

00524

'65



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**Optimización y Validación de un
método analítico para Casiopeína
IIIi en orina por HPLC.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA:

IRMA ESTRELLA GÓMEZ RAMOS



MÉXICO, DF. 2003

**EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUÍMICA**

A



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.



Jurado asignado:

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

Sitio en donde se desarrolló el tema: Laboratorio 112 y 113 (Biofarmacia), Conjunto E, Departamento de Farmacia, División de Estudios De Posgrado, Facultad de Química, UNAM.

Asesora:



M en C Inés Fuentes Noriega

Sustentante :



Irma Estrella Gómez Ramos.



AGRADECIMIENTOS

A mi abuelita Emma¹ que siempre estará con nosotros.

A mi mamá, Irma, por su cariño, apoyo y comprensión, por ayudarme a alcanzar mis metas.

A mi papá por su apoyo durante todo este tiempo.

Mis hermanos Javier y Hugo, por toda la ayuda que me brindan y que es parte muy importante para que yo pueda realizarme.

A mis hermanas Liz y Bibis por su apoyo y paciencia.

A mi sobrinito Javier de Jesús.

A la M en C. Inés Fuentes Noriega por la confianza y su ayuda que siempre me dio muchas gracias.

A mis amigos del Laboratorio 112, Berenice, Jovita, Lupita, Cecilia, Selene, Emmanuel, Escarlet, Francisco, Adriana, Mary.

Especialmente a Julio y Leobardo por toda la ayuda que me dieron, siempre que yo los necesite, estuvieron en la mejor disposición de ayudarme.

A mi amiga Kristel de la FQ UNAM por todos los buenos momentos que pasamos juntos durante la carrera.

INDICE

1. 0 Introducción.	1
1.1 Introducción.	1
1.2 Objetivos.	2
2.0 Antecedentes.	4
2.1 Cromatografía.	4
2.1.1 Cromatografía líquida de Alta Eficiencia HPLC.	5
2.2. Casiopeinas.	6
2.2.1 Casiopeina III.	8
2.3 Cáncer.	10
2.4 Métodos reportados para la cuantificación de Casiopeina III en muestras biológicas .	23
2.5. Validación de métodos analíticos.	24
3. 0 Materiales y Métodos.	27
3.1 Material.	27
3.1.1. Equipos.	27
3.1.2. Estándares.	28
3.1.3. Reactivos.	28
3.1.4. Soluciones.	29
3.1.5. Preparación de soluciones.	29
3.1.6. Preparación de la curva de calibración de Casiopeina III en agua.	31

3.1.7. Preparación de la curva de calibración de Casiopeina IIII en orina.	31
3.2. Optimización del método analítico para determinar Casiopeina IIII por HPLC.	32
3.2.1. Selección de la longitud de onda de máxima absorción.	32
3.2.2. Elección de la composición de la fase móvil y pH.	32
3.2.3. Elección de la proporción de la fase móvil para el método de Casiopeina IIII en orina.	33
3.2.4. Elección de la columna cromatografica .	33
3.2.5. Método de extracción de Casiopeina IIII en orina.	34
3.3. Condiciones Cromatográficas.	35
3.4. Validación del método analítico para cuantificar Casiopeina IIII en orina por HPLC.	36
3.4.1. Validación del sistema.	36
3.4.2. Linealidad.	36
3.4.3. Precisión.	36
3.5. Validación del método.	36
3.5.1. Selectividad.	36
3.5.2. Linealidad del método.	37
3.5.3. Recobro.	37
3.5.4. Exactitud.	38
3.5.5. Precisión.	38
3.5.5.1. Repetibilidad (Día 1).	39
3.5.5.2. Reproducibilidad (Día 2).	39
3.5.6. Limite de detección.	40

3.5.7. Límite de cuantificación.	40
3.5.8. Estabilidad.	40
3.5.8.1. Estabilidad de la muestra procesada a temperatura ambiente.	40
3.5.8.2. Ciclos congelación-descongelación.	41
3.5.9. Tolerancia.	41
3.6. Aplicación del método mediante un estudio preliminar.	42
3.6.1. Diseño experimental.	42
4.0 Resultados.	45
4.1. Optimización del método analítico para determinar Casiopeina IIII por HPLC.	45
4.1.1 Elección de la longitud de máxima absorción.	46
4.1.2 Elección de la composición de la fase móvil y pH.	46
4.1.3 Selección de la proporción de la fase móvil para el método de Casiopeina IIII en orina.	46
4.1.4 Elección de la columna cromatografica.	47
4.1.5 Método de extracción para Casiopeina IIII en orina.	47
4.2. Validación del sistema.	47
4.2.1. Linealidad.	47
4.2.2 Precisión.	49
4.3. Validación del método analítico.	49
4.3.1 Selectividad.	49
4.3.2 Linealidad del método.	52
4.3.3. Recobro.	53
4.3.4. Precisión y exactitud del método.	54

F

Figura 8. Cromatograma de orina blanco.	50
Figura 9. Cromatograma orina adicionada Casiopeina IIII 15 µg/ml .	50
Figura 10. Cromatograma orina adicionada de solución A , Cu 4, 4, dimetil.	51
Figura 11. Cromatograma orina adicionada de solución B, Cu acetilacetato.	51
Figura 12. Cromatograma de orina blanco de rata Wistar.	62
Figura 13. Cromatograma 10µg/ml Casiopeina IIII en orina de rata.	62

Índice de gráficas

Gráfica 1 Curva promedio de Casiopeina IIII en agua, 274 nm.	48
Gráfica 2 Curva de Casiopeina IIII en promedio en orina 274 nm.	52
Gráfica 3 Curva acumulada de Casiopeina IIII en orina de rata Wistar.	70
Gráfica 4 Obtención de la Ke de Casiopeina IIII en orina.	71

Índice de Tablas

Tabla 1. Características morfológicas de la célula cancerosa.	11
Tabla 2. Características metabólicas de las células cancerosas.	12
Tabla 3. Mecanismos de acción de agentes anticancerígenos.	15
Tabla 4. Principales causas de mortalidad en mujeres año 2000.	20
Tabla 5. Principales causas de mortalidad en el hombre año 2000.	21
Tabla 6. Preparación de la curva de calibración de Casiopeina IIII en agua.	31
Tabla 7. Preparación de la curva de calibración de Casiopeina IIII en orina.	31

4.3.4.1. Repetibilidad (Día 1).	54
4.3.4.2 Reproducibilidad Intralaboratorio (Día 2).	54
4.3.5. Limite de detección.	55
4.3.6 . Limite de cuantificación.	55
4.3.7. Estabilidad.	56
4.3.7.1. Estabilidad de la muestra procesada a temperatura ambiente.	56
4.3.7.2. Ciclos congelación–descongelación.	58
4.3.8.Tolerancia.	59
4.3.8.1. Tolerancia por cambio de columna Hipersil Elite C18.	60
4.3.8.2 Tolerancia por cambio de longitud de onda 296 nm.	60
5.0 Aplicación del método.	61
5.1 Cálculo de la constante de eliminación K_e y $t_{1/2}$.	63
6. 0 Análisis de resultados.	65
6.1. Optimización del método analítico para determinar Casiopeina III en orina por HPLC.	65
6.2 Validación del sistema.	65
6.3.Validación del método.	66
6.3.1.Selectividad.	66
6.3.2 Linealidad.	66
6.3.3 Recobro.	66
6.3.4. Precisión.	67
6.3.4.1 Repetibilidad (Día 1).	67
6.3.4.2 Reproducibilidad (Día 2).	67

6.3.5 Exactitud.	67
6.3.6 Limite de detección.	68
6.3.7 Limite de cuantificación.	68
6.3.8. Estabilidad.	68
6.3.8.1. Estabilidad de la muestra procesada a temperatura ambiente.	69
6.3.8.2. Ciclos congelación descongelación.	69
6.3.9 Tolerancia.	69
6.3.9.1 Tolerancia por cambio de columna Hypersil Elite C18.	69
6.3.9.2. Tolerancia por cambio de longitud de onda 298 nm.	70
6.4. Aplicación del método mediante un estudio preliminar en orina.	70
7.0 Conclusiones.	73
8.0 Bibliografía.	74

Índice de figuras.

Figura 1. Clasificación de la cromatografía.	4
Figura 2. Estructura de la Casiopeina IIII.	8
Figura 3. Etapas proceso carcinogénico.	13
Figura 4. Mecanismos de acción de fármacos anticarcinogénicos a nivel celular.	17
Figura 5. Diagrama de flujo del método de extracción.	34
Figura 6 Espectro de absorción Casiopeina IIII en UV.	44
Figura 7. Cromatograma 10 µg/ml Casiopeina IIII en agua.	49

Tabla 8. Fase móvil empleadas en diferente proporción.	33
Tabla 9. Diseño experimental para la Aplicación del método Casiopeina IIII en orina de ratas Wistar.	43
Tabla10 Fases evaluadas para el método de casiopeina IIII en orina.	46
Tabla11 Columnas evaluadas para el método de Casiopeina IIII en orina.	47
Tabla.12. Linealidad del sistema.	48
Tabla 13 Linealidad del método.	52
Tabla 14. % Recobro.	53
Tabla 15 Repetibilidad (Día 1) y exactitud del método.	54
Tabla 16. Reproducibilidad (Día 2).	55
Tabla 17. Limite de cuantificación.	56
Tabla 18 Estabilidad Casiopeina IIII en orina 0 horas.	56
Tabla 19.Estabilidad Casiopeina IIII en orina 12 horas.	57
Tabla 20.Estabilidad Casiopeina IIII en orina 24 horas.	57
Tabla 21.Puntos control Casiopeina IIII en orina.	58
Tabla 22. Estabilidad Ciclos congelación – descongelación.	58
Tabla 23.Puntos control a las condiciones establecidas para el método analítico.	59
Tabla 24 Tolerancia por cambio de columna Hipersil Elite C18.	59
Tabla 25.Tolerancia por cambio de longitud de onda.	60
Tabla 26 Resultados Aplicación método.	61
Tabla 27. Ke Casiopeina IIII en orina.	63



J

INTRODUCCIÓN

OPTIMIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA CASIOPEINA III EN ORINA POR HPLC.

1.1 INTRODUCCIÓN

Las casiopeinas comprenden una serie de compuestos de coordinación de Cobre II como centro metálico, en que la esfera de coordinación presenta un ligante bidentado de tipo dimina (N-N) y otro que puede ser aminoácido (N-O) o donador por oxígeno (O-O). Los complejos estudiados de esta familia han demostrado tener actividad citostática, citotóxica y antineoplásica.

La importancia de estos nuevos compuestos radica que en un futuro puedan emplearse como fármacos antineoplásicos efectivos; hoy se encuentran en una fase de evaluación preclínica. En particular la Casiopeina III ha demostrado tener un alto potencial antineoplásico en líneas de carcinoma cervico-uterino (SiHa y HeLa).

Actualmente en México el cáncer ocupa el segundo lugar de muerte en la población, por lo que es necesario el desarrollo de nuevos fármacos que puedan controlar la enfermedad, con ventaja de producir menos reacciones adversas al paciente.

También se requiere de métodos analíticos validados para poder determinar la cantidad de fármaco que se encuentra en el organismo, en sangre, plasma y orina, para conocer la farmacocinética del fármaco, y los procesos de los que depende que los fármacos alcancen el plasma, luego su sitio de acción y finalmente sean eliminados.



Por lo anterior en este trabajo se establecerá un método analítico para determinar Casiopeina IIII por HPLC en orina, el cual se optimizará y validará para contar con la evidencia documentada sobre la confiabilidad del método analítico.

Además se realizará la aplicación del método analítico, en un estudio preliminar de monitoreo en orina de rata, a las que se les administrará Casiopeina IIII por vía intravenosa en una dosis de 9 mg/Kg.

El método analítico para determinar Casiopeina IIII en orina se va a emplear en un estudio preliminar en ratas para obtener parámetros farmacocinéticos como el $t_{1/2}$ y la K_e de Casiopeina IIII.

1.2 OBJETIVOS

- ❖ Optimizar y validar el método analítico para cuantificar Casiopeina IIII en orina por HPLC y detección UV.

- ❖ Aplicación del método analítico en un estudio preliminar de la Casiopeina IIII en ratas para obtener parámetros farmacocinéticos.



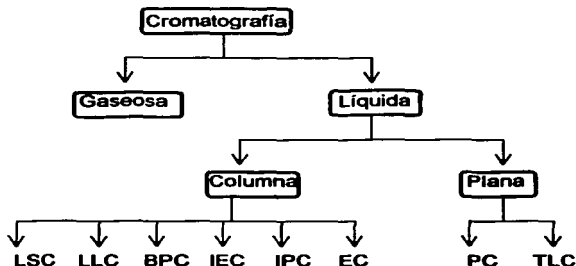
ANTECEDENTES



2. ANTECEDENTES

2.1 CROMATOGRAFÍA:

La cromatografía es esencialmente un método físico de separación en el que los componentes se distribuyen en dos fases llamadas fase móvil y fase estacionaria. Si a este sistema se le introduce una mezcla de sustancias solubles en la fase estacionaria, estas avanzarán por la misma empujadas por la fase móvil, si las sustancias que componen la mezcla interactúan en distinta magnitud con la fase estacionaria, estas avanzarán por el sistema con distinta velocidad, produciéndose así una separación de las mismas. En la figura 1 se muestran la clasificación de los métodos cromatográficos. Existen varios tipos de cromatografía de líquidos: cromatografía de absorción, cromatografía de reparto, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión y cromatografía de afinidad.



LSC Cromatografía líquido-sólido, LLC Cromatografía líquido-líquido, BPC. Cromatografía en fase ligada, IEC Cromatografía de intercambio iónico, IPC Cromatografía por iónico, EC Cromatografía de Exclusión, PC Cromatografía en papel, TLC Cromatografía en capa delgada.

Figura 1 Clasificación de métodos cromatográficos

2.1.1 CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA EFICIENCIA

Esta técnica consiste en hacer pasar una fase móvil líquida constituida por un disolvente adecuado, que arrastra previamente a la muestra (sólida o líquida) a una presión más elevada a través de una columna que contiene la fase estacionaria. Este tipo de cromatografía está alcanzando una amplia difusión ya que es muy rápida, se pueden separar mezclas muy complejas, compuestos termolábiles y se logra resolución de sustancias con un amplio margen de pesos moleculares.

El equipo de cromatografía de HPLC contiene:

Bombas. Su función es suministrar la presión adecuada sobre la columna para que alcance un caudal suficiente a su salida.

Inyectores. Hay varios tipos, de bucle y los inyectores automáticos.

Columnas. Se clasifican de acuerdo a la constitución y características de relleno.

Sistema de detección. Se encuentra a la salida de la columna, origina una señal eléctrica continua, que es amplificada y registrada. Un detector ideal debe cumplir ciertas condiciones tales como: respuesta universal con todos los solutos, sensibilidad alta, ruido de fondo del detector sea bajo, no debe ser destructivo con la muestra, debe ser capaz de funcionar por un tiempo prolongado.

Dentro los detectores más utilizados en cromatografía se encuentran :detectores espectrofotométricos, detectores de diodos en serie y espectrómetro de masas.

2.2 CASIOPEINAS

Son un grupo de compuestos inorgánicos que contienen cobre II como centro metálico quelatos diminas (NN) con aminoácido(N-O) o donadores (O-O). Los compuestos de coordinación estudiados de esta familia, han demostrado tener actividad citotóxica, citostática in Vivo e in Vitro y antineoplásica⁽¹⁾

Se ha demostrado que las casiopeinas inhiben el crecimiento celular in Vitro en células tumorales humanas HeLa y CaLo, mostrando una curva dosis respuesta similar a la Mitomicina C y al cisplatino. Además la dosis letal 50 y los estudios de toxicología indican que las casiopeinas son menos tóxicas⁽²⁾

El diseño de los compuestos se realizó considerando varios parámetros como son:

El metal, su estado de oxidación y el número de coordinación del mismo, con respecto a los quelantes se consideró su capacidad quelante y el grado de hidrofobicidad e hidrofiliidad de los mismos.

Las casiopeinas han sido identificadas plenamente por IR, UV, RPE, rayos X y se encuentran patentadas. Se encuentran clasificadas en nueve familias de acuerdo a sus sustituyentes y estructura.

Estos compuestos fueron sintetizados en la FQ UNAM por la Dra. Lena y colaboradores en la búsqueda de nuevos compuestos antineoplásicos. Para el diseño de las casiopeinas se tomó como base al cisplatino, sin embargo necesitaba que las casiopeinas tuvieran un espectro más amplio de actividad, mayor actividad clínica antitumoral y disminución de efectos secundarios.

Para que un compuesto de coordinación tenga actividad antineoplásica se debe de cumplir con los siguientes postulados:

1. En las reacciones con moléculas biológicas intercambiar rápidamente solo alguno de sus ligantes.
2. Los complejos deben ser eléctricamente neutros, aunque la forma activa puede estar cargada después de intercambiar algún ligante en la especie viva.
3. Son necesarios dos ligantes cis monodentado o uno bidentado como grupos salientes. Los isómeros trans son inactivos.
4. Las velocidades de intercambio de estos ligantes le dan intervalos específicos de labilidad a cada compuesto.
5. Los ligantes no intercambiables en las moléculas deben estar fuertemente enlazados.

De los más de 100 compuestos sintetizados de la familia de casiopéinas, actualmente las casiopéinas I, II, III han demostrado tener actividad antineoplásica in vivo⁽²⁾ en los ensayos exigidos dentro del panel de cerramiento sugerido por el Cáncer Chemotherapy National Service Center del Instituto Nacional de Cancerología de los Estados Unidos y que contempla el uso de líneas tumorales murinas transportables en cepas singénicas del ratón⁽³⁾.



Efecto del metabolismo sobre las casiopeinas

Existen evidencias que las casiopeinas son activadas por las enzimas del metabolismo. Se ha descrito que los metales de transición y algunos de sus complejos son tóxicos en diferentes organismos, y dicha toxicidad se debe a los iones metálicos especialmente a los iones de Hierro y Cobre.

- A) Su potencial para participar en reacciones de Fenton
- B) Oxidación de ácidos grasos en las membranas celulares
- C) Oxidación de los grupos (-SH) a disulfuro (S-S)

Algunas casiopeinas han mostrado generar especies reactivas de oxígeno (ERO), además los compuestos de cobre están relacionadas con la reacción de Fenton en la cual se puede generar el radical hidroxilo. ⁽⁶⁾

2.2.1.CASIOPEINA IIII

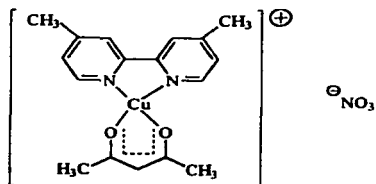


Figura 2 Estructura de la Casiopeina IIII

La Casiopeina III se muestra en la figura. 2 presenta un ligante bidentado donador de oxígenos y un ligante bidentado donador de nitrógenos, tiene una geometría cuadrado plano.

De la Casiopeina III se conoce lo siguiente:

Se encuentra en su fase preclínica con un alto potencial antineoplásico en líneas de carcinoma cervico-uterino HeLa (células de adenocarcinoma de cervix) y SiHa (carcinoma de células escamosas, de cervix). (7)

La dosis letal 50 (DL50) en ratón es de 14.6 mg/kg por vía intraperitoneal⁽⁴⁾
Su longitud de onda máxima absorción es 296.2nm⁽⁴⁾

Estabilidad: a temperatura ambiente en plasma 12hrs.

En refrigeración 72hrs

En solución salina es estable por 9 días

En dextrosa por 4 días

En solución de Harman 3 semanas⁽¹⁸⁾

Farmacocinética de Casiopeina III en conejos⁽⁸⁾

Modelo de un compartimiento MAUC

ABC: 25826.2 mgmin/ml

Ke= 0.016min⁻¹

TMR = 66.95 minutos

Farmacocinética de Casiopeina III en ratas⁽⁹⁾

Modelo de un compartimiento MAUC

ABC: 11074.79mgmin/ml

Ke= 0.014min⁻¹

TMR = 49.18 minutos

La toxicidad esta regida aparentemente por el donador de N-N y los compuestos que poseen acetilacetato como segundo ligante⁽¹⁴⁾. Interacciona por el DNA Lineal⁽¹⁶⁾

Es muy soluble en agua así como en metanol. También es soluble en soluciones fisiológicamente compatibles: cloruro de sodio NaCl al 0.9%. Dextrosa al 5%⁽¹⁶⁾. Su coeficiente de partición es de 0.01364⁽¹⁶⁾

Notablemente activa contra leucemia linfóide LI210, lo cual dio la pauta para evaluar su actividad empleando la Leucemia viral felina. En los gatos tratados se observó que la Casiopeina III es capaz de revertir a números normales todos los parámetros sanguíneos de la fórmula blanca⁽¹⁶⁾.

Hay evidencia que esta Casiopeina III actúa como inhibidor de la fosforilación oxidativa, cuando se realizaron estudios en mitocondrias de hígado de rata⁽¹¹⁾. Se ha demostrado que tiene propiedades citostáticas y antineoplásicas en modelos tumorales murinos.⁽¹²⁾

En la línea celular SPDB demostró ser un agente altamente recombinogénico, por lo cual su mecanismo de acción puede ser por inhibición de las topoisomerasas I y II.⁽¹³⁾ Induce acción recobinogénico débil en *Drosophila*⁽¹³⁾

2.3 CÁNCER

El cáncer es el resultado de la proliferación de una familia o de una clona de células anormales⁽¹⁴⁾. Los aspectos característicos que definen la neoplasia son: el crecimiento celular no regulado por señales externas (es decir, autónomo) y la capacidad de invadir tejidos y metastizar, colonizando lugares a distancia⁽¹⁷⁾

Se agrupa bajo el término de cáncer las afecciones en las cuales un conjunto de células, en el seno de un organismo pluritular, escapa a los mecanismos de regulación que aseguran un equilibrio entre los tejidos compatibles con la vida⁽¹⁸⁾



Características de las células cancerosas

Es importante mencionar que las propiedades cariotípicas, antigénicas y metabólicas de las células neoplásicas se modifican en el curso de la evolución de la neoplasia. El pleomorfismo y la variabilidad son las propiedades más constantes de las células cancerosas.

En la tabla 1 se indican las características morfológicas de las células cancerosas y en la tabla 2 se indican las alteraciones metabólicas de las células cancerosas.

Tabla 1

Características morfológicas de la célula cancerosa
Núcleo voluminoso
Relación núcleo citoplasma elevada
Mitosis anormales y frecuentes
Glicocolix engrosado



Tabla 2

Características metabólicas de la célula cancerosa
Fenómeno de Warburg (acumulación de ácido láctico)
Anomalías cuantitativas de las enzimas celulares normales
Trastornos en la inducción enzimática
Síntesis excesiva de: inmunoglobulinas, hormonas
Síntesis de moléculas de tipo embrionario:
α-feto proteína, antígeno carcinogénico
Síntesis con moléculas con actividad hormonal.

La forma en que una sustancia provoca cambios en la célula y la transforma en célula neoplásica, no ha sido totalmente comprendida. Hoy se sabe que el cáncer es un fenómeno que se lleva a cabo en dos tiempos, la conversión y el desarrollo neoplásico, mismos que a su vez abarca tres etapas. Iniciación, promoción, progresión. En la figura 3 se indican las etapas de un proceso carcinogénico las que se describen a continuación.

Iniciación: Se refiere a la alteración de la capacidad de proliferación de una célula como resultado de una mutación en uno de los genes que lo controlan. Es el resultado de la exposición del tejido a una forma activada del cancerígeno que ocasiona la aparición de proliferaciones focales⁽¹⁸⁾ Los cambios al DNA pueden ser inducidos por una gran variedad de sustancias químicas, virus y agentes físicos⁽²⁰⁾

Promoción: El agente promotor va a estimular el crecimiento celular anormal.

Conversión: Aparición de subclonas que le confieren heterogeneidad celular al tumor. Lo anterior es debido a que las células tumorales son menos estables que las

células normales, debido a la activación o supresión de algunos genes, la presencia de carcinógenos y los mecanismos de reparación DNA anormales⁽²⁸⁾

Progresión: Son todos los cambios en la naturaleza de la neoplasia, después de que ésta ha alcanzado su autonomía. Los cambios incluyen transformación en neoplasia maligna, capacidad de producir metástasis y variaciones morfológicas⁽²⁹⁾

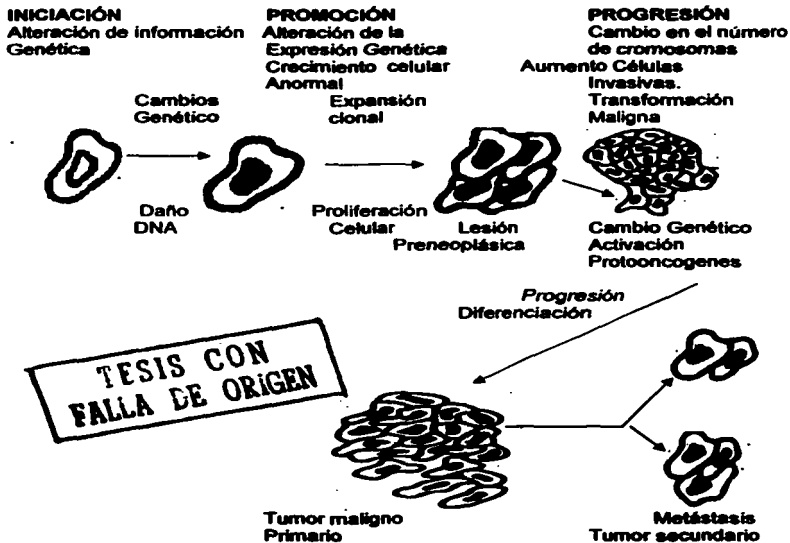


Figura 3 Etapas de un proceso carcinogénico.

Debido que la inmunoterapia se encuentra aún en la etapa experimental, las únicas formas de tratamiento aceptadas hoy en día son: cirugía, radioterapia y quimioterapia.

Cirugía

Ha sido por muchos años la forma de tratamiento curativo y desempeña un papel importante en la paliación. Sin embargo la cirugía es un tratamiento local y es capaz de curar solamente aquella enfermedad que este localizada en el tejido de origen y en los ganglios linfáticos regionales. Cuando no hay metástasis, una cirugía adecuada puede ser considerada como el principal tratamiento curativo.

Radioterapia

La radioterapia puede definirse como el uso terapéutico de las radiaciones ionizantes. Se origino a finales del siglo XIX consecuentemente a los descubrimientos de Roentgen y Becquerel. En los principios del siglo XX se trataron con éxito algunos tumores malignos.

Los tipos de radiaciones ionizantes que se usan más comúnmente en la medicina moderna son radiaciones electromagnéticas (rayos X, rayos gamma) y electrones. La dosis de irradiación se define como la energía absorbida por unidad de masa y se expresa en rads o grays. La dosis requerida para controlar un tumor varia con la radiosensibilidad de cada tumor en particular. Esta dosis se administra durante un tiempo específico generalmente de 3 a 5 fracciones por semana.

Durante la radioterapia el paciente puede presentar nauseas, vómitos, leucopenias, adelgazamiento de la piel irradiada, trastornos de pigmentación. Cuando se administran dosis altas (por encima de los 6.000 rad) el daño vascular tardío es generalmente grave, en particular para órganos como pulmón, riñón e hígado que son más susceptibles (21).

Quimioterapia

La quimioterapia del cáncer se ha ido desarrollando hasta adquirir hoy en día un papel importante en la paliación de muchos tumores y en la curación de algunos. Actualmente la quimioterapia es una de las modalidades principales de tratamiento contra el cáncer. Los principales agentes anticancerígenos clasificados según su mecanismo de acción.⁽²¹⁾, se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3 Agentes anticancerígenos.

Agentes alquilantes

Mostazas nitrogenadas (clorambucil, ciclofosfamida, menfalán)

Etileniminas (TEM, tioTEPA)

Esteres del ácido sulfúrico (Busulfán)

Epóxidos (píposulfan)

Antimetabolitos

Análogos del ácido fólico (methotrexate)

Análogos de purinas (8- mecapurina)

Análogos de pirimidinas (citosin-arabinósido, 5 azauridina)

Pirimidinas Halogenadas (5 fluoruracilo)

Antagonistas de la glutamina (azaserina)

Inhibidores del uso mitótico

Colchicina

Vincristina

Vinblastina

Antibióticos antitumorales

Actinomicina D

Mitramicina

Daunomicina
Adriamicina
Bleomicina

Hormonas

Andrógenos (propionato de testosterona, metiltestosterona)
Estrógenos (benzoato de estradiol, etinil estradiol)
Agentes progestágenos (capronato de progesterona, acetato de medroxiprogesterona)
Corticosteroides (prednisona, prednisolona)
Hormonas tiroideas (triyodotironina)
Antiestrogénos (tamoxifen)

Miscelánea

Enzimas antiproliferativas (l - asparginina)
Nitrosoureas (estreptozotocina)
Compuestos inorgánicos del platino (cis-diaminoplatino)
Otros(procarbazona, hidroxiurea, imidazol, carboxamida).

Hay varios mecanismos de acción de los fármacos anticancerígenos por ejemplo, los que actúan sobre DNA, interfieren en la biosíntesis de DNA y RNA, los que interfieren con el uso mitótico, los que inhiben la producción de esteroides. A continuación se presentan en la figura 4 los mecanismos de acción de fármacos anticancerígenos a nivel celular.

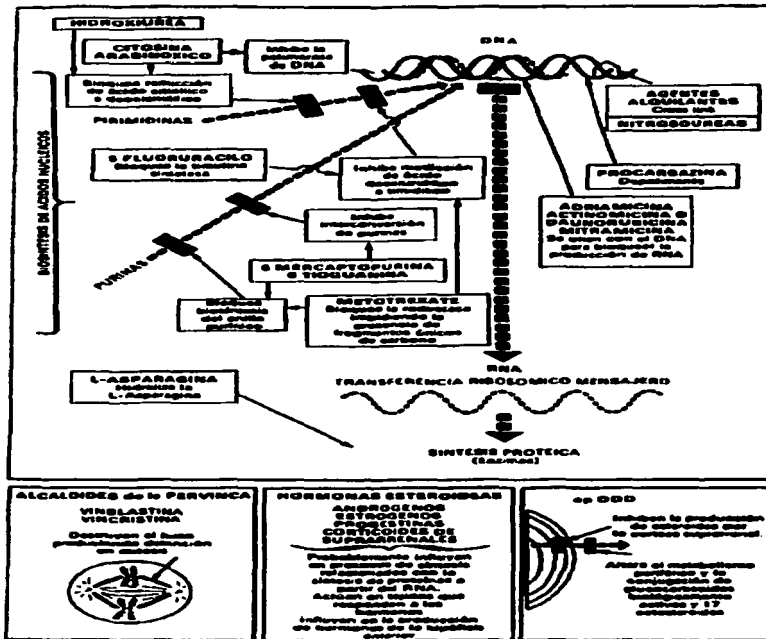


Figura 4 Mecanismo de acción de fármacos anticancerígenos a nivel celular. (21)

**TESIS CON
FALTA DE ORIGEN**



Los efectos colaterales de la quimioterapia aparecen exclusivamente con algunos determinados fármacos, por lo que es oportuno tomar precauciones antes de proceder a su administración. Entre los efectos adversos se conoce:

Náuseas y vómitos. Se presenta en diverso grado con casi todos los fármacos antineoplásicos, especialmente con la actinomicina D, adriamicina, cisplatino, y mecloretamina.

Estomatitis. Se asocia frecuentemente a la administración de actinomicina C, 5-flouracilo y methotrexate.

Alopecia. Se asocia frecuentemente a la administración de actinomicina D, adriamicina, cisplatino, bleomicina, ciclofosmida 5-flouracilo, hidroxiaurea, mitomicina y vincristina. La pérdida de cabello es reversible en la totalidad de los casos tras suspender la administración de los fármacos.

Algunos de los fármacos son también potentes irritantes entre las sustancias que pueden causar lesiones en los tejidos son: actinomicina D, adriamicina, decarbazina, mitomicina, vinblastina y vincristina⁽²²⁾

Inmunoterapia

Se sabe que los factores inmunológicos desempeñan papeles variados tanto en el desarrollo como en la terapia del cáncer en animales. Se ha demostrado que en animales que aun con una carga tumoral pequeña, ya es demasiado para que los factores inmunológicos los destruyan.



Las aplicaciones en humanos sugieren que la inmunoterapia puede desempeñar algún papel, destruyendo cantidades pequeñas de células, generalmente después de que se hayan completado otros tratamientos. ⁽²¹⁾

Incidencia y mortalidad

En el comienzo del siglo XX, las enfermedades infecciosas, tuberculosis y varias enfermedades de los pulmones eran causas principales de muerte en la mayoría de los países. Actualmente, en los países desarrollados con un servicio sanitario eficiente, son las enfermedades cardíacas y los neoplasmas malignos los que producen la tasa más alta de muerte.

La tasa promedio de mortalidad por cáncer en países desarrollados es más alta en hombres que en mujeres. En el hombre hay una mayor frecuencia de cánceres de baja curabilidad (cáncer de pulmón, cáncer gástrico), mientras que en la mujer los cánceres más comunes son razonablemente curables si se pronostican a tiempo (cáncer de seno, cáncer uterino). ⁽²¹⁾

En la tabla 4 y tabla 5 se muestran las principales causas de mortalidad de mujeres y hombres en el año 2000 en México.



Tabla 4 Principales Causas de Mortalidad en la Mujer (2000)⁽²¹⁾

Número de orden	Causa	Defunciones	Tasa1/	%
Total		192 593	383.5	100
1	Diabetes mellitus	25717	51.12	13.4
2	Enfermedades isquémicas del corazón	19908	39.6	10.3
3	Enfermedad cerebrovascular	13383	26.6	6.9
4	Afecciones originadas por el periodo prenatal	8104	16.1	4.2
5	Enfermedad pulmonar	6750	13.4	3.5
6	Infecciones respiratorias agudas bajas	6585	13.1	3.4
7	Enfermedades hipertensivas	5916	11.8	3.1
8	Cirrosis y enfermedades crónicas de hígado	5819	11.6	3.0
9	Nefritis y Nefrosis	4761	9.5	2.5
10	Tumor maligno del cuello de útero	4604	9.2	2.4
11	Desnutrición calórico proteica	4513	9.0	2.3
12	Tumor maligno de mama	3432	6.8	1.8
13	Accidentes automovilísticos	2917	5.8	1.5
14	Enfermedades infecciosas intestinales	2566	5.1	1.3
15	Tumor maligno de hígado	2267	4.5	1.2
16	Tumor maligno de estómago	2 238	4.5	1.2
17	Tumor maligno de tráquea, bronquios pulmón	1994	4.0	1.0
18	Anemia	1679	3.3	0.9
19	Malformaciones congénitas del corazón	11 641	3.3	0.9
20	Leucemia	1559	3.1	0.8

Fuente. Elaborado a partir de la base de datos de defunciones INEGI/SSA 2000.
1/Tasa por 100 000 mujeres

Tabla 5. Principales Causas de Mortalidad en Hombres, (2000)⁽²¹⁾

Número de orden	Causa	Defunciones	Tasa1/	%
Total		242781	491.9	100.0
1	Enfermedades isquémicas del corazón	23842	48.3	9.8
2	Diabetes mellitus	20808	42.2	8.6
3	Cirrosis y enfermedades crónicas del hígado	19558	39.6	8.1
4	Enfermedades cerebrovasculares	11973	24.3	4.9
5	Afecciones en periodo prenatal	11257	22.8	4.6
6	Accidentes automovilísticos	10835	22.0	4.5
7	Agresiones (homicidio)	9349	18.9	3.9
8	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica	9140	18.5	3.8
9	Infecciones respiratorias agudas bajas	7625	15.4	3.1
10	Nefritis y nefrosis	5021	10.2	2.1
11	Desnutrición calórico proteica	4350	8.8	1.8
12	Tumor maligno de tráquea, bronquios y pulmón	4230	8.6	1.7
13	Uso de alcohol	3951	8.0	1.6
14	Tumor maligno de próstata	3835	7.8	1.6
15	Enfermedades hipertensivas	3831	7.8	1.6
16	SIDA	3555	7.2	1.5
17	Suicidios	2923	5.9	1.2
18	Tumor maligno de estómago	2742	5.6	1.1
19	Enfermedades infecciosas intestinales	2641	5.4	1.1
20	tuberculosis	2233	4.5	0.9

Fuente. Elaborado a partir de la base de datos de defunciones INEGI/SSA 2000.

1/Tasa por 100 000 habitantes.

En el descubrimiento y desarrollo del tratamiento contra el cáncer los esfuerzos actuales en investigaciones son más diversos que nunca, están siendo dirigidos a biología molecular y áreas relacionadas que permitan comprender completamente el desarrollo del proceso maligno.⁽²²⁾

La esperanza del avance en el resultado del tratamiento para la mayoría de los pacientes con enfermedad metastática reside en la investigación destinada a descubrir nuevos agentes terapéuticos que reconozcan diferencias en los blancos moleculares entre las células normales y tumorales, y en el empleo efectivo del tratamiento para erradicar la enfermedad⁽²³⁾

La mayoría de los agentes antineoplásicos han sido descubiertos por medio de "screening" o mediante modificaciones químicas de los principales compuestos hallados en los estudios del cáncer. Estos compuestos pueden ser sintetizadas químicamente o extraídos de plantas, microorganismos o fuentes animales marinas.

El descubrimiento de los complejos de platino como agentes antiproliferativos con notable actividad clínica fue de gran importancia, ya que el cis-platino es un fármaco antineoplásico utilizado comúnmente. En 1965 Rosenberg observó que una corriente eléctrica que pasaba a través de electrodos de platino podía inhibir la división celular de la bacteria *E. Coli*.

Este descubrimiento se confirmó después con estudios de platino en modelos de tumor murino. Se demostró que tenía actividad antitumoral en pacientes con neoplasias avanzadas, pero la excesiva toxicidad inicial (nefrotoxicidad) propició serios debates entre los investigadores clínicos. La demostración de que la hidratación adecuada y la infusión lenta reducía el grado de toxicidad renal permitió la evaluación del agente. Se aprobó el fármaco seis años después del ensayo clínico. ⁽²³⁾



2.4 MÉTODOS REPORTADOS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE CASIOPEINA IIII POR HPLC EN MUESTRAS BIOLÓGICAS.

Para cuantificar Casiopeina IIII en muestras biológicas por HPLC, se encuentran reportados dos métodos. En el primer método se extrae Casiopeina IIII en plasma de rata y en el segundo método se extrae Casiopeina IIII de sangre total. Ambos métodos fueron desarrollados y validados por la M en C Inés Fuentes Noriega (28)

Para la cuantificación de Casiopeina IIII en orina no se encontró reportado métodos, sin embargo se realizó la optimización a partir, de las condiciones cromatográficas establecidas en el método para cuantificar Casiopeina IIII en plasma.

El método analítico para determinar Casiopeina IIII en plasma, previamente desarrollado y validado, requirió de una optimización para obtener mejores parámetros de simetría de pico ≤ 2 , y tiempo de retención de la Casiopeina IIII.

También se requirió optimizar el método para obtener % de recobro más altos y disminuir el límite de cuantificación previamente reportado para el método en plasma (5 μ g/ml), para realizar la aplicación del método en un estudio preliminar de Casiopeina IIII en orina de ratas, para obtener parámetros como $t_{1/2}$ y K_e eliminación.

Para la extracción de Casiopeina IIII en orina, se realizó la optimización del método, a partir del método de extracción de Casiopeina IIII en plasma; porque la matriz biológica empleada (orina), presenta un número mayor de picos en el cromatograma de blanco de orina, los cuales pueden interferir en la cuantificación de Casiopeina IIII en orina, si no se realiza una técnica de extracción adecuada que nos permita tener una muestra más limpia. Lo anterior lo logramos al establecer en el método de extracción de Casiopeina IIII en orina un ciclo más de centrifugación (ver figura 5). Para la optimización del método analítico para cuantificar Casiopeina IIII en orina se realizaron cambios en longitud de onda, proporción de fase móvil, composición de fase móvil, pH solución amortiguadora de fosfatos 0.01M, cambio de columna, y de estándar interno.

2.5 VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Es el proceso por el cual queda establecido, por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas, es decir cumple con su propósito⁽²⁴⁾. La validación proporciona la confirmación documental de que los resultados obtenidos por medio del método son confiables⁽²⁵⁾

Se debe llevar a cabo la validación una vez establecidas las condiciones analíticas e incluir como mínimo los parámetros que se describen a continuación:

Especificidad. Capacidad de un método analítico para obtener una respuesta debida únicamente al analito de interés y no a otros componentes de la muestra

Linealidad. Habilidad para asegurar que los resultados obtenidos directamente o por medio de una transformación matemática definida, son proporcionales a la concentración del analito, dentro de un intervalo determinado.

Precisión. Grado de concordancia entre resultados analíticos individuales, cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea.

Repetibilidad. Precisión de un método analítico, expresada como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizada por un solo analista, usando los mismos instrumentos.

Reproducibilidad. Precisión de un método analítico, expresada como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas por diferentes laboratorios.



Exactitud Concordancia entre un valor obtenido empleando el método y el valor de referencia.

Límite de cuantificación. Concentración mínima del analito, que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptables bajo las condiciones de operación establecidas.

Límite de detección. Concentración mínima del analito en una muestra, que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, bajo las condiciones de operación establecidas.

Estabilidad. Se determina las condiciones de temperatura y tiempo entre otros, en la que el compuesto permanezca estable en la matriz biológica, durante su manejo, almacenamiento y procesamiento⁽²⁶⁾.

Tolerancia. Es la capacidad del método analítico para obtener resultados precisos y exactos ante variaciones pequeñas pero deliberadas, en sus parámetros y condiciones de trabajo y que proporciona una indicación de su confiabilidad durante su uso normal.

Recuperación absoluta. Se refiere a la eficiencia de un método analítico para cuantificar el o los compuestos por analizar en la muestra biológica.

MATERIALES Y METODOS



3.MATERIALES Y METODOS

3.1MATERIAL

3.1.1 Equipos

Balanza analítica Mettler modelo H54AR

Balanza Ohaus Serie no. 21975

Centrifuga Eppendorf modelo 5416

Centrifuga sigma modelo 215

Vortex Thermolyne Modelo M37G15 Serie 871990647059

Equipo para filtración de agua Millipore Milli-Q Water Sistem No1058892

Equipo para filtrar disolventes Millipore

Sonicador Fisher-scientific FS60

Filtros HA millipore

Filtros nylon 0.45 micras

Potenciómetro Orion –Reseach Número 3458

Jeringas 3ml

Cromatógrafo de líquidos Shimadzu

Bomba Shimadzu , Modelo LC-10ADVP

Detector UV-Vis Shimadzu- Modelo SPD-10AVP

Autoinyector, Shimadzu. Modelo SIL-10ADVP

Integrador Shimadzu Modelo SCL-10AVP

Computadora, COMPAQ- PRESARIO, Modelo 4102

Software Shimadzu, Class-vp500

Impresora LasserJet HP plus



3.1.2 Estándares

Casiopaina IIII, lote: 33MRGO50402 proveedor Lab. de Química Inorgánica Facultad de Química , UNAM.

Solución A Cu 4-4' dimetil/ metanol Lab. de Química Inorgánica Facultad de Química , UNAM.

Solución B Cu acetilacetato / metanol Lab. de Química Inorgánica Facultad de Química UNAM.

3.1.3. Reactivos

Ranitidina Clorhidrato, estándar secundario. Lote RH1032001254, Lab. IAVAX Pharmaceuticals, Mexicana S. A. De C. V.

Metanol HPLC lote :GFOS04/20/03 Tecno LAB

Fosfato de Sodio monobásico monohidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) R. A. J .T Baker Lote k15460

Fosfato de sodio dibásico dodecahidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$) R .A. J. T. Baker. Lote HO5461.

Hexansulfonato de sodio grado HPLC lote P135-2 registro Technology Inc.

Agua grado HPLC

Solución Reguladora (bifalato) pH 4 lote VA9001. R. A. J .T Baker

Solución Reguladora (fosfatos) pH 7 lote X04COS. R. A. J .T Baker

Solución Reguladora (Borato) pH 10 lote X19C13. R. A. J .T Baker



3.1.4. Soluciones

- A. Solución Amortiguadora de fosfatos 0.01M, pH 6.7
- B. Solución patrón Casiopeina IIII en agua concentración 1000 µg/ml
- C. Solución patrón Casiopeina IIII en orina concentración 1000 µg/ml
- D. Solución patrón Casiopeina IIII en orina concentración 500 µg/ml
- E. Solución patrón clorhidrato de Ranitidina en metanol concentración 100µg/ml
- F. Solución Clorhidrato de Ranitidina en metanol concentración 5µg/ml
- G. Solución de Hexansulfonato de sodio 0.005M en agua.

3.1.5.Preparación de soluciones.

- A. Solución Amortiguadora de fosfatos 0.01M, pH 6.7**

Transferir 0.4230 g Fosfato de Sodio monobásico monohidratado y 0.6927 g de Fosfato de sodio dibasico dodecahidratado a un matraz volumétrico de 0.5L, disolver y llevar a su volumen con agua desionizada y destilada. Transferir la solución a un vaso de precipitado para medir el pH. Filtrar la solución al vacío por medio de una membrana millipore de 0.45µm.

- B. Solución patrón Casiopeina IIII en agua concentración 1000 µg/ml**

Pesar con exactitud 10mg de Casiopeina IIII (0.0100g) y colocarlos en un matraz volumétrico de 10 ml, disolver y aforar con agua desionizada

C. Solución patrón Casiopeina IIII en orina concentración 1000 µg/ml

Pesar con exactitud 10mg de Casiopeina IIII (0.0100g) y colocarlo en un matraz volumétrico de 10 ml, disolver en mínima cantidad de agua, aforar con orina.

D. Solución patrón Casiopeina IIII en orina concentración 500 µg/ml

Tomar una alícuota de 5ml de la solución stock Casiopeina IIII en orina 1000 µg/ml y transferirla a un matraz volumétrico de 10 ml.

E. Solución patrón clorhidrato de Ranitidina en metanol concentración 100µg/ml

Pesar con exactitud 0.001g de clorhidrato de Ranitidina y colocarlo en un matraz volumétrico de 10ml, aforar con metanol.

F. Solución clorhidrato de Ranitidina en metanol concentración 5 µg/ml

Tomar una alícuota de 2.5ml de la solución de clorhidrato de Ranitidina 100µg/ml y colocarla en un matraz volumétrico de 50ml, aforar a su volumen final con metanol.

G. Solución de Hexansulfonato de sodio 0.005M en agua.

Pesar 0.094g de hexansulfonato de sodio y colocarlo en un matraz volumétrico de 100 ml aforar a su volumen final con agua desionizada. Filtrar la solución al vacío a través de una membrana millipore de 0.45 µm.



3.1.6. Preparación de la curva de calibración de Casiopeina IIII en agua se muestra en la tabla 6.

Tabla 6

Concentración Casiopeina IIII $\mu\text{g/ml}$	Volumen μl Solución patrón Casiopeina IIII (Solución B)	Volumen final de la Solución ml
30	300	10
20	200	10
14	140	10
10	100	10
6	60	10

3.1.7 Preparación de la curva de calibración de Casiopeina IIII en orina se muestra a continuación en la tabla 7.

Tabla 7

Concentración Casiopeina IIII $\mu\text{g/ml}$	Volumen μl Solución Patrón Casiopeina IIII	Volumen final de la Solución ml
30	30 μl Sol. C	1
20	20 μl Sol C	1
14	28 μl Sol D	1
10	20 μl Sol. D	1
6	12 μl Sol D	1

3.2 OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAR CASIOPEINA IIII POR HPLC.

Se realizó la optimización del método a partir de las condiciones cromatográficas establecidas previamente para determinar Casiopeina IIII en plasma y sangre total.⁽²⁹⁾

3.2.1 Selección de la longitud de onda máxima de absorción .

Se realizó un barrido de Casiopeina IIII de la región del 200 a 400nm, en UV con el fin de identificar la λ máxima de Absorción.

Se prepararon tres soluciones de Casiopeina IIII 5, 15 y 25 $\mu\text{g/ml}$ y se leyeron a 254, 262, 296 y 274 nm., para determinar la mejor longitud de onda de Casiopeina IIII para este método.

3.2.2. Elección de la composición de la fase móvil y pH

La fase móvil de Metanol/ fosfatos 0.01M en proporción 40:60 v/v se evaluó bajo diferentes condiciones pH de la solución de fosfatos pH 4, 5, 5.3, 6, 6.2 y 6.7.

La composición de la fase móvil y pH, se seleccionó de acuerdo a las siguientes respuestas cromatográficas donde se obtuviera parámetros cromatograficos óptimos de simetría y tiempo de retención de la Casiopeina IIII., considerando como la mejor respuesta aquella donde la simetría tuviera un valor ≤ 2.0 y Tr 5.2 minutos.

3.2.3 Selección de la proporción de Fase Móvil para el método de Casiopeina IIII en orina.

Se evaluó el comportamiento de Casiopeina IIII en diferentes proporción de fase móvil , las diferentes proporciones empleadas se muestran en la tabla 6.

Tabla 8

Fase Móvil	Proporción Metanol	Proporción solución fosfatos 0.01M	Proporción Hexansulfonato de sodio 0.005M
FM1	40	60	-
FM2	60	40	-
FM3	35	65	-
Fm4	30	70	-
Fm5	30	65	5

La proporción de la fase móvil para el método de Casiopeina IIII en orina, se selecciono, como la mejor fase aquella donde la simetría tuviera un valor ≤ 2.0 .

3.2.4 Elección de la columna Cromatográfica.

Se probaron tres columnas cromatográficas de fase reversa, se seleccionó aquella que permitiera una simetría de pico ≤ 2.0 , una resolución de los picos de Casiopeina IIII en orina ≥ 1.5 y un Tr Casiopeina 6.8 minutos.

- ◆ Symmetry C18
- ◆ Hypersil Elite C18
- ◆ Terno Hypersil-Keystone C18.



3.2.5. Método de extracción para Casiopeina IIII en orina.

Se siguió el siguiente método de extracción sólido-líquido (figura 5), para cada punto de la curva de Casiopeina IIII en orina., que se preparó según lo indicado en la tabla 7.

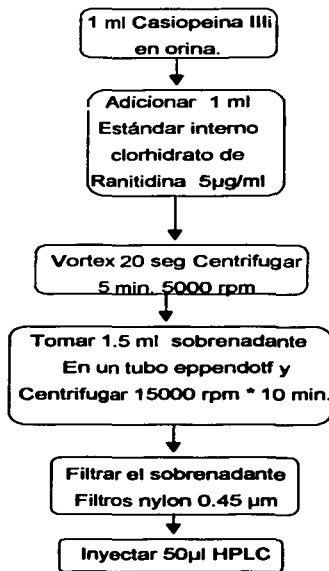


Figura 5 Diagrama de flujo del método de extracción.

El método de extracción para Casiopeina IIII en orina fue desarrollado en base al establecido previamente para de determinación de Casiopeina IIII en plasma ⁽²⁸⁾. Dentro de los cambios efectuados a la técnica de extracción se tienen los siguientes:

Cambio del estándar interno naproxeno por clorhidrato de ranitidina, ya que el naproxeno da una señal que interfiere de los picos del blanco de orina.

Se realizó un ciclo más de centrifugación en tubo eppendorf a 15000 rpm * 10 minutos con el objeto de limpiar la muestra de orina, y evitar así interferencias en blanco de orina.

3.3 Condiciones cromatográficas.

Las condiciones cromatográficas obtenidas después de que se realizó la optimización del método analítico son las siguientes:

Columna: Termo Hyper#-Keystone C18, dimensiones 250 x 4.6mm, tamaño de partícula 5µm.

Fase móvil: Metanol/ Solución Amortiguadora de Fosfatos (0.01M pH 6.7)/ Hexansulfonato de sodio 0.005M en proporción 30:65:5 v/v.

Flujo: 0.8 ml / min.

Longitud de onda: 274nm

Estándar interno: Clorhidrato de ranitidina 2.5 µg/ml

Volumen de inyección: 50µl

Tiempo de corrida: 13 minutos

Precolumna: Phenomenex Part. KJO-4282, con filtro C-18.



3.4. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA CUANTIFICAR CASIOPEINA IIII EN ORINA POR HPLC.

3.4.1. VALIDACIÓN DEL SISTEMA

3.4.2. Linealidad.

Se demostró la linealidad del sistema preparando una curva patrón con al menos cinco puntos, haciendo las inyecciones por duplicado. El coeficiente de determinación r^2 , deberá ser mayor o igual 0.99.⁽²⁸⁾⁽²⁹⁾

3.4.3. Precisión

Los datos de linealidad demostraron que el coeficiente de variación del factor respuesta (%CV) no debe ser mayor al 2% ⁽²⁸⁾

3.5 VALIDACIÓN DEL MÉTODO.

3.5.1 Selectividad

La selectividad del método se evaluó al preparar un blanco de orina, una concentración de Casiopeina IIII en orina, una solución A Cu 4-4 dimetil y una solución B de Cu- acetilacetato en orina a las cuales se realizó el método de extracción y se inyectaron en el sistema cromatográfico.

Se consideraron para la selectividad, la solución A Cu- 4-4 dimetil y la solución B Cu-acetilacetato, por que son compuestos que se forman durante el proceso de síntesis de Casiopeina IIII. En el proceso de síntesis de Casiopeinas se mezclan cantidades iguales de los ligantes y $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$, para obtener una mezcla de color azul



intenso a la que se le evapora el disolvente a presión reducida y temperatura controlada, de esta forma un precipitado color azul ⁽²⁷⁾

El método es específico si los cromatogramas obtenidos no presentan ninguna señal que puedan causar alguna interferencia en los tiempos de retención correspondientes a la Casiopeina IIII y ranitidina.

3.5.2 Linealidad del método.

Se determinó construyendo tres curvas de calibración de Casiopeina IIII en orina, en un día de trabajo, a partir de un mismo stock 1000 μ g/ml (ver tabla 7). Las curvas fueron procesadas como lo indica el método de extracción (figura 5), y fueron inyectadas en el sistema cromatográfico. Se utilizó clorhidrato de ranitidina como estándar interno. Una vez obtenidos los resultados se realizó un arreglo matemático mediante un ajuste por mínimos cuadrados de la respuesta contra la concentración. ^{(28),(29)}

La linealidad del método se evaluó considerando tres factores:

Coefficiente de correlación (r) debe ser mayor o igual al 0.99.

Coefficiente de determinación (r^2) es mayor 0.96

Coefficiente de variación (%CV) no debe ser mayor al 10%

Esto implica que el método es lineal en el intervalo de concentraciones empleadas ⁽²⁸⁾

3.5.3. Recobro.

Se evaluó la recuperación absoluta, al preparar por quintuplicado tres concentraciones conocidas (4,8,12µg/ml) a partir de un mismo stock de Casiopeina IIII en orina las cuales fueron sometidas al proceso de extracción y se analizaron para determinar su respuesta. Además se preparó por quintuplicado las mismas concentraciones de Casiopeina IIII, a partir del mismo stock en agua.

Los valores de respuesta obtenidos de muestras en solución fueron comparados con la respuesta de las muestras en orina sometidas al proceso de extracción.⁽²⁸⁾⁽²⁹⁾ El % de recuperación absoluta no necesariamente es del 100% pero debe de ser reproducible en cada nivel de concentración dentro del rango.⁽²⁸⁾

3.5.4. Exactitud.

El valor promedio de las determinaciones en cada nivel de concentración de los datos de repetibilidad y reproducibilidad debe estar dentro $\pm 15\%$ del valor nominal de la concentración.

Se evaluó al calcular el % de desviación absoluta.⁽²⁸⁾

$$\% \text{ Desv. Abs.} = \frac{\text{Valor nominal} - \text{Valor obtenido}}{\text{Valor nominal}} \times 100$$

3.5.5. Precisión.

La precisión se evaluó por medio de dos parámetros: Repetibilidad y reproducibilidad Intralaboratorio.



3.5.5.1 Repetibilidad (Día 1)

Se analizó en un mismo día por quintuplicado, un mínimo de tres concentraciones conocidas: alta, media, y baja del compuesto Casiopeina IIII en la matriz biológica. Estas concentraciones deben ser diferentes a las de la curva de calibración, pero deben incluirse en el intervalo. Se determinó el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación (%CV) el cual no debe ser mayor al 15%.⁽²⁸⁾

Las concentraciones que se prepararon por quintuplicado fueron 4,8,12 µg/ml de Casiopeina IIII en orina.

3.5.5.2 Reproducibilidad (Día 2).

Se analizó en un segundo día por quintuplicado un mínimo de tres concentraciones conocidas: alta, media, y baja (4,8,12 µg/ml Casiopeina IIII en orina) se determina el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación %CV no debe ser mayor al 15%.⁽²⁸⁾

3.5.6. Límite de detección.

Se determinó la concentración a la cual la señal del compuesto por analizar en la matriz biológica puede distinguirse de los niveles de ruido o de una muestra libre del compuesto de interés.⁽²⁸⁾

El límite de detección se determinó como la concentración en donde la señal del compuesto a analizar en la matriz biológica fue dos veces mayor que el nivel de ruido.



3.5.7. Límite de cuantificación.

Corresponde a la menor concentración del analito que puede determinarse con precisión y exactitud en las condiciones establecidas. Se analizó por quintuplicado la concentración más baja del rango de trabajo (3 µg/ml). Se considera que el punto tiene validez como límite de cuantificación si su valor promedio cae dentro del 20% del valor nominal, con un coeficiente de variación no mayor que el 20%.⁽²⁸⁾

3.5.8. Estabilidad

En la prueba de estabilidad se determinó las condiciones de temperatura y tiempo, en las que el compuesto permanezca estable en la matriz biológica, durante su manejo, almacenamiento y procesamiento. Evaluando la concentración del compuesto por analizar en la matriz biológica.⁽²⁸⁾

3.5.8.1 Estabilidad de la muestra procesada a temperatura ambiente.

En esta prueba se evaluó por duplicado tres niveles de concentración de Casiopeína III en orina (4,8,12 µg/ml). Se prepararon tres series de muestras en orina. Se procesaron, y una de ellas se analizó en el momento de su preparación, el cual fue el tiempo de referencia. Las otras dos series se analizaron a las 12, 24 hrs. posteriores a su preparación.⁽²⁸⁾

3.5.8.2. Ciclos congelación- descongelación.

Se evaluó la estabilidad del compuesto a analizar al congelar y descongelar a temperatura ambiente, muestras de concentración conocida en la matriz biológica. Se preparó por duplicado tres niveles de concentración (4,8,12 µg/ml) en orina, se sometió a dos ciclos de congelación - descongelación a -20 °C antes de analizar las



muestras. Para que los compuestos de interés se consideren estables, su desviación absoluta deberá estar dentro del $\pm 15\%$ del valor nominal de la concentración. ⁽²⁸⁾.

3.5.9. Tolerancia.

Se refiere a la evaluación de un método analítico a pequeñas pero deliberadas modificaciones (ejemplo: cambio de columna, longitud de onda), al analizar muestras adicionadas de concentración conocida en la matriz biológica ⁽²⁹⁾

Las modificaciones que se consideren, en nuestro caso son: cambio de columna y cambio de longitud de onda, deben de cumplir con los criterios de exactitud y precisión. El método es tolerante, si la concentración recuperada no presenta una desviación absoluta con respecto a los valores iniciales mayor al 15%. ⁽²⁸⁾

3.6 APLICACIÓN DEL MÉTODO EN UN ESTUDIO PRELIMINAR DE LA CASIOPEINA IIII EN RATAS.

3.6.1. Diseño experimental

Se emplearon 10 ratas Wistar macho de peso (265-300g), que se obtuvieron de los laboratorios Harlan, México, D .F. Las ratas permanecieron en ayuno 8 horas antes de la administración de Casiopeina IIII y agua *ad libitum*.

En este estudio preliminar 6 ratas Wistar macho se les administro una dosis de 9 mg/kg por vía intravenosa. La solución de Casiopeina IIII fue de 7 mg/ml y se preparó en solución salina.

Se colocaron grupos de dos ratas por jaula, para recolectar las muestras de orina a los diferentes intervalos de tiempo (60, 120, 180, 240, 300, 420, 540, 660, 720, y 1380 minutos), después de la administración de Casiopeina IIII.



Para obtener orina blanco, fueron utilizadas 4 ratas Wistar macho, a las que se les administro agua inyectable, esta orina se utilizó para preparar la curva de Casiopeina IIII y fue recolectada hasta los 1380 minutos (23 horas) después de la administración de agua inyectable.

En la tabla 9 se muestra el diseño experimental del estudio preliminar, se indica la dosis administrada de Casiopeina IIII y el volumen de la solución de Casiopeina IIII inyectado a cada una de las ratas.

Tabla 9 Diseño experimental para la Aplicación del método Casiopeina IIII en orina de ratas Wistar

Num. Rata	Peso (g)	Dosis administrada en mg	Solución. Casiopeina IIII (ml)
1	280.3	2.5227	0.360
2	278.4	2.5056	0.357
3	293.4	2.6406	0.377
4	302.6	2.7234	0.389
5	273.3	2.4597	0.351
6	282.3	2.5407	0.362

Rata 1-6. muestras
Rata 7-10 control.

De cada muestra de orina recolectada se tomo 1 ml y se trató como lo indica el método de extracción de Casiopeina IIII en orina (figura 5) se realizó una curva de Casiopeina IIII en orina de ratas control, donde se interpolaron los datos R áreas para obtener así la concentración de Casiopeina IIII de cada una de las muestras analizadas. Se realizó la gráfica acumulada de la cantidad de Casiopeina IIII contra el tiempo.

Se calculó la constante de eliminación (K_e) y el tiempo de vida media ($t_{1/2}$), por medio del método de sigma menos, obteniendo una gráfica de \ln de la cantidad por excretar de Casiopeina IIII contra el tiempo, en donde la constante de eliminación es la pendiente.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 Optimización del método analítico para determinar Casiopeina IIII por HPLC.

4.1.1. Elección de la longitud de máxima absorción.

Una solución de Casiopeina IIII disuelta en agua (5 µg/ml) presenta su máximo de absorción a 286 nm. en la región ultravioleta.

Para el método se decidió utilizar 274nm ya que presenta una mejor respuesta. A continuación en la figura 6 se presenta el espectro de absorción para la Casiopeina IIII en UV.

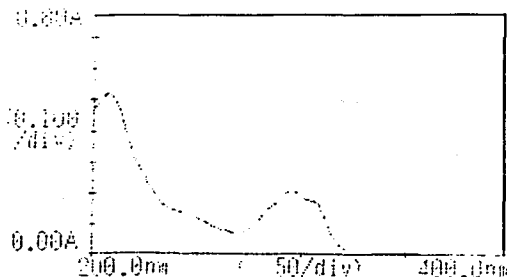


Figura 6. Espectro de absorción de Casiopeina IIII en UV.

TESIS CON
FALTA DE ORIGEN



4.1.2. Elección de la composición de la fase móvil y pH.

A pH de la solución de Fosfatos 0.01M, 4,5,5.3,6, se obtuvieron Tr de Casiopeína IIII 5.25-5.3 minutos, valores de simetría de pico > 3.0 . La fase móvil de metanol: Solución amortiguadora de fosfatos 0.01M pH 6.7 (40:60), se obtuvo un pico de Casiopeína IIII más definido con un Tr = 5.208 minutos, y un valor de simetría de pico ≤ 2.0 .

4.1.3 Selección de la proporción de la fase móvil para el método de Casiopeína IIII en orina.

En la tabla 10 se muestran los resultados obtenidos para cada una de las fases móviles evaluadas.

Tabla 10 Fases Evaluadas para el método de Casiopeína IIII en orina.

Fase Móvil	Proporción			Parámetros Cromatográficos	
	Metanol	Solución fosfatos 0.01M pH 6.7	Hexansulfonato de sodio 0.005M	T resolución Casiopeína IIII Tr min.	simetría
FM1	40	60	-	-	-
FM2	60	40	-	4.8	>3.0
FM3	35	65	-	8.6	>3.0
Fm4	30	70	-	8.9	>3.0
Fm5	30	65	5	10.5	≤ 2.0



4.1.4. Elección de la columna cromatográfica.

En la tabla 11 se muestran los resultados obtenidos para cada una de las columnas evaluadas.

Tabla 11 Columnas evaluadas para el método de Casiopeina IIII en orina

columna	Tr Casiopeina IIII	Simetría	Resolución
Simetry C18	10.5	≤ 2.0	2.0
Hipersil Elite C18	8.1	≤ 2.0	2.0
Termo hypersil- Keytone C18	6.8	≤ 2.0	2.0

4.1.5. Método de extracción para Casiopeina IIII en orina.

El método para la extracción de Casiopeina IIII en orina fue indicado en la figura 5.

4.2 Validación del sistema.

4.2.1. Linealidad

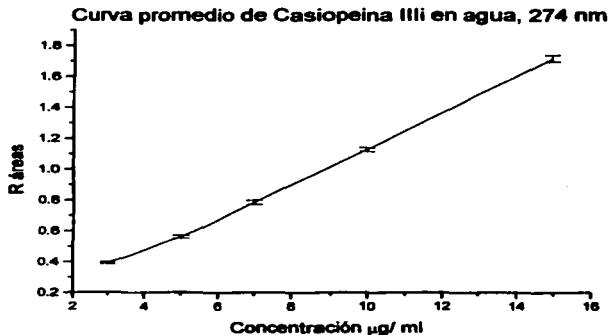
A continuación en la tabla 12 se presentan los datos para linealidad del sistema (agua) y en la gráfica 1 se presenta la curva promedio de Casiopeina IIII en agua, con la siguiente ecuación $y = 0.1117 + 0.0209x$, $r^2 = 0.9987$.

Tabla 12 Linealidad sistema. (agua)

Concentración $\mu\text{g/ml}$	Curva1 *R área 1	Curva2 R área 2	Promedio R área	DS	%CV
3	0.38753	0.39524	0.39138	0.00545	1.39
5	0.55359	0.56570	0.55964	0.00856	1.52
7	0.79307	0.77328	0.78317	0.01399	1.78
10	1.13337	1.11746	1.12542	0.01125	0.99
15	1.69893	1.72953	1.71423	0.02164	1.26
m	0.11100	0.11244			
b	0.02532	0.01669			
r	0.99920	0.99818			
r^2	0.99841	0.99637			

*R área = área casiopeina III/ área st ranitidina

Gráfica 1



4.2.2 Precisión.

Los datos de la tabla 12 de cada una de las concentraciones de Casiopeina IIII de linealidad mostraron un CV menor al 2%, por lo que el sistema fue preciso.⁽²⁸⁾

4.3. Validación del método

4.3.1. Selectividad

La evaluación de la selectividad se presenta en los siguientes cromatogramas: figura 7, 8, 9, 10, y 11.

Tiempo de retención Casiopeina IIII en agua: 6.66 minutos.

Tiempo de retención Casiopeina IIII en orina: 6.73 minutos.

Tiempo de retención Clorhidrato de ranitidina 10.6 minutos

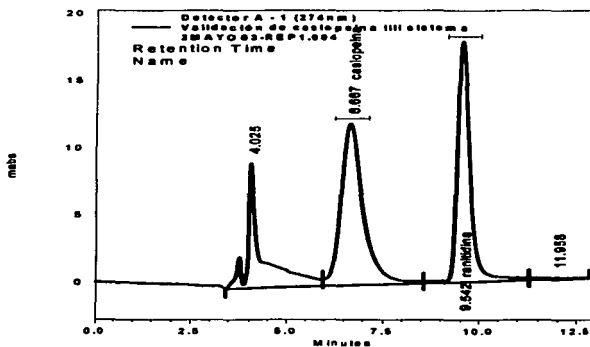


Figura 7 Cromatograma de Casiopeina IIII 10µg/ml en agua

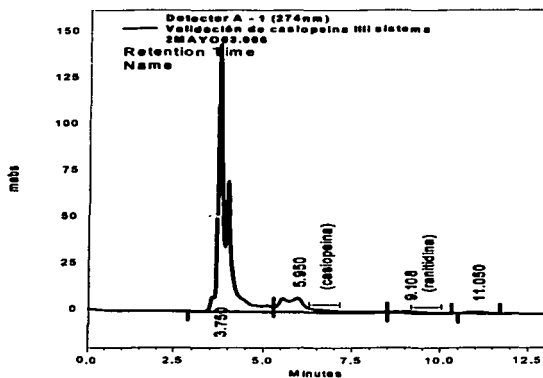


Figura 8 Cromatograma orina blanco.

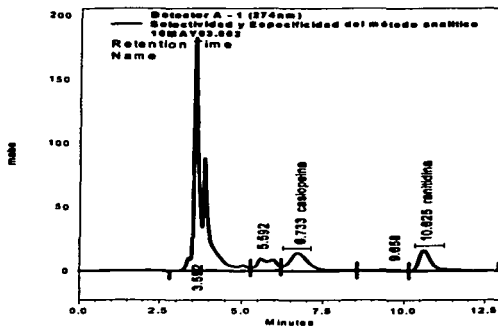


Figura 9 Cromatograma Orina adicionada Casiopeína III 15µg/ ml

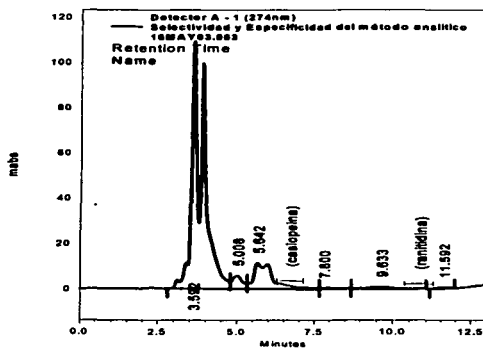


Figura 10 Cromatograma Orina adicionada Solución A Cu 4, 4 dimetil.

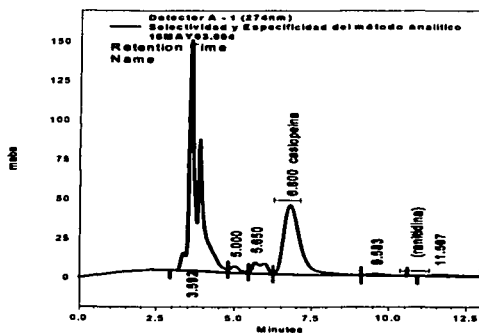


Figura 11 Cromatograma Orina adicionada Solución B Cu Acetilacetato.

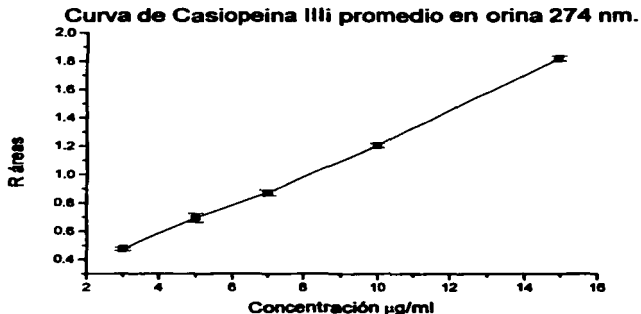
4.3.2. Linealidad del método.

La tabla 13 muestra los resultados de la linealidad del método para la cuantificación de Casiopeina IIII en orina.

Tabla 13 Linealidad del método

Concentración $\mu\text{g/ml}$	Curva 1 R área 1	Curva 2 R área 2	Curva 3 R área 3	Promedio R área	DS	%CV
3	0.47154	0.48819	0.46895	0.47623	0.01044	2.19
5	0.70171	0.66211	0.72146	0.69509	0.03022	4.34
7	0.88350	0.87800	0.84895	0.87015	0.01857	2.13
10	1.21507	1.20702	1.18782	1.20330	0.01400	1.16
15	1.80065	1.83511	1.81466	1.81681	0.01733	0.95
m	0.11009	0.11312	0.11046	0.11122		
b	0.13374	0.10913	0.12471	0.12252		
r	0.99933	0.99813	0.99859	0.99849		
r^2	0.99867	0.99626	0.99320	0.99699		

Gráfica 2



En la grafica 2 se presenta la Curva de Casiopeina IIII en orina a 274 nm. cuya ecuación fue $y = 0.1112x + 0.1225$, $r^2 = 0.997$.

4.3.3. Recobro

En la Tabla 14, se muestran el % promedio de recobro para cada una de las concentraciones, alto, medio, bajo de Casiopeina IIII en orina.

Tabla 14 % de Recobro

Concentración Casiopeina IIII $\mu\text{g/ml}$	Casiopeina IIII en solución R áreas	Casiopeina IIII en orina R áreas	% Recobro Promedio
alto 12 $\mu\text{g/ml}$	1.091	1.111	101.83
	1.065	1.140	
	1.050	1.122	
	1.072	1.118	
	1.069	1.108	
promedio	1.069	1.120	
Medio 8 $\mu\text{g/ml}$	0.909	0.827	93.93
	0.811	0.830	
	0.915	0.846	
	0.920	0.802	
	0.853	0.826	
promedio	0.882	0.826	
Bajo 4 $\mu\text{g/ml}$	0.519	0.469	92.52
	0.450	0.441	
	0.479	0.428	
	0.486	0.450	
	0.529	0.487	
promedio	0.492	0.455	96.42

4.3.4. Precisión y exactitud del método

4.3.4.1 Repetibilidad. (Día 1)

En la Tabla 15 se observan los resultados correspondientes a la repetibilidad (día 1) y exactitud del método. Las concentraciones se obtuvieron por medio de la interpolación de la relación de área, $R \text{ áreas} = \text{área Casiopeina IIII} / \text{área estándar interno}$ en una curva de calibración de Casiopeina IIII en orina.

Tabla 15 Repetibilidad (día 1) y exactitud del método.

	Concentración Casiopeina IIII Control bajo 4 µg/ml	Concentración Casiopeina IIII Control medio 8µg/ml	Concentración Casiopeina IIII Control alto 12 µg/ml
Replica 1	4.01	8.24	11.59
Replica 2	3.69	8.27	11.94
Replica 3	3.54	8.46	11.72
Replica 4	3.80	7.94	11.67
Replica 5	4.22	8.22	11.56
Promedio	3.85	8.23	11.70
DE	0.27	0.19	0.15
CV%	7.03	2.26	1.28
% Des. Abs	3.70	2.85	2.54

4.3.4.2 Reproducibilidad (Día 2).

En la tabla 16 se muestra los resultados de precisión y exactitud del método en un segundo día de análisis de los puntos control.

Tabla 16. Reproducibilidad (día 2).

	Concentración Casiopaina IIII Control bajo 4 µg/ml	Concentración Casiopaina IIII Control medio 8 µg/ml	Concentración Casiopaina IIII Control alto 12 µg/ml
Replica 1	3.59	7.44	11.69
Replica 2	3.57	7.71	10.82
Replica 3	3.63	7.02	10.47
Replica 4	3.54	7.59	10.41
Replica 5	3.88	7.38	11.21
Promedio	3.64	7.43	10.92
DE	0.14	0.26	0.53
CV%	3.82	3.55	4.89
% Des. Abs	8.95	7.13	9.00

4.3.5. Limite de detección.

El límite de detección para Casiopaina IIII fue 2 µg/mL ya que en esta concentración la señal de casiopaina en la matriz biológica fue de dos veces mayor que el nivel del ruido

4.3.6. Limite de cuantificación.

El límite de cuantificación es 3µg/ mL, el cual es el punto más bajo de concentración en la curva de calibración. En la tabla 17 se muestran los resultados del análisis por quintuplicado de la concentración más baja de la curva de calibración de Casiopaina IIII el cual muestra un %CV de 2.1%. y la exactitud (% desviación absoluta) fue 0.33%.

Tabla 17. Limite de cuantificación

Concentración Casiopeina IIII $\mu\text{g/ml}$	R áreas	Concentración Casiopeina IIII Interpolada $\mu\text{g/ml}$
3	0.46243	2.87
3	0.48208	3.04
3	0.47754	3.00
3	0.48426	3.06
3	0.48862	3.10
Promedio	0.47898	3.01
SD	0.01008	0.09
%CV	2.10402	2.86
	% desv abs	0.33

4.3.7. Estabilidad.

4.3.7.1. Estabilidad de la muestra procesada a temperatura ambiente.

En la Tabla 18, 19 y 20, se indican los resultados obtenidos para la estabilidad de la muestra procesada, 0, 12, y 24 horas respectivamente de los resultados anteriores se obtuvo % CV y la desviación estándar.

Tabla 18 Estabilidad de Casiopeina IIII en orina 0 horas

	tiempo 0 hrs.		
	Concentración Casiopeina IIII control bajo $4\mu\text{g/ml}$	Concentración Casiopeina IIII control medio $8\mu\text{g/ml}$	Concentración Casiopeina IIII control alto $12\mu\text{g/ml}$
replica 1	3.68	8.20	11.55
replica 2	3.49	8.05	11.55
promedio	3.58	8.13	11.55
SD	0.14	0.11	0.00
%CV	3.82	1.34	0.04



Tabla 19 Estabilidad de Casiopeina IIII en orina 12 Horas.

	tiempo 12hrs.		
	Concentración Casiopeina IIII control bajo 4µg/ml	Concentración Casiopeina IIII control medio 8µg/ml	Concentración Casiopeina IIII control alto 12µg/ml
replica 1	3.28	9.48	11.57
replica 2	4.24	8.53	12.00
promedio	3.76	9.01	11.78
SD	0.68	0.68	0.30
% CV	18.01	7.52	2.55
% des. Abs	4.92	10.83	2.03

Tabla 20 Estabilidad de Casiopeina IIII en orina 24 hrs.

	tiempo 24hrs.		
	Concentración Casiopeina IIII control bajo 4µg/ml	Concentración Casiopeina IIII control medio 8µg/ml	Concentración Casiopeina IIII control alto 12µg/ml
replica 1	3.79	9.20	11.25
replica 2	3.98	8.04	11.37
promedio	3.88	8.62	11.31
SD	0.14	0.82	0.06
% CV	3.54	9.48	0.75
% desv. Abs	8.41	6.07	2.11

4.3.7.2. Estabilidad de la muestra en ciclos congelación – descongelación.

En la tabla 21 se muestra los puntos control procesados normalmente, los cuales fueron considerados como tiempo cero, para la estabilidad de la muestra en ciclos congelación – descongelación, y en la tabla 22 los puntos control procesados después de dos ciclos de congelación – descongelación.

Tabla 21 Puntos control Casiopeina IIII en orina

Concentración Casiopeina IIII $\mu\text{g/ml}$	Concentración interpolada Casiopeina IIII $\mu\text{g/ml}$
4	3.88
8	8.29
12	12.05

Tabla 22 Estabilidad ciclos congelación - descongelación

2 ciclos congelación - descongelación.			
	Concentración Casiopeina IIII control bajo $4\mu\text{g/ml}$	Concentración Casiopeina IIII control medio $8\mu\text{g/ml}$	Concentración Casiopeina IIII control alto $12\mu\text{g/ml}$
replica 1	2.91	7.44	11.10
replica 2	2.71	7.47	10.95
promedio	2.81	7.46	11.03
SD	0.14	0.02	0.10
% CV	5.07	0.27	0.94
% desv abs	29.69	6.81	8.11

4.3. 8 Tolerancia.

Los resultados obtenidos a las condiciones establecidas del método (Fase móvil metanol/ solución amortiguadora de fosfatos 0.01M pH 6.7/ hexansulfonato de sodio 0.005M 30:65:65 v/v, flujo 0.8 ml/ min. columna Termo Hypersil-Keystone C18, , longitud de onda 274 nm., se presentan en la siguiente tabla 23.

Tabla 23. Puntos control a las condiciones establecidas para el método analítico.

	Concentración Casiopaina IIII	Concentración Casiopaina IIII	Concentración Casiopaina IIII
	Control bajo	Control medio	control alto
	4 µg/ml	8 µg/ml	12 µg/ml
replica 1	4.02	8.24	11.59
replica 2	4.22	8.22	11.56
Promedio	4.12	8.23	11.57
Sd	0.15	0.01	0.02
%CV	3.57	0.15	0.18
% desv. abs.	2.97	2.91	3.55

Los resultados obtenidos después de realizar el cambio de columna , por la columna Hypersil -Elite C18 se muestran en la tabla 24.

4.3.8.1 Tolerancia cambio de columna.

Tabla 24

	Cambio de columna Hypersil -Elite C18		
	Concentración Casiopeina IIII Control bajo 7µg/ml	Concentración Casiopeina IIII Control medio 14 µg /ml	Concentración Casiopeina IIII Control alto 40µg /ml
replica 1	7.24	14.08	35.04
replica 2	6.55	13.90	34.71
Promedio	6.90	13.99	34.88
DS	0.49	0.13	0.23
%CV	7.08	0.91	0.67
% Desv. Abs.	1.50	0.07	12.81

4.3.8.2. Tolerancia por cambio de longitud de onda 296nm

En la tabla 25 se presenta la tolerancia del método analítico a un cambio de longitud de onda.

Tabla 25

	Cambio de longitud de onda 296nm		
	Concentración Casiopeina IIII Control bajo 4µg/ml	Concentración Casiopeina IIII Control medio 8 µg/ml	Concentración Casiopeina IIII control alto 12 µg /ml
replica 1	3.47	7.93	8.90
replica 2	4.32	7.56	8.37
Promedio	3.90	7.74	8.63
DS	0.60	0.26	0.37
%CV	15.36	3.33	4.32
% desv abs	2.61	3.20	28.06

5.0 Aplicación del método mediante un estudio preliminar en ratas.

Al analizar por HPLC las muestras obtenidas de orina de ratas, se puede observar la presencia de Casiopeina IIII. En este estudio se emplearon 10 ratas macho Wistar de las cuales 6 ratas se les administró una dosis de 9 mg/Kg, de solución de Casiopeina IIII por vía i.v. y a las otras cuatro ratas se les administró agua inyectable, estas ratas se emplearon para obtener la orina para preparar la curva de calibración de Casiopeina IIII. Se tomaron muestras de orina de rata a los siguientes tiempos, 60, 120, 180, 190, 240, 300, 420, 540, 660, 720, y 1380 minutos. La primera muestra de orina de rata se tomó a una hora después de la administración intravenosa de Casiopeina IIII.

La tabla 26 se observa la concentración promedio de Casiopeina IIII de las muestras de orina de rata obtenida en los tiempos mencionados. Además se calculó la cantidad excretada de Casiopeina IIII en orina para cada uno de los tiempos de muestreo y la cantidad acumulada de Casiopeina IIII en orina.

Tabla 26 Estudio de Casiopeina IIII excretada (promedio) en orina de ratas.

Tiempo minutos	Concentración Casiopeina IIII $\mu\text{g/ml}$	volumen Orina ml	Cantidad excretada Casiopeina IIII μg	Casiopeina IIII Acumulada μg
60	17.72	3	53.16	53.16
120	6.23	2.5	20.58	73.74
180	18.60	4	74.40	148.14
190	8.79	4.8	42.19	190.33
240	5.21	8	41.68	232.01
300	8.00	10	80.00	312.01
420	6.52	6	39.12	351.13
540	8.95	13	116.35	467.48
660	10.06	10	100.80	568.28
720	2.68	8	23.04	591.32
1380	20.92	8	167.36	758.68

En la figura. 12 y figura. 13 se presenta el cromatograma de orina blanco de rata y el cromatograma obtenido de 10µg/ml Casiopeina IIII en orina rata.

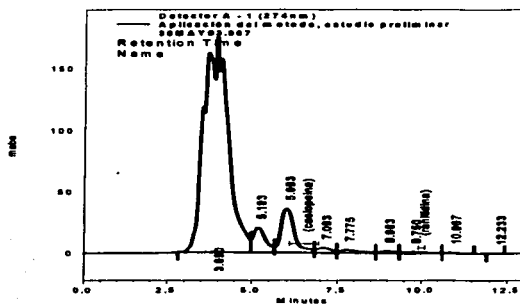


Figura 12 Cromatograma orina blanco de rata

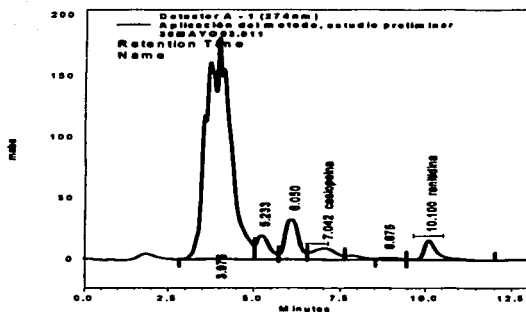


Figura 13. 10µg/ml Casiopeina IIII en orina rata

5.1 Cálculo de la constante de eliminación K_e y tiempo de vida media de Casiopeina IIII en orina.

En la tabla 27 se observan los cálculos para la obtención de la constante de eliminación (K_e), la cual se obtuvo al realizar la gráfica 4 de \ln de la cantidad por excretar de Casiopeina IIII vs. tiempo

Tabla 27. K_e de Casiopeina IIII en orina

Tiempo horas	Concentración Casiopeina IIII $\mu\text{g/ml}$	volumen orina ml	Cantidad Excretada μg Casiopeina IIII	Cantidad Acumulada μg Casiopeina IIII	Cantidad por excretar μg Casiopeina IIII	\ln Cantidad por excretar Casiopeina IIII
1	17.72	3	53.16	53.16	705.52	6.56
2	8.23	2.5	20.58	73.74	684.94	6.53
3	18.60	4	74.40	148.14	610.54	6.41
3.17	8.79	4.8	42.19	190.33	568.35	6.34
4	5.21	8	41.68	232.01	526.67	6.27
5	8.00	10	80.00	312.01	446.67	6.10
7	6.52	6	39.12	351.13	407.55	6.01
9	8.95	13	116.35	467.48	291.20	5.67
11	10.08	10	100.80	568.28	190.40	5.25
12	2.88	8	23.04	591.32	167.36	5.12
23	20.92	8	167.36	758.68	0.00	0

El tiempo de vida media y constante de eliminación para Casiopeina IIII fue $t_{1/2} = 5.22$ horas y la $K_e = 0.1328 \text{ h}^{-1}$

ANALISIS DE RESULTADOS

6.0 ANALISIS DE RESULTADOS

6.1. OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAR CASIOPEINA IIII POR HPLC.

Se eligió como fase móvil: metanol, solución amortiguadora de fosfatos 0.01M pH 6.7, hexansulfonato de sodio 0.005 M, en una proporción de 30:65:5 (v/v).. Por que fue la que obtuvo valores ≤ 2.0 de simetría del pico de Casiopeina IIII.

Se seleccionó la columna cromatografica Termo Hypersil-Keystone C18 5 μ m 4.6 x 250 mm, por que permitió una buena separación de los picos y resolución mayor a 1.5. También se consideró la simetría del pico ≤ 2.0 , y un tiempo retención Casiopeina IIII 6.8 minutos.

El método de extracción para la Casiopeina IIII en orina se muestra en la figura 5, es método fácil y simple en el que se obtienen altos porcentajes de Casiopeina IIII extraída de la orina.

6.2 VALIDACIÓN DEL SISTEMA.

El sistema en agua para Casiopeina IIII fue lineal dentro del intervalo de concentraciones establecidas de 3 a 15 μ g/ml el coeficiente de determinación lineal r^2 fue mayor a 0.99 % y el coeficiente de variación (%CV) fue menor al 2% por lo que cumple con el criterio de aceptación de precisión y linealidad. Establecido en Procedimiento Normalizado de operación GEN-BIO-001⁽²⁸⁾

6.3. VALIDACIÓN DEL MÉTODO.

6.3.1 Selectividad

El método para determinar Casiopeina IIII en orina es selectivo por que en el cromatograma de blanco de orina (figura 8), no se observa ninguna señal que interfiera en el tiempo donde sale el pico de Casiopeina IIII $t_r = 6.73$ min. Por lo que se refiere a la solución A Cu-4,4 dimetil (figura 10) no presenta tampoco ninguna señal que interfiera con la Casiopeina IIII.

Sin embargo la solución B, (Cu - acetilacetato) presenta una señal en t_r 6.8 minutos (figura 11), siendo esta solución B, un compuesto que se forma durante la síntesis de la Casiopeina IIII.

6.3.2. Linealidad

El método para cuantificar Casiopeina IIII en orina fue lineal en el intervalo de concentraciones establecidas de $3\mu\text{g/ml}$ a $15\mu\text{g/ml}$, el coeficiente de correlación " r " fue de 0.998. La ecuación de la curva promedio de Casiopeina IIII en orina fue, $y = 0.1112x + 0.1225$. y el coeficiente de determinación $r^2 = 0.997$, el coeficiente de variación (%CV) fue 0.95% a 2.19%. esto implica que el método fue lineal en el intervalo de concentraciones empleadas.

6.3.3. Recobro.

El recobro promedio para cada nivel de concentración fue del 92.52, 93.93, 101.83% , y fue reproducible en cada nivel de concentración empleado. Lo que indica que la técnica de extracción de Casiopeina IIII en muestras de orina fue adecuada porque permite obtener una buena recuperación del compuesto en orina (tabla 14).



6.3.4. Precisión

6.3.4.1. Repetibilidad (Día 1)

Al evaluar este parámetro de precisión se observó que cumple con los criterios de aceptación, puesto que el %CV en cada uno de los niveles de concentraciones empleadas (4, 8, 12 µg/ml Casiopeina IIII) fue menor al 15% obteniéndose valores de % CV 7.03, 2.26, y 1.28. La exactitud fue definida por el % desviación absoluta, el cual fue menor del 15%.

Como se puede observar al evaluar la precisión, se encontró un aumento del coeficiente de variación conforme disminuye la concentración de Casiopeina IIII. Lo anterior puede deberse a que en concentraciones bajas se tiene más variación, por que la capacidad de extracción del método disminuye afectando la precisión.

6.3.4.2. Reproducibilidad (Día 2)

En un segundo día de análisis de los puntos control de Casiopeina IIII se encontró que el coeficiente de variación fue 3.82 a 4.89 % el cual cumple con el criterio de ser menor al 15%, mientras que el % de desviación absoluta fue menor al 9% en los tres niveles de concentración evaluados.

6.3.5. Exactitud.

El valor promedio de las determinaciones en cada nivel de concentración de los datos de repetibilidad y reproducibilidad, al evaluar el % de desviación absoluto fueron menor al 15 % por lo tanto el método fue exacto.

6.3.6. Límite de Detección.

El límite de detección para Casiopeina IIII fue 2 µg/ml ya que en esta concentración la señal de Casiopeina IIII en la matriz biológica fue de dos veces mayor que el nivel del ruido.



6.3.7 Limite de cuantificación.

El limite de cuantificación fue $3\mu\text{g}/\text{mL}$, el cual es el punto más bajo de concentración en la curva de calibración. En esta concentración la precisión fue 2.1% y la exactitud, % de desviación absoluta fue 0.33% (tabla 17). Estos valores se encuentran dentro del intervalo de ± 20 del valor nominal.

6.3.8 Estabilidad.

Las pruebas de estabilidad tienen como objetivo determinar las condiciones de temperatura, tiempo, en las que el compuesto de interés, permanezca estable en la matriz biológica, durante su manejo, almacenamiento y procesamiento.

6.3.8.1. Estabilidad de la muestra procesada a temperatura ambiente.

El % de desviación absoluta obtenidas de las muestras de Casiopeina IIII para la estabilidad de 12 horas (Tabla 19), en todas las concentraciones fue menor al 15% por lo que se considera que las muestras de Casiopeina IIII en orina son estables bajo estas condiciones. Además los % de desviación absoluta encontrados a las 24 hrs. fueron : 8.41, 6.07, 2.11 % siendo así también estable durante las primeras 24 horas a temperatura ambiente (Tabla 20).

6.3.8.2. Ciclos congelación – descongelación.

Las muestras de Casiopeina IIII en orina sometidas a dos ciclos congelación descongelación. Son estables por dos ciclos de congelación descongelación. Para la concentraciones de $8\mu\text{g}/\text{ml}$ y $12\mu\text{g}/\text{ml}$ su % de desviación absoluta fue 6.81, 8.11%, respectivamente. Sin embargo se encontró un 29.7 % en la concentración más pequeña de Casiopeina IIII (tabla 22).

6.3.9. Tolerancia

Se refiere a la capacidad del método analítico para obtener resultados precisos y exactos ante variaciones pequeñas , y deliberadas de las condiciones de trabajo. En este caso se realizó un cambio de columna de las mismas características solo que esta es de otra marca, y un cambio en la longitud de onda (296nm).

6.3.9.1. Tolerancia por cambio de columna

Al cambiar la columna cromatografica por la Hypersil- elite C18 (Tabla 24), se observó que el pico de casiopeina se obtuvo en un tiempo de retención de 6.4 minutos., en cada una de las concentraciones realizadas el % de desviación absoluta fue menor al 15%, por lo que podemos decir que el método fue tolerante al cambio de columna.

6.3.9.2. Tolerancia por cambio de longitud de onda.

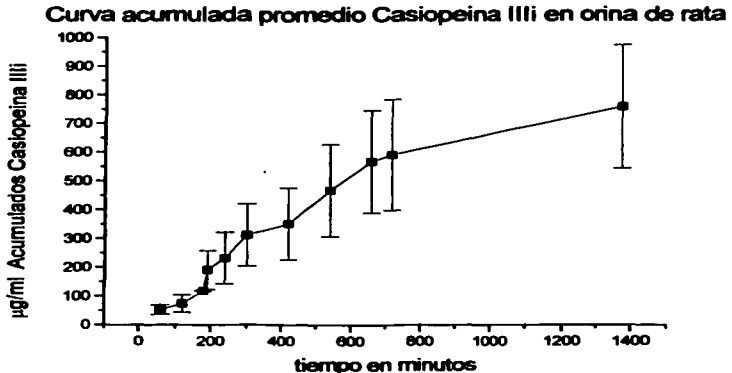
Al cambiar la longitud de onda a 296 nm. (tabla 25) se observó que el método fue tolerante a concentraciones bajas. Sin embargo a una concentración de 12µg/ml se obtuvo un % de desviación absoluta muy alto de 28%. Por lo anterior el método no fue tolerante a cambio de longitud de onda propuesto.

6.4. APLICACIÓN DEL MÉTODO MEDIANTE UN ESTUDIO PRELIMINAR EN ORINA DE RATA

Después de administrar por vía i.v. Casiopeina IIII en ratas macho Wistar, esta fue detectada en cada una de las muestras de orina que se recolectaron. En la gráfica 3 se describe la curva acumulada promedio de Casiopeina IIII del estudio preliminar en orina de rata.



Gráfica 3



La cantidad inicial administrada de Casiopeina IIII a ratas fue 2.57 mg. Se encontró 0.7586 mg de Casiopeina IIII acumulada en la orina hasta las 23 horas. (1380 minutos) que corresponde a 29.5% de la cantidad inicial administrada de Casiopeina IIII

Por lo anterior podemos decir que un 70.5 % de Casiopeina IIII fue metabolizado o aun no ha sido excretado y solo se excretó en orina un 29.5% como Casiopeina IIII inalterado.

Es muy recomendable administrar una cantidad suficiente de agua para provocar diuresis y obtener así las muestras a los intervalos de tiempo establecidos. En las ratas se debe cuidar que beban agua suficiente y si es necesario administrar por vía oral agua con una sonda gástrica.



Otro parámetro importante es el volumen de orina para cada tiempo de muestreo, ya que si este no se mide y recolecta adecuadamente, la cantidad de fármaco remanente puede ser adicionada a la siguiente muestra, lo que puede ocasionar datos incorrectos.

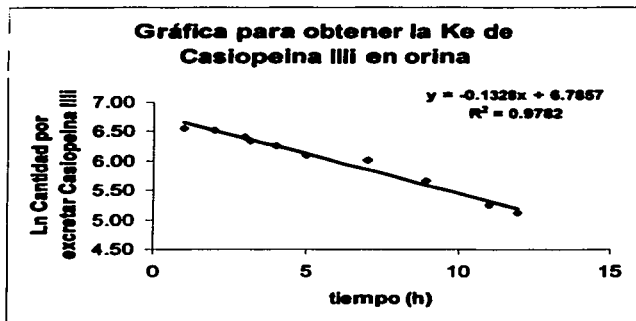
Las ratas empleadas en este estudio deben tener una ayuno de al menos 8 horas antes de administrar casiopeina, para evitar picos en el cromatograma de la orina que interfieran con el pico de Casiopeina IIII.

Para obtener la constante de eliminación K_e , se realizó la grafica de \ln de la cantidad por excretar de Casiopeina IIII vs. tiempo (Gráfica 4). Se realizó un ajuste por mínimos cuadrados donde la pendiente es igual a la constante de eliminación (K_e). Para obtener el tiempo de vida media, se utilizo la siguiente formula:

$$t_{1/2} = 0.693 / k_e$$

A continuación en la gráfica 4 se muestra el \ln de la cantidad por excretar de casiopeina IIII vs. tiempo.

Gráfica 4. Obtención de K_e de Casiopeina IIII en orina



En este estudio preliminar las muestras de orina se recolectaron hasta las 23 horas posteriores a la administración de Casiopeina IIII. Sin embargo, posteriormente se obtuvo el tiempo de vida media 5.22 horas y la constante de eliminación 0.1328 h^{-1} , por lo que se debió recolectar orina por un periodo más largo de tiempo (37 hrs.), ya que en este tiempo corresponde a 7 vidas medias donde se asegura que el 99.2% de la Casiopeina IIII administrada fue excretada.

CONCLUSIONES

7.0 CONCLUSIONES

El método analítico para determinar Casiopeina IIII en orina, por HPLC es selectivo, lineal, exacto y preciso en el intervalo de concentraciones 3, 5, 7, 10, y 15 µg/ml, es preciso y exacto, el % recobro fue 96.42%, LD es 2 µg/ml, LC es 3 µg/ml. estable por 24 horas a temperatura ambiente y por dos ciclos congelación – descongelación.

El método analítico es tolerante a un cambio de columna Hypersil- Elite C18 y es poco tolerante a un cambio de longitud de onda (296 nm).

El desarrollo y optimización del método analítico para determinar Casiopeina IIII en orina fue adecuado para la aplicación del método en el estudio preliminar en ratas. La Constante de eliminación (K_e) de Casiopeina IIII en orina es $K_e = 0.1328$ y $t_{1/2} = 5.22$ horas. El 29.5% de la cantidad inicial de Casiopeina IIII, fue excretada en la orina a las 23 horas.



BIBLIOGRAFIA

8. BIBLIOGRAFÍA.

1. Cuevas Villar Maria de Lourdes, Lena Ruiz Azuara, Síntesis y caracterización de complejos mixtos de Cu II con péptidos, 2 Jornadas de trabajo de Casiopeinas. UNAM, Abril 1996, pag.12.
2. Ruiz Ramírez, L. Gracia. Mora, I. y De la Rosa M. Cytostatic, Mutagenic Antineoplastic Activities and Preliminar Toxicity of Cooper II. New Drugs: Casiopeina I, II III. J. Inorganic Biochemical, 51-2, (1993).
3. Asato Romero A, Martínez, Rosales R, López Sumano H, Indicadores Biomoleculares del efecto de Casiopeina III en células de encéfalo de pollo. 2 Jornada de trabajo de Casiopeinas. UNAM, Abril 1996 pag.54-58.
4. Gracia Mora Isabel, Mabel Tinoco M, Rosales Macias L. Evaluación antineoplásica de los sustituyentes periféricos en la estructura de las Casiopeinas empleando el modelo tumoral murino con carcinoma de pulmón de Lewis y melanoma B16. 4 Jornada de trabajo de Casiopeinas UNAM diciembre 2000 pag.15-17.
5. Viveros Alpizar A. M en C Inés Fuentes. Determinación del pka y coeficiente de partición de la Casiopeina III 3 Jornada de trabajo de Casiopeinas UNAM. Mayo 1998.
6. Márquez Quiñónez Adriana, Mora Gracia Isabel. Citotoxicidad y Genotoxicidad de los compuestos antineoplásicos Casiopeina I, II, III. En cultivo primario de hepatocitos de rata. Jornada de trabajo de Casiopeinas diciembre 2000, pag.53-58.

7. Márquez Adriana, Romero Laura, Lena Ruiz. Evaluación antineoplásica in Vitro de nuevos fármacos(Casiopéinas) empleando líneas tumorales humanas y murinos. Jornada de trabajo de Casiopéinas diciembre 2000, pag.4-9.
8. Antonio Jarquin Julia, Fuentes Noriega Inés. Estudio de farmacocinética preclínica de la Casiopéina III en conejos. Jornada de trabajo de Casiopéinas diciembre 2000, pag.76.
9. Fuentes Noriega Inés. Estudio de Unión a proteínas plasmáticas de Casiopéina III y su unión a proteínas plasmáticas, Jornada de trabajo de Casiopéinas diciembre 2000, pag.69-75.
10. Gracia Mora Isabel, Sumano López Héctor, Azuara Ruiz Lena. Evaluación preclínica de la actividad antineoplásica de dos nuevos compuestos de coordinación, 4 Jornada de trabajo de Casiopéinas diciembre 2000, pag.18-24.
11. Marín Hernández A, Rodríguez Hernández S. Evaluación del efecto antineoplásico sobre el metabolismo energético en mitocondrias y células. Jornada de trabajo de Casiopéinas diciembre 2000, pag.59.
12. Rico Morales Héctor. Evaluación de la actividad antineoplásica de la Casiopéina III sobre diferentes líneas tumorales humanas xenotransportadas al ratón desnudo. Jornada de trabajo de Casiopéinas diciembre 2000, pag.10-12.



13. De la Rosa Duque, M, E. Recombinogenic effects induced by Casiopeina III as detected by reverse mutations in SPDB cells 3 Jornada de trabajo de Casiopeinas UNAM 1998. pag.37-39.
14. Bravo Gómez Maria Elena. "Evaluación, antineoplásica de compuestos de coordinación de cobre (Casiopeinas) en un modelo tumoral murino. Tesis de licenciatura, FQ UNAM 1998.
15. Tovar, Tovar A. Estudio Electroforético del mecanismo de interacción de la familia de Casiopeina I, II, III con el DNA, 1 Jornada de trabajo Casiopeinas UNAM 1994.
16. Romero C. Laura, Marques Q. Adriana, Mora García Isabel. Estabilidad de la Casiopeina II y III en soluciones fisiológicamente compatibles. cells 3 Jornada de trabajo de Casiopeinas UNAM 1998. pag.4-7.
17. Harrison. Principios de Medicina Interna, 14 edición, Editorial Mc Gras Hill, Interamericana. Vol. 1 1998.
18. Amiel Jean Luis. Manual de Oncología. Editorial. Toray-Masson S.A. Barcelona España 1 edición, 1978.
19. Trigo Mateos. Patología general Veterinaria, Editorial Interamericana, Mc Graw Hill segunda edición, México 1993.

20. Balcazar de la Cruz Gladis. Estudio preclínico en farmacocinética de Casiopeina III en gatos. Tesis de Licenciatura, UNAM FQ 1999.
21. UICC. Unión Internacional contra el Cáncer. Oncología clínica, Manual para estudiantes y médicos. Editorial. Alhambra, España 1981.
22. Funes Cortés H. Manual de Oncología medica, 1 edición, Editorial. Alhambra España 1983.
23. De Vita Vincent. Cáncer Principios y practica de Oncología, 5 edición. ED. Panamericana, Volumen 1. 1995.
24. Métodos analíticos Guía de validación. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos A. C edición 2002.
25. Procedimiento Normalizado de Operación GEN-BIO-001 Laboratorio de Biofarmacia FQ.
26. Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998. Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que se deben sujetarse los terceros autorizados que realicen las pruebas.
27. Karnes T Shui. G Validation of bioanalytical methods Pharmaceutical Research 1991, pp421-426.

28. Noriega Fuentes Ines Development and validation of a liquid chromatographic method for Casiopeina IIII in rat plasm. Journal of Chomatography,2002.

29. Michel J. Derelanka, Mannfred Hollinger CRC. Hanbook of Toxicology Edt. CRC Press Tnc. Pag.357-362.

30. Méndez Segovia Verónica. Estudio preliminar para evaluar la Bioequivalencia de Amplicilina. Tesis de licenciatura. FQ UNAM 2003.

31.<http://www.ssa.gob.mx/appsahdocs/estadísticas/estadísticas/mortalidad/datos/m5m.htm>. (copia impresa 27/09/03).

32. Bravo Maria Elena, Diseño, Síntesis y caracterización de compuestos de coordinación de cobre Casiopeinas. Jornada de trabajo de Casiopeinas diciembre 2000, pag. 1-7.

