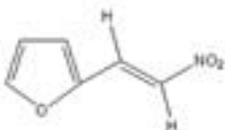


**UNIVERSIDAD CENTRAL DE LAS VILLAS  
FACULTAD DE QUÍMICA FARMACIA  
DEPARTAMENTO DE FARMACIA**



**TESIS POR OPTAR POR TÍTULO DE  
LICENCIADO EN CIENCIAS FARMACEÚTICAS.**

**Estudio cinético de degradación del 1-fur-2-il-2-nitroeteno  
en medio acuoso. Validación de la técnica espectrofotométrica UV-VIS.**

**AUTOR:**

**Yaritsy Abreu Gómez**

**TUTOR:**

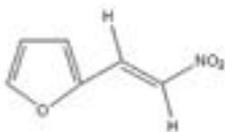
**Lic. Vivian Ruz San Juan**

**Dr. Mirtha Maira González Bedia**

**Curso 2004-2005**

**Santa Clara**

**“Año de la Alternativa Bolivariana para las América”**



---

## Resumen

En este presente trabajo se ha investigado la degradación del fur-2-il-2-nitroeteno (G-0) en disolución acuosa en el intervalo de pH entre 2,2 y 10. Las muestras fueron analizadas a través de una técnica analítica por espectrofotometría UV-VIS, la cual fue validada y su especificidad fue corroborada por comparación de los espectros obtenidos para el fármaco y sus productos de degradación con una técnica por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en fase reversa con detector UV. La cinética de degradación fue estudiada en función del pH, la concentración del buffer y la fuerza iónica a temperatura de 41°C. La degradación siguió una cinética de pseudoprimer orden. El perfil pH- $\log k_0$  mostró que el G-0 es más estable en medio ácido (pH<5,2) y que la velocidad de degradación se incrementa con el aumento del pH. Se evidenció una fuerte influencia de la concentración de las especies  $\text{HPO}_4^-$  y  $\text{HCO}_3^-$  en la degradación del fármaco. La concentración de sales (KCl) tuvo cierto efecto negativo en la constante de velocidad a pH 8,2, mientras que a pH 4,2 no parece tener efecto alguno.

---

# Índice

|   |    |
|---|----|
| Índice .....  | 1  |
| Introducción .....  | 5  |
| Revisión Bibliográfica.....   | 7  |
| 1.1. Propiedades del 1-fur-2-il-2-nitroeteno (G- 0).....  | 7  |
| 1.1.1. Propiedades químico-físicas.....   | 7  |
| 1.1.2. Metodología analítica.....   | 8  |
| 1.1.3. Estudios de Preformulación.....  | 11 |
| 1.1.3.1. Propiedades químico-físicas.....   | 11 |
| 1.1.3.2. Estabilidad.....   | 12 |
| 1.1.3.3. Propiedades farmacotécnicas.....   | 14 |
| 1.1.3.4. Formulación.....   | 15 |
| 1.1.4. Propiedades farmacológicas.....  | 16 |
| 1.1.5. Toxicidad .....  | 18 |
| 1.2. Preformulación.....  | 20 |
| 1.2.1. Estabilidad.....   | 20 |
| 1.2.1.1. Estabilidad del principio activo en disolución.....  | 21 |
| Materiales y Métodos.....   | 22 |
| 2.1. Validación de la técnica para la cuantificación del G-0 mediante<br>espectrofotometría ultravioleta..... | 22 |
| Materiales.....   | 22 |
| Métodos.....  | 23 |
| 2.1.1. Linealidad.....  | 24 |
| 2.1.2. Precisión.....   | 25 |
| 2.1.3. Exactitud.....   | 25 |
| 2.1.4. Selectividad.....  | 26 |
| 2.1.5. Límite de Detección.....   | 28 |
| 2.1.6. Límite de cuantificación.....  | 28 |
| 2.2. Estudio cinético del G-0 en medio acuoso.....  | 29 |
| Materiales.....   | 29 |

---

|   |    |
|---|----|
| 2.2.1. Orden de reacción y constante de velocidad específica.....   | 31 |
| 2.2.2. Evaluación del efecto catalítico de las especies buffer.....   | 32 |
| 2.2.3. Evaluación de la fuerza iónica.....  | 33 |
| 2.2.4. Perfil pH-velocidad de degradación.....  | 33 |
| Resultados y Discusión.....   | 34 |
| 3.1. Validación de la técnica para la cuantificación del G-0 mediante<br>espectrofotometría ultravioleta..... | 34 |
| 3.1.1. Linealidad.....  | 34 |
| 3.1.2. Precisión.....   | 36 |
| 3.1.3. Exactitud.....   | 38 |
| 3.1.4. Selectividad.....  | 39 |
| 3.1.5. Límite de Detección.....   | 44 |
| 3.1.6. Límite de Cuantificación.....  | 44 |
| 3.2. Estudio cinético del G-0 en medio acuoso.....  | 45 |
| 3.2.1. Orden de reacción y constante de velocidad específica.....   | 45 |
| 3.2.2. Evaluación del efecto de la concentración del buffer.....  | 47 |
| 3.2.3. Evaluación de la fuerza iónica.....  | 51 |
| 3.2.4. Perfil pH-velocidad de degradación.....  | 54 |
| Conclusiones.....   | 57 |
| Recomendaciones.....  | 58 |
| Bibliografía.....   | 59 |
| Anexos.....   | 66 |

## **Introducción**

La coccidiosis es una enfermedad causada por parásitos protozoos del género *Eimeria* que se manifiesta en aves, animales domésticos y el hombre. Las aves son muy susceptibles a infecciones por coccidias, por lo que se considera esta enfermedad como una de las más peligrosas para la cría de pollos en el mundo [1]. Debido a que resulta difícil prevenir la coccidiosis mediante una buena higiene; es una necesidad la búsqueda constante de nuevos agentes anticoccidiales que sean efectivos [2].

La obtención de un nuevo principio activo anticoccidiano sintetizado y producido, en nuestro país a partir de materias primas cubanas es una estrategia que favorece al país, debido a que estos productos actualmente son de importación. De lo anterior se infiere que el desarrollo de nuevos productos beneficiará en general la producción de pollos en Cuba y en otros países.

El compuesto 1-fur-2-il-2-nitroeteno (G-0), obtenido por síntesis química a partir de nitrometano y furfural en el Centro de Bioactivos Químicos, presenta una actividad anticoccidiana comparable a otros principios activos que se usan actualmente a nivel mundial en el tratamiento de la coccidiosis.

Conocer la estabilidad del G-0 en disoluciones acuosas a distintos valores de pH es importante cuando se desea administrar el principio activo por vía oral, ya sea en el agua de bebida o en el pienso, para comprobar si durante su recorrido por el tracto gastrointestinal se puede ver comprometida su estabilidad química y por tanto su efectividad. Además, para fármacos lábiles, esta información es útil para la selección del disolvente de granulación y las condiciones de secado en el desarrollo de formas sólidas.

Por estas razones en el presente trabajo nos proponemos:

**Objetivo general:**

- ❖ Evaluar la estabilidad química del G-0 en función del pH, como criterio de su efectividad en el tratamiento oral de la coccidiosis.

**Objetivos específicos:**

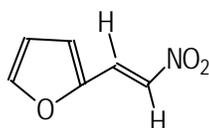
- ❖ Disponer de una técnica analítica que permita evaluar la estabilidad del G-0 en disolución acuosa.
- ❖ Evaluar la estabilidad química del G-0 en el intervalo de pH fisiológico de las aves.
- ❖ Evaluar la influencia de la concentración del buffer y la fuerza iónica en la degradación del G-0.

## Revisión Bibliográfica.

### 1.1. Propiedades del 1-fur-2-il-2-nitroeteno (G- 0).

#### 1.1.1. Propiedades químico-físicas.

El G-0 es un nitrovinilfurano obtenido por síntesis química en el Centro de Bioactivos Químicos (CBQ) de la Universidad Central de Las Villas cuya fórmula estructural es:



En estado puro es un sólido cristalino de color amarillo y de olor característico con masa molecular de 139.050 U y temperatura de fusión entre 73–75 °C. Es muy fácilmente soluble en dimetilformamida, fácilmente soluble en dimetilsulfóxido, cloroformo y benceno, soluble en tetracloruro de carbono y polietilenglicol 400; poco soluble en etanol absoluto, etanol y metanol y muy difícilmente soluble en agua [3].

En cuanto a sus propiedades espectroscópicas, en el infrarrojo presenta las siguientes bandas:

$$\gamma_{C=C} = 1635 \text{ cm}^{-1}$$

$$\gamma_{NO_2} = 1500 \text{ y } 1340 \text{ cm}^{-1}$$

$$\gamma_{C-O-C} = 1270 \text{ cm}^{-1}$$

$$\gamma_{C=C} = 760 \text{ cm}^{-1}$$

En el ultravioleta visible puede presentar transiciones  $\pi-\pi^*$  y  $n-\pi^*$ , fundamentalmente [4].

### 1.1.2. Metodología analítica.

#### ✓ Espectrofotometría Ultravioleta.

La técnica espectrofotométrica se basa en el estudio de las características espectrales del producto en diferentes solventes en la región UV-VIS. Las primeras determinaciones espectrofotométricas del G-0 fueron realizadas en 1993 por Delgado y Calvo [5]. En este trabajo se estudió el uso de siete solventes, obteniéndose los espectros UV-VIS correspondientes, desde 230nm hasta 400nm, determinándose en cada caso la posición de la  $\lambda_{\text{máx}}$  para cada uno, Tabla 1.

**Tabla 1:** Resultados de la técnica espectrofotométrica aplicada al G-0 en 1993.

| SOLVENTES                   | G-0                  |
|-----------------------------|----------------------|
|                             | $\lambda(\text{nm})$ |
| n-Heptano                   | 328,0                |
| Éter de petróleo (70-100°C) | 327,2                |
| Ciclohexano                 | 331,2                |
| Tetracloruro de Carbono     | 336,0                |
| Éter Dietílico              | 336,9                |
| Metanol                     | 345,0                |
| Etanol                      | 345,9                |

Teniendo en cuenta que de los solventes estudiados el etanol y el éter de petróleo resultan los más baratos y accesibles, en el mismo trabajo se incluye un estudio de estabilidad del G-0 en el tiempo a partir de su disolución en estos disolventes. Para este estudio se sometieron muestras a dos condiciones, sin protección de la luz y protegida de la luz (en ambos casos a temperatura ambiente). Estas soluciones fueron analizadas cada 30 min. a partir de tiempo 0

durante 4h. Se registraron los espectros en el intervalo de 210nm a 400nm y se obtuvieron las absorbancias a 349nm y a 327nm para el etanol y el éter de petróleo (70-100) respectivamente. Como resultado se obtuvo que en ambos solventes la luz afecta la estabilidad, aunque no de forma muy marcada y que las soluciones de G-0 en etanol tienden a ser menos estables en el tiempo. Estos resultados demuestran que siempre que las soluciones estén protegidas de la luz y sean analizadas inmediatamente pueden ser utilizados, tanto el etanol como el éter de petróleo, para la cuantificación de G-0.

Teniendo en consideración los resultados obtenidos en 1993; la disponibilidad del éter de petróleo y los resultados de algunos trabajos experimentales que comprueban que este solvente disuelve al G-0 y no a los productos de degradación, Bravo y colaboradores en 1996 [4] seleccionaron este solvente y realizaron la validación de dicha técnica obteniendo los siguientes resultados: la técnica es lineal para el intervalo de concentraciones de 3,2µg/mL a 4,8µg/mL, resultó repetible y reproducible con coeficientes de variación de 0,2289% y 0,3826% respectivamente. El coeficiente de recuperación de 99.89 % demuestra la exactitud de la técnica; parámetro que también fue corroborado con una prueba de hipótesis t- Student en la que no existen diferencias significativas entre el valor experimental y el certificado. Además se corroboró que no existe absorción de las posibles sustancias interferentes en la zona de trabajo lo que muestra la especificidad de la técnica.

✓ **Cromatografía de placa delgada.**

Cárdenas [6] realizó un estudio con el objetivo de escoger sistemas de solventes para la evaluación del G-0 por cromatografía en capa delgada.

Se probaron más de 20 sistemas de solventes en cromatografía radial, comprobándose que de ellos sólo 8 pudieron utilizarse en el análisis del G-0. Al finalizar la cromatografía ascendente para cada uno de los sistemas de solventes seleccionados se obtuvo que sólo se produce un buen desplazamiento del producto a través de la placa bajo las condiciones que aparecen en la tabla2:

**Tabla 2:** Sistemas de solventes empleados en los estudios de cromatografía radial para el G-0, bajo diferentes condiciones.

| Condiciones                        | Sistema 1                                | Sistema 2                                  | Sistema 3                                   |
|------------------------------------|--|--|---|
| Fase móvil                         | CCL <sub>4</sub> /Éter dietílico<br>20:1 | CCL <sub>4</sub> /CHCL <sub>3</sub><br>9:1 | Acetato de etilo/Éter<br>de petróleo<br>2:8 |
| Intervalo<br>de<br>concentraciones | 1µg-100µg                                | 1µg-100µg                                  | 1µg-100µg                                   |
| Visualización                      | Vapores de Iodo                          | Vapores de Iodo                            | Vapores de Iodo                             |
| Límite de<br>detección             | 0.8µg                                    | 0.8µg                                      | 0.8µg                                       |

Ninguna impureza fue detectada en las condiciones empleadas, apareciendo una sola mancha cuyo R<sub>f</sub> en las tres condiciones está en el intervalo de 0,5 a 0,6.

✓ **Cromatografía de gases.**

En el estudio de validación de la técnica de determinación del contenido de G-0 realizado en el año 1998 [7] se utilizó el método del patrón interno para la evaluación o análisis. Se prepararon una solución del patrón interno, una solución patrón y una de ensayo bajo las siguientes condiciones cromatográficas:

- Temperatura del horno: 140<sup>0</sup>C.
- Temperatura del inyector: 230<sup>0</sup>C.
- Temperatura del detector: 280<sup>0</sup>C.
- Nitrógeno: 37mL/min.
- Hidrógeno: 30mL /min.
- Aire: 400mL/min.
- Sensibilidad: Atenuación 256 y Rango 10<sup>2</sup>.

El parámetro linealidad cumplió con los criterios de aceptación establecidos, en el intervalo de concentraciones de 3,48mg/mL a 6,5mg/mL. En cuanto a la precisión, la técnica resultó repetible y reproducible, con coeficientes de variación de 0,3320% y 0,3719% respectivamente. La técnica es exacta, con un coeficiente de recuperación de 99,96%. Además la exactitud se demostró aplicando una prueba de hipótesis t de Student, en la que no se encontraron diferencias significativas entre el valor experimental y el certificado. Se observó también que ninguna de las impurezas interfiere en la señal del G-0, lo que demuestra la especificidad de la técnica.

✓ **Cromatografía Líquida de Alta Resolución.**

Se realizó la validación de una técnica analítica a través de la cromatografía líquida de alta resolución con vistas a cuantificar el principio activo G-0 durante su estudio de estabilidad química. La misma resultó ser lineal en el intervalo de concentración de 0,02mg/mL a 0,08mg/mL, precisa, exacta y con límites de detección y cuantificación de 0,005µg/mL y 0,05µg/mL respectivamente. También se comprobó la especificidad de la técnica, para lo cual se colocaron las muestras de G-0 en medio ácido, básico y oxidante y se obtuvieron los picos correspondientes a los productos de degradación, que presentaron tiempos de retención inferiores al del G-0 en medio básico y en presencia de peróxido de hidrógeno 30%. Estos productos de degradación no interfieren en la señal obtenida para el G-0 [8].

**1.1.3. Estudios de Preformulación.**

**1.1.3.1. Propiedades químico-físicas.**

✓ **Determinación del coeficiente de reparto.**

Se estimó el coeficiente de reparto de G-0, G-1, UC-244, UC-245 en n-octanol/agua usando el TOSS MODE para Windows 95 que es un método teórico que puede predecir las propiedades químico-físicas del fármaco, basado en el cálculo de los

momentos espectrales de una matriz. Para determinar la concentración del fármaco en la fase acuosa se usó una técnica analítica de HPLC en fase reversa. Se obtuvo como resultado un coeficiente de reparto de 1,79 y se corroboró este valor por el método clásico de determinación del mismo mediante el cual se obtuvo un valor de  $1,56 \pm 0,02$ . Se demostró la validez del modelo con un valor del coeficiente de correlación de 0.984 de buena clasificación para las predicciones del coeficiente de reparto [9].

✓ **Sublimación.**

Se realizó un estudio para determinar la capacidad de sublimación del G-0 donde se comprobó que a 55°C sublima. Para la caracterización del sublimado se utilizaron diferentes técnicas: espectroscopía IR, espectrofotometría UV-VIS y cromatografía de capa delgada. Además se determinó la velocidad de pérdida de peso debido a la sublimación. Considerando que la muestra se extendió de forma uniforme sobre el fondo de los pesafiltros, la velocidad de sublimación del G-0 a 55°C fue de 4,2887mg/día/cm<sup>2</sup>. También se realizó un ensayo para evaluar el fenómeno de sublimación del G-0 presente en la premezcla G-0 fosfato monodivale, mediante la cuantificación del G-0 residual en el tiempo en muestras conservadas a 55°C. Se apreció una disminución del contenido de G-0 en las muestras, tanto de la materia prima como en la mezcla binaria, por lo que la formulación de premezclas con el fosfato monodivale no modificó la capacidad de sublimación del G-0 [10].

**1.1.3.2. Estabilidad.**

✓ **Estabilización del G-0 en forma sólida.**

Con la finalidad de evaluar la posibilidad de empleo del derivado furánico G-0 en el tratamiento de la coccidiosis en aves y conejos administrados en el pienso, Belkys R. y Aymet M. en el año 1994 [11] realizaron un trabajo, en el cual se elaboraron dispersiones sólidas con este principio activo, unas por el método de fusión y otras

por el método del solvente y se evaluó de forma preliminar la estabilidad de este bioactivo en dichas dispersiones (sometidas a condiciones drásticas), por cromatografía de placa delgada, espectrofotometría UV-VIS y espectrofotometría IR. En todas las dispersiones sólidas elaboradas, el G-0 se degrada antes de los 15 días lo cual fue demostrado por todos los métodos de análisis empleados. Además se iniciaron las pruebas para la microencapsulación de este producto con el objetivo de su estabilización.

Se obtuvieron microcápsulas muy bien definidas utilizando una técnica de separación-coacervación de fases la cual resulta muy factible de hacer en condiciones de laboratorio, además de ser asequible desde el punto de vista económico, recomendándose la optimización de la misma y la realización de estudios de estabilidad de las microcápsulas.

✓ **Influencia de condiciones drásticas en la estabilidad.**

Se llevó a cabo un estudio de estabilidad para proponer las condiciones bajo las cuales se realizará el estudio de estabilidad de la materia prima G-0. Para desarrollar este trabajo fue preciso validar una técnica analítica por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa.

*Temperatura y humedad.*

Las temperaturas seleccionadas fueron 30, 40, 50<sup>0</sup>C y refrigeración y los ambientes de humedad relativa de 60, 80 y 100%. De acuerdo al comportamiento observado no existieron variaciones significativas entre los valores de porcentaje obtenidos a las diferentes temperaturas y humedades relativas no produciéndose así degradaciones significativas del G-0, en el tiempo en que se analiza el estudio.

*Luz*

Para desarrollar esta evaluación se utilizaron las fuentes de energía que pudieran influir desde la producción del producto hasta el envase para lo cual se almacenaron las muestras en frascos de vidrio transparente ámbar e incoloro durante 16 días. La estabilidad del producto no se vio significativamente afectada,

frente a ninguna de las dos fuentes de luz, cuando el producto se encontraba almacenado en frasco transparente ámbar, ocurriendo lo contrario con el almacenamiento en frasco transparente e incoloro. Se recomienda que para mantener la estabilidad del G-0 se debe tener en cuenta que la manipulación y almacenamiento de las muestras en el estudio de estabilidad de estante se realice en frasco ámbar [8].

✓ **Estabilidad del G-0 disuelto en solventes de interés analítico.**

Para el estudio se seleccionaron solventes de interés analítico que fueran utilizados en las diferentes técnicas analíticas que permiten realizar el control de la calidad del G-0, ellos son: acetona, etanol y acetonitrilo/agua 80:20. Como resultado del estudio se demuestra que las determinaciones analíticas del producto, que incluye su disolución previa, deben ser manipuladas en frasco ámbar, lo que queda corroborado por la disminución rápida de la concentración de G-0 colocada en frascos de vidrio transparentes e incoloros [8].

**1.1.3.3. Propiedades farmacotécnicas.**

✓ **Propiedades farmacotécnicas del G-0 en estado sólido.**

*Tamaño de partícula y su distribución.*

Para la determinación del tamaño de partícula promedio se utilizó el método de tamizaje para tres lotes de G-0 materia prima, obteniéndose los valores 305,5 $\mu$ m; 382,76 $\mu$ m y 407,68 $\mu$ m respectivamente. Para comparar los tamaños de partículas promedio de los tres lotes se realizó un análisis de varianza no paramétrico utilizando el test de Kruskal-Wallis, no existiendo diferencias significativas entre ellos. En la determinación de la distribución del tamaño de partícula se construyeron los denominados histogramas de frecuencia dando como resultado que los tres lotes presentan gran cantidad de polvo fino ya que hay un alto contenido de producto con tamaño de partícula menor de 300  $\mu$ m.

*Forma de las partículas.*

En la caracterización de la forma de las partículas se usó la microscopía donde se pudo observar que el G-0 presenta partículas alargadas e irregulares que pudieran corresponder al tipo denominado prismáticas según la clasificación dada por Vila Jato.

*Densidad aparente, densidad real y porosidad.*

En la determinación de la densidad aparente, la densidad real y la porosidad del G-0 (75 $\mu$ m – 1000 $\mu$ m) se obtuvieron los siguientes resultados:

- Densidad aparente (g/mL) = 0,452
- Densidad real (g/mL) = 0,529
- Porosidad (%) = 14,59

*Velocidad de flujo y ángulo de reposo.*

La velocidad de flujo se determinó a una masa de G-0 de tamaño de partícula entre 75 $\mu$ m-1000 $\mu$ m. Se comprobó que este no fluye debido a la elevada cantidad de polvo fino que presentan los lotes de este producto, lo cual ofrece una mayor superficie específica trayendo consigo un mayor grado de empaquetamiento y cohesividad del material. Además la forma prismática que presentan sus partículas y en alguna medida su porosidad fueron otras propiedades que pudieran explicar esta resultado. No fue posible determinar el ángulo de reposo [10].

#### **1.1.3.4. Formulación.**

✓ **Formulación del G-0 como premezcla en forma de polvo.**

Se realizó un estudio de compatibilidad con excipientes, donde el G-0 se encontraba al 1% en forma de premezcla en polvo para la administración a las aves mediante una técnica espectrofotométrica UV-VIS. Los mejores resultados relacionados con la compatibilidad del producto con los excipientes evaluados se

obtuvieron para la premezcla que incluía el fosfato mono-dicálcico, que contenía un 96.48 % de principio activo a los 90 días de iniciado el estudio [10].

#### **1.1.4. Propiedades farmacológicas.**

El derivado furánico G-0 es una sustancia que tiene actividad frente a bacterias y hongos. Varios son los trabajos que se han realizado en este sentido hasta el momento. Cortés en 1986 [12] determinó que la mínima concentración inhibitoria (MCI) para las bacterias estudiadas se encuentra entre 100mg/mL y 200mg/mL destacándose dentro de las más sensibles la *Escherichia coli* y la *Klebsiella pneumoniae* y dentro de las de mayor resistencia la *Pseudomona aeruginosa* y el *Staphylococcus aureus*. Por otra parte, en las cuatro especies de hongos evaluadas (*Aspergillus nidulans*, *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus niger* y *Helmient hosporium stenospilum*), se apreció su interferencia en la germinación de los conidios.

En ese mismo año Dorado [13] demostró que el G-0 posee actividad antiinflamatoria; se observa que a dosis única de 4,4mg/Kg y 11mg/Kg de peso vivo (p.v.), administrado por vía intraperitoneal (i.p.) en ratas albinas hembras 15 min. después de la aplicación del agente flogístico (formalina 1%, dextrana 6 % y albúmina de huevo al 2%), inhibe la aparición y desarrollo de la respuesta inflamatoria de manera similar al ácido acetil salicílico a dosis de 100mg/Kg y 200mg/Kg de p.v.

Al evaluar la influencia del G-0 (dosis de 4,4mg/Kg y 11mg/Kg p.v. por vía oral e i.p.) sobre la temperatura de ratas albinas machos, en condiciones normales y una vez provocada la reacción de hipertermia con levaduras de cerveza, se comprobó que el G-0, al igual que el ácido acetil salicílico (a dosis única de 100mg/Kg y 200mg/Kg), no modifica la temperatura rectal en ausencia de fiebre e inhibe la aparición y desarrollo de la reacción de hipertermia inducida por la levadura de cerveza; aunque en un período más corto (de 3 horas para la administración i.p. y de 2 horas para la vía oral) que el ácido acetil salicílico [14, 15].

Cedán y colaboradores [16] demostraron que el G-0 en dosis única i.p. equivalente al 10% de la DL-50 en ratas albinas machos tiene efecto diurético en orina durante 24 horas al ser disuelto en suero fisiológico, incrementa la excreción de sodio en orina al ser disuelto en agua destilada e induce un aumento de la excreción urinaria de potasio al ser disuelto en suero fisiológico. La disolución de G-0 en uno u otro de estos solventes puede ser un factor que modifica la respuesta del órgano excretor al derivado furánico.

Además se ha comprobado la eficacia del G-0 en el tratamiento de la coccidiosis cecal inducida artificialmente en pollos de ceba, en ponedoras Leghorn afectadas naturalmente y en la coccidiosis intestinal en conejos provocada de forma artificial y en infecciones naturales.

En este sentido podemos mencionar los trabajos realizados por Alfonso en 1991 [17] relacionados con la actividad anticoccidial mostrada por el G-0 en infecciones naturales por coccidias intestinales en conejos.

Investigaciones realizadas por Olazábal y colaboradores en 1993 [18], en relación con la evaluación de la actividad anticoccidiana en pollos de ceba infectados experimentalmente con *Eimeria tenella*, demostraron que para dosis de 3µg/mL de G-0 administrado en el agua de bebida manifiesta buenos resultados cuando se aplica durante 5 días y se muestra altamente efectivo cuando se aplica durante 10 días consecutivos, con una reducción del 98% del número de quistes.

Por otra parte González y colaboradores [19] encontraron que este producto disminuye la mortalidad causada por infecciones naturales producidas por *Eimeria tenella* en reemplazo de ponedoras.

En el año 2004 López [20] realizó un estudio con aves White Leghorn conformando dos grupos a los cuales se le administraron: 24µg/mL de G-0 al primer grupo y, Amprolium a 125µg/mL al segundo. Ambos productos se aplicaron diariamente en el pienso de las aves durante 41 días para comparar el efecto profiláctico de los mismos en la prevención de coccidiosis. En el segundo experimento realizado se aplicó a dos grupos de 2000 aves, cada uno afectadas con coccidiosis que estaban siendo tratadas con Amprolium en el pienso a una dosis de 125µg/mL, G-0 a

24µg/mL a un grupo de aves durante una semana y el resto se continuó tratando con Amprolium. Se comprobó que existieron diferencias significativas en los valores de ganancia en peso y conversión entre las aves tratadas profilácticamente y terapéuticamente con G-0 24µg/mL y con Amprolium 125µg/mL, con mejores respuestas para el G-0, siendo menor la presencia de lesiones en las aves tratadas con G-0 el cual no interfirió con la aplicación de vacunas y medicamentos aplicados. La dinámica de expulsión semanal de oocistos en las heces mostró un comportamiento similar a la respuesta inmune que se produce en las aves ante esta parasitosis, además el G-0 aplicado en un brote de coccidiosis en aves redujo significativamente el número de las muertes.

#### **1.1.5.Toxicidad**

Navarro [21], en un estudio histopatológico en ratas a las que se les administró G-0 analizó las modificaciones patológicas producidas en órganos vitales de la economía luego de administrar dosis única del producto de 4,4mg/Kg y 11mg/Kg por vía i.p.; observando la presencia de hemorragia intralveolar e infiltrado inflamatorio agudo en los pulmones y hemorragia subaracnoidea en el cerebro; sin embargo no se produjeron alteraciones en el corazón ni en los riñones. En sentido general se detectó un aumento progresivo de la afección en relación con la dosis y el tiempo transcurrido entre la administración del producto y el sacrificio de los animales, excepto para la hemorragia subaracnoidea.

En 1988 Frometa [22] en un estudio histopatológico de órganos del aparato endocrino, después de la administración en ratas albinas de una dosis de 4,4mg/Kg de peso de G-0 por vía i.p. observó la presencia de congestión de la hipófisis, pancreatitis intersticial e infiltración por vacuolas grasas en ascitis pancreáticas. A nivel suprarrenal se observó congestión corticomédular con hemorragias locales y no se detectaron alteraciones en tiroides, testículos ni en ovarios.

En estudios realizados por Salomón y Pardo [23] para valorar la acción mutagénica del producto G-0 sobre la cepa UH 214 de *Aspergillus nidulans* se observó un halo

de inhibición del crecimiento de la cepa en concentraciones superiores a 0,005mg/mL. El porcentaje de toxicidad determinado (26,13%) permite clasificar al G-0 como un producto medianamente tóxico. En otro estudio, Jones [24] llegó a la conclusión de que el G-0 administrado en dosis única al 10% de la DL-50 ( vía i.p.), provoca una disminución de la fertilidad en ratas albinas hembras, mientras que su peso corporal post-parto y el de las crías aumenta.

La toxicidad aguda del G-0 fue determinada en aves de la raza Leghorn y en ratas Sprague Dowley. En las aves la administración se efectuó mediante el empleo de una sonda metálica utilizando como vehículo goma tragacanto y la DL<sub>50</sub> obtenida fue de 1,02g/kg de masa corporal. Para el caso de las ratas se administró el G-0 disuelto en aceite vegetal y en polietilenglicol 400 y se obtuvo una DL<sub>50</sub> de 171,91mg/Kg y 173,89mg/Kg p.v. respectivamente. Estos valores permiten clasificar el producto como moderadamente tóxico [25, 26].

Estudios de irritabilidad cutánea fueron realizados en conejos NZB y ratas Sprague Dowley. En ambos casos los animales recibieron por aplicación cutánea sobre el lomo sano de un lado y previamente escarificados del otro una dosis única del G-0 por el método semioclusivo. El índice de irritabilidad cutánea primario determinado en cada estudio permite considerar a este compuesto como irritante ligero [27, 28].

Al valorar la toxicidad ocular en conejos NZB utilizando la técnica de Draize con el principio activo puro, se comprobó que produce toxicidad aguda ocular, por lo que es considerado irritante ocular [29].

Sosa y colaboradores [30] determinaron en 1994 la residualidad del G-0 en aves (carne y huevo), obteniendo como resultado que el órgano donde se produce mayor acumulación del producto es el hígado, pues al aplicar una dosis de 20mg/kg de masa corporal se detectaron en este órgano niveles inferiores a 2µg/mL después de 2 horas de post aplicación y posterior a las 24 horas no se encontró G-0. Por su parte en huevos no se detectó producto.

## **1.2. Preformulación.**

La preformulación, que surgió a finales de la década de los 50 y principios de los 60, es la primera etapa en el desarrollo racional de formas de dosificación de un principio activo y es el trabajo que abarca el conocimiento de las características básicas tanto biofarmaceuticas como fisicoquímicas que van a influir en la elección y desarrollo de la forma farmacéutica final del medicamento [31, 32]. El objetivo principal de los estudios de preformulación es generar información útil al formulador para el desarrollo de formas de dosificación biodisponibles, estables y que puedan producirse a nivel industrial. El tipo de información que se necesita depende de la forma de dosificación que se desea desarrollar y de las características de la molécula en cuestión: una nueva molécula (medicamento potencial) o una molécula que ya existe (fármaco ya en el mercado en una o más formas de dosificación) y de la que se desea desarrollar un genérico [33, 34].

En el caso de nuevas moléculas el trabajo de preformulación comienza generalmente después que el compuesto ha mostrado suficiente actividad en animales para justificar futuros ensayos en humanos [35]. La selectividad es crítica para el éxito de un programa de preformulación. No todos los parámetros se determinan para cada nuevo compuesto; los datos, según se generan, deben ser revisados para decidir los estudios adicionales que deben emprenderse.

### **1.2.1. Estabilidad.**

La estabilidad se define como la extensión en que un producto mantiene, entre unos límites específicos y durante todo su período de validez, las mismas propiedades y características que poseía en el momento de su elaboración.

El período de validez es el tiempo durante el cual un producto medicamentoso cumple con las especificaciones aprobadas después de su producción. El período de validez se utiliza para establecer la fecha de caducidad de los lotes individuales,

la cual no es más que la fecha colocada en la etiqueta del envase inmediato de un producto farmacéutico [36].

#### **1.2.1.1. Estabilidad del principio activo en disolución.**

Es un estudio enfocado fundamentalmente a la evaluación de la estabilidad química del principio activo. Este puede ser disuelto en varios medios:

- En disolución acuosa. Puede ser útil para detectar la fotolabilidad, la termolabilidad y el efecto del oxígeno sobre el fármaco en disolución; disponer en poco tiempo de productos de degradación, establecer el pH de máxima estabilidad, y, en consecuencia, predecir si se afecta su biodisponibilidad oral.
- En disolventes de distinta naturaleza. Su finalidad es conocer las características de estabilidad del principio activo en medios que habitualmente se utilizan en preformulación para aumentar su solubilidad, como el propilenglicol, el polietilenglicol, el etanol, etc.

Teniendo en cuenta que las reacciones en disolución se desarrollan a mayor velocidad que las que se producen al estado sólido, la utilización de preparados líquidos en disolución es un método rápido para la obtención de productos de degradación y facilita su tipificación y la determinación de su posible acción terapéutica y/o tóxica [37].

Entre las cuestiones que se determinan para evaluar la estabilidad de fármacos en disolución se encuentran los perfiles pH-estabilidad, para lo cual se evalúa previamente la influencia de la concentración del buffer.

La fuerza iónica del medio también puede modificar la velocidad de reacción de descomposición de una sustancia determinada y esta puede ser definida como la semisuma del producto de la concentración de los diferentes iones presentes multiplicado por la potencia de su carga [38].

## Materiales y Métodos.

### **2.1. Validación de la técnica para la cuantificación del G-0 mediante espectrofotometría ultravioleta.**

#### **Materiales.**

Reactivos:

Dihidrógenofosfato de sodio pa. Merck.

Carbonato de sodio anhidro pa. Panreac.

Hidróxido de sodio (perlas) pa. Panreac.

Ácido clorhídrico pa. Merck.

Ácido ortofosfórico 85% pa. VEB Laborchemie APOLDA.

Ácido Acético glacial pa. Panreac.

Cloruro de potasio pa. Reachim.

Acetonitrilo (calidad HPLC). Panreac.

Tampones pH 4 y 7. Panreac.

Alcohol isopropílico pa. Medicuba.

G-0 (muestra de referencia Lote 138) 99,84%.

G-0 (Lote 02-1-165) 99,25%.

Agua desionizada.

Instrumentos:

pH-metro digital. Metrohm.

Balanza analítica digital Sartorius.

Espectrofotómetro ULTROSPEC III.

Baño ultrasónico Bandelín Sonorex RK52.

Cromatógrafo líquido KNAUER (Alemania), con bomba de gradiente cuaternario. K-1000 y detector UV-VIS de  $\lambda$  variable.

Microjeringuilla 100 $\mu$ L, Unimetrics.

Membranas de celulosa tp: 0,45 $\mu$ m. Sartorius.

Bomba de vacío.

Dispositivo de filtración con membranas. Sartorius.

Estufas de calentamiento WTB Binder (Alemania).

Cristalería de laboratorio.

### **Métodos.**

Método analítico: Espectrofotometría UV-VIS.

### **Procedimiento Analítico.**

Para el desarrollo de este estudio se procedió según lo establecido en las normativas definidas por la conferencia internacional de armonización para la validación de técnicas analíticas utilizadas en la cuantificación de fármacos como materia prima [39].

- ✓ Preparación de la solución de referencia:

Se pesaron exactamente 25mg de G-0, muestra de referencia, y se transfirieron a un matraz de 25mL. Se le añadió aproximadamente 20mL de alcohol isopropílico y se colocó durante 3 min. en baño ultrasónico hasta total disolución y con protección de la luz para luego enrasar con alcohol isopropílico (Solución A).

A partir de la solución A se toma una alícuota de 5mL, se transfiriere a volumétrico de 100mL y luego se enrasa con agua desionizada. (Solución B).

De la solución B se toma una alícuota de 2mL, se transfiere a matraz de 25mL y se enrasa con agua desionizada.

Se desarrollaron los espectros UV-VIS contra blanco preparado de igual forma pero sin el analito y se determinó la longitud de onda de máxima absorción.

✓ Preparación de la solución de ensayo:

Se procedió de igual forma que en la preparación de la solución de referencia.

### **Procedimiento de Validación.**

#### **2.1.1. Linealidad.**

Se realizaron tres réplicas para la confección de la curva de calibración en el rango de 0,5µg/mL a 6µg/mL con valores intermedios de concentración de 1µg/mL, 2µg/mL y 4µg/mL para lo cual se siguió el procedimiento descrito para la preparación de la solución de referencia y a partir de la solución B se pipetearon alícuotas de 3,0mL; 2,0mL; 1,0mL; 0,5mL.y 0,25mL, se transfirieron a volumétricos de 25mL y se enrasaron con agua desionizada.

Finalmente se leyó la absorbancia de las soluciones finales a la longitud de onda de 361nm.

Con el total de réplicas se construyó la curva de calibración y se determinan:

- Ecuación de la recta de calibrado.
- Coeficiente de correlación de la región lineal.
- Coeficiente de variación de los factores respuesta.
- Desviación estándar relativa de la pendiente.
- Intervalo de confianza del intercepto.

Se utilizó el programa Estadística versión 6.0 sobre Windows para el desarrollo de la regresión lineal.

### **2.1.2. Precisión.**

#### Repetibilidad.

Se realizaron seis determinaciones a la concentración de 4µg/mL en iguales condiciones y el mismo analista. Se determinó el valor del coeficiente de variación de las determinaciones y el mismo debe resultar menor que 1,5% para materias primas.

#### Precisión Intermedia.

Se desarrollaron seis determinaciones a la concentración de 4µg/mL en iguales condiciones, dos analistas, dos días diferentes. Se calcula el coeficiente de variación para el total de determinaciones, el cual debe resultar menor del 3%.

Se realizó un test t de Student para muestras independientes para corroborar la existencia o no de diferencias significativas entre las determinaciones de los analistas y los días de trabajo.

### **2.1.3. Exactitud.**

Se desarrolló a través del análisis repetitivo de una muestra de concentración única conocida. Se realizaron seis réplicas a la concentración de 4µg/mL, utilizando la sustancia G-0 de referencia (pureza 99,84%) y se comparó el valor medio determinado y el certificado a través de la expresión:

$$\frac{\bar{C}_x}{C_{CERT}} = \frac{X}{100\%}$$

Donde:

$\bar{C}_x$ : pureza media experimental.

$C_{CERT}$ : pureza de la sustancia certificada.

El criterio de aceptación para las técnicas espectrofotométricas en función del porcentaje de recobro (%R) es:  $97\% \leq \% R \leq 103\%$ .

Se utilizó además como criterio el resultado de un test t de Student para comparar la media muestral calculada experimentalmente con el valor de pureza certificado para la muestra de referencia a través del Estadística para Windows versión 6.0, declarando las hipótesis:

$$H_0: \bar{x}_1 = \bar{x}_2$$

$$H_i: \bar{x}_1 \neq \bar{x}_2$$

Se cumplirá la hipótesis nula para  $p > 0,05$  (no existen diferencias significativas entre ambas medias).

#### **2.1.4. Selectividad.**

Para la realización de este ensayo se prepararon soluciones de G-0 (Lote 02-1-165) concentración  $6\mu\text{g/mL}$  y pH de 2,2 hasta 8,2, para lo cual se prepararon soluciones buffer fosfato para los pH 2,2; 3,15; 6,2; 7,2 y 8,2 y buffer acetato para pH 4,2 y 5,2. Las soluciones amortiguadoras fueron ajustadas con cloruro de potasio para mantener constante el valor de la fuerza iónica de 0,1M [40].

Para obtener las soluciones deseadas se siguió el procedimiento descrito para la preparación de la solución de ensayo, pero se sustituyó el agua desionizada por solución buffer de concentración 0,01mol/L al preparar la solución B.

Las soluciones finales recién elaboradas se trasladaron al espectrofotómetro y se obtuvieron los espectros de absorción en el rango de longitudes de onda de 200 hasta 600nm.

Con posterioridad las mismas se colocaron a temperatura de  $41^\circ\text{C}$  y  $30^\circ\text{C}$  en estufa y fueron muestreadas al cabo de 30 días para obtener sus

correspondientes espectros en el intervalo anteriormente señalado, con el objetivo de determinar cualquier producto de degradación que pudiera aparecer durante el tiempo de almacenamiento y en las condiciones prefijadas.

Las muestras también fueron ensayadas a través de una técnica por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en fase reversa con el fin de detectar los posibles productos de degradación no determinados por la técnica espectrofotométrica UV-VIS, usándose las siguientes condiciones cromatográficas:

- ✓ Fase Estacionaria: Eurosil Bios-1000 C18. 250x4mm ID 10µm.
- ✓ Fase móvil: Acetonitrilo/agua (80:20).
- ✓ Modo: Isocrático.
- ✓ Flujo: 0,3mL/min.
- ✓ Temperatura ambiente.
- ✓ Detector: UV-VIS de longitud de onda variable.
- ✓ Inyector: Rheodyne.

Software: Eurochrom 2000, versión 2.05.

#### Procedimiento:

Se pesaron exactamente 25mg de G-0, muestra de ensayo y se transfirieron a un matraz de 25mL. Se le añadieron aproximadamente 20mL de alcohol isopropílico y se colocó durante 3 min. en baño ultrasónico hasta total disolución y con protección de la luz, para luego enrasar con alcohol isopropílico (Solución A).

A partir de esta solución se tomó una alícuota de 5mL, se transfirió a volumétrico de 100mL y luego se enrasó con solución buffer, la cual fue previamente filtrada a través de membranas de celulosa (Solución B).

De la solución B se tomó una alícuota de 2mL, se transfirió a matraz de 25mL y se enrasó con Acetonitrilo/agua (80:20). Esta muestra fue desgasificada y a partir de ella se inyectaron 3µL en el cromatógrafo para su análisis. Se fijó la longitud de

onda de 361nm para determinar al analito objeto de estudio y se registraron los cromatogramas del G-0 en las soluciones buffer, a tiempo 0 para cada pH.

Posteriormente se almacenaron las soluciones en estufa y se muestrearon a intervalos apropiados según el caso, hasta que el principio activo alcanzara el 50% de degradación.

#### **2.1.5. Límite de Detección.**

El método utilizado en este caso estuvo basado en la desviación estándar de la respuesta y la pendiente de la recta de la curva de calibración [39].

Para esto se prepararon 6 soluciones del blanco y se realizaron las correspondientes lecturas de absorbancia a 361nm. Se calcula la desviación estándar de la respuesta del blanco y se determina el valor del límite de detección utilizando la siguiente expresión:

$$DL = \frac{3.3 * \sigma}{S}$$

Donde:

DL: Límite de detección.

$\sigma$ : Desviación estándar de la respuesta del blanco.

S: Pendiente de la curva de calibración.

#### **2.1.6. Límite de cuantificación.**

Se utiliza la misma metodología que para la determinación anterior pero la expresión a utilizar en este caso es la siguiente:

$$QL = \frac{10 * \sigma}{S}$$

Donde QL: Limite de cuantificación.

Todos los ensayos se realizaron con protección de la luz, teniendo en cuenta que en estudios anteriores realizados a esta sustancia se observó que este factor influye negativamente en la estabilidad del mismo [41, 8].

## **2.2. Estudio cinético del G-0 en medio acuoso.**

### **Materiales.**

#### *Reactivos:*

Dihidrógenofosfato de sodio pa. Merck

Carbonato de sodio anhidro pa. Panreac.

Hidróxido de sodio (perlas) pa. Panreac.

Ácido clorhídrico pa. Merck

Ácido ortofosfórico 85% pa. VEB Laborchemie APOLDA.

Ácido Acético glacial pa. Panreac.

Cloruro de potasio pa. Reachim.

Tampones pH 4 y 7. Panreac.

Alcohol isopropílico pa. Medicuba

G-0 (muestra de referencia Lote 138) 99,84%

G-0 (Lote 02-1-165) 99,25%

Agua desionizada.

Instrumentos:

pH-metro digital Metrohm.

Balanza analítica digital Sartorius

Baño ultrasónico Bandelín Sonorex.

Espectrofotómetro ULTROSPEC III

Baño de agua termostatado. Fungilab.

Cristalería de laboratorio.

### **Procedimiento.**

✓ Soluciones buffer:

Se utilizaron los sistemas buffer constituidos por ácido ortofosfórico-hidróxido de sodio (pH 2,2 y 3,15); Ácido acético-hidróxido de sodio (pH 4,2 y 5,2); dihidrógenofosfato de sodio-hidróxido de sodio (pH 6,2; 7,2 y 8,2), carbonato de sodio-ácido clorhídrico (pH 9,5). Para la preparación de los mismos se utilizó la metodología para preparación de soluciones buffer descrita por Bob Reynon [40].

A todas las soluciones se les ajustó la fuerza iónica con cloruro de potasio y para el ajuste de pH final se utilizó solución de hidróxido de sodio o ácido clorhídrico 0,2N y se midió con pH-metro digital equipado con electrodo combinado.

Para medir el efecto del pH las soluciones se prepararon a concentración de 0,01mol/L y la fuerza iónica ajustada de 0,1M.

La evaluación del efecto de la concentración del buffer se desarrolló utilizando los sistemas de pH 4,2 (región ácida), pH 6,2 (ligeramente ácida), pH 8,2 y 9,5 (región básica), y las concentraciones ensayadas para estos sistemas fueron para el primero:  $5 \times 10^{-3}$ ,  $1 \times 10^{-2}$  y  $2 \times 10^{-2}$  mol/L, para el segundo  $5 \times 10^{-3}$ ,  $6 \times 10^{-3}$ ,  $1 \times 10^{-2}$  y  $2 \times 10^{-2}$  mol/L, para el pH 8,2:  $5 \times 10^{-3}$ ,  $6 \times 10^{-3}$ ,  $7,5 \times 10^{-3}$ ,  $1 \times 10^{-2}$  y  $2 \times 10^{-2}$

mol/L y para 9,5:  $2 \times 10^{-3}$ ,  $6 \times 10^{-3}$  y  $1 \times 10^{-2}$ . Se mantuvo el ajuste de la fuerza iónica en un valor de 0,1M en cada caso.

Para la evaluación del efecto salino sobre la velocidad de degradación se seleccionaron los sistemas de pH 4,2 y 8,2 y se mantuvo constante la concentración del buffer en 0,01mol/L. Se ajustaron los valores de fuerza iónica con cloruro de potasio a los valores de 0,05; 0,1; 0,3 y 0,7M.

### **2.2.1. Orden de reacción y constante de velocidad específica.**

#### Procedimiento analítico:

Se realizaron curvas de calibración en el rango de 0,5 $\mu$ g/mL a 6 $\mu$ g/mL con la sustancia G-0 de referencia para realizar la cuantificación antes de comenzar los experimentos cinéticos. Se siguió la metodología planteada en la validación de la técnica. La cantidad de G-0 residual se determinó por espectrofotometría UV-VIS contra blanco preparado de forma idéntica a la muestra a la longitud de onda de 361nm.

#### Procedimiento cinético:

Se preparó una solución madre de G-0 en alcohol isopropílico de concentración 1mg/mL (Solución A) y se tomó una alícuota de 5mL, la cual se transfirió a volumétrico de 100mL y se enrasó con solución buffer (Solución B). Se pipetearon dos alícuotas de 2mL cada una y se enrasaron en volumétricos de 25mL con agua desionizada (Solución C) y se midió la absorbancia esta a tiempo 0. Se colocó la solución B en erlenmeyer de 100mL tapado y se introdujo en un baño de agua termostatado a 41°C, protegido de la luz con papel de aluminio. La toma de muestra se realizó a intervalos de tiempo apropiados según el comportamiento cinético del fármaco frente a cada valor de pH, lo cual

fue determinado previamente. Este procedimiento se realizó por triplicado para cada condición evaluada.

Los órdenes de reacción y las constantes de velocidad de degradación se determinaron por el método integral, aplicando la regresión lineal a los gráficos de %r (porcentaje de fármaco remanente),  $\ln\%r$  y  $1/\%r$  utilizando el tabulador electrónico Microsoft Excel y el paquete estadístico Estadística versión 6.0. [42, 43].

### **2.2.2. Evaluación del efecto catalítico de las especies buffer.**

El efecto de catálisis de las especies buffer se determinó utilizando los sistemas buffer acetato (pH 4,2), fosfato (pH 6,2; 8,2) y carbonato (pH 9,5). Para cada uno de ellos se determinó la constante de velocidad específica ( $k_{\text{buffer}}$ ) en función de la concentración del buffer. Los procedimientos analítico y cinético desarrollados fueron descritos en el acápite anterior.

La constante de velocidad de degradación a cero concentración del buffer ( $k_0$ ) se determinó en cada caso como el intercepto de la recta de regresión de las constantes de velocidad experimentales con la concentración del buffer, según la ecuación:

$$k_{\text{obs}} = k_0 + k_{\text{buffer}} [P_T]$$

Donde  $k_{\text{buffer}}$  es la constante de velocidad catalítica de la especie buffer y  $[P_T]$  es la concentración total del buffer.

### **2.2.3. Evaluación de la fuerza iónica.**

El efecto salino se evaluó para los valores de pH 4,2 y 8,2 a temperatura y concentración del buffer constante. La determinación se realizó a través del ploteo de  $\log k_{obs}$  contra  $\sqrt{\mu}/1+\sqrt{\mu}$ , tal y como describe la ecuación:

$$\log k_{obs} = \log k_0 + 2Q \cdot Z_A Z_B \cdot \sqrt{\mu} / (1 + \sqrt{\mu})$$

Donde  $k_0$  es la constante de velocidad de degradación a dilución infinita,  $Z_A$  y  $Z_B$  son las cargas de ambos reactivos,  $\mu$  es la fuerza iónica del medio y  $Q$  está definida por:

$$Q = (1,825 \cdot 10^6) \left[ \frac{D}{(T\varepsilon)^3} \right]^{1/2}$$

En esta expresión  $D$  es la densidad y  $\varepsilon$  es la constante dieléctrica del disolvente,  $T$  es la temperatura absoluta.

La determinación de la constante de velocidad  $k_{obs}$  se describe en el punto 2.2.1.

### **2.2.4. Perfil pH-velocidad de degradación.**

El efecto del pH en la degradación del principio activo G-0 se determinó mediante el ploteo de  $\log k_{obs}$  vs pH a temperatura de 41°C, concentración del buffer cero y fuerza iónica de 0,1M.

## Resultados y Discusión.

### 3.1. Validación de la técnica para la cuantificación del G-0 mediante espectrofotometría ultravioleta.

#### 3.1.1. Linealidad.

Una de las etapas principales durante la validación de una técnica analítica cuantitativa, es comprobar que en el rango de cuantificación la técnica nos ofrece una respuesta lineal. Para la comprobación de la linealidad, la literatura refiere algunos criterios que han de tenerse en cuenta. Entre ellos se encuentra el coeficiente de correlación, el cual se reporta para materias primas con valores superiores a 0.990, como aceptables. La siguiente tabla muestra los resultados obtenidos, los cuales fueron procesados utilizando la regresión lineal, obteniéndose la curva de calibración (Fig.1).

**Tabla 3.** Relación de la concentración de las soluciones preparadas y la respuesta del método.

| Concentración del patrón ( $\mu\text{g/mL}$ ) | Absorbancia Réplica 1 | Absorbancia Réplica 2 | Absorbancia Réplica 3 |
|---|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| 6   | 0,752                 | 0,763                 | 0,760                 |
| 4   | 0,501                 | 0,514                 | 0,508                 |
| 2   | 0,249                 | 0,256                 | 0,248                 |
| 1   | 0,134                 | 0,130                 | 0,126                 |
| 0,5   | 0,060                 | 0,067                 | 0,062                 |

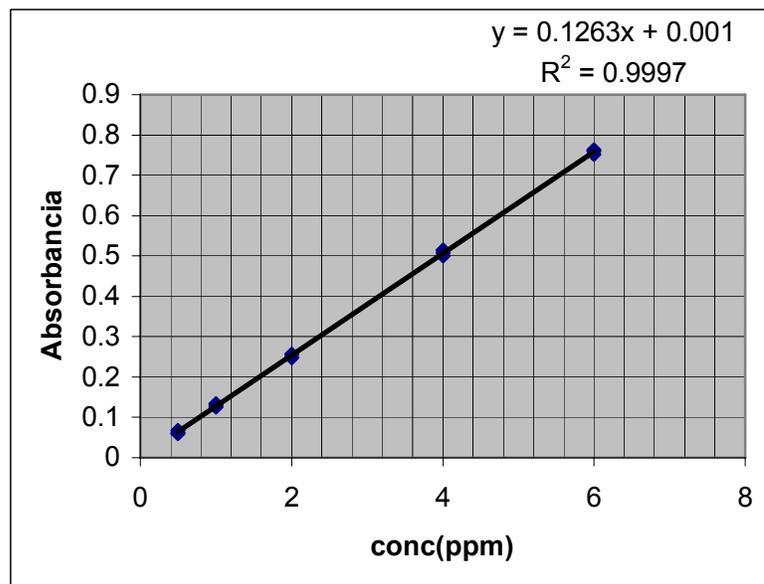


Fig.1. Representación gráfica de la curva de calibración y ecuación de la recta.

Tabla 4. Resultados estadísticos obtenidos para evaluar la linealidad.

|                               | r      | C.V.F (%) | Sbrel (%) | $a \pm tSa$        |
|-------------------------------|--------|-----------|-----------|--------------------|
| <b>Valor obtenido</b>         | 0,9998 | 2,91      | 0,79      | -0,000974±0,003542 |
| <b>Criterio de Aceptación</b> | 0,9900 | <5%       | <2%       | Contener el cero   |

r: coeficiente de correlación.

C.V.F (%): Coeficiente de variación de los factores respuesta.

Sbrel %: Desviación estándar relativa de la pendiente.

$a \pm tSa$ : Límites de confianza del intercepto.

Teniendo en cuenta las regulaciones internacionales para determinar el intervalo de concentración en el cual la técnica proporciona una respuesta lineal, se realizaron determinaciones utilizando dos niveles de concentración superiores: 8 y 10  $\mu\text{g/mL}$ .

Sin embargo no se obtuvieron buenos resultados en los parámetros de linealidad calculados para valores superiores a 8  $\mu\text{g/mL}$ .

El intervalo escogido (0,5 $\mu\text{g/mL}$  a 6 $\mu\text{g/mL}$ ) está en correspondencia con el valor de concentración a utilizar en el estudio cinético de 4 $\mu\text{g/mL}$ , el cual se justifica por los resultados obtenidos en los estudios “in vivo” realizados al producto con anterioridad en función de determinar la concentración efectiva contra la coccidia [18].

Por otra parte, el proceso cinético se seguirá hasta que el principio activo se haya degradado un 50% de su concentración inicial, por lo que nunca serán de interés para nuestro estudio valores inferiores al establecido como mínimo.

### **3.1.2. Precisión.**

#### Repetibilidad.

En la tabla 5 se muestran los valores de concentración obtenidos a partir del análisis repetidos de una muestra según el criterio de aceptación reportado para este estudio en materias primas, el coeficiente de variación debe ser inferior a 1,5% y el valor experimental obtenido de 0,88%, por lo tanto la técnica es repetible.

**Tabla 5.** Resultados obtenidos para el estudio de la repetibilidad.

| Réplicas | Absorbancia | Concentración (mg /mL) | Valor medio (mg /mL) | Desv. estándar | Coef. de variación (%) |
|----------|-------------|------------------------|----------------------|----------------|------------------------|
| 1        | 0,507       | 0,0501                 | 0,0504               | 0,0004         | 0,88%                  |
| 2        | 0,505       | 0,0503                 |                      |                |                        |
| 3        | 0,501       | 0,0497                 |                      |                |                        |
| 4        | 0,512       | 0,0508                 |                      |                |                        |
| 5        | 0,509       | 0,0505                 |                      |                |                        |
| 6        | 0,513       | 0,0509                 |                      |                |                        |

Precisión intermedia

**Tabla 6.** Resultados obtenidos para evaluar la precisión intermedia de la técnica espectrofotométrica.

| Concentración(mg/mL) |        |            |        |
|----------------------|--------|------------|--------|
| Analista 1           |        | Analista 2 |        |
| Día 1                | Día 2  | Día 1      | Día 2  |
| 0,0501               | 0,0494 | 0,0509     | 0,0514 |
| 0,0503               | 0,0502 | 0,0505     | 0,0507 |
| 0,0497               | 0,0500 | 0,0511     | 0,0502 |
| 0,0508               | 0,0508 | 0,0513     | 0,0501 |
| 0,0505               | 0,0511 | 0,0506     | 0,0511 |
| 0,0509               | 0,0509 | 0,0501     | 0,0505 |

No. de determinaciones: 24

Valor medio global: 0,0505mg/mL.

Desviación estándar: 0,0005

Coefficiente de Variación: 1,0000%

Para comprobar si existían diferencias entre los resultados de los dos analistas o entre los dos días de trabajo para cada analista, se utilizó el test t de Student para muestras independientes.

Los resultados se reflejan en la siguiente tabla.

**Tabla 7.** Valores de probabilidad obtenidos al comparar los resultados de dos analistas, dos días de trabajo diferentes.

| <b>Analista 1<br/>(dia1-dia2)</b> | <b>Analista 2<br/>(dia1-dia2)</b> | <b>Dia1<br/>(Analista1-Analista 2)</b> | <b>Dia2<br/>(Analista1-Analista 2)</b> |
|-----------------------------------|-----------------------------------|--|--|
| p= 0,9597                         | p= 0,7671                         | p= 0,1823                              | p= 0,4462                              |

Como se puede apreciar los valores de probabilidad obtenidos son mayores que 0,05 (significación estadística) en todos los casos, por lo que podemos afirmar que no existen diferencias significativas entre las determinaciones realizadas por los analistas y los dos días de trabajo.

Teniendo en cuenta que los resultados que se analizan en los ensayos de Repetibilidad y Precisión Intermedia cumplen con los criterios establecidos para las materias primas, podemos plantear que nuestra técnica es precisa.

### 3.1.3. Exactitud.

La siguiente tabla 8 muestra los resultados que se obtienen luego del análisis repetido de muestras a la concentración de 4µg/mL. Teniendo en cuenta el cálculo del % de recuperación (R) y los límites de aceptación para las técnicas espectrofotométricas, el cual se debe encontrar entre 97%<R<103%, podemos afirmar que la misma es exacta.

**Tabla 8.** Determinación de la exactitud utilizando el valor del % de Recuperación, para un nivel de concentración.

| <b>Absorbancia</b> | <b>Concentración (%)</b> | <b>Media(%)desv.</b> | <b>% de Recuperación</b> |
|--------------------|--------------------------|----------------------|--------------------------|
| 0,498              | 98,77                    | 100,75 ± 1,28        | 100,91                   |
| 0,506              | 100,35                   |                      |                          |
| 0,504              | 99,96                    |                      |                          |
| 0,512              | 101,54                   |                      |                          |
| 0,515              | 102,13                   |                      |                          |
| 0,513              | 101,74                   |                      |                          |

Una técnica analítica por HPLC en fase reversa desarrollada para cuantificar G-0 (materia prima) durante su estudio de estabilidad en estado sólido muestra un % de recuperación de 101,03%, relativamente cercano al obtenido en nuestro estudio [8].

#### **3.1.4. Selectividad.**

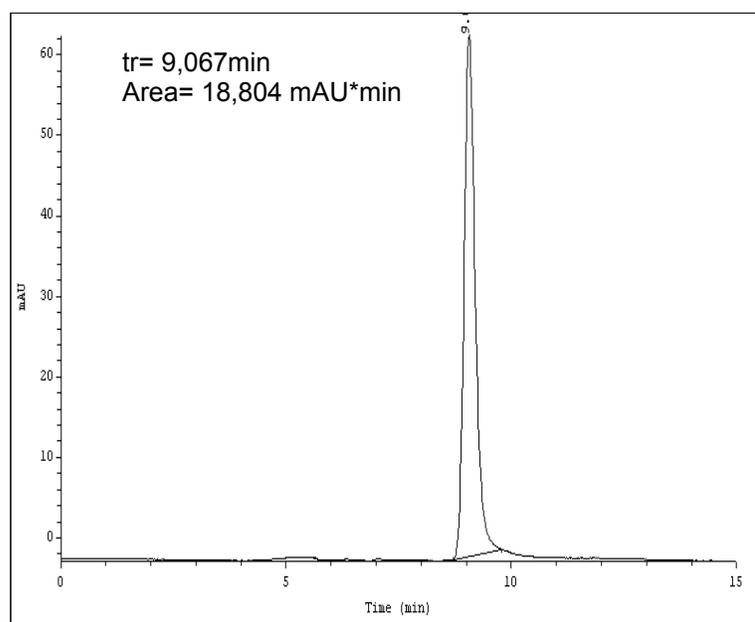
Para evaluar la selectividad de la técnica en cuestión en primer lugar debe tenerse en cuenta que la misma va a ser utilizada para el estudio de la degradación del G-0 en medio acuoso. Este medio está constituido en gran parte por soluciones buffer, por lo tanto es necesario que la técnica analítica a desarrollar sea capaz de determinar el G-0 sin interferencias de los productos de degradación que en este medio se pudieran generar. Con este motivo se prepararon soluciones de la sustancia en cuestión a diferentes valores de pH, tal como se plantea en el materiales y métodos. Se realizaron los espectros UV-VIS desde 200nm hasta 600nm a tiempo 0 y al cabo de 1 y 2 meses de almacenadas las soluciones a 30 y 41°C.

Se observa en todos los casos la banda de absorción del G-0 para tiempo 0, con un máximo entre 361nm y 365nm.

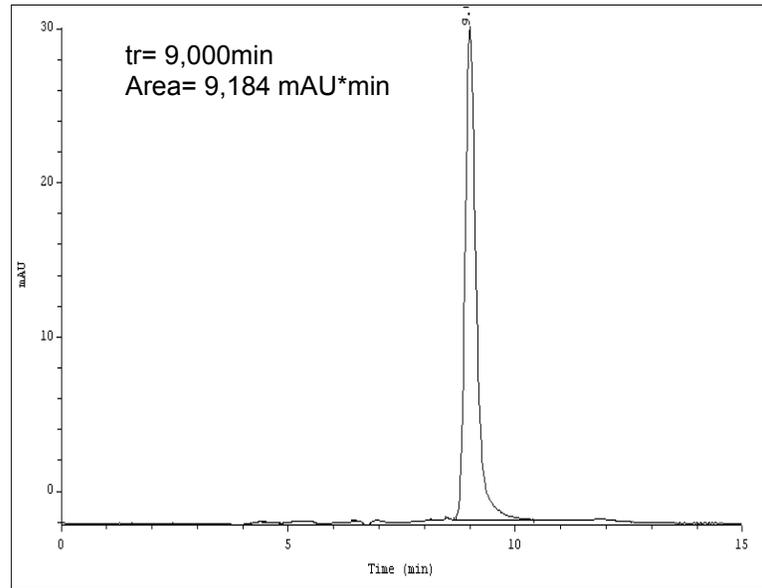
- ✓ pH 2,2: Para ambas condiciones de temperatura se observa la disminución del pico característico de la materia prima, siendo esta disminución significativa para la temperatura de 41°C, en la cual desaparece casi totalmente, lo cual parece indicar que la temperatura acelera el proceso degradativo. Además se presenta un nuevo pico alrededor de los 265nm a los 71 días de almacenada la muestra, el cual pudiera estar asociado a un producto de degradación (Anexos 1 y 2).
  
- ✓ pH 3,15: En ambos casos se aprecia una disminución del pico característico del G-0, el cual se evidencia significativamente en la muestra almacenada a 41°C, donde desaparece casi completamente la banda de absorción del mismo. No se aprecia la aparición de nuevos picos (Anexos 3 y 4).
  
- ✓ pH 4,2: En ambos casos se aprecia una disminución del pico característico del G-0, el cual se evidencia significativamente para la muestra almacenada a 41°C, donde desaparece casi completamente la banda de absorción del mismo. No se aprecia la aparición de nuevos picos (Anexos 5 y 6).
  
- ✓ pH 5,2: Para ambas condiciones de temperatura se observa la disminución del pico característico de la materia prima, siendo significativa para la temperatura de 41°C, en la cual desaparece casi totalmente. Además se aprecia un nuevo pico alrededor de los 280nm a los 76 días de almacenada la muestra para la temperatura de 30°C y a los 23 días para la muestra sometida a 41°C, el cual pudiera estar asociado a un producto de degradación (Anexos 7 y 8).
  
- ✓ pH 6,2: En ambas condiciones de temperatura se aprecia que al cabo de los 20 días ha desaparecido casi totalmente el pico del G-0 y se observa la aparición de un pico nuevo, alrededor de los 280nm (Anexos 9 y 10).

- ✓ pH 7,2: En ambas condiciones de temperatura se aprecia que al cabo de los 22 días ha desaparecido casi totalmente el pico del G-0 y se observa la aparición de un pico nuevo, alrededor de los 280nm (Anexos 11 y 12).
- ✓ pH 8,2: En ambas condiciones de temperatura se aprecia que al cabo de los 22 días ha desaparecido casi totalmente el pico del G-0 y se observa la aparición de un pico nuevo, también alrededor de los 280nm (Anexos 13 y 14).

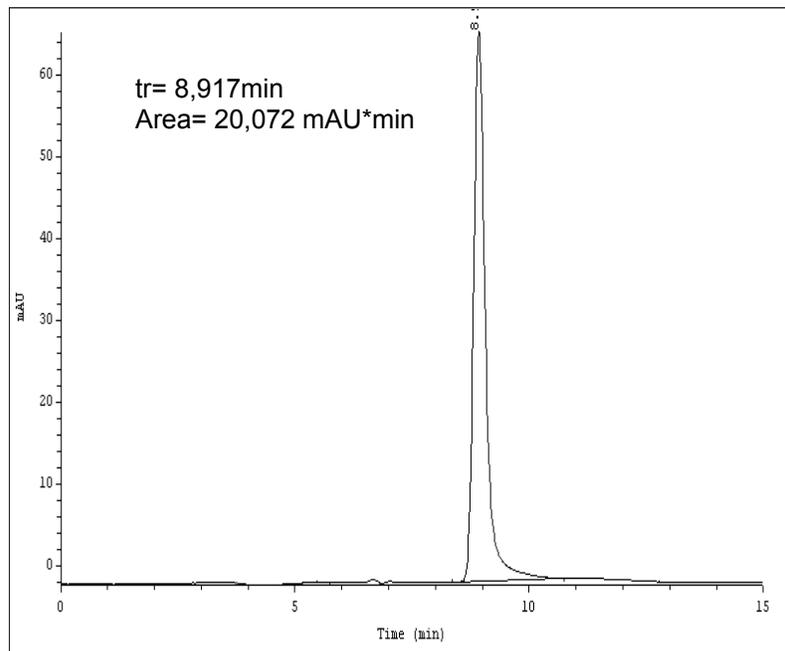
También se comprobó la especificidad por comparación de los resultados obtenidos por espectrofotometría UV-VIS con una técnica analítica por HPLC en fase reversa. Los cromatogramas obtenidos (Figuras 2, 3, 4 y 5) mostraron que al cabo de un tiempo de almacenamiento (el suficiente para que el p.a se degradara en un 50% aproximadamente) existió una disminución significativa del área del pico correspondiente al G-0 con un comportamiento similar al de la técnica en estudio.



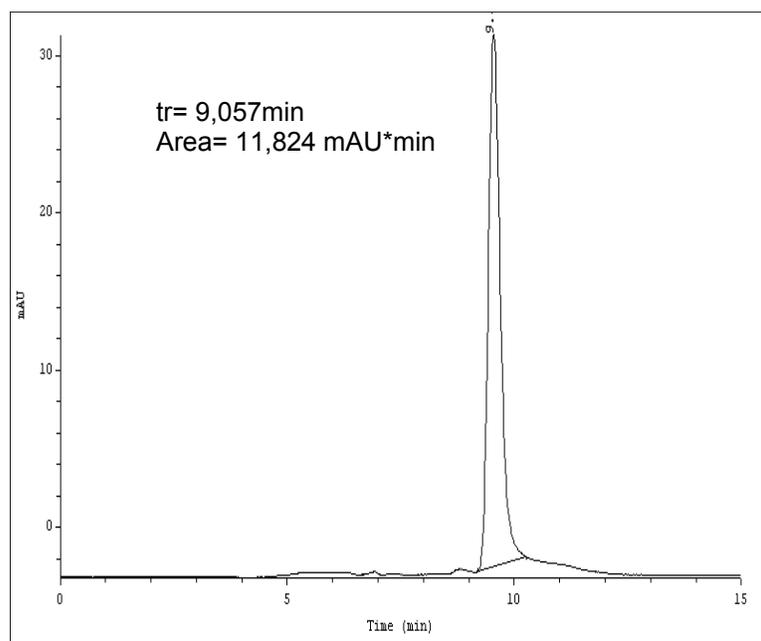
**Figura 2** . Cromatograma obtenido para el G-0 en medio buffer fosfato pH 8,2 a tiempo 0 y longitud de onda de 361nm.



**Figura 3.** Cromatograma obtenido para el G-0 en medio buffer fosfato pH 8,2 a las 5h de almacenamiento y longitud de onda de 361nm.



**Figura 4.** Cromatograma obtenido para el G-0 en medio buffer acetato pH 5,2 a tiempo 0 y longitud de onda de 361nm.



**Figura 5.** Cromatograma obtenido para el G-0 en medio buffer fosfato pH 5,2 a las 96h de almacenamiento y longitud de onda de 361nm.

Por otra parte, se determinaron nuevos picos, los cuales fueron asociados a posibles productos de degradación principales a longitudes de onda inferiores a la longitud de onda de máxima absorción del G-0. Lo anterior es consistente con un estudio desarrollado para corroborar la especificidad de la técnica por HPLC para el estudio de estabilidad de la materia prima G-0 en estado sólido [8].

Se demostró además la necesidad de la protección total de la luz en la manipulación de las muestras debido a que los productos de degradación formados por la acción de luz si pueden interferir el la técnica UV-VIS, lo cual fue detectado a través de la cromatografía líquida (Anexo 15).

### **3.1.5. Límite de Detección.**

Existen varios métodos que pueden ser utilizadas en la determinación de este parámetro. Para la realización de nuestro estudio empleamos la desviación estándar de la respuesta de una serie de blancos y la pendiente de la recta de la curva de calibración [39].

En la tabla 9 se muestran los resultados obtenidos para la serie de blancos y el análisis estadístico correspondiente.

**Tabla 9.** Resultados de absorbancia obtenidos para la serie de blancos.

| <b>Serie</b>                 | <b>Absorbancia del blanco</b> |
|------------------------------|-------------------------------|
| 1. Blanco con buffer pH 2,2  | 0,003                         |
| 2. Blanco con buffer pH 3,15 | 0,007                         |
| 3. Blanco con buffer pH 4,2  | 0,006                         |
| 4. Blanco con buffer pH 5,2  | 0,002                         |
| 5. Blanco con buffer pH 6,2  | 0,002                         |
| 6. Blanco con buffer pH 8,2  | -0,002                        |

Desv estándar = 0,0032

Límite de Detección (DL) = 0,1 µg/mL

### **3.1.6. Límite de Cuantificación.**

Se utilizó la metodología empleada para determinar el límite de detección. Para este caso utilizamos la fórmula que se detalla en materiales y métodos y los resultados obtenidos se relacionan a continuación.

Desv. estándar = 0,0032

Límite de Cuantificación (QL) = 0,3 µg/mL

### **3.2. Estudio cinético del G-0 en medio acuoso.**

#### **3.2.1. Orden de reacción y constante de velocidad específica.**

La constante de velocidad de degradación del fur-2-il-2-nitroeteno determinada a diferentes valores de pH, concentración de buffer, fuerza iónica y temperatura constante puede describirse como una cinética de pseudoprimer orden. Esto puede afirmarse debido a los buenos resultados obtenidos en los coeficientes de correlación de las rectas de regresión y por el hecho de que todos los reactivos presentes en la solución se encontraban en exceso con respecto al analito de interés [44].

González y colaboradores [47] obtuvieron resultados similares cuando estudiaron la cinética de degradación a 25°C de un compuesto muy parecido estructuralmente al analizado en este trabajo (derivado furánico bromado).

Los resultados obtenidos de las constantes de velocidad observadas para toda la degradación, así como los respectivos coeficientes de correlación se muestran en la tabla 10.

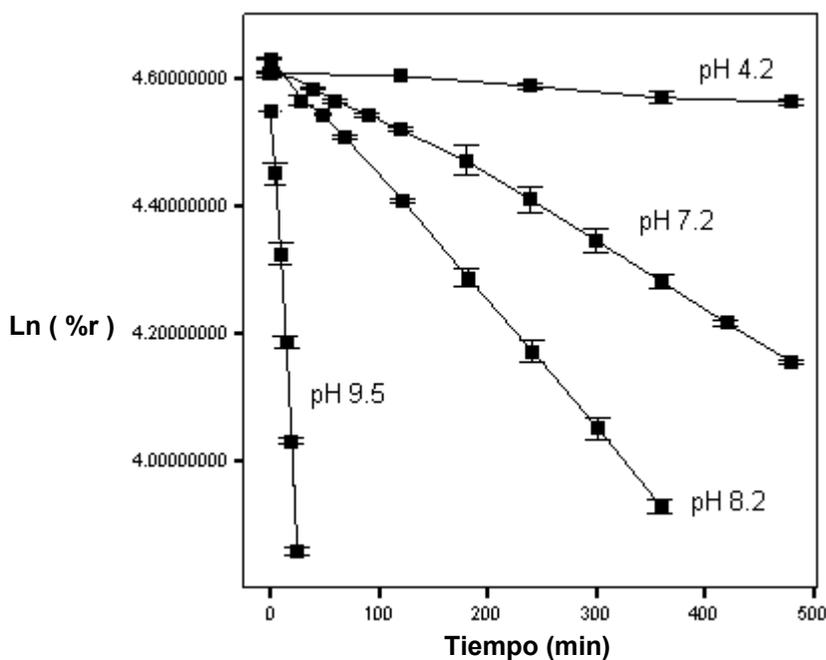
**Tabla 10.** Datos obtenidos a partir de la obtención de las curvas  $\ln\%r$  contra  $t$ .

| <b>pH</b> | <b><math>k_{obs} \cdot 10^{-4} \text{ (min}^{-1}) \pm \text{desv}</math></b> | <b>Coeficiente de correlación (r)</b> |
|-----------|--|---------------------------------------|
| 2,2       | $0,505 \pm 2,12 \times 10^{-6}$  | 0,9987                                |
| 3,15      | $0,550 \pm 1,41 \times 10^{-6}$  | 0,9961                                |
| 4,2       | $0,895 \pm 2,12 \times 10^{-6}$  | 0,9988                                |
| 5,2       | $1,183 \pm 2,31 \times 10^{-6}$  | 0,9963                                |
| 6,2       | $6,255 \pm 2,12 \times 10^{-6}$  | 0,9989                                |
| 7,2       | $9,565 \pm 1,91 \times 10^{-5}$  | 0,9971                                |
| 8,2       | $19,345 \pm 4,17 \times 10^{-6}$   | 0,9995                                |
| 9,5       | $275,5 \pm 3,54 \times 10^{-4}$  | 0,9955                                |

Las condiciones seleccionadas para los experimentos estuvieron basadas en datos reportados relacionados con el comportamiento térmico de las aves, cuyo intervalo puede variar entre 40,9 y 41,3°C [46].

Por otra parte, el pH del aparato digestivo de las aves se encuentra entre 4 y 7,6; motivo por el cual se realizó la evaluación utilizando valores que abarcaran el intervalo anteriormente señalado. Además, el estudio de una amplia gama de pH permite estimar además el comportamiento del principio activo frente a sustancias auxiliares en función del pH que estas últimas le aporten al medio [47].

En la figura 6 se ilustran los resultados relacionados con el comportamiento cinético en algunos de los valores de pH evaluados (los gráficos correspondientes a los medios en los cuales el fármaco resultó más estable fueron seccionados para la mejor comprensión del comportamiento general de la degradación).



**Figura 6.** Cinéticas de degradación de pseudoprimer orden del G-0 en soluciones acuosas tamponadas a temperatura de 41°C.

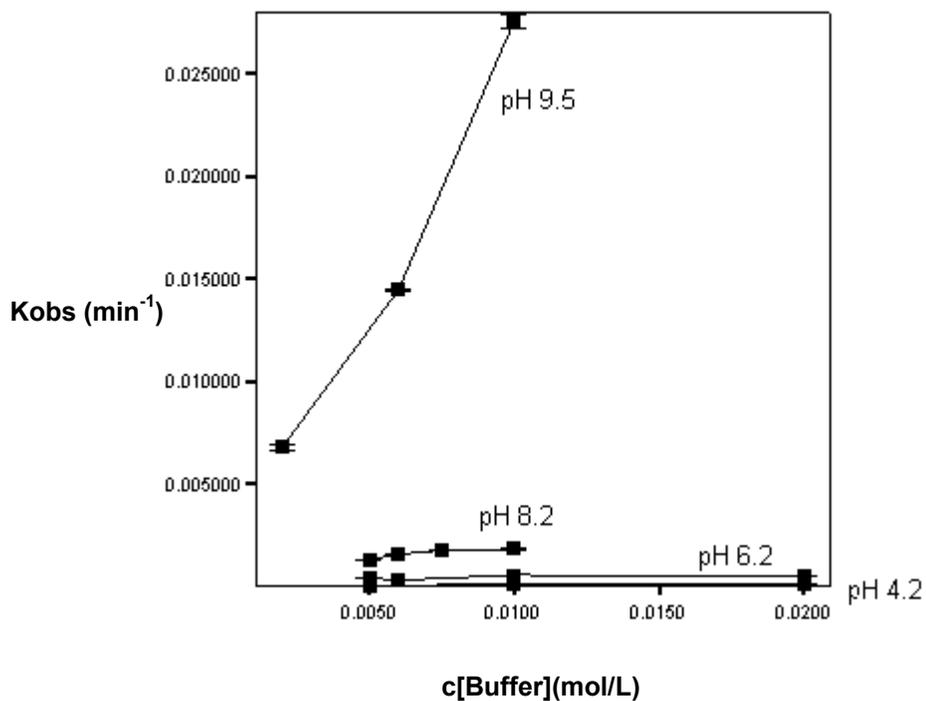
### 3.2.2. Evaluación del efecto de la concentración del buffer.

En la mayoría de los sistemas de interés farmacéutico se utilizan soluciones buffer o tampones, con el objetivo de mantener la solución en un valor de pH particular. En muchas ocasiones se ha detectado, además del efecto del pH en la velocidad de degradación, la influencia de los componentes del buffer como agentes catalíticos. En estas condiciones se plantea que la reacción está sujeta a una catálisis ácida o básica general. Debido a esto, los perfiles pH-velocidad de degradación en las reacciones susceptibles a este tipo de catálisis, exhiben desviaciones del comportamiento esperado [48].

En el presente trabajo, se evaluó el efecto catalítico de 3 sistemas buffer, para lo cual se mantuvieron constantes el pH, la temperatura, la fuerza iónica y la concentración del fármaco. El experimento fue desarrollado a varios niveles de

concentración del buffer, dentro del intervalo de efectividad de cada buffer empleado y sin exceder la fuerza iónica prefijada para las soluciones en estudio.

La figura 7 muestra el efecto obtenido en la constante de velocidad observada ( $k_{obs}$ ) debido a los sistemas buffer empleados y los valores medios y desviaciones estándar correspondientes se muestran en la tabla 11.



**Figura 7.** Influencia de la variación de la concentración de los sistemas acetato, fosfato y carbonato en la constante de velocidad de degradación.

**Tabla 11.** Valores promedios y desviación estándar de las constantes de velocidad observadas a diferentes concentraciones de los sistemas buffer acetato, fosfato y carbonato.

| pH  | Sistema Buffer | kobsx10 <sup>-4</sup> (min <sup>-1</sup> ) |                                 |                                  |                                 |                              |                                 |                                 |
|-----|----------------|--|---------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
|     |                | 2x10 <sup>-3</sup><br>mol/L                | 5x10 <sup>-3</sup><br>mol/L     | 6 x10 <sup>-3</sup><br>mol/L     | 7,5 x10 <sup>-3</sup><br>mol/L  | 8 x10 <sup>-3</sup><br>mol/L | 1x10 <sup>-2</sup><br>mol/L     | 2x10 <sup>-2</sup><br>mol/L     |
| 4,2 | Acetato        | -  | 0,81±<br>4,24x10 <sup>-6</sup>  | -                                | -                               | -                            | 0,89 ±<br>2,12x10 <sup>-6</sup> | 0,87±<br>4,24x10 <sup>-6</sup>  |
| 6,2 | Fosfato        | -  | 4,31±<br>1,41x10 <sup>-6</sup>  | 3,20 ±<br>1,63x10 <sup>-5</sup>  | -                               | -                            | 5,74 ±<br>2,75x10 <sup>-5</sup> | 4,89 ±<br>3,54x10 <sup>-6</sup> |
| 8,2 | Fosfato        | -  | 14,17±<br>7,78x10 <sup>-6</sup> | 16,78 ±<br>3,18x10 <sup>-5</sup> | 18,76±<br>1,20x10 <sup>-5</sup> | -                            | 19,4 ±<br>4,17x10 <sup>-5</sup> | -                               |
| 9,5 | Carbonato      | 38,8 ±<br>3,32x10 <sup>-5</sup>            | -                               | 145 ±<br>7,07x10 <sup>-5</sup>   | -                               | -                            | 276 ±<br>3,54x10 <sup>-4</sup>  | -                               |

Al evaluar el efecto de la concentración del buffer acetato, no se encontraron diferencias significativas entre los valores de kobs obtenidos. Este resultado fue corroborado a través de un análisis de varianza (ANOVA), el cual aportó un valor de  $p = 0,206$  ( $p > 0,05$ ). En este sistema las especies del buffer presentes en solución a pH 4,2 eran HA y A<sup>-</sup>, por lo cual pueden ser descartadas como agentes catalíticos ácido-básico generales. El efecto del buffer acetato no se investigó a pH 5,2 cuando las especies presentes eran las mismas [45].

Cuando se analizó el efecto del sistema buffer fosfato a pH 6,2 (la especie predominante es H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup>) se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los valores medios obtenidos para kobs, sin embargo, no puede afirmarse que exista una tendencia precisa al incremento o disminución de la velocidad de degradación con el aumento de la concentración del buffer y no se observó una dependencia lineal entre la constante de velocidad y la concentración del buffer, por lo que se precisa evaluar otras concentraciones del sistema amortiguador para confirmar si constituye o no un catalizador.

En el sistema buffer fosfato a pH 8,2, se pudo apreciar un ligero incremento de la constante de velocidad de degradación con el incremento de la concentración del buffer, lo cual fue corroborado por un ANOVA, el cual brindó un valor de  $p = 0,0024$

( $p < 0,05$ ), existiendo diferencias significativas entre los valores medios de  $k_{obs}$ . Se confirmó la dependencia lineal entre  $k_{obs}$  y concentración del Buffer ( $c[Buffer]$ ) en el intervalo de concentración de  $5 \times 10^{-3}$  a  $7,5 \times 10^{-3}$  mol/L. Valores superiores de concentración del buffer afectaban la correlación lineal obtenida. Estudiando la influencia del buffer fosfato en la hidrólisis del clordiazepóxido, Maulding y colaboradores determinaron que a concentraciones de buffer superiores a 0,1M, se perdía la linealidad, indicando un cambio en el paso de velocidad limitante de la reacción [49].

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos se puede considerar a la especie  $HPO_4^{2-}$ , la cual predomina a este valor de pH, como agente catalítico básico general.

En un estudio realizado a otro bioactivo furánico (G-1) [45] también consideraron a esta especie como agente catalítico básico general en la reacción de degradación de ese derivado.

Cuando se analizó la influencia de la concentración para el sistema buffer carbonato a pH 9,5; la especie predominante era el  $HCO_3^-$ . Se verificó un notable incremento de la constante de velocidad de degradación con el aumento de la concentración del buffer. Los resultados obtenidos para los valores de  $k_0$  (constante de velocidad a 0 concentración de buffer) y  $k'$  (constante de velocidad catalítica del buffer) se muestran en la tabla 12.

**Tabla 12.** Valores promedio de las constantes de velocidad de degradación del G0 a cero concentración del buffer ( $k_0$ ) y valores de constantes catalíticas de las especies buffer ( $k'$ ) y sus respectivas desviaciones estándar.

| pH  | Sistema Buffer | $k_0 \times 10^{-4} (\text{min}^{-1})$ | $k' \times 10^{-4} (\text{M}^{-1} \text{min}^{-1})$ |
|-----|----------------|--|---|
| 4,2 | Acetato        | 0,8                                    | -   |
| 6,2 | Fosfato        | $3,81 \pm 2,12 \times 10^{-6}$         | -   |
| 8,2 | Fosfato        | $5,55 \pm 7,07 \times 10^{-6}$         | $1795,5 \pm 0,49 \times 10^{-3}$                    |
| 9,5 | Carbonato      | $7,54 \pm 0,41 \times 10^{-6}$         | $2594 \pm 0,023$                                    |

### 3.2.3. Evaluación de la fuerza iónica.

Se conoce que la fuerza iónica del medio ( $\mu$ ) puede modificar la velocidad de reacción de descomposición de un fármaco en disolución. En preformulación, resulta interesante evaluar este efecto porque permite identificar las especies moleculares que participan en la reacción degradativa.

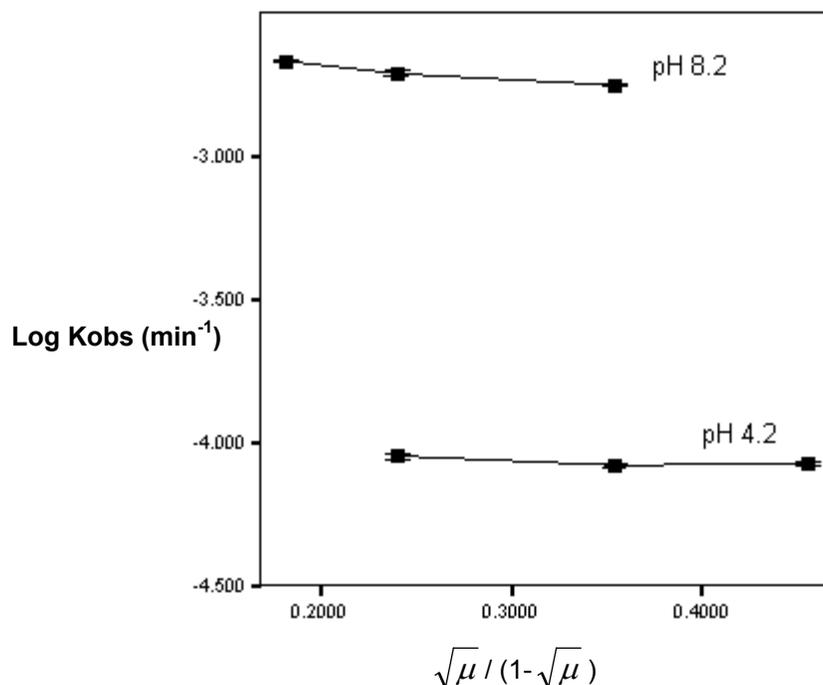
Frecuentemente se utiliza la expresión modificada de la ecuación de Debye-Hückel para correlacionar la constante de velocidad de degradación con la fuerza iónica cuando  $\mu > 0,01$ ; según lo siguiente:

$$\log k = \log k_0 + 2QZ_A Z_B * \frac{\sqrt{\mu}}{(1 + \sqrt{\mu})}$$

En este caso al graficar  $\log k$  contra  $\frac{\sqrt{\mu}}{(1 + \sqrt{\mu})}$ , se puede obtener una recta con pendiente  $2QZ_A Z_B$  y cuya ordenada en el origen permite obtener el valor de la constante de velocidad de degradación a dilución infinita ( $k_0$ ) [50, 51].

Para el estudio de la influencia de las sales en la degradación del G-0 en solución se seleccionaron dos niveles de pH (4,2 y 8,2), de modo que quedaran

incluidas la zona ácida y básica. Los resultados obtenidos para ambas condiciones se muestran en la figura 8.



**Figura 8.** Influencia de la fuerza iónica en la velocidad de degradación del GO en solución ácida y básica.

Al realizarse un análisis de varianza para comprobar si existían diferencias entre los valores promedio de  $k_{obs}$  obtenidas para cada concentración salina evaluada a pH 4,2, no se observaron diferencias significativas entre ellas, para un valor de  $p = 0,1243$  ( $p > 0,05$ ), no obstante el coeficiente de correlación obtenido para la regresión lineal a este valor de pH no ofreció un buen resultado ( $r = 0,7$ ); por lo que debe analizarse en estudios posteriores la posible influencia de la fuerza iónica a valores inferiores a 0,1 molal.

La ausencia del efecto de la fuerza iónica requiere que al menos una de las especies reaccionantes no posea carga. Esto es consistente con un estudio realizado por

Cabrera y colaboradores [9], en el cual se desarrolló un modelo de predicción del pKa del fármaco a partir del coeficiente de reparto, obteniendo un valor de pKa = 7,73; lo cual indica que a pH menores que este valor el fármaco se debe encontrar principalmente en su forma no ionizada.

Un resultado distinto se obtuvo para el comportamiento a pH 8,2; el cual abarcó el intervalo de fuerza iónica de 0,05 hasta 0,7. En este caso el valor del coeficiente de correlación  $r = 0,9451$  mostró que existe mayor ajuste a la ecuación modificada de Debye-Hückel. Se demostró la existencia de diferencias significativas entre los valores promedios de  $\log k_{obs}$ , para  $p = 0,00054$  ( $p < 0,05$ ). Por tal motivo se puede plantear la existencia de una dependencia lineal entre  $\log k_{obs}$  y el

$$\text{término } \frac{\sqrt{\mu}}{(1 + \sqrt{\mu})}.$$

No obstante se debe señalar que el valor de la pendiente de la recta para el pH 8,2 fue pequeño. Por lo que la influencia de la fuerza iónica en el intervalo de analizado no es muy marcado. La pendiente obtenida presentó una pendiente negativa y presentó un valor de 0,38.

Se conoce que la pendiente obtenida de esta regresión puede variar en función de la naturaleza de los iones de la siguiente forma:

- (1)- Si la carga de los mismos es igual (Ej: reacciones entre hidrogeniones y sustancias protonadas) la pendiente es positiva.
- (2)- Si los iones presentan cargas opuestas (Ej: hidroxilo y sustancias protonadas)
- (3)- Si uno de los reactivos no tiene carga, la fuerza iónica no tiene influencia en la constante de velocidad de degradación pues  $Z_A \cdot Z_B = 0$ .

Debido a lo expuesto anteriormente, los resultados indican que en la reacción degradativa que se desarrolla a pH 8,2 se encuentran involucradas especies con cargas contrarias, tal como se refiere en la variante (2).

Esto se cumple a cabalidad en soluciones diluidas, pues a concentraciones elevadas, sí se detecta efecto de la fuerza iónica debido a que puede influir en el coeficiente de actividad de una molécula neutra. En un estudio publicado donde

se determinó la cinética de degradación del furoato de mometasona en sistemas acuosos, Teng y colaboradores [52] emplearon el intervalo de  $\mu$  entre 0,3 y 2,1M. El empleo de soluciones con valores pequeños de fuerza iónica en nuestro estudio se vio limitado debido a la influencia de la fuerza iónica que proporcionaban los sistemas buffer a la concentración establecida al comienzo de este trabajo.

#### **3.2.4. Perfil pH-velocidad de degradación.**

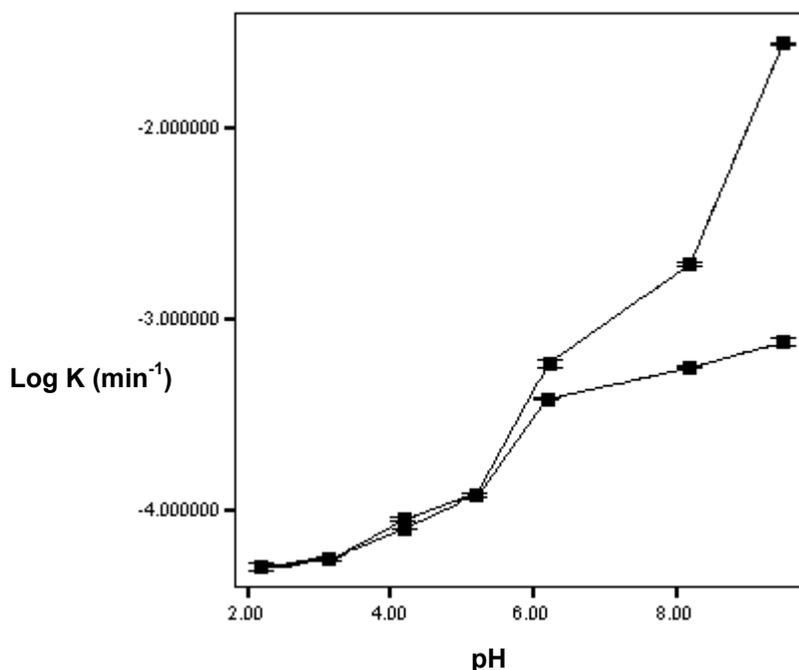
El efecto del pH en la degradación del G-0 en solución acuosa a 0 concentración del buffer, temperatura de 41°C y  $\mu=0,1$  se muestra en la figura 9. El perfil pH-velocidad de degradación, se obtuvo teniendo en cuenta los valores experimentales de la constante de velocidad a cero concentración del buffer, de modo que sólo se considere el efecto debido al pH y no a la influencia que pudiera tener el sistema amortiguador en la kobs. Los valores promedio determinados de  $k_0$  para cada pH, los tiempos de semivida ( $t_{50\%}$ ) y tiempos al 10% ( $t_{10\%}$ ) se muestran en la tabla 13.

**Tabla 13.** Valores experimentales de la constante de velocidad de degradación a cero concentración del buffer.

| pH   | Buffer             | $k_0 \times 10^{-4} (\text{min}^{-1})$ | $t_{50\%}(\text{h})$ | $t_{10\%}(\text{h})$ |
|------|--------------------|--|----------------------|----------------------|
| 2,2  | Fosfato            | $0,51 \pm 2,12 \times 10^{-6}$         | 226,5                | 34,3                 |
| 3,15 | Fosfato            | $0,55 \pm 1,41 \times 10^{-6}$         | 210                  | 31,8                 |
| 4,2  | Acetato            | $0,80 \pm 0$                           | 144,4                | 21,9                 |
| 5,2  | Acetato            | $1,18 \pm 2,31 \times 10^{-6}$         | 97,9                 | 14,8                 |
| 6,2  | Fosfato            | $3,81 \pm 2,12 \times 10^{-6}$         | 30,3                 | 4,6                  |
| 8,2  | Fosfato            | $5,55 \pm 7,07 \times 10^{-6}$         | 20,8                 | 3,15                 |
| 9,5  | Carbonato          | $7,54 \pm 4,10 \times 10^{-5}$         | 15,3                 | 2,32                 |
| 10   | Hidróxido de sodio | $8,22 \pm 3,53 \times 10^{-6}$         | 14                   | 2,1                  |

En la figura 9 se muestran los perfiles pH-velocidad de degradación correspondientes al G-0 en soluciones buffer de concentración 0,01mol/L y el correspondiente a la degradación del fármaco en ausencia de amortiguadores de pH a modo de comparación. Como se puede observar, la mayor parte de la degradación experimentada por el principio activo estuvo relacionada con los considerables efectos catalíticos básicos de las especies hidrogenofosfato ( $\text{HPO}_4^{2-}$ ) y bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) como se refirió con anterioridad. Si se analiza el perfil a cero concentración del buffer se notará que la tendencia del principio activo es a degradarse a medida que disminuye la acidez, aunque en el intervalo de pH evaluado, su velocidad de degradación es lenta en comparación con el perfil obtenido en presencia de soluciones buffer. Este resultado se puede corroborar si se toma en consideración el bajo valor de la pendiente obtenido para todo el perfil ( $m = 0,1721$  y un coeficiente de correlación  $r$  de 0,974), lo cual puede ser indicativo de que las moléculas de agua participan en la degradación catalizada por bases. Un resultado similar obtuvo Yong-Hak [53] en su estudio cinético de degradación de la eritromicina en solución acuosa.

La estabilidad química del G-0 en los fluidos gastrointestinales puede ser en cierta forma estimada a partir de su estabilidad en solución acuosa en el intervalo de pH estudiado. Como ya se ha explicado la degradación del G-0 no es de igual magnitud en todo el intervalo. Sin embargo debemos recordar que el intervalo de pH del TGI de las aves es de 4 a 7,6 y si se valoran los tiempos al 10% (ver tabla 11) se notará que a pH 8,2 el  $t_{10\%}$  es de 3,15 horas, estimándose este adecuado y suficiente para que el principio activo realice su efecto farmacológico en las zonas de menor acidez del aparato digestivo. Por este motivo, consideramos que la efectividad del G-0 en el intervalo de pH de 4 a 7,6 no se ve afectada en gran medida y el mismo debe encontrarse en su forma no ionizada principalmente.



**Figura 9.** Perfil pH-velocidad de degradación del G-0 en los medios buffer evaluados en función de  $k_{obs}$  y a cero concentración del buffer a 41°C.

## Conclusiones

- 1) La técnica por espectrofotometría UV-VIS para cuantificar el G-0 en disolución es lineal en el intervalo de concentración de 0,5 a 6  $\mu\text{g/mL}$ , precisa, exacta y selectiva.
- 2) La degradación del G-0 en solución acuosa sigue una cinética de pseudoprimer orden en las condiciones experimentales establecidas.
- 3) El perfil pH-velocidad de degradación muestra la tendencia a la degradación principalmente en la zona básica, aunque la velocidad del proceso es menor que en aquellas soluciones que están tamponadas, a 41°C.
- 4) El  $t_{10\%}$  de degradación a pH 8,2 es de 3,15 horas, considerándose suficiente para garantizar el efecto farmacológico del principio activo en el intestino grueso (pH 7,6).
- 5) Se evidencia un fuerte efecto catalítico de las especies hidrogenofosfato (pH 8,2) y bicarbonato (pH 9,5) con constantes catalíticas de segundo orden de  $0,18\text{M}^{-1}\text{min}^{-1}$  y  $2,59\text{M}^{-1}\text{min}^{-1}$  respectivamente.
- 6) La concentración de sales no ejerce efecto sobre la constante de velocidad a pH 4,2 y en alguna medida a pH 8,2 de forma negativa.

## **Recomendaciones**

- 1) Determinar la solubilidad del principio activo en medio acuoso en estudios posteriores.
- 2) Correlacionar los estudios de estabilidad-pH con estudios de estabilidad del fármaco en fluidos biológicos.

## **Bibliografía**

1. Biggs, PM. The World of poultry disease. Avian Pathol; (1982) 11: 281-300.
2. <http://www.agrobit.com.ar/Infotecnica/Alternativos/avicultura/AL000015av.htm>
3. Morales, S.; Calvo, A.; Jorge, E.; Machado, R.; Ramos, T.; G-0 Materia Prima. Métodos de control. Especificaciones de calidad. Trabajo no publicado. Centro de Bioactivos Químicos. UCLV. (1997).
4. Rodríguez, M.; Valdés, T.; Bravo, L. Validación de los métodos de determinación de pureza de los principios activos G-1, G-0 y UC-244. Trabajo de Diploma. Facultad de Química y Farmacia. UCLV. (1996)
5. Delgado, M.; Calvo, A. Aplicación de la espectrofotometría UV-VIS en la caracterización y cuantificación de los productos G-0 y UC-244. Trabajo de Diploma. Facultad de Química y Farmacia. UCLV. (1993).
6. Cárdenas, L. Estudio de purificación del principio activo G-0. Trabajo de Diploma. Facultad de Química y Farmacia. UCLV. (1993).
7. Bravo, L.; González, H. , M. Estudio analítico de derivados furánicos mediante cromatografía gaseosa. Aplicaciones farmacéuticas. Tesis de Maestría. Instituto de Farmacia y Alimento. Universidad de la Habana. (1998).
8. San Gabino I. Selección de las condiciones idóneas para el estudio de estabilidad de la materia prima G0. Validación de la técnica de HPLC. Trabajo de Diploma; Facultad de Química Farmacia; Universidad Central de Las Villas. (2001).

- 9.** Cabrera M., González H., Jiménez E., Osmani D., Castañedo N. Experimental and theoretical determination of physicochemical properties in a novel family of microsidal compounds. *European Bulletin of Drug Research*. Vol 9. Nº 1. (2001).
- 10.** Ruz, V.; González, M.; Silverio, D. Preformulación del 2-(2-nitrovinil) fufano en forma de polvo para su uso como anticoccidiano en aves. *Revista Cubana de Farmacia*. (2004). Vol:38.
- 11.** Ruiz, Belkis, I.; Morrel, Aymet, M. ; Bernal, Nancy. Estabilización del G-0 en forma sólida para su uso como coccidiostático. Trabajo de Diploma. Facultad de Química Farmacia. (1994).
- 12.** Cortés N. Evaluación biológica de compuestos furánicos. Efecto del G0 frente a bacterias y hongos de interés. IFI. Informe Técnico; Instituto Superior de Ciencias Médicas de Santiago de Cuba. (1986).
- 13.** Dorado de Lahaye L. Estudio de las propiedades antiinflamatorias del derivado furánico G0 en ratas albinas y su comparación con el ASA. Trabajo de Diploma. Instituto Superior de Ciencias Médicas de Santiago de Cuba. (1986).
- 14.** Gross M. Influencia del derivado furánico G0 sobre la temperatura rectal en animales de experimentación. Trabajo de Diploma; Instituto Superior de Ciencias Médicas de Santiago de Cuba. (1986).
- 15.** Oropeza D. Valoración experimental del efecto antipirético del derivado furánico G0 en ratas albinas. Trabajo de Diploma; Instituto Superior de Ciencias Médicas de Santiago de Cuba. (1987).

- 16.** Cedán, Rosa, E. Comportamiento de la actividad excretora renal bajo la influencia del derivado furánico G-0 en ratas albinas machos. Trabajo de Diploma. Instituto Superior de Ciencias Médicas de Santiago de Cuba. (1988).
- 17.** Alfonso A. Reporte de la actividad anticoccidial en conejos. Informe Técnico; Instituto Superior de Ciencias Médicas de Santiago de Cuba. (1991).
- 18.** Olazábal E, González O, Serrano H., Morales A. Evaluación de la actividad anticoccidiósica del 2-(2-nitrovinil)furano en pollos de ceba infectados experimentalmente con *Eimeria tenella*. Informe Técnico; Centro de Bioactivos Químicos; Universidad Central de Las Villas. (1993).
- 19.** González O, Serrano H, Olazábal E, Santana B, Parrado E. Comportamiento del 2-(2-nitrovinil)furano en la reducción de muertes provocadas por *Eimeria tenella* en reemplazo de ponedoras bajo condiciones de producción. Informe Técnico; Centro de Bioactivos Químicos; Universidad Central de Las Villas. (1993).
- 20.** López R. Evaluación del uso profiláctico y terapéutico del 2-(2-nitrovinil)-furano (G-0) en aves White Leghorn en condiciones de producción. Tesis de maestría. Instituto de Medicina Tropical "PEDRO KOURI". Ciudad de La Habana (2004)
- 21.** Navarro M. Estudio histopatológico experimental en ratas sometidas a G0. Trabajo de Diploma; Instituto Superior de Ciencias Médicas de Santiago de Cuba. (1987).
- 22.** Frometa F. Estudio histopatológico experimental de los efectos del G0 sobre el aparato endocrino. Trabajo de Diploma; Instituto Superior de Ciencias Médicas de Santiago de Cuba. (1988).

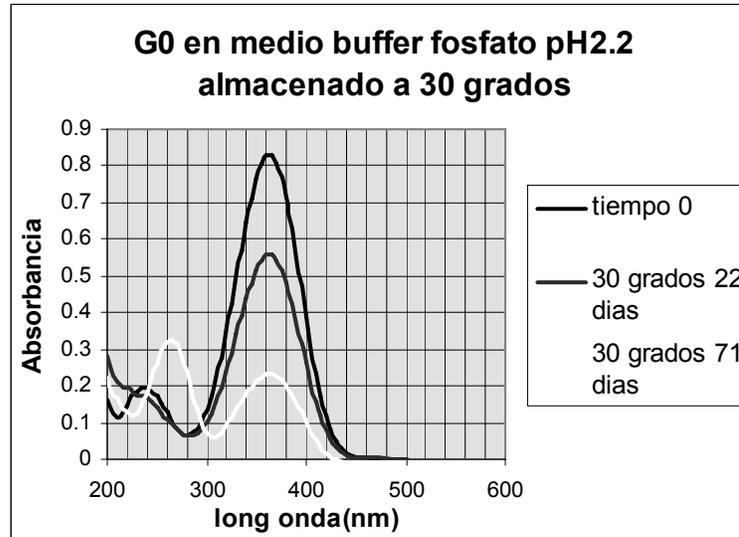
- 23.** Salomón de Mesa, M. Evaluación de la posible actividad genética de un derivado furánico en *Aspergillus nidulans*. IFI. ISCMSC. (1988).
- 24.** Jones Hillhouse R. La fertilidad en ratas albinas hembras sometidas a la acción del G0. Trabajo de Diploma; Instituto Superior de Ciencias Médicas de Santiago de Cuba. (1984).
- 25.** Pascual J, Jiménez G. Toxicidad oral aguda del G0 en ratas. Área de Toxicología Experimental; Instituto Superior de Ciencias Médicas de Santiago de Cuba. (1994).
- 26.** Pérez A, Cortés R, Sosa R. Determinación de la DL<sub>50</sub> en aves de corral. Informe Técnico de Toxicología. Centro de Bioactivos Químicos. Universidad Central de Las Villas. (1993).
- 27.** Pascual J, Jiménez G. Evaluación de la propiedad irritante cutánea del producto G0, 92.82 % de pureza en ratas Sprague Dowley. Área de Toxicometría. Grupo de Toxicología Experimental; Instituto Superior de Ciencias Médicas de Santiago de Cuba. (1994).
- 28.** .Pascual J, Jiménez G. Irritabilidad cutánea del G0 92.82 % de pureza en conejos NZB. Área de Toxicometría. Grupo de Toxicología Experimental; Instituto Superior de Ciencias Médicas de Santiago de Cuba. (1994).
- 29.** Avello E, Cruz R, Morales A. Determinación de la toxicidad del G0 aplicado sobre la mucosa a nivel ocular en conejos albinos. Facultad de Ciencias Agropecuarias; Universidad Central de Las Villas. (1994).

- 30.** Sosa R, Pérez A, Cortés R. Residualidad en huevo y carne. Informa grupo de toxicología; Centro de Bioactivos Químicos. Universidad Central de Las Villas. (1994).
- 31.** Akers MJ. Preformulation testing of solid oral dosage form drugs. *Canadian Journal of Pharmaceutical Sciences* .11: 1-10. (1976).
- 32.** Vila Jato J L. Tecnología farmacéutica. Vol. 1. Preformulación. Viega M., Gil M., Torrado J. Universidad de Barcelona. 1.27. (1997).
- 33.** Carstensen JT. Pharmaceutical Preformulation. Lancaster, Basel: Technomic Publishing Company, Inc. (1998).
- 34.** Wadke DA, Serajuddin AMT, Jacobson H. Preformulation testing. En: Lieberman HA, Lachman L, Schwartz JB, editores. *Pharmaceutical Dosage Forms. Tablets*, v.1. 2<sup>da</sup> ed., revisada y expandida: New York and Basel: Marcel Dekker Inc. 1-73. (1989).
- 35.** Fiese EF, Hagen TA. Preformulation. En: Lachman L, Lieberman HA, Kanig JL, editores. *The Theory and Practice of Industrial Pharmacy*. Philadelphia: Lea & Febiger. 171-195. (1986).
- 36.** Torres, A.I.: Estabilidad de Medicamentos. Conceptos fundamentales y causas de inestabilidad ; Universidad Complutense de Madrid, p. 1-8. (1995).
- 37.** Vila Jato J L. Tecnología farmacéutica. Vol. 1. Preformulación. Viega M., Gil M., Torrado J. Universidad de Barcelona. 1. 61-62. (1997).

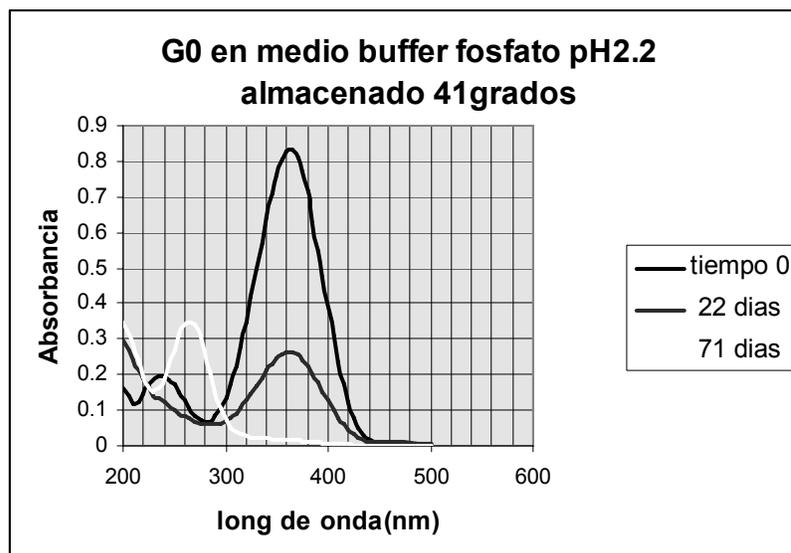
- 38.** Vila Jato J L. Tecnología farmacéutica. Vol. 1. Preformulación. M., Gil M., Torrado J. Universidad de Barcelona. 1. 336. (1997).
- 39.** [www.ifpma.org/ich5q.html/Analytical](http://www.ifpma.org/ich5q.html/Analytical)
- 40.** [www.bi.umist.ac.uk/users/mjfrbn/buffers/makebuf.asp](http://www.bi.umist.ac.uk/users/mjfrbn/buffers/makebuf.asp)
- 41.** Bravo, L.; González, H., M. Estudio analítico de derivados furánicos mediante cromatografía gaseosa. Aplicaciones farmacéuticas. Tesis de Maestría. Instituto de Farmacia y Alimento. Universidad de la Habana. (1998).
- 42.** Sanz P. Físico-química para farmacia y biología. Masson, S.A. Cinética. Cachaza J M. 21; 555-563. (1996).
- 43.** Gibson, M. Pharmaceutical preformulation and formulation. Interpharm ICRC. 2004; 3: 34-36.
- 44.** Vila Jato J L. Tecnología farmacéutica. Vol. 1. Estabilidad. Torres J.; Pérez M. Universidad de Barcelona. 5. 328. (1997).
- 45.** Gonzalez M. M.; Preformulación del 1-(5-Bromofur-2 -il)-2-bromo-2-nitro eteno. Parámetros que permiten predecir su absorción por vía oral. Alternativas tecnológicas para mejorarla. Tesis de maestría. Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de la Habana. (1997).
- 46.** <http://www.PortalVeterinaria.com>
- 47.** [www.ilustrados.com/publicaciones/epzypupuzydwunliwt.php#aves](http://www.ilustrados.com/publicaciones/epzypupuzydwunliwt.php#aves)

- 48.** Martin, A.; Bustamante, P. Physical Pharmacy. 4ta edición. EUA. Lea&Febiger. Kinetics. (1993). 12:303.
- 49.** Carteasen, T. Drugs stability. Principles and practices. New York and Basel.(1990).Solution Kinetics.2;47.
- 50.** Vila Jato J L. Tecnología farmacéutica. Vol. 1. Estabilidad. Torres J.; Pérez M. Universidad de Barcelona. 5. 337. (1997).
- 51.** Carteasen, T. Drugs stability. Principles and practices. New York and Basel.(1990).Solution Kinetics.2;81.
- 52.** Teng, Y.; Cutler D.; Davies, N. Degradation kinetics of mometasone furoate in aqueous systems. International journal of pharmaceutics. Elsevier. (2003). 129-141.
- 53.** Kim, Y.; Heinze, T.; Beger, R.; Pothuluri, J.; Cemiglia, C. A kinetics study on the degradation of erythromycin in aqueous solution. International journal of pharmaceutics. Elsevier. (2004). 63-76.

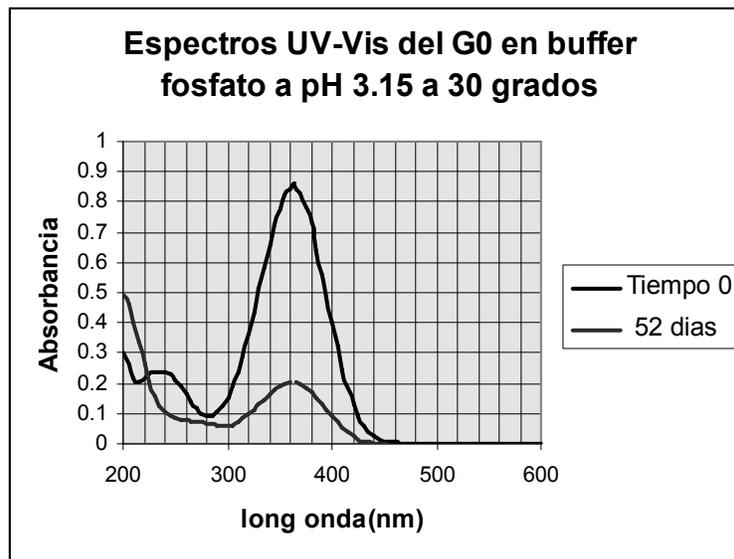
## Anexos



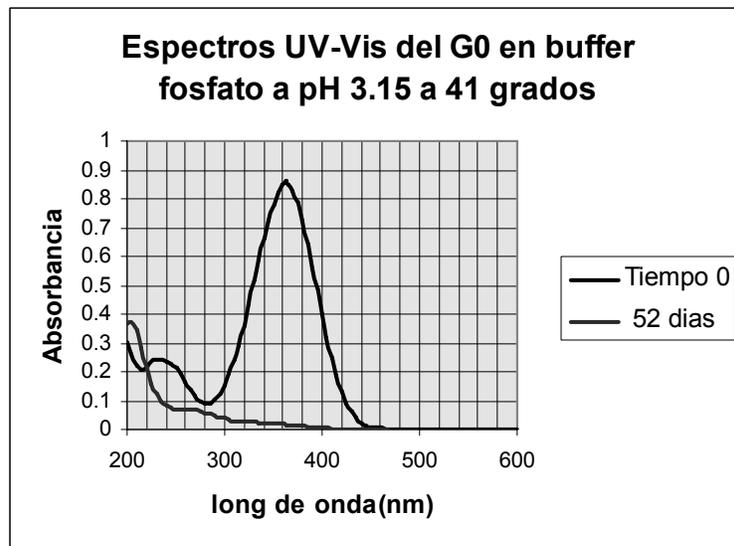
**Anexo 1.** Espectros UV-VIS en el tiempo de una solución de G0 en medio buffer fosfato pH 2.2 preparada a 7  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y almacenada a 30°C.



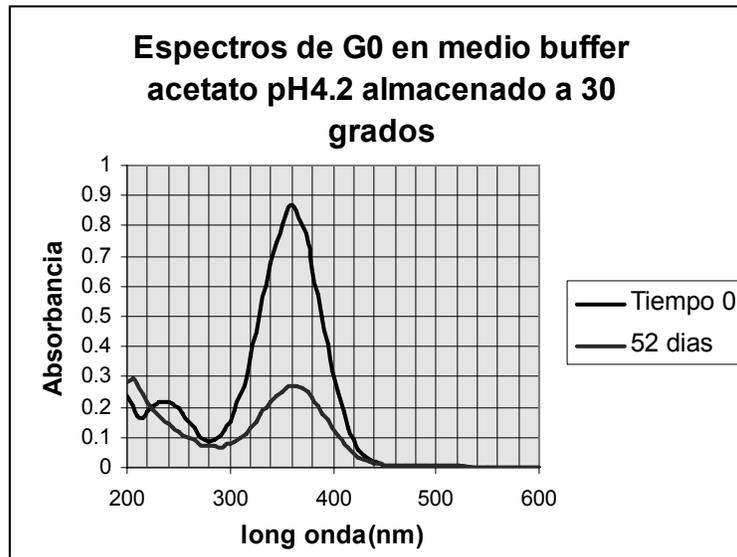
**Anexo 2.** Espectros UV-VIS en el tiempo de una solución de G0 en medio buffer fosfato pH 2.2 preparada a 7  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y almacenada a 41°C.



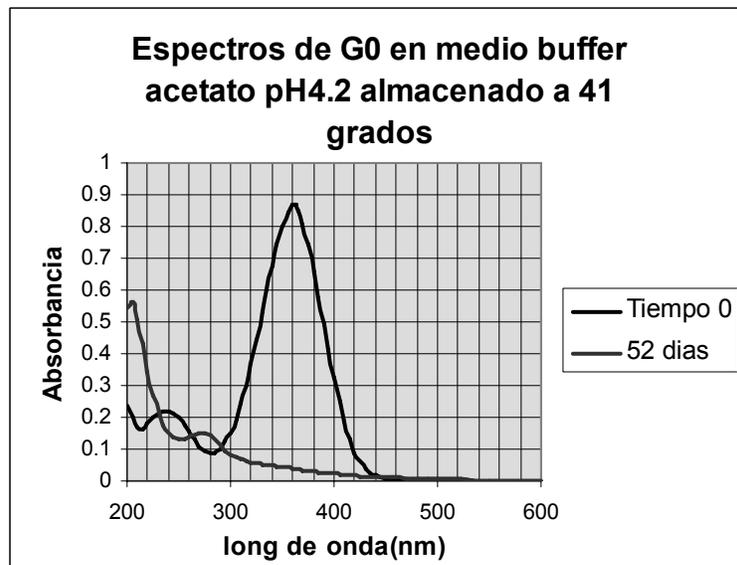
**Anexo 3.** Espectros UV-VIS en el tiempo de una solución de G0 en medio buffer fosfato pH 3.15 preparada a 7  $\mu\text{g/mL}$  y almacenada a 30°C.



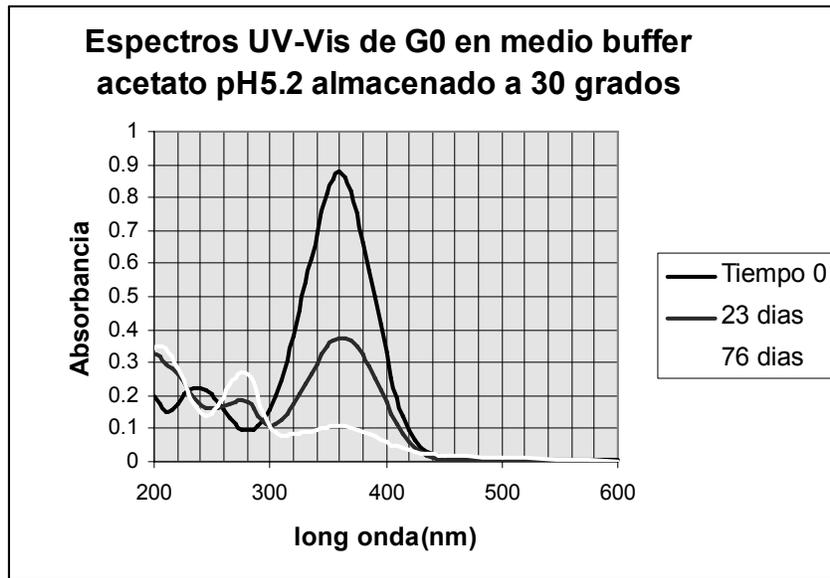
**Anexo 4.** Espectros UV-VIS en el tiempo de una solución de G0 en medio buffer fosfato pH 3.15 preparada a 7  $\mu\text{g/mL}$  y almacenada a 41°C.



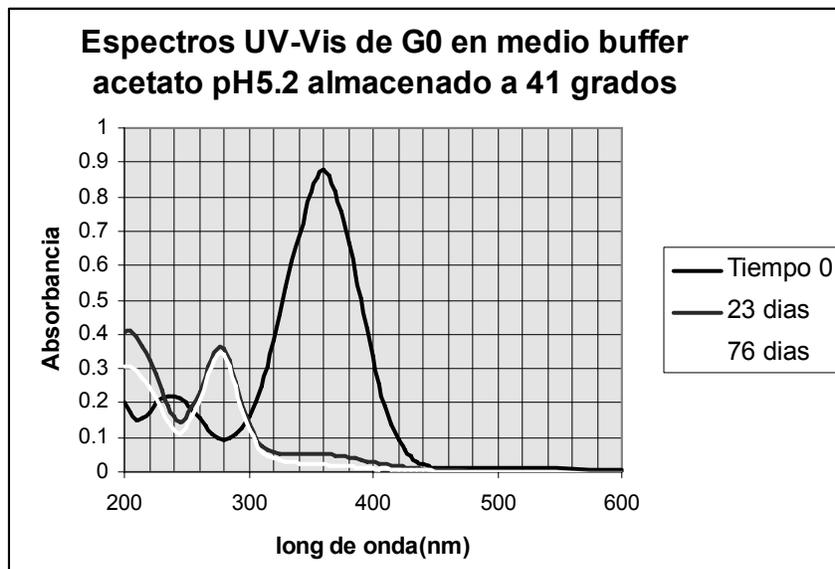
**Anexo 5.** Espectros UV-VIS en el tiempo de una solución de G0 en medio buffer acetato pH 4.2 preparada a 7  $\mu\text{g/mL}$  y almacenada a 30°C.



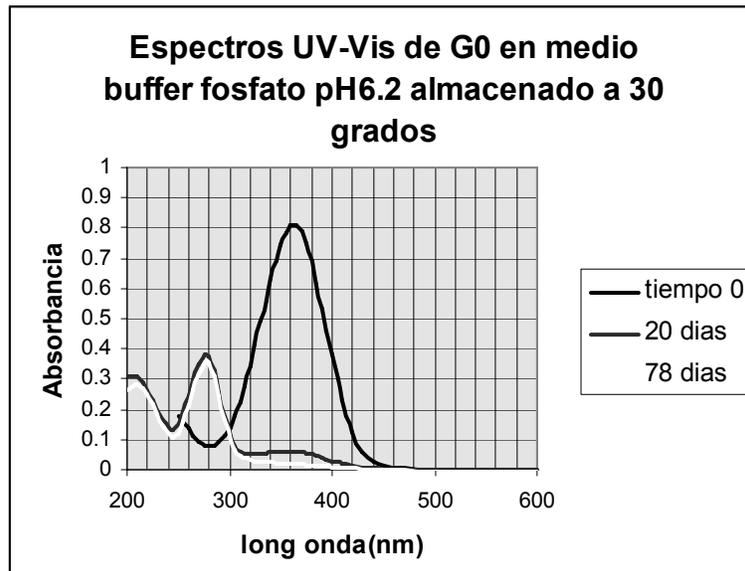
**Anexo 6.** Espectros UV-VIS en el tiempo de una solución de G0 en medio buffer acetato pH 4.2 preparada a 7  $\mu\text{g/mL}$  y almacenada a 41°C.



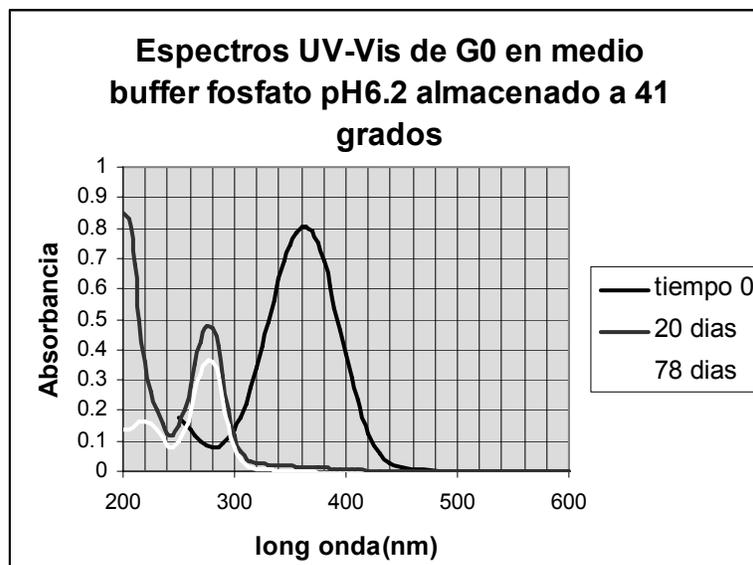
**Anexo 7.** Espectros UV-VIS en el tiempo de una solución de G0 en medio buffer acetato pH 5.2 preparada a 7 µg/mL y almacenada a 30°C.



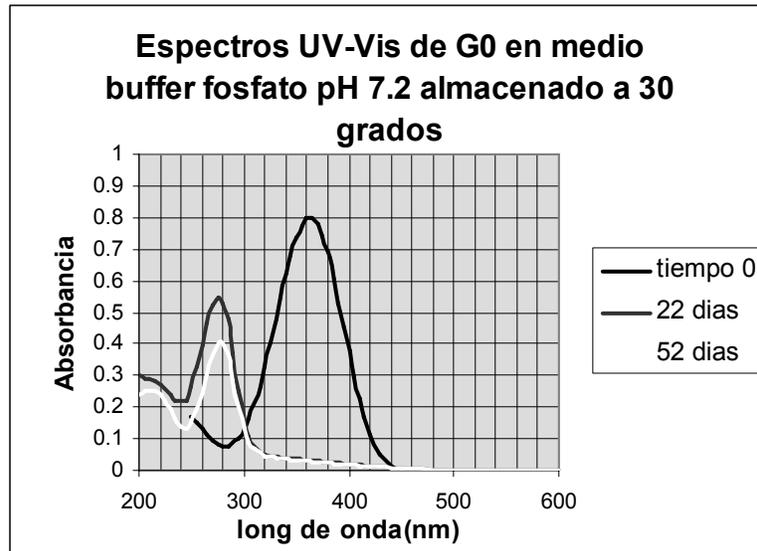
**Anexo 8.** Espectros UV-VIS en el tiempo de una solución de G0 en medio buffer acetato pH 5.2 preparada a 7 µg/mL y almacenada a 41°C.



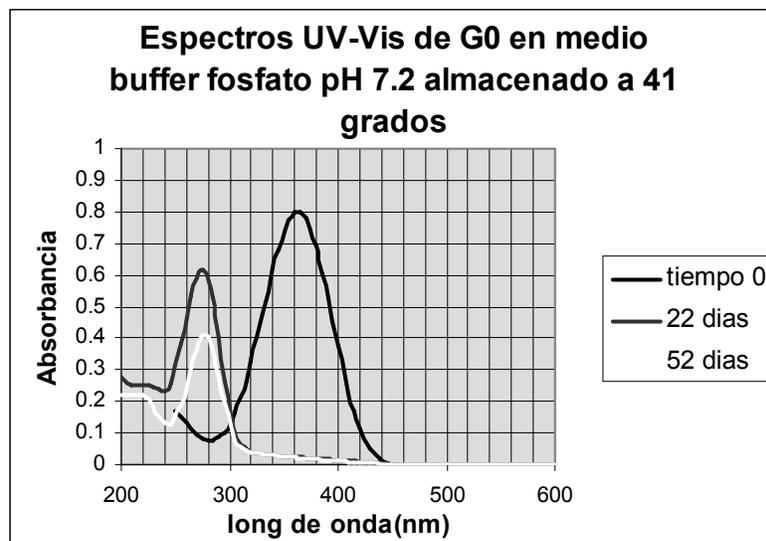
**Anexo 9.** Espectros UV-VIS en el tiempo de una solución de G0 en medio buffer fosfato pH 6.2 preparada a 7  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y almacenada a 30°C.



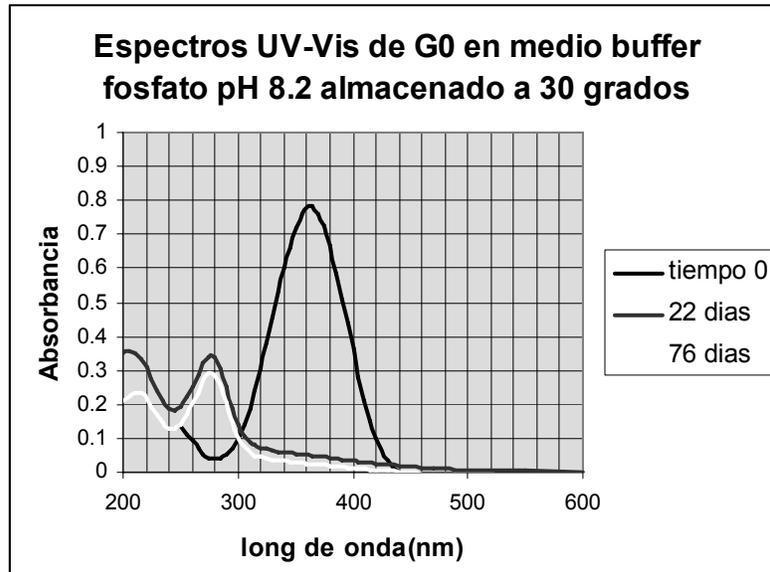
**Anexo 10.** Espectros UV-VIS en el tiempo de una solución de G0 en medio buffer fosfato pH 6.2 preparada a 7  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y almacenada a 41°C.



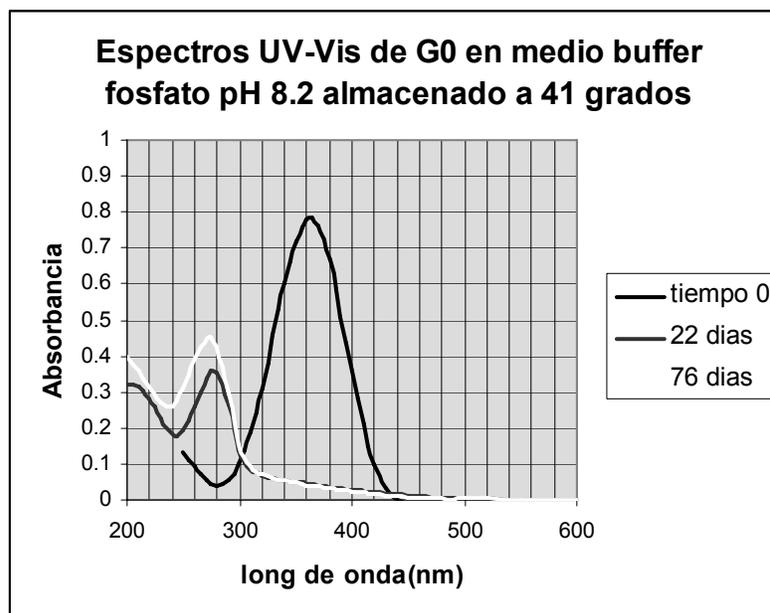
**Anexo 11.** Espectros UV-VIS en el tiempo de una solución de G0 en medio buffer fosfato pH 7.2 preparada a 7  $\mu\text{g/mL}$  y almacenada a 30°C.



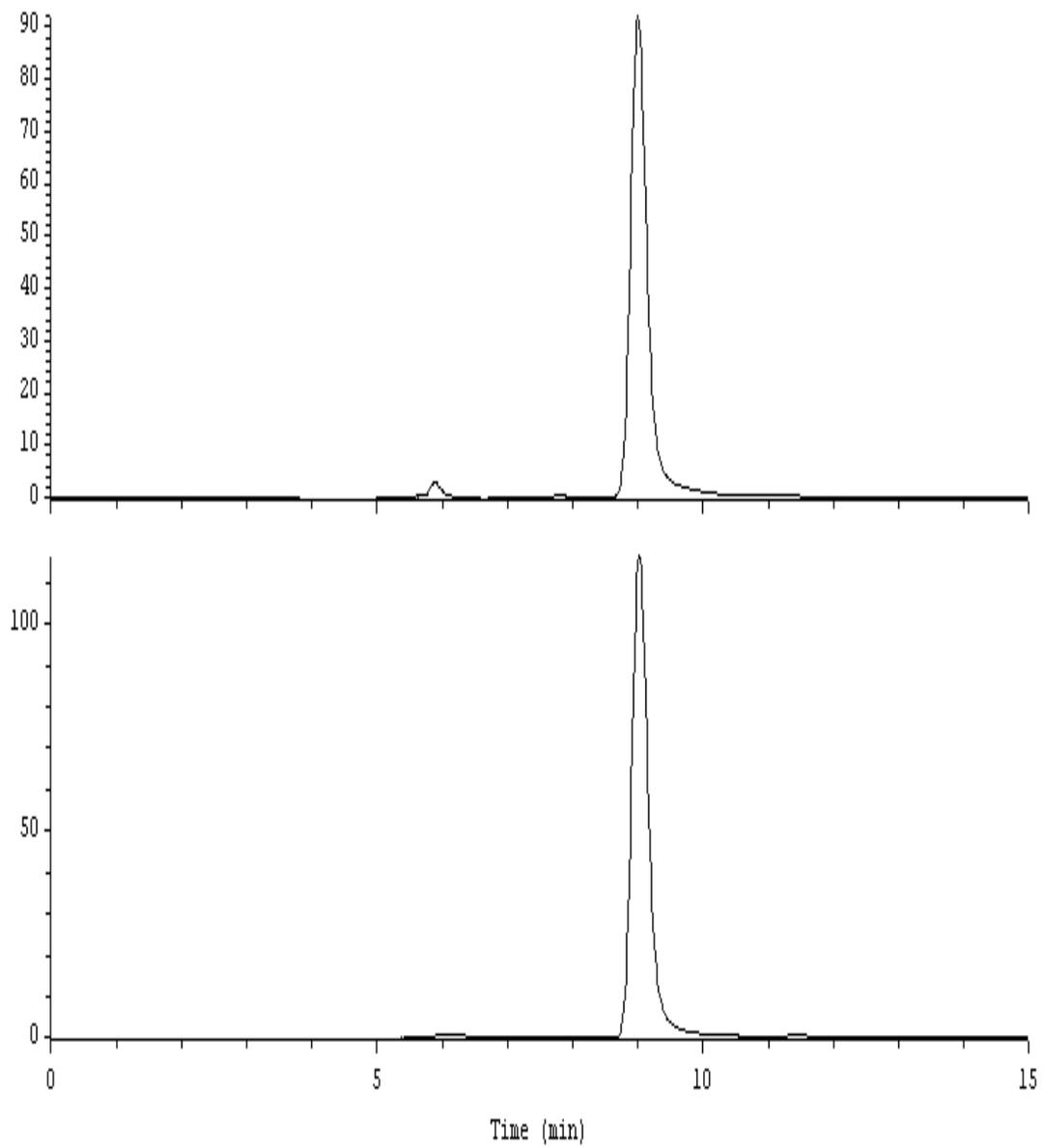
**Anexo 12.** Espectros UV-VIS en el tiempo de una solución de G0 en medio buffer fosfato pH 7.2 preparada a 7  $\mu\text{g/mL}$  y almacenada a 41°C.



**Anexo 13.** Espectros UV-VIS en el tiempo de una solución de G0 en medio buffer fosfato pH 8.2 preparada a 7 µg/mL y almacenada a 30°C.



**Anexo 14.** Espectros UV-VIS en el tiempo de una solución de G0 en medio buffer fosfato pH 8.2 preparada a 7 µg/mL y almacenada a 41°C.



**Anexo 15.** Cromatogramas obtenidos para una muestra de G0 de concentración 6ppm en solución buffer fosfato a pH 7,2 recién preparada y al cabo de 15 min. de expuesta a la luz.