) que la que se utilizó en el estudio y otra más sensible (2,5 mm BBI, 30), además se utilizaron diferentes cantidades de masa las cuales fueron 7 y 3 mg de PA1.

Para determinar si había parámetros que afectaran la cuantificación, se siguió el criterio de comparar la diferencia entre los valores alto y bajo de cada modificación (barridos, sonda, AQ, masa) y la multiplicación de la desviación estándar del estudio de precisión por la raíz cuadrada de 2. Se consideró que el parámetro afectaba la medición siempre que el valor de la diferencia fuera mayor que el segundo término de la siguiente expresión.²³

$$| \text{Valor alto} - \text{Valor bajo} | > DS * \sqrt{2}$$

2.2.9.9 Condiciones para la obtención de los espectros.

La PA1 fue sometida a 30 minutos de desecación al vacío a 35 ° C, y se disolvieron 5 mg de ésta en 500 µL de DMSO-d6. El número de barridos empleado fue de 300 con un Aq de 0,8 segundos y con un D1 de 6 segundos. La sonda de medición utilizada fue la BBI 5mm, el espectro de ¹HRMN se hizo con desacople de ¹³C y a una temperatura de 25 °C.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS

3.1 Espectros de $^1\text{HRMN}$ los compuestos estudiados

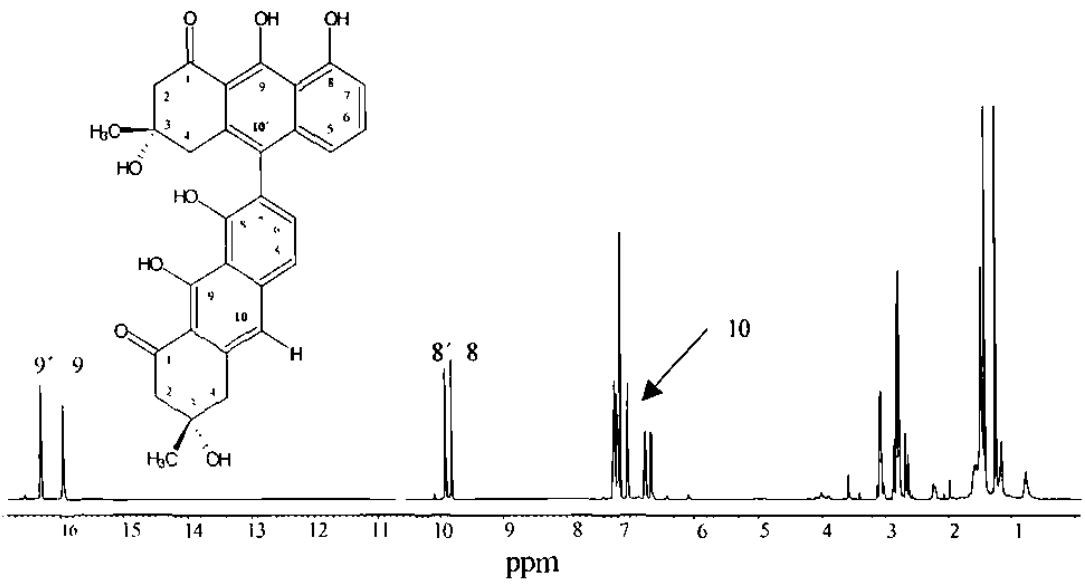


Figura 5. Espectro de $^1\text{HRMN}$ de PA1 en DMSO-d₆.

En la figura 5 podemos observar el singulete utilizado para cuantificar dicha sustancia (7.23 ppm) el cual es originado por el hidrógeno 10.

Por otro lado, la señal utilizada para cuantificar a la IPA1 fue el singulete con desplazamiento a 7,16 ppm el cual se muestra en el espectro de la figura 6, la señal se originó por los hidrógenos 10 y 10'.

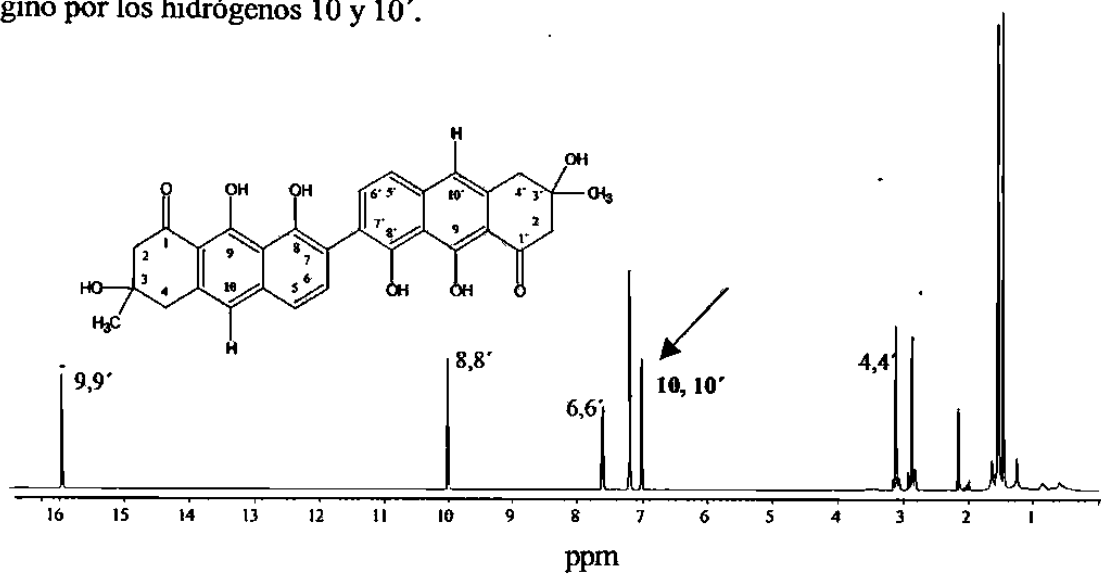


Figura 6. Espectro de ^1H RMN de la IPA1 en DMSO- d_6

3.2 Selección del estándar interno.

En las figuras 7, 8, 9, y 10 se presentan los espectros de los cuatro posibles estándares para cuantificar PA1 e IPA1.

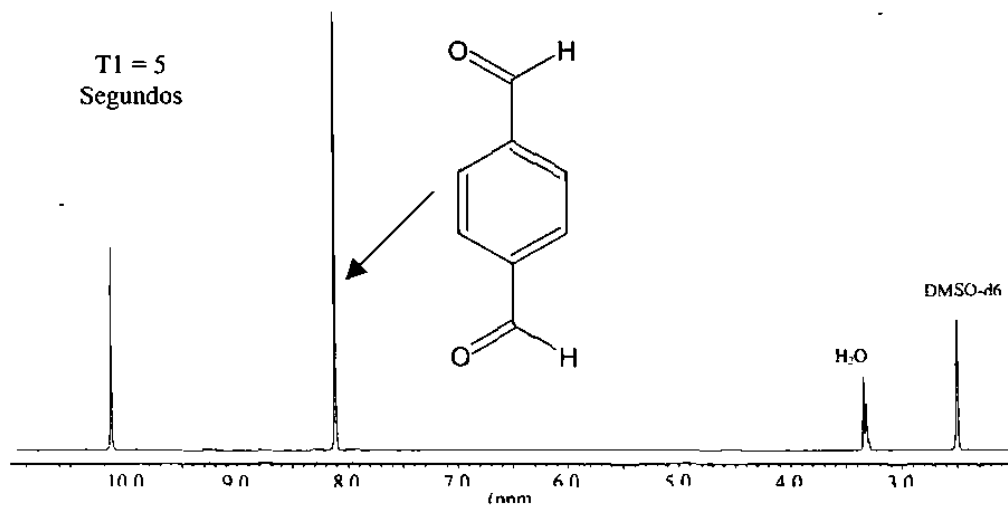


Figura 7. Espectro de ¹HRMN del tereftaldehído

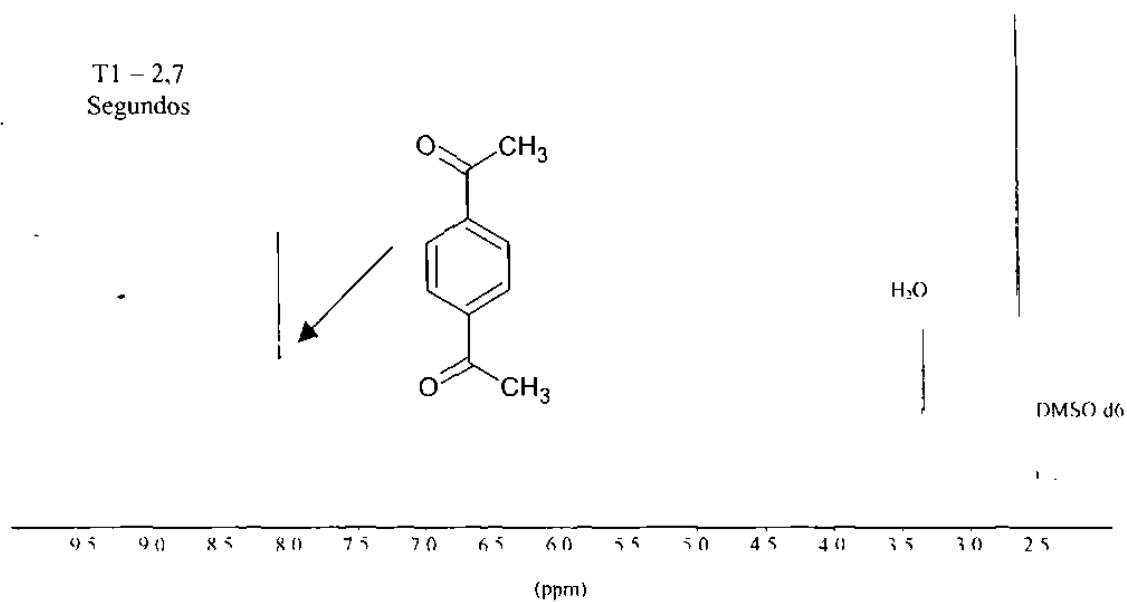
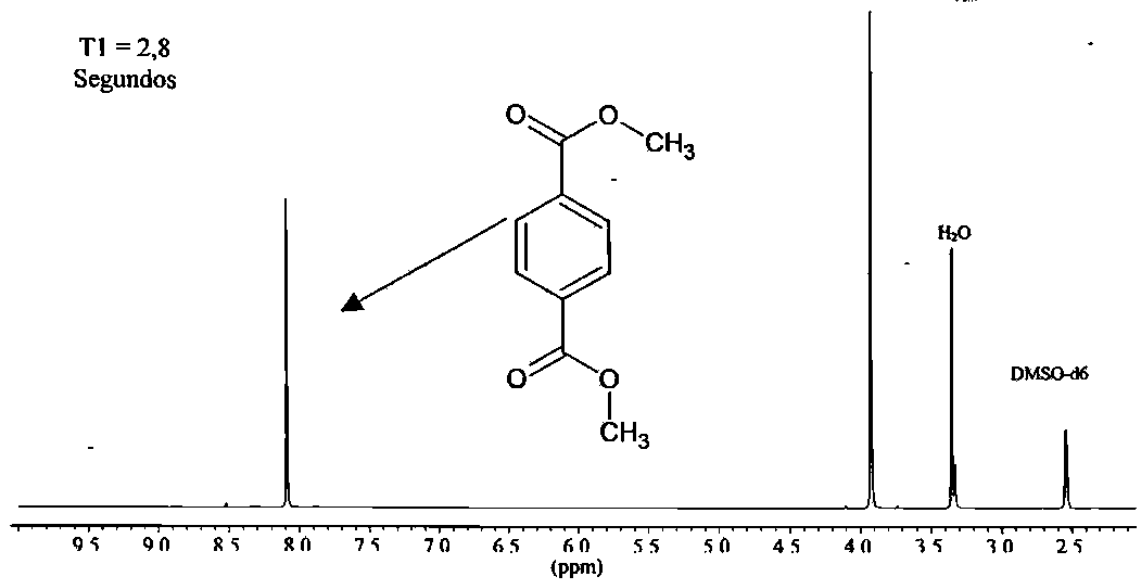
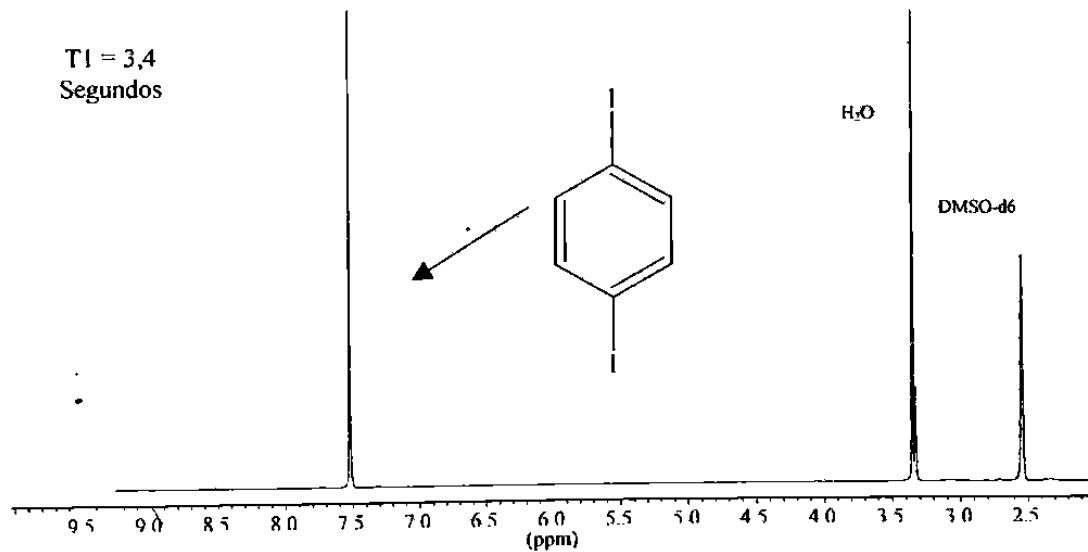


Figura 8. Espectro de ¹HRMN del diacetilbenceno

Figura 9. Espectro de ¹H RMN del tereftalato de metiloFigura 10. Espectro de ¹H RMN del diyodobenceno

El compuesto que se decidió utilizar como estándar interno para efectos cuantitativos fue el tereftalato de metilo, esto debido a que presentó un espectro libre de impurezas y además de que su T1 fue de 2,8 segundos.

3.3 Repurificación de PA1

Cuando se pasó 100 mg de PA1 por CEM se obtuvieron tres fracciones: la segunda fracción fue la más importante, en ella se obtuvieron 50 mg de PA1 repurificada (PA1 L-85R).

En la figura 11, se muestra una ampliación del espectro de $^1\text{HRMN}$ de una muestra previo a la purificación por CEM donde se muestra el remanente de IPA1; por otra parte la figura 12 corresponde al espectro de una muestra de PA1 repurificada en donde se aprecia la disminución de la cantidad del contaminante. Ambos espectros se determinaron bajo las mismas condiciones.

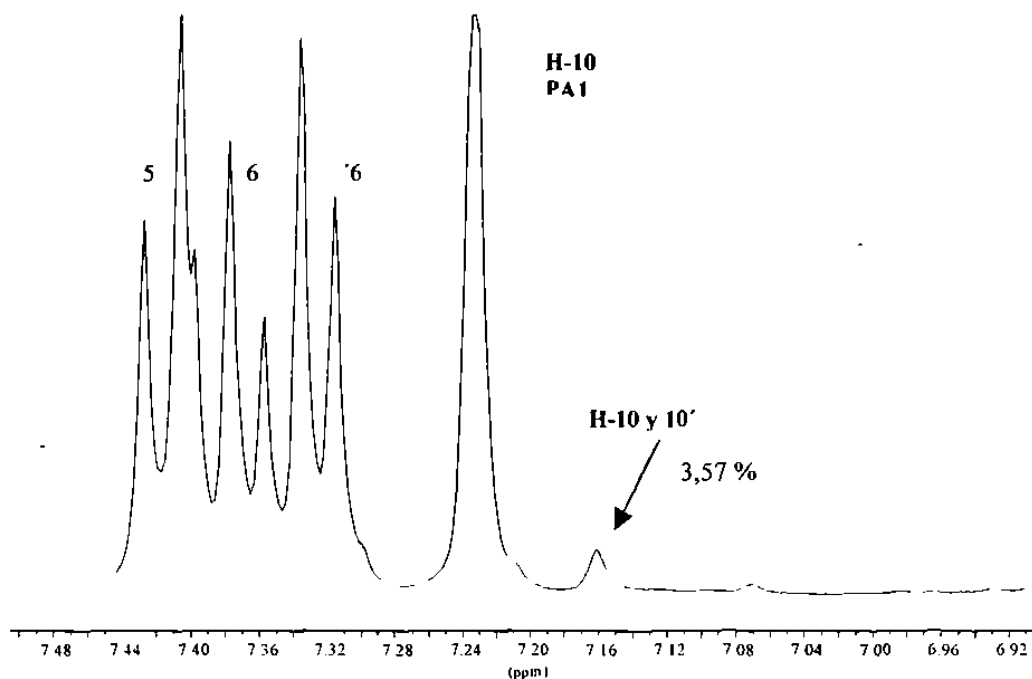


Figura 11. Ampliación del espectro de ^1H RMN de 5 mg del L-85, donde se observa el remanente de IPA1.

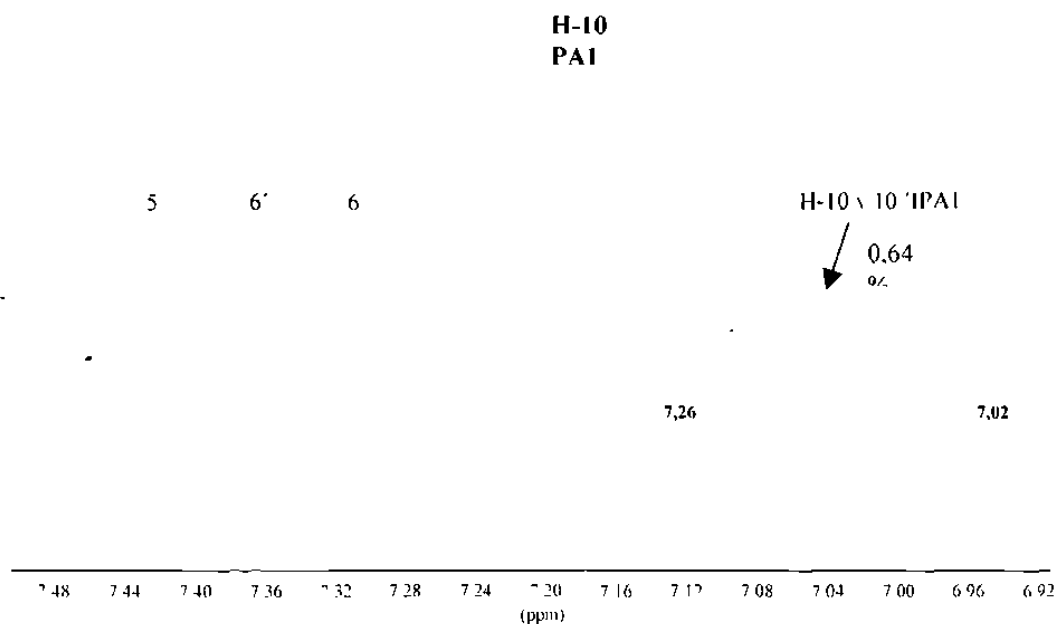


Figura 12. Ampliación del espectro de ^1H RMN de 5 mg de PA1 L-85 repurificada por CEM, con su respectiva ampliación donde se aprecia el singulete de IPA1.

En la repurificación de PA1 utilizando la CEM se logró disminuir un 82 % la cantidad de IPA1 presente respecto de la cantidad encontrada previo a la repurificación (Figuras 11,12); la recuperación fue de 50 %.

3.4 Optimización de parámetros para la obtención del espectro de $^1\text{HRMN}$

En las figuras 13, 14, 15, 16, 17, 18 se presentan los gráficos que se obtuvieron para la selección del número de barridos, tiempo de adquisición y D1 tanto para la PA1 como la IPA1.

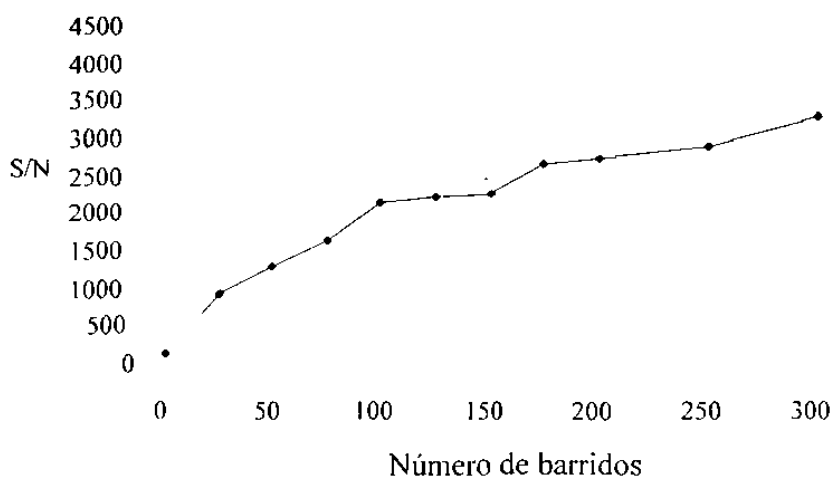


Figura 13. Gráfico de la relación señal-ruido respecto del número de barridos (ns) para la PA1

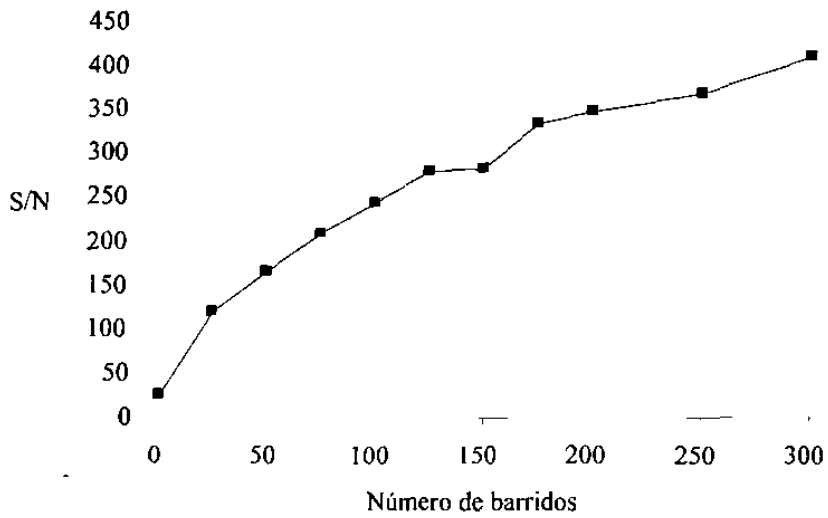


Figura 14. Gráfico de la relación señal-ruido respecto del número de barridos para la IPA1

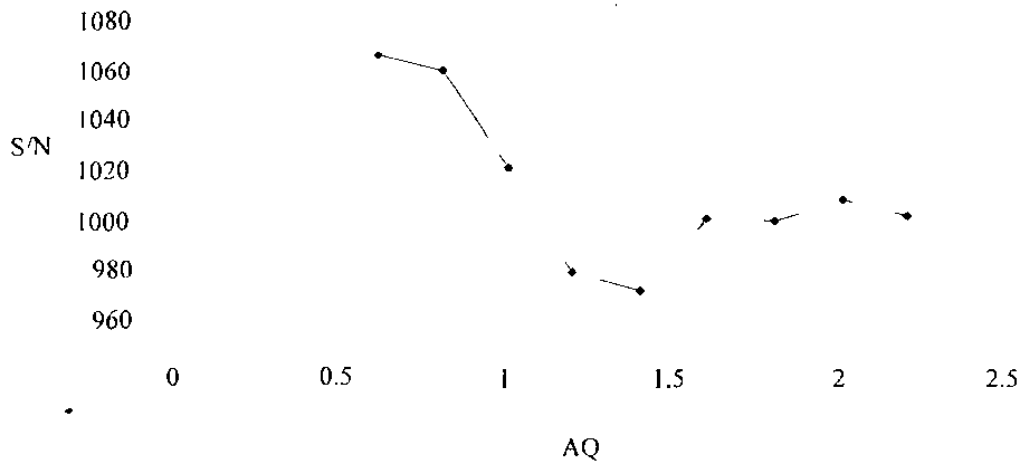


Figura 15 Gráfico de la relación señal-ruido (S/N) respecto del tiempo de adquisición (AQ) para la PA1.

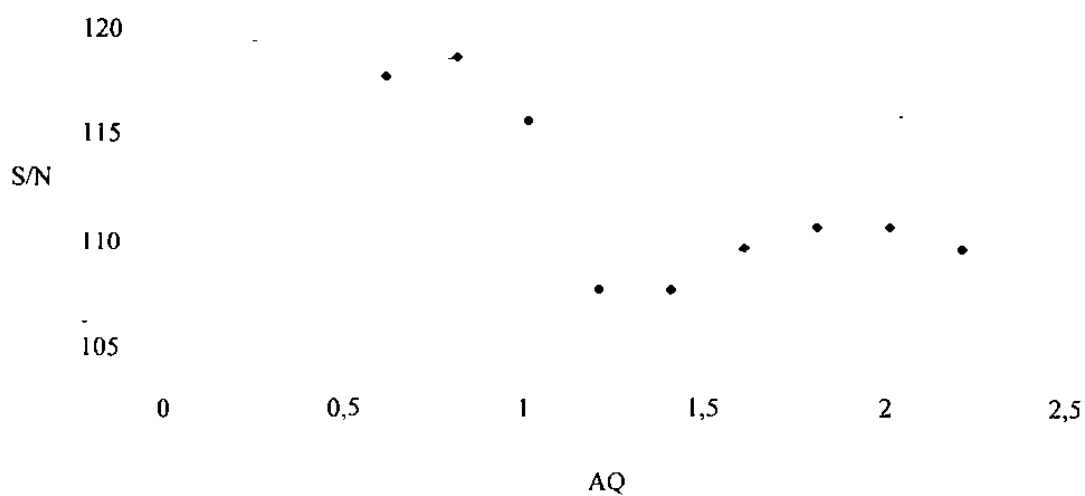


Figura 16. Gráfico de la relación señal-ruido respecto del AQ para la IPA1

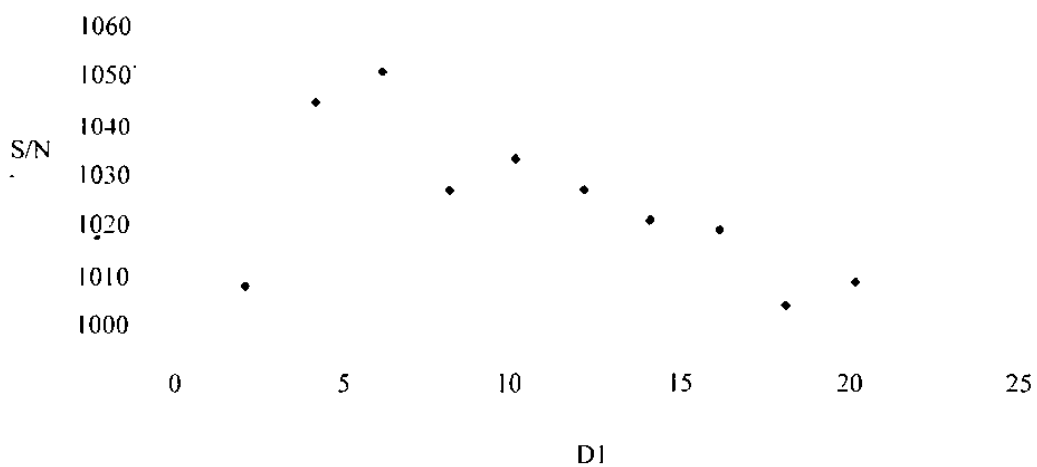


Figura 17. Gráfico de la relación señal-ruido respecto del D1 en la PA1

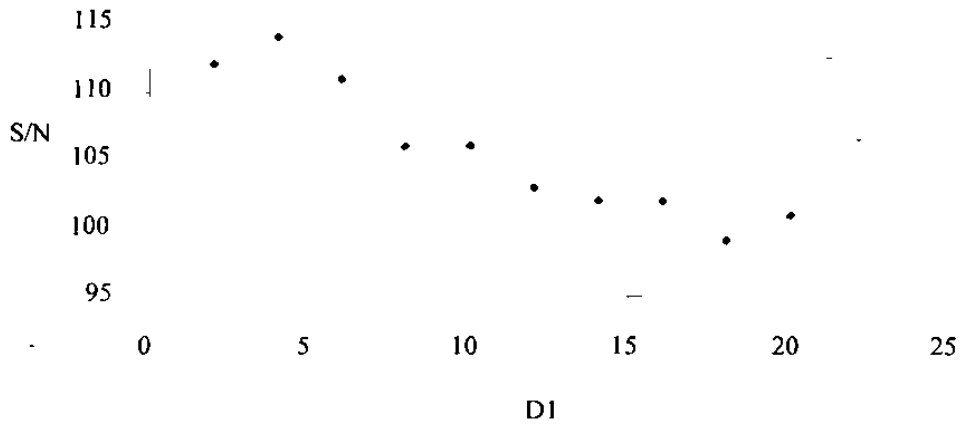


Figura 18. Gráfico de la relación señal-ruido respecto del D1 para la IPA1.

3.5 Determinación de los parámetros de validación del método de cuantificación.

3.5.1 Linearidad

Se tomaron los valores obtenidos en el gráfico de calibración (Figura 20), donde además de determinar los valores de la ecuación de la recta se obtuvo el factor de respuesta (FR) para cada uno de los puntos del gráfico de calibración. El FR promedio fue de 0.207, con una desviación estándar de 0.013 y un Coeficiente de Variación (CV) del 6 %.

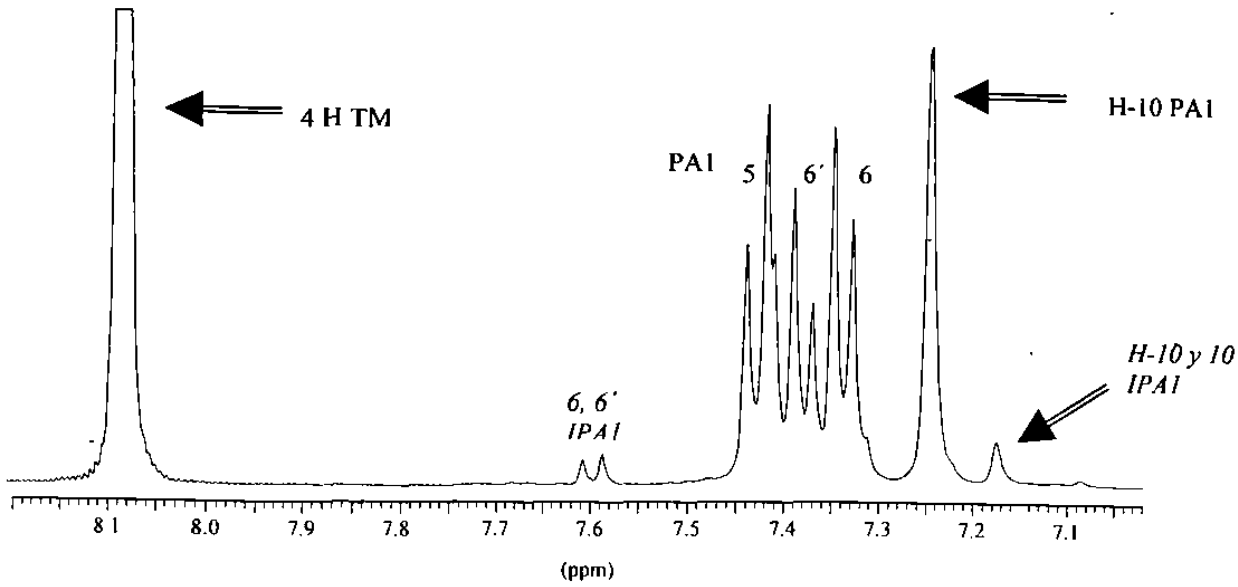


Figura 19. Zona de interés del espectro de ^1H RMN de 5 mg de PA1 del lote 85 con 2 mg del terftalato de metilo (TM) en 0,5 mL de DMSO-d₆.

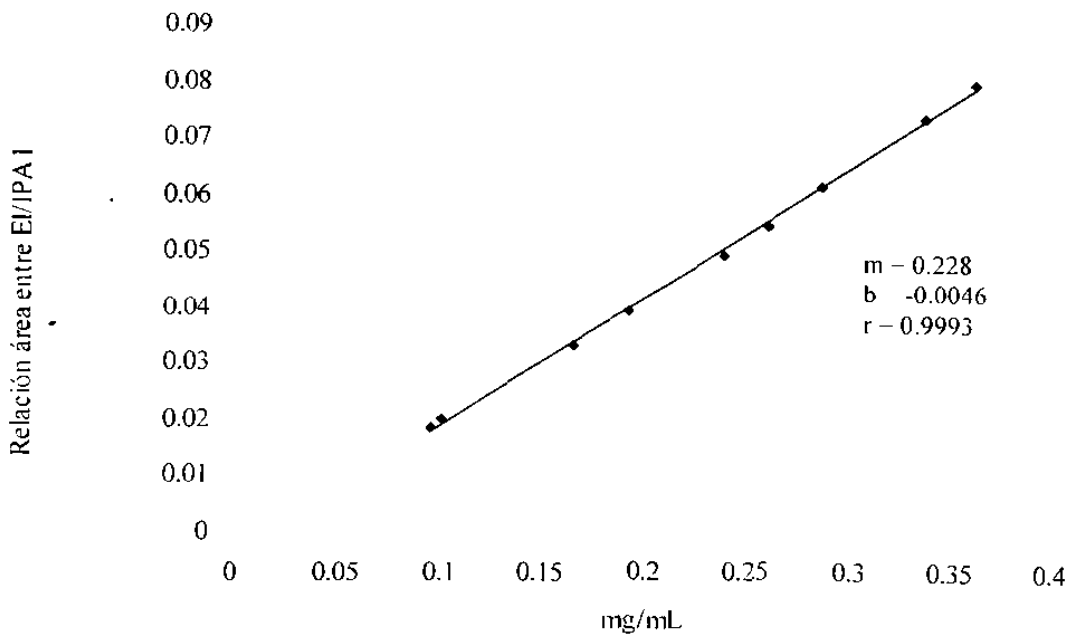


Figura 20. Gráfico de calibración para la IPA1.

3.5.2 Precisión del instrumento

Se obtuvo un coeficiente de variación de 2,50 %, con una desviación estándar de 0,027 y un promedio de 1,07 de abundancia natural del isótopo de carbono trece con un intervalo de confianza de $\pm 0,028$ para un límite de confianza del 95 %.

3.5.3 Precisión del Método

3.5.3.1 Peroxisomicina A1

Se obtuvo el coeficiente de variación de las mediciones del contenido de PA1 medida en % p/p, obteniéndose un valor de 3,0 %

3.5.3.2 Isoperoxisomicina A1

Se obtuvo el coeficiente de variación de los factores de respuesta de los gráficos de calibración y arrojó un valor de 4,3 %

3.5.4 Exactitud

Se obtuvo un 4,0 % medido como error absoluto

3.5.5 Límite de detección

Se obtuvo un límite de detección de 25 µg/mL

3.5.6 Límite de cuantificación

Se obtuvo un límite de cuantificación de 75 µg/mL

3.5.7 Estabilidad

Se determinó la estabilidad del estándar interno, de la PA1 e IPA1 como se describió en la sección de métodos, en las figuras 21, 22, 23 se presentan las cartas control obtenidas.

A partir de la figura 21 se determinó que la solución del estándar interno es estable durante 10 horas al igual que para la IPA1 (figura 23). En cuanto a la PA1 se determinó que la muestra disuelta en DMSO-d6 se mantuvo estable hasta 4 horas posterior a su disolución.

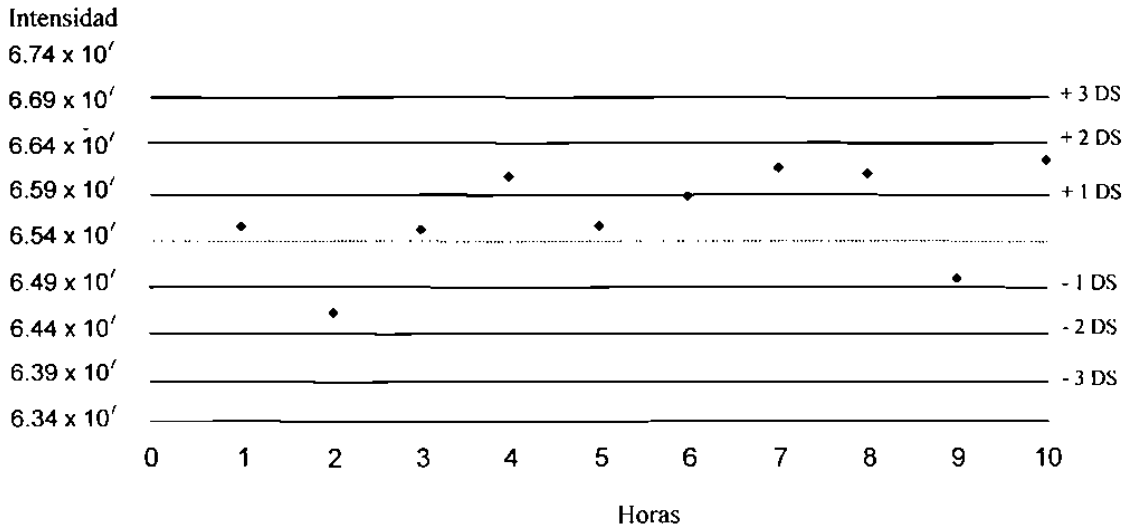


Figura 21. Estabilidad del Tereftalato de metilo en DMSO-d6 a 25 °C

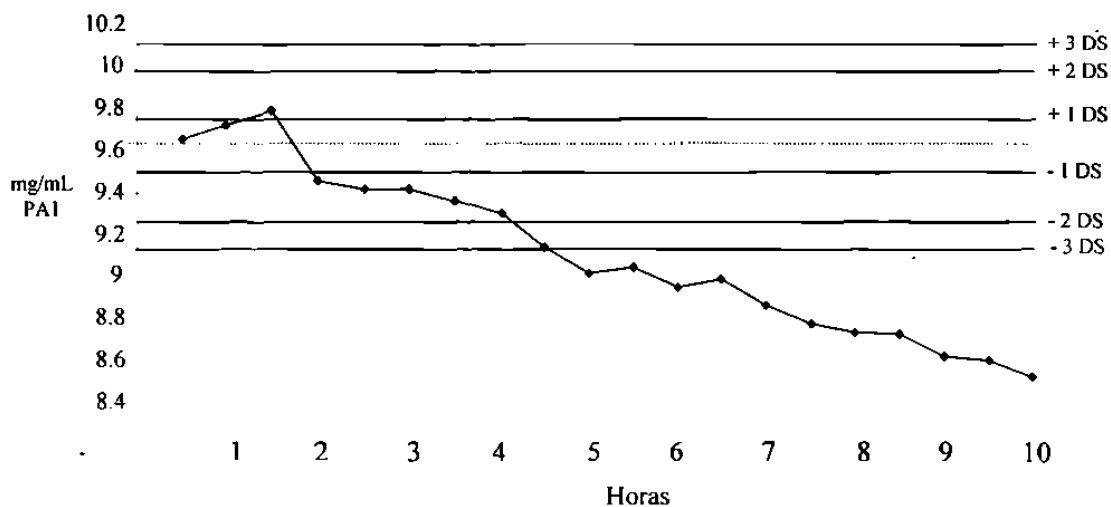


Figura 22. Estabilidad de la PA1 en DMSO-d6 a 25 °C

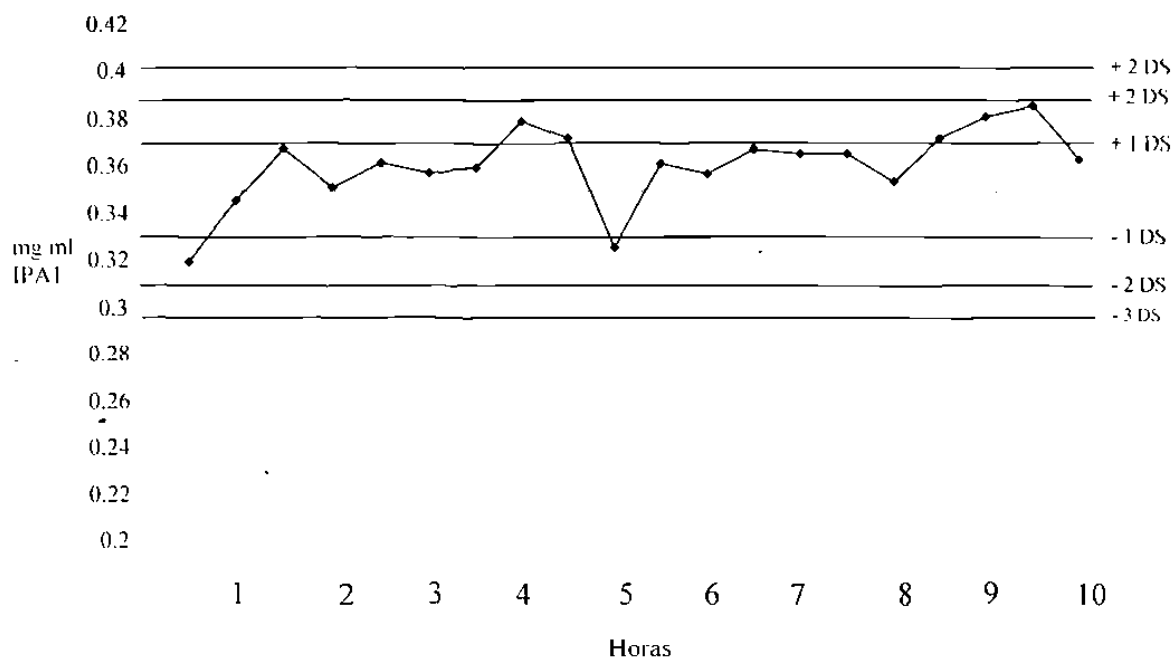


Figura 23. Estabilidad de la IPAI en DMSO-d6 a 25 °C.

3.5.8 Robustez

Se evaluó por medio de la medición de PA1 e IPA1 modificando deliberadamente las condiciones optimadas y siguiendo el criterio mencionado en la sección de métodos. En las tablas 8 y 9 se presentan los resultados de la robustez de la PA1 e IPA1 respectivamente.

Tabla 7. Parámetros evaluados para la robustez en la determinación de PA1

Parámetro	Valor alto	Valor bajo	Diferencias
Barridos	88,80 % p/p	89,60 % p/p	0,80
D1	86,0 % p/p	103,2 % p/p	17,20 *
Sonda	89,80 % p/p	85,20 % p/p	4,60 *
Masa	91,41 % p/p	89,03 % p/p	2,38

Contenido de PA1 bajo las condiciones optimadas – $89,4 \pm 2,93$ %

* afectan en la cuantificación.

Tabla 8. Parámetros evaluados para la robustez en la determinación de IPA1

Parámetro	Valor alto	Valor bajo	Diferencias
Barridos	6,26 % p p	6,392 % p/p	0,132
D1	6,18 % p/p	7,08 % p/p	0,90 *
Sonda	5,78 % p/p	6,62 % p/p	0,84 *
Masa	5,93 % p p	5,90 % p/p	0,03

Contenido de IPA1 bajo las condiciones optimadas $5,70 \pm 0,48$ %

* afectan en la cuantificación

Los resultados obtenidos para la validación se resumen la siguiente tabla:

Tabla 9. Resultados obtenidos del método validado.

Parámetro	PA1	IPA1
Linealidad	*Componente mayoritario	$m = 0,228$, $b = -0,0046$ $r = 0,999$. C.V. de los factores de respuesta = 6,06 %
Precisión del instrumento	C.V. 2,5 % DS = 0,027 Media = $1,07 \pm 0,028$ %♣	C.V. 2,5 % DS = 0,027 Media = $1,07 \pm 0,028$ %♣
Precisión del método	C.V. 3,0 % (% p/p PA1)	C.V. 4,3 % (Factores de respuesta)
Exactitud (Error absoluto)	*Componente mayoritario	4,0 %
Límite de detección	*Componente mayoritario	25 µg/mL
Límite de cuantificación	*Componente mayoritario	75 µg/mL
Estabilidad	4 Horas	Hasta 10 Horas
Robustez	Fue robusto a: Ns, a la masa de 3 mg y 7 mg PA1. Excepto al D1, y tipo de sonda	Fue robusto a: Ns, a la masa de 3 mg y 7 mg PA1. Excepto al D1, y al tipo de sonda.

* Debido a que es el componente mayoritario se consideró que no era necesario validar estos parámetros

♣ Límite de confianza de un 95 %

CAPÍTULO 4

DISCUSIÓN

En el presente trabajo se validó un método por $^1\text{HRMN}$ que permitió determinar la cantidad de IPA1 en muestras de los lotes de PA1 que se obtiene en el Depto. de Farmacología y Toxicología de Facultad de Medicina de la U.A.N.L.. El método aquí desarrollado puede ser aplicado en la determinación de contaminantes (Solvente de extracción, isómeros de la PA1, etc) en la matriz de trabajo y sienta las bases para la posible cuantificación de otros compuestos por este método.

El trabajo expuesto está encaminado al desarrollo de métodos que permitan conocer en forma confiable la cantidad de contaminantes presentes en los lotes de producción de PA1, ya que este método puede incluirse como una prueba más del control de la calidad en la obtención de PA1.

Luego de analizar las características espectrales de los analitos (PA1 e IPA1) se hizo la selección de las señales para su cuantificación. La señal que se utilizó para cuantificar la PA1 correspondió al singulete originado por los hidrógenos de la posición 10, ver figura 5; por otra parte en la IPA1 se tomó en cuenta el singulete originado por los hidrógenos 10 y 10', mismo que puede observarse en la figura 6.

La separación entre los singuletes antes mencionado fue de 0,074 ppm y la resolución entre ambas es aceptable (Figura 11), otra ventaja que presentaron estas señales es que procedieron de hidrógenos estables ya que no son intercambiables como los son los hidrógenos de los grupos hidróxilo o amino.

Las señales seleccionadas son específicas de cada compuesto, esto debido a que el entorno químico es característico para cada átomo de hidrógeno lo cual permite que su desplazamiento químico sea específico.

Las señales seleccionadas son específicas de cada compuesto, esto debido a que el entorno químico es característico para cada átomo de hidrógeno lo cual permite que su desplazamiento químico sea específico.

La identidad de la señal del singulete de la IPA1 propuesta para la cuantificación, se demostró, utilizando el método de adición de estándar, por medio del cual se corroboró el incremento de intensidad del singulete previamente seleccionado.

La selección del estándar interno, se hizo por medio del cálculo del T1 y obtención del espectro de protón donde se siguió el criterio de utilizar el compuesto que tuviera el menor valor de relajación longitudinal conjuntamente con un espectro de $^1\text{H RMN}$ libre de impurezas; además de las características señaladas en la sección de métodos.

El diacetilbenceno presentó una relajación longitudinal de 2,70 s pero presentó la desventaja de estar contaminado por dos señales que se encontraron en 7,45 y 8,17 ppm; razón por la que se descartó. Se prescindió del tereftaldehído por lo grande del T1; así como por las señales provenientes de contaminantes encontradas en 7,80, 7,70 y 7,40 ppm. El diiodobenceno, se descartó por que su desplazamiento (7,51 ppm) quedó cerca de las señales de la PA1 e IPA1 (Hidrógenos 5,6,6' para la PA1 y 6,6' IPA1) además de tener un T1 de 3,40 s; cabe mencionar que no presentó señales de compuestos contaminantes.

Finalmente, se aceptó el Tereftalato de metilo por su T1 (2,80 s), además de que no presentó contaminantes y su desplazamiento quedó libre de posibles traslapes con otras señales.

Para realizar la validación del método desarrollado, se consideró adecuado tratar de obtener una muestra con la menor cantidad posible de IPA1; ésta podría utilizarse en la determinación de la sensibilidad del método y a su vez en la construcción de las gráficas de calibración. Hasta el momento, en el laboratorio no se había utilizado la Cromatografía de Exclusión Molecular para la purificación de la PA1; para lograr este

objetivo se partió de una muestra de PA1 obtenida del laboratorio de producción para verificar su eficacia en la separación de los analitos de interés.

Por medio de un diseño experimental detallado en la sección 2.2.3 de material y métodos se obtuvieron 12 alícuotas, las cuales después del monitoreo por CLAR, se seleccionaron de acuerdo a su pureza cromatográfica y espectroscópica; de aquí se obtuvieron 3 fracciones. En la primera fracción no se cuantificó la IPA1, pero en la segunda se determinó que tenía un 0,64 % de IPA1 y en la tercera se tenía un 2,2 % de IPA1; tal cuantificación fue relativa a la señal de PA1 y dió información suficiente para saber si mejoró el proceso de la repurificación. En la repurificación de PA1 utilizando la CEM se logró disminuir un 82 % la cantidad de IPA1 presente respecto de la cantidad encontrada previo a la repurificación (Figuras 11, 12); además de contar con un 50 % de recuperación.

Con el programa de pulsos descrito en la sección de Material y Métodos, se obtuvo el T1 para la PA1 e IPA1, además de los estándares sometidos a selección. Para la optimación de parámetros usados en la obtención de los espectros, se consideró el T1, tiempo de adquisición y número de barridos. El T1 corresponde al tiempo de relajación longitudinal T1, el cual corresponde a la pérdida de la energía ganada (pulso de radiofrecuencia) en forma de calor al medio que rodea la muestra. Por otra parte el valor que se modifica en el instrumento es el D1 y es el valor instrumental que refleja el T1, y el cual se puede manipular.

Por su parte el tiempo de adquisición (AQ) corresponde al intervalo de tiempo en que se adquiere la FID (Figura 24), y repercute en la duración del experimento ya que entre más grande es el AQ; mayor es la duración de dicho experimento, razón por la cual también se procedió a optimar este valor.

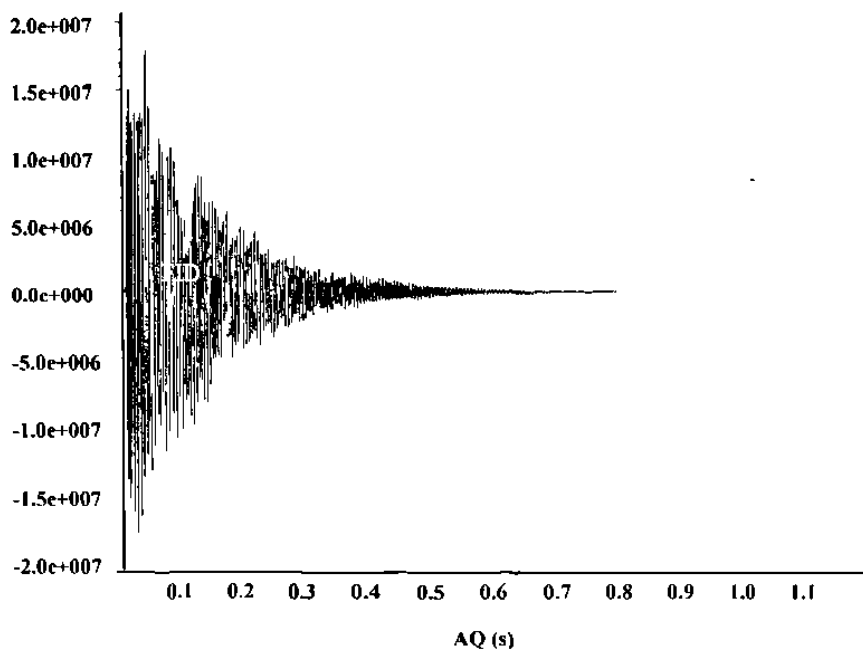


Figura 24. Gráfico del decaimiento libre de inducción (FID) de uno de los espectros obtenidos.

El número de barridos (ns) corresponde al número de veces que se adquiere un espectro. Este parámetro influye directamente sobre la duración del experimento al igual que los parámetros descritos con anterioridad. El aumento en el número de barridos produce un incremento de la relación señal-ruido el cual es asintótico y se corroboró por medio de un gráfico donde se midió la relación señal-ruido en función del número de barridos (Figura 13 y 14). Se escogió como valor óptimo, el máximo en la curva que generó la mayor relación señal-ruido con el menor número de barridos. Por lo anterior, se encontró el número óptimo de barridos que dió la mayor sensibilidad posible para el analito de trabajo.

El T1 de la PA1 fue 1,76 s, para la IPA1 fue de 1,20 s y finalmente el T1 para el estándar interno seleccionado fue de 2,80 s. La relajación completa de los núcleos bajo estudio se corroboró por medio de un gráfico donde se midió la relación señal-ruido obtenida al variar el D1 con valores superiores a 6 s; se observaron solo líneas horizontales debido a que los núcleos estaban completamente relajados; tanto para la PA1 como para la IPA1.

Para estudios cuantitativos por RMN se recomienda utilizar un $D1 = 5 \cdot T1$, nosotros optamos por realizar un gráfico (Figura 18) de la relación señal-ruido en función del D1, para el cual se tomó como valor óptimo aquel punto del gráfico donde se obtuvo la máxima relación señal-ruido. Lo anterior dado que a mayor D1 el porcentaje de núcleos relajados sería mayor, al igual que la relación señal-ruido.

Para obtener los gráficos de calibración como no se tenía un estándar comercial de los compuestos bajo estudio y debido a que la matriz de trabajo contenía remanentes evidentes de IPA1, se optó por aplicar el método de adición de estándar. Se adicionaron cantidades de IPA1 que representaron un incremento de la señal del 0,50 % en función de los 5 mg de PA1 inicial.

Con ayuda de este tipo de gráfico se demostró la linealidad en el rango comprendido de 0,102 mg/mL a 0,362 mg/mL (0,58 % a 3,90 % de IPA1) donde se obtuvo un coeficiente de regresión de 0,999 y un CV de los factores de respuesta de 4,3 %.

Para el cálculo de la precisión del instrumento, se utilizó la medición de la abundancia natural del isótopo de carbono trece; por medio de la medición de las señales satélites en el espectro de $^1\text{HRMN}$, esto ya que se carecía de un estándar certificado que avalara la medición²⁴.

En la evaluación de la precisión del método desarrollado en la determinación de PA1 (% p/p) se realizó la medición del CV de 5 muestras diferentes. Para el caso de la precisión de la IPA1 se obtuvo el CV de los factores de respuesta para cada nivel de

concentración de cada uno de los gráficos de calibración; con esto se tenía un valor representativo de la manipulación de los cinco gráficos de calibración.

En la determinación del LD y el LC se utilizó la desviación estándar de las respuestas y el promedio de la pendiente de los gráficos de calibración²².

Es necesario mencionar que para determinar tanto PA1 como de IPA1 según este método no es necesario realizar un gráfico de calibración cada vez que se hace el análisis y que las mediciones deben realizarse antes de las 4,0 horas para la PA1 y de 10 horas para la IPA1 una vez disueltas en DMSO-d₆, en función del estudio de estabilidad (figuras 22,23).

En el estudio de robustez se determinó que el método de cuantificación para ambas toxinas (PA1, IPA1) soporta leves variaciones en cuanto al número de barridos y a la masa. Las modificaciones del método en cuanto al cambio de sonda y D1, demostró variaciones que indican que no es posible hacer la medición bajo dichas variaciones experimentadas.

En la tabla 10 se observa los diferentes métodos empleados hasta el momento para cuantificar IPA1, la técnica más sensible es CLAR con un límite de cuantificación de 0,40 µg/mL después le sigue el método de UV-Vis y finalmente el método de RMN, por otro lado el método más preciso es el de UV-Vis, luego RMN y al final la CLAR. Para las cantidades que se encuentra de IPA1 (< 5 %) en los lotes de PA1, resulta útil la cuantificación de dicho contaminante por medio de RMN, ya que su precisión es aceptable para las cantidades de trabajo (250 µg /mL) al igual que la sensibilidad presentada, la cual supera las cantidades que normalmente se encuentran de este contaminante, además de que el método desarrollado presenta una selectividad contundente (Figura 11).

La ventaja que ofrece la RMN sobre las demás técnicas es la rapidez con la que se obtiene el resultado, esto se debe a que no es necesario realizar un gráfico de calibración y que la duración del experimento es de 34 minutos, el volumen del disolvente utilizado es pequeño (0,5 mL), además que la selectividad es buena para los compuestos estudiados.

Técnica Analítica	Sensibilidad		Precisión C.V.
	LD	LC	
UV-Visible Relación de respuestas 2857/277 (derivadas) ²⁶	0,35 µg/mL	1,06 µg/mL	0,60
CLAR Adición de estándar ²⁵	0,12 µg/mL	0,40 µg/mL	18,0
HRMN	29,0 µg/mL	87,0 µg/mL	4,50

Tabla 10. Comparación del método validado frente a otros métodos de cuantificación de IPA1

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

5.1 Conclusiones

1. Se logró desarrollar y validar un método para cuantificar por $^1\text{HRMN}$ la IPA1.
2. El método desarrollado presentó menor sensibilidad respecto de la CLAR, UV-Vis pero presenta una aceptable linealidad, exactitud y precisión para los compuestos estudiados.
3. La CEM reduce en un 82 % la cantidad de IPA1 en muestras de PA1, con lo que permitió obtener lotes de PA1 con cantidades menores al 1 % de IPA1.
4. La RMN puede utilizarse como herramienta alternativa para cuantificar la IPA1 en muestras de PA1.
5. La cuantificación relativa de IPA1 es útil para monitorear el proceso de purificación.

5.2 PERSPECTIVAS

- 1.- Utilizar una sonda más sensible y emplear menor cantidad de muestra
- 2.- Aplicación del método desarrollado a sistemas semejantes

BIBLIOGRAFÍA

1. Dreyer, D., Arai, I., Bashman, C., Anderson, W., Smith, R. and Daves, D. "Toxins causing non inflammatory paralytic neuropathy. Isolation and structure elucidation". *J. Am. Chem. Soc.* 97. pp 4985. (1975)
2. Waksman, N., Martínez, L. y Fernández., R. "Screening chemical and toxicological in genus *Karwinskia* (México)". *Rev. Latinoam. Quim.* 20. pp 27. (1989)
3. Waksman, N., Torres., R., Salazar, M. L., Cenicerros, L. y Piñeyro, A., "Peroxisomicina: un producto de interés farmacológico. Avances en los métodos de producción". XIX Simposium de Química de Productos Naturales, ITESM, Abril, (1992)
4. Piñeyro-López, A. "Toxicidad selectiva *in vitro* de la toxina T514 de la *Karwinskia humboltiana*". Tesis doctoral. Facultad de Medicina. U.A.N.L.. Monterrey México. (1990)
5. Garza-Ocañas L., Torres-Alanis O., and Piñeyro-López A. (1990). Effect of toxin 514 of *Karwinskia humboltiana* on liver microsomal lipid peroxidation stimulated by Fe^{+2} -ADP complexes and NADPH *in vitro*. *Eur. J. Pharm.* 183: 1550-1550.
6. Moreno-Sepúlveda M., Vargas-Zapata R., Esquivel-Escobedo D., Waksman de Torres N., and Piñeyro-López A. (1995). Effect of Peroxisomicine and relates anthracenones on catalase activity. *Planta Med.* 61: 337-340.
7. Sepúlveda, J., Vanader Klei, I., Keizer, I., Piñeyro A., Harder, W and Veenhuis, "Studies on yhe effect of toxin T 514 on the integrity of peroxisomes in methylotrophic yeast". *FEMS Microbiology Letters.* 91:207-212. (1992)

BIBLIOGRAFÍA

8. Rivas, V., Waksman N. "Cytotoxic hydroxyanthracenones from fruit of *Karwinskia parvifolia*" Natural Products Letters, in press.
9. Waksman, N. and Ramírez., R. "Isolation of new dimeric anthracenones from *Karwinskia parvifolia*". Rev. Latinoam. Quím, 23/1 and 22/4. (1992)
10. Gill, M., Steglich, W. "Progress in Chemistry organic. Natural Products". 51,150. (1987)
11. Molina S., G., "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. México. (1998)
12. Salazar M., L., Piñeyro. A., Waksman, N. "A Reverse Phase HPLC Method for Quantification of Peroxisomicine and other Anthracenonic compounds". J. Liq. Chrom. And Rel. Tech. 19 (9), 1391-1403, (1996)
13. Osorio P., A., Salazar-Cavazos M., Piñeyro-López, A., and Waksman de Torres, N. Optimization and validation of Analytical procedure by High-Performance Liquid Chromatography for The Quantification of Peroxisomicines and Isoperoxisomicines. Journal of Chromatography in press.

BIBLIOGRAFÍA

14. Tim Wallace., "Quantitative Analysis of Mixture by NMR Spectroscopy", Journal Chemical Education., pp 1074., 1984
15. Jim Peterson "1H analysis of Mixtures Using Internal Standards", Journal Of Chemical Education., Vol 69., Number 10., 1992
16. D. W. Clarke., "Acetone and Ethyl Acetate in Commercial Nail Polish Removers: A Cuantitative NMR Experiment Using an Internal Standard", Journal Of Chemical Education., Vol. 74., N 12., 1997.
17. Lankhorst P. P., M. M., Poot., and M. P. A. de Lange., "Quantitative Determination of Lovastatin and Dihidrolovastatin of 1H NMR Spectroscopy". Pharmacopeial Forum., Volume 22, Number 3., (1996)
18. G. F. Pauli., qNMR- A Versatile Concept for the Validation of Natural Products Reference Compounds. Phytochem, Anal., 28-42 (2001)
19. Fernández R. A., Rivas G. V., Salazar C. M., Piñeyo L. A., Caballero Q. A., Waksman de T. N., "Uso de 1HRMN Para el Control de Calidad de Fármacos". IV Simposio de Ciencia y Tecnología. 24 Y 25 de Mayo de 1999
20. Manual de RMN Sigma Aldrich Chem.Co

BIBLIOGRAFÍA

21. Guía Avance del Usuario, versión 1,1.,Bruker. Páginas 71-81 Agosto 1994
22. VICH., Validation of Analytical Procedures: Methodology., 22 October 1998
23. Quatrocci, O., Abelaira de Andrizzi, S., Laba, R. F. “Introducción a la HPLC”. Merck, pp. 304-312. (1996)
24. Book of abstracts., “2000 Years of Natural Products Research –Past, Present and Future- July, 1999 Amsterdam, The Netherlands, L20.
25. Salazar-Cavazos Et. al. Purity Determination of Peroxisomicine A1 By HPLC With a Diode Array Detector. J. Liq., Chrom, δ Rel. Technol., 25 (12), 1745-1758 (2002)
26. Salazar Cavazos M. L., “Aplicación de Técnicas Modernas de Análisis Para el Control de Calidad de la Peroxisomicina”. Tesis Doctoral. Facultad de Medicina - UANL., Monterrey N.L., México. (2001)

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

Adrián Fernández Ramírez

Candidato para el Grado de

Maestría en Ciencias con Especialidad en Química Biomédica

Título de Tesis: VALIDACIÓN DE UN MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN POR RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE HIDRÓGENO (¹HRMN)

Área de Estudio: Química Analítica

Biografía:

Datos personales: Nacido en Poza Rica de Hidalgo, Veracruz, México, el día 31 de Enero de 1974, hijo del TMI Daniel Fernández Ríos y Profra. Eloísa Gabina Ramírez Campos. Casado con M.C. Agustina Vega Alonso. Hija: Dana Eloísa

Escolaridad: Técnico Laboratorista Clínico, CBTis # 78, Técnico en computación, CATCOM, Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Medicina con el grado de Químico Clínico Biólogo.

Experiencia Profesional: Personal Profesional no docente en el Depto. de Química Analítica de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L. de Marzo de 2001 a la fecha.



