

00524
156



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

ESTUDIO DE UNION A PROTEINAS PLASMATICAS DE
CASIOPEINA III-I EN ALBUMINA, PLASMA DE RATA Y
PLASMA DE HUMANO.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

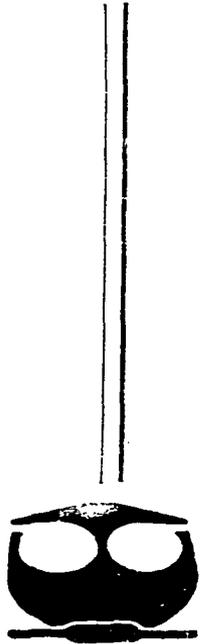
T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A :
SUSANA RODRIGUEZ SILVA



**EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA**

MEXICO, D. F.

2003





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Susana Rodríguez

Silva

FECHA: 07 Abril 03

FIRMA: [Signature]

Jurado asignado:

Presidente: M. En C. Inés Fuentes Noriega
Vocal: Sofía Margarita Rodríguez Alvarado.
Secretario: José Manuel Morales Hernández.
1er. Suplente: Liz Jannet Medina Reyes.
2º, Suplente: Luis Jesús García Aguirre.

Sitio donde se desarrollo el tema:

Laboratorio 112 y 113 de Biofarmacia, ubicado en el Conjunto E, Departamento de Farmacia, División de estudios de Posgrado, Facultad de Química, UNAM.

Asesor:



M. en C. Inés Fuentes Noriega.

Sustentante:



Susana Rodríguez Silva.

LEJIS CON
FALLA DE ORIGEN

DEDICADA A:

A Dios que me ha dejado gozar de salud, me ha dado la fuerza para levantarme de mis tropiezos y que ha permitido conocer a toda la gente que esta y ha estado a mi alrededor y que sin ellos no seria lo que soy.

A mis padres que con su confianza, cariño y apoyo sin escatimar esfuerzo alguno, me han convertido en persona de provecho, ayudando me al logro de una meta más: mi carrera profesional.

A mis hermanos Juana, América, María, Miguel y David, por que de muchas formas he recibido su apoyo.

A mis profesores, amigos, familiares, compañeros del trabajo.

A mis amigos de la jardinera: Maggye, Paty, Itzhel, Clau, Gabby, Jeymit, Oliver, Paco, Raúl, Ernesto y Héctor.

A CONACYT por el apoyo al Proyecto G-35012.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

*Gracias a ustedes:**

Hoy aprendí a ser feliz, a recordar en la noche todo lo bueno que haya pasado en el día.

Hoy aprendí a no recordar las cosas malas, a solo dárles la importancia debida en su momento y después olvidárlas.

Hoy aprendí que una sonrisa sí alegra un día, que si altera tu ánimo y te hace sentir bien.

Hoy aprendí a disfrutar el presente, porque nunca volverá a ser igual.

Hoy aprendí a omitir los comentarios que no sea necesario decir.

Hoy aprendí a no creer en los rumores.

Hoy aprendí a preocuparme únicamente en mi vida, y no inmiscuirme en la de los demás, A menos que me lo pidan.

Hoy aprendí a guardar mis opiniones para mi misma, a veces no es necesario que los demás las sepan.

Hoy aprendí a elegir a las personas en las que se puede confiar. Y de los que yo imaginaba, no son ni la mitad.

Hoy aprendí a escuchar las opiniones de los demás y respetárlas aunque no esté de acuerdo con estas.

Hoy aprendí la diferencia entre oír y escuchar. Ahora, solo escucho las cosas que quiero, las demás solo las oigo.

Hoy aprendí a controlar mis sentimientos y mis impulsos, aprendí a apacentar.

Hoy aprendí a reconocer mis errores y a pedir perdón.

Hoy aprendí que a veces ya es muy tarde para pedir perdón y me prometí a mi misma que nunca dejaría que volviera a suceder.

Hoy aprendí que todo mundo tiene sentimientos, aunque aparenten lo contrario.

Hoy aprendí a ponerme en el lugar de otra persona y ver sus puntos de vista. Al fin entendí el dicho "Nunca hagas lo que no quieres que te hagan a ti".

Hoy aprendí de aprovechar las cosas al máximo porque mañana las puedes perder. Y desgraciadamente lo aprendí perdiendo.

Hoy aprendí que una amistad puede ser la misma después de un perdón, pero nunca puede ser la misma después de haberla descuidado.

Hoy aprendí que soy mejor que miles de personas, pero millones son mejores que yo.

Hoy aprendí a ser firme en mis decisiones y a defenderlas.

Hoy aprendí que cualquier actitud es tomada en cuenta, que puedo lastimar y que debo cuidar aquellos pequeños detalles que se escapan.

Hoy aprendí a distinguir cuando alguien miente por sus ojos.

Hoy aprendí a fingir que creo cuando sé que están mintiendo.

Hoy aprendí a no juzgar a la gente por experiencias pasadas, sino a dárles la oportunidad que cada uno se merece.

Hoy aprendí que todos los hombres son diferentes, que a diferencia de lo que yo pensaba todos son completamente diferentes.

Hoy aprendí que hay algunas cosas que solo puedes probar con el tiempo.

Hoy aprendí que es mejor no hablar sino vas a decir algo bueno.

...SIS CON
FALLA DE ORIGEN

He aprendido a tratar a cada quien como se merece y no tener mal humor con alguien por culpa de otros.

He aprendido que el amor es lo más importante en la vida, pero no es lo único.

He aprendido a dar las prioridades necesarias según la ocasión.

He aprendido a no pensar tanto en el futuro y enfocarme en el presente.

He aprendido a no analizar todo lo que me dicen y solo aprenderlo.

He aprendido a dar segundas oportunidades.

He aprendido a valorar a la gente que realmente me quiere. Que aunque no sea mucha la gente que realmente me quiera, mucha es la gente que me aprecia.

He aprendido que con esos 4 que realmente me quieren es suficiente para ser feliz y sentirme querida.

He aprendido a ayudar a la gente por satisfacción propia y no por recompensa futura.

He aprendido a no esperar mucho de la gente, es mejor esperar poco y recibir sorpresas que esperar mucho y desilusionarse después.

He aprendido a confiar en la gente. Una vez, pero dos ya no.

He aprendido que no todas piensan igual que yo.

He aprendido a dar las gracias sin tener que hablar.

He aprendido que las oportunidades pocas veces se repiten.

He aprendido a disfrutar de lo que me hace feliz.

He aprendido a soñar y a tener ilusiones, pero también a no creer que la vida es como un sueño.

He aprendido que dar todo por alguien no está mal, está mal solo cuando ese alguien no corresponde, no agradece lo que haces.

He aprendido que no importa que tanto creas conocer a alguien, nunca pienses que lo conoces lo suficiente.

He aprendido a no juzgar a las personas antes de conocerlas.

He aprendido que llegar a tus metas por estúpidas que parezcan realmente te hace sentir mejor.

He aprendido a no hablar con rodeos y decir las cosas claramente, como me gustaría que me las dijeran a mí.

He aprendido a tratar de dar lo que la gente espera de mí.

He aprendido muchas cosas y le quiero agradecer a las personas que ya sea con una buena o mala experiencia o quizá hasta inconscientemente me ayudaron a darme cuenta de esto.

* Pensamiento que un día me llegó por correo electrónico, de no recuerdo quién.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

F

INDICE

LISTA DE FIGURAS.....	1
LISTA DE TABLAS.....	3
1.0 INTRODUCCIÓN	
1.1 INTRODUCCIÓN.....	5
1.2 OBJETIVOS.....	7
2.0 GENERALIDADES	
2.1 INTRODUCCIÓN.....	9
2.2 CASIOPEINA III-I.....	10
2.3 UNIÓN A PROTEÍNAS PLASMÁTICAS.....	13
2.4 CINÉTICA DE LA UNIÓN A PROTEÍNAS.....	15
2.5 DIALISIS AL EQUILIBRIO.....	18
2.6 CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN.....	20
3.0 PARTE EXPERIMENTAL	
3.1 EQUIPO.....	25
3.2 REACTIVOS.....	25
3.3 SOLUCIONES.....	26
3.4 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES.....	26
3.5 CONDICIONES CROMATOGRAFICAS.....	26
3.6 DETERMINACIÓN DEL TIEMPO DE EQUILIBRIO Y LA UNIÓN A LA MEMBRANA.....	27
3.6.1 PREPARACIÓN DE LA MEMBRANA.....	27
3.6.2 TIEMPO DE EQUILIBRIO Y UNIÓN A LA MEMBRANA.....	28
3.7 UNIÓN A PROTEÍNAS PLASMÁTICAS EN PLASMA DE HUMANO Y PLASMA DE RATA.....	29
3.7.1 MÉTODO ANALÍTICO PAA CUANTIFICAR CASIOPEINA III-I.....	29

4.0 RESULTADOS

4.1 REVALIDACIÓN.....	32
4.1.1 REPETIBILIDAD	32
4.1.2 LINEARIDAD	32
4.1.3 SELECTIVIDAD	35
4.2 DETERMINACIÓN DEL TIEMPO DE QUILIBRIO	39
4.3 UNIÓN A LA MEMBRANA	40
4.4 UNIÓN A PROTEINAS PLASMATICAS EN PLASMA DE RATA Y PLASMA DE HUMANO	40
5.0 ANALISIS DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES	45
6.0 BIBLIOGRAFIA	49

TESIS CON
FALLA DE ORICEN

Índice de figuras

Figura 1	Estructura de la Casiopeína III-i.	12
Figura 2	Principio de diálisis al equilibrio.	19
Figura 3	Dializador Spectrum 5-cell.	19
Figura 4	Esquema de un equipo cromatográfico.	21
Figura 5	Dializador Spectrum 5-cell.	28
Figura 6	Diagrama de flujo de la metodología utilizada.	30
Figura 7	Linealidad de la Casiopeína III-i en solución amortiguadora 0.064M pH = 7.4, considerando el área como respuesta cromatográfica.	33
Figura 8	Linealidad de la Casiopeína III-i en plasma de rata, considerando el área como respuesta cromatográfica.	33
Figura 9	Linealidad de la Casiopeína III-i en plasma de humano, considerando el área como respuesta cromatográfica.	34
Figura 10	Linealidad de la Casiopeína III-i solución al 4% en albúmina humana, considerando el área como respuesta cromatográfica.	34
Figura 11	Cromatograma del blanco de la solución amortiguadora 0.064M pH = 7.4.	35
Figura 12	Cromatograma de la Casiopeína III-i 10 µg/ml en solución amortiguadora 0.064M pH = 7.4.	35
Figura 13	Cromatograma del blanco de plasma de humano.	36

Figura 14	Cromatograma de la Casiopeína III-i en plasma de humano.	36
Figura 15	Cromatograma del blanco de plasma de rata.	37
Figura 16	Cromatograma de la Casiopeína III-i en plasma de rata.	37
Figura 17	Cromatograma del blanco de albúmina humana.	38
Figura 18	Cromatograma de la Casiopeína III-i en albúmina humana.	38
Figura 19	Determinación del tiempo de equilibrio de la Casiopeína III-i en solución amortiguadora de fosfatos 0.064 m pH = 7.4.	39
Figura 20	Unión a proteínas plasmáticas de la Casiopeína III-i en plasma de rata.	42
Figura 21	Unión a proteínas plasmáticas de la Casiopeína III-i en plasma de humano.	42
Figura 22	Unión a proteínas plasmáticas de la Casiopeína III-i en albúmina humana.	43
Figura 23	Comparación de grado de unión a proteínas plasmáticas de la Casiopeína III-i en cada uno de los fluidos biológicos trabajados.	43

TESIS CON
FALLA DE ORICEN

Lista de tablas

Tabla 1	Principales causas de mortalidad general. Estados unidos mexicanos, 1999.	9
Tabla 2	Comparación entre la diálisis al equilibrio y ultrafiltración.	18
Tabla 3	Soluciones de trabajo para la curva patrón.	27
Tabla 4.	Resultados de la repetibilidad del sistema.	32
Tabla 5.	Resultados de la linealidad del sistema.	32
Tabla 6.	Resultados de la determinación del tiempo de equilibrio de la Casiopeína III-i en solución amortiguadora de fosfatos 0.064 m pH = 7.4	39
Tabla 7.	Resultados de la determinación del porcentaje de unión a la membrana de la Casiopeína III-i en solución amortiguadora de fosfatos 0.064 m pH = 7.4.	40
Tabla 8.	Resultados de la determinación del porcentaje de unión a la membrana de la Casiopeína III-i en solución plasma de humano.	40
Tabla 9.	Resultados de la determinación del porcentaje de unión a la membrana de la Casiopeína III-i en solución plasma de rata.	41
Tabla 10.	Resultados de la determinación del porcentaje de unión a la membrana de la Casiopeína III-i en solución albúmina humana al 4%.	41
Tabla 11.	Resultados de la determinación del tiempo de equilibrio de la Casiopeína III-i en solución amortiguadora de fosfatos 0.064 m pH =7.4.	41



1.0 INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1.1 INTRODUCCIÓN.

El desarrollo de nuevos fármacos requiere de una interacción multidisciplinaria entre investigadores para así contar con moléculas con potencial farmacológico a las cuales se les efectuó las pruebas que determinen su eficacia, bio-disponibilidad, seguridad y mecanismo de acción.

Es importante, durante el desarrollo del estudio preclínico de las Casiopeínas, determinar las propiedades biofarmacéuticas inherentes al fármaco y a la forma de dosificación que será utilizada durante la etapa clínica.

En la facultad de química a finales de la década de los 70's bajo la dirección de la Doctora Lena Ruiz Azuara fueron sintetizadas las Casiopeínas que es una familia de más de cien complejos inorgánicos que contienen metales como el Cobre (II) y con un ligante bidentado del tipo diiminas (N-N) con aminoácidos (N-O) o donadores (O-O). Durante la década de los 80's se comprobó la actividad antitumoral de algunos compuestos de esta familia en ensayos *in vivo* y posteriormente en 1992 fueron patentados. La Casiopeína III-i ((Cu(4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina) (acetilacetionato)) (NO₃) se encuentra en etapa preclínica con alto potencial antineoplásico en líneas de carcinoma cérvico-uterino (SiHa y HeLa), carcinoma de mama (MCF7), Leucemia promielocítica (HL60), así como se ha aplicado como tratamiento es especies animales como ratón, gato y perro.

La unión a proteínas plasmáticas es parte complementaria de los estudios farmacocinéticos, por lo tanto es de gran importancia conocer esta unión ya que nos sirve para seleccionar el régimen de dosificación de un fármaco.

La unión de un fármaco a proteínas plasmáticas, puede ser determinada por la técnica de diálisis al equilibrio. Esta técnica sirve para la separación de las moléculas por medio de una membrana semipermeable. Esta separación depende del peso molecular de la molécula.

En este caso se estudio se realizo en plasma de humano, plasma de

rata y albúmina humana, para obtener una comparación entre especies animales y a su vez confirmar en cual de las proteínas presentes en el plasma en mayor proporción (albúmina y α -glicoproteína) se une la Casiopeína III-i, así como, conocer el comportamiento de la Casiopeína III-i *in vitro* y obtener una mejor correlación en fluidos biológicos.

El estudio se realizó con la Casiopeína III-i a concentraciones de 12, 25 y 50 $\mu\text{g/ml}$ en plasma de humano, plasma de rata y albúmina humana por el método de diálisis al equilibrio a 37°C , 16 rpm con un tiempo de equilibrio de 5 horas y solución amortiguadora 0.064 M pH = 7.4; las muestras fueron cuantificadas por el método de CLAR. La unión a proteínas en plasma de humano a una concentración de 12 $\mu\text{g/ml}$ fue de 89 %, a una concentración de 25 y 50 $\mu\text{g/ml}$ fue de 76 %, en plasma de rata a concentración de 25 $\mu\text{g/ml}$ fue de 48 % y a concentraciones de 50 $\mu\text{g/ml}$ fue de 58 % y en albúmina humana a concentraciones de 25 $\mu\text{g/ml}$ fue de 30% y a concentraciones de 50 $\mu\text{g/ml}$ fue del 38%.

En plasma de humano el % de unión a proteínas es mayor que en plasma de rata y los dos anteriores son mayores que en albúmina humana, lo que permite concluir que la mayor cantidad de Casiopeína III-i se une en mayor proporción a α -glicoproteína y componentes sanguíneos.

1.2 OBJETIVOS

OBJETIVOS GENERALES

- Determinar el grado de unión a proteínas de la Casiopeína III-i por el método de diálisis al equilibrio en plasma de rata, plasma de humano y albúmina humana.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Cuantificar la Casiopeína III-i por el método de cromatografía de alta resolución.
- Realizar la revalidación parcial del método reportado por Fuentes-Noriega et al., en para la determinación de la Casiopeína III-i en plasma de rata, plasma humano y albúmina humana.
- Determinar el porcentaje de unión a la membrana de la Casiopeína III-i.
- Determinar el tiempo de equilibrio de diálisis de la Casiopeína III-i en solución amortiguadora de fosfatos 0.064 M pH =7.4.
- Determinar la unión a proteínas de la Casiopeína III-i por el método de diálisis al equilibrio en albúmina humana, plasma de rata y plasma de humano.

2.0

GENERALIDADES

2.1 INTRODUCCIÓN

El cáncer comienza cuando una célula ha perdido sus mecanismos de control generando el crecimiento descontrolado. Todas las células del organismo pueden sufrir este descontrol en el crecimiento, formando una masa de tejido canceroso que genera invasividad y metástasis. La tabla No 1 muestra estadísticas de 1999 en donde el cáncer es la segunda causa de muerte en México. (1)

Tabla 1.-Principales Causas de Mortalidad General. Estados Unidos Mexicanos, 1999.

No. de Orden	C a u s a	Defunciones	Tasa * 1/
	Total	443,950	452.4
1	Enfermedades del corazón	69,278	70.6
	- Enfermedades isquémicas del corazón	44,070	44.9
2	Tumores malignos	53,662	54.7
3	Diabetes mellitas	45,632	46.5
4	Accidentes	35,690	36.4
	- Accidentes de tráfico de vehículos de motor	11,659	11.9
5	Enfermedades del hígado	27,040	27.6
	- Enfermedad alcohólica del hígado	13,417	13.7
6	Enfermedades cerebrovasculares	25,836	26.3
7	Ciertas afecciones originadas en el período perinatal	19,268	19.6
	- Dificultad respiratoria del recién nacido y otros trastornos respiratorios originados en el período perinatal	10,042	10.2
8	Influenza y Neumonía	14,068	14.3
9	Agresiones (homicidio)	12,249	12.5
10	Enfermedades pulmonares obstructivas crónicas	11,319	11.5

* 1/ Tasa por 100,000 habitantes.
Fuente: INEGI, SSA/DGEI, 1999.

Las células de cáncer se desarrollan a partir de células normales en un proceso denominado transformación. El primer paso en el proceso es la iniciación en el cual el material genético de la célula sufre un daño por causa de un carcinógeno que la prepara para transformarse en cancerosa. El paso de la promoción es cuando una célula que ha iniciado su cambio se transforma en cancerosa. Cuando una célula se ha convertido ya en cancerosa el sistema inmunitario puede, a menudo destruirla antes de que se reproduzca y se establece como un cáncer.

El cáncer puede ser causado por agentes físicos, químicos y biológicos. Estos agentes alteran o dañan el DNA produciendo cambios que conducen a la formación de un adenoma (tumor benigno). Un oncogen hace que el adenoma crezca activamente.

Los factores de riesgo del cáncer han cambiado con el paso del tiempo. Algunos cánceres que eran corrientes se han convertido en raros. (1, 2, 3, 4, 5)

2.2 CASIOPEÍNA III-I. (1.2, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13)

Antes de que un medicamento llegue al mercado es necesario que este pase por una larga etapa de investigación. Los requisitos para que un medicamento sea aceptado por la Secretaría de Salud son divididas en tres rubros:

Parte farmacéutica
Parte farmacología y
Parte biofarmacéutica.

La parte farmacéutica solicita toda la información química acerca del fármaco y de la forma farmacéutica.

La parte farmacología incluye las fases de estudio preclínica y clínica (Fase I, Fase II y Fase III).

La parte biofarmacéutica incluyen los estudios de biodisponibilidad y bioequivalencia.

Para la obtención de compuestos con posible actividad antineoplásica, se han considerado complejos que tengan metales con toxicidad relativamente baja, y que su estado de oxidación sea similar al de los metales que se encuentra en los fluidos biológicos y que posee un número de coordinación alto. Por otro lado los ligantes deben tener la capacidad de formar quelatos y cierto grado de hidrofobicidad e hidrofiliidad. Según las características mencionadas de los compuestos en términos de solubilidad, potencial electroquímico, capacidad de transporte a través de las membranas y estabilidad, se pretende entre otras posibilidades, que el mecanismo de actividad sea por interacción con el DNA.

En la actualidad existen numerosos fármacos antineoplásicos de origen orgánico e inorgánico, pero la existencia de tumores refractarios a estos tratamientos, la elevada toxicidad y alto costo estimula la búsqueda de nuevas moléculas que mejoren estas características. Además de las causas anteriores la razón para la búsqueda de nuevos compuestos está basada en el deseo de encontrar compuestos con:

1. Ausencia de resistencia cruzada al cisplatino
2. Un espectro más amplio de actividad, particularmente en áreas clínicas donde el cisplatino no ha demostrado efectos terapéuticos significativos.
3. Mayor actividad antitumoral.
4. Disminución de efectos eméticos y renales.
5. Sinergismo en terapias combinadas.

En la facultad de química a finales de la década de los 70's bajo la dirección de la Doctora Lena Ruiz Azuara fueron sintetizadas las Casiopeínas que es una familia de más de cien complejos inorgánicos que contienen metales como el Cobre (II) y con un ligante bidentado del tipo diiminas (N-N) con aminoácidos (N-O) o donadores (O-O). Son compuestos de coordinación análogos al cisplatino, que se diseñaron considerando diferentes parámetros y propiedades químicas como son: el metal su estado de oxidación, número de coordinación del metal, propiedades de solubilidad, potencial electroquímico, capacidad de transporte a través de las membranas y estabilidad del mismo.

Durante la década de los 80's se comprobó la actividad antitumoral de algunos compuestos de esta familia en ensayos *in vivo* y posteriormente en 1992 fueron patentados.

La Casiopeína III-I ((Cu(4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina) (acetilacetionato)) (NO₃) se encuentra en etapa preclínica con alto potencial antineoplásico en líneas de carcinoma cérvico-uterino (SiHa y HeLa), carcinoma de mama (MCF7), Leucemia promielocítica (HL60) y actividad antineoplásica de crecimiento tumoral en ratón desnudo atímico (aplasia congénita hereditaria del timo). Así como algunos estudios indican que no causan daños teratogénicos a ratones preñadas en dosis bajas.

El posible mecanismo de acción se cree que es debido a planaridad en la geometría de la molécula y el ligante diimina con carácter hidrofóbico que le confiere la posibilidad de actuar como intercalante a través de interacciones con las bases púricas y pirimidicas del DNA y el

ligante cargado le confiere, una polaridad necesaria para el transporte de la molécula. El centro metálico por su parte, participa en ciclos redox para liberar especies reactivas de oxígeno que oxidan al DNA dando como resultado daño irreparable en su estructura.

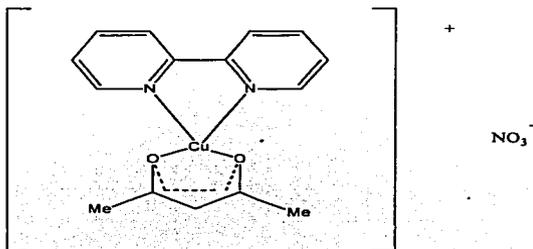


Figura 1. Estructura de la Casiopeína III-I.

Los estudios de toxicidad han permitido obtener la DL₅₀ de 24.68 mg/kg por vía Intrapertoneal.

Los estudios farmacocinéticos indican las siguientes propiedades físicas y farmacocinéticos:

- Soluble en agua y metanol.
- Estable en soluciones fisiológicas.
- Tiene un pKa de 8.25 y un coeficiente de partición de 0.01364.
- Farmacocinética en ratas:
 - Área bajo la curva (ABC) de 22277.14 µg/ml, min.
 - Tiempo de vida media (t_{1/2}) de 12.47 hr;
 - Cmax : 157.37 µg/ml
 - Depuración (Cl) de 0.000115 µg/min;
 - Tiempo de vida media de residencia (TMR) de 7.15 hrs;
 - Volumen de distribución aparente de 0.118 L;

- Farmacocinética en conejos:
 - Área bajo la curva (ABC) de 29820.78 $\mu\text{g/ml}\cdot\text{min}$.
 - Tiempo de vida media ($t_{1/2}$) de 22.8 hrs;
 - C_{max} : 15.11 $\mu\text{g/ml}$
 - Depuración (Cl) de 0.00443 $\mu\text{g/min}$;
 - Tiempo de vida media de residencia (TMR) de 32.73 hrs;
 - Volumen de distribución aparente de 8.69 L;

- Farmacocinética en perros:
 - Área bajo la curva (ABC) de 451149.77 $\mu\text{g/ml}, \text{min}$.
 - Tiempo de vida media ($t_{1/2}$) de 246.7 hrs;
 - C_{max} : 88.76 $\mu\text{g/ml}$
 - Depuración (Cl) de 9×10^{-5} $\mu\text{g/min}$;
 - Tiempo de vida media de residencia (TMR) de 352.16 hrs;
 - Volumen de distribución aparente de 1.91 L;

2.3 UNIÓN A PROTEÍNAS PLASMÁTICAS. (15, 16, 17, 18, 19, 20, 23, 24)

La unión de fármacos a proteínas tiene una gran influencia en su comportamiento farmacocinético y farmacodinámico ya que solamente la fracción libre se encuentra en disposición de cumplir con su efecto terapéutico.

Una vez que el fármaco llega a circulación sistémica, se produce una distribución del mismo en las células sanguíneas, proteínas plasmáticas y agua plasmática. Solamente la fracción libre del fármaco se encontrará en disposición de abandonar el espacio vascular para difundir al espacio extravascular y alcanzar los distintos órganos y tejidos, donde se fijará con mayor o menor intensidad a las proteínas u otros componentes tisulares.

La interacción más importantes se produce a nivel de proteínas plasmáticas, las cuales se pueden fijar a moléculas de fármacos, principalmente mediante uniones físicas reversibles tales como puentes de hidrogeno o fuerzas de Van der Waals. La unión irreversible de un fármaco a una proteína plasmática es menos frecuente y se produce como consecuencia de una activación química del fármaco que se une a proteínas mediante un enlace covalente.

El plasma humano contiene más de 60 proteínas de las cuales las más importantes desde el punto de vista de la fijación de fármacos son:

- a) **Albumina:** es la más abundante y la máxima responsable de la fijación de fármacos. El 40 % de plasma es albúmina, además esta proteína se encuentra distribuido extravascularmente. En condiciones normales los niveles plasmáticos de albúmina son de 35-45 g/L. Aunque la albúmina fija una gran variedad de fármacos, desempeña un papel fundamental en la fijación de fármacos neutros y ácidos débiles.

Se han descrito cuatro sitios de unión en la molécula de albúmina plasmática:

Sitio I. A él se unen fármacos de estructura diversas tales como la warfarina, fenilbutazona, etc.

Sitio II. Se unen el diazepam y los ácidos carboxílicos.

Sitio III. El tercer sitio de unión corresponde al tamoxifeno

Sitio IV. El cuarto sitio es el que corresponde a la digitoxina.

También hay sustancias endógenas que se pueden unir a la albúmina y competir por los mismos sitios de unión de algunos fármacos.

- b) **α -glicoproteína.** Es la más pequeña de las proteínas plasmáticas. Es una glicoproteína ácida con peso molecular de 41 000 Dalton y un gran contenido de ácido siálico, lo que proporciona la naturaleza ácida y un bajo pKa. Su concentración oscila entre 0.4-1.0 g/L, produciéndose un aumento cuando existe un proceso inflamatorio, un proceso maligno, estrés y disminuyendo en caso de trastornos hepáticos o renales.
- c) **Lipoproteínas** son moléculas de gran tamaño, sobrepasa los 2500000 Daltons para las β /lipoproteínas. Contiene cantidades importantes de lípidos. La cantidad plasmática es variable. A estas proteínas se fijan principalmente en fármacos liposolubles, con elevado volumen de distribución y generalmente de naturaleza básica.
- d) **Globulinas.** Las α , β y γ globulinas constituyen un grupo importante de proteínas con capacidad para fijar fármacos. Las α y β globulinas presentan una fuerte afinidad por numerosas sustancias endógenas y por las exógenas de estructura similar, la γ globulina reacciona específicamente con antígenos.

2.4 CINÉTICA DE LA UNIÓN A PROTEÍNAS. (15, 16, 17)

La unión reversible de los fármacos a las proteínas requiere por lo general que la conformación original de la proteína no es alterada.

La fijación a proteína sigue en general la ley de acción o de equilibrio químico, es decir existe, existe un equilibrio reversible entre la forma libre y la forma ligada que constituye una forma de almacenamiento plasmático.

La ley de acción de masas dice que la velocidad de una reacción química a una temperatura dada es directamente proporcional a las concentraciones de las sustancias que reaccionan.

Cuando la unión a proteínas es reversible, la cantidad de un fármaco unido actúa como un depósito del cual se va liberando lentamente el fármaco activo y reemplazando al que es eliminado.

La cinética de la unión reversible de fármacos a proteínas puede describirse como sigue:



[P]: concentración molar de la proteína libre.

[F]: concentración molar del fármaco libre.

[PF]: concentración molar del complejo fármaco-proteína.

K₁: constante de asociación del complejo fármaco-proteína.

K₂: constante de disociación del complejo fármaco-proteína.

Cuando se alcanza el equilibrio se tiene que:

$$K_{eq} = \frac{[PF]}{[P][F]} \dots\dots(2)$$

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Siendo K_a la constante de afinidad que se define como el cociente entre k_1 y k_2 .

$$K_a = \frac{k_1}{k_2} \dots\dots(3)$$

La magnitud de la constante de afinidad (k_a) proporciona información sobre el grado de unión del fármaco a la proteína.

La cantidad de complejo fármaco-proteínas formado es dependiente de la constante, K_a y la magnitud de esta corriente proporciona información acerca del grado de unión.

Los fármacos que están fuertemente unidos a proteínas tienen un K_a grande y está en su mayor parte en forma de complejo. Con este tipo de fármacos es necesaria una dosis mayor para obtener una concentración terapéutica del fármaco libre.

Todos los fármacos saturan los sitios de acción a concentraciones suficientemente altas. A concentraciones todavía más altas todo el fármaco adicional sigue libre, así que la fracción unida disminuye. Por el contrario conforme el fármaco es eliminado del cuerpo la fracción unida tiende a incrementar y el grado en lo que lo haga dependerá de la afinidad del fármaco a la proteína alcanzándose así la fracción unida máxima.

La formación del complejo fármaco-proteína es un proceso saturable, de manera que si la dosis son muy altas o existe alguna enfermedad en la que la concentración de proteína plasmáticas principalmente albúmina, se vea disminuida puede llegar a una saturación que trae como consecuencia una mayor concentración del fármaco libre pudiéndose presentar en un aumento imprevisto en la respuesta farmacológica, llegando a ser tóxico. Así mismo al administrar conjuntamente fármacos que se unen en alto grado a proteínas los efectos secundarios se pueden potenciar, lo cual puede interpretarse como resultado del desplazamiento del fármaco de los sitios de unión a proteínas plasmática.

El complejo fármaco-proteína influye en la farmacocinética de un fármaco ya que, el fármaco libre puede pasar a través de las membranas celulares y alcanzar los receptores o bien ser eliminado.

Solo el fármaco libre esta disponible para la filtración glomerular por lo que, la excreción por ésta vía se ve afectada por el grado de unión. La velocidad de desaparición del organismo tiende a ser autolimitada, por lo menos en el rango en el que la fracción unida aumenta con la disminución de la concentración del fármaco. Entre más baja sea la concentración, menor será fracción susceptible de filtración por el glomérulo.

Los procesos activos tales como la secreción en los túbulos renales o el transporte por acarreador a través de membranas celulares no están restringidos al fármaco libre. La reversibilidad de la interacción fármaco-proteína es tan rápida que las moléculas de fármaco libre retiradas de la fase acuosa mediante el flujo sanguíneo renal y por estos procesos activos, se reemplazan instantáneamente por más fármaco libre derivado de la disociación del complejo de unión provocando que el tiempo de vida media de eliminación sea corto.

Es importante considerar el efecto de la unión a proteínas y tejidos en la vida media biológica de los fármacos, ya que, si la eliminación de un fármaco esta limitada por el flujo sanguíneo a través del cuerpo, entonces el tiempo de vida aumenta mientras aumenta el grado de unión a proteínas. Terapéuticamente la prolongación de la vida media solamente llega a ser importante cuando el porcentaje de unión a proteínas plasmáticas es mayor al 90%.

Una disminución del grado de unión puede producir un aumento relevante en el volumen de distribución de fármacos que están altamente unidos a proteínas plasmáticas y tienen un volumen de distribución limitado.

El incremento en el volumen de distribución puede aumentar la concentración del fármaco en el sitio receptor. El aumento en las concentraciones del fármaco en tejido y la consecuente disminución de la constante de eliminación puede ser riesgoso para aquellos fármacos con un estrecho índice terapéutico.

Las variaciones en el volumen de distribución o en el tiempo de vida media pueden influir en el aclaramiento de un fármaco y por lo tanto la unión a proteínas puede influir también en el aclaramiento bajo ciertas circunstancias, de ahí la importancia del estudio de unión a proteínas en la etapa preclínica.

2.5 DIALISIS AL EQUILIBRIO. (15, 16, 17, 28)

Para la determinación de unión a proteínas existen dos técnicas más utilizadas: Diálisis al equilibrio y la ultrafiltración, esta última se emplea con menor frecuencia debido a que el volumen obtenido es muy pequeño limitando el uso para fracciones de fármaco muy pequeño.

En la diálisis al equilibrio la proteína está contenida en un compartimiento, el cual está separado de un segundo compartimiento por una membrana permeable a todos los otros componentes del sistema excepto a la proteína misma. Cuando llega al equilibrio existe la misma cantidad de fármaco libre en cada compartimiento. La cantidad de fármaco que se une a la membrana puede variar dependiendo de la naturaleza química de la membrana empleada. En el método de diálisis al equilibrio las membranas más utilizadas son de celulosa regenerada y existen de mayor o menor grosor.

Tabla No 2. Comparación entre la diálisis al equilibrio y ultrafiltración.

METODO	VENTAJAS	DESVENTAJAS
<ul style="list-style-type: none">• Diálisis al equilibrio:	<ul style="list-style-type: none">• Temperatura controlada• Aparato de diálisis.• Muy usada.• Técnica simple y económica.• Muestras pequeñas de proteína.	<ul style="list-style-type: none">• Tiempo para alcanzar el equilibrio• Degradación de unión a proteínas inestables.• Posible unión de fármacos a componentes de la celda.• Dilución de proteínas plasmáticas.• Tediosos
<ul style="list-style-type: none">• Ultrafiltración	<ul style="list-style-type: none">• Es una técnica simple, rápida y barata.• Muy usada	<ul style="list-style-type: none">• El volumen del filtrado puede ser insuficiente para el análisis de los fármacos.• Posible unión de fármacos al ultrafiltro.• Temperatura incontrolable.

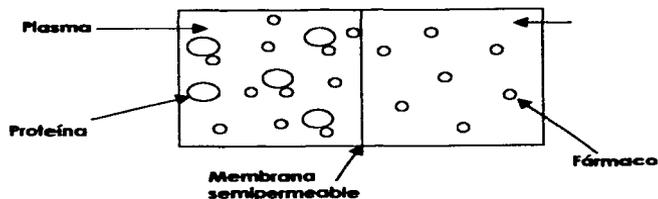


Figura 2. Principio de diálisis al equilibrio.

Algunos de los factores que afectan el proceso de diálisis son: la temperatura, la velocidad de rotación, área de la membrana, espesor y tamaño de poro.

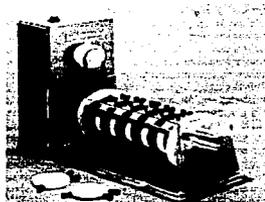


Figura 3. Dializador Spectrum 5-cell.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

El dializador Spectrum 5-cell está constituido por 5 celdas de teflón. cada celda de teflón, está diseñada de tal manera que al unirse sellan las membranas y por lo tanto dividen el interior en dos compartimentos uno a cada lado de la membrana. Cada celda de teflón se separa de otra por espaciadores de acero inoxidable, las muestras se retiran a través de orificios localizados en el borde de las celdas.

La membrana se selecciona para permitir únicamente el paso del fármaco libre. En este tipo de estudios se introducen solución amortiguadora de fosfatos 0.064M a pH = 7.4 con el fármaco en uno de los compartimentos de la celda y la solución de albúmina o plasma total en otro compartimiento.

Las celdas montadas en el soporte se colocan en la unidad de rotación. Las celdas de teflón se rotan alrededor de un eje perpendicular a la membrana a velocidades variables se ajustan entre 5, 10 y 20 r.p.m.

El equipo de diálisis esta diseñado para ser sumergido en un baño de agua. Únicamente se sumerge el soporte de las celdas y las celdas de teflón.

La concentración de fármaco libre es igual en ambos lados de la membrana después de terminado tiempo. Para obtener la fracción libre, en la práctica se divide la concentración obtenida del lado del buffer al equilibrio entre la concentración obtenida del lado del plasma del equilibrio, es decir:

$$F_l = \frac{C_l}{C_l + C_u}$$

Donde:

C_l: concentración del fármaco libre.
C_u: concentración del fármaco unido.

2.6 CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (21,22, 25, 27)

La cromatografía es un método usado primariamente para la separación de los componentes de una muestra en la cual los componentes se distribuyen entre dos fases una estacionaria y una fase móvil.

La cromatografía líquida de alta resolución representa una de las herramientas más empleadas en el laboratorio analítico moderno. La técnica de cromatografía constituye un método de separación y en combinación con detectores adecuados, de medición cuantitativa simultánea.

simultánea.

Este procedimiento se desarrolló al aplicar los principios de la cromatografía en la columna alimentada por gravedad convencional. Los materiales usuales de la fase estacionaria, celite o sílice, de pequeño tamaño y en algunos casos sustituidos por partículas de material sintético. Tales partículas permiten una mejor distribución del soluto entre la fase móvil y acuosa, pero por encontrarse fuertemente empacadas, ofrecen una mayor resistencia al flujo del solvente. Para lograr flujos útiles se hace necesario en uso de bombas para vencer la resistencia del material de la fase estacionaria.

Instrumentos.

Básicamente los equipos de C.L.A.R. pueden clasificarse en integrados y modulares; los más utilizados actualmente son los modulares. Los modulares son instrumentos individuales que permiten armar el equipo según la necesidad del analista. Además de la visualización de cada componente permite no solo el mejor conocimiento y control visual del equipo si no el mejor aislamiento y resolución de problemas cuando estos se producen.

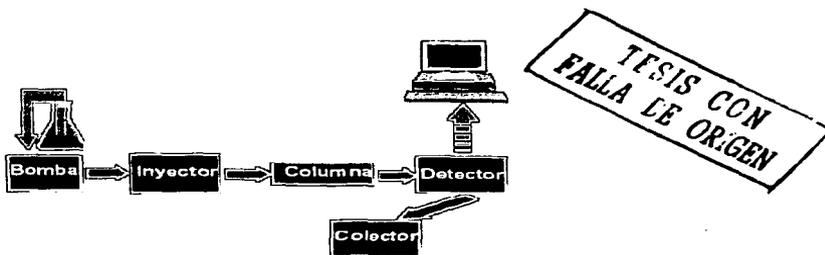


Figura 4. Esquema de un equipo cromatográfico.

Tuberías.

La fase móvil empleada en C.L.A.R. debe circular por tuberías que conectan el reservorio de solvente con la bomba, la bomba con el inyector, este con uno o más detectores conectados en serie y eventualmente con un colector de fracciones o válvulas de distribución. Es evidente que estas tuberías deberán ser inertes y de acuerdo a su ubicación del sistema cromatográfico y resistente a altas presiones. Así como se emplean tubos de acero inoxidable o poliméricas (propileno o teflón).

Bomba

Las bombas de C.L.A.R. impulsan la fase móvil proveniente del reservorio de solvente hacia el inyector y desde ahí a la columna.

Las bombas están construidas de materiales muy resistentes tanto al ataque químico como al desgaste mecánico. Los componentes en contacto con el solvente son de acero inoxidable, zafiro, rubí y teflón. En general el acero inoxidable se utiliza como cuerpo de toda la bomba, para la construcción de tuberías, conectores y cabezales de los pistones.

Inyectores.

El inyector es el dispositivo que permite introducir la muestra en solución sin interrumpir el caudal de solvente a través del sistema. El inyector debe reunir una serie de características importantes entre ellas:

- Debe ser fácil de operar
- Debe ser inerte al ataque químico y capaz de soportar altas presiones.
- Deber ser preciso en cuanto a la cantidad de muestra introducida en el sistema
- No debe provocar diluciones importantes de la solución inyectada.

Actualmente la totalidad de los inyectores son válvulas que orientan el caudal hacia la columna y que puede accionarse manual o automáticamente.

Detectores.

El detector es la parte del equipo cromatográfico que permite ver y ubicar en tiempo y espacio la posición de cada componente de una

muestra a la salida de la columna cromatográfica.

Columnas para la cromatografía líquida.

Se han usado numerosas columnas de diferentes tipos. La columna más común es de 4,6 mm de diámetro interno que consiste en un tubo de acero inoxidable con paredes muy gruesas. La longitud más común es de 250 mm.

El relleno que se utiliza en muchas de las columnas esta formada de una microesferas de sílice porosa con la superficie modificada.

Es de gran ayuda pasar la fase móvil a través de una columna pequeña rellena de sílice antes de que llegue a la columna analítica. Esto satura la fase móvil con sílice y previene la pérdida del empaquetado de la sílice de la columna analítica. Las columnas pueden dañarse por perdida del relleno provocado por una disolución del mismo.

Sistema de toma y procesamiento de datos.

El resultado del ensayo cromatográfico es por un lado, la obtención de fracciones separadas de los componentes de la muestra, y por el otro lado, la del gráfico o cromatograma, de cuya interpretación puede extraerse conclusiones cualitativas y cuantitativas. Este registro y la eventual manipulación se obtienen a partir de la señal proveniente del detector y por medio de un sistema de toma y procesamiento de datos.

3.0

PARTE EXPERIMENTAL

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

3.0 PARTE EXPERIMENTAL.

La parte experimental se realizó en el laboratorio 112 del Edificio E de la Facultad de Química.

3.1 Equipo

- Dializador Spectrum 5 Cell
- Equipo desionizador de agua. Millipore.
- Equipo para filtración de disolventes. Millipore.
- Balanza analítica Ohaus. Mod. 21975
- Centrífuga Eppendorf Mod. M37615
- Potenciómetro Orion Research Mod. 301
- Sonic or FIRE Scientific Mod. FS60
- Cromatógrafo de líquidos:
 - Bomba Shimadzu, Mod. LC-10AT
 - Detector UV-Vis, Shimadzu, Mod. SPD-10AV
 - Automuestreador, Shimadzu, Mod. SIL-10A
 - Integrador, shimadzu, Mod. SCI-10
 - Software Shimadzu Class VP Versión 5.0

3.2 Reactivos.

- Casiopeína III-I recristalizada, proporcionada por el laboratorio de Química Inorgánica (Dra. Lena Ruiz y col)
- Metanol HPLC, Tecnolab.
- Fosfato de sodio monobásico monohidratado R.A., J.T Baker
- Fosfato de sodio dibásico dodecahidratado monohidratado R.A., J.T Baker
- Sulfato d Zinc R.A.
- Agua grado HPLC (destilada, desionizada y filtrada).
- Hidróxido de sodio R.A., J.T. Baker.
- Albúmina humana Sigma-Aldrich
- Material Biológico
- Plasma de humano
- Plasma de rata cepa Wistar (Harlan México).

3.3 Soluciones

- Solución amortiguadora de fosfatos 0.064 M pH = 7.4
- Solución amortiguadora de fosfatos 0.01 M pH = 6.2
- Solución al 10 % de $ZnSO_4$
- Solución al 4% de albúmina humana.
- Solución patrón de Casiopeína III-i 500 μ g/ml

3.4 Preparación de soluciones

3.4.1 Solución amortiguadora de fosfatos 0.064 M pH = 7.4

Pesar 0.87g de fosfato de sodio monobásico y aforar a 500 ml con agua destilada. Ajustar el pH = 7.4 con NaOH 0.8 M.

3.4.2 Solución amortiguadora de fosfatos 0.01 M pH = 6.2

Pesar 1.2557 g de NaH_2PO_4 y 0.3259 g de Na_2HPO_4 disolver y aforar a 1000ml con agua destilada. Ajustar pH = 6.2 con NaOH 0.8 M.

3.4.3 Solución al 10 % de $ZnSO_4$

Pesar 0.5g de $ZnSO_4$ y aforar a 5 ml con agua destilada.

3.4.4 Solución al 4% de albúmina humana.

Pesar 2 g de Albúmina humana y aforar a 50 ml con solución amortiguadora 0.064 M pH = 7.4

3.4.5 Solución stock de Casiopeína III-i 500 μ g/ml

Pesar exactamente 0.05g de Casiopeína III-i. Aforar a 10 ml con agua destilada.

3.4.5.1 Curva patrón de Casiopeína III-i

La curva patrón se realizó con el siguiente esquema de diluciones:

Tabla No 3. Soluciones de trabajo para la curva patrón de Casiopeína III-i.

Sol. Stock de Casiopeína III-i ($\mu\text{g/ml}$)	Concentración final de Casiopeína III-i ($\mu\text{g/ml}$)	Alicuota de Casiopeína III-i (ml)	Aforo (ml)
10	5	2.5	5.0
50	10	1.0	5.0
50	25	2.5	5.0
100	50	2.5	5.0
500	100	1.0	5.0

3.5 Condiciones cromatográficas.

Se revalido parcialmente (linealidad, repetibilidad y selectividad) y trabajo el método reportado por Fuentes-Noriega et al. (21,22, 26). Las condiciones de trabajo fueron las siguientes:

- **Columna:** Hypersil Hypurity C18, dimensiones 250 x 4.6 mm, tamaño de partícula de 5 μ m
- **Precolumna:** pre-columna Security Guard phenomenex guard cartridge system C18.
- **Fase móvil:** solución amortiguadora de fosfatos (0.01M, pH = 6.2) / Metanol HPLC 58:42 (v/v).
- **Flujo:** 0.8 ml/min
- **Longitud de onda:** 262 nm
- **Volumen de inyección:** 100 μ l

3.6 Determinación de tiempo de equilibrio y unión a la membrana.

3.6.1 Preparación de las membranas

Las membranas deben ser preparadas un día antes de realizar el experimento:

1. Colocar las membranas en un vaso de precipitados de 250 ml.
2. Remojar las membranas en agua destilada durante 15 minutos.

Desdoblar, si es necesario cada membrana ayudándose de las pinzas de disección, cuidando no romperla y nunca tocarla con la yema de los dedos.

3. Remojar las membranas en etanol al 30% durante 20 minutos.
4. Desdoblar las membranas y enjuagarlas perfectamente con agua destilada para remover completamente el alcohol.
5. Poner a remojar las membranas en solución amortiguadora de fosfatos pH = 7.4 hasta el día siguiente cubriendo el vaso con papel aluminio o parafilm.

La determinación del tiempo de equilibrio y la unión a la membrana se realizó en un dializador Spectrum 5-cell a las siguientes condiciones:

- Velocidad : 16 rpm
- Temperatura : 37° C.

NOTA: Las condiciones de trabajo fueron a 37° para simular la temperatura fisiológica y a 16 rpm por ser la velocidad que el equipo permitió.

3.6.2 Tiempo de equilibrio y unión a la membrana.

En cada una de las celdas de menor grosor se colocó 1 ml de solución amortiguadora de fosfatos 0.064M pH = 7.4, en cada celda de mayor grosor fue colocada una muestra de 1ml de Casiopeína III-I a la concentración de 50 µg/ml en solución amortiguadora 0.064 M pH = 7.4. Las muestras fueron tomadas a las 2, 3, 4 y 5 horas y cuantificadas por CLAR. Esta determinación se realizó para corroborar la metodología reportada por Fuentes-Noriega et

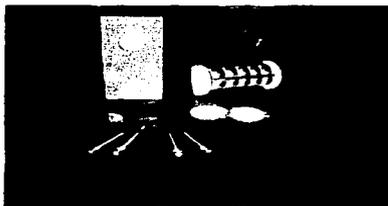
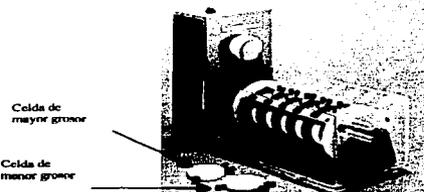


Figura 5. Dializador Spectrum 5-cell

3.7 Unión a proteínas plasmáticas en plasma de humano, plasma de rata y albúmina humana.

La diálisis en plasma de humano, plasma de rata y albúmina humana realizó en un dializador Spectrum 5-cell a las siguientes condiciones:

- Velocidad : 16 rpm
- Temperatura: 37° C.

NOTA: Las condiciones de trabajo fueron a 37° para simular la temperatura fisiológica y a 16 rpm por ser la velocidad que el equipo permitió. El método de diálisis fue validado por Fuentes-Noriega et al.

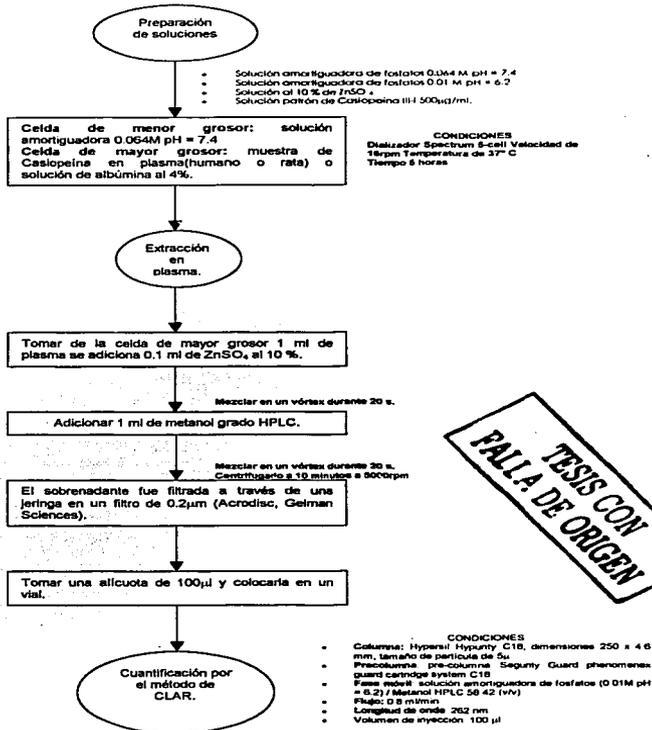
En cada una de las celdas de menor grosor se colocó 1 ml de solución amortiguadora de fosfatos 0.064M pH = 7.4, en las celdas de mayor grosor fue colocada una muestra de 1 ml de Casiopeína III-i a la concentración de 12 µg/ml, esta metodología es repetida utilizando concentraciones de 25 y 50 µg/ml preparadas en la matriz biológica correspondientes (plasma de rata, plasma de humano y sol de albúmina al 4%). Las muestras fueron tomadas a las 5 horas. Las muestra de solución amortiguadora 0.064M pH = 7.4 fueron tomadas y cuantificadas por el método de CLAR. Las muestras de plasma fueron extraídas y cuantificadas por CLAR.

3.7.1 Método analítico para cuantificar Casiopeína III-i por HPLC.

La extracción de la Casiopeína III-i en plasma y solución de albúmina se realizó de la siguiente manera:

1. En 1 ml de la muestra se adicionan 0.1 ml de ZnSO₄ al 10 %.
2. Agitar en vórtex durante 20 segundos.
3. Adicionar 1 ml de metanol HPLC seguido de
4. Agitar en vórtex durante 20 segundos
5. Centrifugado a 10 minutos a 5000rpm.
6. Filtró el sobrenadante a través de una jeringa en un filtro de 0.2µm (Acrodisc, Gelman Sciences).
7. Colocar una alícuota de 100µl en un vial.
8. Cuantificación por el método de CLAR.

3.0 DIAGRAMA



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 6.- Diagrama de flujo de la metodología utilizada

4.0 RESULTADOS

4.0 RESULTADOS

Los siguientes resultados fueron obtenidos durante las secciones experimentales y de acuerdo a los lineamientos descritos en el capítulo III.

4.1 Revalidación.

4.1.1 Repetibilidad.

La repetibilidad del sistema se realizó con tres corridas de tres curvas patrón de Casiopeína III-i en un mismo día en solución amortiguadora 0.064M pH = 7.4, obteniéndose los siguientes resultados:

Tabla 4. Resultados de la repetibilidad del sistema.

Conc. De Casiopeína III-i (µg/ml)	Curva 1	curva 2	curva 3	Promedio	Des. Est	% C.V.
	Área	área	área			
5	0	-	-	-	-	-
10	564273	543849	530335	546152.3	17085.8	3.13
25	1637692	1649728	1554157	1613659	52052.5	3.23
50	3597897	3206130	3143596	3315874.3	246232.0	7.43
100	5521343	5424513	5447243	5464366.3	50635.15	0.93
r	0.9681	0.9873	0.9910	0.9822	0.012	1.25
m	1.85E-05	1.8E-05	1.8E-05	1.8E-05	9.64E-08	0.523
b	-2.537	-3.8815	-2.68809	-3.03553	0.7365	-24.26

4.1.2 Linealidad

La linealidad del sistema se realizó con tres corridas de tres curvas patrón de Casiopeína III-i en un mismo día en solución amortiguadora 0.064M pH = 7.4 obteniéndose los siguientes resultados:

Tabla 5. Resultados de la linealidad del sistema.

Conc. de Casiopeína III-i (µg/ml)	Curva 1	curva 2	curva 3	Promedio
	Área	Área	Área	
5	0	-	-	-
10	564273	543849	530335	0.9910
25	1637692	1649728	1554157	0.9955
50	3597897	3206130	3143596	0.9910
100	5521343	5424513	5447243	0.9821
R	0.9839	0.9936	0.9955	1.844E-05
r ²	0.9681	0.9873	0.9910	-3.0865
M	1.85E-05	1.85E-05	1.83E-05	
B	-2.537	-3.8815	-2.6881	

La linealidad de la metodología empleada se muestra en las figuras 7,8,9 y 10.

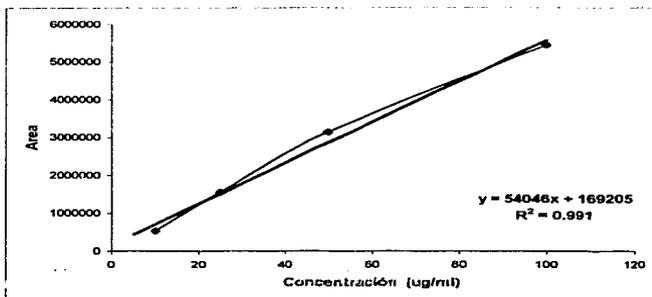


Figura 7.- Gráfica de linealidad del sistema con Casiopeína III-i en solución amortiguadora 0.064M pH = 7.4, considerando el área como respuesta cromatográfica.

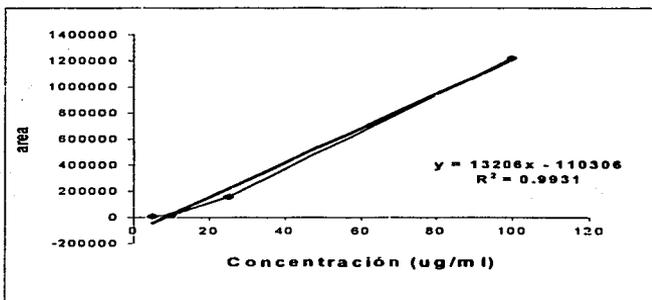


Figura 8. Gráfica de linealidad del método con la Casiopeína III-i en plasma de rata, considerando el área como respuesta cromatográfica.

TESIS CUR
FALLA DE ORIGEN

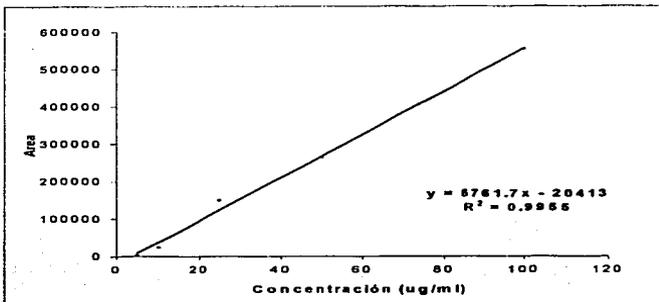


Figura 9. Gráfica de linealidad de la Casiopeína III-I en plasma de humano, considerando el área como respuesta cromatográfica.

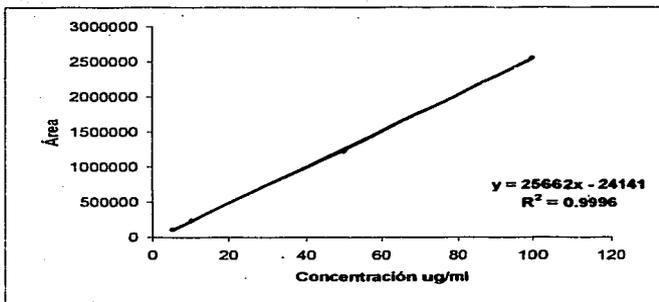


Figura 10. Gráfica de linealidad de la Casiopeína III-I solución al 4% en albúmina humana, considerando el área como respuesta cromatográfica.

La selectividad de la Casiopeína III-i se muestra en los siguientes cromatogramas:

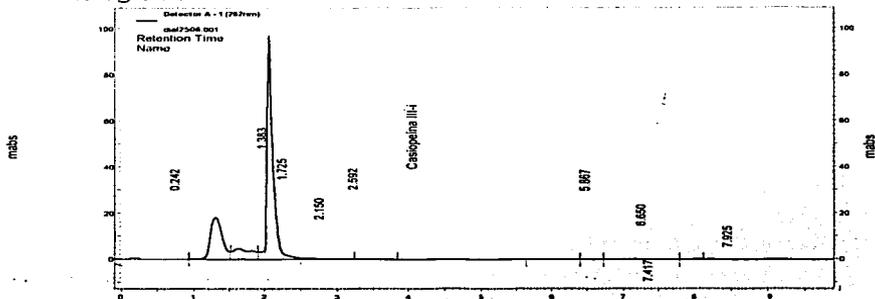


Figura 11. Cromatograma del blanco de la solución amortiguadora 0.064M pH = 7.4.

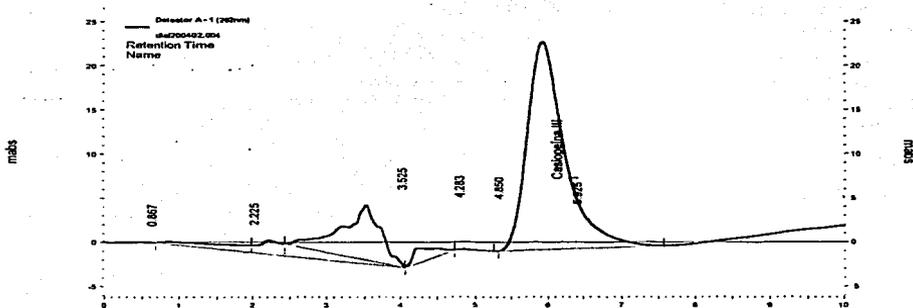


Figura 12. Cromatograma de la Casiopeína III-i 10 µg/ml en solución amortiguadora 0.064M pH = 7.4.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

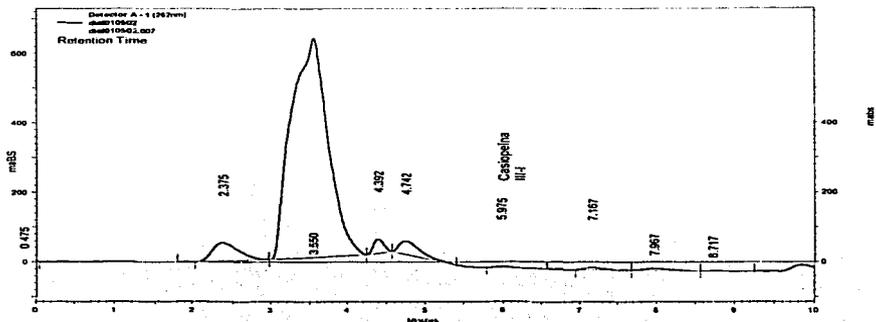


Figura 13. Cromatograma del blanco de plasma de humano.

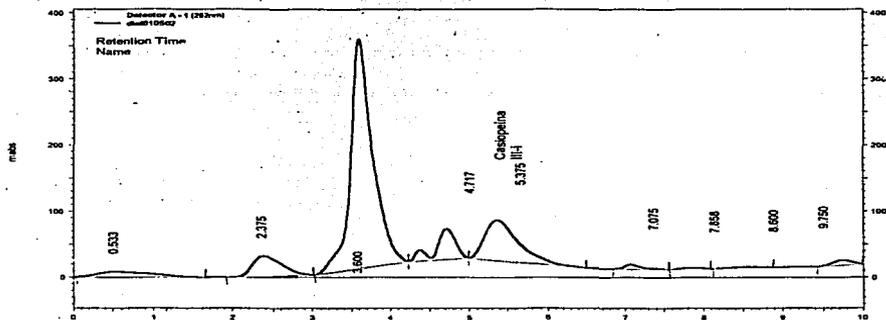


Figura 14. Cromatograma de la Casiopeina III-I en plasma de humano.

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

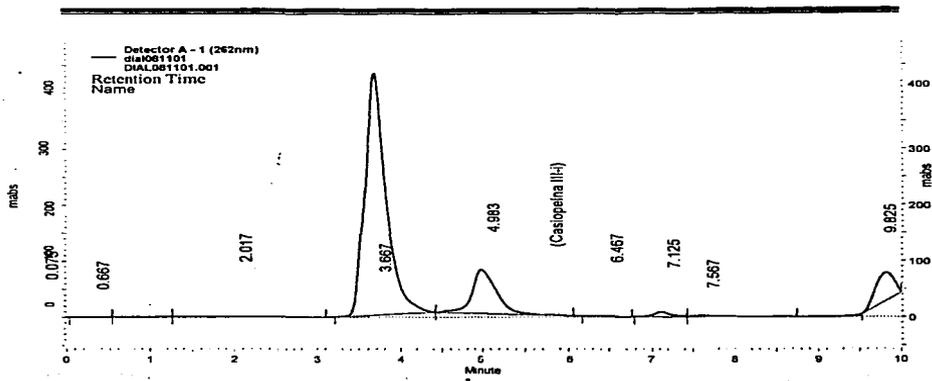


Figura 15. Cromatograma del blanco del plasma de rata.

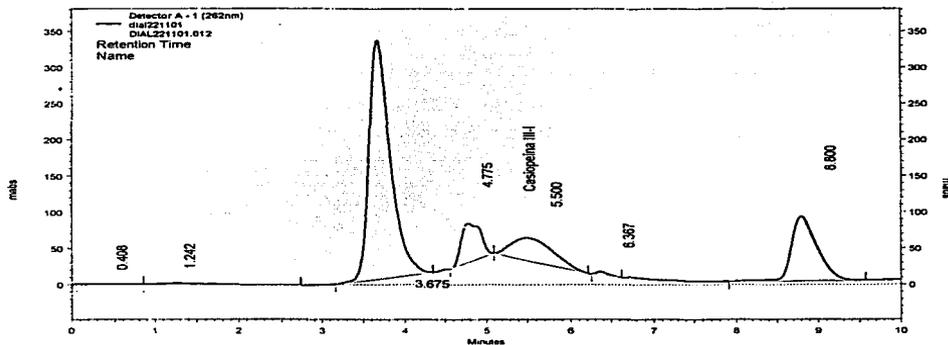


Figura 16. Cromatograma de la Casiopelina III-I en plasma de rata.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

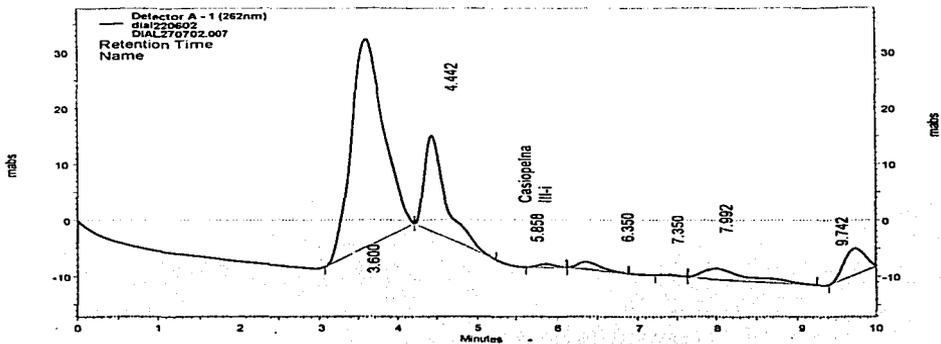


Figura 17. Cromatograma del blanco de albúmina humana.

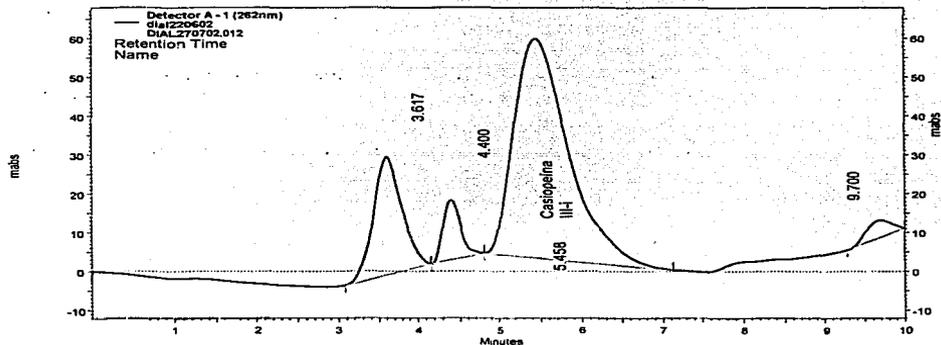


Figura 18. Cromatograma de la Casiopina III-I en albúmina humana.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

4.2 Determinación de tiempo de equilibrio.

El tiempo de equilibrio se determinó siguiendo los lineamientos descritos en la sección 3.6, con los resultados se elaboraron gráficas de % de concentraciones con respecto al tiempo, la tabla No 6 y la Figura No 15 muestran los resultados obtenidos, de los cuales se observa que el tiempo de equilibrio de la Casiopeína III-i es de aproximadamente 4.0 h, por lo cual el resto de los experimentos se realizaron con 5 horas de diálisis.

Tabla 6. Resultados de la determinación del tiempo de equilibrio de la Casiopeína III-i en solución amortiguadora de fosfatos 0.064 M pH =7.4

Tiempo (horas)	No de celda	Concentración en celda sin Casiopeína III-i ($\mu\text{g/ml}$).	Concentración en celda con Casiopeína III-i ($\mu\text{g/ml}$)
2	1	14.1	24.8
3	2	17.1	23.2
4	3	22.1	18.2
5	4	18.1	14.8
BLANCO	5	0	0

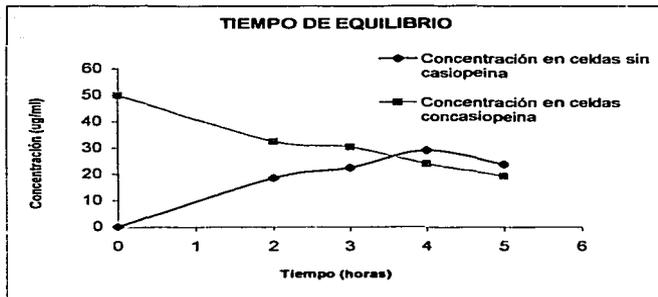


Figura 19. Determinación del tiempo de equilibrio de la Casiopeína III-i en solución amortiguadora de fosfatos 0.064 M pH = 7.4

TESIS CON
FALTA DE ORIGEN

4.3 Unión a la membrana

El grado de unión a la membrana de la Casiopeína III-i, se determinó siguiendo los lineamientos especificados en la sección 3.6 y los resultados se muestran en la tabla No 7.

Tabla 7. Resultados de la determinación del porcentaje de unión a la membrana de la Casiopeína III-i en solución amortiguadora de fosfatos 0.064 M pH =7.4.

Tiempo (horas)	No de celda	Conc. (µg/ml) Blanco	Conc. (µg/ml) Muestra	Conc. total (µg/ml)	% Unión a la membrana
2	1	14.135	24.761	38.896	22.21
3	2	17.122	23.158	40.28	19.44
4	3	22.064	18.191	40.255	19.49
5	4	18.113	14.732	32.842	34.31
5	5	0	0	0	0
Promedio					23.86

4.4 Unión a proteínas plasmáticas en plasma de rata, plasma de humano y albúmina humana.

El grado de unión a proteínas plasmáticas de la Casiopeína III-i se determinó siguiendo los lineamientos de la sección 3.6.1 y 3.7 los resultados se muestran en las tablas No 8, No 9, No 10.

Tabla 8. Resultados de la determinación del porcentaje de unión a la membrana de la Casiopeína III-i en solución plasma de humano.

Concentración de Casiopeína III-i (µg/ml)	Concentración (µg/ml) en: (n=5)		% Unión
	Plasma	Fosfatos	
12	8.2	0.9	89.1
25	15.8	3.5	77.0
50	36.8	8.7	76.4

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Tabla 9. Resultados de la determinación del porcentaje de unión a la membrana de la Casiopeína III-i en solución plasma de rata.

Concentración de Casiopeína III-i (µg/ml)	Concentración (µg/ml) en: (n=5)		% Unión
	Plasma	Fosfatos	
12	-	-	-
25	15.1	7.8	48.3
50	34.3	14.5	57.7

Tabla 10. Resultados de la determinación del porcentaje de unión a la membrana de la Casiopeína III-i en solución albúmina humana al 4%.

Concentración de Casiopeína III-i (µg/ml)	Concentración (µg/ml) en: (n=5)		% Unión
	Plasma	Fosfatos	
12	-	-	-
25	6.7	4.3	30.5
50	24.6	15.3	37.9

La tabla No 11 y las figuras No 16, 17, 18 y 19 muestran los resultados la unión a proteínas plasmáticas de la Casiopeína III-i a 12, 25 y 50 µg/ml en las diferentes matrices biológicas utilizadas.

Tabla 11. Resultados de la determinación del tiempo de equilibrio de la Casiopeína III-i en solución amortiguadora de fosfatos 0.064 M pH =7.4

Conc. (µg/ml)	% Unión en plasma de rata (n=5) (desviación estándar)	% Unión en plasma de humano (n=5) (desviación estándar)	% Unión en albúmina al 4% (n=5) (desviación estándar)
12	-	89.1 (1.9)	-
25	48.3 (7.6)	76.3 (0.17)	30.5 (6.4)
50	57.7 (9.6)	76.4 (4.4)	37.9 (4.9)

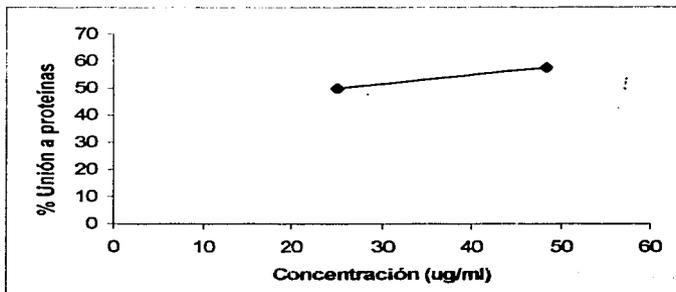


Figura 20. Unión a proteínas plasmáticas de la Casiopeína III-I en plasma de rata (n=5).

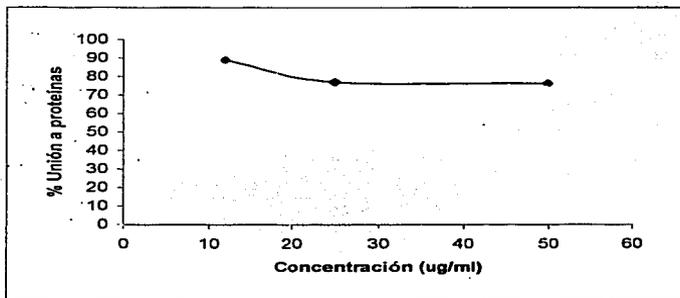


Figura 21. Unión a proteínas plasmáticas de la Casiopeína III-I en plasma de humano (n=5).

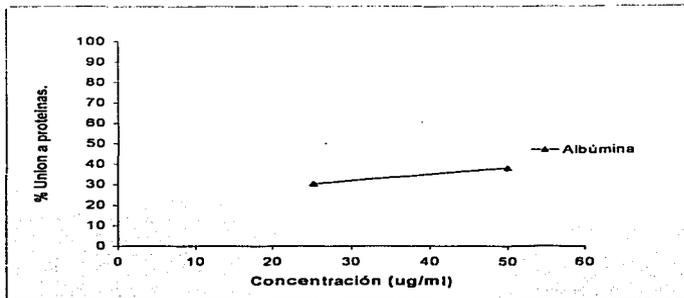


Figura 22. Unión a proteínas plasmáticas de la Casiopeína III-i en albúmina humana (n=5).

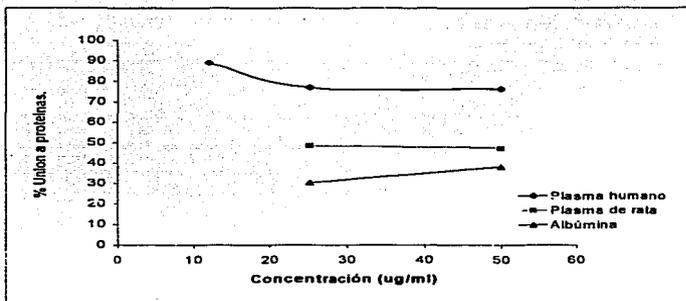


Figura 23. Comparación de grado de unión a proteínas plasmáticas de la Casiopeína III-i en cada uno de los fluidos biológicos trabajados (n=5).

5.0

ANÁLISIS DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES



ANÁLISIS DE RESULTADOS.

5.1 Revalidación

La revalidación se realizó para determinar la precisión, linealidad y selectividad del método y de acuerdo a lo reportado por Fuentes-Noriega et al; la validación total del método fue realizada por Fuentes-Noriega et al.

5.1.1 Repetibilidad

Los resultados de la tabla No. 4 tienen como % C.V. de 0.9 a 7.4, lo que nos muestra que la repetibilidad es adecuada en el intervalo de concentraciones que se utilizaron para la determinación de unión a proteínas de la Casiopeína III-i.

5.1.2 Linealidad

Los resultados de la tabla No. 5 muestran que la linealidad del sistema obtenida para el intervalo de concentraciones de 5-100 µg/ml de Casiopeína III-i de la cual se obtuvo la siguiente ecuación: $Y = 1.84 \times 10^{-5} - 3.03$ y un coeficiente de correlación de 0.991, cumpliendo con las especificaciones. (29, 30, 31)

De los resultados de la linealidad en plasma de rata, plasma de humano y solución de albúmina humana al 4%, se obtuvieron las siguientes ecuaciones: $Y = 13020X + 110306$ y $r = 0.9965$ para plasma de rata; $Y = 2761.7X - 20413$ $r = 0.995$ en plasma de humano; $Y = 25662X - 124141$ y $r = 0.9996$ en solución de albúmina al 4%. La linealidad del método se muestran en las figuras No. 7, 8 y 10 respectivamente y el coeficiente de correlación en cada uno de los sistemas biológicos fue mayor al 0.98 por lo que cumplé con los parámetros. (29, 30, 31)

La selectividad es determinada con el fin de establecer si existe interferencia debido a sustancias endógenas de la matriz biológica. Los cromatogramas de: el blanco de solución amortiguadora 0.064 M pH = 7.4; la Casiopeína III-i en solución amortiguadora 0.064 M pH = 7.4; el blanco del plasma de humano; la muestra de Casiopeína III-i en plasma de humano; el blanco de plasma de rata; la muestra de Casiopeína III-i en plasma de rata; el blanco de albúmina humana y la muestra de Casiopeína III-i en albúmina humana se observan en las figuras No. 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 y 18 respectivamente, en las cuales se observa que no

existe interferencia en las respuestas cromatográficas de la Casiopeína III-i a causa de la matriz biológica por lo tanto el método es adecuado para ser utilizado en la cuantificación de la Casiopeína III-i en los fluidos biológicos ya mencionados.

5.2 Determinación de tiempo de equilibrio.

La tabla No. 6 muestra los resultados de la determinación del tiempo de equilibrio, estos fueron graficados en las figura No. 19 en la cual se observa que la diálisis alcanza el tiempo de equilibrio aproximadamente a las 4 horas por lo que el resto de los experimentos se realizaron durante 5 horas de tiempo de diálisis.

La determinación del tiempo de equilibrio fue realizada para corroborar el tiempo reportado por Fuentes-Noriega et al.

5.3 Determinación la unión a la membrana.

La tabla No. 7 muestra que 23.86 % de la Casiopeína III-i se une a la membrana. Esto se detecto durante la determinación del tiempo de equilibrio ya que se observó que había una disminución de la Casiopeína III-i utilizada inicialmente, con respecto a la cantidad cuantificada al término del experimento por lo que fue un parámetro importante a determinar para así considerarlo en los cálculos de los resultados finales durante todo la parte el trabajo experimental.

5.4 Unión a proteínas plasmáticas en plasma de humano y plasma de rata y albúmina humana.

Las tablas No. 7, 8, 9 y 10 muestran los resultados de la unión a proteínas y las Figuras No. 20, 21 y 22 muestran las graficas del porcentaje de unión a proteínas de la Casiopeína III-i en plasma de humano, plasma de rata y solución de albúmina humana al 4%. Los resultados muestra que la unión a proteínas en plasma rata es menor que la unión a proteínas en plasma de humano, esto puede ser debido a que la rata contiene una menor cantidad de proteínas en el plasma (32), lo que ocasiona que en comparación con el plasma de humano, exista una disminución de porcentaje de unión a proteínas de la Casiopeína III-i en dicho plasma.

En plasma de rata y albúmina humana no fue posible detectar la Casiopeína III-i a la concentración de 12 µg/ml debido a la baja sensibilidad del método analítico.

Así mismo, el grado de unión a proteínas en plasma de rata y plasma de humano no es significativo, ya que es menor del 90% y por ello a estas concentraciones se esperaba que no repercutiera en una depuración lenta al aplicarse en la clínica. Por otro lado, al administrarse en forma de poli-fármacos, lo que sucede comúnmente en terapia contra el cáncer, se esperaba que no presentara problemas en presencia de otros fármacos.

En los resultados obtenidos en plasma de humano se observa que la concentración en plasma de humano existe un leve aumento de la unión a proteínas, por lo tanto se sugiere optimizar el método o proponer un método más sensible para hacer la determinación a concentraciones menores a 12 $\mu\text{g/ml}$ ya que este método analítico para la cuantificación de Casiopeína III-i en fluido biológico (validado por Fuentes-Noriega et al) tiene un límite de cuantificación de 5 $\mu\text{g/ml}$ lo que impide aplicar este método para la cuantificación de concentraciones menores en una diálisis.

CONCLUSIONES.

El método analítico utilizado para la cuantificación de la Casiopeína III-i de acuerdo con la revalidación es lineal a las concentraciones de 5 µg/ml a 100 µg/ml, es repetible y selectivo para las matrices biológicas utilizadas.

El tiempo de equilibrio obtenido y utilizado para la diálisis fue 5 horas, reportado previamente por Fuentes-Noriega et al.

El grado de unión a proteínas de la Casiopeína III-i en cada fluido biológico encontrado es:

Conc. (µg/ml)	% Unión en plasma de rata (n=5) (desviación estándar)	% Unión en plasma de humano (n=5) (desviación estándar)	% Unión en albúmina al 4% (n=5) (desviación estándar)
12	-	89.1 (1.9)	-
25	48.3 (7.6)	76.3 (0.17)	30.5 (6.4)
50	57.7 (9.6)	76.4 (4.4)	37.9 (4.9)

En plasma de humano el % de unión a proteínas es mayor que en plasma de rata y los dos anteriores son mayores que en albúmina humana, lo que permite concluir que la mayor cantidad de Casiopeína III-i se une en mayor proporción a la α -glicoproteína y a componentes sanguíneos.

Al disminuir la concentración en plasma de humano se nota un leve aumento de la unión a proteínas, por lo tanto se requiere de un método más sensible para hacer la determinación a concentraciones menores al 12 µg/ml.

Es recomendable verificar la unión a proteínas en alfa-glicoproteína para observar si la diferencia entre plasma de humano y albúmina humana se debe a la presencia de esas proteínas en plasma de humano.

6.0 BIBLIOGRAFIA



BIBLIOGRAFIA

1. Balcazar Gladys. Tesis de licenciatura. Estudio preclínico en farmacocinética de Casiopeína III-i en gatos. UNAM, 1999.
2. Antonio J. Tesis de licenciatura. Farmacocinética de Casiopeínas III-i. Estudio preclínico en conejos. UNAM, 2001.
3. Lessner Howard. Oncología médica. El manual moderno. México, (1980).
4. Goodman L., Gilman A. Las bases farmacológicas de la terapéutica. Editorial Médica panamericana. 1ª edición 1993.
5. González Barón, M. Fundamentos de oncología Medic. Interamericana Mc- Graw-Hill. 1ª Edición. España, 1989.
6. Marín Hernández Alvaro. Tesis de licenciatura. Evaluación de actividad anticancerígena de nuevos compuestos de coordinación de cobre mediante el empleo de líneas humanas de cáncer en cultivo *in vitro*. UNAM 2000
7. Romero de Lira Laura. Tesis de licenciatura. Evaluación antineoplásica *in vitro* de nuevos fármacos (Casiopeínas) empleando líneas tumorales humanas y murinas. UNAM 2000
8. Pedro Morales y col., Determinación del potencial citostático de compuestos antineoplásicos en desarrollo mediante su efecto sobre el ciclo mitótico en células de la médula ósea de ratón *in vivo*. Primera Jornada de trabajo en Casiopeínas. UNAM. 1994.
9. Celedonio Gómez R y col., Evaluación antineoplásica de nuevos compuestos (memorias). Instituto Nacional de Cancerología. Primera Jornada de trabajo en Casiopeínas. UNAM. 1994
10. Ruiz Azuara, Lena y cols. Estudio estructural de las Casiopeínas III-i.

Jornada de trabajo en Casiopeínas (memorias). Facultad de Química. UNAM. 1996.

11. Macías Rosales, L y cols. Evaluación preclínica de fármacos con actividad antineoplásica potencial. 3º Jornada de trabajo en Casiopeínas (memorias). Facultad de química 1998.
12. Bravo Gómez, M. E. Evaluación antineoplásica de compuestos de coordinación de cobre (Casiopeínas) en modelo tumoral murino. Tesis de licenciatura. Facultad de química. UNAM. 1998.
13. Romero, Laura C. Estabilidad de las Casiopeínas II y III en soluciones fisiológicamente compatibles. 3º Jornada de trabajo en Casiopeínas (memorias). Facultad de química. 1998
14. Alpizar Viveros A. Determinación de pKa y el coeficiente de partición de la Casiopeína III. 3º Jornada de trabajo en Casiopeínas (memorias). Facultad de química 1998.
15. Gibaldi M. Introducción a la biofarmacia. Editorial Reverté. España. 1982 pp 466-499.
16. Medina L. García. Tesis de licenciatura. Estudios de unión a proteínas plasmáticas del Albendazol y su principal metabolito, sulfóxido de albendazol. UNAM. 1995.
17. Gómez E. Tesis de licenciatura. Estudio de unión del α -BIOF10 a proteínas plasmáticas. Universidad Veracruzana.
18. Kebbet M. Pfafky., Olof Borga. Plasma Binding of basic drugs. Clin. Pharm and Therapeutics. 5 (22)
19. A. Paulson, Todd A Kaprak, et al. Plasma Protein Binding of Celecoxib in Mice, rat, rabbit, dog and human. Pharmaceutics and drugs disposition. 20: 293-299 (1999).
20. Pahlman I. and Gozzi P. Serum Protein binding of tolterodine and its major metabolites in human and several animal species.

-
21. Fuentes-Noriega et al. Development and validation of liquid chromatographic method for Casiopeína III-i in rat plasma. Journal of chromatographic 772 (2002) 115-121.
 22. L. Stanley and G. Malikin. An improved micro-scale protein precipitation procedure for HPLC Assay of therapeutic drug in serum. Journal of Liquid chromatographic. 12(10). 1851-1872 (1989).
 23. Lee. S. and Lee M. Factors influencing the protein binding of azosemide using an equilibrium dialysis technique. Biopharmaceutics and drug disposition. 16, 615-626 (1995).
 24. Chignell C. Physical methods for studying Drug-Protein binding, Concept in Biochemical Pharmacology, part 1. (1971) 187-212
 25. Quantrocchi, et al. Introducción a H.P.L.C. Aplicación y práctica.
 26. V.P. Shah, K.K. Midha, S. Dighe, y cols. Analytical Methods validation: Bioavailability, bioequivalence and pharmacokinetic studies. Journal of pharmaceutical sciences. 81 (3) 309-312, 1992.
 27. Krstulovic, Ante M. Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography. Theory Practice and Biomedical Applications. John Wiley and Sons. 1982. pp 4-31.
 28. Spectra for equilibrium dialyzer: Manual de uso del dializador.
 29. Manual de validación de métodos analíticos: Editado por el Colegio Nacional de Químicos farmacéuticos Biólogos. México
 30. Karnes T., Clark M., Clark M. Precision, accuracy and data acceptance criterion in biopharmaceutical . Analysis pharmaceutical research, No. 10 pp 1420-1426 (1993).

-
31. Karnes T., Shiu G. Validation of bioanalytical methods. Pharmaceutical research, No. 4 pp 421-426 (1991).
32. Zuñiga Jesús M. y cols. Ciencia y tecnología en protección y experimentación animal. Mc-Graw-Hill. Interamericana. México. 2001 pp 26-27, 552-555.