



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FARMACOLÓGICA Y TOXICOLÓGICA
LABORATORIO DE BIOELECTROQUÍMICA

EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD DE PRAVASTATINA

DIRECTOR DE MEMORIA
Dr. Alejandro Álvarez-Lueje

PATROCINANTE
Prof. Luis J. Núñez-Vergara

Memoria para optar al Título de Químico Farmacéutico

CLAUDIA JOHANNA REQUENA ÁLVAREZ

SANTIAGO DE CHILE

2006

ÍNDICE

RESUMEN	2
SUMMARY.....	4
INTRODUCCIÓN	6
MATERIALES Y MÉTODOS	11
I. MATERIALES.....	11
II. MÉTODOS	14
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	24
DESARROLLO DE LA METODOLOGÍA ANALÍTICA	24
APLICACIÓN A ESTUDIOS DE ESTABILIDAD HIROLÍTICA DE PRAVASTATINA	29
ESTUDIOS DE REACTIVIDAD DE PRAVASTATINA.....	42
A. REACTIVIDAD FRENTE A RADICALES PEROXILO (ROO·).....	46
B. REACTIVIDAD FRENTE A PEROXINITRITO (ONOO·)	48
C. REACTIVIDAD FRENTE A RADICALES ALQUILO	49
D. REACTIVIDAD FRENTE A ABTS ^{•+}	51
E. COMPARACIÓN DE LA REACTIVIDAD DE PRAVASTATINA VS ANÁLOGOS ESTRUCTURALES	54
CONCLUSIONES	57
REFERENCIAS.....	60

RESUMEN

En esta Memoria se desarrolló una metodología por HPLC, para ser empleada en el estudio de estabilidad hidrolítica del fármaco hipocolesterolémico pravastatina.

Las condiciones óptimas fueron alcanzadas luego de llevar a cabo el ensayo de aptitud del sistema (*system suitability test*, USP XXVII), y consistieron en una fase móvil isocrática: acetonitrilo/tampón fosfato 30 mM, pH 2.0 (28/72), flujo 1 mL/min a 40 °C. Las condiciones óptimas se seleccionaron en base a la combinación adecuada entre los valores de resolución (R), factor de capacidad (k'), selectividad (α), tiempos de retención de cada señal y el tiempo de corrida del cromatograma. En estas condiciones pravastatina exhibió un tiempo de retención (t_r) promedio de 8.95 min (n=10), R= 2.1, k'= 5.5 y α =1.16.

La metodología exhibió características analíticas de repetibilidad (CV=0.11 %) y reproducibilidad (CV=0.49 %) adecuadas para ser empleada en estudios de estabilidad. Para la cuantificación se empleó el método de la curva de calibración, que estuvo descrita por la ecuación: $ABC = 2.74 \times 10^{10} [c] + 72267$ (r= 0.99992; n= 7). Los límites de detección y cuantificación calculados fueron 3.4×10^{-7} M y 3.7×10^{-6} M, respectivamente.

El estudio de estabilidad se realizó a cuatro concentraciones iniciales, tres temperaturas y cinco pH en tampón fosfato 30 mM, con el fin de lograr interpretar la influencia de estas variables sobre la velocidad de degradación de pravastatina. En todas las condiciones de pH y temperatura ensayadas se obtuvo una cinética mixta, en las cuales se ajustó a una cinética de pseudo primer orden hasta aproximadamente el 50 % de degradación del fármaco.

Para evaluar la influencia del pH en la degradación, se ensayaron los pH 3, 5, 7, 9 y 12. A pH < 7 los cromatogramas presentan cinco nuevas señales correspondientes a los productos de degradación, a t_r de 10.21 min; 11.83 min; 15.91 min; 17.60 min y 19.47 min.

A pH > 7 sólo se observa la aparición de una nueva señal, a t_r de 1.90 min. En todos los casos estudiados, las nuevas señales presentan un espectro UV análogo al de pravastatina, lo cual indica que la hidrólisis no afecta la estructura cromófora del fármaco.

Con el objeto de evaluar la influencia de la temperatura sobre la degradación de pravastatina, se llevaron a cabo experimentos a 40, 60 y 80 °C, obteniéndose que la constante de velocidad de degradación (k) aumenta en forma concomitante con el incremento de la temperatura. Además se reportan los valores de energías de activación, vidas medias y t_{90} calculadas para la degradación de pravastatina.

Adicionalmente se estudió la reactividad de pravastatina frente a radicales libres y peroxinitrito, como modelos predictivos de su estabilidad oxidativa tanto en preformulaciones como *in vivo*. Se empleó como técnica analítica la espectrofotometría UV-Visible y como generadores de radicales alquilo ABAP+ N₂, radicales alquilperoxilo ABAP + O₂, y ABTS (radicales ABTS^{•+}). Para evaluar la reactividad frente a peroxinitrito se empleó SIN-1. La reactividad frente a ABAP y SIN-1 se llevó a cabo siguiendo la señal del fármaco a 240 nm, empleando el método de la curva de calibración ($A = 2.04 \times 10^{-8} [c] + 4.55 \times 10^{-9}$). Para ABTS^{•+} se siguió el decaimiento de su señal a 734 nm.

Pravastatina (40 μM a 100 μM) fue reactiva frente a todos los compuestos ensayados, encontrándose que el orden de reactividad fue: peroxilo ($k=1.13 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$) ≥ alquilo ($k=7.07 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$) > peroxinitrito ($k=2.68 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$) ≥ ABTS^{•+} ($k=1.20 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$).

Además, se informa la reactividad de estos compuestos frente otros análogos estructurales de la pravastatina: los profármacos lovastatina y simvastatina, y sus análogos de cadena abierta obtenidos experimentalmente por hidrólisis alcalina exhaustiva.

SUMMARY

In this Thesis a methodology by high HPLC was developed, with aim to be used in the stability study in front of hydrolysis of the hypocholesterolemic drug pravastatin.

The optimal conditions were reached after carried out the system suitability test according to USP XXVII, which consisted of an isocratic mobile phase of 30 mM acetonitrile/phosphate buffer, pH 2.0 (28/72), flow rate of 1 mL/min at 40 °C. The optimal conditions were selected on the basis of the combination between the values of resolution (R), capacity factor (k'), selectivity (α), the retention times of each signal and the run time of the chromatogram. In these conditions pravastatin exhibited a retention time (R_t) average of 8.955 min (n =10), R = 2.1, k' = 5.5 and α = 1.16.

The methodology exhibited analytical characteristics of repeatability (CV=0.11 %) and reproducibility (CV=0.49%) adequate to be used in stability studies. For the quantification the calibration curve method was used, and was described by the equation: $ABC=2.74 \times 10^{10} [c] + 72267$ (r =0.99992; n=7). The detection and quantification limits were 3.4×10^{-7} M and 3.7×10^{-6} M, respectively.

The stability study were carried out at four initial concentrations, three temperatures and five pH in 30 mM phosphate buffer, with the aim of evaluate the influence of these variables on the pravastatin degradation. In all the tested conditions of pH and temperature a mixed kinetic was obtained, in which it adjusted to a pseudo-first order kinetic until approximately 50% of degradation of the drug.

In order to evaluate the effect of pH on the degradation, pH 3, 5, 7, 9 and 12 were assayed. At pH<7, five new signals corresponding to degradation products appears in the chromatograms, with R_t of 10.21 min; 11.83 min; 15.91 min; 17.60 min and 19.47 min. At pH>7 only a new signal in the chromatograms was observed, at the same R_t of 1.90 min.

In all the studied cases, the new signals display an UV spectrum similar to that of pravastatin, which indicates that the hydrolysis process does not affect the chromophore structure of the drug.

With the aim to evaluate the influence of temperature on the hydrolytic degradation; experiments at 40, 60 and 80 °C were carried out. From these experiments was obtained that the degradation rate constant (k) increases concomitantly as the temperature increase. Also, activation energies values, half lives and t_{90} values for the degradation of pravastatin are reported.

Additionally, the reactivity of pravastatin in front of free radicals and peroxynitrite, as predictive models of its oxidative stability in both preformulations and *in vivo*, were studied. For this study UV/Vis spectrophotometry was used as analytical technique and ABAP + N₂ as alkyl radical's generator, ABAP + O₂ as alkylperoxyl radical's generator, and ABTS (ABTS^{•+}). The reactivity with peroxynitrite was evaluated by using SIN-1. The reactivity of pravastatin in front of ABAP and SIN-1 was assess following the spectrophotometric signal of the drug at 240nm, using the calibration curve method ($A = 2.04 \times 10^{-8}[c] + 4.55 \times 10^{-9}$). For ABTS^{•+} the decay of its signal at 734 nm was used.

Concentrations of pravastatin in the range of 40 μM to 100 μM were studied. The drug was reactive in front to all the compounds assayed, and the reactivity ranking was: ABAP+O₂ ($k=1.13 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$) ≥ ABAP+ N₂ ($k=7.07 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$) > SIN-1 ($k=2.68 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$) ≥ ABTS ($k=1.2 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$), that means: alkylperoxyl ≥ alky > peroxynitrite ≥ ABTS^{•+}.

In addition, the reactivity of these compounds in front other structural analogous of pravastatin: the prodrugs lovastatin and simvastatin, and their analogous of open chain experimentally obtained by exhaustive alkaline hydrolysis are reported.

INTRODUCCIÓN

La pravastatina (figura 1) es un fármaco perteneciente a la familia denominada como estatinas. Este fármaco, al igual que sus congéneres, lovastatina, simvastatina y fluvastatina, actúa inhibiendo la hidroximetilglutaril-CoA (HMG-CoA) reductasa, enzima que participa en la síntesis de colesterol endógeno y es utilizado en terapéutica para el tratamiento de hiperlipoproteinemia, como coadyuvante en la terapia dietaria para disminuir la elevada concentración sérica de colesterol y para disminuir la velocidad de progresión de aterosclerosis coronaria, en pacientes con enfermedad coronaria¹.

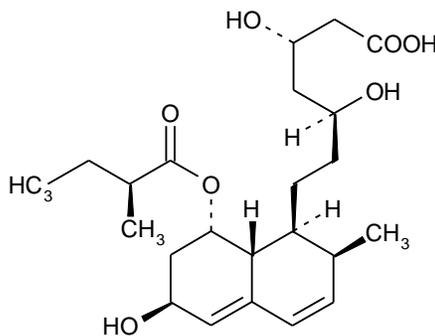
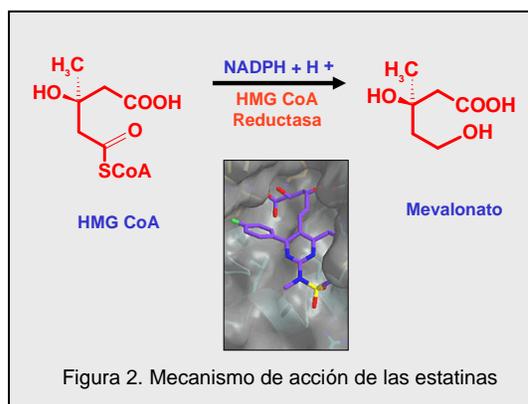


Figura 1. Estructura química de pravastatina

Pravastatina es rápidamente absorbida después de una administración oral y se observan concentraciones plasmáticas máximas 1 a 1.5 h después de la ingestión. Sufre metabolismo hepático extenso a un compuesto isomérico 3 α -hidroxilado, que tiene un 10 a un 40% de la actividad del compuesto madre y un metabolito isomérico 3 α , 5 β , 6 β -trihidroxilado. Las concentraciones plasmáticas máximas del metabolito 3 α -hidroxilado, se observan entre 0.9 y 1.3 h después de la ingestión de pravastatina. Es excretado principalmente en las heces (aproximadamente el 70%) vía biliar y también en la orina (el

20%), con el 80% de excreción urinaria completa dentro de las doce primeras horas. El fármaco y/o su metabolitos pueden acumularse en pacientes con insuficiencia renal o hepática. Además, una cantidad insignificante de la pravastatina se distribuye en la leche materna².

La inhibición de la HMG-CoA reductasa está directamente relacionada con las similitudes estructurales que existen entre la pravastatina y el sustrato endógeno, HMG-CoA (figura 2). En consecuencia, la actividad farmacológica y por ende terapéutica de este fármaco, tiene una estrecha relación con su estructura química, lo cual constituye una base irrefutable de la necesidad de estudios químicos respecto a su estabilidad, que desde el punto de vista estructural, tiene centros químicamente reactivos, como por ejemplo el grupo éster, susceptible de ser hidrolizado y/o reaccionado, dependiendo de las condiciones experimentales².



Con respecto a la relación entre la estructura química y la actividad farmacológica, existen algunos trabajos bastante específicos, que en líneas generales destacan que las características estructurales de las estatinas están estrechamente relacionadas a las propiedades fisicoquímicas. Así, los profármacos lactónicos, como lovastatina y simvastatina, son a lo menos 3 ordenes de magnitud más lipofílicos que sus correspondientes formas de hidroxiaácidos abiertos, los cuales, en cambio, son

aproximadamente 100 veces más lipofílicos que la pravastatina. Por otra parte, la pravastatina no atraviesa la barrera hematoencefálica en grado significativo, en contraste con los compuestos lactónicos más lipofílicos, lovastatina y simvastatina³.

Entre los estudios analíticos dedicados a la determinación de algunos representantes de esta familia de fármacos en formas farmacéuticas, se pueden citar el de la determinación de simvastatina por HPLC y por espectrofotometría derivativa⁴ y la determinación de pravastatina sódica en comprimidos por polarografía de pulso diferencial⁵, además de la lovastatina y simvastatina, contenidas en la USP XXVII y cuantificadas por HPLC⁶. Pravastatina ha sido cuantificada en plasma y orina humana luego de su extracción en fase sólida, usando HPLC con detección UV^{7,8} y HPLC acoplado espectrometría de masas en tandem⁹. Por otra parte, pravastatina y su principal metabolito han sido determinados simultáneamente empleando HPLC-MS con ionización química a presión atmosférica¹⁰, GC-MS^{2,11} y cromatografía turbo spray iónico/espectrometría de masas en tandem (LC/MS/MS), previa extracción ácida en fase sólida, obteniendo un método sensible, específico y reproducible para la cuantificación de este fármaco¹². Además, pravastatina y otros agentes hipolipemiantes han sido determinados en solución acuosa usando cromatografía líquida-MS con ionización electrospray en tandem¹³.

Dentro de los escasos estudios respecto a la estabilidad de las estatinas, se puede citar uno en que se aplica la polarografía de oxígeno a los ensayos de estabilidad y desarrollo de formulaciones farmacéuticas, específicamente la oxidación en fase líquida de lovastatina y simvastatina, evaluando la oxidación del fármaco en solución acuosa y ensayando la efectividad de diversos agentes antioxidantes, con objeto de incrementar la estabilidad de estos fármacos, concluyéndose que la estabilidad de ésta puede ser rápida y convenientemente evaluada por las técnicas descritas en el estudio¹⁴. También se ha

usado a la lovastatina como modelo para estudios de descomposición, haciendo uso de la técnica de calorimetría, aplicando un método para determinar la naturaleza de la reacción de descomposición, fuentes de errores sistemáticos en el método, ecuaciones que relacionan la señal calorimétrica a la cinética de reacción y algunos ejemplos de resultados¹⁵.

Cabe destacar también, un par de estudios dedicados a la lovastatina y simvastatina. En el primero se estudian las constantes de equilibrio y velocidad para la hidrólisis de la lactona catalizada por ácidos, en que los datos de hidrólisis obtenidos son usados para simular el grado de degradación que sufrirían estos fármacos en fluidos gástricos ácidos, luego de una administración oral¹⁶. En el segundo de estos trabajos, se estudia el efecto de la interconversión de la lactona y la forma hidroxilada sobre el perfil de disolución de simvastatina en comprimidos, observando que la velocidad de aparición de la forma hidroxilada depende del pH del medio¹⁷.

Por último, cabe mencionar un estudio respecto a la cinética de interconversión, equilibrio y solubilidades de las formas lactona e hidroxilada del inhibidor de la HMG-CoA reductasa, atorvastatina. Este estudio se llevó a cabo en distintos pH, concentraciones de soluciones reguladoras y temperaturas, a una fuerza iónica constante. Entre los resultados más importantes, se encontró que la constante de velocidad para la formación de la lactona estaría bien descrita por una catálisis ácida específica y que las vías de lactonización espontáneas, al igual que la constante de velocidad para la hidrólisis de la lactona, estarían bien descritas tanto por catálisis básica específica, así como por catálisis específica por agua y ácido¹⁸.

Por otra parte, y directamente relacionado con esta Memoria, cabe mencionar dos trabajos relacionados con la oxidación del congénere simvastatina frente a radicales libres. En el primero de ellos se estudió la autooxidación de la simvastatina en solución de

dicloroetileno, con un iniciador de radicales libres tipo azo para estudios cinéticos, haciendo uso de HPLC y aislando e identificando distintos productos secundarios espectroscópicamente¹⁹, en tanto que en el segundo se estudió la oxidación de simvastatina y otros inhibidores de la HMG-CoA reductasa, por radicales *tert*-butoxilo y 1,1,-difeníl-2-picrilhidrazilo, como modelos para predecir la sensibilidad oxidativa de estos compuestos durante el proceso de preformulación²⁰.

En función de los antecedentes expuestos, el objetivo de este trabajo es aportar nuevos antecedentes sobre la estabilidad química de pravastatina y desarrollar herramientas analíticas que cumplan los requerimientos de reproducibilidad y selectividad para ser aplicados a este estudio. Para tal efecto, se implementará un método por cromatografía líquida de alta eficiencia reproducible y selectivo, adecuado para seguir la cinética de degradación de pravastatina y posteriormente, se evaluará la estabilidad hidrolítica de pravastatina en función del pH.

Adicionalmente, se estudiará la estabilidad y reactividad de pravastatina frente a radicales libres, como modelos predictivos de su estabilidad tanto en preformulaciones como *in vivo*; comparando la pravastatina con sus congéneres de tipo lactónico lovastatina y simvastatina.

MATERIALES Y MÉTODOS

I. MATERIALES

Fármaco en estudio²¹

DCI	: Pravastatina sódica (Gentec S.A., Barcelona, España) (98.3%, HPLC)
Fórmula global	: C ₂₃ H ₃₅ Na O ₇
Nomenclatura IUPAC	: Sal ácida monosódica, 1, 2, 6, 7, 8, 8a-hexahidro-β,δ,6 - trihidroxi-2-metil-8-[2-metil-1-oxobutoxi]-1-aftalenheptanoico.
Peso molecular	: 446.51 g/mol
Intervalo de fusión	: 138 - 142°C

Solventes

Acetonitrilo grado HPLC (99.8%), EMD

Ácido fosfórico p.a. (85%), Fluka

Ácido clorhídrico p.a (32%), Merck

Agua desionizada Milli-Q

Reactivos sólidos

Hidróxido de sodio p.a. (99%), Merck

Hidróxido de potasio p.a. (99%), Merck

Fosfato de sodio monobásico, monohidratado p.a (99 %), J.T.Baker

Cloruro de sodio p.a. (99 %), Merck

Peroxidisulfato de potasio p.a. (98%), Merck

2,2'-azobis -(2-amidinopropano) (97%), Sigma-Aldrich. $C_8H_{18}N_6 \times 2 HCl$, PM 271.2 (ABAP)

(ácido 2,2' azino-bis (3-etilbenzo-tiazolina - 6-sulfónico) (98%), Sigma-Aldrich. $C_{18}H_{18}N_4O_6S_4 \cdot 2H_3N$, PM 548.68 (ABTS)

3-(4-Morfolinil) sidnonimina clorhidrato (97%), Sigma-Aldrich. $C_6H_{10}N_4O_2 \times HCl$, PM 206.6 (SIN-1)

Soluciones tampones

Tampón calibrador pH metro pH 4.00 WTW

Tampón calibrador pH metro pH 7.00 WTW

Tampón calibrador pH metro pH 10.00 WTW

Tampón fosfato monoácido de sodio 30 mM, pH 2.0

Material de vidrio

Todo el material de vidrio utilizado fue clase A

Viales ámbar Hewlett Packard de 2 mL

Otros materiales

Pipetas automáticas, Transferpette de volumen variable 2 - 1000 μ L

Jeringa de inyección HPLC Hamilton 80565 de 50 μ L

Jeringa de purga Hamilton de 10 mL

Sellos para viales Alltech

Sellador de viales Kimble INC

Desellador de viales Kimble INC

Equipos

Balanza analítica Precisa 40SM-200A (sensibilidad 0.01 mg)

Balanza granataria Precisa junior 500C

Medidores de pH WTW pH 537 y 3000

Agitador magnético Heidolph MR 3002

Sonicador Brasinic Branson 2210

Sistema purificador de agua Milli-Q Ultra-Pure Water System. Millipore

Estufa WTB Binder

Baño termorregulado Julabo SW 22

Espectrofotómetro UNICAM – ATI UV-3.

Programas de adquisición y tratamiento de datos Visión 2.1 y ORIGIN 6.0

Espectrómetro de Resonancia Magnética Nuclear Bruker, modelo Advance DRX 300

Espectrómetro FT-IR Bruker, modelo IFS 55 EQUINOX

Sistema cromatográfico (HPLC) y computacional

El equipo cromatográfico estuvo compuesto por una bomba cuaternaria Waters 600, válvula de inyección Rheodyne de 20 μ L y columna cromatográfica Symmetry C-18 (3.9 mm \times 150 mm, de tamaño de partículas de 5 μ m), precolumna C-18 Bondapack (30 mm \times 4.6 mm).

El sistema se mantuvo a temperatura constante por medio de un calefactor de columna Waters, modelo 600.

El detector empleado fue de arreglo de fotodiodo Waters 996. El control del sistema y tratamiento de datos se realizó en un computador DTK Computer Multi Sync 4D, con programa de adquisición y tratamiento de datos Millenium 3.05.

II. MÉTODOS

Preparación de soluciones

Solución de tampón fosfato 30 mM

Se disolvieron 3.86 g de fosfato monobásico de sodio anhidro en 900 mL de agua desionizada Milli-Q, ajustando a pH 2 con ácido fosfórico 85% p.a. Para finalizar se completó a 1000 mL con agua desionizada Milli-Q.

Solución stock de pravastatina

Se pesaron exactamente alrededor de 0.02232 g de pravastatina, los cuales se disolvieron en 5 mL agua desionizada Milli-Q, obteniéndose una solución de concentración final 1×10^{-2} M.

Solución stock de simvastatina

Se pesaron exactamente alrededor de 0.02090 g de simvastatina, los cuales se disolvieron en 5 mL de solución tampón fosfato pH 7.4/acetoneitrilo (50/50), obteniéndose una solución de concentración final 1×10^{-2} M.

Solución stock de lovastatina

Se pesaron exactamente alrededor de 0.02023 g de lovastatina, los cuales se disolvieron en 5 mL de solución tampón fosfato pH 7.4/acetoneitrilo (50/50), obteniéndose una solución de concentración final 1×10^{-2} M.

Soluciones de trabajo

Se midieron diferentes alícuotas de la solución stock de pravastatina con el fin de obtener concentraciones necesarias de trabajo, las cuales estuvieron en el rango de concentración de 1×10^{-3} - 5×10^{-5} M, se llevaron a matraces aforados de 25 mL con tampón fosfato y ajustados a los distintos pH a ensayar (3, 5, 7, 9, 12), con gotas de soluciones hidróxido de sodio 0.1 M o ácido clorhídrico 0.1 M, según sea el caso.

Ácido clorhídrico 0.1 M

Se midió una alícuota de 115 μ L ácido clorhídrico concentrado (32%) y se diluyó a 10 mL con agua desionizada Milli-Q.

Hidróxido de sodio 0.1 M

Se pesaron 0.4 g de reactivo NaOH los cuales se disolvieron en 10 mL de agua desionizada Milli-Q.

Solución de SIN-1^{22,23}

Se pesaron 3.1 mg de reactivo SIN-1 los cuales se disolvieron en 500 μ L de tampón fosfato pH 7.4, obteniéndose una solución de concentración final de 0.03 M.

Solución de ABAP^{22,24}

Se pesaron exactamente alrededor de 0.135 g de reactivo ABAP los cuales se disolvieron en 50 mL de tampón fosfato pH 7.4, obteniéndose una solución de concentración final de 10 mM.

Solución de ABTS^{22,24}

Se pesaron exactamente alrededor de 0.038 g de reactivo ABTS los cuales se disolvieron en 10 mL de tampón fosfato pH 7.4, obteniéndose una solución de concentración final de 7 mM.

Solución de peroxidisulfato de potasio

Se pesaron exactamente alrededor de 0.07569 g de reactivo peroxidisulfato de potasio los cuales fueron disueltos en 2 mL de tampón fosfato pH 7.4, obteniéndose una solución de concentración final de 140 mM.

Soluciones para la curva de calibración en HPLC

Se midieron alícuotas de una solución stock de pravastatina 1×10^{-2} M para preparar 6 soluciones que estuvieron en el rango de concentración final de 1×10^{-3} - 5×10^{-6} M.

Soluciones para la curva de calibración en espectrofotometría

Se midieron alícuotas de las soluciones stock 1×10^{-2} M, de cada estatina estudiada, para preparar 6 soluciones que estuvieron en el rango de concentración final de 5-100 μ M.

Hidrólisis de pravastatina

Se pesaron 200 mg de pravastatina y disolvieron en 50 mL de tampón fosfato pH 7.4. A esta solución se le adicionó una cantidad equimolar de solución NaOH 0.1 M, posteriormente se tomaron muestras para ser monitoreadas por HPLC a 239 nm. La solución resultante se rotaevaporó hasta sequedad, obteniéndose un compuesto sólido el cual se analizó por ¹HNMR, ¹³CNMR, FT-IR.

*Hidrólisis de lovastatina y simvastatina*²⁵

Se pesaron 200 mg de la estatina en estudio y disolvieron en 50 mL de una solución tampón fosfato pH 7.4/acetonitrilo (50/50). A esta solución se le adicionó una cantidad equimolar de solución NaOH 0.1 M, posteriormente se tomaron muestras para ser monitoreadas por HPLC a 239 nm. La solución resultante se rotaevaporó hasta sequedad, obteniéndose un compuesto sólido el cual se analizó por ¹HNMR, ¹³CNMR y FT-IR.

*Ensayo de reactividad frente a ABAP + O₂*²⁴

Pravastatina. Se prepararon 50 mL de una solución ABAP 10 mM en tampón fosfato pH 7.4, la cual se llevo a 37 °C en un baño termorregulado por 15 min. La línea base se realizó con esta solución entre 220 y 380 nm. Posteriormente los 50 mL de solución se dividieron en dos matraces de 25 mL cada uno, los cuales se mantuvieron a 37 °C, a uno se le fueron adicionando cantidades de solución stock de pravastatina, de forma de obtener concentraciones finales de 40, 60, 80 y 100 µM y el otro se utilizó como blanco. Finalmente se tomaron muestras de 3 mL cada 20 min por un periodo de 100 min y midió a 240 nm. Para la generación de los radicales alquilperoxilo bastó con la saturación normal de oxígeno en la solución.

Lovastatina y simvastatina. La metodología experimental fue análoga a la de la pravastatina, pero empleando una solución de ABAP 10 mM en tampón fosfato pH 7.4/acetonitrilo (50/50).

*Ensayo de reactividad frente a ABAP + N₂*²⁴

Pravastatina. Se prepararon 100 mL de solución de ABAP 10 mM en tampón fosfato pH 7.4, la cual se dispuso en un baño termorregulado a 37°C y burbujeó con nitrógeno

(previamente saturado con acetonitrilo) por 15 min. Se realizó la línea base entre 220 y 380 nm. Finalmente se siguió con el procedimiento descrito para el ensayo de reactividad frente a ABAP + O₂.

Lovastatina y simvastatina. La metodología experimental fue análoga a la de la pravastatina, pero empleando una solución de ABAP 10 mM en tampón fosfato pH 7.4/acetonitrilo (50/50).

Ensayo de reactividad frente a ABTS³⁰

Pravastatina. El catión radical ABTS^{•+} se preparó 12 h antes de su uso, mezclando 5mL de una solución 7 mM de ABTS con 88 µL de una solución de peroxidisulfato de potasio 140 mM. La solución intensamente coloreada resultante se protegió de la luz y se mantuvo a temperatura ambiente. Para el ensayo se adicionaron 3 mL de solución ABTS^{•+} en la cubeta de muestra y en la cubeta de referencia solución tampón fosfato pH 7.4. A la cubeta de muestra se le agregaron alícuotas de la solución stock de pravastatina, para obtener concentraciones de 40, 60, 80 y 100 µM. Se midió a una longitud de onda de 734 nm cada 10 min., por un periodo de 100 min.

Lovastatina y simvastatina. La metodología experimental fue análoga a la de la pravastatina, pero empleando como disolvente tampón fosfato pH 7.4/acetonitrilo (50/50) en vez del tampón fosfato solo.

Ensayo de reactividad frente a SIN-1²⁴

Pravastatina. Se preparó una solución stock de SIN-1 0.03 M en tampón fosfato pH 7.4, la cual se mantuvo en hielo durante todo el ensayo. Se realizó el blanco adicionando en ambas cubetas 3mL de la solución tampón fosfato pH 7.4 y 10 mL del

solución stock de SIN-1. Para medir el decaimiento se tomaron alícuotas de la solución stock de pravastatina, para obtener concentraciones finales de 40, 60, 80 y 100 μM y se adicionaron directamente en la cubeta. Finalmente se agitó y midió a 240 nm cada 10 min por 100 min.

Lovastatina y simvastatina. La metodología experimental fue análoga a la de la pravastatina, pero empleando como disolvente tampón fosfato pH 7.4/acetoneitrilo (50/50) en vez del tampón fosfato solo.

*Ensayo de aptitud del sistema*²¹

Se prepararon 10 mL de una solución de pravastatina 1×10^{-4} M en tampón fosfato pH 7.4, la cual fue sometida a una hidrólisis ácida con HCl (0.1 M) en exceso, a una temperatura de 80°C por 1 h, para finalizar se le agregó a la solución resultante 0.008 mg KNO_3 como sustancia que no se retiene en la columna, a fin de poder calcular posteriormente los parámetros de interés.

Posteriormente se monitoreó la solución resultante de pravastatina y sus productos de hidrólisis, por HPLC, donde se ensayaron proporciones de acetoneitrilo/tampón fosfato 30 mM, pH 2.0. Se fue aumentando la composición de fase orgánica en la fase móvil desde una proporción 20/80 a 80/20 (acetoneitrilo/tampón fosfato pH 2.0), a fin de encontrar las condiciones experimentales óptimas de trabajo.

En cada condición cromatográfica se procedió a obtener los valores de resolución (R), factor de capacidad (k') y selectividad (α).

Finalmente, luego del desarrollo de este estudio y análisis de los diferentes parámetros, se obtuvieron las condiciones óptimas experimentales para el método cromatográfico las cuales fueron:

- Fase móvil : acetonitrilo/tampón fosfato 30 mM
pH 2, (28/72)
- Flujo : 1.0mL/min (1800psi)
- Volumen de inyección : 20 μ L
- Tiempo de desarrollo del cromatograma : 21 min
- Temperatura : 40 °C
- Detector de arreglo de fotodiodos : $\lambda = 239$ nm

Rango dinámico

A partir de la solución stock de pravastatina de 1×10^{-2} M, se prepararon soluciones en el intervalo de concentración entre 1×10^{-3} a 5×10^{-5} M, las cuales se inyectaron bajo las condiciones de trabajo óptimas seleccionadas, con el objetivo de determinar las concentraciones adecuadas de fármaco para su análisis.

Límite de cuantificación y detección²⁵

Para calcular el límite de cuantificación y detección:

- Se determinó la pendiente (m) de la curva de calibración (área versus concentración).
- Se realizó otra curva de calibración, inyectando cada muestra por triplicado, pero en este caso se utilizaron las concentraciones en el tercio inferior de la curva de calibración. Se determinó la ecuación de la nueva recta, extrapolándose la respuesta a concentración cero de analito, obteniéndose así la respuesta estimada del blanco (Y_{bl}).

- Se determinó la desviación estándar (s) correspondiente a cada concentración de la segunda curva de calibración; se calculó la recta correspondiente a la gráfica de concentración *versus* desviación estándar, extrapolándose como en el caso anterior, la desviación estándar a concentración cero, obteniéndose la desviación del blanco (s_{bl}).

En la tabla 1 se presentan las ecuaciones para calcular el límite de detección y cuantificación.

Tabla 1. Ecuación límite de detección y cuantificación

Límite	Ecuación
Detección	$\frac{Y_{bl} + 10 \times s_{bl}}{m}$
Cuantificación	$\frac{Y_{bl} + 3 \times s_{bl}}{m}$

*Estudio de repetibilidad*²⁶

Se procedió a inyectar diez veces consecutivas una misma solución de concentración 1×10^{-4} M. Se usó el detector de arreglo de fotodiodos en las condiciones óptimas experimentales. Como parámetro estadístico se consideró el coeficiente de variación ($CV < 2$ %), utilizando el área de la señal obtenida experimentalmente.

*Estudio de reproducibilidad*²⁶

Se procedió a inyectar 10 veces consecutivas una misma solución de concentración 1×10^{-4} M. Se utilizó el detector de arreglo de fotodiodos en las

condiciones óptimas seleccionadas, cambiando el día de la medición.

Como parámetro estadístico se consideró el coeficiente de variación ($CV < 2\%$), utilizando el área de la señal obtenida experimentalmente.

Estudio de recuperación

Se prepararon 10 muestras de pravastatina 1×10^{-4} M en tampón fosfato en forma independiente. Luego se procedió a inyectar las muestras bajo las condiciones de trabajo óptimas seleccionadas.

Estudio de estabilidad

Se prepararon 4 soluciones de pravastatina en el intervalo de concentración entre 1×10^{-3} - 5×10^{-5} M, las cuales se fraccionaron en viales ámbar de vidrio de 2 mL y sellados con tapas de aluminio. Posteriormente fueron trasladados a una estufa a temperatura controlada y definida para cada ensayo (40, 60 y 80 °C).

El muestreo se realizó a intervalos de tiempo definidos dependiendo de la condición ensayada, en forma aleatoria y por duplicado. Los viales fueron enfriados inmediatamente en hielo para detener la reacción de hidrólisis y posteriormente las muestras fueron analizadas por HPLC.

Método para la determinación del orden de reacción

Método gráfico²⁷

Se evaluó la degradación de pravastatina a cuatro concentraciones iniciales distintas (1×10^{-3} , 5×10^{-4} , 1×10^{-4} , 5×10^{-5} M), utilizando para ello la metodología HPLC (detector de arreglo de fotodiodos) desarrollada, para diferentes de ordenes

de reacción, buscando el mejor ajuste, que es representado por el coeficiente de regresión “r” cercano a uno.

En la tabla 2 se presenta la ecuación para cada orden de reacción y su vida media correspondiente.

Tabla 2. Ecuación y vida media para cada pseudo orden de degradación

Orden	Ecuación	Vida media
0	$C = C_0 - kt$	$t_{1/2} = \frac{C_0}{2k}$
1	$C = C_0 e^{-kt}$	$t_{1/2} = \frac{0.693}{k}$
2	$\frac{1}{C} = \frac{1}{C_0} + kt$	$t_{1/2} = \frac{3}{2} \times \frac{1}{2C_0 k}$

Determinación de la energía de activación

Método gráfico²⁶²⁸

Se evaluó la energía de activación para cada condición ensayada, utilizando para ello el modelo de Arrhenius, a través de la gráfica de $\ln k$ versus $1/T$ (temperatura) para las cuatro concentraciones, buscando el mejor ajuste que es representado por el coeficiente de regresión “r” cercano a uno.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

DESARROLLO DE LA METODOLOGÍA ANALÍTICA

Para el desarrollo de la metodología analítica se ensayaron como fases estacionarias columnas C-8 y C-18, y distintas proporciones de mezclas de acetonitrilo/tampón fosfato 30 mM, pH 2.0, como fases móviles. La selección de las condiciones experimentales óptimas de trabajo se realizó luego de llevar a cabo el ensayo de aptitud del sistema, de acuerdo a lo establecido en la USPXXVII²¹. Para este ensayo se llevó a cabo una hidrólisis ácida (HCl 0.1 M) de una solución de pravastatina 1×10^{-4} M, a 80 °C por 1 h, a objeto de obtener los productos de degradación hidrolítica. En la figura 3 se presenta el efecto de la composición de fase orgánica en la fase móvil.

Como se puede observar en la figura 3, a medida que disminuye el contenido de acetonitrilo en la fase móvil, las señales cromatográficas, tanto del fármaco en estudio como la de sus productos de hidrólisis, se van separando. En cada condición cromatográfica se procedió a obtener los valores de diferentes parámetros como: resolución (R), factor de capacidad (k') y selectividad (α) (figura 4). La condición óptima experimental se seleccionó en base a la combinación adecuada entre los valores de resolución, factor de capacidad, selectividad, tiempos de retención de cada señal y finalmente el tiempo que duró la corrida del cromatograma. Encontrándose como condiciones óptimas, una fase móvil isocrática de acetonitrilo/tampón fosfato 30 mM, pH 2.0 (28/72), flujo 1 mL/min a una temperatura de 40 °C. En estas condiciones, pravastatina exhibió un tiempo de retención (t_r) promedio de 8.95 ± 0.0553 min ($n=10$) (figura 5), y los siguientes valores para los distintos parámetros evaluados: $R = 2.1$, $k' = 5.5$ y $S = 1.6$.

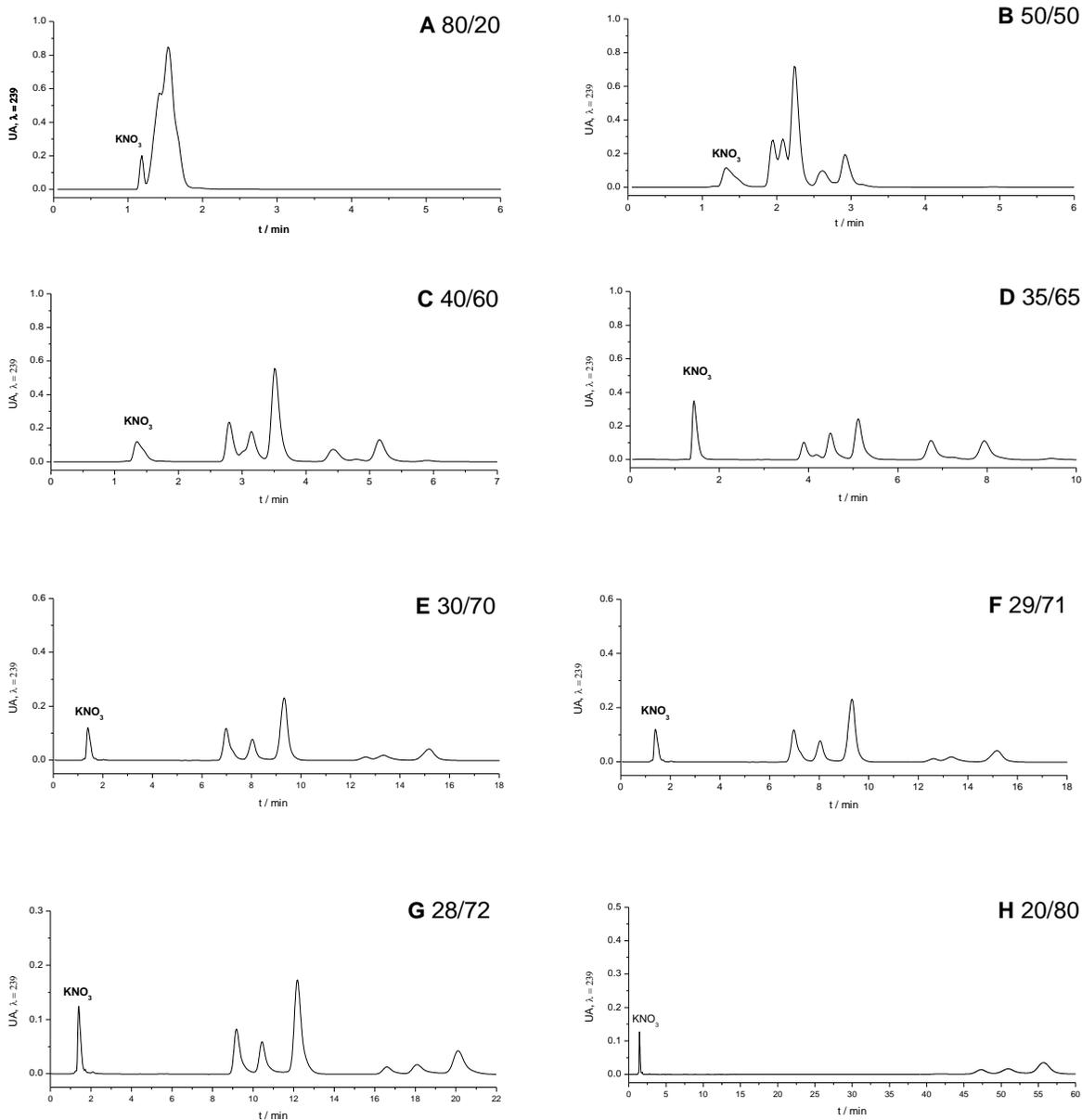


Figura 3. Efecto de la composición de fase orgánica (acetonitrilo) en la fase móvil. Cromatogramas de una solución de pravastatina 1×10^{-4} M hidrolizada en medio ácido (HCl 0.1 M) por 1 h a 80 °C, En todos los casos se emplea la mezcla acetonitrilo/tampón fosfato 30 mM, pH 2.0. **A:** 80/20, **B:** 50/50, **C:** 40/60, **D:** 35/65, **E:** 30/70, **F:** 29/71, **G:** 28/72, **H:** 20/80.

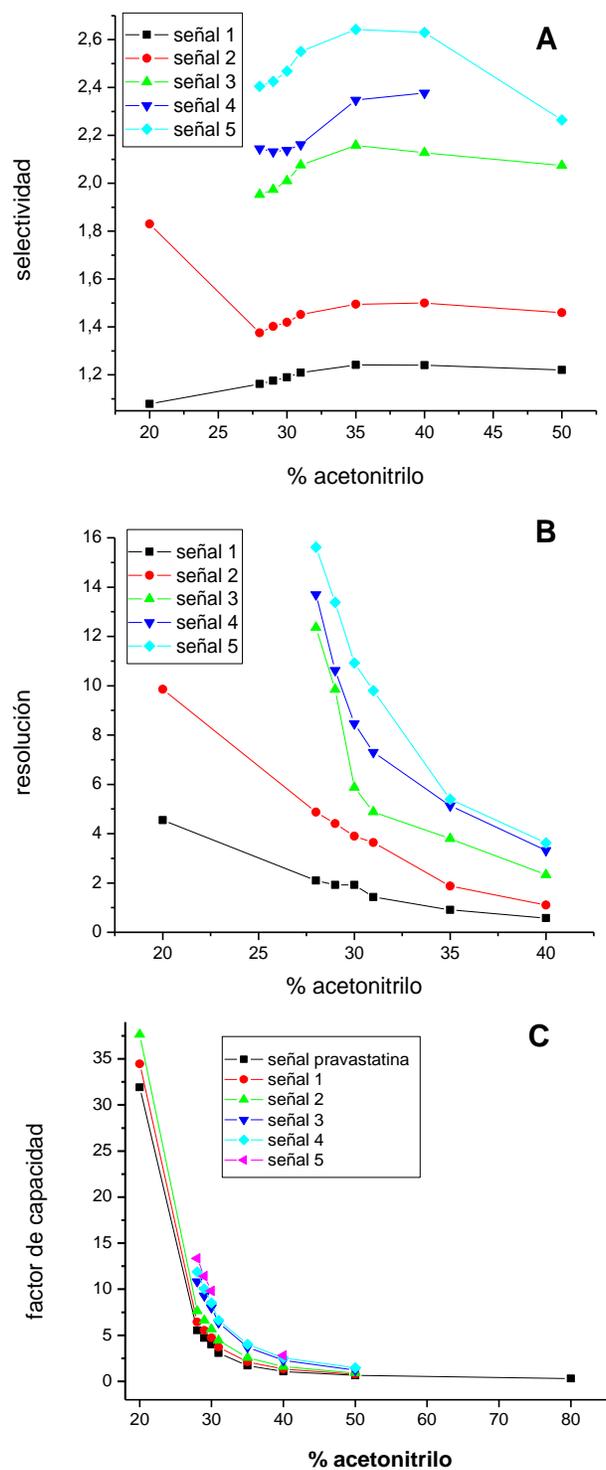


Figura4. Gráficos resultantes del ensayo de aptitud del sistema, **A:** selectividad, **B:** resolución, **C:** factor de capacidad.

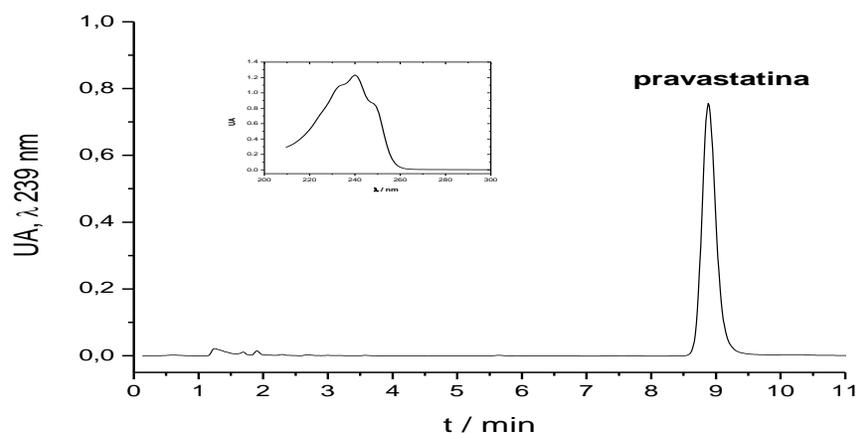


Figura 5. Cromatograma de una solución 1×10^{-4} M, $\lambda=239$ de pravastatina en las condiciones experimentales óptimas seleccionadas. Inserto espectro UV.

Una vez determinadas las condiciones experimentales óptimas de trabajo selectivas, se llevaron a cabo los demás ensayos de validación de la metodología cromatográfica. Para tal efecto se construyó una curva de calibración para el detector de arreglo de fotodiodos (figura 6), en un intervalo de concentración de 1×10^{-3} a 1×10^{-6} M. La ecuación de la curva y los parámetros de eficiencia analítica se presentan en la tabla 3.

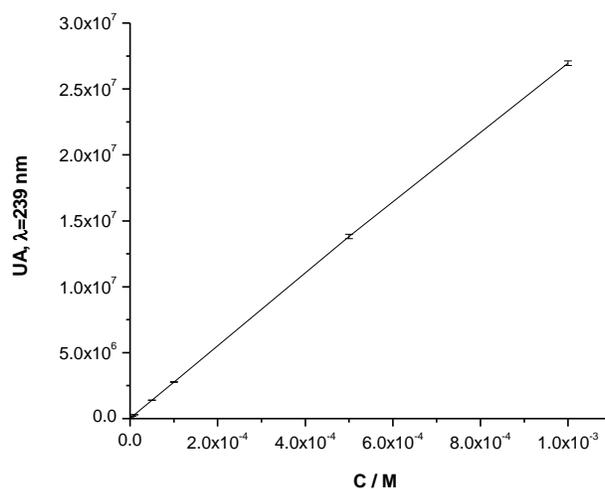


Figura 6. Curva de calibración de pravastatina (1×10^{-3} - 1×10^{-6} M), $n=6$, por duplicado. Cada punto se encuentra con su desviación estándar correspondiente.

Tabla 3. Parámetros de eficiencia analítica para la metodología cromatográfica desarrollada.

Parámetro	HPLC UV - 239
Repetibilidad CV (%) ^a	0.11
Reproducibilidad CV (%)	0.49
Recuperación ± d.e. ^a	98.6 ± 0.9
Rango de Concentración (M)	1×10 ⁻³ - 1×10 ⁻⁶ M
Curva de calibración	ABC = 2.74×10 ¹⁰ [c] + 72267 (r = 0.99992; n=7)
Límite de detección (M)	3.4×10 ⁻⁷
Límite de cuantificación (M)	3.7×10 ⁻⁶

^a: Concentración 1×10⁻⁴ M

ABC : Área bajo la curva

[c] : Concentración molar

La determinación del límite de detección y cuantificación, permitió definir el rango de concentración en el cual se podría trabajar en el estudio de estabilidad. Además los parámetros analíticos de la metodología implementada cumplen con los requerimientos planteados, por lo tanto permiten seguir con seguridad la evolución de la pravastatina en los ensayos de estabilidad.

La pureza de cada señal cromatográfica se verificó extrayendo los espectros UV en tres zonas de cada pico. Los espectros UV correspondientes a cada señal se encuentran insertos en la figura 7.

La longitud de onda seleccionada para el tratamiento de las áreas en el detector de fotodiodos fue de 239 nm, la cual es la longitud de máxima absorción de la pravastatina.

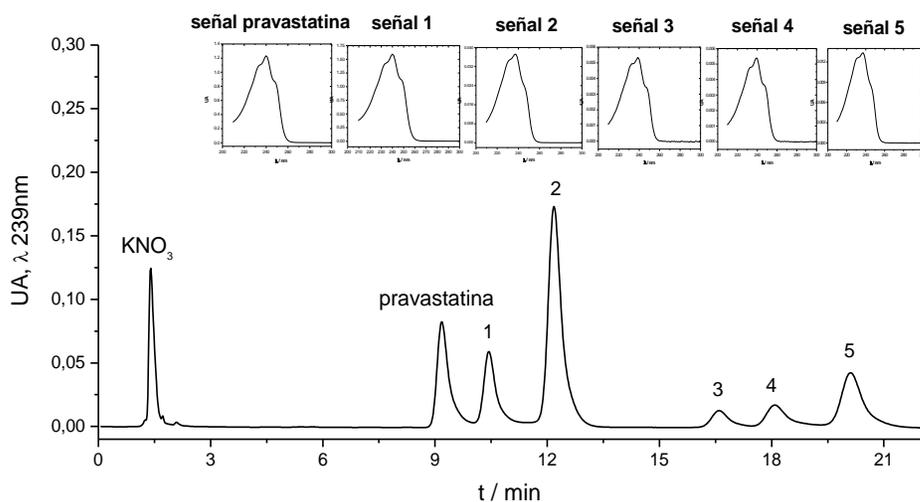


Figura 7. Cromatograma de una solución de pravastatina 1×10^{-4} M y sus productos de hidrólisis en medio (HCl 0.1M), 80°C por 1h. Insertos espectros de absorción UV de pravastatina y cada producto de degradación hidrolítica.

Bajo todos los parámetros analíticos analizados y expuestos anteriormente, la metodología desarrollada fue adecuada para realizar estudios de estabilidad y la cuantificación del fármaco en estudio.

APLICACIÓN A ESTUDIOS DE ESTABILIDAD HIROLÍTICA DE PRAVASTATINA

El presente estudio se realizó a cuatro concentraciones iniciales, a tres temperaturas y cinco pH, en tampón fosfato 30 mM, con el fin de lograr interpretar la influencia de estas variables sobre la velocidad de degradación de pravastatina.

A objeto de determinar el orden de reacción, se realizó el estudio de degradación hidrolítica a diferentes concentraciones iniciales de pravastatina (1×10^{-3} , 5×10^{-4} , 1×10^{-4} y 5×10^{-5} M). En la figura 8 se presenta una curva de decaimiento tipo para pravastatina. En

todas las condiciones ensayadas de pH (ácido, neutro y básico) y temperatura (40, 60 y 80 °C) se obtuvo una cinética mixta. Luego de ajustar cada ecuación cinética, para obtener una línea recta y definir las constantes cinéticas, se desprende que en todas las condiciones de pH y temperatura ensayadas se obtuvo una cinética de pseudo primer orden, hasta aproximadamente el 50 % de degradación de pravastatina. Para el cálculo de las constantes cinéticas se realizó el ajuste lineal en este primer tramo del decaimiento. Este efecto se presenta en la figura 9, en donde también es posible observar que el orden de reacción no se modifica con la concentración inicial del fármaco.

En consecuencia, de los experimentos realizados a distintas concentraciones iniciales, se puede concluir que la degradación hidrolítica corresponde a una cinética de pseudo primer orden, ya que, como se observa en la figura 9, no existe un cambio significativo en las pendientes de los gráficos $\ln C$ vs. t , para una misma temperatura y pH.

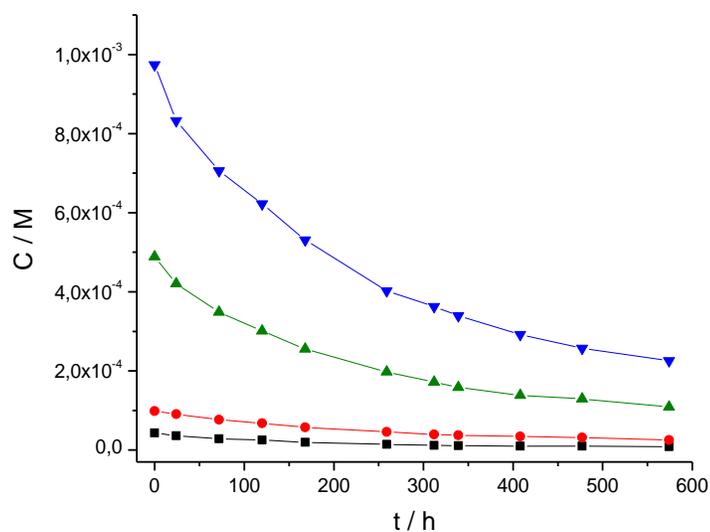


Figura 8. Curvas de decaimiento típico de pravastatina a distintas concentraciones iniciales (∇ 1×10^{-3} M, \blacktriangle 5×10^{-4} M, \bullet 1×10^{-4} M, \blacksquare 5×10^{-5} M), pH 7, 80 °C.

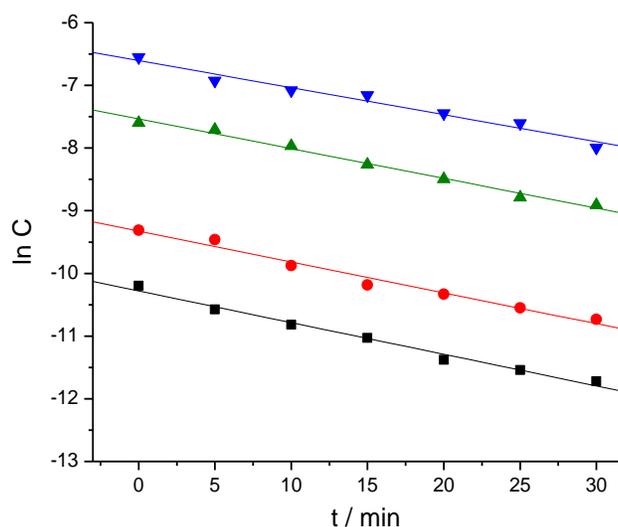


Figura 9. $\ln C$ vs. t para la hidrólisis de pravastatina a distintas concentraciones iniciales, pH 3, 80 °C (∇ 1×10^{-3} M, \blacktriangle 5×10^{-4} M, \bullet 1×10^{-4} M, \blacksquare 5×10^{-5} M).

Para evaluar el efecto del pH respecto a la degradación de pravastatina, se ensayaron los pH 3, 5, 7, 9 y 12. A pH < 7 los cromatogramas presentan 5 nuevas señales correspondientes a los productos de degradación de pravastatina (figura 10), a tiempos de retención de 10.21 ± 0.087 min; 11.83 ± 0.064 min; 15.91 ± 0.39 min; 17.60 ± 0.17 min y 19.47 ± 0.17 min, que corresponden a los productos denominados de 1 a 5 respectivamente. Por otra parte, a pH > 7 sólo se observa la aparición de una nueva señal en los cromatogramas, a $t_r = 1.902 \pm 0.0095$ min (figura 11).

En todos los casos, las nuevas señales presentan un espectro de absorción UV análogo al de pravastatina (Figuras 7 y 11), lo cual indica que el proceso de hidrólisis no afecta la estructura cromófora del fármaco en estudio (anillo hexahidronaftaleno).

A todas las concentraciones ensayadas se observa que el decaimiento de pravastatina es dependiente del pH, incrementándose a pH ácidos. Dicho efecto se presenta en la figura 12.

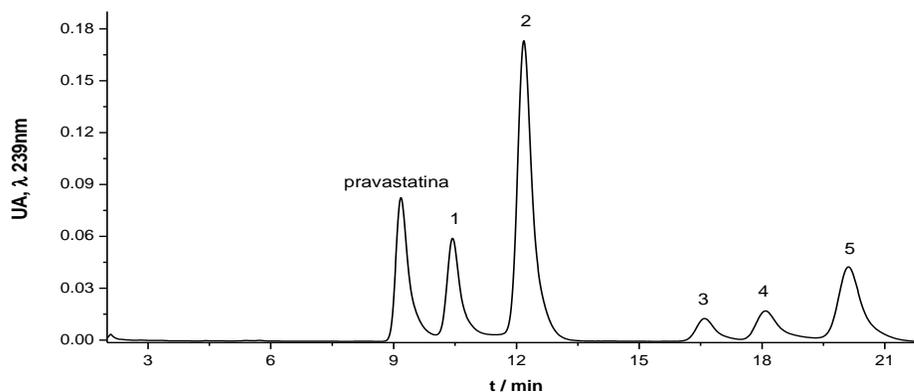


Figura 10. Cromatograma de una solución de pravastatina $1 \times 10^{-4} M$, luego de 1 h de degradación a pH 3, 80 °C. 1 - 5: productos de degradación.

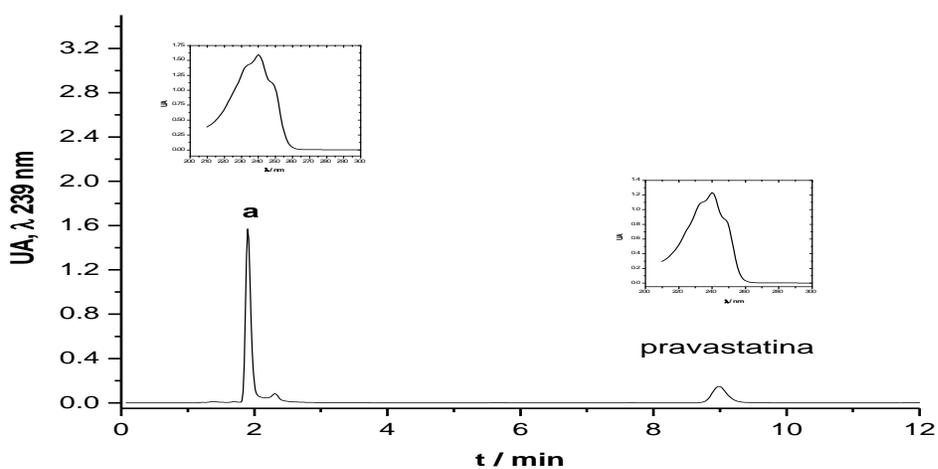


Figura 11. Cromatograma de una solución de pravastatina $1 \times 10^{-4} M$, luego de 6h de degradación a pH 12, 80 °C. Insertos espectros UV respectivos.

Llama la atención la cantidad de productos que se generan a pH ácidos (5 señales), respecto a los pH básicos, en que sólo se genera uno, el cual no se visualiza en pH ácidos ($t_r = 1.902 \pm 0.0095$ min). Esta situación podría deberse a que en pH ácidos son posibles, además de la ruptura del enlace ester, la reesterificación y la relactonización de la molécula.

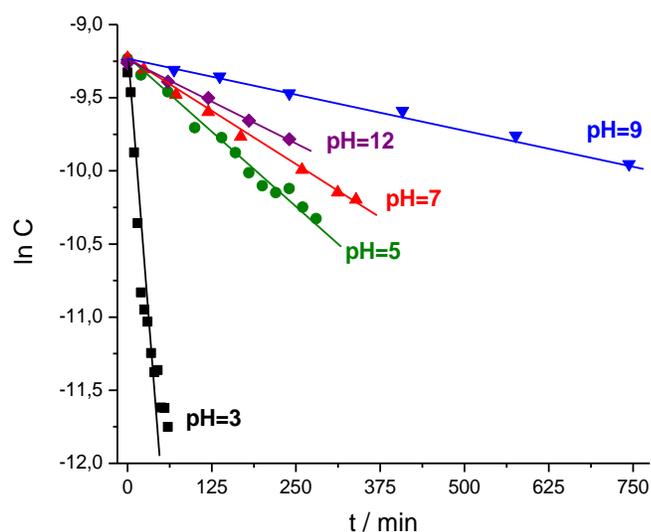


Figura 12. Efecto del pH sobre la degradación de pravastatina a 80 °C.

De acuerdo a los resultados obtenidos experimentalmente es posible postular distintos productos de hidrólisis. En las figuras 13 y 14 se presentan los esquemas con los potenciales productos luego de una hidrólisis del fármaco en medio básico y ácido, respectivamente.

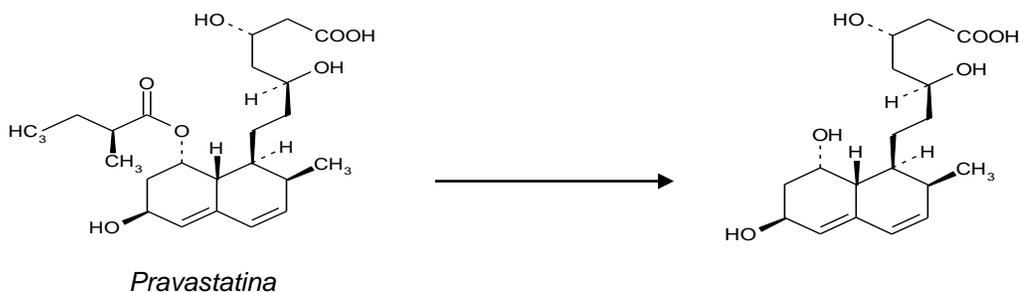


Figura 13: Esquema de los potenciales productos de hidrólisis, en medio básico, de pravastatina.

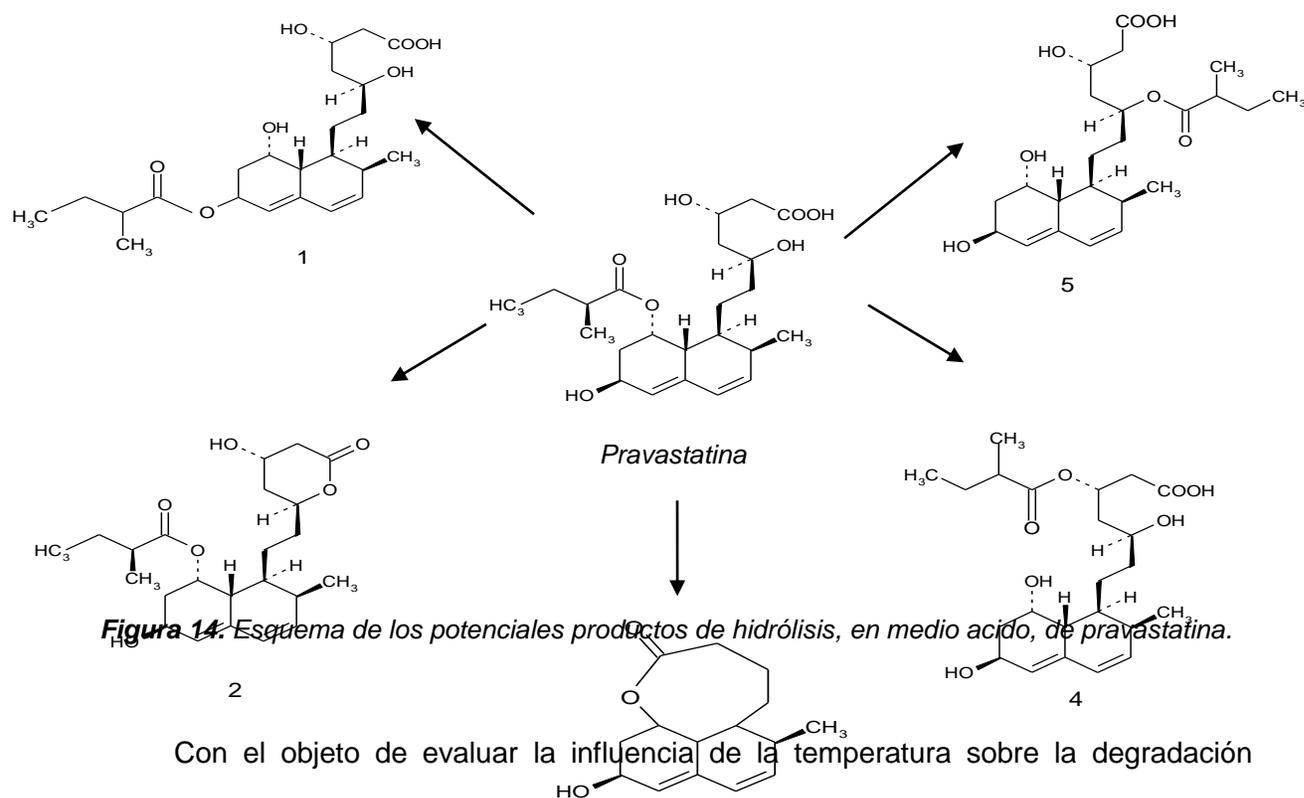


Figura 14. Esquema de los potenciales productos de hidrólisis, en medio ácido, de pravastatina.

Con el objeto de evaluar la influencia de la temperatura sobre la degradación hidrolítica de pravastatina, se llevaron a cabo tres experimentos a tres temperaturas diferentes: 40, 60 y 80 °C. En la figura 15 se presenta el efecto de la temperatura sobre la degradación de pravastatina a pH 3 (1×10^{-4} M). Como se observa en la gráfica de la figura 15, la constante de velocidad de degradación (k) aumenta en forma concomitante con el incremento de la temperatura.

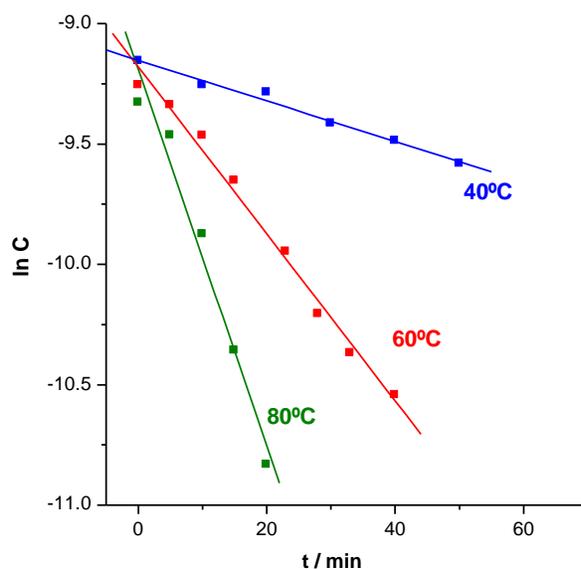


Figura 15. Efecto de la temperatura sobre la degradación de pravastatina $1 \times 10^{-4} M$ a pH 3.

En la figura 15 se observa que al variar la temperatura se influncia la significativamente la pendiente (k), del grafico $\ln C$ vs t , aumentando al incrementar la temperatura.

En la tabla 4 se presenta el resumen de los valores obtenidos para las constantes (k) de degradación hidrolítica de pravastatina a las distintas temperaturas y pH ensayados.

De los resultados presentados en la tabla 4 y figura 16 podemos observar la influencia de la temperatura en la evolución de la cinética de degradación. Claramente la aplicación de calor aumenta la velocidad de la reacción química.

Tabla 4. Valores de constantes (k) degradación hidrolítica a las temperaturas ensayadas.

pH	Constante de degradación (k , min^{-1})*		
	40°C	60°C	80°C
3	$5.13 \times 10^{-3} \pm 6.94 \times 10^{-4}$	$3.62 \times 10^{-2} \pm 1.90 \times 10^{-3}$	$4.76 \times 10^{-2} \pm 3.20 \times 10^{-3}$
5	$9.76 \times 10^{-5} \pm 2.99 \times 10^{-6}$	$5.10 \times 10^{-4} \pm 7.15 \times 10^{-5}$	$4.21 \times 10^{-3} \pm 4.99 \times 10^{-4}$
7	$4.16 \times 10^{-6} \pm 2.75 \times 10^{-6}$	$1.04 \times 10^{-5} \pm 1.43 \times 10^{-6}$	$5.69 \times 10^{-5} \pm 9.04 \times 10^{-6}$
9	No determinada	$2.41 \times 10^{-6} \pm 3.87 \times 10^{-7}$	$1.11 \times 10^{-5} \pm 1.62 \times 10^{-6}$
12	$3.18 \times 10^{-5} \pm 9.74 \times 10^{-6}$	$6.99 \times 10^{-5} \pm 7.98 \times 10^{-6}$	$4.19 \times 10^{-4} \pm 3.83 \times 10^{-5}$

* k representa el promedio de cuatro de concentraciones, ($p < 0.05$)

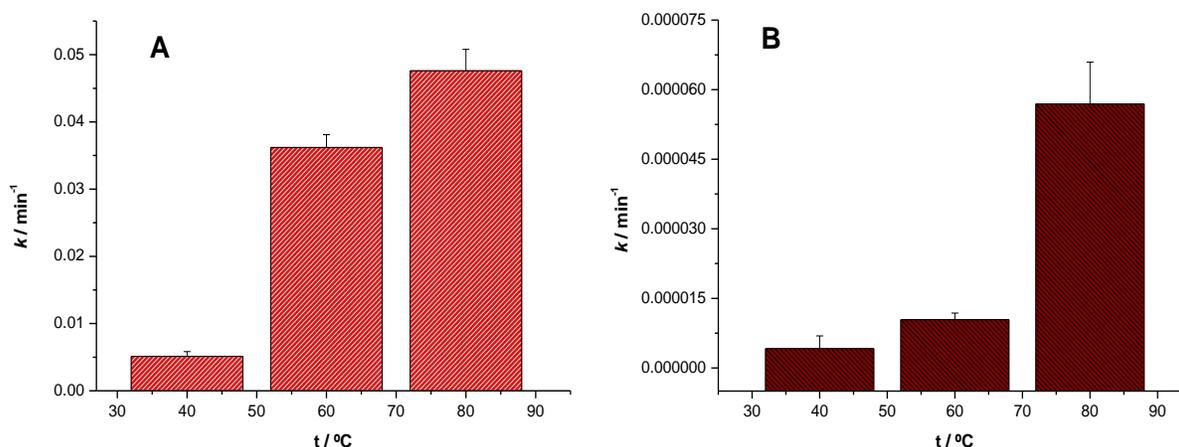


Figura 16. Constante de velocidad (k) de pseudo primer orden de pravastatina en tampón fosfato 30 mM. **A:** pH 3, **B:** pH 7.

Aunque las velocidades de reacción pueden expresarse cuantitativamente en términos de valores numéricos de k , en muchos casos la expresión más útil es en términos de la vida media de reacción, o sea el tiempo necesario para que la mitad del

fármaco entre en reacción. En la Tabla 5 se presentan los valores de vidas medias y t_{90} calculadas para la degradación de pravastatina, Además se observan estos valores extrapolados a 25 °C a los distintos pH ensayados. Como se puede observar, el fármaco en solución a pH 3 es estable por sólo 12 min a una temperatura de 80 °C, estabilidad que se incrementa concomitante con el aumento del pH.

Tabla 5. Parámetros cinéticos a 80 °C y extrapolados a 25 °C

pH	T = 80°C		T = 25°C		
	k (min ⁻¹)	$t_{1/2}$ (h)	k (min ⁻¹)	$t_{1/2}$ (h)	t_{90} (h)
3	4.76×10^{-2}	0.24	2.05×10^{-2}	0.56	0.09
5	4.21×10^{-3}	2.74	1.81×10^{-3}	6.38	0.97
7	5.69×10^{-5}	203	2.45×10^{-5}	471	71.43
9	1.11×10^{-5}	1040	4.78×10^{-6}	2416	366
12	4.19×10^{-4}	28	1.81×10^{-4}	63.81	9.67

En la figura 17 se presenta la gráfica del perfil de pH para la hidrólisis de pravastatina a 80 °C. En ella se puede observar que la cinética de degradación decae drásticamente desde pH 3 hasta pH 5, para mantenerse más o menos estable hasta pH 12. En este sentido, la velocidad de reacción a pH 3 es 11 veces mayor que a pH 5 y 114 veces mayor que a pH 12.

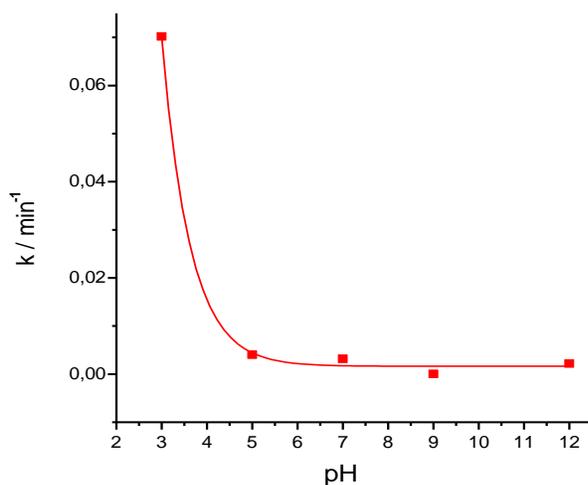


Figura 17. Perfil de pH para la hidrólisis de pravastatina a 80 °C.

A partir de los resultados obtenidos del estudio de la influencia de la temperatura en la velocidad de la degradación de pravastatina, se pudo calcular la *Energía de Activación* (E_a) correspondiente, a partir del modelo de *Arrhenius* (k vs. $1/T$)²⁶. La E_a representa la barrera energética que tiene que ser sobrepasada para que la reacción tenga lugar, que en este caso corresponde a la generación de los productos de hidrólisis.

Las E_a calculadas, acorde con el modelo de *Arrhenius* en el proceso de hidrólisis, se presentan en la tabla 6.

Tabla 6. Energía de activación a distintos pH a 80 °C.

pH	E_a , Kcal/mol
3	3.20
5	17.84
7	19.85
9	24.66
12	20.92

De los resultados expuestos anteriormente podemos decir que las energías de activación de la reacción en cada condición de pH ensayada se encuentran dentro del rango de valores usuales de reacción, que van entre 12 y 24 Kcal/mol.

Como ya fue comentado anteriormente, a pH < 7 pravastatina genera cinco productos de hidrólisis, las señales cromatográficas de estos se observan después de la aparición de la señal de pravastatina, en cambio a pH >7 sólo se genera uno, el cual se observa antes de la señal cromatográfica de la pravastatina (figura 18).

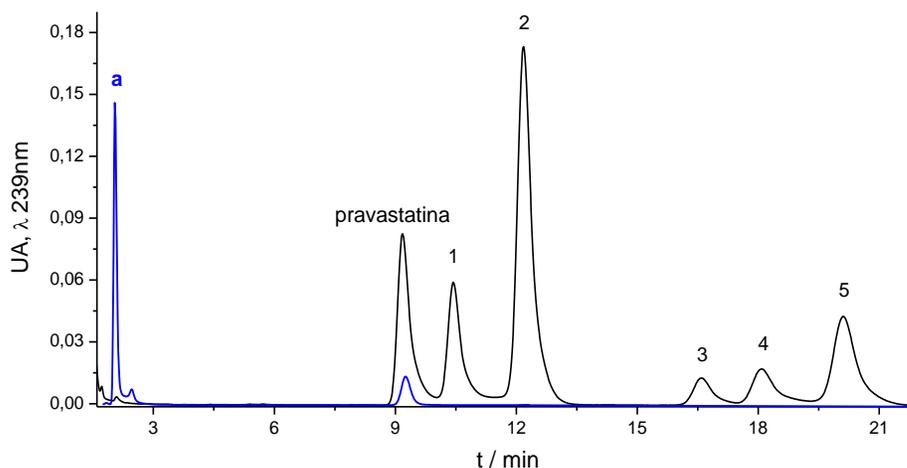


Figura 18. Cromatograma de la hidrólisis básica (NaOH 0.1 M) (—), e hidrólisis ácida (HCl 0.1 M) (—) de pravastatina, ambas soluciones de concentración 1×10^{-4} M.

En la figura 19 se presenta la evolución de cada señal en el tiempo. Como se puede observar, a pH básicos, el único producto de degradación se genera prácticamente con la misma velocidad con que la pravastatina desaparece (figura 19A). Nótese que este producto que no se visualiza en pH ácidos, se genera recién de las primeras 50 h de degradación y el experimento se sigue hasta que la pravastatina se degrada aproximadamente en un 90 %, lo cual ocurre a los 25 días a pH 12 y a los 3 meses a pH

9, es el caso de los pH ácidos, en que el principal producto de degradación, correspondiente a la señal 2 se genera ya a partir de tiempo cero y crece rápidamente hasta un máximo, luego del cual decae. El resto de las señales no son posibles de distinguir desde el inicio del experimento y al parecer crecen a expensas del producto denominado como 2. En la figura 19 B se presenta la evolución a pH 3 y 80 °C, y el comportamiento de cada señal fue similar en todos los pH < 7, variando sólo la velocidad de aparición de cada una.

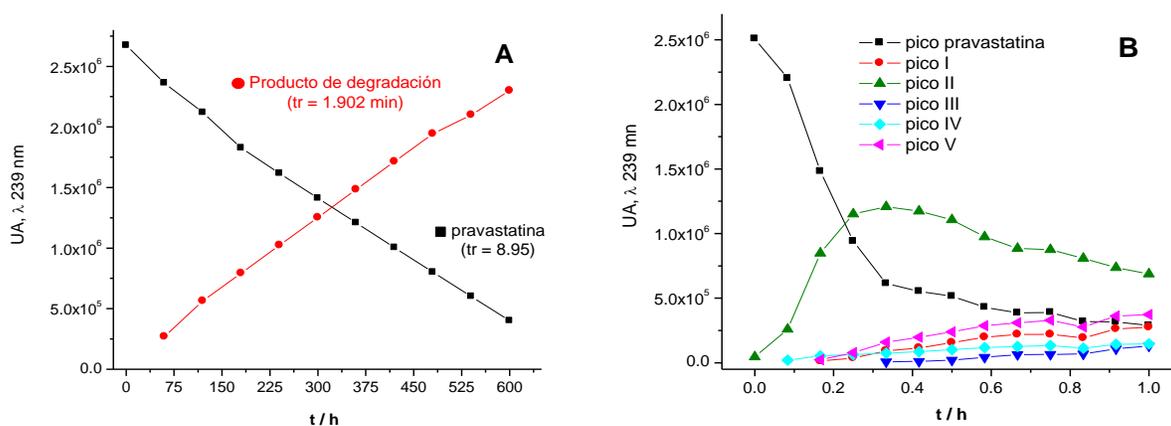
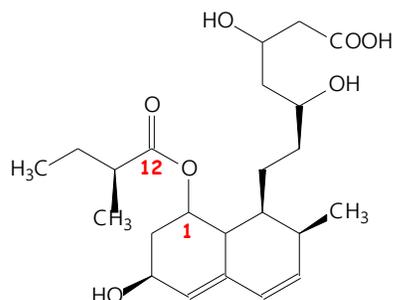


Figura 19. Evolución del decaimiento de pravastatina $1 \times 10^{-4} M$ y aparición de su(s) producto(s) de degradación a 80 °C. **A.** pH 12 **B.** pH 3.

Por otra parte, se intentó dilucidar la estructura de los productos de degradación, para lo cual se llevó a cabo la aislación de cada producto por cromatografía en capa fina y por recristalización. Los productos así obtenidos se analizaron a través de 1H -NMR, ^{13}C -NMR y FT-IR. En las figuras 20 y 21 se presentan los espectros 1H -NMR y ^{13}C -NMR para pravastatina y su producto de hidrólisis alcalina. En ellas es posible observar, con respecto a los espectros simulados computacionalmente, que existen cambios

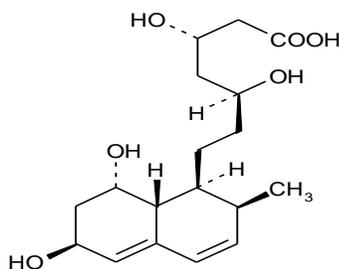
significativos en algunas zonas de los espectros. Con respecto a este punto y considerando la siguiente numeración para la estructura de la pravastatina:



Podemos observar en los espectros $^1\text{H-NMR}$ para hidrólisis alcalina, un corrimiento hacia campo alto de la señal del protón que acompaña al carbono 1, señalado como “a” en la figura 20, este corrimiento se produce de 5.4 ppm a 4.2 ppm al ser hidrolizada.

Por otra parte, con el fin de avalar la estructura propuesta para el producto de hidrólisis alcalina, se llevo acabo el espectro de $^{13}\text{C-NMR}$ para pravastatina y su producto de hidrólisis (figura 21). En ellos podemos observar un corrimiento de 175 ppm a 183 ppm correspondiente al carbono numerado como 12 en la estructura de la pravastatina, el cual luego de la hidrólisis se desplaza hacia campo bajo, a casi 100 ppm.

Luego de este análisis, la estructura propuesta para la hidrólisis alcalina de la pravastatina, debida a la escisión del enlace éster en su estructura, corresponde a:



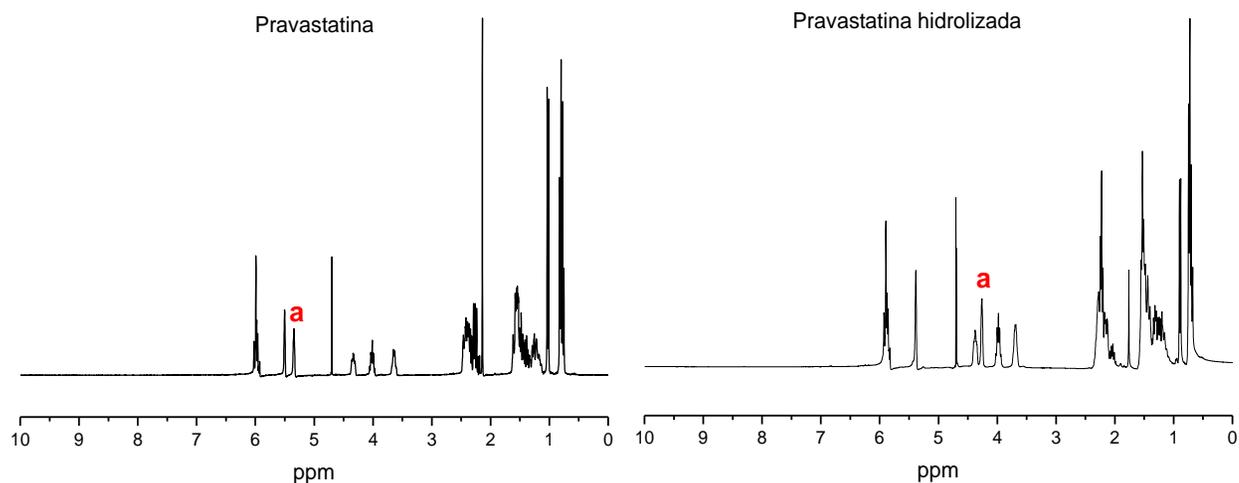


Figura 20. Espectros $^1\text{H-NMR}$ para pravastatina y su producto de hidrólisis alcalina, señalado como "a" el protón que acompaña al carbono 1.

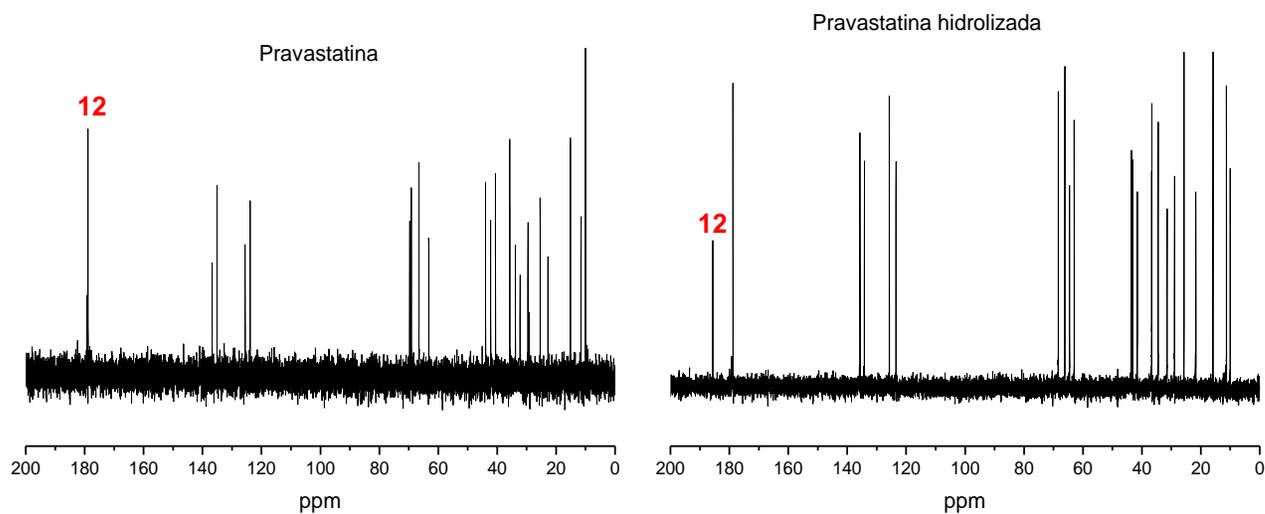


Figura 21. Espectros $^{13}\text{C-NMR}$ para pravastatina y su producto de hidrólisis alcalina. 12

ESTUDIOS DE REACTIVIDAD DE PRAVASTATINA

Se estudió la reactividad de pravastatina frente a radicales libres y peroxinitrito, como modelos predictivos de su estabilidad oxidativa tanto en preformulaciones como *in vivo*. Para dicho estudio se empleó como técnica la espectrofotometría UV-Visible y como generadores de radicales alquilo: ABAP+ N₂, radicales alquilperoxilo: ABAP + O₂, y ABTS (radicales ABTS^{•+}). Para evaluar la reactividad frente a peroxinitrito se empleó SIN-1.

La reactividad de pravastatina frente a peroxinitrito y radicales peroxilo y alquilo, se evaluó siguiendo la señal espectrofotométrica de pravastatina a 240 nm. Para determinar los cambios de concentración se empleó el método de la curva de calibración, la cual estuvo descrita por la ecuación: $A = 2.04 \times 10^{-2} [c] + 4.55 \times 10^{-3}$, $r = 0.9998$ (figura 22).

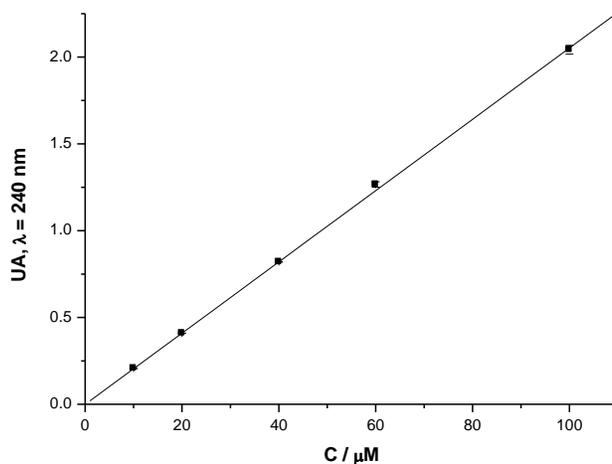


Figura 22. Curva de calibración para pravastatina para el rango de concentración 5–100 µM. Cada punto experimental representa el promedio de experimentos independientes y cada muestra se analizó por duplicado.

Previo a cada ensayo se evaluó la estabilidad de la pravastatina en las condiciones experimentales empleadas, a fin de que los cambios espectrofotométricos observados se debieran sólo a la interacción del fármaco con cada compuesto y no a la degradación natural de la pravastatina. En la figura 23 se presenta el control de pravastatina y su interacción frente a cada uno de los compuestos ensayados. Como puede observarse en la figura, pravastatina se mantiene estable durante el curso de los experimentos.

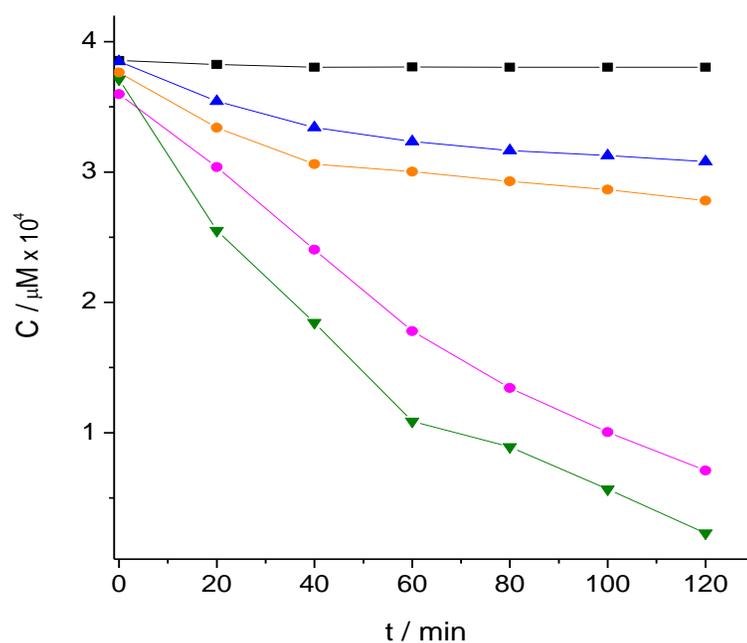


Figura 23. Control de pravastatina y su interacción frente a cada uno de los compuestos ensayados (■ control de pravastatina, ▲ peroxinitrito, ● ABTS*+, ● peroxilo, ▼ alquilo)

A partir de las gráficas de concentración vs tiempo, correspondientes al decaimiento de pravastatina frente a cada compuesto ensayado, se construyeron las gráficas de velocidad vs concentración inicial de pravastatina, a fin de encontrar las

concentraciones de pravastatina para simular un pseudo orden uno. Los resultados de estos estudios se encuentran en la figura 24.

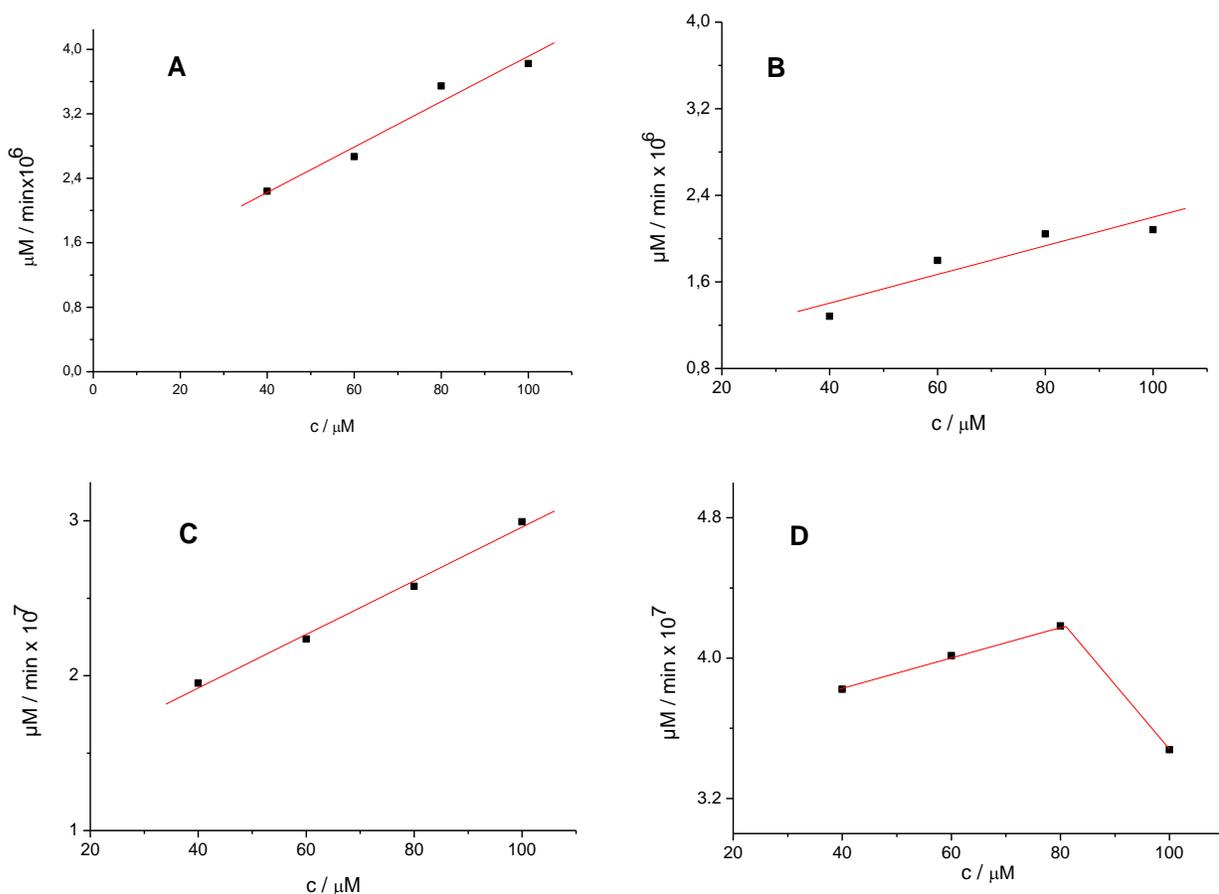


Figura 24. Gráficas de velocidad vs concentración inicial de pravastatina. **A.** radicales peroxilo, **B.** peroxinitrito, **C.** radicales alquilo, **D.** ABTS⁺

Como puede inferirse a partir de la figura 24, las concentraciones adecuadas de pravastatina para llevar a cabo los ensayos de reactividad se encuentran en el intervalo de 40 μM a 100 μM , excepto para el caso del ABTS en que sobre una concentración de pravastatina de 80 μM , la velocidad de reacción disminuye.

A. REACTIVIDAD FRENTE A RADICALES PEROXILO (ROO·)

En la figura 25 se presenta el curso temporal de los espectros UV de soluciones de pravastatina frente a radicales peroxilo. Se puede observar claramente la disminución significativa de la concentración inicial de pravastatina, medida a intervalos de tiempo de 20 min, durante 2 horas. Previamente se estableció que la pravastatina no presenta decaimiento natural en las condiciones ensayadas.

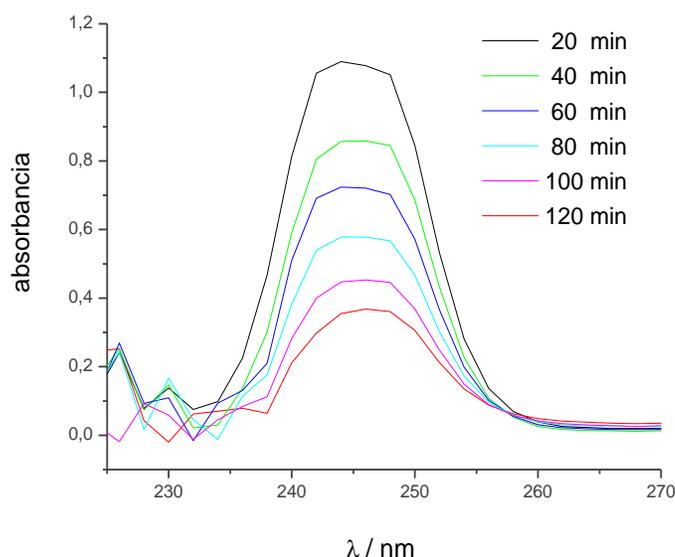


Figura 25. Curso temporal del espectro UV de pravastatina 80 µM, durante 2 horas, frente a radicales peroxilo

En la figura 26 se presentan las gráficas de decaimiento de pravastatina, a las distintas concentraciones estudiadas, frente a radicales peroxilo. Se puede observar que las rectas son paralelas hasta una concentración inicial de pravastatina de 40 µM, en consecuencia el cálculo de la constante de decaimiento promedio fue obtenido sin considerar esta concentración.

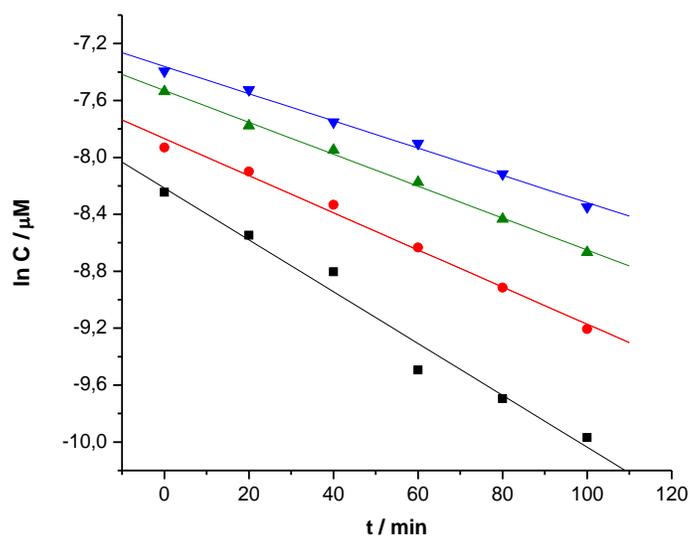


Figura 26. Decaimiento de pravastatina a distintas concentraciones iniciales (\blacktriangledown $100\mu\text{M}$, \blacktriangle $80\mu\text{M}$, \bullet $60\mu\text{M}$, \blacksquare $40\mu\text{M}$), frente a radicales peroxilo.

En la tabla 7 se presentan los parámetros de regresión de cada curva de decaimiento, para cada concentración inicial. Cabe mencionar que los resultados expuestos presentan un coeficiente de correlación adecuado, dando cuenta de una reacción de pseudo primer orden. De los resultados expuestos, se obtiene una constante promedio de $1.13 \times 10^{-2} \pm 1.75 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$.

Tabla 7. Parámetros de regresión de las curvas de decaimiento de pravastatina a distintas concentraciones frente a radicales peroxilo.

Concentración (μM)	Pendiente (k)	intercepto	coeficiente de correlación
40	1.80×10^{-2}	-8.232	0.984
60	1.31×10^{-2}	-7.867	0.996
80	1.12×10^{-2}	-7.294	0.998
100	9.60×10^{-3}	-7.360	0.996

B. REACTIVIDAD FRENTE A PEROXINITRITO (ONOO⁻)

En la figura 27 se presenta el curso temporal de los espectros UV de soluciones de pravastatina frente a peroxinitrito. Se puede observar claramente la disminución significativa de la concentración inicial de pravastatina, medida a intervalos de tiempo de 20 min, durante 2 horas.

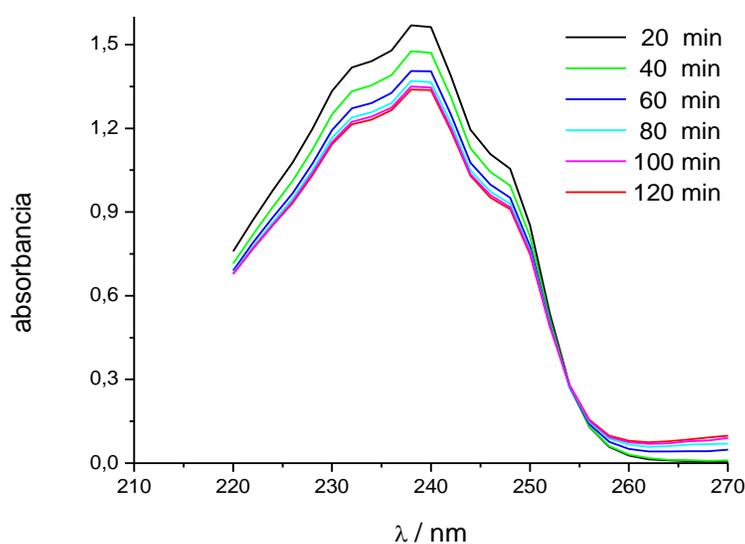


Figura 27. Curso temporal del espectro UV de pravastatina 80 μM, durante 2 horas, frente a peroxinitrito

En la figura 28 se presentan las gráficas de decaimiento de pravastatina, a las distintas concentraciones estudiadas, frente a peroxinitrito. Se puede observar paralelismo entre las rectas de decaimiento a todas las concentraciones ensayadas.

Por otra parte, en la tabla 8 se presentan los parámetros de correlación para las curvas de decaimiento de pravastatina frente a peroxinitrito. De los resultados obtenidos se obtiene una constante promedio de $2.68 \times 10^{-3} \pm 2.14 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$.

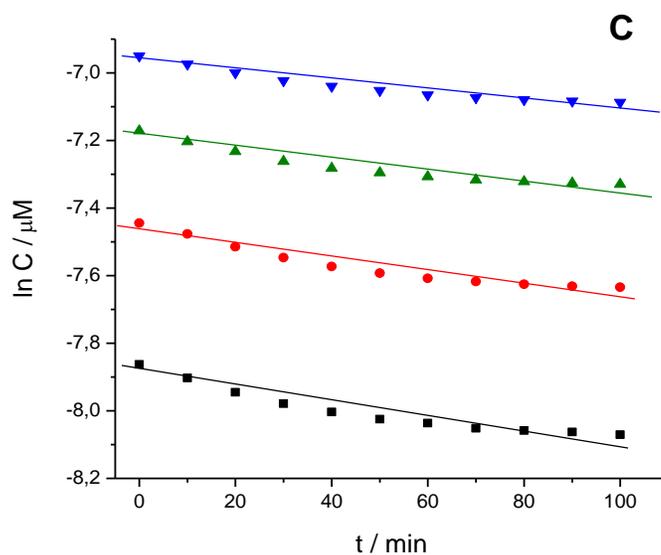


Figura 28. Decaimiento de pravastatina a distintas concentraciones iniciales (\blacktriangledown 100 μM , \blacktriangle 80 μM , \bullet 60 μM , \blacksquare 40 μM), frente peroxinitrito.

Tabla 8. Parámetros de regresión de las curvas de decaimiento de pravastatina a distintas concentraciones frente a peroxinitrito.

Concentración (μM)	Pendiente (k)	intercepto	coeficiente de correlación
40	2.90×10^{-3}	-7.871	0.990
60	2.83×10^{-3}	-7.448	0.994
80	2.45×10^{-3}	-7.177	0.990
100	2.56×10^{-3}	-6.953	0.993

C. REACTIVIDAD FRENTE A RADICALES ALQUILO

En la figura 29 se presenta el curso temporal de los espectros UV de soluciones de pravastatina frente a radicales alquilo. Se puede observar claramente la disminución significativa de la concentración inicial de pravastatina, medida a intervalos de tiempo de 20 min, durante 2 horas.

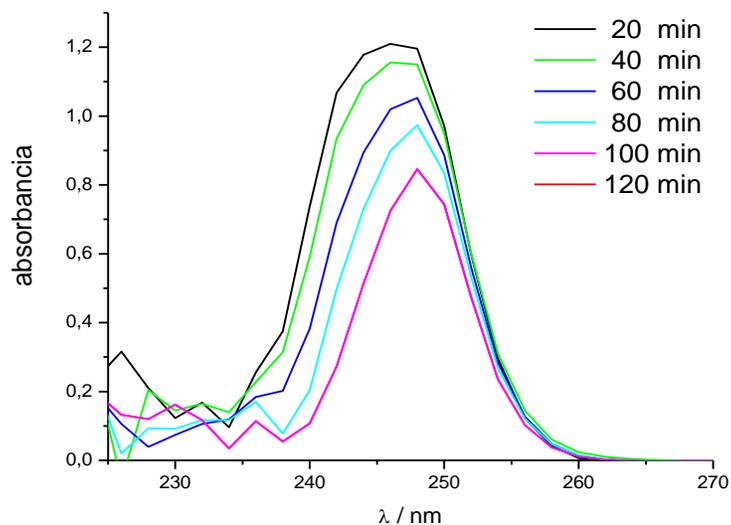


Figura 29. Curso temporal del espectro UV de pravastatina 100 μM, durante 2 horas, frente a radicales alquilo.

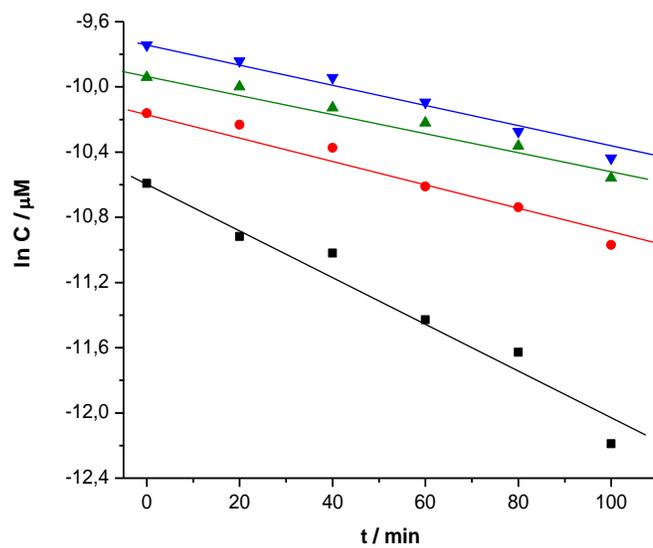


Figura 30. Decaimiento de pravastatina a distintas concentraciones iniciales (▼ 100 μM, ▲ 80 μM, ● 60 μM, ■ 40 μM), frente a radicales alquilo.

Al igual que en el estudio de reactividad frente a radicales peroxilo, en este caso el paralelismo entre las rectas de decaimiento se pierde a una concentración inicial de pravastatina de 40 μM (figura 30). Por tanto, el cálculo de la constante de decaimiento promedio fue obtenido sin considerar esta concentración. En la tabla 9 se presentan los parámetros de correlación para las curvas de decaimiento de pravastatina frente a radicales alquilo. De los resultados obtenidos se obtiene una constante promedio de $7.1 \times 10^{-3} \pm 1.1 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$.

Tabla 9. Parámetros de regresión de las curvas de decaimiento de pravastatina a distintas concentraciones frente a radicales alquilo.

Concentración (μM)	Pendiente (k)	intercepto	coeficiente de correlación
40	1.6×10^{-2}	-10.50	0.982
60	8.2×10^{-3}	-10.10	0.988
80	6.0×10^{-3}	-9.901	0.986
100	7.0×10^{-3}	-9.703	0.992

D. REACTIVIDAD FRENTE A ABTS^{•+}

A diferencia de los casos anteriores, para la evaluación de la reactividad de pravastatina frente a ABTS^{•+} se siguió el decaimiento de la señal espectrofotométrica del ABTS^{•+} a 734 nm. En la figura 31 se presenta el curso temporal de los espectros visibles de ABTS^{•+} frente a soluciones de pravastatina. Se puede observar claramente la disminución significativa de la concentración inicial de ABTS^{•+}, medida a intervalos de tiempo de 20 min, durante 2 horas.

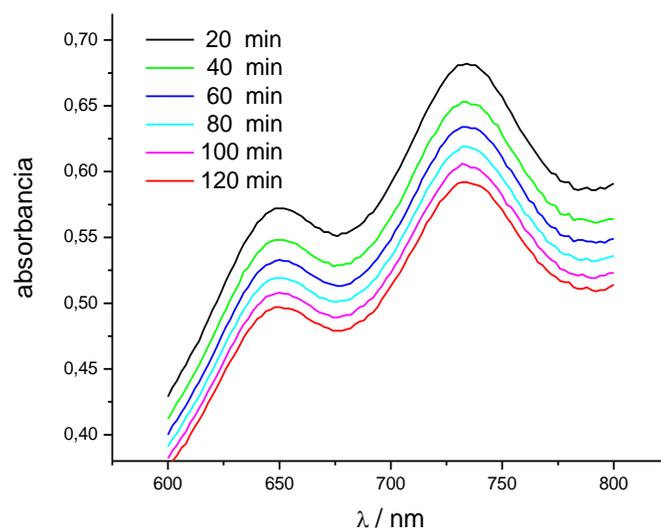


Figura 31. Curso temporal del espectro UV de pravastatina 80 μM, durante 2 horas, frente a ABTS^{•+}

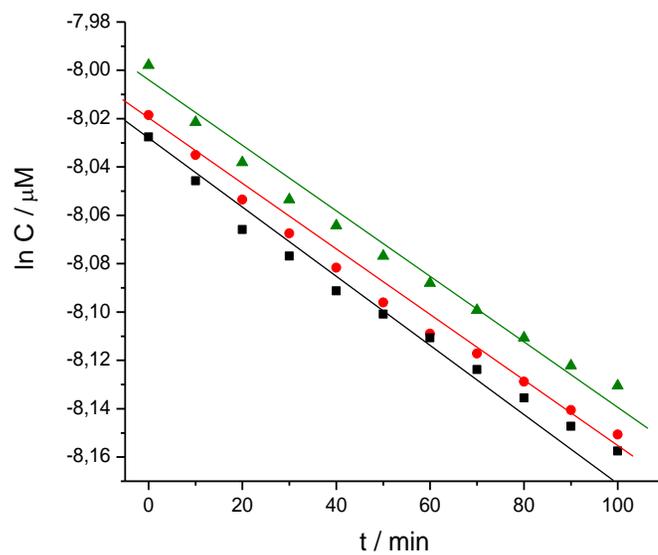


Figura 32. Decaimiento de pravastatina a distintas concentraciones iniciales (▲ 80 μM, ● 60 μM, ■ 40 μM), frente a ABTS^{•+}

En este caso, como se observa en la figura 32, no existen diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.005$) entre las pendientes de decaimiento a diferentes concentraciones iniciales. Cabe hacer notar que en el caso del ABTS se ensayaron sólo 3 concentraciones de pravastatina, de acuerdo a los resultados obtenidos previamente en los estudios de velocidad vs concentración inicial de pravastatina.

En la tabla 10 se presentan los parámetros de regresión de cada curva de decaimiento, en cada condición experimental. Cabe mencionar que los resultados expuestos presentan un coeficiente de correlación adecuado, dando cuenta de una reacción de pseudo primer orden. Por otra parte, para el cálculo de las constantes de velocidad promedio para el ensayo con ABAP + O₂ y ABAP + N₂, no se tomaron en cuenta los resultados de los valores a la concentración de 40 µM, debido a la pérdida del paralelismo. De los resultados obtenidos se obtiene una constante promedio de $1.2 \times 10^{-3} \pm 1.2 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$.

Tabla 10. Parámetros de regresión de las curvas de decaimiento de pravastatina a distintas concentraciones frente a ABTS^{•+}

Concentración (µM)	Pendiente (k)	intercepto	coeficiente de correlación
40	1.1×10^{-3}	-8.014	0.998
60	1.2×10^{-3}	-8.009	0.992
80	1.3×10^{-3}	-8.025	0.995

Al comparar los valores de las constantes de velocidad promedio se pudo llegar a establecer un orden de reactividad de pravastatina, frente a los distintos compuestos ensayados. Con respecto a lo expuesto anteriormente, podemos establecer que el orden de reactividad de pravastatina fue: *peroxilo* ($k=1.13 \times 10^{-2} \pm 1.75 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$) \geq *alquilo*

($k=7.07 \times 10^{-3} \pm 1.1 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$) > *peroxinitrito* ($k=2.68 \times 10^{-3} \pm 2.14 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$) \geq *ABTS* ($k=1.20 \times 10^{-3} \pm 1.2 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$).

De los valores de k obtenidos experimentalmente para pravastatina frente a radicales alquilo (en el orden de 10^{-3} min^{-1}), se puede decir que presentan una reactividad aproximadamente 10 veces mayor que fármacos dihidropiridínicos como nitrendipino y nimodipino, y análoga a Trolox^{29,30}.

E. COMPARACIÓN DE LA REACTIVIDAD DE PRAVASTINA VS ANÁLOGOS ESTRUCTURALES

Por otra parte, con el objetivo de evaluar la participación del anillo lactónico en la capacidad de reaccionar con los distintos radicales libres ensayados y peroxinitrito, se analizó la reactividad de fármacos de estructura análogas a pravastatina, pero de cadena cerrada, como son simvastatina y lovastatina. Además se realizó este mismo estudio de reactividad a sus derivados de hidrólisis (figura 33). En este sentido, se encuentran descritos en la literatura, las constantes de velocidad de abstracción de hidrógeno para estatinas de cadena lactónica, como lovastatina y simvastatina entre otras, para la reacción con radicales *tert*-butoxilo (modelos de radicales hidroxilo y alcohexilos) y radicales 1,1-difenil-2-picrilhidrazilos (modelos de radicales hidroperoxilo y peroxilos). Este estudio se realizó debido a que los inhibidores de la HMG-Coa reductasa contienen el sistema de enlaces naftenil dieno, potencialmente susceptible a la oxidación radicalaria²⁰.

Los resultados obtenidos de estos se muestran en las tablas 11 y 12; en ella se informan las constantes de velocidad promedio de la reacción frente a cada compuesto ensayado. En este sentido podemos decir que pravastatina es 0.5 mas reactiva con SIN-1

respecto a ABTS, en cambio, para el caso de ABAP+N₂ y ABAP+O₂, es 6 y 9 veces más reactiva que con ABTS, respectivamente.

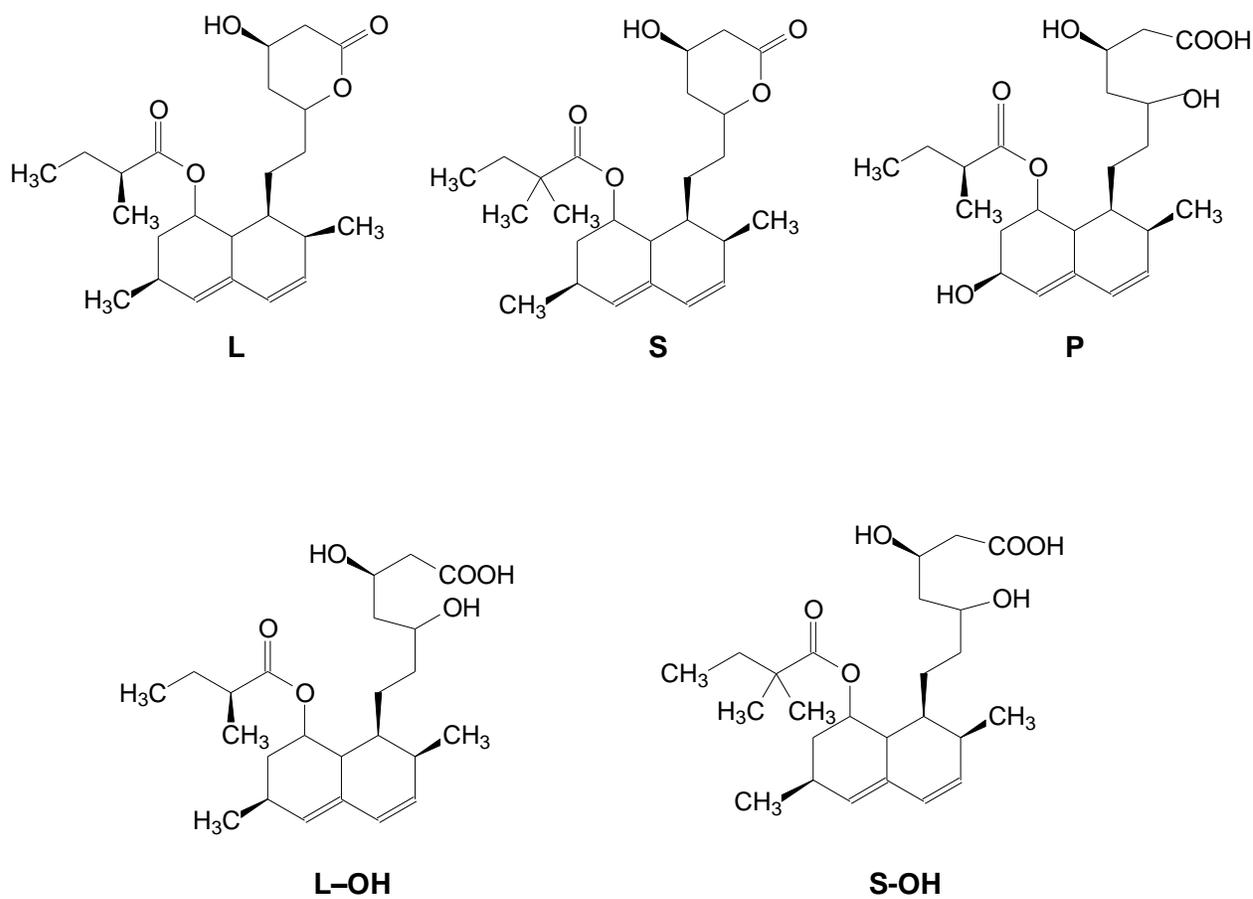


Figura 33. Estructuras de las estatinas de trabajo, lovastatina (L), simvastatina (S) y pravastatina (P), junto con los hidrolizados de lovastatina (L-OH) y simvastatina (S-OH).

Tabla 11. Valores de las constantes de velocidad de reacción para las distintas estatinas ensayadas a 35°C, con sus respectivas desviaciones estándares.

Generador	K promedio ± d.e. (min ⁻¹)		
	pravastatina	lovastatina	simvastatina
Peroxilo	1.13×10 ⁻² ±1.75×10 ⁻³	7.04×10 ⁻³ ±4.30×10 ⁻³	6.43×10 ⁻³ ±3.30×10 ⁻³
peroxinitrito	2.68×10 ⁻³ ±2.14×10 ⁻⁴	5.59×10 ⁻³ ±2.40×10 ⁻⁴	7.57×10 ⁻³ ±5.50×10 ⁻³
Alquilo	7.07×10 ⁻³ ±1.1×10 ⁻³	4.71×10 ⁻² ±4.32×10 ⁻²	6.36×10 ⁻² ±5.30×10 ⁻²
ABTS	1.20×10 ⁻³ ±1.2×10 ⁻⁴	6.11×10 ⁻³ ±3.50×10 ⁻³	8.24×10 ⁻³ ±2.30×10 ⁻³

Tabla 12. Valores de las constantes de velocidad de reacción para pravastatina y los hidrolizados de las distintas estatinas ensayadas a 35 °C, con sus respectivas desviaciones estándares.

Generador	K promedio ± d.e. (min ⁻¹)		
	pravastatina	Lovastatina-OH	Simvastatina-OH
Peroxilo	1.13×10 ⁻² ±1.75×10 ⁻³	1.21×10 ⁻² ±3.65×10 ⁻³	1.14×10 ⁻² ±2.70×10 ⁻³
Peroxinitrito	2.68×10 ⁻³ ±2.14×10 ⁻⁴	2.37×10 ⁻³ ±5.38×10 ⁻⁴	2.13×10 ⁻³ ±3.94×10 ⁻⁴
Alquilo	7.07×10 ⁻³ ±1.1×10 ⁻³	1.05×10 ⁻² ±2.91×10 ⁻³	8.33×10 ⁻³ ±4.25×10 ⁻³
ABTS	1.20×10 ⁻³ ±1.2×10 ⁻⁴	9.62×10 ⁻³ ±2.83×10 ⁻³	3.09×10 ⁻³ ±7.46×10 ⁻⁴

CONCLUSIONES

- ◆ El método implementado a través de HPLC fue adecuado y lo suficientemente selectivo para poder separar la señal cromatográfica de pravastatina y sus productos de hidrólisis, tanto para poder seguir su evolución en el tiempo, como realizar el estudio de estabilidad acelerada, siendo una herramienta útil para estudiar este tipo de degradación.
- ◆ Los parámetros analíticos del método cromatográfico desarrollado, para el fármaco en estudio, cumple con los requisitos analíticos, exhibiendo repetibilidad y reproducibilidad adecuadas, además de una recuperación superior al 98.5 %.
- ◆ La hidrólisis de pravastatina en todas las condiciones de temperatura y pH ensayadas presentan a una cinética de pseudo primer orden.
- ◆ La velocidad de degradación hidrolítica de pravastatina aumenta en forma significativa con la temperatura y la variación del pH, lo anterior se manifiesta tanto en los valores de las constantes cinéticas, como en la vida media y t_{90} para cada condición de pH y temperatura ensayada.
- ◆ La hidrólisis de pravastatina es pH-dependiente, siendo la reactividad en pH alcalino significativamente menor que hidrólisis en medios ácido, lo cual se ve reflejado en las constantes cinéticas encontradas para cada condición.
- ◆ Los valores E_a de pravastatina son dependientes del pH del medio.

- ◆ Los productos generados en el proceso de hidrólisis acelerada en todas las condiciones de pH y temperatura ensayadas presentan el mismo espectro UV que la pravastatina, evidenciando que la estructura cromófora (anillo hexahidronaftaleno) se mantiene inalterada, siendo las únicas modificaciones en la estructura química, la ruptura del enlace éster, la reesterificación y la relactonización de la molécula.
- ◆ La formación de los productos de degradación de la pravastatina es dependiente del pH, lo que se ve reflejado en la aparición de cinco señales, después de la señal de pravastatina, a pH 3, 5, 7, y una señal, antes de la aparición de la señal pravastatina, a pH 9 y 12.
- ◆ La velocidad de formación de los productos de degradación de la pravastatina es dependiente de la temperatura y del pH a la cual se efectúa la hidrólisis.
- ◆ Con respecto a la estabilidad de pravastatina, frente a los distintos radicales ensayados y peroxinitrito, fue posible estimar adecuadamente la reactividad de cada estatina espectrofotométricamente en un intervalo de lineal de concentraciones de 40 a 100 μM , excepto en el caso del ensayo con $ABTS^{\bullet+}$, en el cual no se considero la concentración de 100 μM .
- ◆ Todas las estatinas estudiadas presentaron reacción en distintos grados frente a radicales libres ensayados y peroxinitrito.

- ◆ El orden de reactividad para pravastatina frente a los compuestos ensayados fue:
 $peroxilo (k=1.13 \times 10^{-2} \pm 1.75 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}) \geq alquilo (k=7.07 \times 10^{-3} \pm 1.1 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}) >$
 $peroxinitrito (k=2.68 \times 10^{-3} \pm 2.14 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}) \geq ABTS^{\bullet+} (k=1.20 \times 10^{-3} \pm 1.2 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1})$.
- ◆ Frente al generador radicalario ABAP+O₂, es decir radicales peroxilo, el orden de reactividad para los compuestos ensayados fue: pravastatina \simeq lovastatina hidrolizada \simeq simvastatina hidrolizada > lovastatina > simvastatina.
- ◆ Simvastatina hidrolizada resultó ser aproximadamente 2 veces más reactiva que simvastatina ($k=1.14 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ vs $k=6.43 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$) frente a radicales peroxilo.
- ◆ Análogamente, lovastatina hidrolizada resultó ser aproximadamente 2 veces más reactiva que lovastatina ($k=1.21 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ vs $k=7.04 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$) frente a radicales peroxilo.
- ◆ Frente al generador radicalario SIN-1, es decir peroxinitrito, el orden de reactividad para los compuestos ensayados fue: pravastatina \simeq lovastatina hidrolizada \simeq simvastatina hidrolizada > lovastatina > simvastatina.
- ◆ Estos resultados parecen indicar la participación del anillo lactónico en la reactividad.

REFERENCIAS

- [1] R.S. Blumenthal, *Am. Heart J.* 139 (2000) 577.
- [2] Clarke's Analysis of Drugs and Poisons 2004. Consulting Editors: Anthony C Moffat, M David Osselton, Brian Widdop. Managing Editor: Laurent y Galichet. Pharmaceutical Press, 2004
- [3] B. A. Hamelin, J. Turgeon. *TiPS.* 19 (1998) 26.
- [4] G. Carlucci, P. Mazzeo. *Farmaco.* 47 (1992) 718.
- [5] N.Y. Coskun, S. Aycan, S. Sungur. *Pharmazie.* 52 (1997) 485.
- [6] United States Pharmacopoeia XXVIII/NF IXX. United States Pharmacopoeial Convention, Inc., Rockville M.D. USA, pp. 1083, 1084, 2000.
- [7] S. Bauer, J. Mwinyi, A. Stoeckle, T. Gerloff, I. Roots, *J. Chromatogr. B.* 818 (2005) 257–262
- [8] K. Otter, C. Mignat, *J. Chromatog. B.* 708 (1998) 235.
- [9] Z. Zhu , L. Neirinck, *J. Chromatogr. B.* 783 (2003) 133.
- [10] K. Kawabata, N. Matsushima, K. Sasahara, *Biomed. Chromatogr.* 12 (1998) 271.
- [11] H.Y. Pan, A.R. DeVault, D. Wang-Iverson, E. Ivashkive, B.N. Swanson, A.A. Sugerman, *J. Clin. Pharmacol.* 30 (1990) 1128.
- [12] D. Mulvana, M. Jemal, S. Coates Pulver, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 23 (2000) 851.
- [13] X.S. Miao, C.D. Metcalfe, *J. Chromatogr. A.* 998 (2003) 133.
- [14] M.J. Kaufman, *Pharm. Res.* 7 (1990) 289.
- [15] L.D. Hansen, E.A. Lewis, D.J. Eatough, R.G. Bergstrom, D. Jonson-DeGraft. *Pharm. Res.* 6 (1989) 20.
- [16] M.J. Kaufman. *Int. J. Pharm.* 66 (1990) 97.

- [17] T. Hatanaka, Y. Otaru, K. Katayama, T. Koizumi. *Arch. Pract. Pharm.* 58 (1998) 194.
- [18] A.S. Kearney, L.F. Crawford, S.C. Mehta, G.W. Radebaugh. *Pharm. Res.* 10 (1993) 1461.
- [19] G.B. Smith, L. DiMichele, L.F. Colwell, G.C. Dezeny, A.W. Douglas, *Tetrahedron.* 49 (1993) 4447.
- [20] S.B. Karki, V. Treemaneeekarn, M.J. Kaufman, Oxidation of HMG-CoA Reductase Inhibitors by tert-Butoxyl and 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl Radicals: Model Reactions for Predicting Oxidatively Sensitive Compounds During Preformulation. *J. Pharm. Sc.* 89 (2000) 1518.
- [21] United States Pharmacopoeia 27/NF 22 CD-ROOM. United States Pharmacopoeial Convention, Inc., Rockville M.D. USA, 2003.
- [22] A. Alvarez-Lueje, C. Valenzuela, J. A. Squella, L.J. Nuñez Vergara. *J. AOAC Int.* 88 (2005) 1631.
- [23] C. López-Alarcón, H. Speisky, J.A. Squella, C. Olea-Azar, C. Camargo, L.J. Núñez-Vergara. Reactivity of 1,4-dihydropyridines towards SIN-1-derived peroxy nitrite. (2004). *Pharmaceutical Research.* 21(10): 1750-1757.
- [24] V. Valenzuela, P. Santander, C. Camargo, J.A. Squella, C. López-Alarcón, L.J. Núñez-Vergara. 1,4-Dihydropyridines: Reactivity of nitrosoaryl and nitroaryl derivatives with alkylperoxyl radicals and ABTS radical cation. (2004). *Free Radical Research.* 38(7): 715-727.
- [25] O.A. Quattrocchi, S.A. de Andrizzi, R.F. Laba. Introducción a la HPLC, aplicación y práctica, 321-328 Editorial País. 1992.

- [26] M. Castro, S. Gascón, M. Pujol, J. Soms, L. Vicente; "Validación de Métodos Analíticos" Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria, Sección Catalana, Comisión de Normas de Buena Fabricación y Control de Calidad, pp 67-68, 90-93. 1989
- [27] A. Martin, P. Bustamante. Physical Pharmacy. Lea & Febiger Philadelphia, London. 4^o edición. 1993
- [28] K. Connors, G. Amidon, V. Stella. Chemical stability of Pharmaceuticals a Handbook for Pharmacist. Ed. A Wiley- Interscience Publication. 1986.
- [29] C. López-Alarcón, P. Navarrete, C. Camargo, J.A. Squella, L.J. Núñez-Vergara. Reactivity of 1,4-dihydropyridines towards alkyl, alkylperoxyl radicals and ABTS radical cation. (2003). Chemical Research in Toxicology. 16(2):208-215.
- [30] C. Yáñez, C. López-Alarcón, C. Camargo, V. Valenzuela, J. A. Squella, L.J. Núñez-Vergara Effects of C-4 and N-1 substitutions on the reactivity of commercial 1,4-dihydropyridines and other structural-related compounds towards alkylperoxyl radicals and ABTS radical cation. (2004). Bio-Organic in Medicinal Chemistry. 12(9): 2459-2468.