



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

Optimización y validación del método por CLAR para  
cuantificar Casiopeína III-a en sangre total y su aplicación en  
ratas susceptibles con tumor transplantado glioma C6.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A :

JOVITA LIZETH SÁNCHEZ SÁNCHEZ



EXAMENES PROFESIONALES  
FAC. 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	M. en C. Sofía Margarita Rodríguez Alvarado
Secretario	M. en C. Lauro Misael Del Rivero Ramírez
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 de Biofarmacia, Departamento de Farmacia, Conjunto E, Facultad de Química, UNAM.

**M. en C. Inés Fuentes Noriega**  
Asesor del Tema

**Jovita Lizeth Sánchez Sánchez**  
Sustentante

**A mis padres**

Minerva Sánchez Oseguera y  
Efrén Sánchez Armengolt  
con amor y respeto

**A mis hermanas**

Efy, Yuyu, Gladiola, Nallely, Laura y Miriam  
con cariño

**A mi sobrina**

Fernanda Abril

**A mis amigas**

Nora, Maribel, Lorena  
por su apoyo

**A mis amigos del laboratorio**

Estrella, Fernando, Lupita, Maestra Inés, Escarlet, Leobardo, Julio

## **Agradecimientos**

A CONACyT U41997 - MAI,  
PAPIIT - IN 212100,  
PAIP 6390 - 05,  
CONACyT SECTORIAL SALUD 2002 - C01 - 7677.

Al M. en C. Julio César Rivera, por su apoyo en la realización de este proyecto,  
Gracias !!!

A la M. en C. Inés Fuentes Noriega, por su apoyo y porque siempre estuvo dispuesta a escucharme,  
Mil Gracias !!!

A la M. en C. Margarita Rodríguez y al M. en C. Misael Del Rivero por su dedicación en la revisión de este proyecto,  
Gracias !!!

Si piensas...

Si piensas que estás vencido, lo estás,  
si piensas que no te atreves, no lo harás,  
si piensas que te gustaría ganar  
pero que no puedes, no lo lograrás,  
si piensas que perderás, ya has perdido,  
porque en el mundo encontrarás que  
el éxito empieza con la voluntad del hombre.

Piensa en grande y tus hechos crecerán,  
Piensa en pequeño y quedarás atrás,  
piensa que puedes y podrás.

*Claude Bernard*

## Índice general

<b>Capítulo I. Introducción</b>		
1.1	Introducción.....	2
1.2	Objetivos.....	3
<b>Capítulo II. Antecedentes</b>		
2.1	Antecedentes.....	5
2.1.1	Cromatografía.....	5
2.1.1.1	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución .....	6
2.1.2	Cáncer .....	8
2.2	Casiopeínas .....	14
2.2.1	Casiopeína IIII-a .....	17
2.3	Glioma .....	19
2.4	Validación de métodos analíticos .....	21
<b>Capítulo III. Materiales y Métodos</b>		
3.1	Materiales y métodos .....	25
3.1.1	Preparación de soluciones .....	27
3.2	Optimización del método analítico para cuantificar Casiopeína IIII-a en sangre total por CLAR .....	31
3.2.1	Tratamiento de la muestra .....	34
3.3	Validación del método analítico para cuantificar Casiopeína IIII-a en sangre total por CLAR .....	35
3.3.1	Validación del sistema .....	35
3.3.2	Validación del método .....	36
3.4	Aplicación del método .....	40
3.4.1	Diagrama experimental .....	40
<b>Capítulo IV. Resultados</b>		
4.1	Resultados .....	45

---

4.1.1	Optimización del método analítico para cuantificar Casiopeína IIII-a en sangre total por CLAR .....	45
4.1.2	Validación del sistema .....	47
4.1.3	Validación del método .....	48
4.1.4	Aplicación del método .....	58

### **Capítulo V. Análisis de Resultados**

5.1	Análisis de resultados .....	65
-----	------------------------------	----

### **Capítulo VI. Conclusiones**

6.1	Conclusiones .....	71
-----	--------------------	----

### **Bibliografía**

	Bibliografía .....	73
--	--------------------	----



## Índice de figuras

Figura 1	Clasificación de la cromatografía en función a la naturaleza de la fase estacionaria .....	5
Figura 2	Clasificación global de la cromatografía .....	6
Figura 3	Esquema del sistema de cromatografía de líquidos .....	8
Figura 4	Etapas principales de la generación de cáncer por sustancias .....	10
Figura 5	Etapas de la carcinogénesis .....	11
Figura 6	Distribución de la edad por sexo en 1999 de los casos notificados en el RHNM .....	13
Figura 7	Estructura química de Casiopeína IIII-a .....	17
Figura 8	Método de separación .....	34
Figura 9	Curva promedio de Casiopeína IIII-a en agua .....	48
Figura 10	Cromatograma de Casiopeína IIII-a preparada en agua (25 µg/mL ..	49
Figura 11	Cromatograma de ranitidina en fase móvil (25 µg/mL) .....	49
Figura 12	Cromatograma blanco del sistema (en agua) .....	50
Figura 13	Cromatograma de Casiopeína IIII-a en agua (35 µg/mL) .....	50
Figura 14	Cromatograma blanco del método (en sangre) .....	51
Figura 15	Cromatograma de heparina (anticoagulante) en agua a 274 nm ....	51
Figura 16	Cromatograma de Casiopeína IIII-a en sangre (50 µg/mL) a 274nm	52
Figura 17	Cromatograma de Cu-(4, 4-dimetil-2,2-bipiridina) en sangre.....	52
Figura 18	Cromatograma de Cu-(acetilacetato) en sangre .....	53
Figura 19	Curva promedio de Casiopeína IIII-a en sangre de rata Wistar .....	54
Figura 20	Modelo Abierto de Dos Compartimientos .....	59
Figura 21	Farmacocinética de concentración de Casiopeína IIII-a en sangre de rata vs tiempo.....	60
Figura 22	Cromatograma Casiopeína IIII-a en sangre de rata con glioma C6 ..	62



---

**Índice de tablas**

Tabla 1	Los 10 principales tumores malignos en mujeres según el RHNM ....	12
Tabla 2	Diluciones utilizadas para preparar la curva de calibración en agua ..	29
Tabla 3	Diluciones utilizadas para preparar la curva de calibración en sangre	30
Tabla 4	Preparación de las muestras control del sistema y método para determinación de Casiopeína IIII-a en agua o sangre .....	31
Tabla 5	Proporciones de los componentes de la fase móvil .....	33
Tabla 6	Estándares .....	33
Tabla 7	Diagrama de toma de muestras, dosis 0.75 mg/Kg de Casiopeína IIII-a en ratas Wistar .....	41
Tabla 8	Diagrama de toma de muestras en el inicio del estudio, dosis 1.5 mg/Kg de Casiopeína IIII-a .....	42
Tabla 9	Diagrama de toma de muestras, dosis 1.5 mg/Kg de Casiopeína IIII-a en ratas Wistar .....	43
Tabla 10	Tiempos de retención .....	45
Tabla 11	Tiempos de retención de Casiopeína IIII-a y ranitidina .....	46
Tabla 12	Tiempos de retención de estándares .....	46
Tabla 13	Linealidad del sistema .....	47
Tabla 14	Linealidad del método .....	53
Tabla 15	% Recobro .....	54
Tabla 16	% Recobro de muestras control de Casiopeína IIII-a en sangre .....	55
Tabla 17	Precisión y exactitud del método de Casiopeína IIII-a en sangre de rata .....	56
Tabla 18	Límite de cuantificación .....	57
Tabla 19	Muestras control, Casiopeína IIII-a en sangre a tiempo cero .....	57
Tabla 20	Ciclo congelación – descongelación .....	58
Tabla 21	Concentraciones de Casiopeína IIII-a, dosis 1.5 mg/Kg en el inicio	



	del estudio en ratas con glioma C6 .....	59
Tabla 22	Parámetros farmacocinéticos obtenidos con el Software Win-Nonlin .	61
Tabla 23	Concentraciones de Casiopeína IIII-a, dosis 1.5 mg / Kg a los 7, 14 y 21 días .....	62
Tabla 24	Volumen tumoral evaluado en ratas Wistar .....	63



Capítulo I

# Introducción

## 1.1 Introducción

La importancia de controlar enfermedades degenerativas mortales como el cáncer ha propiciado la búsqueda, caracterización y síntesis de nuevos compuestos con capacidad antineoplásica, ya que, si bien es cierto que actualmente existe una gran cantidad de estos compuestos en el mercado, también es conocido que son altamente tóxicos, por lo que su eficacia se ve disminuida con el paso del tiempo.

En el desarrollo de nuevos fármacos contra el cáncer: se comprueba la toxicidad del compuesto interesante en líneas celulares normales y cancerosas, luego en animales y después en ensayos clínicos. El éxito de cualquier sustancia quimioterapéutica varía considerablemente de un tipo de cáncer a otro.

Bajo la dirección de la Dra. Lena Ruiz Azuara se diseñó y sintetizó en la Facultad de Química de la UNAM, un nuevo grupo de compuestos de coordinación con centro metálico de cobre, a los cuales llamó Casiopeínas. Estos compuestos han demostrado actividad citostática y antineoplásica importante, principalmente las Casiopeínas II y III, pero sobre todo lo que ha llamado la atención es su baja toxicidad, por lo que han generado muchas expectativas para una posible aplicación clínica a corto plazo. Actualmente las Casiopeínas se encuentran en una fase de evaluación preclínica.

El desarrollo y validación de métodos analíticos se requiere para establecer evidencia documentada para garantizar que los métodos son reproducibles. La validación del método analítico de acuerdo a la NOM-177-SSA1-1998 requiere cumplir con los siguientes parámetros: selectividad, linealidad, recobro, exactitud, precisión, límite de detección, límite de cuantificación, estabilidad por ciclos de congelación-descongelación.



Este trabajo consistió en la optimización de un método analítico previamente desarrollado en el laboratorio 112 y 113 de Biofarmacia, Conjunto E, Facultad de Química que nos permitió cuantificar Casiopeína IIII-a en sangre por CLAR, el cuál posteriormente fue validado para demostrar la confiabilidad del método. También se realizó un estudio, en donde se llevó a cabo la cuantificación de Casiopeína IIII-a en sangre de ratas susceptibles con tumor transplantado glioma C6.

El estudio consistió en la aplicación diaria de Casiopeína IIII-a en ratas Wistar (modelo experimental con trasplante de tumor glioma C6) por vía intraperitoneal (dosis 0.75 y 1.5 mg/Kg) por 21 días. En los días 1, 7, 14 y 21 se obtuvo sangre del corazón por punción cardíaca y se cuantificó el compuesto por CLAR. Se analizaron los resultados con el Software Win-Nonlin para la obtención de parámetros farmacocinéticos: Vida media ( $\alpha$ ): 49 min y vida media ( $\beta$ ): 3.3 días siguiendo un modelo bicompartimental.

## 1.2 Objetivos

Optimizar y validar el método analítico por cromatografía de líquidos de alta resolución.

Cuantificar Casiopeína IIII-a en sangre total en ratas con tumor transplantado glioma C6 (modelo *in vivo*).

Determinar la farmacocinética de la Casiopeína IIII-a en el modelo experimental de rata.

## Capítulo II

# Antecedentes

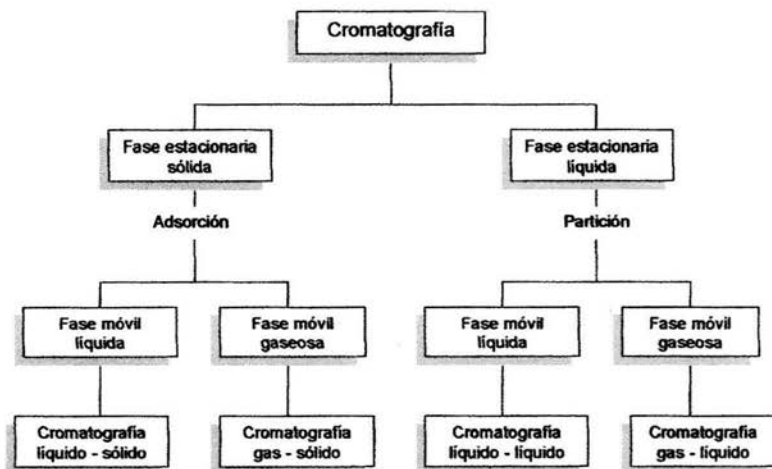


## 2.1 Antecedentes

### 2.1.1 Cromatografía

La cromatografía es una técnica analítica que permite separar los componentes de una mezcla de sustancias biológicas. El término deriva de *chrôma*, color y *graphein*, escritura. La cromatografía fué aplicada por primera vez por el científico Mikhail Tswett en 1903; M. Tswett trabajó en la separación de pigmentos vegetales en la cual usó un disolvente hidrocarbonado y polvo de inulina (un hidrato de carbono) como fase estacionaria. La separación de bandas coloreadas le llevó a llamar al proceso cromatografía.<sup>1</sup> Actualmente es una de las técnicas más aplicadas.

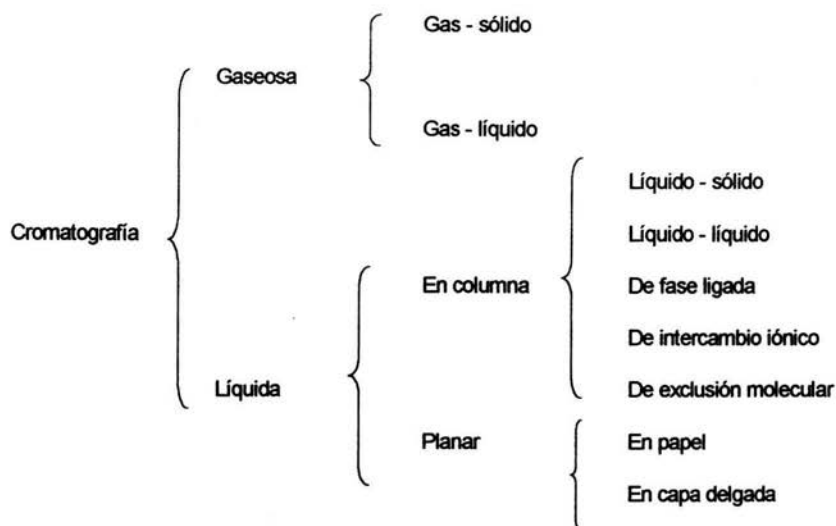
Los procesos cromatográficos se pueden clasificar en función de la naturaleza de la fase estacionaria, Figura 1 y de manera global como se indica en la Figura 2.<sup>2</sup>



**Figura 1.** Clasificación de la cromatografía en función a la naturaleza de la fase estacionaria.







**Figura 2.** Clasificación global de la cromatografía.

### 2.1.1.1 Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR)

La cromatografía de Líquidos de Alta Resolución es un proceso físico de separación en el que los componentes se distribuyen entre dos fases, una de ellas es la fase estacionaria y la otra (fase móvil) que se mueve por percolación a través de esta fase estacionaria. Cuando la fase móvil es un gas, se llama Cromatografía de Gases; si es líquida se denomina Cromatografía de Líquidos. En la Cromatografía de Gases, la fase móvil es un acarreador, en la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución la fase móvil es el parámetro que lleva a cabo la separación.

La combinación de disolventes de diferentes polaridades y el efecto de la presión en el sistema cromatográfico en la CLAR, han favorecido la separación de una gran cantidad de compuestos.

Básicamente los componentes de un equipo cromatográfico son los siguientes:

**Bomba.** Las bombas de HPLC impulsan la fase móvil proveniente del reservorio de fase móvil hacia el inyector, y desde allí hacia la columna.

**Inyector.** Es el dispositivo que permite introducir la muestra en solución sin interrumpir el caudal de la fase móvil a través del sistema.

**Columna.** Es la base 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 capacidad de la columna depende de su longitud, diámetro y material de relleno.

**Detector.** Es la parte del equipo cromatográfico que permite ubicar en tiempo y espacio la posición de cada componente de una muestra a la salida de la columna cromatográfica.<sup>3</sup>

**Sistema de Adquisición y Procesamiento de Datos.** El resultado del ensayo cromatográfico es por un lado, la obtención de fracciones separadas de los componentes de la muestra, y por el otro, la del gráfico o cromatograma, de cuya interpretación puede obtenerse conclusiones cualitativas y cuantitativas. Este registro y la eventual manipulación se obtienen a partir de la señal proveniente del detector por medio de un sistema de adquisición y procesamiento de datos.<sup>4</sup>

Los sistemas de cromatografía de líquidos se consideran como un conjunto de partes o módulos y su instalación generalmente sigue un diagrama como el que se presenta en la Figura 3.

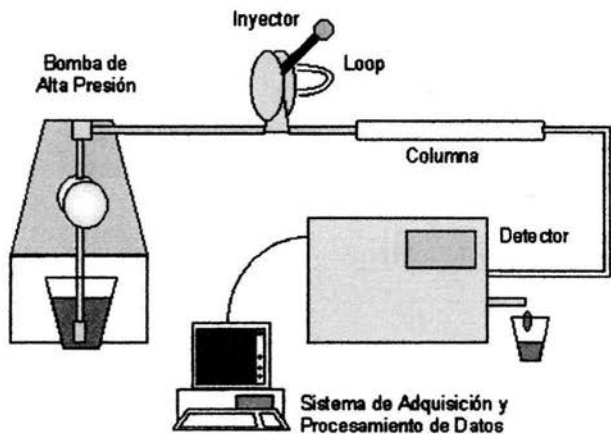


Figura 3. Esquema del sistema de cromatografía de líquidos.

### 2.1.2 Cáncer

La palabra cáncer se utiliza para agrupar diversas enfermedades que se caracterizan por un crecimiento anormal (incontrolado) de células, situación que es transmitida a células hijas y que se manifiesta por una reducción del control del crecimiento y la función celular. Aunque existen muchas causas que originan este grupo de padecimientos, éstas se pueden clasificar en los siguientes grupos:



- Predisposición genética,
- Factores ambientales (ocupacionales, dieta, fármacos, contaminantes),
- Factores ambientales interaccionando con predisposiciones genéticas,
- Virus.

La mayoría de los cánceres en humanos es inducido por factores carcinogénicos presentes en nuestro medio ambiente incluyendo nuestros alimentos. Sin embargo, algunas sustancias naturales presentes en nuestra dieta o sintetizadas en nuestras células, son hábiles para bloquear, atrapar o descomponerse en especies reactivas de oxígeno (ROS) participando en carcinogénesis. Los carcinógenos pueden también ser removidos de nuestras células. Si en el DNA ocurren daños, estos son reparados en la mayoría de los casos.<sup>5</sup>

Las células de los tumores malignos suelen mostrar pleomorfismo o variabilidad significativa en forma y tamaño. Por lo regular el núcleo adquiere mayor coloración con la tinción de hematoxilina, lo cual refleja directamente la concentración anormal de DNA.<sup>6</sup>

Oncogenes. Es la generación de copias múltiples de genes asociados a los tumores. Los oncogenes inducen o mantienen una proliferación celular incontrolada asociada al cáncer. La existencia de genes específicos asociados con la transformación de células normales en cancerosas fue deducida por Francis Peyton Rous en 1910.

Las células cancerosas han perdido la capacidad para regular su propio crecimiento y división. Por ello, pueden desarrollarse dando lugar a tumores malignos que invaden tejidos vecinos. A veces, las células cancerosas se separan del tumor primario y se sitúan en cualquier parte del cuerpo, en donde crecen y se dividen, dando lugar a tumores secundarios. Este proceso, llamado metástasis es a menudo la causa de



muerte de los pacientes de cáncer.<sup>7</sup>

### Proceso carcinogénico

El cáncer es un fenómeno que se lleva a cabo en dos tiempos, la conversión y el desarrollo neoplásico, mismos que a su vez abarcan tres etapas: iniciación, promoción y progresión (Figura 4).

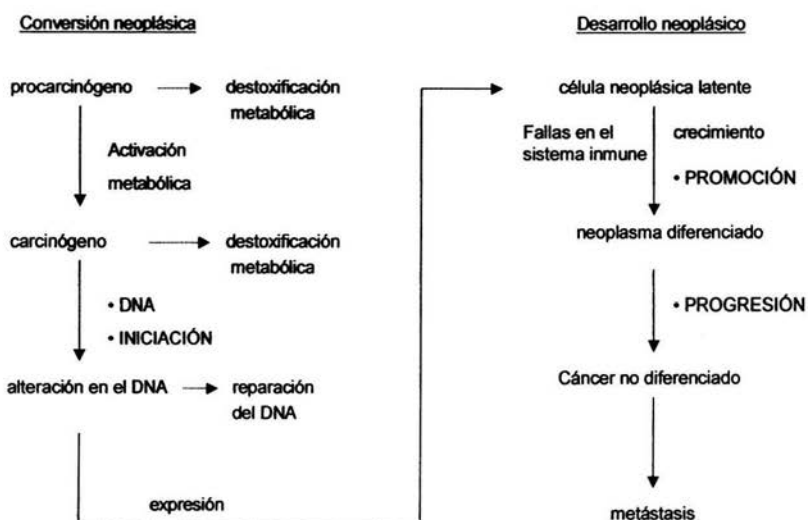


Figura 4. Etapas principales de la generación de cáncer por sustancias.

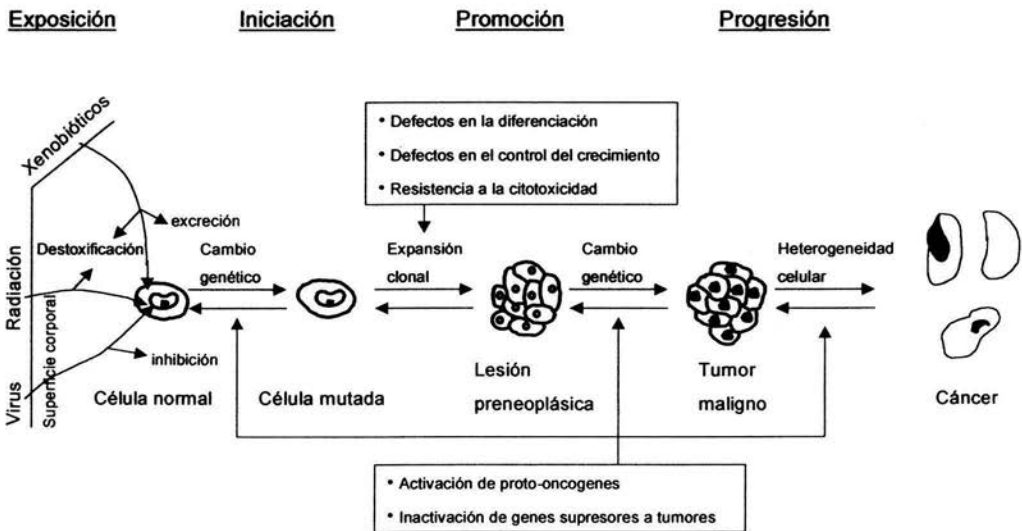
**Iniciación.** Se habla de iniciación como un daño permanente y transmisible en el DNA de una célula que, si no se repara, se fija como mutación, quedando la célula "iniciada". Los agentes iniciadores son por definición, compuestos genotóxicos, es decir, compuestos que pueden interactuar con el DNA y dañarlo.



**Promoción.** En esta etapa ocurre una expansión clonal, que puede ser reversible, a partir de la célula que se inició. Las células “promovidas” que constituyen el clon tumoral siguen siendo todavía células benignas, es decir, que a estas alturas aún se trata de una neoplasia benigna. La neoplasia es el tumor, la neoformación, y puede ser benigna o maligna.

**Progresión.** La progresión tumoral es, finalmente, la adquisición por la neoplasia del carácter maligno. Se explica mediante la aparición secuencial de subpoblaciones cada vez más aberradas genéticamente y de una heterogeneidad celular incrementada dentro del clon neoplásico.<sup>8</sup>

En la Figura 5, se esquematiza la integración de estos eventos con algunas alteraciones que se van presentando en la carcinogénesis.<sup>9</sup>



**Figura 5.** Etapas de la carcinogénesis.

## Mortalidad

En México, según la información de las Estadísticas Vitales, la mortalidad global de 1999 fue de 443 950 defunciones. La primera causa fue la enfermedad cardiovascular con una tasa de  $70.6 \times 10^5$ , seguida por los tumores malignos con  $54.7 \times 10^5$  (Tabla 1). La mortalidad por cáncer de acuerdo con el sitio de residencia mostró que en el Distrito Federal la tasa fue de  $71.1 \times 10^5$ , seguida por la de Sonora con  $70.0 \times 10^5$  y Nuevo León con  $66.0 \times 10^5$ .

En 1999 se notificó que entre 1980 y 1997 hubo en México un total de 76 315 muertes secundarias a cáncer de estómago con una relación varón:mujer de 1.2:1.

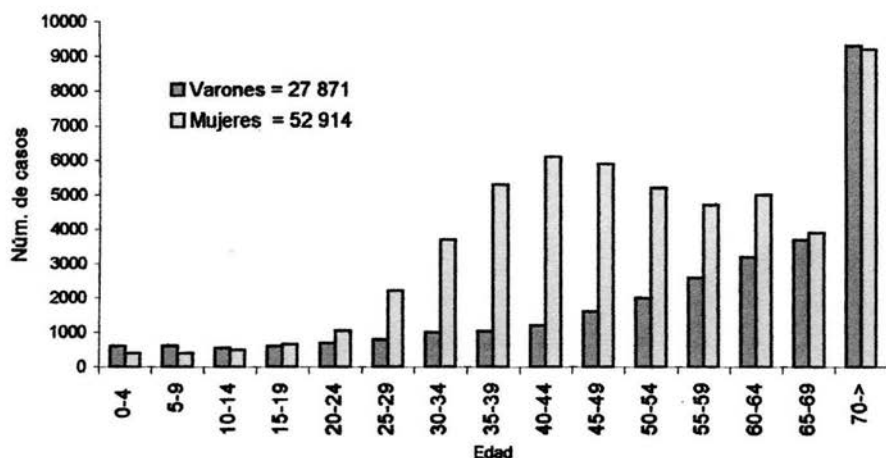
**Tabla 1.** Los 10 principales tumores malignos en mujeres según el RHNM\*

	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	Total
CCU	11 023	14 554	15 749	15 312	20 008	19 506	20 458	116 610
Mama	5 712	6 406	7 791	9 175	9 050	9 490	9 563	47 634
Ovario	1 081	1 354	1 684	2 000	2 991	2 012	1 858	12 980
Útero	1 068	1 049	1 432	3 710	1 938	1 431	1 631	12 259
Estómago	803	1 004	1 258	1 516	1 560	1 431	1 469	9 041
Tiroides	715	894	1 211	1 104	1 458	1 362	1 388	8 132
Sarcomas	540	791	1 179	795	1 065	701	706	5 777
Pulmón	463	470	492	947	842	732	652	4 598
Colon	413	555	728	820	957	936	1 067	5 476
Cerebro	326	502	568	624	695	503	535	3 753

\*RHNM, Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas.

En la Figura 6, se muestra la distribución de casos de neoplasias malignas por Edad y Sexo.





**Figura 6.** Distribución de la edad por sexo en 1999 de los casos notificados en el RHNH.

Más del 50% de los tumores malignos se cura; lo esencial es saber cómo y cuándo pueden detectarse en etapas iniciales para lograr el máximo beneficio.<sup>6</sup>

Debido a que el cáncer es un grupo de enfermedades que causa muchas muertes por año en todo el mundo, en la actualidad se realizan esfuerzos para encontrar tratamientos útiles contra esta enfermedad. Las limitaciones de la quimioterapia han estimulado el diseño, síntesis y evaluación de estos compuestos con un espectro terapéutico más amplio y es dentro de este esfuerzo que en la Facultad de Química de la UNAM, bajo la dirección de la Dra. Lena Ruiz Azuara, se ha diseñado y sintetizado un nuevo grupo de compuestos de coordinación de cobre que han sido patentados y registrados por la UNAM con el nombre de Casiopeínas.<sup>10</sup>





## 2.2 Casiopeínas

El desarrollo de una nueva serie de fármacos que contienen cobre (II) como centro metálico, llamados Casiopeínas, cuya fórmula general es  $[\text{Cu}(\text{NN})(\text{ON})]\text{NO}_3$  y  $[\text{Cu}(\text{NN})(\text{OO})]\text{NO}_3$ , 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* para líneas celulares tumorales Hela y Calo mostrando una curva dosis-respuesta similar a Mitomicina C y Cisplatino. Además la dosis letal 50 ( $\text{DL}_{50}$ ) y estudios de toxicología indican que las Casiopeínas son menos tóxicas.<sup>11</sup> Para la obtención de estos complejos se ha considerado que el metal presenta una toxicidad relativamente baja, que su estado de oxidación sea similar al de los metales que se encuentran en los fluidos biológicos. Por otro lado los ligantes deben tener la capacidad de formar quelatos y cierto grado de hidrofiliidad e hidrofobicidad.

Según las características de los compuestos en términos de solubilidad, potencial electroquímico, capacidad de transporte a través de las membranas y estabilidad, se busca entre otras posibilidades, que el mecanismo de actividad sea por interacción con el DNA.

Este grupo de compuestos fue diseñado pensando en que la planaridad en la geometría de la molécula, y el ligante diimina, con carácter hidrofóbico, le conferirían la posibilidad de actuar como intercalante a través de interacciones con las bases púricas y pirimidicas del DNA y el ligante cargado le conferiría una polaridad necesaria para el transporte de la molécula. La naturaleza, número y posición de los sustituyentes en el ligante diimina son responsables de la variación en la actividad biológica. El centro metálico por su parte puede participar en ciclos redox para liberar ROS, que oxiden al



DNA dando como resultado daños irreparables en su estructura, adicionalmente el cobre puede o no intercambiar alguno de sus ligantes presumiblemente el  $\alpha$ -a.a. ( $\alpha$ -amino-ácido) o donador O-O para coordinarse directamente con los donadores por nitrógeno de las bases formando enlaces similares a los observados con el cisplatino. Finalmente el  $\alpha$ -a.a. o donador por O-O se proponen como responsables de la modulación en la distribución y transporte, y por tanto de la selectividad tumoral de la molécula.<sup>12</sup>

### Síntesis de Casiopeínas

El proceso de síntesis de Casiopeínas se realiza al mezclar cantidades equimolares de los ligantes y  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$  para obtener una mezcla de reacción azul intenso en la mayoría de los casos a la que se le evapora el disolvente a presión reducida y temperatura controlada. De esta forma se obtiene un precipitado cuya coloración varía según los ligantes del verde oscuro al azul en diferentes tonalidades. Este producto se somete repetidas veces a recristalización para purificarlo y finalmente se procede a realizar la prueba de identificación (IR) y caracterización.<sup>12</sup>

La razón para la búsqueda de nuevos compuestos está basada en el deseo de encontrar compuestos con las siguientes características:

- Ausencia de resistencia cruzada al cisplatino,
- Un espectro más amplio de actividad, particularmente en áreas clínicas donde el cisplatino no ha demostrado efectos terapéuticos significativos,
- Mayor efectividad clínica antitumoral,
- Disminución de efectos eméticos y renales,
- Sinergismo en terapias combinadas.<sup>13</sup>



En 1969 el descubrimiento por Rosenberg de la actividad citostática del compuesto cis-diamino-dicloro-platino (II), marca el inicio de investigaciones encaminadas a encontrar quimioterapéuticos inorgánicos efectivos.<sup>12</sup>

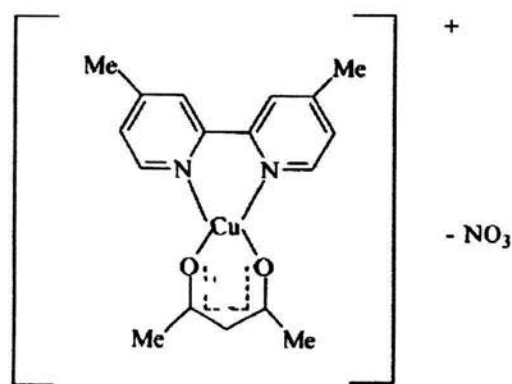
Cisplatino (cis-diamino-dicloro-platino). Es un fármaco citostático usado para el tratamiento de tumores, incluyendo glioblastomas cerebrales. El fármaco inhibe el ciclo celular, resultado por su acumulación, principalmente en la fase G2/M.

La dosis citostática del cisplatino induce lentamente el desarrollo de alteraciones en la morfología de células nucleicas de glioma C6, la cual puede reflejar inicialmente algunas reparaciones como reacciones y más tarde estados de ejecución de muerte apoptótica.<sup>14</sup>

El éxito del cisplatino en el tratamiento de diversos tumores, particularmente cáncer testicular, el cual desafortunadamente fue acompañado de efectos adversos severos como disfunción renal tubular, cambios degenerativos y necrosis, entre otros; esto ocasionó la búsqueda y desarrollo de nuevos fármacos antineoplásicos.<sup>15</sup>

Las Casiopeínas han mostrado actividad citostática, citotóxica y antineoplásica *in vitro* e *in vivo*. Además de un estudio de la actividad de la superóxido dismutasa (SOD) de Casiopeínas han sido reportados estudios de mecanismos de acción que están en progreso.<sup>16</sup>

## 2.2.1 Casiopeína IIIi-a



**Figura 7.** Estructura química de Casiopeína IIIi-a.

La Casiopeína IIIi-a presenta en su estructura un ligante bidentado donador de oxígenos y un ligante bidentado donador de nitrógenos, tiene una geometría cuadrado plano (Figura 7).<sup>17</sup> La Casiopeína IIIi-a se encuentra en etapa preclínica con alto potencial antineoplásico en líneas de carcinoma cérvico-uterino SiHa (carcinoma de células escamosas de cervix) y HeLa (células de adenocarcinoma de cervix).<sup>18</sup> Se demostró su actividad tanto *in vitro* como *in vivo*, induce acción recombinogénica y tiene habilidad para degradar DNA *in vitro* en varios tejidos.<sup>19</sup>



La Casiopeína IIIi-a ha demostrado tener propiedades citostáticas y antineoplásicas en modelos tumorales murinos.<sup>20</sup>

Los estudios de toxicidad y farmacocinéticos muestran las siguientes propiedades físicas y farmacocinéticas:

La DL<sub>50</sub> en ratones es de 14.6 mg/Kg, es muy soluble en agua y soluciones fisiológicas. Tiene un pka de 8.25 y un coeficiente de partición de 0.01364; su estabilidad a temperatura ambiente en plasma es de 12 h y en refrigeración de 72 h.<sup>18</sup>

En solución salina es estable por 9 días, en dextrosa por 4 días, y en solución Harman 3 semanas.<sup>17</sup>

La farmacocinética preclínica de Casiopeína IIIi-a se realizó en 10 conejos de 2.5-5.0 Kg, administrándose una dosis de 10 mg/Kg por infusión intravenosa;

Modelo de un compartimiento (MAUC)

ABC = 25 828.2 mg/mL-min y Ke = 0.016 min<sup>-1</sup>.

Tiempo de vida media de residencia, TMR = 66.95 min.

La farmacocinética de Casiopeína IIIi-a en ratas machos se realizó con las siguientes condiciones: se utilizaron 21 ratas de peso de 250 a 300 g, la dosis utilizada fue de 4.5 mg/Kg por vía intravenosa;

Modelo de un compartimiento (MAUC)

ABC = 11 074.79 µg/mL-min. y Ke = -0.014 min<sup>-1</sup>.

Vida media = 49.18 min.

Cp<sup>0</sup> = 208.29 µg/mL.

TMR = 16.11 min.<sup>18</sup>



---

Farmacocinética de Casiopeína III-a en perros.

ABC = 451 149.77  $\mu\text{g/mL}\cdot\text{min}$ .

Vida media = 246.7 h.

$C_{\text{máx}}$  = 88.76  $\mu\text{g/mL}$ .

Depuración (Cl) =  $9 \times 10^{-5}$   $\mu\text{g/min}$ .

TMR = 352.16 h.

Volúmen de distribución aparente = 1.91 L.<sup>4</sup>

La Casiopeína III-a tiene un menor efecto tóxico que la Casiopeína II y la intensidad de interacción con el DNA (medido por electroforesis) no es del todo equivalente para las tres familias. Esto es, el mecanismo de acción es diferente para la Casiopeína III-a que para las familias I y II, lo cual además podría explicar la selectividad de la actividad antineoplásica hacia las líneas tumorales estudiadas.

La Casiopeína III-a alcanza un equilibrio en plasma y sangre en un tiempo de dos horas. Este compuesto presenta un proceso de almacenaje en la sangre.<sup>21</sup>

### 2.3 Glioma

El glioma es un tumor primario frecuente en el cerebro, además del glioblastoma otros tumores del Sistema Nervioso Central secretan una cantidad suficiente de mediadores que promueven el crecimiento y angiogénesis incluyendo: el factor de crecimiento epidermal (EGF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de crecimiento de plaquetas (PGF), factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF).<sup>22</sup>

Los gliomas son los tumores cerebrales más comunes, y son en general altamente malignos, con un mal pronóstico. Porque tratamientos tradicionales como una



quimioterapia o radioterapia no han mejorado estos pronósticos; nuevas estrategias basadas en terapia génica están en desarrollo.<sup>23</sup>

Estos tumores presentan un pobre pronóstico clínico y constituyen el 60% de las neoplasias cerebrales. La terapia génica dirigida puede ser una opción para este tipo de padecimientos. Para lograr una expresión astrocit-específica de transgenes terapéuticos se ha usado el promotor de la proteína glial fibrilar ácida (GFAP) Gas1 (Growth Arrest Specific 1) es un gen supresor de tumores dependiente de P53, el cual pertenece a una familia de genes involucrados con la regulación del ciclo celular. De esta manera células de la línea C6 (derivada de un astrocitoma murino) que fueron transfectadas con el DNAC del gen gas1 humano bajo el control transcripcional de un fragmento de 22 kb del promotor de la GFAP, presentaron inhibición de la proliferación y un nivel significativo de muerte celular. Además las células transfectadas mostraron la fragmentación nuclear característica de la apoptosis.<sup>24</sup>

Los tumores transplantados en animales susceptibles, son un modelo común para estudios experimentales en oncología. Más investigación sobre tumores gliales transplantados es lograda sobre la inducción de gliomas en ratas por inyección de células gliales C6 en ratas Wistar. La velocidad del desarrollo del tumor varía de 30-60% en relación a la cepa de la rata Wistar, a el sitio de inoculación (usualmente subcutáneo o intracerebral) y a la edad del huésped. Sin embargo, aún bajo condiciones óptimas, la velocidad del desarrollo del tumor es lenta y la reducción espontánea del tamaño de los tumores es frecuente. Como la línea celular C6 fue derivada de ratas Wistar casualmente, no existen cepas de ratas singénicas para la línea celular C6, con frecuencia el desarrollo del tumor depende fuertemente del sitio del MHC (Complejo Mayor de Histocompatibilidad) de las ratas Wistar utilizadas en el experimento. Por lo tanto, las ratas Wistar Furth o BD son más susceptibles que otras cepas. Las células C6 cultivadas por vía intracerebral inducen un glioma más



frecuentemente que aquellas inyectadas subcutáneamente. Sin embargo para muchos tipos de experimentos, los tumores subcutáneos son preferibles, particularmente debido a su tamaño pequeño y difícil acceso al cerebro de ratas para manipulación experimental y de forma más importante, porque el lapso de tiempo entre la inoculación y la muerte del animal, secundaria a la destrucción cerebral por el tumor es corto para muchos diseños experimentales. En consecuencia es importante tener un modelo confiable de trasplante de glioma subcutáneo en ratas.

En un experimento piloto se observó que la inyección de células C6 en la cavidad peritoneal indujo de manera repetida un tumor grande, multilobulado, suave y altamente maligno, se cree que tales tumores podrían ser una fuente de células tumorales simple, económica y eficiente para estudios de tumores transplantados. En realidad, células tumorales mecánicamente disociadas del crecimiento de tumores gliales C6 en cavidad peritoneal son asociadas con una alta velocidad de cambios en la formación de glioma subcutáneo cuando se transplantaron en animales singénicos.<sup>25</sup>

La presencia y regulación de el sistema Citocromo P450 monooxigenasa en células gliales de el cerebro puede ser importante en quimioterapia y carcinogénesis de tumores cerebrales.<sup>26</sup>

#### **2.4 Validación de Métodos Analíticos:**

La validación del método puede definirse como la evidencia experimental documentada de que un procedimiento cumple con el propósito para el que fue diseñado.

La validación generalmente incluye una evaluación de los siguientes parámetros analíticos:





**Selectividad.** Es la capacidad que tiene un método analítico para cuantificar exacta y específicamente el compuesto a analizar, en presencia de otros compuestos que pudieran estar presentes en la muestra.

**Linealidad.** La linealidad de un sistema o método analítico es la habilidad para asegurar que los resultados analíticos, los cuales pueden ser obtenidos directamente o por medio de una transformación matemática bien definida, son proporcionales a la concentración del analito de interés dentro de un intervalo determinado.

**Exactitud.** Es la concordancia entre un valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia.

**Precisión.** La precisión de un método analítico es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes muestreos de una muestra homogénea del analito de interés.

La precisión es una medida del grado de reproducibilidad y/o repetibilidad del método analítico bajo las condiciones normales de operación.

**Repetibilidad.** Es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas bajo las mismas condiciones (analista, tiempo, equipo, laboratorio, etc.).

**Reproducibilidad.** Es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas bajo condiciones diferentes (diferentes analistas, en diferentes días, en el mismo y/o diferentes laboratorios, utilizando el mismo y/o diferentes equipos, etc.).



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

**Límite de detección.** Es la mínima concentración de una sustancia en una muestra la cual puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, bajo las condiciones de operación establecidas.

**Límite de cuantificación.** Es la concentración mínima del analito que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptables bajo las condiciones de operación establecidas.

**Estabilidad de la muestra.** Es la propiedad de una muestra preparada para su cuantificación, de conservar su integridad fisicoquímica y la concentración del analito de interés, después de almacenarse durante un tiempo determinado bajo condiciones específicas.

**Recuperación absoluta (Recobro).** Se le llama a la eficiencia de un método analítico para cuantificar el o los compuestos por analizar en la muestra biológica.<sup>27</sup>



Capítulo III

# Materiales

y

# Métodos

### 3.1 Materiales y métodos

#### Material

- Balanza analítica Sartorius, modelo A 210 P,
- Centrifuga SIGMA modelo 2-15,
- Columna Symmetry C<sub>18</sub> 4.6 x 250 mm, Waters (Part No. WAT054275),
- Cromatógrafo de líquidos Shimadzu:

Bomba Shimadzu, modelo LC-10ADVP,  
Autoinyector Shimadzu, modelo SIL-10ADVP,  
Detector UV-Vis Shimadzu, modelo SPD-10AVP,  
Sistema de control Shimadzu, modelo SCL-10AVP,  
Computadora COMPAQ-PRESARIO, modelo 4102,  
Software Shimadzu, Class vp Versión 5.0,  
Impresora LasserJet IIP *plus*.

- Equipo para filtración de agua, Millipore Milli-Q Waters System No. 1058892,
- Equipo para filtrar disolventes, Millipore,
- Espectrofotómetro Shimadzu UV – 1601,
- Filtros FH Millipore 0.5 µm,
- Filtros Nylon 0.45 µm,
- Jeringas de 3 mL,
- Micropipetas Transferpette (10-100 µL, 100-1000 µL, 500-5000 µL),
- Potenciómetro Orion Research modelo 301,
- Precolumna Security Guard Phenomenex (Part No. KJO-4282),
- Baño de ultrasonido Fisher Scientific modelo FS60,
- Vórtex Thermolyne modelo M37615 Serie 871990647059.



### Estándares

- Casiopeína IIIi-a, lote 33MRG050402; proveedor: Laboratorio de Química Inorgánica, Facultad de Química, UNAM,
- Solución de Cu-(4-4'-dimetil-2-2'-bipiridina) en metanol; proveedor: Laboratorio de Química Inorgánica, Facultad de Química, UNAM,
- Solución de Cu-(acetilacetionato) en metanol; proveedor: Laboratorio de Química Inorgánica, Facultad de Química, UNAM.

### Reactivos

- Clorhidrato de ranitidina, Ranitidine hydrochloride AWS 22E 99.8% w/w – Chromatographic purity, Glaxo Smith Kline,
- Metanol HPLC, TECNOLAB,
- 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.,
- Sulfato de zinc R.A. Mallinckrodt LabGuard, lote 8880 KMKJ,
- Agua grado HPLC (destilada, desionizada y filtrada),
- Solución reguladora (bifalatos) pH 4, lote VA9001 R.A., J.T. Baker,
- Solución reguladora (fosfatos) pH 7, lote X04COS R.A., J.T. Baker,
- Solución reguladora (boratos) pH 10, lote X19C13 R.A., J.T. Baker,
- Material biológico: Sangre total de rata.



## Soluciones

- Solución amortiguadora de fosfatos 0.01 M, pH 6.6,
- Solución de Casiopeína IIII-a en agua (1000 µg/mL),
- Solución de Casiopeína IIII-a en agua (500 µg/mL),
- Solución de Casiopeína IIII-a en sangre total (500 µg/mL),
- Solución de clorhidrato de ranitidina en metanol HPLC (1000 µg/mL),
- Solución de clorhidrato de ranitidina en fase móvil (25 µg/mL),
- Solución de ZnSO<sub>4</sub> al 10% en agua,
- Solución de hexansulfonato de sodio 5 mM en agua.

### 3.1.1 Preparación de soluciones

#### Solución amortiguadora de fosfatos 0.01 M, pH 6.6

Transferir 0.4230 g de fosfato de sodio monobásico monohidratado y 0.6928 g de fosfato de sodio dibásico dodecahidratado a un matraz volumétrico de 500 mL, disolver y llevar a un volumen (antes del aforo) con agua destilada y desionizada (HPLC), transferir la solución a un vaso de precipitado para medir el pH, aforar. Filtrar la solución al vacío a través de una membrana millipore de 0.45 µm.

#### Solución de Casiopeína IIII-a en agua (1000 µg/mL)

Pesar con exactitud 5 mg de Casiopeína IIII-a (0.0050 g) y transferirlos a un matraz volumétrico de 5 mL, disolver con agua destilada y desionizada (HPLC), y aforar con el mismo disolvente.



**Solución de Casiopeína IIII-a en agua (500 µg/mL)**

Transferir una alícuota de 900 µL de la solución de Casiopeína IIII-a (1000 µg/mL) a un tubo de ensayo, y agregar 900 µL de agua destilada y desionizada (HPLC), mezclar en vórtex.

**Solución de Casiopeína IIII-a en sangre total (500 µg/mL)**

Transferir una alícuota de 900 µL de la solución de Casiopeína IIII-a (1000 µg/mL) a un tubo de ensayo, y agregar 900 µL de sangre total, mezclar en vórtex.

**Solución de clorhidrato de ranitidina en metanol HPLC (1000 µg/mL)**

Pesar con exactitud 0.0100 g de clorhidrato de ranitidina y transferirlos a un matríz volumétrico de 10 mL, disolver con la suficiente cantidad de metanol HPLC, y aforar con el mismo disolvente.

**Solución de clorhidrato de ranitidina en fase móvil (25 µg/mL)**

Transferir una alícuota de 250 µL de la solución de clorhidrato de ranitidina (1000 µg/mL) a un tubo de ensayo, y agregar 9750 µL de fase móvil, mezclar en vórtex.

**Solución de ZnSO<sub>4</sub> al 10% en agua**

Pesar con exactitud 0.5000 g de sulfato de zinc y transferirlos a un tubo de ensayo, disolver con 5 mL de agua destilada y desionizada (HPLC). El sulfato de zinc se prepara el mismo día del experimento de preferencia.



### Solución de hexansulfonato de sodio 5 mM en agua

Pesar con exactitud 0.0941 g de hexansulfonato de sodio y transferirlos a un matríz volumétrico de 100 mL, disolver con la suficiente cantidad de agua destilada y desionizada (HPLC), aforar con el mismo disolvente, mezclar. Filtrar la solución al vacío a través de una membrana millipore de 0.45  $\mu\text{m}$ .

### Preparación de la curva de calibración de Casiopeína IIII-a en agua

La curva de calibración de Casiopeína IIII-a en agua se preparó como se indica en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Diluciones utilizadas para preparar la curva de calibración en agua.

Concentración Casiopeína IIII-a ( $\mu\text{g/mL}$ )	Volumen alícuota ( $\mu\text{L}$ )	Volumen final de la solución (mL)
75	300 *	2
50	200 *	2
25	100 *	2
10	400 **	2
5	200 **	2

\*Alícuotas se toman de la solución de Casiopeína IIII-a en agua de 500  $\mu\text{g/mL}$ ,

\*\*Alícuotas se toman de la solución de Casiopeína IIII-a en agua de 50  $\mu\text{g/mL}$ .



### Preparación de la curva de calibración de Casiopeína IIIi-a en sangre

La curva de calibración de Casiopeína IIIi-a en sangre total se preparó como se indica en la Tabla 3.

**Tabla 3.** Diluciones utilizadas para preparar la curva de calibración en sangre.

Concentración Casiopeína IIIi-a ( $\mu\text{g/mL}$ )	Volumen alícuota ( $\mu\text{L}$ )	Volumen final de la solución (mL)
75	300 *	2
50	200 *	2
25	100 *	2
10	400 **	2
5	200 **	2

\*Alícuotas se toman de la solución de Casiopeína IIIi-a en sangre total de 500  $\mu\text{g/mL}$ .

\*\*Alícuotas se toman de la solución de Casiopeína IIIi-a en sangre total de 50  $\mu\text{g/mL}$ .

### Preparación de las soluciones para muestras control

Se prepararon soluciones tres niveles de concentración (alta, media y baja), de acuerdo a la curva patrón, Tabla 4.



**Tabla 4.** Preparación de las muestras control del sistema y método para determinación de Casiopeína IIII-a en agua o sangre.

Alicuota ( $\mu\text{L}$ )	Aforo (mL de agua o sangre)	Concentración final ( $\mu\text{g/mL}$ )
240*	2	60
140*	2	35
400**	2	7

\*Tomar alícuota de la solución de Casiopeína IIII-a en agua o sangre total de 500  $\mu\text{g/mL}$ ,

\*\*Tomar alícuota de la solución de Casiopeína IIII-a en agua o sangre total de 35  $\mu\text{g/mL}$ .

### 3.2 Optimización del método analítico para cuantificar Casiopeína IIII-a en sangre total por CLAR

La optimización se realizó a partir de las condiciones cromatográficas establecidas para determinar Casiopeína IIII-a en plasma y sangre total.<sup>16</sup>

Las condiciones cromatográficas previas son las siguientes:

- Columna Hypersyl,
- Fase móvil: Metanol/ Solución amortiguadora de fosfatos 0.01 M, pH 6.7/ Hexansulfonato de sodio 5 mM, proporción (40:55:05),
- Flujo: 0.8 mL/min.,
- Estándar interno: sin estándar,



- Volumen de inyección: 50  $\mu$ L.,
- Longitud de onda: 262 nm.,
- Tiempo de análisis: 15 min.,
- Precolumna : Phenomenex.

### **Longitud de onda**

Para la elección de la longitud de onda ( $\lambda$ ), se realizó un barrido de una solución de Casiopeína IIII-a de 25  $\mu$ g/mL, en el espectrofotómetro en la región del UV, de 200-400 nm, con el propósito de determinar la longitud de onda de máxima absorción.

### **pH de la fase móvil**

La fase móvil Metanol/ Solución amortiguadora de fosfatos 0.01 M/ Hexansulfonato de sodio 5 mM (40:55:05) %v/v, se evaluó con dos pH's de la solución amortiguadora de fosfatos, pH 6.2 y 6.6, con el propósito de determinar el pH adecuado para este método.

El pH fue seleccionado de acuerdo a la respuesta cromatográfica: tiempo de retención de la Casiopeína IIII-a y ranitidina.

### **Proporción de la fase móvil**

La elección de la proporción de fase móvil se realizó por medio del análisis de la Casiopeína IIII-a con diferentes proporciones de fase móvil. Las proporciones utilizadas se muestran en la Tabla 5.



**Tabla 5.** Proporciones de los componentes de la fase móvil.

Proporción metanol	Proporción Solución amortiguadora fosfatos pH=6.6 (0.01 M)
45	50
40	55
35	60

La elección se realizó de acuerdo a los tiempos de retención presentados por Casiopeína IIII-a y ranitidina.

### Estándar interno

Se seleccionó el estándar interno de acuerdo al tiempo de retención con respecto a la Casiopeína IIII-a. En la Tabla 6, se muestra la lista de estándares analizados.

**Tabla 6.** Estándares.

Estándares	
Naproxeno de sodio 10 µg/mL	Acetaminofén 6 µg/mL
Acetaminofén 100 µg/mL	Tetraciclina 100 µg/mL
Naproxeno 6 µg/mL	Ranitidina 20 µg/mL
Furosemida 100 µg/mL	Tinidazol 20 µg/mL
Metoclopramida 6 µg/mL	Teofilina 20 µg/mL
Clorhidrato de tetraciclina 6 µg/mL	



### 3.2.1 Tratamiento de la muestra

El método de separación que se muestra en la Figura 8, se basa en un método cromatográfico de separación sólido-líquido.

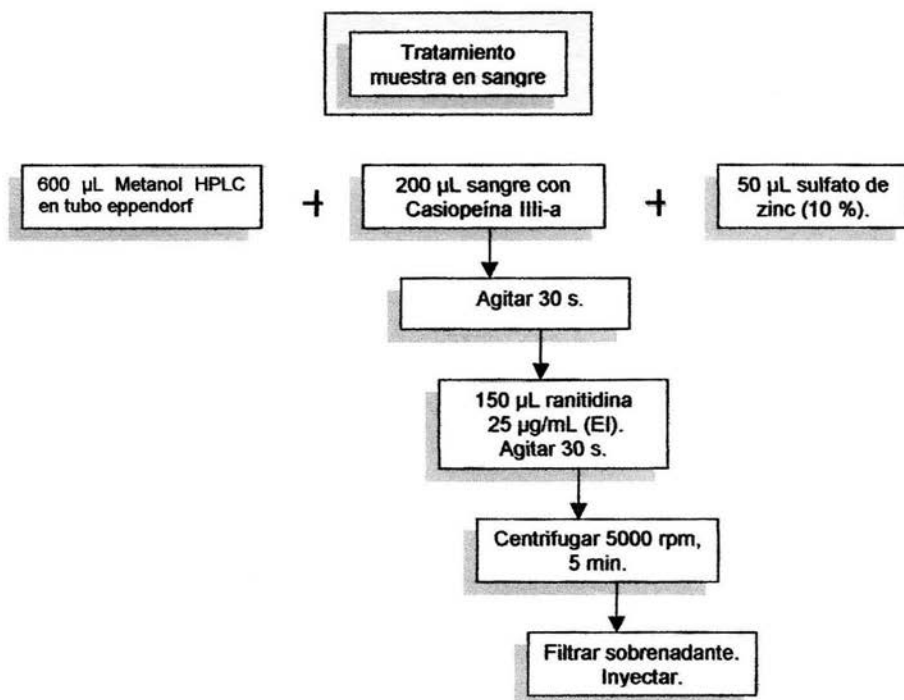


Figura 8. Método de separación.



### Condiciones Cromatográficas

- Columna Symmetry C<sub>18</sub> 4.6 x 250 mm.,
- Fase móvil: Metanol/ Solución amortiguadora de fosfatos 0.01 M, pH 6.6/ Hexansulfonato de sodio 5 mM, proporción (40:55:05),
- Flujo: 0.8 mL/min.,
- Estándar interno: Clorhidrato de ranitidina 25 µg/mL.,
- Volumen de inyección: 50 µL.,
- Longitud de onda: 274 nm.,
- Tiempo de análisis: 12 min.,
- Precolumna : Phenomenex.

### 3.3 Validación del método analítico para cuantificar Casiopeína III-a en sangre total por CLAR

#### 3.3.1 Validación del sistema

La validación se evaluó considerando los parámetros analíticos descritos en los Procedimientos Normalizados de Operación<sup>28</sup> y la NOM-177-SSA1-1998<sup>27</sup>.

#### Linealidad

La linealidad del sistema se demostró al preparar tres curvas patrón con cinco puntos como mínimo, con un intervalo de concentraciones de 5-75 µg/mL, a partir de una solución estándar de 500 µg/mL.

Criterio de aceptación: coeficiente de determinación ( $r^2$ )  $\geq 0.99$ .



### **Precisión**

La precisión se expresa en términos de coeficiente de variación (%CV), se determinó con los datos de linealidad.

Criterio de aceptación:  $\%CV \leq 2\%$ .

### **3.3.2 Validación del método**

#### **Selectividad**

La selectividad del método se demostró experimentalmente al trabajar un blanco, una concentración de Casiopeína IIII-a, una solución de Cu-(4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina) y una solución de Cu-(acetilacetato) en sangre, a las cuales se les realizó el proceso de separación.

Los compuestos Cu-(4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina) y Cu-(acetilacetato) son compuestos que se forman durante el proceso de síntesis de Casiopeína IIII-a.

Criterio de aceptación: los cromatogramas no deben presentar ninguna señal que cause interferencia con los tiempos de retención correspondientes a la Casiopeína IIII-a y ranitidina.

#### **Linealidad**

Se demostró al preparar tres curvas patrón de Casiopeína IIII-a en sangre, con un intervalo de concentraciones de 5-75  $\mu\text{g/mL}$ , a partir de la misma solución estándar de



500 µg/mL, el análisis fue realizado un mismo día bajo las mismas condiciones de operación. El estándar interno utilizado es clorhidrato de ranitidina.

Criterio de aceptación: Coeficiente de correlación ( $r \geq 0.99$ ),  
Coeficiente de determinación ( $r^2 \geq 0.98$ ),  
Coeficiente de variación (%CV)  $\leq 10\%$ .

### **Recobro (Recuperación absoluta)**

La recuperación absoluta se evaluó al preparar por quintuplicado tres concentraciones que son 7, 35 y 60 µg/mL, a partir de una misma solución patrón de Casiopeína IIII-a de 500 µg/mL en sangre (método), a las cuales se les realizó el proceso de separación. También fue necesario preparar las mismas concentraciones de Casiopeína IIII-a a partir de una misma solución patrón de Casiopeína IIII-a en agua (sistema).

Los factores de respuesta obtenidos de muestras en solución fueron comparados con los factores de respuesta obtenidos de muestras en sangre.

Criterio de aceptación: el % de recuperación absoluta no necesariamente es del 100%, pero éste debe ser reproducible en cada concentración analizada.

### **Exactitud**

La exactitud se evaluó con los datos de repetibilidad y reproducibilidad, al realizar el cálculo % de desviación absoluta,



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

Criterio de aceptación: el valor promedio de las determinaciones en cada nivel de concentración debe estar dentro  $\pm 15\%$  del valor nominal de la concentración.

### **Precisión**

La precisión se evaluó por medio de: Repetibilidad y Reproducibilidad.

#### **Repetibilidad (día 1)**

La repetibilidad fue analizada en un mismo día por quintuplicado, con un mínimo de tres concentraciones conocidas (alta, media y baja) de Casiopeína IIII-a en sangre. Estas concentraciones son 7, 35 y 60  $\mu\text{g/mL}$ , las cuales están dentro del intervalo de concentración de la curva patrón. Se determinó el promedio, desviación estándar y % de coeficiente de variación.

Criterio de aceptación: % Coeficiente de variación (%CV) < 15%.

#### **Reproducibilidad (día 2)**

Se analizó en un segundo día por quintuplicado un mínimo de tres concentraciones conocidas (alta, media y baja) de casiopeína IIII-a en sangre. Concentraciones utilizadas 7, 35 y 60  $\mu\text{g/mL}$ . Se determinó el promedio, desviación estándar y % de coeficiente de variación.

Criterio de aceptación: %CV < 15%.



### **Límite de detección**

El límite de detección se determinó con la concentración en 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.

Este límite se determina como la concentración en donde la señal del compuesto a analizar en la matriz biológica fue tres veces mayor que el nivel del ruido.

### **Límite de cuantificación**

El límite de cuantificación es 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 intervalo de trabajo (5 µg/mL).

Criterio de aceptación: promedio  $\pm$  20% del valor nominal y %CV < 20%.

### **Estabilidad por 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 7, 35 y 60 µg/mL en sangre, se realizó 1 ciclo congelación - descongelación a -20°C antes de analizar las muestras.

Criterio de aceptación: Desviación absoluta  $\pm$  15% del valor nominal de la concentración.



### 3.4 Aplicación del método

#### 3.4.1 Diagrama experimental

En el estudio se utilizaron ratas macho Wistar con peso 250-300 g con transplante de tumor glioma C6 que se trabajaron bajo condiciones de bioterio convencionales, y tuvieron acceso a alimento y agua *ad libitum*.

Las células C6 fueron cultivadas bajo condiciones estériles a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub> en medio Ham's F-10, suplemento con 2.5% de suero bovino fetal y 15% de suero de caballo; cuando los cultivos fueron confluentes, aproximadamente después de 6 días en cultivo, 500 µL de solución salina conteniendo 1x10<sup>7</sup> células, se inyectaron por vía intraperitoneal (i.p.) en ratas Wistar. Después de tres semanas, se desarrollaron los tumores malignos en un 80% de los animales.

Cuando el tumor estuvo del tamaño adecuado se les inyectó a las ratas solución de Casiopeína IIII-a por vía i.p. diariamente por 21 días. El estudio se realizó en dosis de 0.75 mg/Kg y 1.5 mg/Kg.

La toma de muestras de sangre se realizó de acuerdo a los diagramas que se presentan en las Tablas 7,8 y 9, estas muestras se procesaron como se indica en el método de separación (Figura 8).

Para dosis de 0.75 mg/Kg se tomaron muestras a los 7, 14 y 21 días de cada una de las ratas, como se muestra en la Tabla 7, analizándose al mismo tiempo ratas control.



**Tabla 7.** Diagrama de toma de muestras, dosis 0.75 mg/Kg de Casiopeína IIII-a en ratas Wistar.

Ratas con tratamiento de Casiopeína IIII-a	Tiempo (días)		
	7	14	21
Rata 1	x		
Rata 2	x		
Rata 3	x		
Rata 4 control	x		
Rata 5		x	
Rata 6		x	
Rata 7		x	
Rata 8 control		x	
Rata 9			x
Rata 10			x
Rata 11			x
Rata 12 control			x
Rata 13			x
Rata 14			x
Rata 15			x
Rata 16 control			x
Rata 17 control			x
Rata 18 control			x

Se evaluaron 12 tiempos de muestreo con 14 ratas para la dosis de 1.5 mg/Kg al inicio del estudio, considerando el promedio de las concentraciones de Casiopeína IIII-a cuantificadas en la sangre de las ratas para cada tiempo.

Para la dosis de 1.5 mg/Kg en el primer estudio, las muestras se tomaron a 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.25, 2, 3, 6, 8, 24, 50, 240 horas como se indica en la Tabla 8.



**Tabla 8.** Diagrama de toma de muestras en el inicio del estudio, dosis 1.5 mg/Kg de Casiopeína IIII-a.

Ratas con tratamiento de Casiopeína IIII-a	Tiempo (horas)											
	0.25	0.5	0.75	1	1.25	2	3	6	8	50	96	144
Rata 4	x	x										
Rata 5	x		x									
Rata 6		x	x									
Rata 10				x		x						
Rata 11				x	**							
Rata 12					x	x						
Rata 1							x	x				
Rata 2								x	**			
Rata 3							x		x			
Rata 15										x	x	
Rata 16											x	**
Rata 17										x		**
Rata 13	Control											
Rata 14	Control											

\*\*Estas muestras no se tomaron, porque las ratas murieron en la toma de muestras por punción cardíaca.

Además se realizó otro muestreo con una dosis de 1.5 mg/Kg a los 7, 14 y 21 días, como se muestra en la Tabla 9.



**Tabla 9.** Diagrama de toma de muestras, dosis 1.5 mg/Kg de Casiopeína IIII-a en ratas Wistar.

Ratas con tratamiento de Casiopeína IIII-a	Tiempo (días)		
	7	14	21
Rata 1	X		
Rata 2	X		
Rata 3	X		
Rata 4 control	X		
Rata 5 control	X		
Rata 6 control	X		
Rata 7		X	
Rata 8		X	
Rata 9		X	
Rata 10 control		X	
Rata 11 control		X	
Rata 12 control		x	
Rata 13			X
Rata 14			X
Rata 15			X
Rata 16 control			X
Rata 17 control			X
Rata 18 control			X

Los resultados se analizaron con el Software Win-Nonlin para obtener algunos de los parámetros farmacocinéticos.

Así también, se evaluó la existencia y tamaño de los tumores presentes en las ratas con tratamiento y sin tratamiento.



Capítulo IV

# Resultados



## 4.1 Resultados

### 4.1.1 Optimización del método analítico para cuantificar Casiopeína IIIi-a en sangre total por CLAR

#### Longitud de onda ( $\lambda$ )

La  $\lambda$  de máxima absorción de la Casiopeína IIIi-a es 296 nm. La  $\lambda$  seleccionada del barrido de Casiopeína IIIi-a para el método de separación en sangre fue 274 nm, porque en esta  $\lambda$  se presenta una mejor respuesta.

#### pH de la solución amortiguadora de fosfatos utilizado en la fase móvil

Los tiempos de retención de la Casiopeína IIIi-a y ranitidina para los pH's 6.2 y 6.6 de la solución amortiguadora de fosfatos utilizada en la fase móvil se muestran en la Tabla 10.

**Tabla 10.** Tiempos de retención.

pH Solución amortiguadora de fosfatos	Tiempo Retención (min) Casiopeína IIIi-a	Tiempo Retención (min) Ranitidina
6.2	5.8	5.7
6.6	6.2	7.8

El pH seleccionado para la solución amortiguadora de fosfatos fue 6.6.



### Proporción de la fase móvil

La proporción de la fase móvil seleccionada para el método cromatográfico fue 40:55:05, de acuerdo a los resultados de la Tabla 11.

**Tabla 11.** Tiempos de retención de Casiopeína IIII-a y ranitidina.

Proporción	Tiempo	Tiempo
	Retención (min) Casiopeína IIII-a	Retención (min) Ranitidina
45:50:05	5.6	6.6
40:55:05	6.2	7.8
35:60:05	6.8	9.4

### Estándar interno

La selección del estándar interno fue realizada de acuerdo a lo presentado en la Tabla 12.

**Tabla 12.** Tiempos de retención de estándares.

Estándares	Tiempo de Retención (min)
Naproxeno de sodio 10 µg/mL	4
Acetaminofén 100 µg/mL	4
Naproxeno 6 µg/mL	13
Metoclopramida 6 µg/mL	13
Clorhidrato de tetraciclina 6 µg/mL	11
Acetaminofén 6 µg/mL	1
Tetraciclina 100 µg/mL	6.5 y 9.8
Ranitidina 20 µg/mL	7.6
Tinidazol 20 µg/mL	4.7
Teofilina 20 µg/mL	4.8
Furosemida 100 µg/mL	8 (en sistema)



El estándar seleccionado para este método fue ranitidina con tiempo de retención de 7.6 min. La concentración utilizada fue de 25 µg/mL porque hay una mejor respuesta con respecto a la respuesta de Casiopeína IIII-a en el punto medio de la curva.

#### 4.1.2 Validación del sistema

##### Linealidad

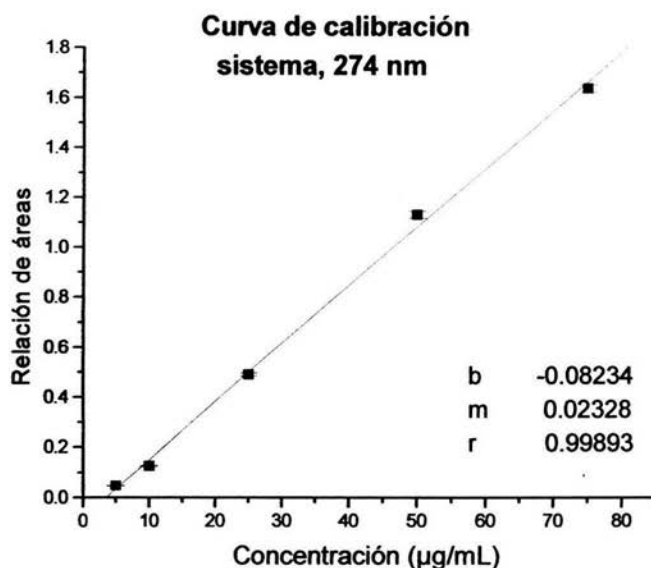
Los datos de linealidad del sistema (agua) se muestran en la Tabla 13, y la curva promedio de Casiopeína IIII-a del sistema se presenta en la Figura 9.

**Tabla 13. Linealidad del sistema.**

Concentración (µg/mL)	Curva A Rel. áreas	Curva B Rel. áreas	Curva C Rel. áreas	Promedio	Desv. Est.	%CV
5	0.0466	0.0467	0.0476	0.0469	0.0005	1.17
10	0.1268	0.1248	0.1256	0.1257	0.0010	0.78
25	0.4882	0.4849	0.4955	0.4895	0.0054	1.11
50	1.1394	1.1143	1.1386	1.1308	0.0142	1.26
75	1.6484	1.6418	1.6214	1.6372	0.0141	0.86
<b>m</b>	0.0235	0.0233	0.0231	0.0233		
<b>b</b>	-0.0844	-0.0857	-0.0769	-0.0823		
<b>r</b>	0.9989	0.9993	0.9984	0.9989		
<b>r<sup>2</sup></b>	0.9978	0.9986	0.9969	0.9979		

Relación de áreas = área Casiopeína IIII-a / área ranitidina.





**Figura 9.** Curva promedio de Casiopeína Illi-a en agua.

### Precisión

Los %CV de cada una de las concentraciones mostrados en la Tabla 13, fueron menores al 2%, por lo tanto el sistema cumple con este parámetro, es decir, fue preciso.

### 4.1.3 Validación del método

#### Selectividad

La selectividad se realizó mediante el análisis de los siguientes cromatogramas de las Figuras 10 – 18.



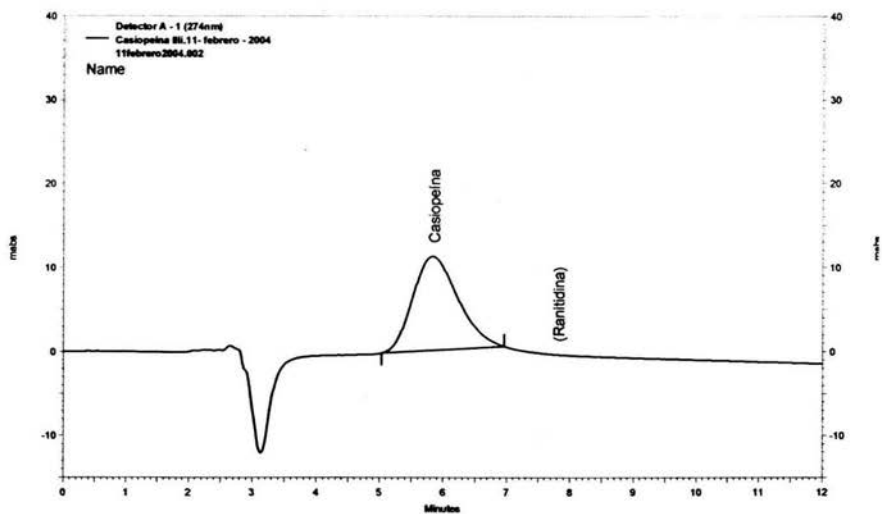


Figura 10. Cromatograma de Casiopeína III-a preparada en agua (25 µg/mL).

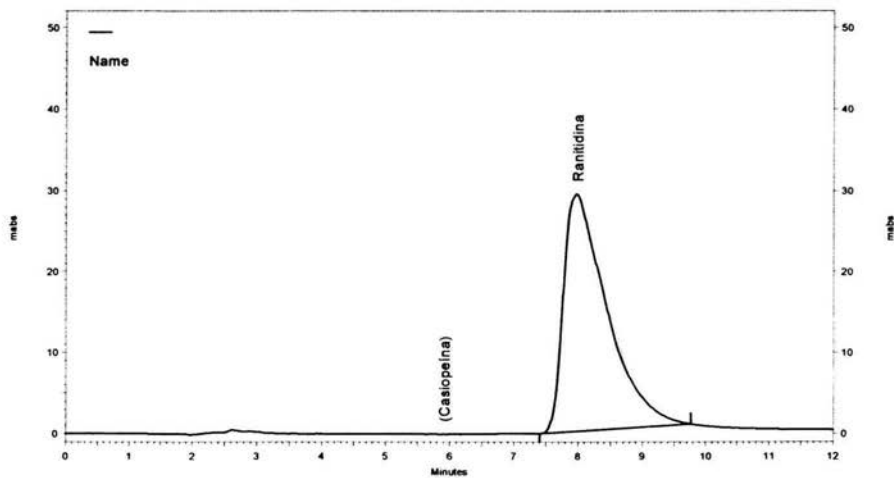


Figura 11. Cromatograma de ranitidina en fase móvil (25 µg/mL).



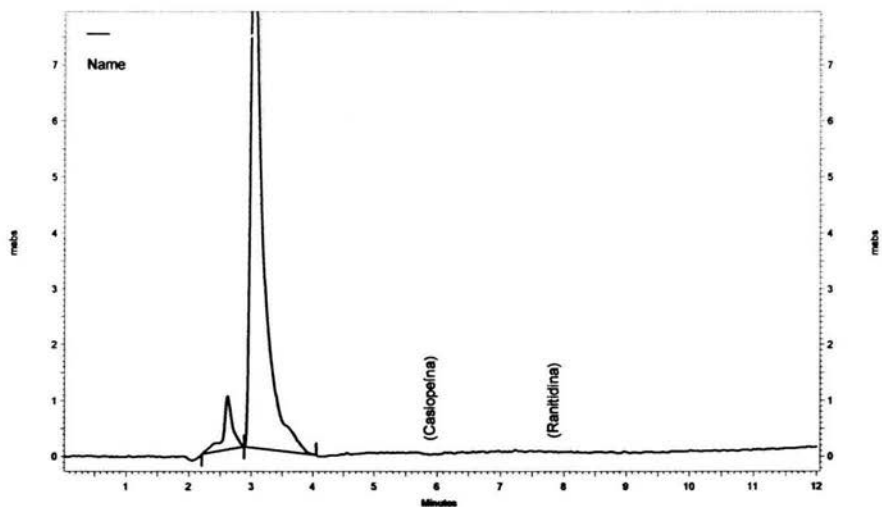


Figura 12. Cromatograma blanco del sistema (en agua).

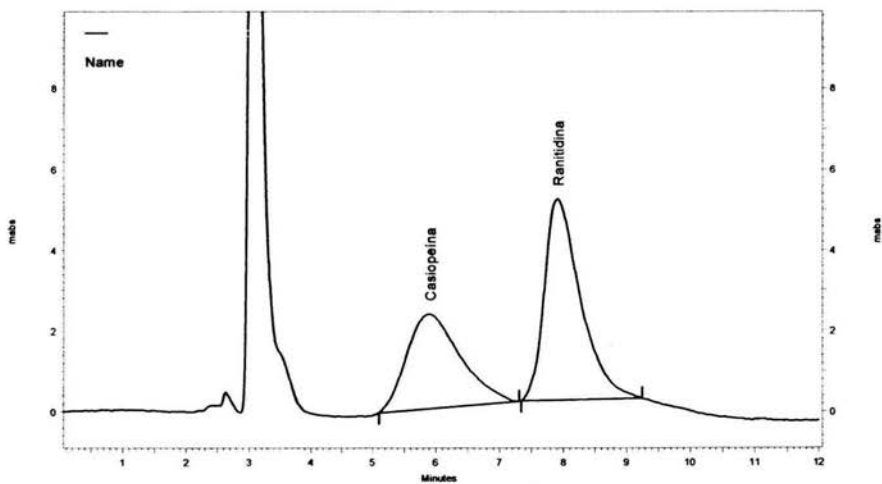
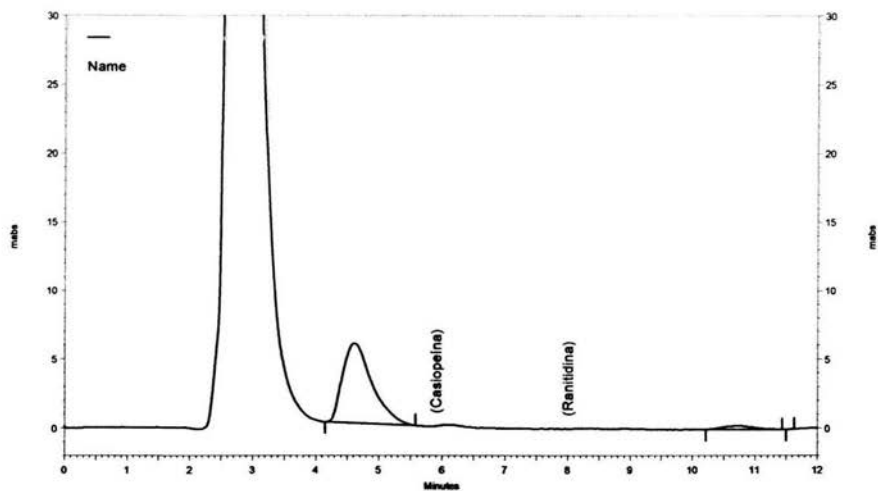
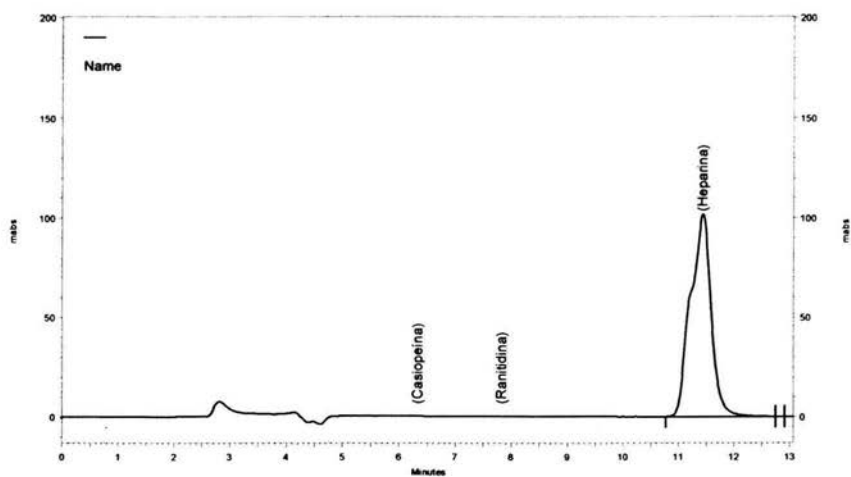


Figura 13. Cromatograma de Casiopeina IIII-a en agua (35 µg/mL).





**Figura 14.** Cromatograma blanco del método (en sangre).



**Figura 15.** Cromatograma de heparina (anticoagulante) en agua a 274 nm.



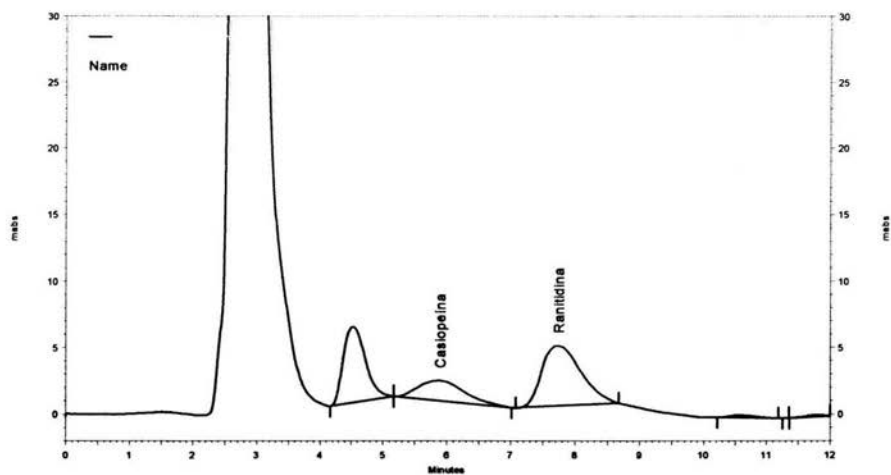


Figura 16. Cromatograma de Casiopeína Illi-a en sangre (50 µg/mL) a 274 nm.

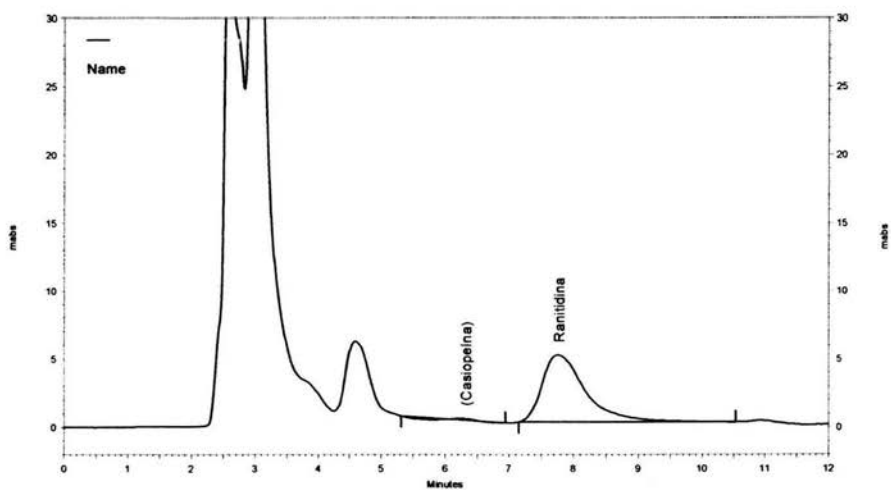


Figura 17. Cromatograma del compuesto de Cu-(4,4' -dimetil-2,2' -bipiridina) en sangre.

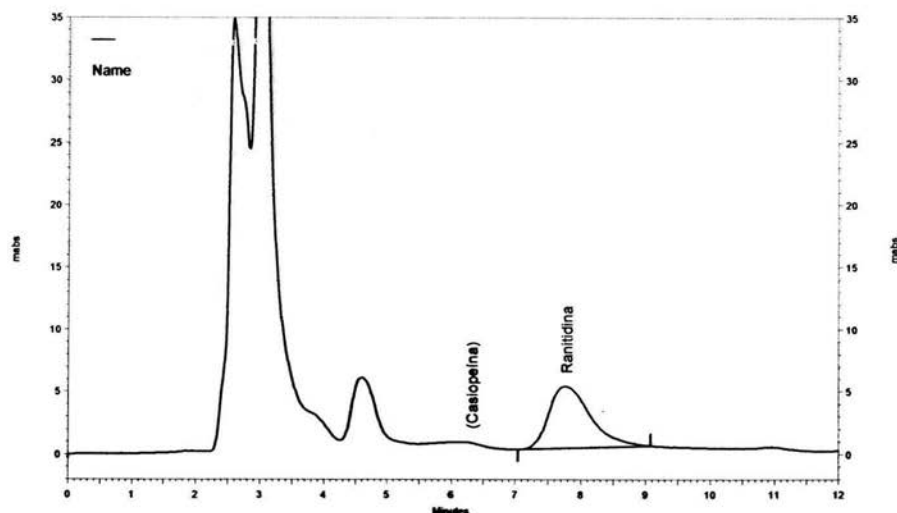


Figura 18. Cromatograma del compuesto de Cu-(acetilacetato) en sangre.

### Linealidad

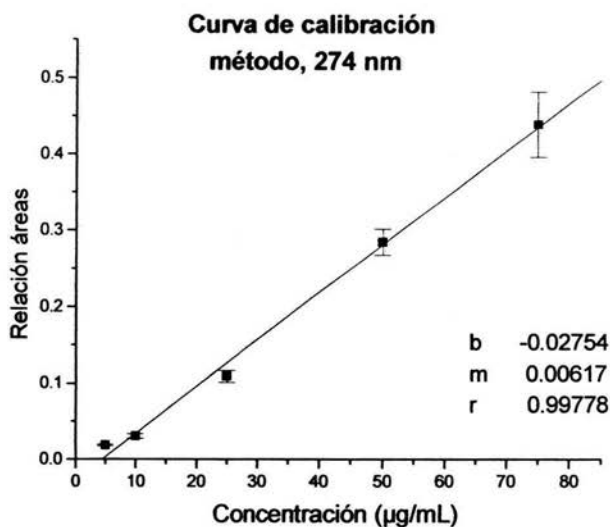
Los datos de linealidad del método (sangre) se muestran en la Tabla 14 y la curva promedio de Casiopeína III-a del método se presenta en la Figura 19.

Tabla 14. Linealidad del método.

Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ )	Curva A Rel.áreas	Curva B Rel. áreas	Curva C Rel. áreas	Promedio	Desv. Est.	%CV
5	0.0193	0.0184	0.0175	0.0184	0.0009	4.74
10	0.0301	0.0277	0.0334	0.0304	0.0029	9.42
25	0.1074	0.1022	0.1171	0.1089	0.0076	6.97
50	0.2650	0.2923	0.2962	0.2845	0.0170	5.97
75	0.4103	0.4177	0.4877	0.4385	0.0427	9.74
<b>m</b>	0.0057	0.0060	0.0068	0.0062		
<b>b</b>	-0.0226	-0.0260	-0.0340	-0.0275		
<b>r</b>	0.9983	0.9956	0.9972	0.9978		
<b>r<sup>2</sup></b>	0.9966	0.9912	0.9944	0.9956		







**Figura 19.** Curva promedio de Casiopeína III-a en sangre de rata Wistar.

### Recobro

El % de recuperación absoluta se muestra en la Tabla 15, evaluado con una curva de sistema y una curva de método.

**Tabla 15.** % Recobro.

Concentración Casiopeína III-a (µg/mL)	Casiopeína III-a en sistema Áreas	Casiopeína III-a en método Áreas	% Recobro
5	11691	6902	59.04
10	39548	26650	67.39
25	76732	46037	60.00
50	182332	115593	63.40
75	285237	189370	66.39
		promedio	63.24
		Desv. Est.	3.72
		%CV	5.88



La Tabla 16 contiene el % de recuperación absoluta evaluada con muestras control.

**Tabla 16.** % Recobro de muestras control de Casiopeína IIII-a en sangre.

Concentración Casiopeína IIII-a (µg/mL)	Casiopeína IIII-a en sistema Áreas	Casiopeína IIII-a en método Áreas	% Recobro	Promedio % Recobro
7	17736	10633	59.95	60.99
	18575	11720	63.10	
	18246	11072	60.68	
	18233	10931	59.95	
	18628	11411	61.26	
35	138897	85898	61.84	62.22
	137747	82265	59.72	
	137349	85549	62.29	
	134171	85078	63.41	
	137806	87952	63.82	
60	226517	149149	65.84	65.74
	222830	147538	66.21	
	220970	138911	62.86	
	222983	145364	65.19	
	214422	147113	68.61	
			promedio	62.98
			Desv. Est.	2.47
			%CV	3.91

### Precisión y exactitud del método

Los % de desviación absoluta de las muestras control del primero y segundo día de análisis se muestran en la Tabla 17.



**Tabla 17.** Precisión y exactitud del método de Casiopeína IIIi-a en sangre de rata.

	Concentración teórica ( $\mu\text{g/mL}$ )	Concentración promedio (n = 5) ( $\mu\text{g/mL}$ )	Desv. Est.	%CV	%Desv. Abs.
Primer día	7	7.55	0.13	1.69	7.83
	35	33.16	0.61	1.83	5.24
	60	58.07	0.82	1.41	3.21
Segundo día	7	7.40	0.39	5.24	5.67
	35	32.94	0.26	0.80	5.88
	60	61.99	3.93	6.35	3.33

**Límite de detección**

El límite de detección fue  $3.5 \mu\text{g/mL}$ , se determinó la concentración a la cual la señal del compuesto por analizar en la matriz biológica puede distinguirse 3 veces el nivel de ruido.

**Límite de cuantificación**

El límite de cuantificación fue  $5 \mu\text{g/mL}$ , la cual es la concentración más baja de la curva de calibración. Se determinó con los datos que se muestran en la Tabla 18.



**Tabla 18.** Límite de cuantificación.

Concentración Casiopeína IIII ( $\mu\text{g/mL}$ )	Rel. Áreas	Concentración interpolada Casiopeína IIII ( $\mu\text{g/mL}$ )
5	0.0193	5.23
5	0.0184	5.00
5	0.0175	4.76
5	0.0184	4.99
5	0.0188	5.10
Promedio	0.0185	5.02
Desv. Est.	0.0006	0.17
%CV	3.4587	3.44
	% Desv. Abs.	0.32

### Estabilidad de la solución de Casiopeína IIII-a en ciclos congelación - descongelación

La estabilidad se evaluó con 1 ciclo congelación – descongelación, porque la muestra biológica es sangre total, los resultados evaluados con muestras control se presentan en las Tablas 19 y 20.

**Tabla 19.** Muestras control, Casiopeína IIII-a en sangre a tiempo cero.

Concentración Casiopeína IIII-a $\mu\text{g/mL}$	Concentración interpolada Casiopeína IIII-a $\mu\text{g/mL}$
7	7.01
35	33.21
60	66.06



**Tabla 20.** Ciclo congelación – descongelación.

	Ciclo congelación - descongelación		
	Casiopeína IIII-a	Casiopeína IIII-a	Casiopeína IIII-a
	Muestra control bajo 7 µg/mL	Muestra control medio 35 µg/mL	Muestra control alto 60 µg/mL
réplica 1	6.66	33.58	67.41
réplica 2	6.63	31.88	67.98
promedio	6.65	32.73	67.69
Desv. Est.	0.02	1.21	0.40
%CV	0.28	3.69	0.60
%Desv. Abs.	5.03	6.49	12.82

#### 4.1.4 Aplicación del método

El método analítico optimizado y validado en el laboratorio de Biofarmacia, se aplicó para la evaluación *in vivo* de la Casiopeína IIII-a en un estudio de farmacocinética en ratas Wistar.

El estudio se llevó a cabo con la aplicación de Casiopeína IIII-a utilizando dos dosis (0.75 mg/Kg y 1.5 mg/Kg) por vía intraperitoneal, con toma de muestras a los 7, 14 y 21 días como se indica en los diagramas mostrados en las Tablas 7, 8 y 9.

Para el estudio con dosis de 0.75 mg/Kg no se encontró respuesta debido a que el método no fue tan sensible para detectar concentraciones por debajo de 3.5 µg/mL.

Los resultados de las muestras de Casiopeína IIII-a en sangre por CLAR en el inicio del estudio (dosis 1.5 mg/Kg) analizados con el Software Win-Nonlin se muestran en la

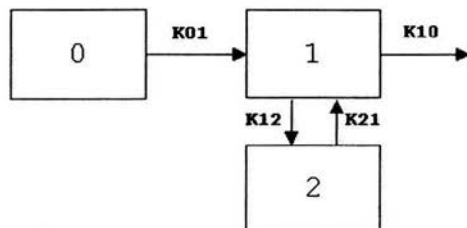


Tabla 21.

**Tabla 21.** Concentraciones de Casiopeína IIII-a, dosis 1.5 mg/Kg en el inicio del estudio en ratas con glioma C6.

Tiempo (horas)	Concentración interpolada Casiopeína IIII-a ( $\mu\text{g/mL}$ )
0.25	33.8607
0.5	22.8557
0.75	18.6785
1	16.6271
1.25	32.9708
2	10.1315
3	16.1576
6	13.3505
8	7.4656
50	9.5178
96	4.3371

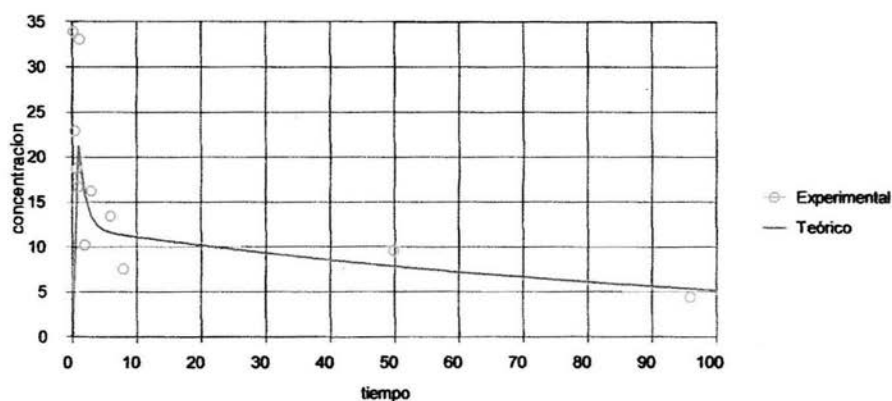
El modelo farmacocinético al que mejor se ajustaron los datos de la Tabla 21 fue el Modelo Abierto de Dos Compartimentos (MADC) que se muestra en la Figura 20.

**Figura 20.** Modelo Abierto de Dos Compartimentos.

El modelo se basó en una cinética de primer orden, considerando el tiempo cero, por lo tanto no hay tiempo de retraso. La ecuación que describe el modelo MADC es la siguiente:

$$C_t = Ae^{-\alpha \cdot t} + Be^{-\beta \cdot t} + Ce^{-K_{01} \cdot t}$$

Se obtuvo el siguiente perfil farmacocinético, Figura 21.



**Figura 21.** Farmacocinética de concentración de Casiopeína IIII-a en sangre de rata vs tiempo.

El coeficiente de correlación ( $r$ ) fue de 0.8146, el criterio de Akaike fue de 73.38, y la Suma de Cuadrados de 75.37.

Los valores de los parámetros farmacocinéticos para este modelo, se muestran en la Tabla 22.

Tabla 22. Parámetros farmacocinéticos obtenidos con el Software Win-Nonlin.

Parámetro farmacocinético	Valor estimado	Parámetro farmacocinético	Valor estimado
Volúmen (L)	20.29	$\alpha$ ( $h^{-1}$ )	0.87
$K_{01}$ ( $h^{-1}$ )	4.91	$\beta$ ( $h^{-1}$ )	0.01
$K_{10}$ ( $h^{-1}$ )	0.02	$T_{1/2\alpha}$ (h)	0.79
$K_{12}$ ( $h^{-1}$ )	0.09	$T_{1/2\beta}$ (h)	80.61
$K_{21}$ ( $h^{-1}$ )	0.12	A ( $\mu g/mL$ )	20.60
ABC ( $\mu g/mL.h$ )	1422.32	B ( $\mu g/mL$ )	12.03
$T_{1/2} K_{10}$ (h)	30.56	$C_0$ ( $\mu g/mL$ )	32.63
$T_{1/2} K_{01}$ (h)	0.01	Cl ( $mL/h$ )	0.32

Los resultados obtenidos en el análisis de las muestras de sangre, dosis 1.5 mg/Kg se muestran en la Tabla 23.

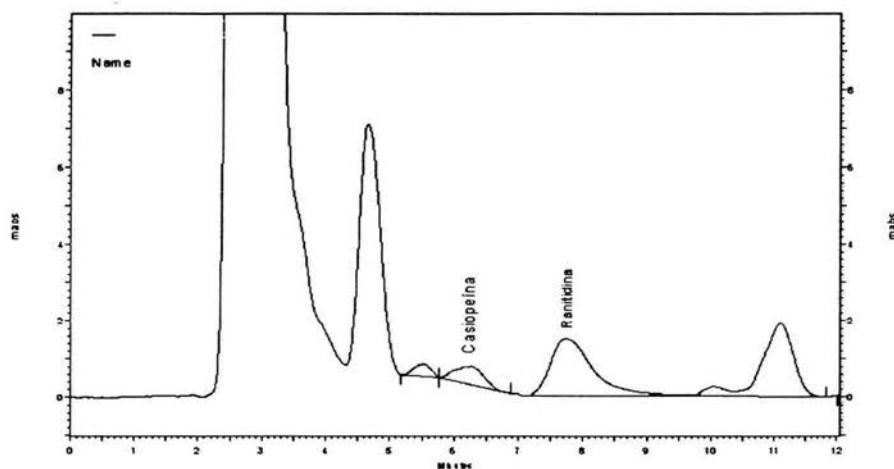




**Tabla 23.** Concentraciones de Casiopeína IIII-a, dosis 1.5 mg/Kg a los 7, 14 y 21 días.

Tiempo (días)	Concentración interpolada promedio de Casiopeína IIII-a ( $\mu\text{g/mL}$ ), n = 3	
	Ratas control	Ratas con tratamiento
7	No cuantificable	No cuantificable
14	No cuantificable	3.8286
21	No cuantificable	4.4180

El cromatograma de la Figura 22, muestra la respuesta cromatográfica de la Casiopeína IIII-a en sangre de rata con glioma C6 durante el estudio.

**Figura 22.** Cromatograma Casiopeína IIII-a en sangre de rata con glioma C6.

La Tabla 24 muestra el volumen tumoral de las ratas control y de las ratas con tratamiento de Casiopeína IIIi-a con dosis de 0.75 y 1.5 mg/Kg.

**Tabla 24.** Volumen tumoral evaluado en ratas Wistar.

Dosis mg/Kg/día	Volumen tumoral de tratamiento de Casiopeína IIIi-a	
control	$84 \pm 16 \text{ cm}^3$	————
0.75	$9 \pm 2 \text{ cm}^3$	$p \leq 0.05$
1.5	$20 \pm 3 \text{ cm}^3$	$p \leq 0.001$

Capítulo V

Análisis  
de  
Resultados



## 5.1 Análisis de resultados

### Optimización del método analítico

Se seleccionó la longitud de onda de 274 nm, porque esta longitud permitió la suficiente sensibilidad para detectar los compuestos en estudio. La fase móvil que se utilizó esta compuesta por metanol/ solución amortiguadora de fosfatos 0.01 M/ hexansulfonato de sodio 5 mM, en una proporción 40:55:05 (v/v), el pH de la solución amortiguadora de fosfatos fue de 6.6, con esta fase móvil se observó una mejor simetría en los picos.

El estándar interno seleccionado para el método de cuantificación de Casiopeína IIIi-a en sangre fue ranitidina, con un tiempo de retención de 7.6 min., se intentó usar furosemida como estándar, pero el pico sólo se presentó en sistema, porque al analizar muestras en sangre, la furosemida no presentó ningún pico, por lo tanto se decidió usar ranitidina 25 µg/mL, esta concentración se determinó de acuerdo a la respuesta cromatográfica presentada por las concentraciones de las soluciones en la curva patrón de Casiopeína IIIi-a.

### Validación del sistema

#### Linealidad

El sistema en agua fue lineal para el intervalo de concentración de 5 - 75 µg/mL, ya que el coeficiente de determinación es mayor a 0.99 y los coeficientes de variación presentados fueron 1.17, 0.78 y 1.11, 1.26 y 0.86% respectivamente, por lo tanto el sistema cumple con los criterios de aceptación de linealidad y precisión.



## Validación del método analítico

### Selectividad

En las figuras 10-18, se observa que ni los reactivos, ni la matriz biológica, ni los fármacos añadidos, interfieren en la respuesta cromatográfica, lo cual demostró que el método para cuantificar Casiopeína III-a en sangre total fue selectivo.

Con ello se logró obtener picos de Casiopeína III-a y ranitidina con tiempos de retención de 6.0 y 7.8 min., respectivamente.

### Linealidad

El método en la matriz biológica (sangre total) fue lineal en el intervalo de concentraciones de 5 - 75  $\mu\text{g/mL}$ , porque los resultados muestran coeficientes de correlación y de determinación mayores a 0.99, y coeficientes de variación de 4.74, 9.42, 6.97, 5.97, y 9.74, menores al 10%.

### Recobro

En la Tabla 15, se muestra que los porcentajes de recobro son reproducibles en cada concentración analizada con una curva de sistema y una curva de método. Este varió de 59.04 a 67.39% (promedio 63%), el %CV fue de 5.88%, este fue menor al 15%.

Los datos presentados en la Tabla 16 analizados con muestras control (7, 35 y 60  $\mu\text{g/mL}$ ), muestran reproducibilidad en los porcentajes de recobro obtenidos en cada concentración. El recobro obtenido fue de 63% y el %CV fue de 3.91% (menor al 15%).



### **Precisión y exactitud del método**

En la Tabla 17, las muestras control (7, 35 y 60  $\mu\text{g/mL}$ ) presentaron %CV de 1.69, 1.83 y 1.41%, los cuales fueron menores al 15%, con el % de desviación absoluta de 7.83, 5.24 y 3.21, respectivamente. Los % de desviación absoluta están dentro del  $\pm 15\%$  del valor nominal de la concentración, por lo tanto cumple con los criterios de aceptación para el primer día de análisis.

En el segundo día de análisis se obtuvieron %CV de 5.24, 0.80 y 6.35%, estos fueron menores al 15%, y % de desviación absoluta de 5.67, 5.88 y 3.33, los cuales están dentro del  $\pm 15\%$  del valor nominal de la concentración. Cumple con los criterios de aceptación para este segundo día.

El método fue exacto y preciso porque los % de coeficientes de variación y los % de desviación absoluta fueron menores al 15%.

### **Límite de detección**

El límite de detección fue 3.5  $\mu\text{g/mL}$ , porque fue la concentración en la cual la señal de la Casiopeína Illi-a en la matriz biológica (sangre) fue tres veces mayor que el nivel del ruido.

### **Límite de cuantificación**

El límite de cuantificación fue 5  $\mu\text{g/mL}$ , concentración más baja de la curva de calibración. En la Tabla 18 se observa que el %CV fue de 3.44%, el cual fue menor al 20%, y el % de desviación absoluta fue de 0.32%, este valor está dentro del  $\pm 20\%$  del valor nominal.



### Estabilidad 1 ciclo congelación – descongelación

La Casiopeína IIII-a en sangre fue estable considerando 1 ciclo congelación – descongelación. Los % de desviación absoluta para las concentraciones 7, 35 y 60  $\mu\text{g/mL}$  son 5.03, 6.49 y 12.82%, los cuales estan dentro del  $\pm 15\%$  del valor nominal de la concentración.

### Aplicación del método

En el estudio (dosis 0.75  $\mu\text{g/mL}$ ) no se encontró respuesta debido a que el método no fue tan sensible para detectar concentraciones por debajo de 3.5  $\mu\text{g/mL}$ , probablemente se metaboliza o se distribuye ampliamente en otro compartimiento fuera del fluido biológico.

En el inicio del estudio (dosis 1.5 mg/Kg) se encontraron concentraciones de Casiopeína IIII-a con las cuales se obtuvieron los datos farmacocinéticos con modelo de 2 compartimientos que se muestran en la tabla 22, obtenidos por el Software Win-Nonlin; los parámetros farmacocinéticos independientes obtenidos fueron: la depuración ( $\text{Cl} = 0.316 \text{ mL/h}$ ), área bajo la curva ( $\text{ABC} = 1422.316 \mu\text{g/mL.h}$ ) y volumen de distribución ( $\text{Vd} = 20.290 \text{ L}$ ), y los parámetros dependientes: constante de distribución ( $\alpha = 0.871 \text{ h}^{-1}$ ), vida media de eliminación ( $T_{1/2} = 80.612 \text{ h}$ ), constante de eliminación ( $\beta = 0.008 \text{ h}^{-1}$ ); la fase de distribución es más rápida que la fase de eliminación ( $\alpha > \beta$ ). La concentración plasmática al tiempo cero ( $C_0 = 32.628 \mu\text{g/mL}$ ) y las microconstantes de velocidad  $K_{01} = 4.913 \text{ h}^{-1}$ ,  $K_{10} = 0.017 \text{ h}^{-1}$ ,  $K_{12} = 0.093 \text{ h}^{-1}$ ,  $K_{21} = 0.116 \text{ h}^{-1}$ , establecen que el fármaco se distribuye con diferente velocidad en dos compartimientos comunicados, central y periférico.

Cuando se realizó el análisis de las muestras de sangre con dosis 1.5 mg/Kg a los 7, 14 y 21 días se observó que en las muestras obtenidas de ratas control no se detectó Casiopeína IIII-a, para las muestras obtenidas de ratas con tratamiento de Casiopeína IIII-a a los 7 días la Casiopeína IIII-a no fue detectable, a los 14 días se detectó una concentración de Casiopeína IIII-a de 3.828  $\mu\text{g/mL}$  y a los 21 días se detectó una concentración de 4.418  $\mu\text{g/mL}$ , estas concentraciones fueron mayores al límite de detección (3.5  $\mu\text{g/mL}$ ).

El volumen tumoral presentado por las ratas (Tabla 24) después de la inoculación fue de  $84 \pm 16 \text{ cm}^3$ , y se observó que después del tratamiento con Casiopeína IIII-a el volumen tumoral disminuyó significativamente hasta  $9 \pm 2 \text{ cm}^3$  con una dosis de Casiopeína IIII-a de 0.75 mg/Kg y  $20 \pm 3 \text{ cm}^3$  con una dosis de Casiopeína IIII-a de 1.5 mg/Kg, lo cual demostró que hubo diferencia significativa entre ambos tratamientos. De acuerdo al volumen tumoral, para la dosis de 1.5 mg/Kg/día el tumor presentó un volumen mayor que para la dosis de 0.75 mg/Kg, esto se puede deber a que a mayor dosis aumenta el metabolismo de la Casiopeína IIII-a y disminuye su efectividad.

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA





**Capítulo VI**

# Conclusiones



## 6.1 Conclusiones

El método analítico utilizado para cuantificar Casiopeína IIIi-a en sangre fue optimizado y validado. Este método analítico fue preciso, exacto, selectivo y lineal en un intervalo de concentración de 5 a 75  $\mu\text{g/mL}$ .

Se cuantificó Casiopeína IIIi-a en sangre total de rata Wistar con tumor transplantado glioma C6.

En el estudio de Casiopeína IIIi-a con dosis de 0.75 mg/Kg y vía de administración i.p. (intraperitoneal) no pudo ser detectada en ninguno de los tiempos de muestreo.

Se determinó la farmacocinética de la Casiopeína IIIi-a en sangre de rata con los datos obtenidos en el inicio del estudio (dosis 1.5 mg/Kg), vía de administración i.p., el perfil farmacocinético se ajustó a un MADC, con una vida media ( $\alpha$ ): 49 min., una vida media ( $\beta$ ): 3.3 días, un área bajo la curva (ABC) = 1422.32  $\mu\text{g/mL.h}$ , un volumen de distribución ( $V_d$ ) = 20.29 L, una  $C_o$  = 32.63  $\mu\text{g/mL}$  y una depuración (Cl) = 0.32 mL/h.

Se recomienda utilizar una población mayor de ratas para el primer día de estudio, dosis 1.5 mg/Kg de Casiopeína IIIi-a.



# Bibliografía



**Bibliografía**

1. Harris, Daniel C., Análisis Químico Cuantitativo. 3ª edición, Grupo Editorial Iberoamérica, México, D. F. 1992.
2. Buenas Prácticas de Laboratorio en Cromatografía de Líquidos. Corporación Analítica Integral, S. A. de C. V.
3. Quattrocchi Oscar, Abelaira Sara, Laba Raúl. Introducción a la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución. Artes Gráficas Farro. Buenos Aires, Argentina 1992.
4. Rodríguez Silva Susana. Estudio de unión a proteínas plasmáticas de Casiopeína III-i en albúmina, plasma de rata y plasma humano. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM 2003.
5. Marek Jakóbisiak, Witold Lasek and Jakub G., Natural mechanisms protecting against cancer. Immunology Letters, October 2003.
6. Manual de Oncología. Procedimientos medicoquirúrgicos. Instituto Nacional de Cancerología. Editorial McGraw-Hill Interamericana. 2ª edición, México, D. F. 2003, p. 14-19, 35-37.
7. William S. Klug, Michael R. Cummings., Conceptos de Genética. Prentice Hall Iberia, Madrid, 1999, p. 625-646.
8. Torroella Kourí Marta, Villa Treviño Saúl., Bases Genéticas del Cáncer, Instituto Nacional de Cancerología. Editorial Fondo de Cultura Económica, México D. F. 1998, p. 27-31.

9. Arthur I. Holeb, Diane J. Fink, Gerald P. Murphy., American Cancer Society textbook of Clinical Oncology. AMERICAN CANCER SOCIETY, USA 1991, p. 82-85.
10. Márquez Adriana, Romero Laura, Marín Alvaro. Evaluación Antineoplásica *in vitro* de nuevos fármacos (Casiopéinas) empleando líneas tumorales humanas y murinas. 4ª Jornada de trabajo en Casiopéinas. Diciembre 2000, p. 4-8.
11. Ruiz Ramírez L., De la Rosa M. E., Gracia Mora I., Mendoza A., Pérez G., Ferrer Sueta G., Tovar A., Breña M., Gutiérrez P., Cruces Martínez M. P., Pimentel E. y Natarajan A. T., Casiopéinas, metal-based drugs a new class of antineoplastic and Genotoxic Compounds. Journal of Inorganic Biochemistry, 51, 1-2, p. 406 (1993).
12. Bravo Ma. Elena. Diseño, síntesis y caracterización de compuestos de coordinación de cobre Casiopéinas. 5ª Jornada de trabajo de Casiopéinas. Diciembre 2002, p. 1-5.
13. Reyes Velasco Leobardo. Farmacocinética Preclínica de la Casiopéina Ilgly en ratas. Tesis de maestría. Facultad de Química, UNAM 2003.
14. Krajčí Dimitrolos, Mares Vladislav, Lisa Vera, Spanova Alena, Vorlíček Jaroslav. Ultrastructure of nuclei of cisplatin-treated C6 glioma cells undergoing apoptosis. European Journal of Cell Biology 79, 365-376 (2000, May).
15. Marín-Hernández A., Gracia-Mora I., Ruiz-Ramírez L., Moreno-Sánchez R., Toxic effects of copper-based antineoplastic drugs (Casiopéinas) on mitochondrial



- functions. *Biochemical Pharmacology* 65, 1979-1989 (2003).
16. Fuentes Noriega I. et al., Development and validation of a liquid chromatographic method for Casiopeína III in rat plasma. *Journal of Chromatography* 772, 25 May 2002, p. 115-121.
17. Gómez Ramos Irma Estrella. Optimización y validación de un método analítico para Casiopeína III-i en orina por HPLC. Tesis de licenciatura. Facultad de Química, UNAM 2003.
18. Fuentes Noriega Inés. Estudios de unión a proteínas plasmáticas de Casiopeína III y su unión a proteínas plasmáticas. 4ª Jornada de trabajo en Casiopeínas. Diciembre 2000, p. 69-76.
19. Fuentes Noriega Inés. Farmacocinética preclínica de casiopeína III en ratas, conejos y perros y su distribución en sangre total. 5ª Jornada de trabajo de Casiopeínas. Diciembre 2002, p. 89-90.
20. Rico Morales Héctor A. Evaluación de la actividad antineoplásica de la Casiopeína III sobre diferentes líneas tumorales humanas xenotransplantadas al ratón desnudo. 4ª Jornada de trabajo en Casiopeínas. Diciembre 2000, p. 10-12.
21. Novelo Torres Alma Miriam. Cinética *in vitro* de un nuevo fármaco antineoplásico (Casiopeína III). 5ª Jornada de trabajo de Casiopeínas. Diciembre 2002, p. 115-119.
22. Trejo Solís María Cristina. The effect of Casiopeínas II and III on the rat C6 glioma *in vivo*. 5ª Jornada de trabajo de Casiopeínas. Diciembre 2002, p. 87-88.



23. Sánchez Álvarez R., Tabernero A., Sánchez Abarca L. I., Orfao A., Giaume C., Medina J. M., Proliferation of C6 glioma cells is blunted by the increase in gap junction communication caused by tolbutamide. *FEBS Letters* 509, 202-206 (2001).
24. Zamorano A., Lamas M., Vergara P., Naranjo J. R., Mellström B. Y Segovia J., El direccionamiento de la expresión del gen letal GAS1 por un promotor glial-específico induce muerte celular en la línea C6. *Revista de Salud Pública y Nutrición. Edición Especial No.2* (2001).
25. Guevara Patricia and Sotelo Julio., C6 rat glioma grown into the peritoneal cavity, a large source of tumoral cells for subcutaneous transplant of glioma. *Journal of Neuro-Oncology* 44: 91-92, 1999.
26. Geng Jun, Strobel Henry W., Expression, induction and regulation of the cytochrome P450 monooxygenase system in the rat glioma C6 cell line. *Brain Research* 784 (1998) 276-283.
27. Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998. Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados que realicen las pruebas.
28. Procedimientos Normalizados de Operación GEN-BIO-001, Laboratorio de Biofarmacia, Facultad de Química, UNAM.

