



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE
MEXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

CINÉTICA IN VITRO DE CASIOPEÍNA IIgly
EN SANGRE TOTAL DE RATA
POR HPLC.

TESIS
PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA
P R E S E N T A
BERENICE ZEPEDA BENÍTEZ.



EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUÍMICA



México D.F.

2004



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: Lauro Misael Del Rivero Ramírez.
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:



Berenice Zepeda Benítez.

AGRADECIMIENTOS

AGRADEZCO A LOS SIGUIENTES PROGRAMAS POR EL APOYO OTORGADO PARA LA REALIZACIÓN DE ESTA TESIS DE CASIOPEÍNA II gly:

- PROGRAMA DEL CONACYT- G -35012N
- PROGRAMA PAPIIT-IN212100
- PROGRAMA PAIP 6390-05



AGRADECIMIENTOS

A MI MADRE QUIEN EN TODO MOMENTO SUPO ENCAMINAR MIS PASOS, A NO DEJARME VENCER POR LAS ADVERSIDADES QUE PRESENTA LA VIDA, HACER DE MI QUIÉN SOY.

A MIS MAESTROS POR ENSEÑARME Y COMPARTIR SUS CONOCIMIENTOS, PARA SER UN BUEN PROFESIONISTA DE LA QUÍMICA, A TODOS ELLOS AGRADEZCO INFINITAMENTE SU PACIENCIA Y TIEMPO.

A TODAS LAS PERSONAS QUE CONOCÍ DURANTE MI TESIS, QUE ME AYUDARON Y ME BRINDARON SU AMISTAD (JULIO, LEONARDO, ESTRELLA, LUPIÑA, JOVITA).

A MIS AMIGOS QUE COMPARTIERON CONMIGO MIS TRIUNFOS Y FRACASOS EN LA ESCUELA, QUE TUVIERON PACIENCIA PARA ESCUCHARME, DARMÉ UN CONSEJO Y SOBRE TODO BRINDARME SU AMISTAD (ELENA, SANDRA, LETICIA, EDITH, ETC).

A MÍ ESPOSO POR COMPARTIR MIS SUEÑOS, POR TENERME TAN PACIENCIA, POR DEJARME SER Y QUERERME COMO SOY, MUCHAS GRACIAS (JAVIER).

UN AGRADECIMIENTO MUY ESPECIAL A LA MAESTRA LINES POR DARMÉ LA OPORTUNIDAD DE REALIZAR CON ELLA LA TESIS, POR EL TIEMPO QUE ME DEDICO Y POR TODAS LAS EXPERIENCIAS VIVIDAS DURANTE LA PARTE EXPERIMENTAL DE MI TESIS, POR NO SER SOLO LA MAESTRA, SINO LA AMIGA.

AGRADEZCO A TODAS LAS PERSONAS QUE ESTUVIERON CONMIGO EN LOS MOMENTOS DIFÍCILES.

Y POR ÚLTIMO A MI UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO POR DARMÉ EL PRIVILEGIO ESTUDIAR EN SUS AULAS.

MUCHAS GRACIAS A TODOS



ÍNDICE

| | |
|---|----|
| ÍNDICE DE FIGURAS | 1 |
| ÍNDICE DE TABLAS | 2 |
| | |
| 1.0 INTRODUCCIÓN | |
| 1.1 INTRODUCCIÓN | 5 |
| 1.2 OBJETIVOS | 7 |
| | |
| 2.0 GENERALIDADES | |
| INTRODUCCIÓN CÁNCER | 9 |
| CASIOPEÍNA Igly | 12 |
| UNIÓN A PROTEÍNAS | 17 |
| CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN (CLAR) | 18 |
| VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO | 21 |
| | |
| 3.0 PARTE EXPERIMENTAL | 24 |
| 3.1 EQUIPO | 25 |
| 3.2 REACTIVOS | 25 |
| 3.3 SOLUCIONES | 26 |
| 3.4 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES | 26 |
| 3.4.1 SOLUCIÓN DE HEXANSULFONATO DE SODIO (0.003 M) | 26 |
| 3.4.2 SOLUCIÓN DE SULFATO DE ZINC AL 5 % | 26 |
| 3.4.3 SOLUCIÓN DE PREDNISONA | 26 |
| 3.4.4 SOLUCIÓN DE CASIOPEÍNA Igly 1 mg/mL | 27 |
| 3.4.5 SOLUCIÓN DE CASIOPEÍNA II gly 50 y 100 µg/mL | 27 |



ÍNDICE

| | |
|---|----|
| 3.5 OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO PARA CUANTIFICAR CASIOPEÍNA Igly | 27 |
| 3.6 PREPARACIÓN DE CURVA PATRÓN DE CASIOPEÍNA Igly EN SOLUCIÓN Y EN PLASMA | 29 |
| 3.6.1 CURVA PATRÓN DE CASIOPEÍNA Igly EN SOL. | 29 |
| 3.6.2 CURVA PATRÓN DE CASIOPEÍNA Igly EN PLASMA DE RATA. | 30 |
| 3.6.3 METODOLOGÍA PARA CUANTIFICAR CASIO Igly EN PLASMA POR CLAR | 30 |
| 3.7 VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO | 31 |
| 3.7.1 LINEALIDAD DEL SISTEMA | 31 |
| 3.7.2 LINEALIDAD DEL MÉTODO | 31 |
| 3.7.3 PRECISIÓN | 31 |
| 3.7.4 EXACTITUD | 32 |
| 3.7.5 RECUPERACIÓN ABSOLUTA | 32 |
| 3.7.6 LÍMITE DE DETECCIÓN | 32 |
| 3.7.7 LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN | 32 |
| 3.7.8 ESTABILIDAD DE LA MUESTRA | 33 |
| 3.7.9 TOLERANCIA O ROBUSTEZ DEL MÉTODO | 33 |
| 3.8 CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS | 33 |
| 3.9 METODOLOGÍA DE CINÉTICA DE DISTRIBUCIÓN IN VITRO DE CASIOPEÍNA Igly EN SANGRE TOTAL | 34 |



ÍNDICE

| | |
|---|----|
| 3.9.1 DETERMINACIÓN DEL TIEMPO DE EQUILIBRIO DE LA CASIOPEÍNA IgGy EN PLASMA DE RATA | 34 |
| 4.0 RESULTADOS | |
| 4.1 OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO | 38 |
| 4.2 VALIDACIÓN DEL SISTEMA | 39 |
| 4.3 VALIDACIÓN DEL MÉTODO | 40 |
| 4.3.1 SELECTIVIDAD DEL MÉTODO | 40 |
| 4.3.2 LINEALIDAD Y REPETIBILIDAD DEL MÉTODO | 43 |
| 4.3.3 PRECISIÓN DEL MÉTODO | 44 |
| 4.3.4 EXACTITUD DEL MÉTODO | 45 |
| 4.3.5 PORCIENTO DE RECOBRO | 46 |
| 4.3.6 LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN | 46 |
| 4.3.7 LÍMITE DE DETECCIÓN | 46 |
| 4.3.8 ESTABILIDAD DE LA MUESTRA | 47 |
| 4.3.9 TOLERANCIA DEL MÉTODO | 49 |
| 4.4 DATOS EN SANGRE ESTUDIO PRELIMINAR DE VALIDACIÓN | 50 |
| 4.5 RESULTADOS DE CINÉTICA DE DISTRIBUCIÓN IN VITRO DE CASIOPEÍNA IgGy EN SANGRE TOTAL | 51 |
| 5.0 ANÁLISIS DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES | |
| 5.1 ANÁLISIS DE RESULTADOS DE LA VALIDACIÓN DEL SISTEMA | 55 |
| 5.2 ANÁLISIS DE RESULTADOS DE LA VALIDACIÓN DEL MÉTODO | 55 |
| 5.3 ANÁLISIS DE RESULTADOS DE LA CINÉTICA DE DISTRIBUCIÓN IN VITRO DE CASIOPEÍNA IgGy EN SANGRE TOTAL | 58 |
| 5.4 CONCLUSIONES | 60 |
| 6.0 BIBLIOGRAFÍA | 61 |



ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 . Porcentajes de cánceres más frecuentes en ambos sexos. | 9 |
| Figura 2. Estructura de casiopeína IIgly. | 13 |
| Figura 3. Gráfica de perfil farmacocinético de casiopeína IIgly | 15 |
| Figura 4. Diagrama de equipo de cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) . | 18 |
| Figura 5. Diagrama de flujo de metodología utilizada en plasma. | 35 |
| Figura 6. Diagrama de flujo de metodología utilizada en sangre total. | 36 |
| Figura 7. Gráfica de linealidad de casiopeína IIgly en sistema. considerando el área como respuesta cromatográfica. | 39 |
| Figura 8. Cromatograma de casiopeína IIgly y estándar interno. en solución. | 40 |
| Figura 9. Cromatograma de blanco de plasma de rata Wistar. | 40 |
| Figura 10. Cromatograma de blanco de sangre de rata Wistar. | 41 |
| Figura 11. Cromatograma de casiopeína IIgly en plasma de rata. | 41 |
| Figura 12. Cromatograma de estándar interno prednisona 45µg/mL. | 42 |
| Figura 13. Cromatograma de anticoagulante utilizado heparina dil.(1:10). | 42 |
| Figura 14. Gráfica de linealidad de casiopeína IIgly en plasma de rata. | 43 |
| Figura 15. Gráfica de curva patrón de casiopeína IIgly en sangre total. | 50 |
| Figura 16. Gráfica de cinética in vitro de casiopeína IIgly conc. 12.5 µg/mL. | 51 |
| Figura 17. Gráfica de cinética in vitro de casiopeína IIgly conc. 25 µg/mL. | 52 |
| Figura 18. Gráfica de cinética in vitro de casiopeína IIgly conc. 50 µg/mL. | 53 |

LISTA DE TABLAS

| | |
|---|--------|
| Tabla 1. Principales causas de defunción en ambos sexos en el 2001 en México. | 10 |
| Tabla 2. Sustancias potencialmente carcinogénicas. | 11 |
| Tabla 3. Parámetros farmacocinéticas de casiopeína IIgly. | 15 |
| Tabla 4. Ventajas y limitaciones de la cromatografía de líquidos. | 19 |
| Tabla 5. Condiciones de trabajo utilizadas para optimización el método. | 28 |
| Tabla 6. Curva patrón de casiopeína IIgly en solución. | 29 |
| Tabla 7. Curva patrón de casiopeína IIgly en plasma. | 30 |
| Tabla 8. Resultados de linealidad del sistema. | 39 |
| Tabla 9. Resultados de linealidad y repetibilidad del método. | 43 |
| Tabla 10. Repetibilidad del método analítico. | 44 |
| Tabla 11. Reproducibilidad del método en diferentes días. | 44 -45 |
| Tabla 12. Exactitud del método. | 45 |
| Tabla 13. Porcentaje de recobro de casiopeína IIgly en plasma de rata Wistar. | 46 |
| Tabla 14. Límite de cuantificación. | 46 |
| Tabla 15. Estabilidad de la muestra analítica procesada a t0 horas. | 47 |
| Tabla 16. Estabilidad de la muestra procesada a t12 horas. | 47 |
| Tabla 17. Estabilidad de la muestra procesada a t 24 horas. | 48 |

| | |
|---|----|
| Tabla 18. Estabilidad de muestra sin procesar ciclos congelación/ descongelación. | 48 |
| Tabla 19. Porcentaje de recobro de muestras de sangre | 50 |
| Tabla 20. Resultados de cinética <i>in vitro</i> de casiopeína IIgly conc. 12.5 µg/mL. | 51 |
| Tabla 21. Resultados de cinética <i>in vitro</i> de casiopeína IIgly conc. 25 µg/mL. | 52 |
| Tabla 22. Resultados de cinética <i>in vitro</i> de casiopeína IIgly conc. 50 µg/mL. | 53 |

1.0

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1.1 INTRODUCCIÓN

En la actualidad el diseño de nuevos fármacos es de gran importancia, a lo largo de veintiséis años de trabajo un grupo multidisciplinario de investigadores ha trabajado en una serie de compuestos desarrollados en la UNAM bajo la dirección de la Dra. Lena Ruíz Azuara a los cuales denominó casiopeínas.

Se conoce como casiopeínas a una familia de más de 100 compuestos sintetizados a base de cobre (II), que en su esfera de coordinación tienen dos ligantes bidentados, uno de ellos es una diimina (N,N), y el otro puede ser un aminoacidato (N,O) o donador (O,O).

Actualmente estos compuestos están en fase preclínica de ahí que sea importante conocer las propiedades biofarmacéuticas inherentes del compuesto, ya que muy pronto estos compuestos entraran a la fase I, es de gran interés conocer las relaciones existente entre fármaco, forma farmacéutica y organismo.

Durante la década de los 80's se comprobó la actividad antitumoral de algunos compuestos de esta familia en ensayos *in vivo* e *in vitro* con lo cual se dio inicio a las pruebas de cemimiento primario sugeridas por el Cancer Chemotherapy National Service Center donde se estipula el uso de líneas celulares de tumores murinos y humanos.

La Casiopeína IIgly [Agua (4,7-dimetil-1,10-fenantrolina) (glicina) Cu(II) nitrato] se encontró que actúa contra tumores como Hela (carcinoma cérvico-uterino), L210 (leucemia) y células de tipo calo, y S180 (sarcoma), B16 (melanoma) y Lw 1, es potencialmente citotóxico y también mata células por apoptosis.

En la presente tesis se llevó a cabo la optimización del método para cuantificar la casiopeína IIgly utilizando el método reportado por Fuentes I. y cols. (referencia 14) para casiopeína III-i, se realizaron cambios a la proporción de la fase móvil, encontrando que las mejores condiciones cromatográficas fueron las siguientes: fase móvil MeOH:Hexansulfonato de sodio (0.003M):ACN ajustado a pH=4 con ácido acético dil, columna Symmetry C-18 4.6x250mm, $\lambda= 273$ nm, flujo de 0.7 mL/min, volumen de inyección 50 μ L.

Se validó el método analítico de acuerdo a la NOM-177-SSA1-1998. El sistema y método, es preciso y lineal en el intervalo de 2.5 a 50 μ g/mL. El método fue preciso con un CV menor al 15 %, una exactitud menor del 15 %, y un recobro de 87.6 % de casiopeína IIgly. El límite de cuantificación (LC) fue de 2.5 μ g/mL y el límite de detección de 0.46 μ g/mL. Las muestras son estables las primeras 12 hrs una vez procesadas encontrándose que es preciso y exacto, las muestras de las 24 horas son precisos, pero no exactos. El método es poco tolerante.

Una vez validado el método analítico se procedió a llevar a cabo la cinética de distribución *in vitro* de casiopeína IIgly en sangre total para determinar el comportamiento del compuesto a diferentes concentraciones las cuales fueron 12.5 μ g/mL, 25 μ g/mL y 50 μ g/mL, las muestras sanguíneas se colocaron en un baño maría de 37 °C sin agitación durante los siguientes lapsos de t0 min, t15 min, t30min, t90min, t150 min y t180min, posteriormente se cuantificó la casiopeína IIgly en plasma y en sangre por el método de CLAR.

El comportamiento de la cinética de distribución es diferente en cada una de las concentraciones trabajadas, en el caso de la conc. de 12.5 μ g/mL las concentraciones en plasma permanecen casi constantes a lo largo del tiempo. En el caso de la conc. de 25 μ g/mL y la de 50 μ g/mL las concentraciones de casiopeína en sangre son mayores que en plasma, después de los 30 minutos las concentraciones en plasma empiezan a alcanzar el equilibrio.

1.2 OBJETIVOS

- Optimizar y validar el método analítico para cuantificar casiopeína IIgly en plasma por el método de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.

- Determinar el tiempo de equilibrio de la casiopeína IIgly para llevar a cabo una cinética de distribución in vitro en sangre total a diferentes concentraciones.

2.0

GENERALIDADES

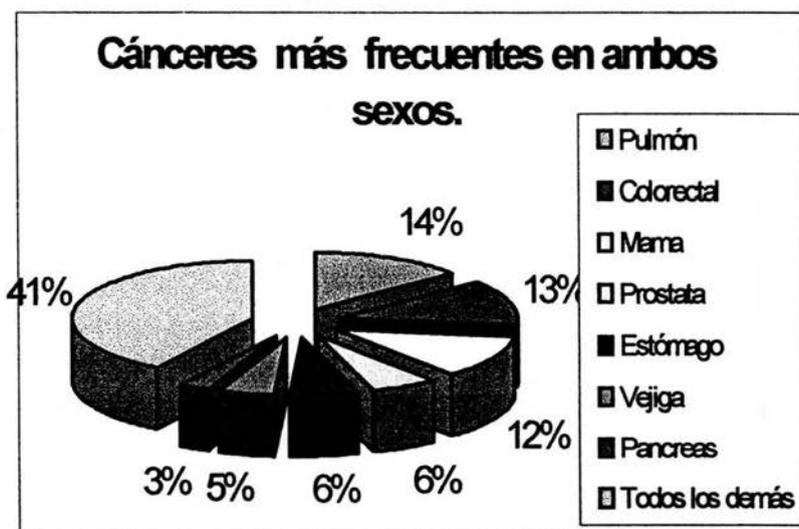


Cáncer

Introducción

El cáncer es una enfermedad crónico degenerativa y es básicamente una enfermedad de las células que se caracteriza por un cambio en los mecanismos de control que regulan la proliferación y diferenciación de las células, formando una masa de tejidos cancerosos que genera invasividad y metástasis.^(16,10)

Cánceres más frecuentes en pacientes con nuevo diagnóstico (ambos sexos).⁽¹³⁾



*<http://oncología.com/tumores.htm>.

Figura 1. Porcentaje de cánceres más frecuentes en ambos sexos.

Tabla 1. Principales causas de defunción en ambos sexos en el 2001 en México.⁽¹²⁾

| EDAD | CAUSA | DEFUNCIONES | No. DE ORDEN |
|--------------|--|-------------|--------------|
| 0 -4 Años | Leucemia | 278 (1%) | 11 |
| 5 -14 Años | Leucemia | 588 (8%) | 1 |
| | Linfoma y MM | 91 (1%) | 15 |
| 15 – 29 Años | Leucemia | 621 (2%) | 8 |
| 30 - 44 Años | Tumor maligno de cuello de útero | 877 (2%) | 11 |
| | Tumor maligno de mama | 749 (2%) | 13 |
| 45 -59 | Tumor maligno de cuello de útero | 1418 (2%) | 8 |
| | Tumor maligno de mama | 1360 (2%) | 9 |
| | Tumor maligno de tráquea, bronquios y pulmón | 1017 (2%) | 12 |
| | Tumor maligno de estómago | 967 (1%) | 13 |

<http://www.salud.gob.mx/apps/htdocs/estadísticas/publicaciones/publicaciones.htm>

(Mortalidad 2001)

Actualmente no se conoce el mecanismo celular que cause este desarrollo maligno, sin embargo se han propuesto diversos factores que solos o en combinación pueden fungir como iniciadores de dicho proceso :⁽²¹⁾

- 1) Exposición a algunas sustancias potencialmente carcinogénicas (factores ambientales que pueden ser físicos, químicos o biológicos), la dieta y factores genéticos.

Tabla 2. Sustancias potencialmente carcinogénicas.

| Factores físicos | Factores Químicos | Factores Biológicos |
|---|--------------------------|----------------------------|
| Radiaciones ionizantes (rayos x, rayos gama) | Aflatoxinas | Oncomavirus |
| | Nitrosaminas | |
| | Gas mostaza | |
| | Benceno | Papilomavirus |
| | Metilcolantreno | Adenovirus |

Los cambios más sobresalientes que ocurren en las células neoplásicas están relacionados con los fenómenos de transformación.⁽²⁰⁾

- Alteraciones de la membrana celular.
- Cambios antigénicos y bioquímicos.
- Alteraciones cromosómicas.

2) La transformación maligna por lo menos requiere de 3 pasos: Iniciación, promoción y progresión.⁽¹⁶⁾

La iniciación se puede entender como el conjunto de eventos que da lugar a la pérdida de la inhibición del crecimiento celular por contacto con células contiguas.

La promoción se refiere a la perpetuación del daño celular probablemente por la actuación de oncogenes o inactivación de los antioncogenes.

La progresión requiere el escape de la célula tumoral del sistema inmunológico, lo que implica una libertad mitótica sin límite.

Casiopeína Ilgly

Por tres decenios se ha hecho un gran esfuerzo por desarrollar medicamentos anticancerosos a través del diseño tanto de pruebas de selección empíricas como racionales de los compuestos de la actualidad.⁽¹⁷⁾

Existen 44 compuestos aprobados para su uso, de ellos sólo dos, el cisplatino y el carboplatino son fármacos inorgánicos a base de Pt (47), de los cuales ninguno es de tecnología mexicana.

La necesidad de importación de estos fármacos incrementa sus costos haciéndolos inaccesibles para el tratamiento de los pacientes.

Por lo que adquiere gran prioridad el desarrollo de fármacos con tecnología nacional, a finales de los años 70's en la Facultad de Química de la UNAM, bajo la dirección de la Dra. Lena Ruíz Azuara se diseñó y sintetizó un nuevo grupo de compuestos de coordinación a base de cobre (II) denominados **casiopeínas**.⁽¹⁸⁾

Se conoce como casiopeínas a una familia de compuestos de coordinación de Cu (II) que en la esfera de coordinación tienen dos ligantes bidentados, uno de ellos es una diimina (N,N) y el otro puede ser un aminoacidato (N,O) o donador (O,O).

Se ha demostrado que las casiopeínas inhiben el crecimiento celular *in vitro* en las células tumorales humanas Hela y Calo, mostrando una dosis- respuesta similar a la mitomicina-G y al cisplatino.⁽²²⁾ Además la LD50 y los estudios toxicológicos indica que las casiopeínas son menos tóxicas. Hasta el momento más de 100 casiopeínas han sido sintetizadas y caracterizadas.⁽²³⁾

En la presente tesis se trabajó con la casiopeína IIgly que forma parte de la subfamilia II con fórmula general:

Casiopeína IIgly
[Agua (4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(glicina)Cu(II)nitrato]
 $C_{16}H_{14}O_3N_4 \cdot H_2O$

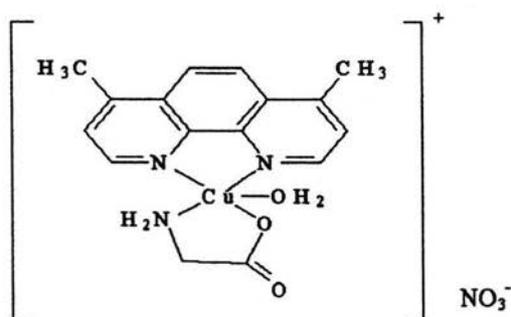


Figura 2. Estructura de casiopeína IIgly.

Propiedades Físicoquímicas

Casiopeína IIgly PM 423.5 g/mol pKa 5.4

Estabilidad

El compuesto es estable al agua a fuerza iónica y a temperatura constante a pH de aproximadamente durante 7 días.

Es termodinámicamente estable y no se descompone en el intervalo de pH de 4 – 10.

La DL₅₀ en ratón por vía intraperitoneal es de 8.8 mg/kg/P.C y de 16 mg/kg por vía intravenosa.

En la actualidad los estudios realizados se han llevado a cabo por un grupo multidisciplinario que participa en este proyecto, se han tenido los siguientes resultados en lo que respecta casiopeína IIgly.

Durante la década de los 80's se comprobó la actividad antitumoral de algunos compuestos de esta familia en ensayos in vivo e in vitro con lo cual se dio inicio con las pruebas de cernimiento primario sugeridas por el Cancer Chemotherapy National Service Center donde se estipula el uso de líneas celulares de tumores murinos y humanos.⁽¹⁶⁾ Encontrando que actúa contra tumores como Hela (carcinoma cérvico-uterino), L210 (leucemia) y células de tipo calo, y S180 (sarcoma), B16 (melanoma) y Lw 1, es potencialmente citotóxico y también mueren células por apoptosis.

La casiopeína IIgly mostró una relación dosis respuesta positiva, lo que indica que el donador O-N influye en la actividad mutagénica del compuesto. Lo que sugiere que los sustituyentes dimetil y difenil influyen directamente en la actividad recombinagénica siendo el dimetil más efectivo en la inducción de recombinación.

La mayoría de los resultados apoyan la hipótesis de que el mecanismo de acción de las casiopeínas con el ADN es por intercalación, las cual interactúan preferentemente con adenina, esta intercalación es de tipo apilamiento, lo cual llevaría a pensar que estos complejos (si llegan integros al ADN). Los complejos formados por fenantrolina sustituidas (- CH₃, -C₆H₅, -H) y aminoácidos tienen un efecto intercalante mucho mayor que aquellos complejos que tienen bipyridinas sustituidas (-H, -CH₃) y acetilacetato o salicialdehído. Lo cual se corrobora con estudios de electroforesis en gel de agarosa, donde se encontró que las familias I y II interactúan en mayor magnitud con el ADN (superenrollado y lineal) que la familia III.⁽³²⁾

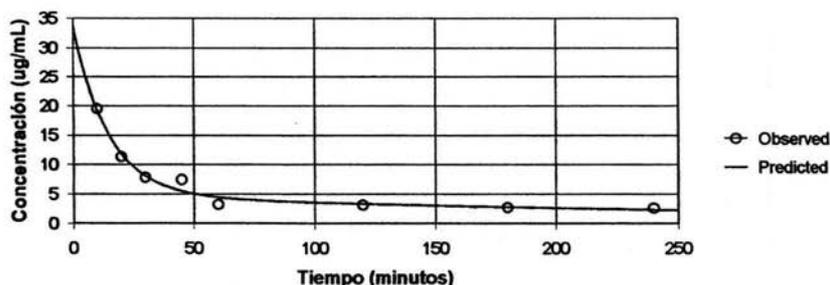
En los estudios de farmacocinética preclínica de la casiopeína IIgly en rata bolo IV con dosis de 8mg/kg (50% de la DL₅₀ en ratón), se obtuvieron los siguientes parámetros:

Tabla 3. Parámetros Farmacocinéticos de casiopeína IIgLy.⁽¹⁵⁾

| Parámetro Farmacocinético | Resultado |
|---|------------------------------------|
| Área bajo la curva (ABC) | 1988.09 $\mu\text{g}/\text{mLmin}$ |
| Concentración plasmática al tiempo cero (C_p^0) | 33.79 $\mu\text{g}/\text{mL}$ |
| Volumen de distribución (V_d) | 0.07 L |
| Depuración (Cl) | 66.84 mL/h |
| Tiempo de vida media ($t_{1/2}$) | 3.80 h |
| Constante de eliminación (β) | 0.18 h^{-1} |
| Constante de eliminación (α) | 4.08 h^{-1} |
| A | 29.04 $\mu\text{g}/\text{mL}$ |
| B | 4.75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ |
| K_{10} | 1.02 h^{-1} |
| K_{12} | 2.52 h^{-1} |
| K_{21} | 0.72 h^{-1} |
| Tiempo de residencia (TMR) | 4.37 h |

Figura 3. Perfil farmacocinética de casiopeína IIgLy

Farmacocinética Casiopeína IIgLy en plasma de ratas.



Efectos tóxicos de la casiopeína Igly

Sin embargo la casiopeína Igly tiene efectos tóxicos a nivel de la función cardiovascular que sugiere una acción a nivel mitocondrial, por la disminución de algunas enzimas mitocondriales como la α -cetoglutarato deshidrogenasa y la succinato-deshidrogenasa.⁽²³⁾

También se han realizado estudios de distribución aplicando una dosis de casiopeína Igly de (5mg/Kg) en ratas observando que el complejo se distribuye rápidamente en sangre y tejidos. Además de que el complejo *in vivo* e *in vitro* se une a proteínas plasmáticas (albúmina) entra rápidamente en células rojas y es transportado a los tejidos. Así como efectos tóxicos una vez administrada la casiopeína como son hemólisis, reducción en la Hb y células inmaduras, atribuido al daño oxidativo del eritrocito.^(24, 25, 26)

Unión a proteínas ^(10, 30, 31)

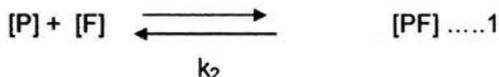
La unión reversible de los fármacos a las proteínas requiere por lo general que la conformación original de la proteína no sea alterada.

La fijación a proteínas sigue en general la ley de acción o de equilibrio químico, es decir 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 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 unión reversible de fármacos a proteína puede describirse como sigue:
 k_1



P: Concentración molar de la proteína libre

F: Concentración molar del fármaco libre

PF: Concentración molar del complejo fármaco-proteína.

K_1 : Constante de asociación del complejo fármaco-proteína.

K_2 : Constante de disociación del complejo fármaco-proteína

Cuando se alcanza el equilibrio se tiene que:

$$K_a = [PF] / [P] [F] \dots\dots\dots(2)$$

El fármaco reversiblemente unido estará en equilibrio con el fármaco libre. La cantidad unida dependerá de la afinidad del fármaco por una proteína determinada. La sangre y los tejidos contendrán a ambos, fármaco libre y unido. Sólo el fármaco libre es el que está disponible para su distribución en el organismo; así como también para producir un efecto terapéutico o tóxico.

Cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR)^(5, 6, 7, 8, 9)

En la presente tesis se utilizó la técnica de CLAR para cuantificar la casiopeína Ilgly en la matriz biológica (plasma y sangre total).

Los métodos de separación son una de las herramientas fundamentales en la química analítica y constituyen la base de la separación preparativa.

La cromatografía es un método físico de separación en el que los componentes se distribuyen entre dos fases: una de ellas es un lecho estacionario (fase estacionaria) y la otra se mueve por percolación a través de la fase estacionaria.

El éxito en la aplicación de la CLAR para un compuesto depende de la combinación correcta de las condiciones de operación es decir; el tipo de columna, la velocidad de flujo, la composición de la fase móvil, etc.

Los sistemas de cromatografía de líquidos se considera como un conjunto de partes o módulos y su instalación generalmente sigue el siguiente diagrama:

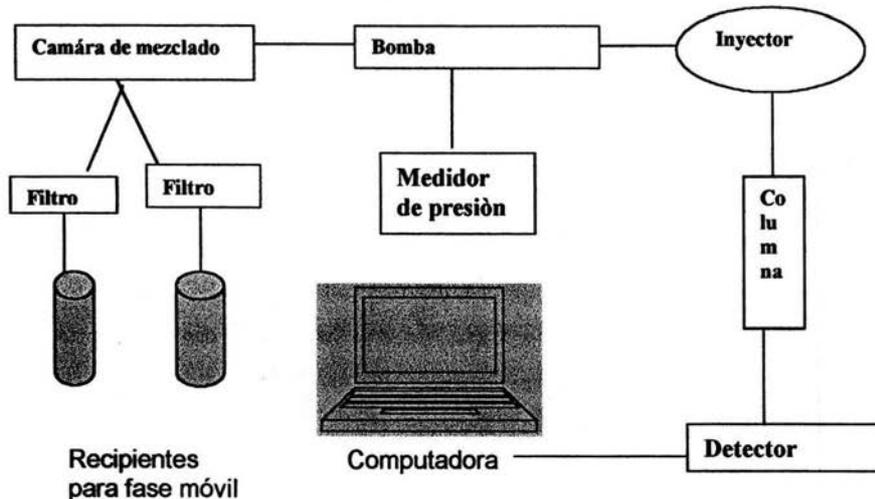


Figura 4. Diagrama de equipo de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR).

Tabla 4. Ventajas y limitaciones de la Cromatografía de líquidos.

| Ventajas | Limitaciones |
|----------------------------|--|
| Diversidad de aplicaciones | Es un equipo costoso |
| Velocidad de análisis | No existe un detector que al mismo tiempo sea sensible y universal |
| Poder de resolución | Capacitación del personal |
| Alta sensibilidad | |
| Automatización | |

A continuación se explica cada una de las partes que integran el equipo de cromatografía de líquidos de alta resolución.

Recipientes

Su función es contener la fase móvil o disolvente. El reservorio debe ser químicamente inerte, ya que la mayoría de los disolventes de la cromatografía de líquidos son corrosivos por naturaleza.

Bomba

Su propósito es pasar la fase móvil del reservorio a la columna de separación. Debe cumplir ciertas especificaciones como reproducibilidad y precisión, manteniendo un flujo constante. La bomba debe ser químicamente inerte ya que se emplea una gran variedad de disolventes.

Inyector

El objetivo del inyector es introducir la muestra en la columna sin pérdida de presión para no alterar el flujo constante y no dañar el empaque de la columna.

Un factor muy importante para obtener una buena resolución es la adecuada introducción de la muestra.

El criterio más importante para conocer el rendimiento del inyector es la precisión del volumen de inyección.

Columna

La columna es la base o alma del sistema debido a que en ella se lleva a cabo la separación de los componentes de la muestra en estudio. Consiste en un segmento de tubo de algún material inerte, de diámetro uniforme y capaz de resistir presiones altas. El material más común es acero inoxidable.

La cromatografía de fase inversa involucra una fase estacionaria relativamente poco polar, en donde los grupos silanoles del soporte van unidas cadenas de hidrocarburos de 8 a 18 carbonos, y se utilizan por lo general con fases móviles muy polares para separar componentes poco polares.

Detector

El detector funciona como el "ojo" del sistema cromatográfico, su función es traducir un cambio de la concentración de la muestra que eluye de la columna, en una señal eléctrica que se registra por el procesador.

Pueden ser de dos tipos: aquellos que miden alguna propiedad del soluto y la fase móvil como por ejemplo, índice de refracción y aquellas que miden alguna propiedad del soluto únicamente como absorción al UV o fluorescencia.

Los principales requerimientos para seleccionar un buen detector depende en gran medida de la aplicación, pero lo que se requiere de él es un buen nivel de detección (sensibilidad), bajo nivel de ruido y linealidad de la respuesta.

Registrador de señal

Nos proporciona una representación gráfica o cromatograma, de la respuesta del detector. El uso de integradores electrónicos evita los errores en la medición de las áreas o de las alturas.

Validación del método analítico (1, 2, 3, 4, 11)

Validación del método analítico es la confirmación documental de que los resultados obtenidos por medio del método son confiables. La validación se divide básicamente en dos partes:

- Validación del sistema
- Validación del método

Los parámetros a considerar en una validación del método son los siguientes:

- Selectividad (especificidad)
- Linealidad
- Exactitud
- Precisión
- Límite de cuantificación
- Límite de detección
- Estabilidad de la muestra
- Recobro absoluto
- Tolerancia o robuztez

Selectividad

Es la capacidad de un método analítico para cuantificar exacta y específicamente el compuesto a analizar, en presencia de otros compuestos que pudieran estar presentes en la muestra (precursores sintéticos y productos de degradación).

Linealidad

La linealidad de un método analítico es su capacidad (dentro de un intervalo dado de concentraciones) para obtener resultados de prueba que sean directamente proporcionales a la concentración de analito (cantidad) en la muestra.

Precisión

Es el grado de concordancia de los resultados analíticos obtenidos dentro de una serie de mediciones efectuadas en una muestra homogénea bajo las mismas condiciones de operación.

Se expresa en términos del coeficiente de variación. La precisión es una medida del grado de reproducibilidad y/o repetibilidad del método analítico bajo las condiciones normales de operación.

Repetibilidad

La precisión de un método analítico expresa la variación dentro de un mismo laboratorio obtenida entre determinaciones independiente realizadas en las mismas condiciones. Para determinar la repetibilidad se analiza un mismo día por quintuplicado tres concentraciones conocidas: alta, media y baja, estas concentraciones deben ser diferentes a la curva de patrón, pero dentro del intervalo de trabajo.

Reproducibilidad

Es la precisión de un método analítico que expresa la variación obtenida entre determinaciones independientes realizadas en un mismo laboratorio, pero con diferentes condiciones de análisis, tales como día, equipo, columna o analistas.

Exactitud

Es la concordancia entre un valor medido experimentalmente y el valor de referencia.

Recuperación Absoluta

Es la eficiencia de un método analítico para cuantificar él o los compuestos por analizar en la muestra biológica. El por ciento de esta razón no es necesariamente del 100%, pero debe ser reproducible en cada nivel de concentración dentro del intervalo.

Límite de detección

Es la mínima concentración de un compuesto en una muestra el cual puede ser detectado, pero no necesariamente cuantificado, bajo las mismas condiciones de operación. Este se determina dos veces el nivel de ruido.

Límite de cuantificación

Es la concentración más baja del compuesto que puede ser cuantificarse cumpliendo con la precisión y la exactitud establecidos en el método.

Estabilidad de la muestra

Es la propiedad del compuesto por analizar de conservar sus características, desde el momento del muestreo hasta su análisis.

Se determinan las condiciones de temperatura y tiempo, en la que el compuesto permanezca estable en la matriz biológica, durante su manejo, almacenamiento y procesamiento.

Estas son las condiciones que se establece:

- Condiciones de almacenamiento
- Ciclos congelación/descongelación
- Estabilidad de la muestra procesada a 0 h, 12 h y 24 h.

Tolerancia o robustez

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.

3.

PARTE EXPERIMENTAL



El desarrollo experimental de la presente tesis se realizó en el laboratorio 112 del Edificio E de la Facultad de Química , UNAM.

3.1 Equipo

- Vortex Thermolyne Maxi Mix II 37600 Mixer
- Centrifuga eppendorf 5416
- Potenciometro Orion Research analog pH meter/model 301
- Sonicador Fisher Scientific FS60
- Milli-Q Water System
- Baño María Imperial IV water bath LAB.-Line
- Balanza analitica Sartorius analytic
- Equipo de cromatografía
 - Bomba Shimadzu LC-10AD_{VP}
 - Inyector SIL-10 AD_{VP}
 - Detector SPD-10_{VP} UV- Visible
 - System Controller SCL-10 A_{VP}

3.2 Reactivos.

- Hexansulfonato de sodio grado HPLC Lot. P135-27-2
- Metanol grado HPLC Tecnolab
- Acetonitrilo grado HPLC Tecnolab
- Prednisona USP Shering-Plough
- Sulfato de zinc (granular) Mallinckrodt AR
- Casiopeína Ilgly Lote 152 MBG100203
- Agua grado HPLC (destilada, desionizada y filtrada).
- Material biológico
- Plasma de rata cepa Wistar
- Sangre de rata cepa Wistar

3.3 Soluciones

- Solución de hexansulfonato de sodio 0.003 M
- Solución de sulfato de zinc al 10 %
- Solución de prednisona 90 µg/mL
- Solución de casiopeína IIgly 1 mg/mL
- Solución de casiopeína II gly 100µg/mL
- Solución de casiopeína IIgly 50µg/mL
- Fase móvil (MeOH:Hexansulfonato de sodio (0.003M):ACN) pH=4
- Solución de ácido acético diluido (1:1)
- Metanol:agua (1:1)

3.4 Preparación de soluciones

3.4.1 Solución de hexansulfonato de sodio (0.003M)

PM 188.22 g/mol

$$\text{gramos} = (0.250 \text{ L})(188.22 \text{ g/mol})(0.003 \text{ mol/L}) = 0.1411 \text{ g}$$

Pesar 0.1411g de hexansulfonato de sodio, transferir el peso a un matraz volumétrico de 250 mL, disolver y llevar al aforo con agua desionizada. Filtrar la solución .

3.4.2 Solución de sulfato de zinc al 10%

Pesar 0.5000 gramos de ZnSO₄ disolverlo y llevar al aforo de 5 ml con agua desionizada.

3.4.3 Solución de prednisona 90 µg/mL

$$90 \mu\text{g/mL} * 50 \text{ mL} = 4500 \mu\text{g} = 4.5 \text{ mg} = 0.0045 \text{ g de prednisona.}$$

Pesar 0.0045 g de prednisona transferir a un matraz volumétrico de 50 mL, disolver y llevar al aforo con metanol .

3.4.4 Solución patrón de casiopeína IIgly 1 mg/mL

$$1\text{mg/mL} \cdot 5\text{mL} = 5\text{ mg} = 0.0050\text{ g de casiopeína IIgly}$$

Pesar 0.0050 g de casiopeína IIgly transferir el peso a un matraz volumétrico de 5 mL, disolver y llevar al aforo con metanol :agua (1:1). Cubrir la solución con papel aluminio.

3.4.5 Solución de casiopeína IIgly 100 µg/mL y 50 ug/mL.

Solución de casiopeína IIgly 100 µg/mL

A partir de la solución patrón de casiopeína IIgly de 1 mg/mL, se tomó la alícuota para preparar las soluciones .

$$V_2 = (100\mu\text{g/mL}) (0.5\text{ mL}) / 1000\mu\text{g/mL} = 0.5\text{mL} = 500\ \mu\text{L}$$

Tomar la alícuota de 500 µL a partir de la solución patrón de 1 mg/mL , transferirlo a un matraz volumétrico de 5 mL, llevar al aforo con metanol:agua (1:1).

Solución de casiopeína IIgly 50 µg/mL

Tomar una alícuota de 250 µL de la solución patrón de casiopeína IIgly de 1 mg/mL transferir a un matraz volumétrico de 5 mL, llevar al aforo con metanol:agua (1:1).

Todas las soluciones de casiopeína deben cubrirse con papel aluminio.

3.5 Optimización del método para cuantificar casiopeína IIgly

En la optimización del método las modificaciones que se realizaron fueron primordialmente en la fase móvil. Se partió del método reportado por Reyes, R. L referencia 15, cabe mencionar que se llevó a cabo una extracción sólido-líquido utilizando cartucho sep-pak vac C-18.⁽¹⁵⁾

En la siguiente tabla se resúmen las modificaciones realizadas en la fase móvil para recorrer el tiempo de retención utilizando el método de extracción reportado por Fuentes I. y cols. para casiopeína IIIi.⁽¹⁴⁾

Tabla 5. Condiciones de trabajo utilizadas para optimizar el método.

| FASE MÓVIL | COMPOSICIÓN | PROPORCIÓN (V/V) |
|--|---------------------------------|--------------------|
| Metanol:Agua | MeOH:H ₂ O | 58:42 η |
| Metanol:Hexansulfonato de sodio (0.001M) | MeOH: Hexan | 58:42 η |
| Metanol:Agua:Acetonitrilo | MeOH:H ₂ O:ACN | 72.5:24:3.5 * |
| Metanol:Hexansulfonato de sodio (0.01M) | MeOH:Hexan | 58:42 η |
| Metanol:Agua:Hexansulfonato de sodio(0.001M):ACN | MeOH:H ₂ O:Hexan:ACN | 72.5:14:10:3.5 * |
| Metanol:Hexansulfonato de sodio(0.005M):ACN | MeOH:Hexan:ACN | 72.5:25:2.5 * |
| Metanol:Hexansulfonato de sodio (0.01M):ACN | MeOH:Hexan:ACN | 72.5:25:2.5 * |
| Metanol:Hexansulfonato de sodio (0.005M) | MeOH:Hexan | 58:42 η |
| Metanol:Hexansulfonato de (0.005M):ACN | MeOH:Hexan:ACN | 57:42:1 * |
| Metanol:Hexansulfonato de sodio(0.001M):ACN | MeOH:Hexan:ACN | 57:42:1 η |
| Metanol:Hexansulfonato de sodio (0.003M):ACN | MeOH:Hexan:ACN | 57.5:42:0.5 η |
| Metanol:Hexansulfonato de sodio(0.009M):ACN | MeOH:Hexan:ACN | 57:42:1 * |
| Metanol:Hexansulfonato de sodio (0.01M) :ACN | MeOH:Hexan:ACN | 57:42:1 η |
| Metanol:Hexansulfonato de sodio (0.003M):ACN | MeOH:Hexan:ACN | 57:42:1 η |

Símbolos

(*) Las fases móviles que tienen este símbolo se les ajustó el pH a 3 con ácido fosfórico diluido, solo a la mezcla de metanol: agua o hexansulfonato de sodio, y posteriormente se le adicionó el acetonitrilo dependiendo del caso.

(η) En estas fase se ajustó el pH a 4 con ácido acético diluido, solo a la mezcla de metanol:agua o hexansulfonato de sodio, y posteriormente se le adicionó el acetonitrilo dependiendo del caso.

3.6 Preparación de curva patrón de Casiopeína Igly en solución y en plasma

3.6.1 La preparación de la curva patrón de casiopeína Igly se realizó de la siguiente manera:

Tabla 6. Curva patrón de casiopeína Igly en solución (metanol:agua 1:1).

| Tubo | Alícuota (μ L) | Aforo (mL) | Conc. (μ g/mL) |
|------|---------------------|------------|---------------------|
| A | 250* | 5 | 50 |
| B | 2500 | 5 | 25 |
| C | 2000 | 5 | 10 |
| D | 2500 | 5 | 5 |
| E | 2500 | 5 | 2.5 |

(*) La alícuota de esta concentración se tomó a partir de la solución patrón de casiopeína Igly de 1 mg/mL en MeOH:H₂O (1:1).

A partir de esta son sucesivas las diluciones para preparar la curva patrón. cubrir las soluciones con papel aluminio.

Antes de tomar la alícuota correspondiente agitar en vortex la solución por 30 segundos, llevar al aforo con metanol:agua (1:1).

3.6.2 Curva patrón de casiopeína Igly en plasma

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

Tabla 7. Curva patrón de Casiopeína Igly en plasma

| Solución | Alicuota(μ L) | Aforo (mL) | Conc.(μ g/mL) | Conc. Final (μ g/mL) ^{&} |
|----------|--------------------|------------|--------------------|--|
| A | 105.0♣ | 1 | 105.0 | 50 |
| B | 52.5♣ | 1 | 52.5 | 25 |
| C | 21.0♣ | 1 | 21.0 | 10 |
| D | 105.0* | 1 | 10.5 | 5 |
| E | 52.5* | 1 | 5.25 | 2.5 |

(♣) Estas alícuotas se tomaron a partir de la solución patrón de casiopeína Igly de 1mg/mL.

(*) Para la preparación de estas soluciones se tomaron a partir de la solución de casiopeína Igly de 100 μ g/mL. Cada una de las soluciones se llevo a 1 mL con plasma de rata, posteriormente se agitó por 30 segundos en vortex. Todas las soluciones se cubrieron con papel aluminio.

([&]) Indica la concentración final una vez aplicado el método de extracción en plasma.

3.6.3 Metodología para cuantificar casiopeína Igly en plasma por CLAR.

La extracción de casiopeína Igly en plasma se realizó por medio de una precipitación de la siguiente manera:

En un tubo de ensayo se colocó 1 mL de muestra a está se le adicionó 100 μ L de ZnSO₄ al 10%, posteriormente se agitó en vórtex por 20 segundos , luego se agregó 1 mL de metanol en el cual va incluido el estándar interno (Prednisona conc. de 45 μ g/mL), nuevamente se volvió a agitar por 20 segundos en vortex, después se centrifugó por 10 minutos a 5000 r.p.m. .Separar el sobrenadante en una jeringa conectada a un filtro nylon GL 0.45 μ m, el filtrado se recolecta en un vial y se inyecta un volumen de 50 μ L para ser cuantificado por el método de CLAR.

3.7 VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

La validación se divide básicamente en dos partes: validación del sistema y validación del método. Los parámetros a considerar en una validación son: selectividad, linealidad, exactitud, precisión, límite de detección, límite de cuantificación, estabilidad de la muestra, porcentaje de recobro y tolerancia del método analítico. A continuación se describe como se validó cada uno de los parámetros, según la NOM-177-SSA1-1998 y el Manual de Procedimientos Normalizados de Operación del Laboratorio de Biofarmacia.

3.7.1 Linealidad del sistema

La linealidad del sistema se determinó construyendo una curva de calibración en el intervalo de concentración de 2.5 a 50 $\mu\text{g/mL}$ preparadas a partir de una solución patrón de casiopeína Igly de 1 mg/mL, esta curva se inyectó por duplicado. Los parámetros a evaluar son el coeficiente de correlación(r), coeficiente de determinación (r^2), pendiente (m), ordenada al origen(b) y el C.V.

3.7.2 Linealidad del método

Para la linealidad del método se determinó preparando tres curvas de calibración de casiopeína Igly en el intervalo de concentración de 2.5 a 50 $\mu\text{g/mL}$, preparadas de forma independiente. Se evaluaron los mismos parámetros que en el caso del sistema.

3.7.3 Precisión

La precisión se evaluó por medio de dos parámetros la repetibilidad y la reproducibilidad del método .

Para determinar la repetibilidad se evaluó en un mismo día , bajo las mismas condiciones, tres concentraciones 3 $\mu\text{g/mL}$, 15 $\mu\text{g/mL}$ y 45 $\mu\text{g/mL}$, las cuales están dentro del intervalo del trabajo, pero diferentes a las concentraciones de la curva, se realizaron por quintuplicado. Las muestras se procesaron de acuerdo al método descrito en el apartado 3.6.3.

Para determinar la reproducibilidad se analiza en dos días diferentes por quintuplicado tres concentraciones, las mismas que en el caso de repetibilidad. Se determinó el promedio, desviación estándar y coeficiente de variación.

3.7.4 Exactitud

Para determinar la exactitud del método se toman los datos de repetibilidad y reproducibilidad de las determinaciones de los puntos control de 3µg/mL, 15 µg/mL y 45 µg/mL, los cuales deben estar dentro del ± 15% del valor nominal de concentración.

$$\text{Exactitud} = \frac{\text{Conc. nominal} - \text{Conc. experimental}}{\text{Conc. nominal}} * 100$$

3.7.5 Recuperación Absoluta

Se determinó analizando en un mismo día un mínimo tres concentraciones conocidas: 3µg/mL, 15 µg/mL y 45 µg/mL en la matriz biológica por quintuplicado cada concentración. Se comparó el área del sistema como nuestro 100% a cuanto equivale la muestra analizada en método de su respectiva concentración.

El porcentaje de esta razón no es necesariamente del 100%, pero debe ser reproducible en cada nivel de concentración dentro del intervalo.

3.7.6 Límite de detección

Se determina dos veces el nivel de ruido. Se documenta el criterio utilizado para establecerlo.

3.7.7 Límite de cuantificación

Se analizó la concentración baja de la curva patrón en este caso la de 2.5 µg/mL de casiopeína IIgLy, por quintuplicado, y se determinó el coeficiente de variación.

3.7.8 Estabilidad de la muestra

Se evaluó la respuesta a tres niveles de concentración (baja, media y alta) del compuesto por analizar en la matriz biológica en este caso las concentraciones que se trabajaron fueron 3 µg/mL, 15µg/mL y 45 µg/mL, en muestra preparadas por duplicado, considerando las siguientes condiciones:

- Condiciones de almacenamiento
- Ciclos congelación/descongelación
- Estabilidad de la muestra procesada a 0 h, 12 h y 24 h.

Los resultados obtenidos deben cumplir los criterios de exactitud y repetibilidad expresada anteriormente.

3.7.9 Tolerancia o robustez

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.

Todo lo anterior debe se llevo para casiopeína Igly en plasma.

En el caso del método en sangre solo se realizó una validación parcial, debido a que en este fluido es un estudio preliminar.

3.8 Condiciones cromatográficas

Las condiciones de trabajo fueron las siguientes:

- **Columna:** Symmetry C-18, dimensiones 250 x4.6 mm, tamaño de partícula de 5 µm.
- **Precolumna:** precolumna Security Guard Phenomenex guard cartridge system C18.
- **Fase móvil:** Metanol HPLC:Hexansulfonato de sodio (0.003M) ajustado a pH=4 con ácido acético dil.(1:1) :Acetonitrilo HPLC 57:42:1 (v/v).
- **Flujo:** 0.7 mL/min.
- **Longitud de onda:** 273 nm.
- **Volumen de inyección:** 50 µL.

3.9 Metodología de la cinética *in vitro* de casiopeína Igly ⁽²⁸⁾

Se prepararon muestras sanguíneas de rata Wistar con casiopeína Igly a diferentes concentraciones 12.5 µg/mL, 25 µg/mL y 50 µg/mL, por duplicado, posteriormente se colocaron en baño maría los tubos a 37 °C sin agitación, los tiempos de muestreo fueron t0, t15, t30, t90, t150 y t180 min. Una vez transcurrido el tiempo indicado se retiraron los tubos del baño. En seguida se tomaron 200 µL de sangre total para seguir el procedimiento indicado en el diagrama de flujo No. 6, lo restante del tubo se centrifugó a 5000 r.p.m durante 5 minutos para obtener el plasma y seguir el procedimiento indicado en el apartado 3.6.3 .

3.9.1 Determinación del tiempo de equilibrio de la casiopeína Igly en plasma de rata.

Se realizaron varios preliminares con la concentración de 12.5µg/mL de casiopeína Igly para determinar el tiempo en el cual era más conveniente tomar las muestras, encontrándose que después de los 90 minutos empieza a presentarse un equilibrio constante la concentración de casiopeína Igly en plasma. Se determinó realizar el muestreo hasta las 3 horas para apreciar mejor la cinética de la casiopeína Igly.

Con los datos obtenidos de área de la casiopeína Igly a lo largo de la cinética de distribución del compuesto en sangre total, se interpolaran en su respectiva curva patrón, para cada punto de la cinética se tendrán por duplicado tanto en sangre como en plasma, para determinar la concentración . Posteriormente los datos de sangre total y de plasma se graficarán para ver la distribución de la casiopeína Igly en ambos fluidos conc. vs tiempo.

Figura 5. Diagrama de flujo de metodología utilizada en plasma.

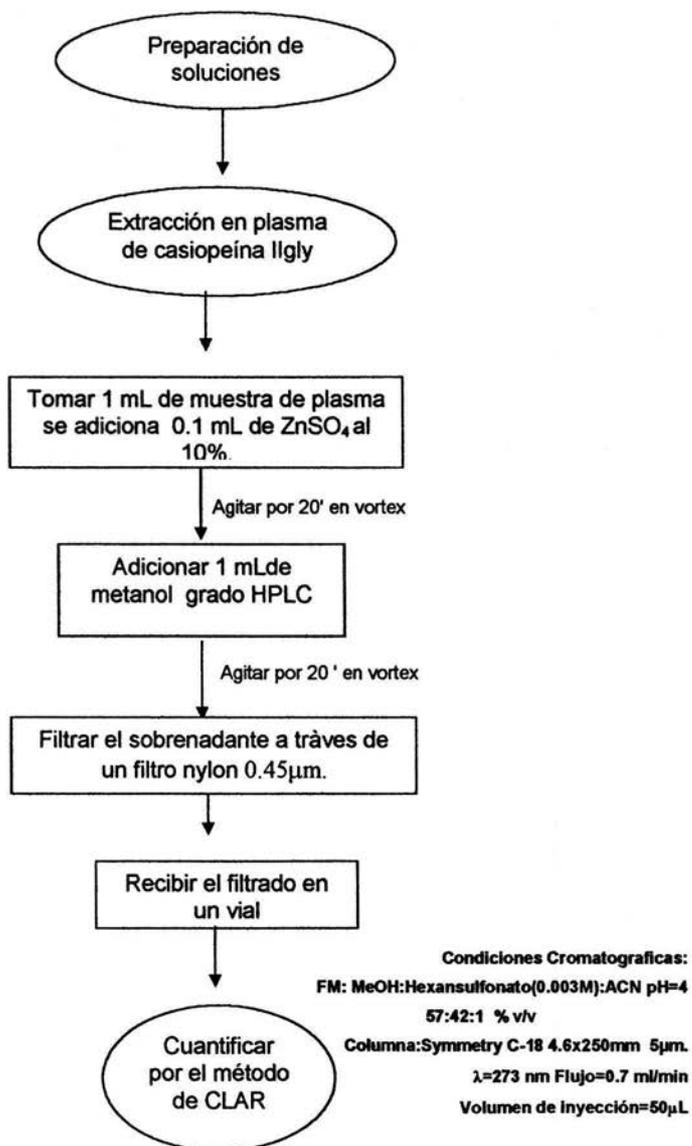
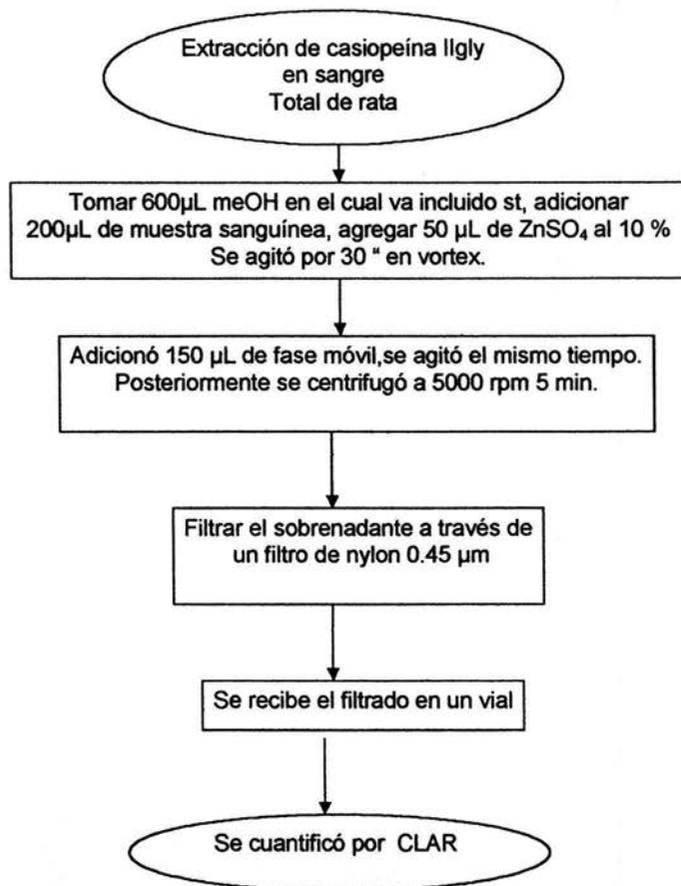


Figura 6. Diagrama de flujo de metodología utilizada en sangre total.



Condiciones Cromatográficas:

FM: MeOH:Hexansulfonato(0.003M):ACN pH=4
57:42:1 % v/v

Columna:Symmetry C-18 4.6x250mm 5µm.

λ=273 nm Flujo=0.7 ml/min

Volumen de inyección=50µL



4. RESULTADOS

1. RESULTADOS

A continuación los resultados obtenidos durante la parte experimental de este trabajo de acuerdo a los lineamientos mencionados en el capítulo III.

1.1 Optimización del método analítico

En la optimización del método analítico el criterio empleado para la selección de la fase móvil, se basó en aquella que proporcionara mejor tiempo de retención, mejor definición, resolución de los picos y un tiempo de análisis corto, con el propósito de contar con una cuantificación confiable del fármaco.

Las condiciones de trabajo fueron las siguientes:

- Columna: Symmetry C-18, dimensiones 250 x4.6 mm, tamaño de partícula de 5 μ . % Carbono 18.82 – 20.18
- Precolumna: precolumna Security Guard phenomenex guard cartridge system C18.
- Fase móvil: Metanol HPLC:Hexansulfonato de sodio (0.003M) ajustado a pH=4 con ácido acético dil.(1:1) :Acetonitrilo HPLC 57:42:1 (v/v).
- Flujo: 0.7 mL/min.
- Longitud de onda: 273 nm.
- Volumen de inyección: 50 μ L.

4.2 Validación del sistema

Linealidad del sistema

La validación del sistema se realizó con dos curvas patrón de casiopeína Igly en un mismo día en solución de metanol:agua (1:1), obteniéndose los siguientes resultado:

Tabla 8. Resultados de linealidad del sistema.

| Conc. ($\mu\text{g/mL}$) | Curva 1 A casio/ A st. | Curva 2 A casio/A st. | | | |
|-------------------------------|------------------------------|-----------------------------|------------|-----------|--------|
| 2.5 | 0.0939 | 0.1066 | | | |
| 5 | 0.1974 | 0.1859 | | | |
| 10 | 0.3556 | 0.3553 | | | |
| 25 | 0.8871 | 0.8775 | | | |
| 50 | 1.9413 | 1.9454 | Promedio | DE | CV% |
| m | 0.0387 | 0.0387 | 0.0386651 | 0.0000120 | 0.03 |
| b | -0.0201 | -0.0213 | -0.0207022 | 0.0008869 | 4.28 |
| r | 0.9988 | 0.9985 | 0.9987 | 0.0003 | 0.0253 |
| r ² | 0.9977 | 0.9970 | 0.9973 | 0.0005 | 0.0505 |

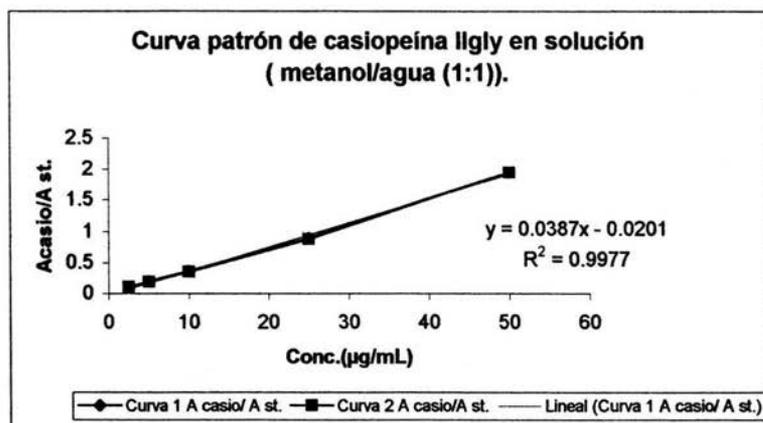


Figura 7. Gráfica de linealidad de casiopeína Igly en sistema, considerando como respuesta cromatográfica relación de área.

4.3 Validación del método

4.3.1 Selectividad del método

La selectividad del método de casiopeína Igly se muestra en los siguientes cromatogramas:

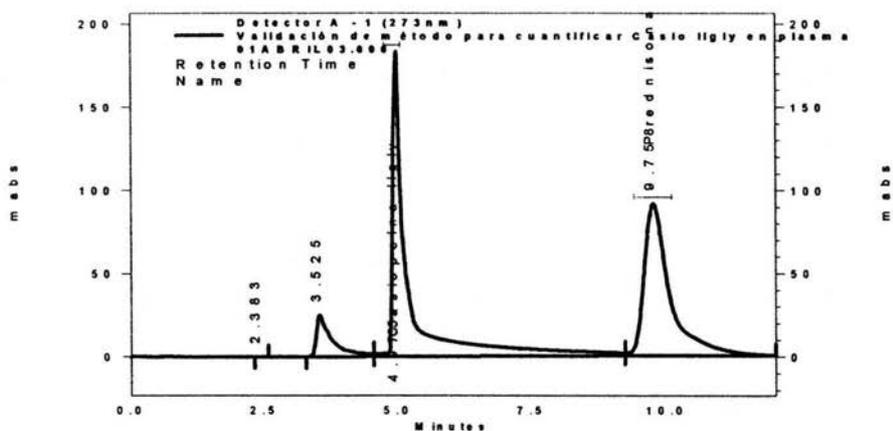


Figura 8. Cromatograma Casiopeína Igly y estándar interno Prednisona en solución.

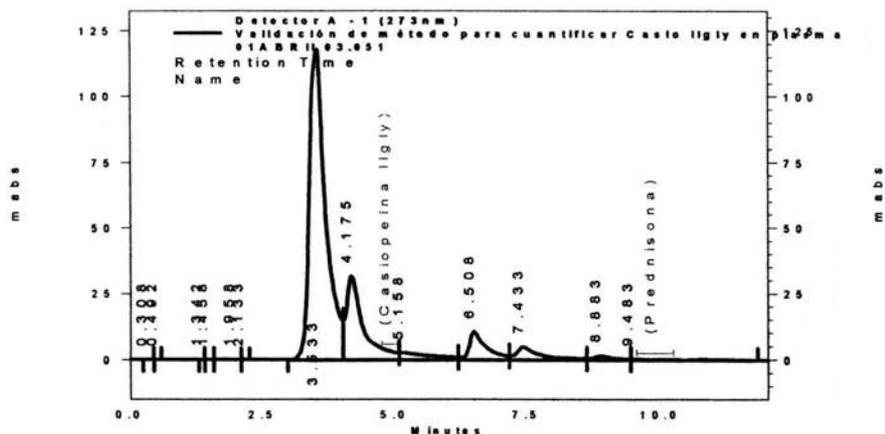


Figura 9. Cromatograma de blanco de plasma de rata Wistar.

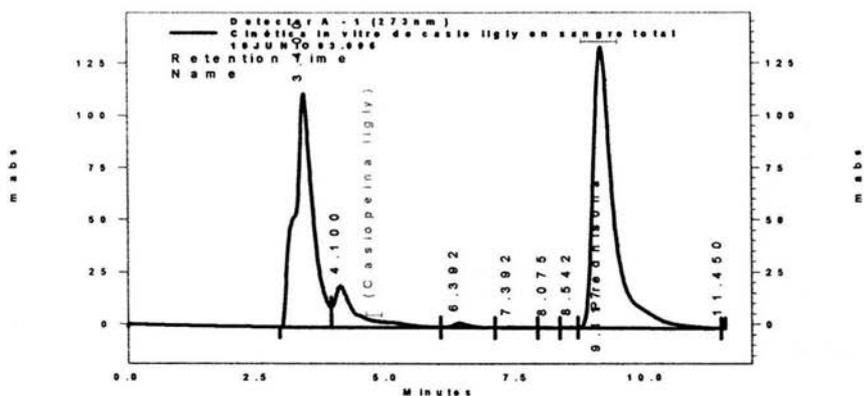


Figura 10. Cromatograma de blanco de sangre total de rata Wistar

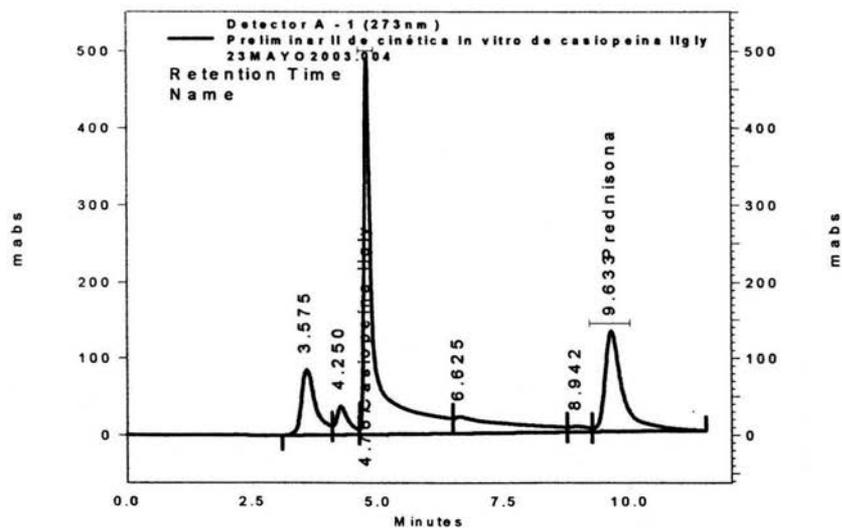


Figura 11. Cromatograma de Casiopegina Igly en plasma de rata Wistar.

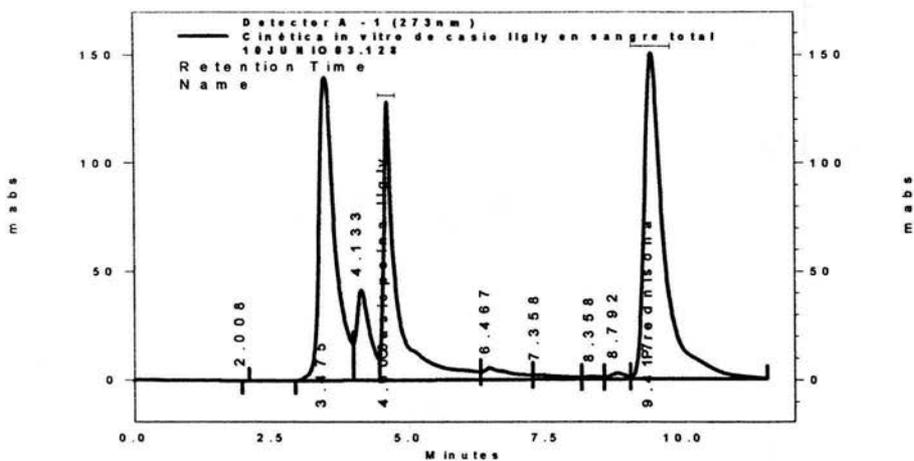


Figura 12. Cromatograma de estándar interno Prednisona 45 µg/ml.

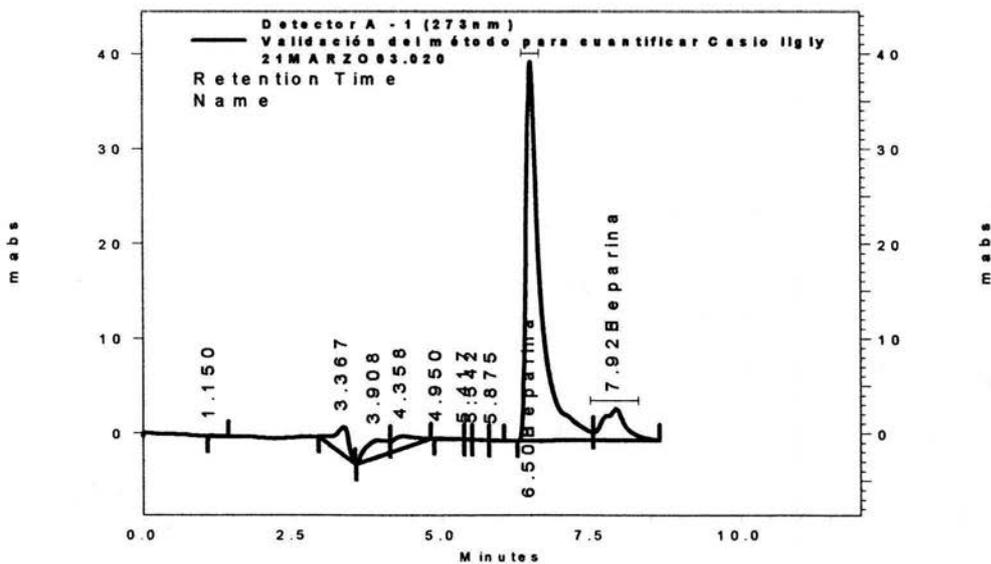


Figura 13. Cromatograma de anticoagulante utilizado Heparina dil.(1:10).

4.3.2 Linealidad y repetibilidad del método.

En linealidad del método se realizó con tres curvas patrón de casiopeína Igly en plasma en un mismo día obteniéndose los siguientes resultados:

Tabla 9. Resultados de linealidad y repetibilidad del método.

| Conc. (µg/mL) | Curva 1 | Curva 2 | Curva 3 | Promedio | DE | CV% |
|---------------|---------|---------|---------|----------|--------|------|
| 2.5 | 0.2563 | 0.2128 | 0.2007 | 0.2233 | 0.0292 | 13.1 |
| 5 | 0.3326 | 0.3028 | 0.2709 | 0.3021 | 0.0309 | 10.2 |
| 10 | 0.5932 | 0.6450 | 0.6057 | 0.6146 | 0.0270 | 4.4 |
| 25 | 1.6016 | 1.4484 | 1.4616 | 1.5039 | 0.0849 | 5.6 |
| 50 | 2.7670 | 2.7798 | 2.6536 | 2.7335 | 0.0695 | 2.5 |
| | | | | | | |
| m | 0.0541 | 0.0544 | 0.0525 | 0.0537 | 0.0010 | 1.9 |
| b | 0.1124 | 0.0719 | 0.0678 | 0.0840 | 0.0247 | 29.4 |
| r | 0.9969 | 0.9997 | 0.9986 | 0.9984 | 0.0014 | 0.1 |
| r2 | 0.9938 | 0.9993 | 0.9972 | 0.9968 | 0.0028 | 0.3 |

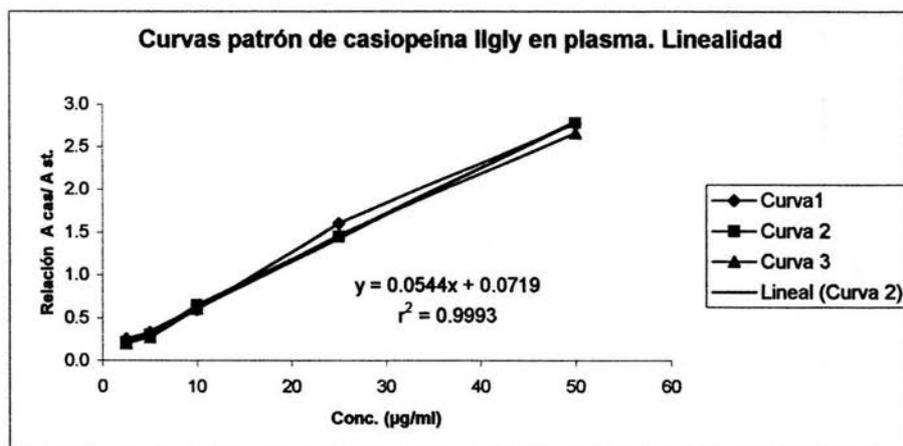


Figura 14. Gráfica de linealidad de casiopeína Igly en plasma de rata .

4.3.3 Precisión del método

- **Repetibilidad del método**

Para la repetibilidad del método se utilizaron tres concentraciones o puntos control de 3 μ g/mL, 15 μ g/mL y 45 μ g/mL de casiopeína IIgy cada una por quintuplicado.

Tabla 10. Repetibilidad del método analítico .

| Concentración | Conc. (μ g/mL) | Conc. (μ g/mL) | Conc. (μ g/mL) |
|---------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| nominal | 3 | 15 | 45 |
| Replica 1 | 3.62 | 12.06 | 43.01 |
| Replica 2 | 3.91 | 13.71 | 41.04 |
| Replica 3 | 3.87 | 14.81 | 41.50 |
| Replica 4 | 3.89 | 13.79 | 40.58 |
| Replica 5 | 3.69 | 13.54 | 40.21 |
| Promedio | 3.80 | 13.58 | 41.27 |
| DE | 0.13 | 0.98 | 1.09 |
| CV% | 3.5 | 7.2 | 2.6 |

- **Reproducibilidad del método**

En la reproducibilidad del método se trabajaron los puntos control antes mencionados por quintuplicado en dos días diferentes.

Tabla 11. Reproducibilidad del método en días diferentes.

| Con. Exp. (μ g/mL) | Con. Exp. (μ g/mL) | | | |
|-------------------------|-------------------------|-----------------------------|------|------|
| Día 1 | Día 2 | | | |
| 3.62 | 4.96 | | | |
| 3.91 | 4.99 | Conc. Nominal (μ g/mL) | | |
| 3.87 | 4.44 | 3 | | |
| 3.89 | 4.37 | Promedio | DE | CV% |
| 3.69 | 4.36 | 4.21 | 0.49 | 11.7 |

Tabla 11. Reproducibilidad del método en días diferentes.

| Con. Exp. ($\mu\text{g/mL}$) Día 1 | Con. Exp. ($\mu\text{g/mL}$) Día 2 | | | |
|--|--|---|------|-----|
| 12.06 | 13.11 | | | |
| 13.71 | 14.56 | Conc. Nominal ($\mu\text{g/mL}$) 15 | | |
| 14.81 | 14.26 | | | |
| 13.79 | 13.26 | Promedio | DE | CV% |
| 13.54 | 15.05 | 13.81 | 0.89 | 6.5 |
| 43.01 | 43.15 | Conc. Nominal ($\mu\text{g/mL}$) 45 | | |
| 41.04 | 42.8 | | | |
| 41.5 | 42.47 | Promedio | DE | CV% |
| 40.58 | 49.39 | 44.14 | 5.28 | 12 |
| 40.21 | 57.24 | | | |

4.3.4 Exactitud del método

Se tomaron los valores de precisión para determinar si el método es exacto, empleando la fórmula que se encuentra en el apartado 3.7.4.

Tabla 12. Exactitud del método analítico.

| Conc. $\mu\text{g/ml}$ Nominal | Concentración Experimental | |
|--------------------------------------|-----------------------------------|------------------------|
| | Interpolación $\mu\text{g/ml}$ | Exactitud de A/ Asi |
| 3 | 2.3 | 23.3 |
| 3 | 2.6 | 13.3 |
| 3 | 2.5 | 16.7 |
| 3 | 2.5 | 16.7 |
| 3 | 2.3 | 23.3 |
| 15 | 12.1 | 19.6 |
| 15 | 13.7 | 8.6 |
| 15 | 14.8 | 1.3 |
| 15 | 13.8 | 8.1 |
| 15 | 13.5 | 9.8 |
| 45 | 43.0 | 4.4 |
| 45 | 41.0 | 8.8 |
| 45 | 41.5 | 7.8 |
| 45 | 40.6 | 9.8 |
| 45 | 40.2 | 10.6 |

4.3.5 Porcentaje de Recobro

Tabla 13. Porcentaje de recobro de casiopeína IIgly en plasma de rata.

| Conc.($\mu\text{g/mL}$) | A/A SI Casiopeína IIgly | | | A/ A SI Casiopeína IIgly | | |
|---------------------------|-------------------------|------|-----------|--------------------------|------|------|
| | 3 | 15 | 45 | 3 | 15 | 45 |
| Nominal | Muestras en sistema | | | Muestras en plasma | | |
| Replica 1 | 0.24 | 1.15 | 2.91 | 0.22 | 0.84 | 2.51 |
| Replica 2 | 0.23 | 0.91 | 2.85 | 0.24 | 0.96 | 2.35 |
| Replica 3 | 0.24 | 1.05 | 2.72 | 0.24 | 1.04 | 1.63 |
| Replica 4 | 0.17 | 1.16 | 3.04 | 0.24 | 0.97 | 1.73 |
| Replica 5 | 0.22 | 1.16 | 2.57 | 0.22 | 0.95 | 1.78 |
| Promedio | 0.22 | 1.09 | 2.82 | 0.23 | 0.95 | 2.00 |
| | | | % Recobro | 104.4 | 87.5 | 71.0 |
| | | | Promedio | | | |
| | | | %Recobro | 87.6 | | |

4.3.6 Límite de cuantificación

Se preparó por quintuplicado el punto de 2.5 $\mu\text{g/mL}$ de casiopeína IIgly en plasma a partir de un pull de plasma de rata, obteniéndose los siguientes resultados:

Tabla 14. Resultados de límite de cuantificación.

| Conc. ($\mu\text{g/mL}$) | Conc. Experimental ($\mu\text{g/mL}$) |
|-------------------------------|---|
| Nominal | |
| 2.5 | 2.7 |
| 2.5 | 2.9 |
| 2.5 | 2.4 |
| 2.5 | 3.0 |
| 2.5 | 3.1 |
| Promedio | 2.8 |
| DE | 0.28 |
| CV% | 9.9 |

4.3.7 Límite de detección

El nivel de ruido fue 1.1 mab esto se multiplicó por dos y de esa forma se determinó el límite de detección 2.2 mab lo que corresponde a una concentración de 0.46 $\mu\text{g/mL}$.

4.3.8 Estabilidad de la muestra.

Resultados de estabilidad de la muestra analítica se realizó por duplicado cada uno de los puntos control obteniendo los siguientes resultados:

Tabla 15. Estabilidad de la muestra analítica a t0 .

| Conc. µg/mL | Interpolación µg/mL | Exactitud | | | |
|------------------|------------------------|-----------|-----------|----------|----------|
| 3 | 2.7 | 10.0 | | | |
| 3 | 2.8 | 7.7 | | | |
| 15 | 11.3 | 24.7 | | | |
| 15 | 12.8 | 14.7 | | | |
| 45 | 42.8 | 4.9 | | | |
| 45 | 39.9 | 11.3 | | | |
| Conc. (µg/mL) | Interpolación µg/mL | A/Asi | Precisión | | |
| | | | Replica1 | Replica2 | Promedio |
| 3 | 2.7 | 2.8 | 2.7 | 0.050 | 1.8 |
| 15 | 11.3 | 12.8 | 12.0 | 1.1 | 8.8 |
| 45 | 42.8 | 39.9 | 41.4 | 2.0 | 4.9 |

- Estabilidad de la muestra procesada a las 12 horas.

Tabla 16. Estabilidad de la muestra al tiempo de 12 horas.

| Conc. µg/mL | A/Asi | Interpolación µg/mL | Exactitud | | | |
|------------------|------------------------|------------------------|-----------|----------|----------|----|
| 3 | 0.28 | 3.59 | 19.6 | | | |
| 3 | 0.24 | 3.01 | 0.33 | | | |
| 15 | 0.86 | 11.61 | 22.6 | | | |
| 15 | 0.94 | 12.73 | 15.2 | | | |
| 45 | 3.11 | 42.65 | 5.2 | | | |
| 45 | 3.10 | 42.54 | 5.5 | | | |
| Conc. (µg/mL) | Interpolación µg/mL | A/Asi | Precisión | | | |
| | | | Replica1 | Replica2 | Promedio | DE |
| 3 | 3.59 | 3.01 | 3.30 | 0.41 | 12.6 | |
| 15 | 11.61 | 12.73 | 12.17 | 0.79 | 6.5 | |
| 45 | 42.65 | 42.54 | 42.60 | 0.08 | 0.2 | |

- Estabilidad de la muestra a las 24 horas de procesada.

Tabla 17. Estabilidad de la muestra al t 24 horas.

| Conc.($\mu\text{g/mL}$) | A/Asi | Interpolación $\mu\text{g/ml}$ | Exactitud | | |
|---------------------------|-------|-----------------------------------|-----------|--|--|
| 3 | 0.26 | 3.30 | 9.9 | | |
| 3 | 0.29 | 3.65 | 21.5 | | |
| 15 | 0.95 | 12.76 | 14.9 | | |
| 15 | 1.03 | 13.90 | 7.4 | | |
| 45 | 3.28 | 45.03 | 0.1 | | |
| 45 | 3.25 | 44.51 | 1.1 | | |

| Conc. ($\mu\text{g/mL}$) | Interpolación $\mu\text{g/mL}$ | | Precisión | | |
|-------------------------------|-----------------------------------|----------|-----------|------|------|
| | Replica1 | Replica2 | Promedio | DE | CV % |
| 3 | 3.30 | 3.65 | 3.47 | 0.25 | 7.1 |
| 15 | 12.76 | 13.90 | 13.33 | 0.80 | 6.0 |
| 45 | 45.03 | 44.51 | 44.77 | 0.37 | 0.8 |

- **Estabilidad de la muestra sin procesar: dos ciclos de congelación/descongelación.**

En este caso se preparó cada punto control por duplicado, obteniéndose los siguientes resultados:

Tabla 18. Estabilidad de la muestra sin procesar ciclos congelación/descongelación.

| Conc. $\mu\text{g/mL}$ | Interpolación $\mu\text{g/mL}$ | Exactitud | | | |
|---------------------------|-----------------------------------|-----------|--|--|--|
| 3 | 3.2 | 5.5 | | | |
| 3 | 3.0 | 0.0 | | | |
| 15 | 11.3 | 24.6 | | | |
| 15 | 10.2 | 32.2 | | | |
| 45 | 37.3 | 17.2 | | | |
| 45 | 35.1 | 22.0 | | | |

| Conc. ($\mu\text{g/mL}$) | Interpolación $\mu\text{g/mL}$ | A/Asi | Precisión | | |
|-------------------------------|-----------------------------------|----------|-----------|-----|------|
| | | | Promedio | DE | CV % |
| Nominal | Replica1 | Replica2 | | | |
| 3 | 3.2 | 3.0 | 3.1 | 0.1 | 3.6 |
| 15 | 11.3 | 10.2 | 10.7 | 0.8 | 7.5 |
| 45 | 37.3 | 35.1 | 36.2 | 1.5 | 4.2 |

4.3.8 Tolerancia del método

Para la tolerancia del método se realizó cambio de columna en las mismas condiciones en las que se trabajaron los puntos control, las columnas probadas fueron :

- Hypersil Hypurity™ Elite C-18 , 5 μ 250 x 4.6 mm. % Carbono 12.4 -13.5
- Agilent Zorbax SB C-18 5 μ ,250 x 4.6 mm.
- Phenomenex Luna 5 μ C-18, 250x 4.6 mm. % Carbono 17.8 \pm 0.70

Se realizaron modificaciones a la fase móvil:

- No se ajusto el pH de la fase móvil, el pH final de la fase móvil fue de 5.4.

4.4 Datos en sangre estudio preliminar de validación

Se determinó el porcentaje de recobro de las muestras en sangre comparandolas con el sistema, realizando la metodología que se encuentra en el diagrama de flujo 5 , en las mismas condiciones cromatográficas mencionadas anteriormente.

Tabla 19. Porcentaje de recobro de muestras en sangre.

| Conc.(µg/ml) | Area de casiopeína Igly Sistema | Método en sangre | % Recobro | Promedio |
|--------------|---------------------------------|------------------|-----------|----------|
| 2.5 | 816047 | 351048 | 43.0 | 70.2 |
| 5 | 1052532 | 963145 | 91.5 | |
| 10 | 2497309 | 1543405 | 61.8 | |
| 25 | 6945809 | 5080574 | 73.1 | |
| 50 | 16012289 | 13032131 | 81.4 | |
| | m | 266535.7 | | |
| | b | -736850.2 | | |
| | r | 0.9938 | | |
| | r² | 0.9877 | | |

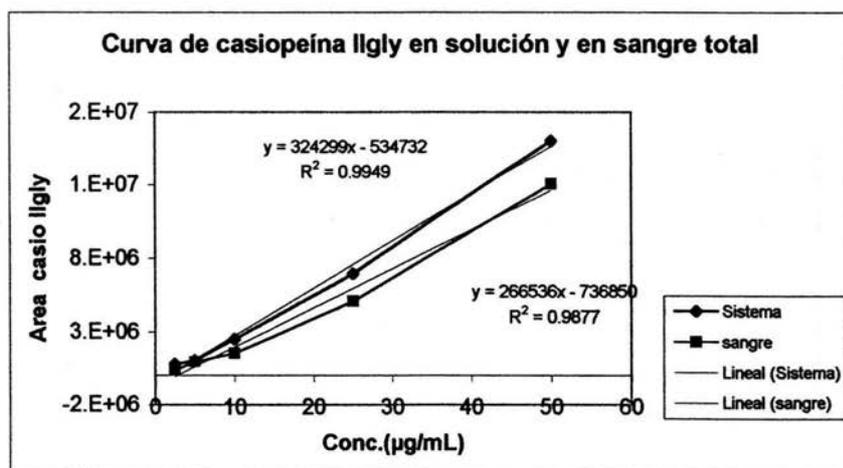


Figura 15. Gráfica de curva patrón de casiopeína Igly en sangre total.

4.5 Resultados de cinética *in vitro* de casiopeína IIgly en sangre total.

Se trabajó con tres concentraciones diferentes 12.5 µg/mL, 25 µg/mL y 50 µg/mL de casiopeína IIgly por duplicado en sangre total en las condiciones mencionadas en el apartado 3.9, obteniéndose los siguientes resultados.

Tabla 20. Resultados de cinética *in vitro* de casiopeína IIgly concentración de 12.5 µg/mL.

| CASIOPEÍNA IIgly | CONCENTRACIÓN | |
|------------------|---|---|
| | Conc.(µg/mL) Promedio PLASMA | 12.5 µg/mL Conc.(µg/mL) Promedio SANGRE |
| Tiempo (min) | | |
| 0 | 8.7 | 12.5 |
| 15 | 7.5 | 17.1 |
| 30 | 9.4 | 16.9 |
| 90 | 8.9 | 5.8 |
| 150 | 10.1 | 13.6 |
| 180 | 10.9 | 14.2 |

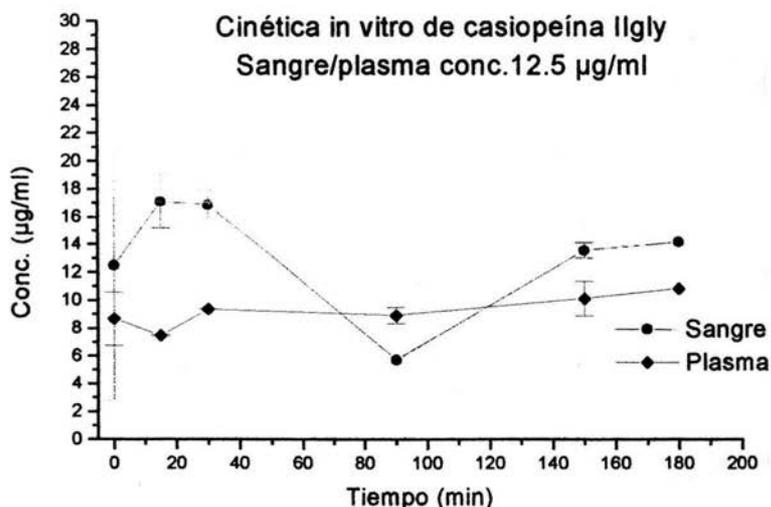


Figura 16. Gráfico de cinética *in vitro* de casiopeína IIgly concentración de 12.5µg/mL.

Tabla 21. Resultados de cinética *in vitro* de casiopeína IIgly en sangre total concentración de 25 µg/mL.

| CASIOPEÍNA | IIgly CONC. 25 µg/mL | |
|------------|------------------------------------|------------------------------------|
| | Conc.(µg/mL) Promedio PLASMA | Conc.(µg/mL) Promedio SANGRE |
| 0 | 19.6 | 13.6 |
| 15 | 22.0 | 10.2 |
| 30 | 11.4 | 9.7 |
| 90 | 14.3 | 20.0 |
| 150 | 14.8 | 27.6 |
| 180 | 15.3 | 23.8 |

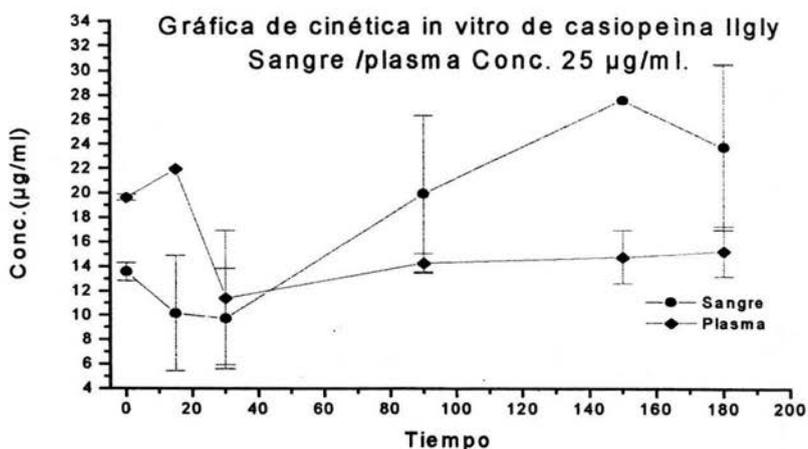


Figura 17. Gráfico de cinética *in vitro* de casiopeína IIgly concentración de 25µg/mL.

Tabla 22. Resultados de cinética *in vitro* de casiopeína Igly en sangre total concentración de 50 µg/mL.

| CASIOPEÍNA | Igly CONC. | 50 µg/mL |
|--------------|-------------------------------|-------------------------------|
| Tiempo (min) | Conc. (µg/mL) Promedio PLASMA | Conc. (µg/mL) Promedio SANGRE |
| 0 | 45.2 | 23.2 |
| 15 | 28.9 | 26.5 |
| 30 | 23.5 | 31.4 |
| 90 | 18.0 | 50.6 |
| 150 | 16.0 | 34.6 |
| 180 | 16.3 | Dato perdido |

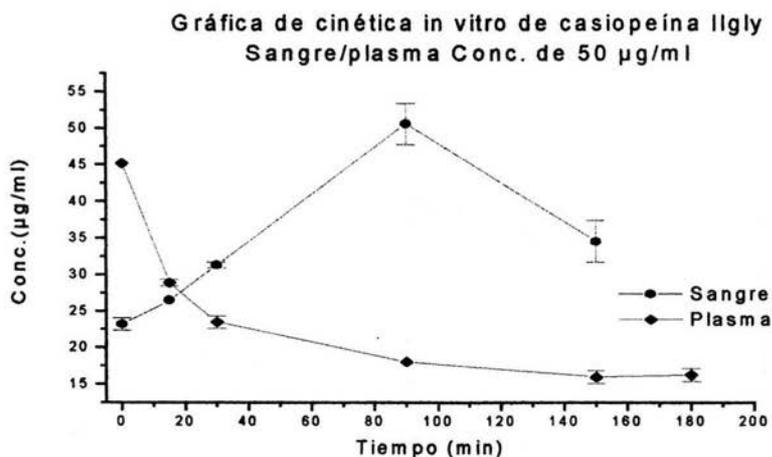


Figura 18. Gráfico de cinética *in vitro* de casiopeína Igly concentración de 50 µg/mL.

5.

ANÁLISIS DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES

5.0 ANÁLISIS DE RESULTADOS

El análisis de datos se realizó tomando en cuenta la relación de área (casiopéina Ilgly/prednisona) como respuesta cromatográfica.

5.1 Análisis de resultados de la validación del sistema.

Los resultados de la tabla 8. muestran los datos de linealidad del sistema, el intervalo de trabajo fue de 2.5 µg/mL a 50 µg/mL, obteniéndose una ecuación de la recta de $y = 0.0386X - 0.0207$ con una $r = 0.9987$ y $r^2 = 0.9973$, por lo tanto se demuestra que la concentración del analito es directamente proporcional a la respuesta obtenida.

5.2 Análisis de resultados de validación del método.

La selectividad del método podemos observar en el blanco de plasma y el blanco de sangre total no hay interferencias por parte de la matriz biológica, también podemos ver un blanco del anticoagulante utilizado (heparina dil. (1:10), los picos no interfieren con el compuesto de interés. En la figura 10,11 podemos observar el pico de la casiopéina Ilgly en tr 4.7 a 4.9 y el estándar utilizado (prednisona) con un tiempo de retención de 9.6 a 9.9.

El límite de cuantificación se determinó preparando el punto más bajo de la curva por quintuplicado, obteniéndose un coeficiente de variación de 9.87 %. En cuanto al límite de detección se obtuvo el nivel de ruido de un cromatograma de blanco de plasma, posteriormente se relacionó con la altura de la concentración más baja de la curva, obteniéndose un LOD 0.46 µg/mL.

Para determinar la linealidad y repetibilidad del método se procesaron tres curvas patrón de casiopéina Ilgly en un mismo día, las mismas concentraciones del sistema, observando que las tres curvas cumplen con el criterio de linealidad con un $r > 0.9984$ y un $r^2 > 0.9968$, la ecuación de la recta es $y = 0.0537X + 0.0840$.

El coeficiente de variación entre las curvas va de 2.5 a 13.1 %, lo que indica que el método cumple con los criterios de aceptación que marca la norma.

La precisión del método se determinó por medio de la repetibilidad y reproducibilidad, preparando puntos control de las siguientes concentraciones 3 µg/mL, 15 µg/mL y 45 µg/ml por quintuplicado para la repetibilidad, obteniendo coeficientes de variación de 2.6 a 7.2 % . Para reproducibilidad del método se determinó trabajar los puntos control por quintuplicado en diferentes días, en la tabla 11 se encuentran los datos , el coeficiente de variación va de 2.4 a 13.9 % .

En la tabla 12 se localizan los resultados de exactitud del método, se utilizaron los puntos control antes mencionados, los datos están dentro de ± 15 % del valor nominal de la concentración a excepto los punto control de 3µg/mL y un punto control de 15 µg/mL .

El porciento de recobro de casiopeína IIgly en plasma fue de 87.6 % y en sangre total fue de 70.2%, encontrando que existe un mejor recobro en plasma que en sangre, en este último fluido se deben tener mayor cuidado al tomar las alícuotas, mayor tiempo de agitación para incorporar bien el compuesto, debido a que esta matriz biológica es más viscoso.

La estabilidad de la muestra procesada se inyectó inmediatamente (t0) los puntos control cumplen con el coeficiente de variación es menor del 15 % en el caso de precisión.

La estabilidad de las muestras a las 12 horas solo los puntos de 45 y uno de 3 µg/mL su CV es menor al 15 %, todos los demás punto control estan arriba de este valor para exactitud. En el análisis para determinar si son precisos todos cumplen con un CV que va de 0.2 a 12.6 %.

En la tabla 17. se pueden observar los datos de estabilidad a las 24 horas, solo un punto control de 3 µg/mL no cumple con el criterio de exactitud, todos los demás puntos están por debajo del 15% de la concentración nominal. En el caso de precisión el coeficiente de variación oscila entre 0.8 a 7.1% .. Por lo tanto considero que las muestras son estables las primeras veinticuatro horas, en los casos donde se obtuvo un coeficiente de variación mayor a quince, tal vez el error ocurrió al procesar la muestra.

Se determinaron dos ciclos congelación-descongelación de la muestra una vez transcurrido los ciclos se procedió a procesar la muestra, encontrando que los puntos control de 3 µg/mL son exacto y precisos, en cuanto a los demás puntos no cumplen con los criterios de exactitud y precisión. Cabe mencionar que se observa una disminución en la concentración de casiopeína, considero que no es recomendable sacar y meter del congelador las muestras, probablemente hay degradación del compuesto y por lo tanto los datos no serían confiables.

El método es poco tolerante a los cambios que se realizaron de columna debido a que el compuesto de interés no se detectó utilizando la columna Zorbax y la columna Phenomenex, en el caso de la Hypersil hypurity el pico de casiopeína Ilgly se deformó. En el caso donde no se ajustó el pH a la fase móvil no fue posible detectar el pico de casiopeína Ilgly solo el estándar interno. Aunque las columnas utilizadas son similares a la Symmetry C-18, el porcentaje de carbono en esta última es mayor, que las utilizadas para la tolerancia del método.

5.3 Análisis de resultados de cinética *in vitro* de casiopeína IIgly en sangre total.

Las concentraciones se trabajaron por duplicado, se interpolaron los datos de área en una curva patrón para determinar la concentración de casiopeína IIgly, con los valores obtenidos de concentración se promediaron. Posteriormente se graficó el tiempo contra el promedio de la concentración de casiopeína cuantificada.

Observando las tres cinéticas de distribución de casiopeína IIgly que se llevaron a cabo podemos decir que su comportamiento es diferente en cada una de las concentraciones analizadas.

La concentración de 12.5 µg/mL es la conc. más baja que se trabajó encontrando que las concentraciones del compuesto en sangre son mayores en comparación con las de plasma, excepto en el punto de 90 minutos en sangre donde es más bajo, probablemente en este punto hubo un problema de toma de muestra o al procesarla.

Los primeros tiempos en sangre encontramos una mayor variabilidad de los datos en comparación con el plasma, en este último a partir del tiempo 30 min. permanecen sin mucha variación las concentraciones del compuesto.

Respecto a la concentración de 25 µg/mL es donde observamos mayor variabilidad en los datos de sangre como en plasma. Siendo en plasma más altas las tres primeras concentraciones, posterior a este punto permanece casi constante. En cambio en sangre ocurre al inverso las primeras concentraciones son más bajas, y posteriormente va aumentando.

La concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ es donde podemos observar menor variabilidad entre los datos, los dos primeros puntos son mayores en plasma que en sangre, posteriormente va decreciendo la concentración en plasma hasta permanecer constante en los últimos tres puntos y en sangre lo contrario hasta llegar a un máximo en 90 min. para después volver a disminuir. Es importante hacer notar que la gráfica que se obtuvo en la concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de la cinética in vitro en plasma es muy semejante al perfil farmacocinético in vivo.

Como podemos ver el comportamiento de la cinética de distribución es muy diferente en cada una de las concentraciones trabajadas. Otro punto importante es entre mayor es la concentración de casiopeína IIgly mayor grado de hemólisis se observaba en las muestras que se trabajaron.

Podemos ver que la distribución del compuesto en la cinética in vitro en relación de conc. en plasma / conc. en sangre de casiopeína IIgly va de 0.36 a 2.15. En donde estamos encontrando el cociente más bajo es en la concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y es de esperarse ya que las concentraciones en sangre son mayores que en plasma.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

5.4 CONCLUSIONES

Fue posible optimizar el método analítico para cuantificar casiopeína Igly en plasma con respecto al método reportado en la referencia 15, cual utilizan una extracción sólido-líquido. El método montado es más sencillo y económico, fue lineal en el intervalo de 2.5 µg/mL a 50 µg/mL, es selectivo, preciso y exacto, con un recobro de 87.6 % y límite de detección de 0.46 µg/mL. El tiempo de retención del compuesto de interés fue de 4.8 y estándar interno prednisona de 9.6-9.9 minutos.

Se demostró que el método en la aplicación es útil en plasma y en sangre, capaz de detectar y cuantificar las concentraciones en una cinética *in vitro* en sangre total, como se mencionó anteriormente el comportamiento a diferentes concentraciones de casiopeína Igly es diferente en cada caso. Observando que en todos los casos a partir del tiempo de 30 minutos en plasma empieza haber un equilibrio, en sangre es donde se registran las concentraciones más altas después de los 30 minutos.

La importancia de llevar a cabo la cinética de distribución *in vitro* de la casiopeína Igly radica en que es un compuesto nuevo del cual se requiere conocer sus propiedades biofarmacéuticas, una de ellas es saber su distribución y comportamiento tanto en plasma como en sangre total, en algunos artículos se sugiere que hay un efecto de almacenaje en los eritrocitos, además se sabe que la casiopeína Igly tiene alto grado de unión a proteínas (albúmina).^(24, 25,26)

6.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Manual de Procedimientos Normalizados. Unidad de Estudios de Bioequivalencia. Laboratorio de Biofarmacia ,UNAM.
2. Corporación Analítica Integral , CANITEC pág. 4.
3. <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/177ssa18.html>.
4. Weed, Donald H. Una aproximación estadística integrada a la validación del método analítico. *Pharmaceutical Technology* .4 (1) pp. 10-19.
5. <http://www.relaq.mx/RLQ/tutoriales/Cromatografia/hplc.htm>
6. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 7 ed. Apartado de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución . México. 2000. pp 234-237.
7. Rubinson, Judith F. Rubinson Kenneth. Química Analítica Contemporanea. 1 ed. Edit. Prentice Hall.México. 2000 pp.406-417.
8. Douglas,A. Skoog. Fundamentos de Química Analítica. 4 ed. TomoII Edit. Reverte. Barcelona.1997 pp. 710-715.
9. Manual de Buenas Prácticas de Laboratorio en Cromatografía de Líquidos. CENAM (Centro Nacional de Metrología).
10. Rodríguez , Silva Susana. Tesis de Licenciatura. Estudio de unión a proteínas plasmáticas de casoipeína III-i en albumina, plasma de rata y plasma de humano. UNAM 2003.
11. Guidance for industry. Bioanalytical Methods Validation for Human studies. U.S. Department of Health and Human Services. December 1998 pp.1-13.
12. <http://www.ssa.gob.mx>
13. <http://www.oncología.com/tumores.htm>.

-
14. Fuentes Noriega et. al. Development and validation of liquid chromatographic method for casiopeina III-i in rat plasma. J. of Chromatography B. 772 (2002) 115-121.
 15. Reyes,R..Leobardo. Fuentes Noriega, I. et. al. Development and validation of liquid chromatographic method for casiopeina IIgly in rat plasma. J. of B. 791(2003) pp.111-116.
 16. 4ª Jornada de trabajo en casiopeína. Facultad de Química, UNAM 2000. pp. 19, 59, 62, 65-66, 77,
 17. Goodman & Gilman's . The pharmacological Basics of therapeutics. 8ed. Mc Graw-Hill México 1996 pp. 1302-1307.
 18. Katzung, Bertram G. Farmacología básica y clínica. 7 ed. El manual Moderno. México 1993 pp. 1011-1014.
 19. Salamanca, Gómez Fabio. Citogenética Humana. Fundamentos y aplicaciones clínicas. 1 reimpresión. Edit. Médica Panamericana . México 1993 pp. 258-259.
 20. Guyton, Arthur C. Tratado de Fisiología Médica. Interamericana. México 1997 pp. 41-42.
 21. Guizar, Vázquez Jesús. Genética Clínica. Diagnóstico y manejo de las enfermedades hereditarias. 2 ed. El manual moderno. México 1994. pp.575-579.
 22. 2ª Jornada de trabajo en casiopeínas 2. Facultad de Química, UNAM. 1996. pp 12, 22-23.

-
23. Primer Congreso en Casiopeína. 5ª . Jornada de trabajo en casiopeínas.
Facultad de Química. UNAM. 2002. pp.28, 136-139, 128.
24. A. De Vizcaya-Ruiz. et. al. Hematological effects of casiopeína II: a novel
copper-based anticancer agent. American Ass.For Cancer Research (1998)
39:328
25. A. De Vizcaya-Ruiz. Haemotological response after administration of the
novel copper-based anticancer agent casiopeína II. Jornada de trabajo en
casiopeínas 3. pp.31
26. Vizcaya-Ruiz, A. Rivero – Muller, M. Dobrota. Distribution and toxicity of
casiopeína II. School of Biological Science Univ. Surrey.
27. Lena Ruiz-Ramírez. et. al. Cytostatic, mutagenic, antineoplastic activities
and preliminar toxicity of cooper (II) New drugs:casiopeína I, II, III. J.
Inorg.Bioch. 43.2 615(1992).
28. Bustamente García Ruth, et.al. Manual para el uso y manejo de la rata y el
ratón como animales de laboratorio. Bioterio de la F.Q y Departamento de
Farmacia. Facultad de Química , UNAM.
29. Kye S. Han . et.al. Blood Partition and Protein Binding of a New Reversible
Proton Pump Inhibitor, YH1885. Biopharm. Drugs Dispos. 19: 413-415
(1998).
30. Clark,Bruce. Smith, Dennis A. Introducción a la farmacocinética. Edit.
Acribis . España 1989. pp 56 -59.

-
31. Smith, M.D Cedric. Reynard, Alan M. Farmacología. 1 reimp. Edit. Médica Panamericana S.A. México 1997 pp.44-46.
32. Tovar, Tovar Araceli. et.al. Interacción entre casiopeínas y adenina. Primer Congreso en casiopeínas. 5ª Jornada de trabajo en casiopeínas. Facultad de Química. UNAM. 2002 pág.121-128.