



---

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

FACULTAD DE QUÍMICA

**Evaluación fisicoquímica de nuevos compuestos con actividad  
antineoplásica ( Casiopeína IIgly y Casiopeína III-i).**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

FERNANDO RODRIGUEZ ROSAS



MÉXICO, D.F.

**EXAMENES PROFESIONALES**  
FAC. DE QUÍMICA

2004



Biofarmacia



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. Ines fuentes Noriega.               |
| Vocal         | M en C. Sofía Margarita Rodríguez Alvarado. |
| Secretario    | M en C. Lauro Misael Del Rivero Ramirez.    |
| 1er. Suplente | M en C. Liz Jannet Medina Reyes.            |
| 2º. Suplente  | M en C. Luis Jesús García Aguirre.          |

Sitio en donde se desarrollo el tema:

Laboratorio 112 de Biofarmacia, Departamento de Farmacia, Conjunto E,  
Facultad de Química, Ciudad Universitaria, UNAM.

**M. en C. Inés Fuentes Noriega.**

Asesor del tema

**Fernando Rodríguez Rosas**

Sustentante



---

## AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Química, UNAM.  
Por las instalaciones, equipo y materiales prestados para mi desarrollo profesional.

A los proyectos de investigación: PAPIIT-IN 212100, PAIP 6390-05, CONACYT-G35012-N, CONACYT SECTORIAL SALUD 2002-C01-7677

A la ( Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación ( USAI), por el equipo y materiales prestados para la realización de proyecto.

A la M. en C. Inés Fuentes Noriega.  
Por la asesoría, dirección y el apoyo constante e incondicional cuyo resultado es esta tesis.

A los miembros del jurado M. en C. Sofía Margarita Rodríguez Alvarado y M en C. Lauro Misael Del Rivero R, por la pronta y acertada revisión crítica del manuscrito.

A la M. en C. Margarita Portilla Bauza por su asesoría y consejos que contribuyeron a mejorar este trabajo.

Al M en C Julio César Rivera por su amistad, sugerencias y las observaciones durante el desarrollo de este proyecto.

A mis amigos y compañeros de los Laboratorios 112 y 113 de Biofarmacia.



---

## DEDICATORIAS

A mi Madre Lourdes.

Por su cariño, comprensión y apoyo brindado en todo instante para la realización de este proyecto.

A mi Abuelita Raquel

Por haberme enseñado e inculcado los valores y principios morales que hasta hoy rigen mi vida.

A mi Hermana Ana

Por su cariño y por compartir los momentos inolvidables de nuestra infancia.

A mi amigo Germán Rivera

Por su invaluable amistad y apoyo brindado durante mi licenciatura.

A todas las personas que directa o indirectamente se vieron involucradas de alguna manera para la realización de esta tesis.



---

## INDICE

| Capítulo |   | Página. |
|----------|---|---------|
| I        | INTRODUCCION  | 1       |
|          | 1.1 Introducción  | 2       |
| II       | 2. ANTECEDENTES   | 4       |
|          | 2.1 Casiopeínas   | 5       |
|          | 2.2 Pruebas Fisicoquímicas Para Control Farmacéutico.           | 12      |
|          | 2.3 Espectroscopia Ultravioleta-Visible                         | 13      |
|          | 2.4 Espectroscopia Infrarroja.                                  | 15      |
|          | 2.5 Análisis Térmico  | 16      |
|          | 2.6 Cromatografía   | 18      |
|          | 2.7 Validación De Métodos Analíticos.                           | 19      |
| III      | 3. Parte Experimental   | 22      |
|          | 3.1 Objetivos   | 23      |
|          | 3.2 Pruebas Realizadas.   | 24      |
|          | 3.3 Pruebas Reológicas (No Farmacopeicas)                       | 25      |
|          | 3.4 Espectroscopia Uv-Visible.                                  | 27      |
|          | 3.5 Espectroscopia de Infrarrojo.                               | 29      |
|          | 3.6 Análisis Térmico (Calorimetría Diferencial De Barrido(DSC). | 30      |
|          | 3.7 Cromatografía Liquida De Alta Resolución ( CLAR )           | 33      |
| IV       | 4 Resultados.   | 45      |
|          | 4.1 Descripción Física del Compuesto.                           | 46      |



---

|  |    |
|--|----|
| 4.2. Pruebas Reológicas.   | 46 |
| 4.3 Espectroscopia UV-VIS.   | 49 |
| 4.4 Espectroscopia De Infrarrojo.  | 51 |
| 4.5 Análisis Térmico.  | 52 |
| 4.6 Método Analítico para Casiopeína IIgly. en materia prima.                              | 56 |
| 4.7 Método Analítico para Casiopeína III-i en materia prima.                               | 63 |
| V 5. Análisis De Resultados.   | 71 |
| 5.1 Densidad Real, Aparente Y Velocidad de Flujo   | 72 |
| 5.2 Tamaño De Partícula  | 72 |
| 5.3 Espectroscopia Uv-Visible  | 73 |
| 5.4 Espectroscopia de Infrarrojo.  | 75 |
| 5.5 <i>Análisis térmico</i>  | 76 |
| 5.6 Validación del método analítico para cuantificar Casiopeína IIgly como materia prima.  | 77 |
| 5.7 Validación del método analítico para cuantificar Casiopeína III-i, como materia prima. | 80 |
| VI CONCLUSIONES  | 83 |
| 6.1 CONCLUSIONES   | 84 |
| VII BIBLIOGRAFIA   | 85 |
| 7.1 BIBLIOGRAFIA   | 86 |
| VIII APENDICE  | 91 |



---

## LISTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| Figura 1. Estructura de la Casiopeína IIgly. [Acua (4,7-dimetil-1,10-fenantrolina) (glicina) Cu (II)] NO <sub>3</sub>  | 9  |
| Figura 2. Estructura de la Casiopeína III-i. ((Cu(4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina) (acetilacetona)) (NO <sub>3</sub> ))   | 11 |
| Figura 3. Esquema del sistema cromatográfico   | 19 |
| Figura 4. Distribución del tamaño de partícula de la Casiopeína IIgly  | 48 |
| Figura 5. Distribución del tamaño de partícula de la Casiopeína III-i  | 48 |
| Figura 6. Espectrograma de Casiopeína IIgly en solución de 10 µg/mL  | 49 |
| Figura 7. Espectrograma de Casiopeína IIgly en la solución de 7µg/mL   | 49 |
| Figura 8. Espectrograma de Casiopeína III-i en solución de 5 µg/mL   | 50 |
| Figura 9. Espectrograma de Casiopeína III-i. En solución de 7 µg/mL  | 50 |
| Figura 10. Espectrograma de Infrarrojo para casiopeína IIgly   | 51 |
| Figura 11. Espectrograma de Infrarrojo para casiopeína III-i.  | 51 |
| Figura 12. Calorimetría Diferencial de Barrido Casiopeína IIgly  | 54 |
| Figura 13. Calorimetría Diferencial de Barrido Casiopeína III-i  | 54 |
| Figura 14. Termo gravimetría, DTG y DTA, para Casiopeína IIgly   | 55 |
| Figura 15. Termo gravimetría, DTG y DTA, PARA Casiopeína III-i.  | 55 |
| Figura 16. Cromato grama de Casiopeína IIgly en fase móvil,100µg/mL con estándar interno ( Ketorolaco 50µg/mL), Tiempo de retención Casiopeína IIgly =2.7 min., Tiempo de retención Ketorolaco =7.1 min. | 56 |





---

|  |    |
|--|----|
| Figura 17. Blanco [Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)]NO <sub>3</sub> , con estándar interno (Ketorolaco 50 µg / mL) en fase móvil. Tiempo de retención [Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)]NO <sub>3</sub> = 3.02 min., Tiempo de retención Ketorolaco 7.2 min. | 57 |
| Figura 18. Linealidad del sistema para Casiopeína IIgly)   | 58 |
| Figura 19. Cromatograma de Casiopeína III-i en fase móvil, 30 µg/mL con estándar interno ( Furosemida 2.5) Tiempo de retención Casiopeína III-i = 5.7 min., Tiempo de retención Furosemida =8.6 min.   | 63 |
| Figura 20. Solución A: Cu-4,4 dimetil en fase móvil, con estándar interno (FUROSEMIDA 2.5µg/mL) Tiempo de retención SOLUCION A: Cu-4,4 dimetil = 4.6 min., Tiempo de retención Furosemida =8.9 min.  | 64 |
| Figura 21. Linealidad del sistema para Casiopeína III-i  | 65 |
| Figura 22 Micrografía Casiopeína IIgly, con un aumento 10X   | 92 |
| Fig.23 Micrografía Casiopeína IIgly, con un aumento 40X  | 93 |
| Fig. 24 Micrografía Casiopeína III-i, con un aumento 10X   | 94 |
| Fig.25 Micrografía Casiopeína III-i, con un aumento 40X  | 95 |



---

## INDICE DE TABLAS

|   |    |
|---|----|
| Tabla 1 Descripción física del compuesto                                    | 46 |
| Tabla 2 Pruebas Reológicas (no farmacopeicas) de Casiopeínas IIgly y III-i. | 47 |
| Tabla 3 Resultados del Análisis Térmico.                                    | 52 |
| Tabla 4 Linealidad del sistema para Casiopeína IIgly.                       | 58 |
| Tabla 5 Precisión del sistema (repetibilidad día 1)                         | 59 |
| Tabla 6. Precisión del sistema (repetibilidad día 2)                        | 59 |
| Tabla 7. Reproducibilidad del sistema Casiopeína IIgly                      | 60 |
| Tabla 8. Exactitud del sistema (Día 1).                                     | 61 |
| Tabla 9 . Exactitud del sistema(Día 2)                                      | 62 |
| Tabla 10. Linealidad del sistema para Casiopeína III-i.                     | 64 |
| Tabla 11. Precisión del sistema (día 1).                                    | 66 |
| Tabla 12. Precisión del sistema (día 2).                                    | 66 |
| Tabla 13 Reproducibilidad del sistema Casiopeína III-i.                     | 67 |
| Tabla 14 Exactitud del sistema(Día 1)                                       | 68 |
| Tabla 15 Exactitud del sistema (Día 2).                                     | 69 |
| Tabla 16 Espectroscopia de Infrarrojo Casiopeína IIgly                      | 75 |
| Tabla 17 Espectroscopia de Infrarrojo Casiopeína III-i                      | 76 |



# INTRODUCCION





---

**Evaluación fisicoquímica de nuevos compuestos con actividad antineoplásica**  
**(Casiopéina IIgly y Casiopéina III-i)**

**1.1 INTRODUCCION.**

Debido a que en la actualidad el diseño y síntesis de nuevos fármacos es de gran importancia para el tratamiento del cáncer, un grupo multidisciplinario de investigadores de la UNAM bajo la dirección de la Dra. Lena Ruiz Azuara han trabajado con una serie de compuestos que tienen actividad antineoplásica denominados Casiopéinas.

Las Casiopéinas son compuestos de coordinación sintetizados a partir de una base orgánica y un metal, con propiedades anticancerígenas y citotóxicas, la familia de las Casiopéinas contiene cobre (II) como metal, y en la esfera de coordinación tienen dos ligantes bidentados, uno de ellos es una diimina (N-N) y el otro puede ser un aminoacido (N-O) o donador (O-O), cuya fórmula general es  $[Cu(NN)(ON)]NO_3$  ó  $[Cu(NN)(OO)]NO_3$ .

Actualmente se han sintetizado más de 100 compuestos, los cuales se han agrupado en subfamilias: Casiopéina I, Casiopéina II, Casiopéina III, Casiopéina VIII. Los compuestos se encuentran patentados y están plenamente caracterizados por análisis elemental IR, UV-VIS (en varios casos), conductividad, momento magnético, y estructuras de rayos X cuando se han obtenido cristales.

La Casiopéina IIgly nitrato de acua 4,7-dimetil- 1,10- fenantrolina, glicina, cobre (II), se ha desarrollado específicamente como un fármaco anticancerígeno que actúa contra células Hela, células tipo CaLo, murinas de leucemia L1210, contra los tipos de cáncer S180, B16 y LW1; es potencialmente citotóxico e induce apoptosis.

La Casiopéina III-i\* ((Cu(4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina) (acetilacetato)) (NO<sub>3</sub>) se encuentra en etapa preclínica con alto potencial antineoplásico en líneas de carcinoma cérvico-uterino (SiHa y HeLa).



---

En la presente tesis se realizará un estudio para obtener un control de calidad del principio activo como materia prima, para que cumpla los estándares que marca la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM), como principio activo de una forma farmacéutica, estos estándares se refieren a Identidad, Pureza y Concentración del compuesto en estudio. (Casiopeína IIgly, Casiopeína III-i ).

Se realizó la descripción física de estos compuestos con actividad antineoplásica, también se realizaron las pruebas reológicas que pueden ayudar como propuesta al proceso tecnológico farmacéutico en diferentes lotes de síntesis: Densidad real, densidad aparente, velocidad de flujo y tamaño de partícula.

El análisis realizado a estas sustancias implicó ensayos de identidad con las siguientes técnicas instrumentales: Espectroscopia UV-VIS, Espectroscopia de Infrarrojo, Análisis Térmico Diferencial (DTA), Calorimetría Diferencial de barrido(DSC) y Termo gravimetría (TG), finalmente se realizó la Validación del método analítico por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución ( CLAR ) para la Casiopeína IIgly y Casiopeína III-i.

\*Actualmente el compuesto se nombra Casiopeína III i-a.



# ANTECEDENTES



---

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Casiopeínas

Debido a que el cáncer es un problema de salud muy importante y que la quimioterapia es uno de los tratamientos que se utilizan para aliviar esta enfermedad, cada vez es más necesario encontrar fármacos que actúen de manera selectiva sobre las células cancerosas.

El tratamiento de los tumores cancerosos puede ser desarrollado por cirugía, radioterapia, inmunoterapia, crioterapia y quimioterapia, y sus combinaciones, dependiendo del tipo de cáncer, la distribución y el estado del paciente. La cirugía es la más confiable y rápida de todas las terapias, pero únicamente es efectiva contra tumores sólidos localizados, y presenta el riesgo de recurrencia debido al origen del mal que puede ser en otro sitio del cuerpo (metástasis), o que el tumor no fue completamente extirpado. Por ello, el método usado comúnmente es la quimioterapia combinada con la cirugía y la radioterapia.<sup>17</sup>

La resistencia a los fármacos es el principal obstáculo para la quimioterapia, algunos tumores (por ejemplo, cáncer de pulmón y colon) se han reportado que son resistentes a los agentes quimioterapéuticos (por ejemplo, cis-platino, mostazas, ciclofosfamida).<sup>2,40</sup>

La mayor parte de los agentes antineoplásicos actúan específicamente sobre procesos como la síntesis de ADN, la transcripción o la función del huso mitótico y por ende se les considera específicos del ciclo celular.<sup>4,12</sup>

Rosenberg descubrió la aplicación del primer quimioterapéutico metálico, *cis*-diaminodicloro platino (II) (*cis*-platino), el cual permanece a la fecha como uno de los fármacos anticancerígenos más exitoso. Este compuesto había sido sintetizado desde finales del siglo XIX.

El *cis*-platino es efectivo contra los tumores testicular, ovárico, cabeza, cuello y vesícula, prolongando la supervivencia y en la mayoría de los casos la remoción.<sup>24</sup> Sin embargo, el



cis-platino presenta serios efectos adversos, donde los más importantes son: nefrotoxicidad, ototoxicidad, mielotoxicidad, neuropatía periférica, náusea y vómito.

La hidratación de los pacientes por infusión de solución salina y diuréticos permite el uso de altas dosis sin dañar los riñones.<sup>4</sup> Por las razones anteriormente descritas la razón se basa en el deseo de encontrar compuestos con las siguientes características:

- a) Ausencia de resistencia cruzada al cis-platino.
- b) Un espectro más amplio de actividad, particularmente en áreas clínicas donde el cis-platino no ha demostrado efectos terapéuticos significativos.
- c) Mayor efectividad clínica antitumoral.
- d) Disminución de efectos eméticos y renales.<sup>1</sup>
- e) Sinergismo en terapias combinadas.

### **2.1.1 Diseño, síntesis y caracterización.**

Dentro de las nuevas moléculas con actividad citostática y antineoplásica se tiene a las Casiopeínas. La familia de las Casiopeínas contiene cobre (II) como metal, y 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), cuya fórmula general es  $[Cu(NN)(ON)]NO_3$  o  $[Cu(NN)(OO)]NO_3$ .<sup>36</sup> Para la obtención de estos complejos se ha considerado que el metal presenta una toxicidad relativamente baja y 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 estas características serán las propiedades de los compuestos en términos de solubilidad, potencial electroquímico, capacidad de transporte a través de membranas y estabilidad; ya que se pretende entre otras posibilidades que el mecanismo de actividad sea por interacción con el ADN.<sup>27,35,37</sup>

Como un posible modo de actividad química, los metales pueden participar en reacciones biológicas del tipo redox (hierro y cobre)<sup>29</sup>, recibiendo la sustitución de ligandos



---

con moléculas biológicas (cis-platino)<sup>21</sup> formando estructuras específicas alrededor del centro metálico, con reactividad específica.<sup>13</sup> Otros tienen isótopos radiactivos, los cuales pueden utilizarse para la caracterización de tumores o para inmunoterapia (yodo unido a un anticuerpo).<sup>19</sup>

Una mejor comprensión de las interacciones entre un metal o un complejo metálico con moléculas biológicas ayudaría para el diseño de complejos metálicos más específicos y efectivos para la terapia del cáncer.<sup>1</sup>

Se han sintetizado y evaluado numerosos complejos de platino de coordinación de otros metales tales como bismuto, germanio (IV), iridio, molibdeno, paladio, titanio (IV), rutenio (III), rodio (I, II y III), oro (III), vanadio y cobre (II). De estos los que parecen tener una actividad significativa y así utilizarlos en pruebas clínicas, son el spirogermanio, nitrato de galio, rutenio (III) indazol, *cis*-dietoxibis(1-fenilbutano-1,3-dionato) titanio (IV) (budotitano), y titanoceno de dicloruro.<sup>13,23,24,25</sup>

Los complejos metálicos varían ampliamente en su actividad biológica y sus mecanismos de acción dependiendo de su estructura química, ligantes, resistencia y estabilidad, forma metálica y configuración. Muchos de ellos son complejos de coordinación con una estructura cuadrada plana, en donde el metal forma el centro de la molécula.<sup>24</sup> Así el ligante también puede determinar el modo de acción dependiendo de sus propiedades de enlace.

Algunos de estos complejos metálicos se han evaluado en tumores y células cancerosas, en espera de pruebas clínicas.

De acuerdo a estudios realizados con cis-platino se ha encontrado que los compuestos de coordinación que cumplan con los siguientes postulados tienen potencial antineoplásico:

- Deben intercambiar rápidamente sólo algunos de sus ligantes en reacciones con moléculas biológicas.
- Los complejos deben ser eléctricamente neutros.



- Son necesarios dos ligantes *cis* monodentados (o uno bidentado) como grupo saliente. Los isómeros *trans* son inactivos.
- Las velocidades de intercambio de estos ligantes se encuentran en un intervalo específico de labilidad.
- Los ligantes no intercambiables en las moléculas deben estar fuertemente enlazados.

Las Casiopeínas han demostrado cumplir con estos postulados, a excepción del postulado b, además de tener un buen efecto antineoplásico lento en las pruebas *in Vitro* como *in vivo* que exige el panel de cernimiento sugerido por el National Cancer Institute (NCI). Dentro de las pruebas se tiene el uso de líneas tumorales murinas transplantables en cepas singénicas, determinación de dosis letal 50 (DL<sub>50</sub>)<sup>3,15,16</sup>

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

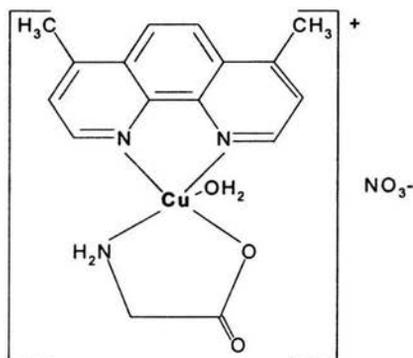
Actualmente se han sintetizado más de 100 compuestos, los cuales se han agrupado en subfamilias: Casiopeína I, Casiopeína II, Casiopeína III, Casiopeína VIII. Estas subfamilias de Casiopeínas son tóxicas para bacterias y han demostrado ser activas contra algunas líneas celulares tumorales *in Vitro* (L1210 y CaLo)<sup>27,28</sup> y tumores implantados en ratón (sarcoma S180, melanoma melanótico B16, tumor de Lewis, LW-1, y leucemia linfóide L1210).<sup>36</sup>

Los compuestos se encuentran patentados<sup>34</sup> y están plenamente caracterizados por análisis elemental IR, UV-VIS (en varios casos), conductividad, momento magnético, y estructuras de rayos X cuando se han obtenido cristales.



### 2.1.2 Casiopeína Ilgly.

La casiopeína Ilgly nitrato de acua 4,7-dimetil- 1,10- fenantrolina, glicina, cobre (II) (PM.: 423.5 g/mol; pka: 5.4) ha mostrado actividad antineoplásica y una toxicidad menor hacia las células sanas que el cis-platino; se ha desarrollado específicamente como un fármaco anticancerígeno que actúa contra células Hela, células tipo Calo, murinas de leucemia L1210, contra los tipos de cáncer S180, B16 y LW1; es potencialmente citotóxico e induce apoptosis.



**Figura. 1 Estructura de la Casiopeína Ilgly. [Acua (4,7-dimetil-1,10-fenantrolina) (glicina) Cu (II)] NO<sub>3</sub>**

Lo que actualmente se sabe acerca de la Casiopeína Ilgly es:

1. Soluble en agua, etanol y metanol.
2. Estable en soluciones fisiológicas.
3. Por ser una molécula plana interacción con el ADN.
4. DL50 por administración intravenosa en ratón es de 15.85 mg/Kg.
5. DL50 por administración intraperitoneal en ratón es 16.7 mg/Kg.

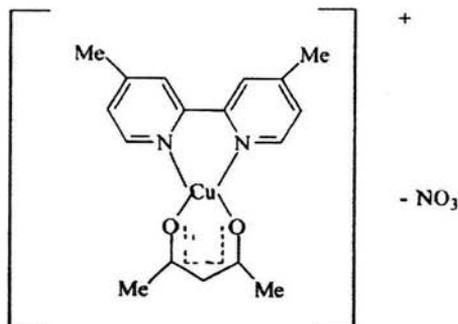


6. El efecto más serio *in vivo* de la casiopeína IIgly es la hemólisis de glóbulos rojos, la cual se debe a la toxicidad del cobre.<sup>8</sup>
7. La casiopeína IIgly reduce la expresión de metalotioneína, la cual es uno de los medios conocidos usados por las células cancerosas resistentes para eliminar a los fármacos anticancerígenos basados en metales.<sup>22</sup>
8. También se une al ADN y aunque esto no es único, lo novedoso de su actividad puede deberse a que reacciona con agentes reductores y rompe la molécula de doble hélice en lugar de inhibir la replicación por cambios estructurales sobre la molécula del ADN o aumentando la reparación del ADN.<sup>6,7,32,33</sup>
9. El mayor efecto adverso *in vivo* producido después del tratamiento con casiopeína IIgly (dosis de 5 mg/Kg.) es la hemólisis aguda.<sup>9</sup>
10. Los eritrocitos son células muy susceptibles al ataque del cobre debido a su contenido de oxígeno y la oxidación de la hemoglobina, los que pueden beneficiar a la lipoperoxidación y la hemólisis.<sup>28</sup>

### **2.1.3 Casiopeína III-i.**

La Casiopeína III-i ((Cu(4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina) (acetilacetionato)) (NO<sub>3</sub>)(PM: 426.92 g/mol; pka: 8.25) ha mostrado actividad antineoplásica y una toxicidad menor hacia las células sanas que el cis-platino, se encuentra en etapa preclínica con alto potencial antineoplásico en líneas de carcinoma cérvico-uterino (SiHa y HeLa).





**Figura.2 Estructura de la Casiopeína III-i. ((Cu(4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina) (acetilacetato)) (NO<sub>3</sub>))**

La Casiopeína III-i se muestra en la figura.2 presenta un ligante bidentado donador de oxígenos y un ligante bidentado donador de nitrógenos, tiene una geometría cuadrado plana.

Lo que actualmente se sabe acerca de la Casiopeína III-i es:

- Soluble en agua y metanol.
- Estable en soluciones fisiológicas.
- Su toxicidad al parecer se debe por el donador N-N y los compuestos que poseen acetilacetato como segundo ligante.
- Tiene una DL<sub>50</sub> de 14.6 mg/Kg. por vía intraperitoneal en ratones.
- Por ser una molécula plana interacciona con el ADN.
- Constante de eliminación (K<sub>el</sub>) de 0.012 min<sup>-1</sup>;
- Tiempo de vida media (t<sub>1/2</sub>) de 64.13 min.
- Tiempo de vida de residencia (TMR) de 73.56 min.
- Volumen de distribución aparente de 44.8 mL
- Depuración (Cl) de 4.41 mL/min.
- Un área bajo la curva (ABC) de 18538.41 µg/mL, min.



## **2.2 Pruebas fisicoquímicas para control farmacéutico.**

El control de calidad de un producto farmacéutico, es cotidiano, para lo cual debe de contar con especificaciones detalladas, así como los métodos adecuados para su evaluación, las especificaciones comprenden los criterios y los límites de aceptación ó rechazo. Dentro del control de calidad para materias primas se evalúan una serie de parámetros fisicoquímicos no farmacopeicos como son: El tamaño de partícula, la densidad aparente y real, y la velocidad de flujo. Las diferentes farmacopeas especifican los controles adecuados para materias primas que se utilizan para la elaboración de medicamentos.

### ***2.2.1 Tamaño de partícula.***

El tamaño de partícula de las sustancias medicamentosas, o su superficie, es un factor decisivo para la serie total de sus cualidades, esto es válido para las sustancias que se encuentran en forma de polvo, como para aquellas que han sido elaboradas en formas farmacéuticas (tabletas, granulados, pomadas, supositorios, emulsiones), pueden citarse, como ejemplo, la capacidad de adsorción, conductibilidad de calor, capacidad para incorporar líquidos, adherencia a la superficie de sólidos extraños y capacidad de goteo, se han presentado también aspectos biofarmacéuticos del tamaño de partícula en formas farmacéuticas (por ejemplo, modificación de la velocidad de disolución de medicamentos poco solubles por el tamaño de partícula y su repercusión consiguiente en la administración y absorción de medicamentos).<sup>44</sup>

En la realización de ensayos microscópicos el tamaño de partícula es empleado para enumerar amorfos, semilíquidos u otra forma morfológica de distintos materiales. En muchos casos, las monografías individuales especifican solamente el ensayo de microscopía, las pruebas descritas son pruebas físicas que funcionan para el objetivo de enumerar y subdividir partículas extrañas conteniendo rangos específicos de tamaño.<sup>44</sup>



---

Las partículas que se encuentran en la materia, contienen movimientos al azar de diferente origen, sustancias extrañas, otras contienen burbujas de gas disuelto, éstas no pueden ser cuantificadas por análisis químico debido a que una pequeña cantidad de material contiene una composición heterogénea por estos motivos se emplea la determinación del tamaño de partícula.<sup>42</sup>

### **2.2.2 Densidad Real**

Se define como la relación entre la masa de un objeto, determinada en un vacío o referida a el, y el volumen de ese objeto a una temperatura específica.

### **2.2.3 Densidad Aparente**

Difiere de la densidad real (absoluta), sólo en el hecho de que la masa del objeto se determina en el aire y que influye en ella el efecto de flotación del aire sobre el objeto que se pesará y sobre las masas (pesos) estándares usados para la comparación, si el objeto y las masas son del mismo material o tienen la misma densidad no habrá diferencia en el efecto de flotación, y la densidad aparente será igual a la absoluta.<sup>31</sup>

### **2.2.4 Velocidad de Flujo**

Esta determinación se realiza para saber si una sustancia tiene un flujo adecuado para la elaboración de medicamentos. Cuando se tienen velocidades de flujo bajas, se observa que los materiales se adhieren a los instrumentos de medición, de elaboración de medicamentos, lo que presenta un problema en la manufactura de formas farmacéuticas.

## **2.3 Espectroscopia ultravioleta-visible**

Las sustancias que tienen grupos cromóforos presentan en general absorción de radiación en las zonas ultravioleta o visible (ambas), la intensidad de absorción en función de la longitud de onda puede representarse mediante dos tipos de gráfico:



1.- Trazando valores de transmitancia frente a las longitudes de onda.

2.-Trazando las absorbancias de la muestra frente a las longitudes de onda.

Esta ultima ofrece la ventaja de que existe relación lineal entre concentraciones y absorbancias para cualquier longitud de onda.<sup>43</sup>

Los espectros en el ultravioleta destinados a análisis cualitativo se obtienen la mayoría de las veces con soluciones diluidas del analito.

Las características más importantes de los métodos espectrofotométricos son: Amplia aplicabilidad, elevada sensibilidad, selectividad de moderada a alta, Exactitud, facilidad y comodidad.<sup>38</sup>

### **2.3.1 Aplicaciones de la espectrofotometría uv-visible**

- La espectroscopia molecular de absorción uv-visible se emplea primariamente en análisis cuantitativo y es probablemente el procedimiento más usado en los laboratorios químicos y clínicos del mundo.
- Permite la identificación de una sustancia por medio de un barrido espectral localizando máximos de absorción, y por comparación con un patrón previamente establecido.
- Se utiliza en análisis sistemáticos de control de calidad, para comprobar que la sustancia ó preparado está conforme con un patrón previamente establecido.
- Puede usarse para la asignación de estructuras de compuestos orgánicos, en combinación con otras técnicas espectroscópicas.
- Determinación de constantes de disociación de sustancia ionizables.
- Conviene citar el control de purificación de sustancias que, no presentando absorción en estas regiones espectrales, contienen impurezas con bandas de absorción en uv-visible.



## **2.4 Espectroscopia infrarroja.**

La espectroscopia infrarroja implica movimientos de torsión, flexión, rotación y vibración de los átomos de una molécula, la multiplicidad de las vibraciones que ocurren en forma simultánea produce un espectro de absorción altamente complejo, que dependen de las características de los grupos funcionales constitutivos de la molécula, así como de la configuración total de los átomos.<sup>20</sup>

La región infrarroja del espectro electromagnético se extiende desde el extremo rojo al final del espectro visible hasta las microondas, es decir esta región incluye radiaciones de longitudes de onda entre 0.7 y 500 micrómetros ó en números de onda entre 14000  $\text{cm}^{-1}$  y 20  $\text{cm}^{-1}$ .

La región infrarroja se divide en tres zonas:

- Infrarrojo cercano      12500- 4000 $\text{cm}^{-1}$
- Infrarrojo medio        4000-200 $\text{cm}^{-1}$
- Infrarrojo lejano        200-10  $\text{cm}^{-1}$

Cuando una molécula grande contiene un sistema de tres átomos es posible que existan vibraciones que implican movimientos de átomos que salen del eje del enlace, se pueden considerar 4 tipos: movimientos de deformación o tijereteo, balanceo ó flexión plana, oscilación ó flexión espacial, y torsión.<sup>20</sup>

**MANEJO DE LA MUESTRA:** Las muestras sólidas que son las más frecuentemente utilizadas en el área farmacéutica se pueden medir en solución, en suspensión o en pastilla. Las muestras que son líquidas a temperatura ambiente se examinan en su forma pura ó en soluciones, se deben escoger valores de concentración y una longitud de trayecto óptico de tal manera que la transmitancia quede entre 15 y 70%, para soluciones lo más practico es usar concentraciones de 10% y longitudes de celda de 0.1mm.



#### **2.4.1 Aplicaciones de la espectroscopia infrarroja**

- El interés de la espectroscopia IR radica fundamentalmente en sus aplicaciones de tipo cualitativo, esta característica se utiliza ampliamente en control de calidad como método de identificación de las materias primas utilizadas en farmacia, comprobando el espectro de absorción IR. de las muestras con el espectro de sus respectivos patrones.
- Tiene gran interés en el campo de la investigación, conjuntamente con otras técnicas espectroscópicas, como método de asignación de estructuras en nuevos compuestos de síntesis orgánica.

#### **2.5 Análisis térmico.<sup>41</sup>**

El conjunto de técnicas que determinan cualquier cambio de propiedades físicas de una sustancia, en función de la temperatura, dicha sustancia esta sujeta a un programa de temperatura controlada.

##### **2.5.1 Reseña histórica del análisis térmico <sup>26</sup>**

Le Chatelier realizó los primeros estudios termo analíticos, pero no es sino hasta 1950 cuando empiezan a aparecer en el mercado instrumentos construidos con un carácter distinto, los cuales proporcionan una normalización y comparación de resultados. En 1960, empiezan a aparecer excelentes publicaciones que examinan la influencia de los factores experimentales y los resultados termo analíticos.

En 1965, se forma la Confederación Internacional de Análisis Térmico (ICTA), la cual establece reglas básicas fundamentales en técnicas termo analíticas.

De acuerdo con las normas establecidas por el ICTA, (1999), se muestran las siguientes definiciones oficiales:





### **2.5.2 Análisis Térmico Diferencial ( Differential Thermal Analysis: DTA).<sup>41</sup>**

Determina la diferencia de temperatura de una sustancia y un material de referencia térmicamente inerte en función de la temperatura, las cuales están sujetas a un programa controlado de temperatura.

### **2.5.3 Calorimetría Diferencial de Barrido (Differential Scanning Calorimetry: DSC).<sup>41</sup>**

Mide la diferencia de flujo de calor (energía) recibida por una sustancia con respecto a una referencia en función de la temperatura, las cuales están sujetas a un programa controlado de temperatura.

### **2.5.4 Termo gravimetría (Thermogravimetry: TG)<sup>41</sup>**

Esta técnica determina el cambio de masa de una sustancia en función de la temperatura, a una velocidad de calentamiento constante.

### **2.5.5 Termogravimería Derivativa (Derivative Thermogravimetry: DTG)<sup>41</sup>**

Esta técnica determina la primera derivada de la curva termogravimétrica con respecto a la temperatura o al tiempo.

### **2.5.6 Aplicaciones generales del análisis térmico<sup>11</sup>**

La información que nos puede proporcionar el análisis térmico para uso y aplicación dentro de la industria farmacéutica son las siguientes:

- Pruebas de identidad, compatibilidad y pureza de materias primas, principios activos y compuestos orgánicos para la elaboración de medicamentos.
- Determinación de calores de transición, de reacción, de cambio de fases y elaboración de diagramas de fase.
- Caracterización de materiales por determinación de punto de ebullición, punto de fusión, sublimación y pérdida de masa.
- Cinéticas de descomposición, Isomerización y caracterización de polímeros.





- En material biológico, interacciones en reacciones antígeno-anticuerpo, fármaco-receptor, estudios de compatibilidad de productos.<sup>11</sup>
- Dentro de la manufacturación de productos farmacéuticos: en la selección de la forma de la sal ó cristal, forma del polimorfo, el control de la sustancia del fármaco y de los excipientes utilizados.<sup>14</sup>
- En la determinación de formas amorfas, ya que el estado amorfo produce una rápida cristalización, disolución, precipitación, pérdida por secado, lo cual influye en la manufactura de los medicamentos.
- En procesos de Optimización de fármacos y formulaciones: Control de procesos, granulación, micro esferas y recubrimientos de medicamentos.
- En productos farmacéuticos: Control de procesos, granulación, mezclado, tableteado, amasado y disolución de formas farmacéuticas.
- Interacción de agua en geles, cremas y polímeros.
  
- Las técnicas de Análisis Térmico sirven como base para la determinación de datos (termodinámicos) de polimorfos, solvatos y formas amorfas los cuales pueden marcar un paso limitante en la manufactura, condiciones de almacenamiento y transporte de materiales distribuidos en la medicina de patente.<sup>11</sup>

## **2.6 Cromatografía.**

Es una técnica que permite identificar, separar y cuantificar los componentes de una mezcla de compuestos, la separación se basa en la distribución del soluto entre dos fases, llamadas fase estacionaria y fase móvil. Si a este sistema se le introduce una mezcla de sustancias solubles en la fase estacionaria, estas avanzarán por la misma empujadas por la fase móvil, si las sustancias que componen la mezcla interactúan en distinta magnitud con la fase estacionaria, estas avanzarán por el sistema con distinta velocidad, produciéndose así la separación.



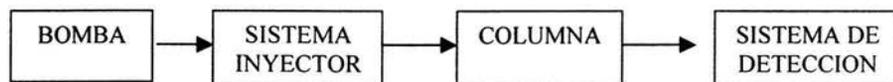
La gran importancia que estos métodos han cobrado en la actualidad proviene fundamentalmente de su velocidad, su gran poder de resolución, su versatilidad y la posibilidad de poder trabajar con cantidades muy pequeñas de material.

### **2.6.1 Cromatografía de líquidos de alta resolución ( CLAR ).**

Esta técnica consiste en hacer pasar una fase móvil líquida constituida por un disolvente adecuado, que arrastra previamente a la muestra (sólida o líquida) a una presión más elevada a través de una columna que contiene la fase estacionaria.

El equipo de HPLC esta constituido por los siguientes módulos:

1. BOMBA: La bomba extrae el disolvente del reservorio y debe tener la capacidad de entregar un flujo y presión constante de fase móvil a la columna.
2. INYECTORES: Generalmente se emplean inyectores automáticos.
3. COLUMNA: Se clasifica de acuerdo a la constitución y características de relleno.
4. SISTEMA DE DETECCION: El detector genera una señal eléctrica continua que es amplificada y registrada por un integrador electrónico dando como resultado la respuesta gráfica (cromatograma).



**Fig. 3 Esquema del sistema cromatográfico**

### **2.7 Validación de métodos analíticos.**

La validación de un método analítico se define como el proceso por el cual se establece mediante estudios de laboratorio, que las características de capacidad del método cumple con los requerimientos de calidad para las aplicaciones analíticas deseadas, es decir cumple con su propósito.



---

La validación proporciona evidencia documentada de que los resultados obtenidos por medio del método son confiables, dentro de este proceso están comprendidas una serie de pruebas sistemáticas que permiten evaluar la confiabilidad en las mediciones analíticas, los parámetros a determinar en la validación de un método analítico son los que se describen a continuación:

**Especificidad.-** Es la capacidad que tiene un método analítico para que la respuesta obtenida proceda únicamente del fármaco de interés y no de otros componentes que estén presentes en la muestra de estudio como productos de degradación, se realiza de acuerdo a la aplicación que vaya a tener el método analítico.<sup>5</sup>

**Linealidad.-** Es la capacidad que tiene un método analítico para asegurar que los resultados analíticos obtenidos directamente, o bien mediante una transformación matemática bien definida, son proporcionales a la concentración de la sustancia de interés dentro de un intervalo.<sup>5</sup>

**Precisión.-** Es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales, cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea.<sup>5</sup>

**Repetibilidad.** Es el grado de concordancia de los resultados analíticos obtenidos dentro de una serie de mediciones efectuadas en una misma muestra homogénea realizada por un solo analista, usando los mismos instrumentos.

**Reproducibilidad.** Es la concordancia entre los resultados individuales obtenidos con el mismo método y material de prueba, bajo diferentes condiciones de operación (analista, laboratorios).



---

**Exactitud.** Es la concordancia que existe entre un valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia.<sup>5</sup>

**Límite de Cuantificación.** Es la mínima concentración en la cual el método analítico es lo suficientemente preciso y exacto para dar un estimado satisfactorio de una muestra de concentración desconocida.<sup>5</sup>

**Límite de Detección.**<sup>5</sup> Concentración mínima del analito en una muestra, que puede ser detectada, sin confundirse con el ruido del sistema.

**Tolerancia.** Es la capacidad del método analítico para obtener resultados precisos y exactos ante variaciones pequeñas pero deliberadas, en sus parámetros y condiciones de trabajo, indicando confiabilidad durante su uso normal.<sup>5</sup>



---

# PARTE EXPERIMENTAL





---

### **3. PARTE EXPERIMENTAL**

#### **3.1 OBJETIVOS**

- ❖ Determinar y evaluar las propiedades fisicoquímicas de los nuevos fármacos anticancerígenos (Casiopéinas IIgly y III-i ) por medio de las técnicas instrumentales utilizadas en la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, (Espectroscopia UV-VIS, Espectroscopia de Infrarrojo, Análisis térmico diferencial, Calorimetría diferencial de barrido, y Termo gravimetría, Cromatografía Líquida de Alta Resolución ( CLAR ), para identificar y caracterizar estos compuestos.
  
- ❖ Validar un método analítico por Cromatografía líquida de alta resolución (CLAR), para identificación de Casiopéina IIgly y Casiopéina III-i.



### **3.2 Pruebas realizadas.**

Se estudiaron lotes de las siguientes materias primas: Casiopeína IIgly y Casiopeína III-i. Las pruebas fisicoquímicas que se realizaron en cada lote de materia prima fueron las siguientes:

#### **Descripción de la sustancia de referencia.**

- ❖ Descripción de la sustancia de referencia: Casiopeína IIgly y Casiopeína III-i.

#### **Pruebas Reológicas (NO farmacopeicas)**

- ❖ Densidad aparente
- ❖ Densidad real
- ❖ Velocidad de flujo
- ❖ Tamaño de partícula

#### **Ensayos de Identidad**

- ❖ Espectroscopia UV-VISIBLE
- ❖ Espectroscopia Infrarrojo
- ❖ Análisis Térmico Diferencial (DTA)
- ❖ Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)
- ❖ Termo gravimetría (TG)

#### **Validación del método analítico por CLAR**

- ❖ Cromatografía Líquida de Alta Resolución ( CLAR ).





### 3.2.1 Materias primas

- ❖ Casiopeína IIgly, lote 02MRG3101024f, sintetizada en la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, con certificado de pureza de acuerdo al análisis elemental.
- ❖ Casiopeína III-i, lote 33MRG050402 , sintetizada en la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, con certificado de pureza de acuerdo al análisis elemental.

**Precauciones:** Se debe tener cuidado especial al manejarlo ya que es tóxico; evitar el contacto directo con la piel, así como inhalar el polvo contenido en su envase. Todas las operaciones relacionadas con el análisis deben efectuarse en una campana de extracción restringiendo el acceso a personal ajeno. Los guantes y mascarillas utilizados al realizar las pruebas deben incinerarse igual que los desechos del análisis. (Según Cis-platino, FEUM Séptima Edición)

### 3.3 Pruebas reológicas (no farmacopeicas)

#### 3.3.1 Densidad aparente y real

Equipo y Material:

- Balanza Analítica SARTORIUS Modelo A 210 P, No de Serie 40040065
- Cronómetro
- Pinza con tres dedos con nuez para soporte
- Probeta graduada de 25 mL
- Soporte Universal

Estas pruebas se realizaron de la siguiente manera:



### **Densidad Aparente.**

A.- Pesar 3 gramos de principio activo (polvo) y depositarlo en una probeta graduada de 25 mL.

B.- Leer el volumen ocupado por el polvo.

Cálculos:  $Densidad\ Aparente = Masa\ (g) / Volumen\ ocupado\ por\ el\ polvo\ (mL)$

### **Densidad Real.**

A.- Pesar 3 gramos de principio activo (polvo), y depositarlo en una probeta graduada de 25 mL. En un soporte universal, sujetar la probeta con las pinzas.

B.- Dejar caer la probeta desde una altura de 5 cm, 100 veces.

C.- Leer el volumen ocupado por el polvo.

Cálculos:  $Densidad\ Real = Masa\ (g) / Volumen\ ocupado\ por\ el\ polvo\ (mL)$

### **3.3.2 Velocidad de Flujo.**

Equipo y Material:

- ❖ Balanza Analítica SARTORIUS Modelo A 210 P, No de Serie 40040065
- ❖ Cronómetro
- ❖ Soporte Universal
- ❖ Pinza de tres dedos con nuez para soporte
- ❖ Embudo de vidrio de tallo corto (1.1 cm de diámetro)
- ❖ Vidrio de reloj
- ❖ Espátula de Cromo-Níquel

### **Procedimiento experimental**

A.- En un soporte universal sujetar el embudo con las pinzas de tres dedos, el embudo deberá estar a una distancia de 10 cm ( medidos con regla convencional ), con respecto a la base del soporte universal.





B.- Pesar 3 gramos del principio activo (polvo), y colocarlo en el embudo.

C.- Medir el tiempo que tarda el polvo en pasar a través del embudo.

Cálculos: Velocidad de Flujo Masa (g) / Tiempo (seg)

### 3.3.3 Tamaño de partícula.

Equipo y Material:

- ◆ Micrómetro Ocular American Optical company 2mm Div, into units of 0.01mm.
- ◆ Microscopio OLIMPUS BH-2
- ◆ Ocular Micrométrico WILD Heerbrugg 6X
- ◆ Portaobjetos
- ◆ Espátula de Cromo-Níquel

### ***Procedimiento experimental***

Calibración: el microscopio OLIMPUS BH, se calibra con la ayuda de un ocular micrométrico de 0.01mm en cada uno de los objetivos a utilizar 10X y 60X.

En un portaobjetos se coloca una pequeña cantidad de muestra, la cual se divide en diez secciones, midiendo en cada sección diez partículas, (teniendo un total de 100 partículas medidas para cada uno de los compuestos, para el posterior análisis estadístico).

Las materias primas (Casiopéina IIgly y Casiopéina III-i), fueron evaluadas en la Facultad de Química, en el laboratorio de Inmunología.

### **3.4 Espectroscopia UV-Visible.**

***Equipo y Material:***

- ❖ Balanza analítica Sartorius, modelo: A210P, No. de serie 40040065.
- ❖ Espectrofotómetro UV/Visible Shimadzu, modelo: UV-1601, No. de serie 62121.
- ❖ Celdas de Cuarzo de 1cm diámetro interno.
- ❖ Desionizador Milli-Q Water System, Millipore No. 01395-C, Millipore Corporation.



- ❖ Disolventes: Metanol, agua.
- ❖ Espátula de Cromo-Níquel.
- ❖ Matraz Aforado de 5 y 10 mL.
- ❖ Potenciómetro Orion Research, modelo: 301, análogo S/n 46562.
- ❖ Probeta graduada de 100 mL.
- ❖ Tubos de ensayo.
- ❖ Vaso de pp. 250 mL
- ❖ Vaso de pp. 50 mL

### ***Preparación de soluciones***

Solución Patrón de casiopeína IIgly (1000 µg/mL).

Pesar 0.0050 g de casiopeína IIgly, disolver con la solución Metanol:H<sub>2</sub>O, 1:1, transferir a un matraz volumétrico de 5 mL aforar con la solución de Metanol:H<sub>2</sub>O, 1:1. La concentración así obtenida es de 10 µg /mL.

Solución de Casiopeína IIgly (10 µg /mL).

De la solución Patrón de Casiopeína IIgly(1000 µg/mL), tomar una alícuota de 50 µL, transferir a un matraz volumétrico de 5 mL, llevar al aforo con una solución Metanol:H<sub>2</sub>O, 1:1. La concentración así obtenida es de 10 µg/mL.

Solución de Casiopeína IIgly (7 µg /mL).

De la solución Patrón de Casiopeína IIgly(1000 µg/mL), tomar una alícuota de 35 µL, transferir a un matraz volumétrico de 5 mL, llevar al aforo con una solución Metanol:H<sub>2</sub>O, 1:1. La concentración así obtenida es de 7 µg/mL.





Solución Patrón de casiopeína III-i (1000  $\mu\text{g/mL}$ ).

Pesar 0.005 g de casiopeína III-i, disolver con  $\text{H}_2\text{O}$ , transferir a un matraz volumétrico de 5 mL aforar con  $\text{H}_2\text{O}$ . La concentración así obtenida es de 1000  $\mu\text{g/mL}$ .

Solución de Casiopeína III-i (5  $\mu\text{g/mL}$ ).

De la solución Patrón de Casiopeína III-i(1000  $\mu\text{g/mL}$ ), tomar una alícuota de 25  $\mu\text{L}$ , transferir a un matraz volumétrico de 5 mL, llevar al aforo con  $\text{H}_2\text{O}$ . La concentración así obtenida es de 5  $\mu\text{g/mL}$ .

Solución de Casiopeína III-i (7  $\mu\text{g/mL}$ ).

De la solución Patrón de Casiopeína III-i (1000  $\mu\text{g/mL}$ ), tomar una alícuota de 35  $\mu\text{L}$ , transferir a un matraz volumétrico de 5 mL, llevar al aforo con  $\text{H}_2\text{O}$ . La concentración así obtenida es de 7  $\mu\text{g/mL}$ .

### ***Procedimiento experimental***

Se prepara una solución de 10  $\mu\text{g/mL}$  de Casiopeína ( IIgly y III-i ), la cual se coloca en una celda de cuarzo que se introduce al espectrofotómetro de UV-Visible (previamente calibrado), se realiza un barrido espectral a lo largo de la región comprendida entre 190-400nm, para determinar el o los máximos de absorción del compuesto. Después de realizar el barrido espectral se obtiene el pico de detección, detección del valle, y el espectrograma del compuesto analizado por medio de un integrador electrónico.

### **3.5 Espectroscopia de infrarrojo.**

#### **Equipo:**

Espectrómetro de infrarrojo Perkin Helmer

Las materias primas (Casiopeína IIgly y Casiopeína III-i) fueron enviadas a la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Química, en el laboratorio de Espectroscopia, donde fueron analizadas.





### **3.6 Análisis Térmico (Calorimetría Diferencial de Barrido(DSC).**

#### **Equipo y Material:**

- ❖ Balanza Analítica AG 245.
- ❖ Mettler Toledo DSC 821<sup>e</sup>, acoplado a un sistema de enfriamiento, con un programa Star<sup>e</sup>, el cual incluye un programa de análisis de datos.
- ❖ Crisoles de Aluminio con tapa de 40  $\mu$ L de capacidad, con orificio en el centro.

#### **Estándares:**

|            |                          |
|------------|--------------------------|
| Indio (In) | Punto de fusión 156.6 °C |
| Zinc (Zn)  | Punto de fusión 419.5 °C |

#### ***Calibración del calorímetro diferencial de barrido***

La calibración del Mettler Toledo DSC se llevó a cabo con estándares de referencia puros (orgánicos o inorgánicos), usando las mismas condiciones de trabajo en calibración y en la muestra que se va a estudiar ( una tasa de calentamiento de 20 °C/min, en atmósfera de nitrógeno).

La calibración se realizó por tres diferentes métodos:

- 1.- Calibración por temperatura: Se realiza esta calibración para asegurar la precisión del equipo, la cual se encuentra reportada en grados centígrados.
- 2.- Calibración por flujo de calor: Se lleva a cabo para asegurar la precisión en la medición de la Entalpía.
- 3.- Calibración Tau Lag: Esta calibración asegura la medición bajo condiciones variables, ejemplo: rapidez de calentamiento, tipo de cápsula y tipo de gas.

#### ***Procedimiento experimental***

Los estudios de análisis térmico se realizan en un mismo equipo (Mettler Toledo DSC), se obtiene una línea base horizontal (sin ruidos), posteriormente se calibra con cada uno





de los estándares, a una tasa de calentamiento de 20 °C/ min, en atmósfera de nitrógeno, con un flujo de 10 mL/ min en un intervalo de temperatura de 25 °C a 500 °C, la muestra se coloca en el porta muestras y se introduce al equipo para realizar el análisis, se obtienen los termo gramas por medio de un programa de análisis de datos acoplado al equipo.

### 3.6.1 Análisis Termogravimétrico (Thermogravimetric Analysis: TG)

#### 3.6.2 Equipo y Material para TG

- ❖ Mettler Toledo DSC 821<sup>e</sup>, acoplado a un sistema de enfriamiento, con un programa Star<sup>e</sup>, el cual incluye un programa de análisis de datos.
- ❖ Termo balanza Mettler Toledo Modelo 851<sup>e</sup>, con enfriador y sistema simultaneo de DTA, cuenta con un programa STAR<sup>e</sup>, incluyendo análisis de datos.
- ❖ Crisoles de aluminio de 70 µL de capacidad sin tapa.

Estándares:

|            |                          |
|------------|--------------------------|
| Indio (In) | Punto de fusión 156.6 °C |
| Zinc (Zn)  | Punto de fusión 419.5 °C |

#### 3.6.3 Condiciones de trabajo

Flujo del disolvente metanol: 10mL/min.

Atmósfera de Nitrógeno inerte 10 mL/min.

Tamaño de muestra 1.0 mg

Tiempo de análisis: 30 min.



### **3.6.4 Calibración del calorímetro diferencial de barrido ( TG ).**

La calibración del Mettler Toledo DSC se llevó a cabo con estándares de referencia puros (orgánicos o inorgánicos), dependiendo del tipo de estudio que se vaya a llevar a cabo, usando las mismas condiciones de trabajo en calibración y en la muestra que se va a estudiar, ( una tasa de calentamiento de 20 °C/ min, en atmósfera de nitrógeno, con un flujo de 10 mL/ min en un intervalo de temperatura de 25 °C a 500 °C.

La calibración se realizó por tres diferentes métodos:

- 1.- Calibración por temperatura: Se realiza esta calibración para asegurar la precisión del equipo, la cual se encuentra reportada en grados centígrados.
- 2.- Calibración por flujo de calor: Se lleva a cabo para asegurar la precisión en la medición de la Entalpía.
- 3.- Calibración Tau Lag: Esta calibración asegura la medición bajo condiciones variables, ejemplo: rapidez de calentamiento, tipo de cápsula y tipo de gas.

### **3.6.5 Procedimiento experimental (TG)**

Primero se realiza la calibración de la Termo balanza, una vez calibrada la Termo balanza se coloca la cápsula de alúmina sobre el soporte y se tara el peso.

Se coloca la muestra en la cápsula con peso aproximado de 5 mg y se procede a calentar a 20 °C/ min, en atmósfera de nitrógeno con un flujo de 10 mL/ min en un intervalo de temperatura ambiental de 25 °C a 500 °C.

Se analizan los datos de la curva de calentamiento, se determina su primera derivada y se obtiene la curva de DTA.





## 3.7 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

### 3.7.1. VALIDACION DEL METODO ANALITICO PARA CUANTIFICAR CASIOPEINA

#### Ilgly Y CASIOPEINA III-i EN MATERIA PRIMA

##### **3.7.1.1 Estándares para cuantificación en HPLC**

Casiopeína Ilgly, lote 152MEB100230, sintetizada en la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, Departamento de Química Inorgánica.

Casiopeína III-i, lote 33MRG050402, sintetizada en la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, Departamento de Química Inorgánica.

Solución A Cu 4,4´dimetil/metanol(Casiopeína III-i), sintetizada en la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Solución B Cu acetilacetato/metanol(Casiopeína III-i), sintetizada en la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Solución A Cu 4,7dimetil-1-10-fenantrolina(Casiopeína Ilgly), sintetizada en la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Solución B Cu (glicina)NO<sub>3</sub>(Casiopeína Ilgly), sintetizada en la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Ketorolaco Trometamina, Roche Sintex S.A de C.V estándar de trabajo lote: CC00050001, ensayo: 100.2%

Furosemida: Lote Wu, estándar de trabajo, potencia:99.24%

##### **3.7.1.2 Reactivos.**

Metanol, grado HPLC, TecnoLab, Lote 23584HF

Fosfato monobásico, reactivo Baker, Lote: K15460.

Fosfato dibásico, reactivo Baker, Lote: H05461

Hexansulfonato de Sodio, grado HPLC, Lote: P135-27-2.





---

Agua desionizada, grado Millipore, 18 Mega Homs-cm.

Solución reguladora(biftalato) pH=4 lote VA9001.R.A.J.T Baker

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

Solución reguladora(borato) pH=10 lote X19C13.R.A.J.T Baker

### **3.7.1.3 Equipo.**

Cromatógrafo de líquidos de alta resolución Shimadzu:

Auto inyector modelo: SIL 10ADVP, Loop de 50  $\mu$ L, cat. No. 228-39005-92, No. de serie C2105360009US.

Balanza analítica Sartorius, modelo: A210P, No. de serie 40040065.

Baño María Imperial Bath, Lab-Line, modelo: 18000, No. de serie 06090-0432.

Bomba isocrática modelo: LC 10 ADVP, cat. No. 228-39000-92, No. de serie C2096365042US.

Congelador Lab-Line, Frigid-Cab, cat. No. 3552, temperatura  $-20^{\circ}\text{C}$ , No. de serie 194-004

Desionizador Milli-Q Water System, Millipore No. 01395-C, Millipore Corporation.

Detector UV/Visible, modelo: SPD 10 AVP, cat. No. 228-393000-92, No. de serie C2099350103KG.

Espectrofotómetro UV/Visible, Shimadzu, modelo: UV-1601, No. de serie 62121.

Potenciómetro Orion Research, modelo: 301, análogo S/n 46562.

Sistema controlador modelo: SCL 10 AVP, cat. No. 228-34350-92, No. de serie C21013650227US.

Vortex Maxi Mix II, Thermolyne, modelo: M37615, No. de serie 871990647059.

### **3.7.1.4. Software.**

Shimadzu Class-Vp, version 5.2, Chromatography Laboratory Automated Software System, Shimadzu Corporation (1999).





### 3.7.1.5. Preparación de soluciones(Casiopeína Ilgly).

A. Fase móvil Metanol/ H<sub>2</sub>O/Acetonitrilo (72.5:24:3.5) v/v, pH = 3.0 con ácido fosfórico.

Filtrar y medir 290 mL de metanol grado HPLC con filtros de membrana de 0.45 µm de tamaño de poro, adicionar 96 mL de agua desionizada, agregar 14 mL de Acetonitrilo, mezclar y ajustar el pH de la mezcla a 3.0 con ácido fosfórico.

B. Solución de Ketorolaco 100 µg/mL, en fase móvil (estándar interno).

Pesar 0.0050 g de Ketorolaco (estándar de referencia), disolver con la solución de Metanol:H<sub>2</sub>O, 1:1, transferir a un matraz volumétrico de 5 mL, llevar al aforo con la misma solución de Metanol:H<sub>2</sub>O,1:1, de la solución anterior (1000 µg/mL), tomar 5mL, transferir a un matraz volumétrico de 50 mL, llevar al aforo con una solución Metanol:H<sub>2</sub>O, 1:1. La concentración así obtenida es de 100 µg/mL.

C. Solución Patrón de casiopeína Ilgly (1000 µg/mL).

Pesar 0.005 g de casiopeína Ilgly, disolver con la solución Metanol:H<sub>2</sub>O, 1:1, transferir a un matraz volumétrico de 5 mL aforar con la solución de Metanol:H<sub>2</sub>O, 1:1. La concentración así obtenida es de 1000 µg /mL.

D. Curva de calibración, casiopeína Ilgly.

De la solución Patrón de casiopeína Ilgly (1000 µg/mL), se realizan diluciones tomando las alícuotas correspondientes para obtener las diferentes concentraciones de la curva de calibración (10,30, 50, 70 y 100 µg /mL).

Tomar 50 µL de la solución de 1000 µg/mL del Patrón de casiopeína Ilgly, llevar a un matraz volumétrico de 5 mL, aforar con la solución Metanol:H<sub>2</sub>O, 1:1, para obtener una concentración de 10 µg/mL de casiopeína Ilgly.



---

Tomar 150  $\mu\text{L}$  de la solución de 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  del Patrón de casiopeína Igly, llevar a un matraz volumétrico de 5 mL, aforar con la solución Metanol: $\text{H}_2\text{O}$ , 1:1, para obtener una concentración de 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de casiopeína Igly.

Tomar 250  $\mu\text{L}$  de la solución de 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  del Patrón de casiopeína Igly, llevar a un matraz volumétrico de 5 mL, aforar con la solución Metanol: $\text{H}_2\text{O}$ , 1:1, para obtener una concentración de 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de casiopeína Igly.

Tomar 350  $\mu\text{L}$  de la solución de 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  del Patrón de casiopeína Igly, llevar a un matraz volumétrico de 5 mL, aforar con la solución Metanol: $\text{H}_2\text{O}$ , 1:1, para obtener una concentración de 70  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de casiopeína Igly.

Tomar 500  $\mu\text{L}$  de la solución de 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  del Patrón de casiopeína Igly, llevar a un matraz volumétrico de 5 mL, aforar con la solución Metanol: $\text{H}_2\text{O}$ , 1:1, para obtener una concentración de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de casiopeína Igly.

E. Soluciones para la preparación de las muestras de control de calidad. (Puntos control).

Concentración alta (40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

Tomar 200  $\mu\text{L}$  de la solución Patrón de casiopeína Igly, llevar a un matraz volumétrico de 5 mL y aforar con la solución de Metanol: $\text{H}_2\text{O}$ , 1:1, para obtener una concentración de 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

Concentración media (60  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

Tomar 300  $\mu\text{L}$  de la solución Patrón de casiopeína Igly, llevar a un matraz volumétrico de 5 mL y aforar con la solución de Metanol: $\text{H}_2\text{O}$ , 1:1, para obtener una concentración de 60  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

Concentración baja (90  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

Tomar 450  $\mu\text{L}$  de la solución Patrón de casiopeína Igly, llevar a un matraz volumétrico de 5 mL y aforar con la solución de Metanol: $\text{H}_2\text{O}$ , 1:1, para obtener una concentración de 90  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .





### **Preparación de soluciones (Casiopéina III-i).**

F. Fase móvil Metanol/Fosfatos/Hexansulfonato de Sodio v/v, pH = 6.9

Filtrar y medir 160 mL de metanol grado HPLC con filtros de membrana de 0.45  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro, adicionar 220 mL de Solución de fosfatos 0.01M, pH = 7.0, agregar 20 mL de Hexansulfonato de Sodio 0.005M, mezclar, el pH de la mezcla es de 6.9

G. Solución de Hexansulfonato de Sodio 0.005 M

Pesar 0.094 g de Hexansulfonato de Sodio, disolver con agua desionizada, transferir a un matraz volumétrico de 100 mL, y aforar con agua desionizada.

H. Solución de Furosemida 5  $\mu\text{g/mL}$ , en fase móvil (estándar interno).

Pesar 0.005 g de Furosemida (estándar de referencia), disolver con  $\text{H}_2\text{O}$  desionizada, transferir a un matraz volumétrico de 5 mL, llevar al aforo con  $\text{H}_2\text{O}$  desionizada, de la solución anterior(1000  $\mu\text{g/mL}$ ), tomar una alícuota de 125  $\mu\text{L}$ , transferir a un matraz volumétrico de 5 mL, llevar al aforo con  $\text{H}_2\text{O}$ . La concentración así obtenida es de 5  $\mu\text{g/mL}$ .

I. Solución Patrón de casiopéina III-i (1000  $\mu\text{g/mL}$ ).

Pesar 0.005 g de casiopéina IIgly, disolver con  $\text{H}_2\text{O}$ , transferir a un matraz volumétrico de 5 mL aforar con  $\text{H}_2\text{O}$ . La concentración así obtenida es de 1000  $\mu\text{g/mL}$ .

J. Curva de calibración, casiopéina III-i.

De la solución Patrón de casiopéina III-i (1000  $\mu\text{g/mL}$ ), se realizan diluciones tomando las alícuotas correspondientes para obtener las diferentes concentraciones de la curva de calibración (20, 25,30,35, y 40  $\mu\text{g/mL}$ ).



Tomar 100  $\mu\text{L}$  de la solución de 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  del Patrón de casiopeína III-i, llevar a un matraz volumétrico de 5 mL, aforar con  $\text{H}_2\text{O}$ , para obtener una concentración de 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de casiopeína III-i.

Tomar 125  $\mu\text{L}$  de la solución de 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  del Patrón de casiopeína III-i, llevar a un matraz volumétrico de 5 mL, aforar con  $\text{H}_2\text{O}$ , para obtener una concentración de 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de casiopeína III-i.

Tomar 150  $\mu\text{L}$  de la solución de 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  del Patrón de casiopeína III-i, llevar a un matraz volumétrico de 5 mL, aforar con  $\text{H}_2\text{O}$ , para obtener una concentración de 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de casiopeína III-i.

Tomar 175  $\mu\text{L}$  de la solución de 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  del Patrón de casiopeína III-i, llevar a un matraz volumétrico de 5 mL, aforar con  $\text{H}_2\text{O}$ , para obtener una concentración de 35  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de casiopeína III-i.

Tomar 200  $\mu\text{L}$  de la solución de 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  del Patrón de casiopeína III-i, llevar a un matraz volumétrico de 5 mL, aforar con  $\text{H}_2\text{O}$ , para obtener una concentración de 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de casiopeína III-i.

K. Soluciones para la preparación de las muestras de control de calidad. (Puntos control).

Concentración alta (22  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

Tomar 110  $\mu\text{L}$  de la solución Patrón de casiopeína III-i (1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), llevar a un matraz volumétrico de 5 mL y aforar con  $\text{H}_2\text{O}$ , para obtener una concentración de 22  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

Concentración media (28  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

Tomar 140  $\mu\text{L}$  de la solución Patrón de casiopeína III-i (1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), llevar a un matraz volumétrico de 5 mL y aforar con  $\text{H}_2\text{O}$ , para obtener una concentración de 28  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

Concentración baja (38  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

Tomar 190  $\mu\text{L}$  de la solución Patrón de casiopeína III-i (1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), llevar a un matraz volumétrico de 5 mL y aforar con  $\text{H}_2\text{O}$ , para obtener una concentración de 38  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .





### 3.7.1.6. Condiciones Cromatográficas.

#### **Casiopeína Igly.**

- ❖ Cromatógrafo de líquidos de alta resolución Shimadzu:
- ❖ Bomba: LC 10 ADVP.
- ❖ Autoinyector: SIL 10ADVP.
- ❖ -Detector: UV/Visible SPD 10 AVP.
- ❖ Sistema control: SCL 10 AVP.
- ❖ -Software: Shimadzu Class VP version 5.2.
- ❖ Fase móvil: Metanol/H<sub>2</sub>O/Acetonitrilo v/v, pH = 3.0 con ácido fosfórico.
- ❖ Flujo de corrida: 0.7 mL/min.
- ❖ Longitud de onda: 254 nm.
- ❖ Columna analítica: Phenomenex Luna C18, 5 µm, 250 x 4.6 mm, 17.8+0.70 Symmetry, %C 18.82-20.18
- ❖ Tiempo de corrida: 11 minutos.
- ❖ Temperatura: ambiente (20 – 25 °C).

#### **Casiopeína III-i.**

- ❖ Cromatógrafo de líquidos de alta resolución Shimadzu:
- ❖ Bomba: LC 10 ADVP.
- ❖ Autoinyector: SIL 10ADVP.
- ❖ Detector: UV/Visible SPD 10 AVP.
- ❖ Sistema control: SCL 10 AVP.
- ❖ Software: Shimadzu Class VP version 5.2.
- ❖ Fase móvil: Fase móvil Metanol/Fosfatos/Hexansulfonato de Sodio v/v, pH = 6.9
- ❖ Flujo de corrida: 0.8 mL/min.
- ❖ Longitud de onda: 274 nm.



- ❖ Columna analítica: Thermo Hypersil Keystone C18, 5 $\mu$ m, 250 x 4.6 mm, Batch No. 6206
- ❖ Tiempo de corrida: 12 minutos.
- ❖ Temperatura: ambiente (20 – 25 °C ).

### **3.7.2 VALIDACION DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA CUANTIFICAR CASIOPEINA Ilgly Y CASIOPEINA III-i COMO MATERIA PRIMA.**

Se evaluaron los siguientes parámetros de acuerdo a lo especificado para métodos analíticos en la guía de armonización de Analytical Methods Validation, Guidance for Industry ( Q2A Validation of Analytical, Produces: Methodology, November 1996, ICH : selectividad, linealidad, precisión, exactitud, límite de detección (LOD), límite de cuantificación (LOQ),y tolerancia del método analítico.

#### **3.7.2.1 Validación del sistema/ Casiopeína Ilgly**

**3.7.2.2. Especificidad / Casiopeína Ilgly.** Para la evaluación de la selectividad, se realizó el análisis cromatográfico de la casiopeína Ilgly en solución de fase móvil con el estándar interno (Ketorolaco 50  $\mu$ g/mL) figura 16 y una solución A de [Cu (4,7dimetil-1-10 fenantrolina) en solución figura 17.

Se consideró para la selectividad la solución A de [Cu (4,7dimetil-1-10 fenantrolina) por que es el compuesto que forma durante el proceso de síntesis de Casiopeína Ilgly. El método analítico es selectivo si los cromatogramas obtenidos NO presentan ninguna señal que puedan causar alguna interferencia en los tiempos de retención correspondientes a la Casiopeína Ilgly y el Ketorolaco.





---

**3.7.2.3. Linealidad del sistema/ Casiopeína Ilgly.** - Se prepararon 3 curvas de calibración con al menos cinco diluciones preparadas a partir de una misma solución patrón ( 10, 30, 50, 70, 100  $\mu\text{g/mL}$ ) haciendo el análisis cuando menos por duplicado para cada dilución, en un día de trabajo. La curva se evaluó en un rango de 10 a 100  $\mu\text{g/mL}$  de casiopeína Ilgly, en solución con fase móvil, con el estándar interno de Ketorolaco (50  $\mu\text{g/mL}$ ), y se reporta la relación de alturas entre la casiopeína Ilgly y el Ketorolaco, (Tabla 4).

Para evaluar este parámetro se considera el coeficiente de correlación ( $r$ ) $\geq 0.99$ , coeficiente de determinación ( $r^2$ ), pendiente (m), ordenada al origen (b), y el coeficiente de variación global (CV) $< 2.0$

#### **3.7.2.4. Precisión del sistema/ Casiopeína Ilgly.**

**Repetibilidad/ Casiopeína Ilgly.** Se determinó en un mismo día con el análisis por cuadruplicado de un mínimo de tres concentraciones conocidas: alta, media y baja del compuesto Casiopeína Ilgly en solución. Estas concentraciones deben ser diferentes a las de la curva de calibración, pero deben incluirse en el intervalo. Se determino el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación (%CV) el cual no debe ser mayor al 2.0%.

En este caso los niveles de concentración seleccionados dentro la curva de calibración son: ( 40, 60 y 90  $\mu\text{g/mL}$ ),de Casiopeína Ilgly en solución, (Tablas 5 y 6).

**3.7.2.5. Reproducibilidad/ Casiopeína Ilgly.** Se determinó con base en los resultados de repetibilidad de los puntos control alto, medio y bajo de compuesto, realizándose el análisis de las repeticiones de ambos días para obtener un CV $< 2.0\%$  global y evaluar de este modo la reproducibilidad del sistema. (Tabla 7)



---

**3.7.2.6 Exactitud del sistema/ Casiopeína Ilgly-** Con base en los resultados de repetibilidad y reproducibilidad del sistema, se calculó la concentración, para cada uno de los puntos control, en función al valor nominal de cada concentración, por medio de la fórmula:

$(\text{Concentración real} - \text{Concentración experimental} / \text{Concentración real}) * 100$

El valor obtenido se interpola en la curva de calibración (que se corrió el mismo día del análisis), se compara el valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia, ambos resultados deben presentar concordancia según lo especificado en la guía de validación para métodos analíticos Q2A Noviembre 1996, ICH. El CV debe ser <2%.

**3.7.2.7. Límite de detección (LOD)/Casiopeína Ilgly.** Se preparó una serie de 5 blancos ( agua + estándar de Ketorolaco 50 µg/mL) se inyectan al equipo cromatográfico, en el cromato grama que se obtuvo con ayuda del software, se amplió la escala en la zona del tiempo de retención donde aparece la casiopeína III-i y con ayuda de la fórmula  $LOD = 3.3r$  se determina el límite de detección.

**3.7.2.8 Límite de cuantificación (LOQ)/Casiopeína Ilgly** Se preparó una serie de 5 blancos ( 500 µL agua + estándar de Ketorolaco 50 µg/mL ) se inyectan al equipo cromatográfico, en el cromato grama que se obtuvo con ayuda del software, se amplió la escala en la zona del tiempo de retención donde aparecía la casiopeína Ilgly y con ayuda de la fórmula  $LOQ = 10r$  se determinó el límite de cuantificación.

### **3.7.3 Validación del sistema/ Casiopeína III-i**

**3.7.3.1. Especificidad / Casiopeína III-i** .-Para la evaluación de la especificidad, se realizó el análisis cromatográfico de la casiopeína III-i (30 µg/mL) en solución de fase móvil con el estándar interno (Furosemda 2.5 µg/mL).



Se consideró para la especificidad, la solución A de [4-4 dimetil por que este compuesto se forman durante el proceso de síntesis de Casiopeína III-i.

El método analítico es específico si los cromato gramas obtenidos NO presentan ninguna señal que puedan causar alguna interferencia en los tiempos de retención correspondientes a la Casiopeína III-i y la Furosemida.

### **3.7.3.2. Linealidad del sistema/ Casiopeína III-i –**

Se realizó con el análisis de 3 curvas de calibración con al menos cinco diluciones preparadas a partir de una misma solución estándar ( 20, 25, 30, 35, y 40  $\mu\text{g/mL}$ ) y haciendo el análisis cuando menos por duplicado para cada dilución, en un día de trabajo.

La curva se evaluó en un rango de 20 a 40  $\mu\text{g/mL}$  de casiopeína III-i, en solución con fase móvil, con el estándar interno de Furosemida (2.5  $\mu\text{g/mL}$ ), y se reportó la relación de alturas entre la casiopeína III-i y la Furosemida( tabla 10).

Para evaluar este parámetro se consideró el coeficiente de correlación ( $r$ ) $\geq 0.99$ , coeficiente de determinación ( $r^2$ ), pendiente (m), ordenada al origen (b), y el coeficiente de variación global (CV) $< 2.0$

### **3.7.3.3. Precisión del sistema/ Casiopeína III-i**

**Repetibilidad.-** Se determinó en un mismo día con el análisis por cuadruplicado de un mínimo de tres concentraciones conocidas: alta, media y baja del compuesto Casiopeína III-i en solución. Estas concentraciones deben ser diferentes a las de la curva de calibración, pero deben incluirse en el intervalo. Se determinó el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación(%CV) el cual no debe ser mayor al 2.0%.

En este caso los niveles de concentración seleccionados dentro la curva de calibración son: (22, 28 y 38 $\mu\text{g/mL}$ ),de Casiopeína III-i en solución (Tabla 11 y 12).





**3.7.3.4 Reproducibilidad /Casiopeína III-i** .Se determinó con base en los resultados de repetibilidad de los puntos control alto, medio y bajo de compuesto, realizándose el análisis de las repeticiones de ambos días para obtener un %CV<2.0% global y evaluar de este modo la reproducibilidad del sistema ( Tabla 13 ).

**3.7.3.5. Exactitud del sistema/ Casiopeína III-i** Con base en los resultados de repetibilidad y reproducibilidad del sistema, se calculó la concentración, para cada uno de los puntos controles, en función al valor nominal de cada concentración, por medio de la fórmula:

$(\text{Concentración real} - \text{Concentración experimental} / \text{Concentración real}) * 100$

El valor obtenido se interpoló en la curva de calibración (que se corrió el mismo día del análisis), se compara el valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia, ambos resultados deben presentar concordancia según lo especificado en la guía de validación para métodos analíticos Q2A Noviembre 1996, ICH. El C.V debe ser <2% ( Tabla 14 y 15).

**3.7.3.6 Limite de detección (LOD) /Casiopeína III-i** Se preparó una serie de 5 blancos (agua + estándar de Furosemida 2.5 µg/ mL ) se inyectan al equipo cromatográfico, en el cromatograma que se obtiene con ayuda del software, se realizó una ampliación de la escala en la zona del tiempo de retención donde aparecía la casiopeína III-i y con ayuda de la fórmula  $LOD=3.3r$  se determinó el limite de detección.

**3.7.3.7 Limite de cuantificación (LOQ) /Casiopeína III-i** Se preparó una serie de 5 blancos ( agua + estándar de Furosemida 2.5 µg/ mL ) se inyectan al equipo cromatográfico, en el cromatograma que se obtuvo con ayuda del software, se realizó una ampliación la escala en la zona del tiempo de retención donde aparecía la casiopeína III-i y con ayuda de la fórmula  $LOQ= 10r$  se determinó el LOQ.





# RESULTADOS





#### **4. RESULTADOS.**

##### **4.1. Descripción física del compuesto.**

**Tabla 1 Descripción física del compuesto**

|                  |  |
|------------------|--|
| Casiopeína IIgly | Polvo fino, libre de partículas extrañas, homogéneo,<br>Color azul Turquesa (INTENSO). |
| Casiopeína III-I | Polvo fino, libre de partículas extrañas, homogéneo,<br>Color azul (CLARO).            |

##### **4.2. Pruebas Reológicas**

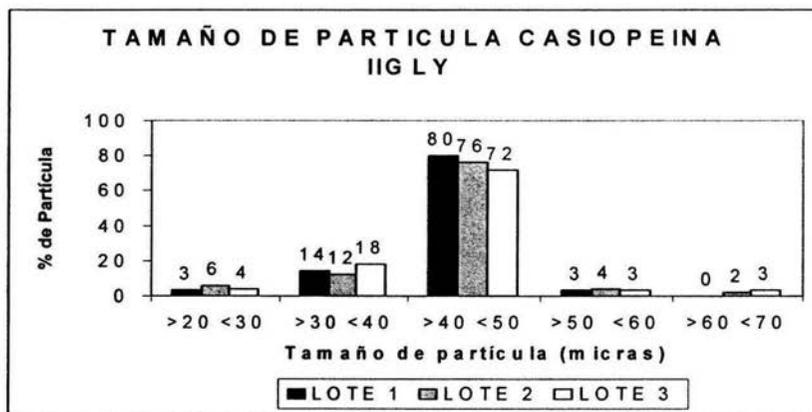
Los resultados obtenidos de las pruebas de densidad real, densidad aparente, tamaño de partícula, velocidad de flujo se muestran en la tabla 2, posteriormente se muestran las gráficas y fotografías del tamaño de partícula.



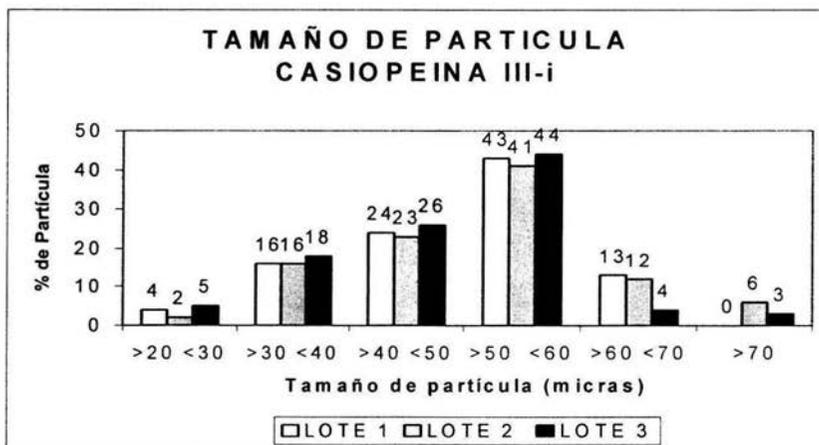


**Tabla 2 Pruebas Reológicas ( no farmacopeicas) de Casiopeínas IIgly y III-i.**

| MATERIA PRIMA             | DENSIDAD APARENTE (g/mL) | DENSIDAD REAL (g/mL) | VELOCIDAD DE FLUJO (g/seg) | TAMAÑO DE PARTICULA (Micras) | TAMAÑO DE PARTICULA (%) |
|---------------------------|--------------------------|----------------------|----------------------------|------------------------------|-------------------------|
| Casiopeína IIgly (Lote A) | 0.425                    | 0.666                | 1.0                        | >20 <30                      | 3                       |
|                           |                          |                      |                            | >30 <40                      | 14                      |
|                           |                          |                      |                            | >40 <50                      | 80                      |
|                           |                          |                      |                            | >50 <60                      | 3                       |
|                           |                          |                      |                            | >60 <70                      | 0                       |
| Casiopeína IIgly (Lote B) | 0.425                    | 0.666                | 1.0                        | >20 <30                      | 6                       |
|                           |                          |                      |                            | >30 <40                      | 12                      |
|                           |                          |                      |                            | >40 <50                      | 76                      |
|                           |                          |                      |                            | >50 <60                      | 4                       |
|                           |                          |                      |                            | >60 <70                      | 2                       |
| Casiopeína IIgly (Lote C) | 0.425                    | 0.666                | 1.0                        | >20 <30                      | 4                       |
|                           |                          |                      |                            | >30 <40                      | 18                      |
|                           |                          |                      |                            | >40 <50                      | 72                      |
|                           |                          |                      |                            | >50 <60                      | 3                       |
|                           |                          |                      |                            | >60 <70                      | 3                       |
| Casiopeína III-i (Lote A) | 0.444                    | 0.666                | 0.8                        | >20 <30                      | 4                       |
|                           |                          |                      |                            | >30 <40                      | 16                      |
|                           |                          |                      |                            | >40 <50                      | 24                      |
|                           |                          |                      |                            | >50 <60                      | 43                      |
|                           |                          |                      |                            | >60 <70                      | 13                      |
| Casiopeína III-i (Lote B) | 0.444                    | 0.666                | 0.8                        | >20 <30                      | 2                       |
|                           |                          |                      |                            | >30 <40                      | 16                      |
|                           |                          |                      |                            | >40 <50                      | 23                      |
|                           |                          |                      |                            | >50 <60                      | 41                      |
|                           |                          |                      |                            | >60 <70                      | 12                      |
| >70                       | 6                        |                      |                            |                              |                         |
| Casiopeína III-i (lote C) | 0.444                    | 0.666                | 0.8                        | >20 <30                      | 5                       |
|                           |                          |                      |                            | >30 <40                      | 18                      |
|                           |                          |                      |                            | >40 <50                      | 26                      |
|                           |                          |                      |                            | >50 <60                      | 44                      |
|                           |                          |                      |                            | >60 <70                      | 4                       |
| >70                       | 3                        |                      |                            |                              |                         |



**Fig.4** Distribución del tamaño de partícula de la Casiopeina Iigly.



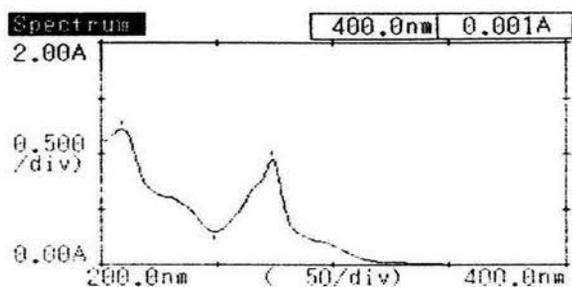
**Fig.5** Distribución del tamaño de partícula de la Casiopeina III-i.



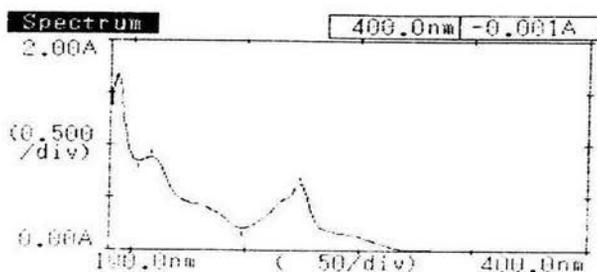


### 4.3 Espectroscopia UV-VIS

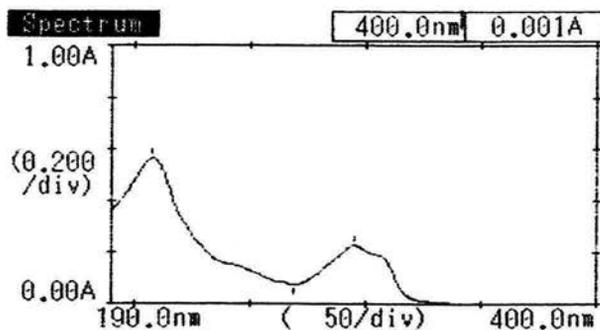
Los Espectrogramas obtenidos como resultado del análisis por medio de espectrometría de UV-VISIBLE para la Casiopeína IIgly y Casiopeína III-i se muestran en las figuras: 6,7,8, y 9.



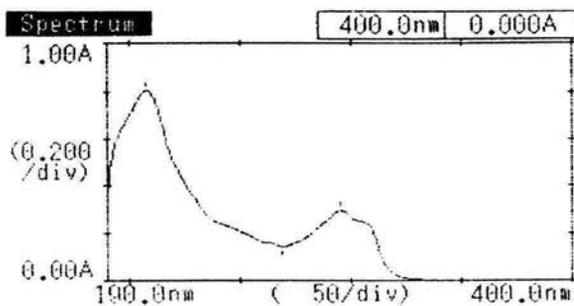
**Fig.6 Espectrograma de Casiopeína IIgly en solución de 10 µg/mL**



**Fig.7 Espectrograma de Casiopeína IIgly en la solución de 7µg/mL**



**Fig.8 Espectrograma de Casiopeína III-i en solución de 5 µg/mL**

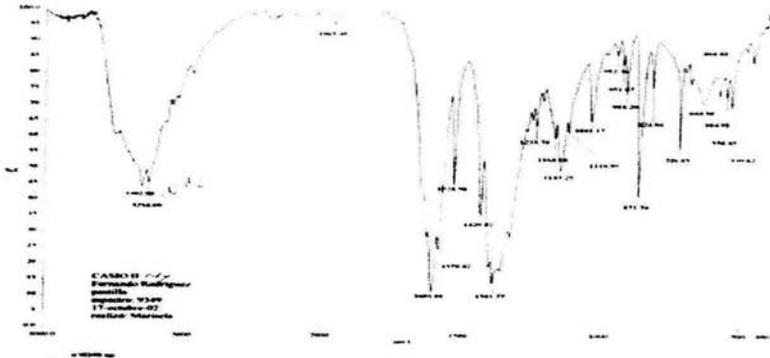


**Fig.9 Espectrograma de Casiopeína III-i en solución de 7 µg/mL**

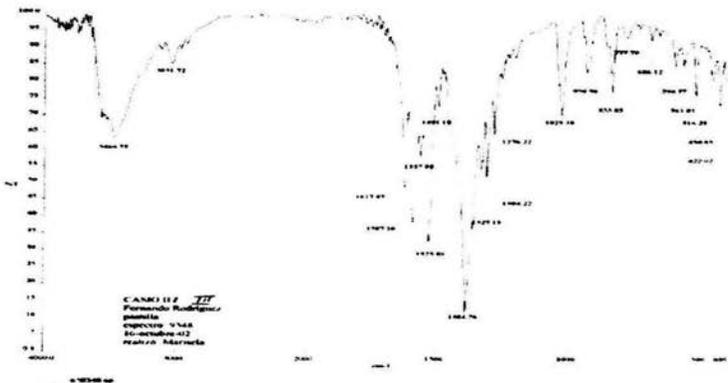


#### **4.4 Espectroscopia de Infrarrojo**

Los Espectrogramas obtenidos como resultado del análisis de IR para la Casiopeína IIgly y Casiopeína III-i se muestran en las figuras 10 y 11.



**Fig.10 Espectrograma de Infrarrojo para casiopeína IIgly**



**Fig.11 Espectrograma de Infrarrojo para casiopeína III-i.**



**4.5 Análisis térmico.** Los Termo gramas obtenidos como resultado del análisis térmico para la Casiopeína IIgly y Casiopeína III-i se muestran en las figuras 12,13,14, y 15.

**Tabla.3 Resultados del Análisis Térmico.**

CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE BARRIDO(DSC)

|                  |  |
|------------------|--|
| CASIOPEINA IIGLY | Presenta una señal en 70 °C<br>Presenta una señal en 261.5 °C  |
| CASIOPEINA III-i | Observan transiciones en 40 y 220 °C<br>Presenta una señal en 100 °C<br>Presenta una señal en 250 °C |

ANALISIS TERMICO DIFERENCIAL(DTA)

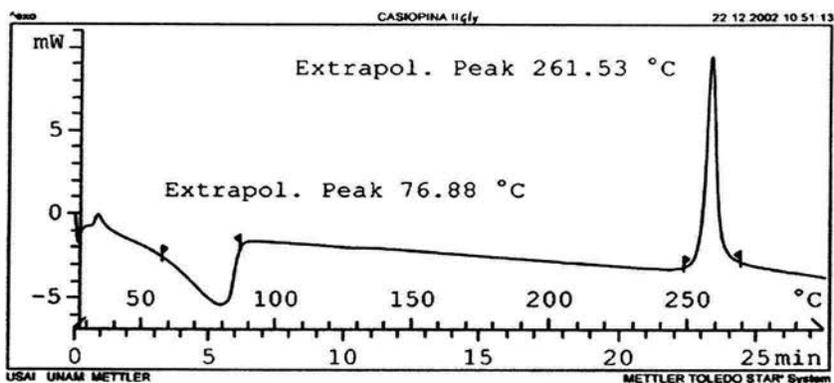
|                  |   |
|------------------|---|
| CASIOPEINA IIgly | Observan transiciones en 40 y 222 °C<br>Presenta una señal en 96 °C<br>Presenta una señal en 250 °C |
| CASIOPEINA III-i | Presenta una señal en 220 °C<br>NO se observan transiciones   |



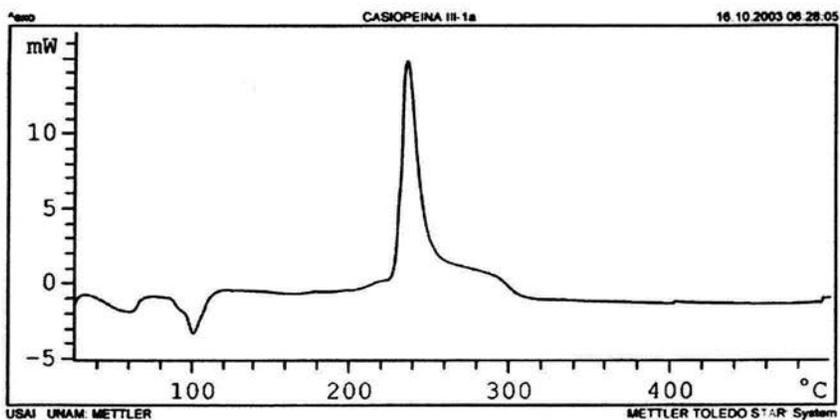
## ANALISIS TERMOGRAVIMETRICO (TGA)

|                  |  |
|------------------|--|
| CASIOPEINA IIgly | <p>Se presenta una pérdida de materia del 0.63% con respecto al 100%, a una temperatura de 70 °C</p> <p>Se presenta una pérdida de materia del 17.11% con respecto al 100%, a una temperatura de 225 °C</p> <p>Se presenta una pérdida de materia del 31.42% con respecto al 100%, a una temperatura de 355 °C</p> |
| CASIOPEINA III-i | <p>Se presenta una pérdida de materia del 1.18% con respecto al 100%, a una temperatura de 60 °C</p> <p>Se presenta una pérdida de materia del 3.09% con respecto al 100%, a una temperatura de 220 °C</p> <p>Se presenta una pérdida de materia del 36.64% con respecto al 100%, a una temperatura de 440 °C</p>  |

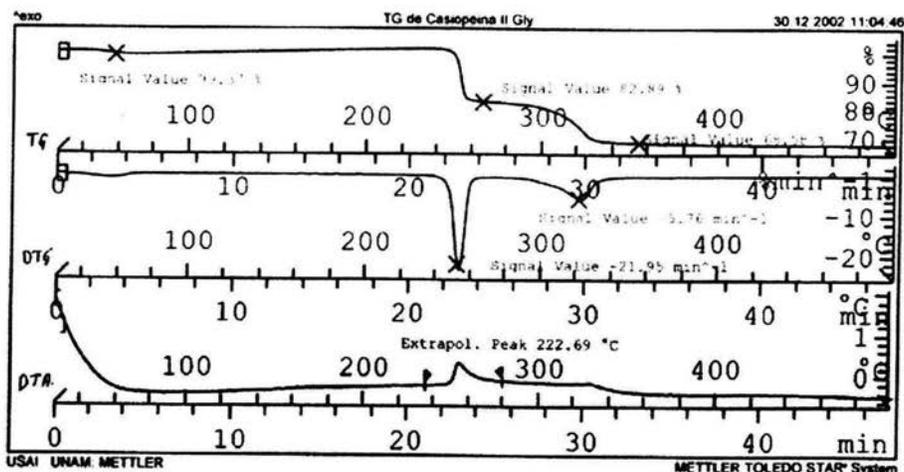




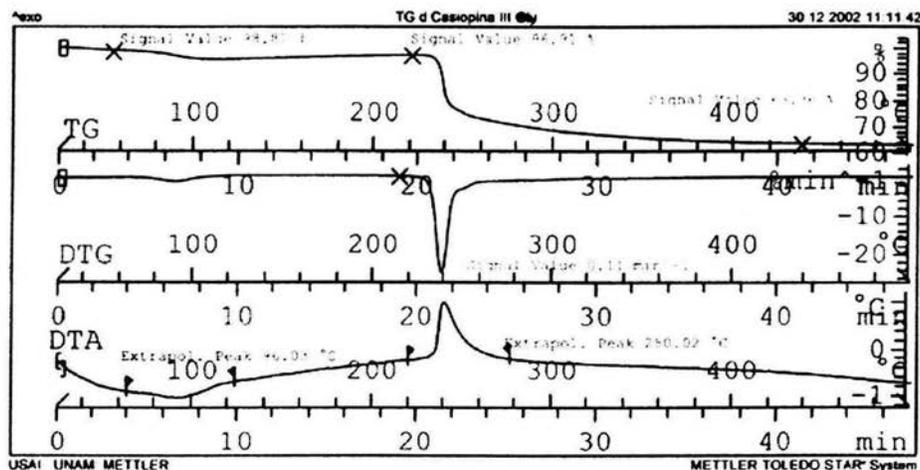
**Fig.12 Calorimetría Diferencial de Barrido Casiopeína II gly**



**Fig.13 Calorimetría Diferencial de Barrido Casiopeína III-i**



**Fig.14 Termo gravimetría, DTG y DTA, para Casiopeína IIgly**



**Fig.15 Termo gravimetría, DTG y DTA, PARA Casiopeína III-i.**





#### **4.6 Método Analítico para Casiopeína Ilgly en materia prima.**

##### **4.6.0 Condiciones cromatográficas de trabajo Casiopeína Ilgly.**

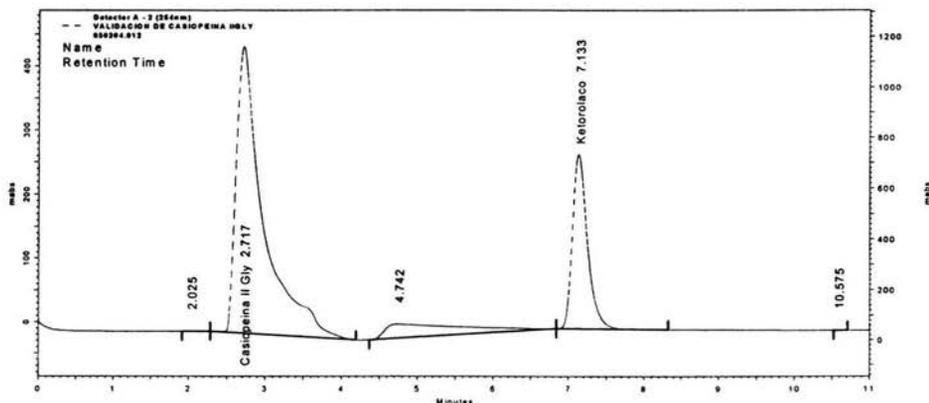
Fase móvil Metanol/ H<sub>2</sub>O/Acetonitrilo (72.5:24:3.5) v/v, pH = 3.0

##### **4.6.1 Especificidad / Casiopeína Ilgly**

La evaluación de la especificidad se presenta en las figuras de los cromatogramas: 16 y 17.

Tiempo de retención de la Casiopeína Ilgly: T.R.= 2.7 minutos.

Tiempo de retención de la Ketorolaco (estándar interno): T.R.= 7.1 minutos.



**Fig.16 Cromatograma de Casiopeína Ilgly en fase móvil, 100µg/mL con estándar interno (Ketorolaco 50µg/mL), Tiempo de retención Casiopeína Ilgly =2.7 min., Tiempo de retención Ketorolaco =7.1 min.**

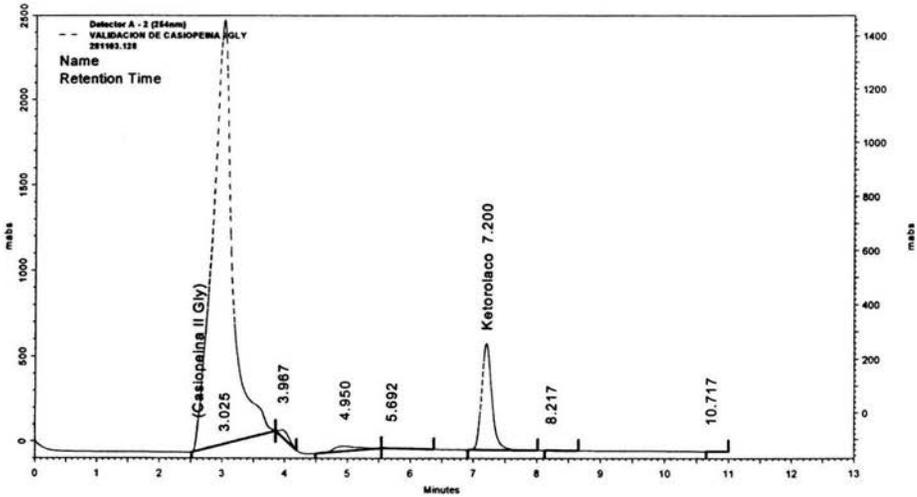


Figura. 17 Blanco  $[\text{Cu}(4,7\text{-dimetil-1,10-fenantrolina})]\text{NO}_3$ , con estándar interno (Ketorolaco 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) en fase móvil. Tiempo de retención  $[\text{Cu}(4,7\text{-dimetil-1,10-fenantrolina})]\text{NO}_3 = 3.02$  min. Tiempo de retención Ketorolaco 7.2 min.

#### 4.6.2 Linealidad del sistema/ Casiopina IIgly.

La Tabla 4 muestra los resultados de la linealidad del sistema para la cuantificación de la Casiopina IIgly en solución.



Tabla 4 Linealidad del sistema para Casiopeína Igly.

| Conc.(µg/mL) | Curva 1<br>*R altura 1 | Curva2<br>*R altura 2 | Curva3<br>*R altura 3 | Promedio<br>*R altura | Desvest | C.V % |
|--------------|------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|---------|-------|
| 10           | 0.1597                 | 0.1563                | 0.1570                | 0.1577                | 0.00182 | 1.15  |
| 30           | 0.6026                 | 0.5952                | 0.5987                | 0.5988                | 0.00371 | 0.61  |
| 50           | 1.1227                 | 1.0742                | 1.0834                | 1.0901                | 0.02414 | 1.84  |
| 70           | 1.6508                 | 1.6109                | 1.6093                | 1.6237                | 0.02349 | 1.44  |
| 100          | 2.2566                 | 2.2506                | 2.2713                | 2.2595                | 0.01067 | 0.47  |

\*Relación de alturas = Altura de la casiopeína Igly / Altura estándar de Ketorolaco.

La curva promedio de las tres curvas es la siguiente:

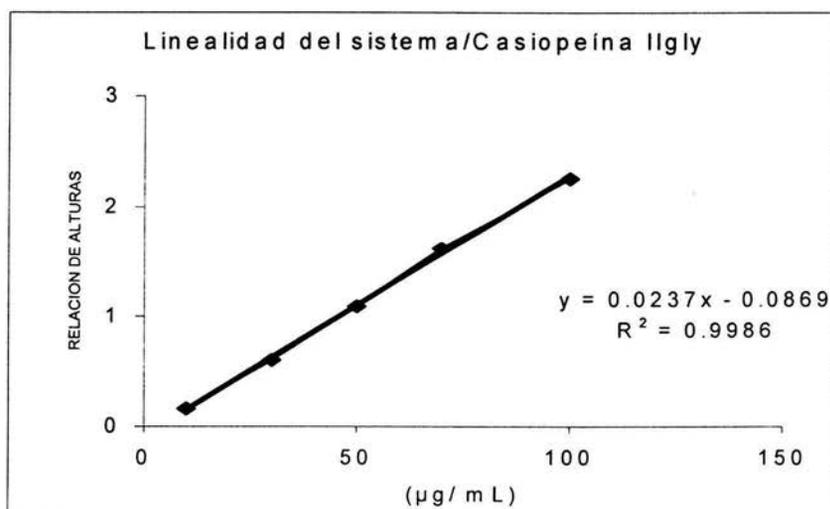


Fig. 18 Linealidad del sistema para Casiopeína Igly



En la figura 18 se presenta la Curva de calibración de Casiopeína Igly en solución a 274nm, cuya ecuación fue  $Y = 0.0237X - 0.0869$ ,  $r^2 = 0.9986$

#### 4.6.3 Precisión del Sistema/ Casiopeína Igly

**Repetibilidad (día 1).**- Se realizó con el análisis por cuadruplicado de los puntos controles (concentraciones de casiopeína Igly, baja: 40 µg/mL, media: 60 µg/mL y alta: 90 µg/mL) verificando que el coeficiente de variación (C.V.) fuera menor al 2%, tabla 5.

**Tabla 5 Precisión del sistema (repetibilidad día 1).**

| Conc. (µg/mL) | Rep. 1  | Rep. 2  | Rep. 3  | Rep. 4  | Promedio | Desv. Est. | C.V. % |
|---------------|---------|---------|---------|---------|----------|------------|--------|
| 40            | 397141  | 391772  | 389680  | 391572  | 392541.3 | 3208.096   | 0.81   |
| 60            | 718944  | 721903  | 732537  | 745022  | 729601.5 | 11821.71   | 1.62   |
| 90            | 1156768 | 1158018 | 1142353 | 1165281 | 1155605  | 9598.882   | 0.83   |

**Repetibilidad (día 2).**- Los puntos controles se analizaron por cuadruplicado en dos días diferentes, verificando que el CV. fuera menor al 2%. Tabla 6.

**Tabla 6. Precisión del sistema (repetibilidad día 2)**

| Conc. (µg/mL) | Rep. 1  | Rep. 2  | Rep. 3  | Rep. 4  | Promedio | Desv. Est. | C.V. % |
|---------------|---------|---------|---------|---------|----------|------------|--------|
| 40            | 358999  | 368859  | 362638  | 357020  | 3611829  | 5113.341   | 1.41   |
| 60            | 684290  | 683094  | 684987  | 694607  | 686744.5 | 5299.636   | 0.77   |
| 90            | 1260156 | 1284013 | 1264495 | 1256712 | 1266344  | 12202.17   | 0.96   |



#### 4.6.4 Reproducibilidad/ Casiopeína Ilgly.

**Reproducibilidad** . Con los datos de repetibilidad se evalúa la reproducibilidad del sistema entre el día 1 y día 2 verificando que el CV. fuera menor al 2%. Tabla 7.

**Tabla 7 Reproducibilidad del sistema Casiopeína Ilgly**

| Conc.<br>µg/mL | Rep.<br>1 | Rep.<br>2 | Rep.<br>3 | Rep.<br>4 | Rep.<br>5 | Rep.<br>6 | Rep.<br>7 | Rep.<br>8 | Promedio  | Desv.<br>Est. | C.V.<br>% |
|----------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|---------------|-----------|
| 40             | 397141    | 391772    | 389680    | 391572    | 358999    | 368859    | 362638    | 357020    | 377210.1  | 16871.03      | 4.47      |
| 60             | 718944    | 721903    | 732537    | 745022    | 684290    | 683094    | 684987    | 694607    | 708173    | 24427.62      | 3.44      |
| 90             | 1156768   | 1158018   | 1142353   | 1165281   | 1260156   | 1284013   | 1264495   | 1256712   | 1210974.5 | 60058.71      | 4.95      |

#### 4.6.5 Exactitud del Sistema/ Casiopeína Ilgly.

Con base en los resultados de repetibilidad y reproducibilidad del sistema, se calculó la concentración para cada uno de los puntos controles, en función al valor nominal de cada concentración, por medio de la fórmula:

$$(\text{Concentración real} - \text{Concentración experimental} / \text{Concentración real}) * 100$$

El valor obtenido se interpola en la curva de calibración (que se corre el mismo día del análisis), se compara el valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia, ambos resultados deben presentar concordancia según lo especificado en la guía de validación para métodos analíticos Q2A Noviembre 1996, ICH.( Ver tablas 8 y 9 ).





**Tabla 8 Exactitud del sistema Casiopeína Ilgly (Día 1).**

|             | CASIO<br>Ilgly<br>(40µg/<br>mL) | KETOR<br>OLACO | A/Asi | Conc.<br>Inter | CASIO<br>Ilgly<br>(60µg/<br>mL) | KETOR<br>OLACO | A/Asi | Conc.<br>Inter | CASIO<br>Ilgly<br>(90µg/ml) | KETOR<br>OLACO | A/Asi | Conc.<br>Inter |
|-------------|---------------------------------|----------------|-------|----------------|---------------------------------|----------------|-------|----------------|-----------------------------|----------------|-------|----------------|
| REP<br>1    | 397141                          | 148090         | 2.681 | 37.05          | 718944                          | 152093         | 4.727 | 60.47          | 1156768                     | 155858         | 7.421 | 91.32          |
| REP<br>2    | 391772                          | 148664         | 2.635 | 36.52          | 721903                          | 154444         | 4.674 | 59.87          | 1158018                     | 156630         | 7.393 | 91.0           |
| REP<br>3    | 389680                          | 149421         | 2.607 | 36.21          | 732537                          | 153885         | 4.76  | 60.85          | 1142353                     | 154576         | 7.390 | 90.66          |
| REP<br>4    | 391572                          | 150412         | 2.603 | 36.16          | 733609                          | 154258         | 4.75  | 60.80          | 1165281                     | 160513         | 7.259 | 89.47          |
| PROM        | 392541                          | -----          | ----- | 36.49          | 726748                          | -----          | ----- | 60.50          | -----                       | -----          | ----- | 90.69          |
| DESV<br>EST | 3208.09                         | -----          | ----- | 0.4121         | 7415.35                         | -----          | ----- | 0.453          | -----                       | -----          | ----- | 0.8297         |
| CV %        | 0.81                            | -----          | ----- | 1.12           | 1.02                            | -----          | ----- | 0.74           | -----                       | -----          | ----- | 0.91           |

Relación de alturas (A/Asi) = Altura de la casiopeína Ilgly / Altura estándar de Ketorolaco.





**Tabla 9 Exactitud del sistema Casiopeína Ilgly (Día 2)**

|             | CASIO<br>Ilgly<br>(40µg/<br>ml) | KETOR<br>OLACO | A/Asi | Conc.<br>Inter | CASIO<br>Ilgly<br>(60µg/<br>ml) | KETOR<br>OLACO | A/Asi | Con<br>Inter | CASIO<br>Ilgly<br>90µg<br>/ml) | KETOR<br>OLACO | A/Asi | Conc.<br>Inter |
|-------------|---------------------------------|----------------|-------|----------------|---------------------------------|----------------|-------|--------------|--------------------------------|----------------|-------|----------------|
| REP<br>1    | 358999                          | 168567         | 2.129 | 35.44          | 684290                          | 170473         | 4.014 | 59.66        | 1260156                        | 167859         | 7.507 | 104.54         |
| REP<br>2    | 368659                          | 172571         | 2.136 | 35.53          | 683094                          | 170270         | 4.011 | 59.63        | 1284013                        | 170658         | 7.523 | 104.76         |
| REP<br>3    | 362638                          | 172868         | 2.097 | 35.03          | 684987                          | 172487         | 3.971 | 59.11        | 1264495                        | 172410         | 7.334 | 102.32         |
| REP<br>4    | 357020                          | 172821         | 2.065 | 34.62          | 694607                          | 167945         | 4.135 | 61.22        | 1256712                        | 172181         | 7.298 | 101.86         |
| PROM        | 361829                          | -----          | ----- | 35.16          | 686744.5                        | -----          | ----- | 59.90        | 1266344                        | -----          | ----- | 103.37         |
| DESV<br>EST | 5113.3                          | -----          | ----- | 0.4164         | 5299.63                         | -----          | ----- | 0.9150       | 12202.2                        | -----          | ----- | 1.490          |
| CV %        | 1.41                            | -----          | ----- | 1.18           | -----                           | -----          | ----- | 1.52         | 0.96                           | -----          | ----- | 1.44           |

Relación de alturas (A/Asi) = Altura de la casiopeína Ilgly / Altura estándar de Ketorolaco.

**4.6.6 Límite de detección (LD)/Casiopeína Ilgly** Para la determinación de LD se utilizaron muestras blanco (Metanol: agua 1:1), en los cromato gramas obtenidos se determinó el nivel de ruido (r) el cual fue 1.1 µg / mL, y con este valor se calcula LD con la siguiente fórmula:  $LD = 3 r$ , por lo tanto  $LD = 3(1.1) = 3.3 r$ . ( donde r es el nivel de ruido expresado en µg/ mL ).

La concentración correspondiente se determina con la curva de calibración del mismo día de análisis.





**4.6.7 Límite de cuantificación (LC)/Casiopeína IIgly.** El LC se determinó utilizando el mismo procedimiento que para LD, considerando ahora la siguiente fórmula:  $LC = 10r$ , por lo tanto  $LC = 10 (1.1) = 11.0 \mu\text{g} / \text{mL}$ , (donde  $r$  es el nivel de ruido expresado en  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ).

#### **4.7 Método Analítico para Casiopeína III-i en materia prima**

##### **4.7.0 Condiciones cromatográficas de trabajo Casiopeína III-i.**

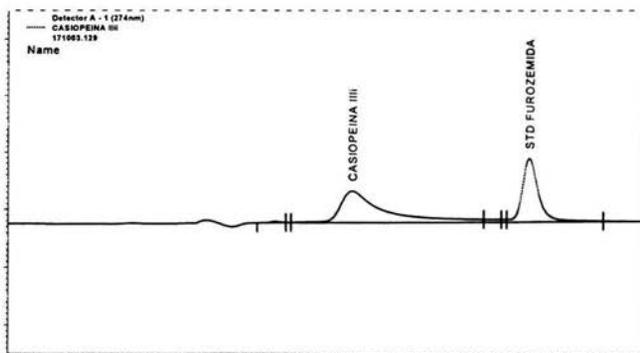
Fase móvil Metanol/ Fosfatos/ Hexansulfonato de Sodio (40:55:5) v/v, pH = 6.9

##### **4.7.1 Especificidad.**

La evaluación de la especificidad se presenta en las siguientes figuras: 19 y 20.

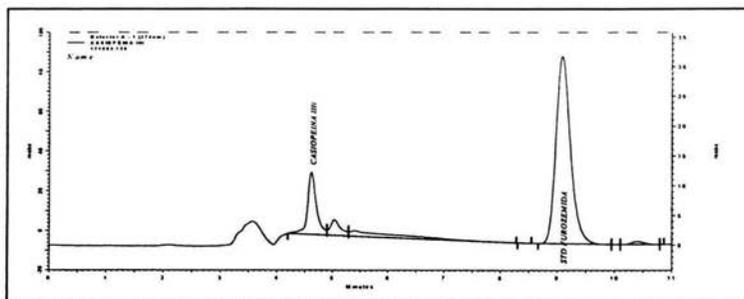
Tiempo de retención de la Casiopeína III-i: T.R.= 5.7 minutos.

Tiempo de retención de la Furosemida (estándar interno): T.R.= 8.6 minutos.



**Fig.19** Cromatograma de Casiopeína III-i en fase móvil, 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  con estándar interno ( Furosemida 2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ) Tiempo de retención Casiopeína III-i= 5.7 min., Tiempo de retención Furosemida =8.6 min.





**Fig.20 SOLUCION A: Cu-4,4 dimetil en fase móvil, con estándar interno (Furosemida 2.5 µg/mL) Tiempo de retención SOLUCION A: Cu-4,4 dimetil = 4.6 min., Tiempo de retención Furosemida =8.9 min.**

#### **4.7.2 Linealidad del Sistema/ Casiopeína III-i.**

La Tabla 10 muestra los resultados de la linealidad del sistema para la Cuantificación de la Casiopeína III-i en solución (agua).

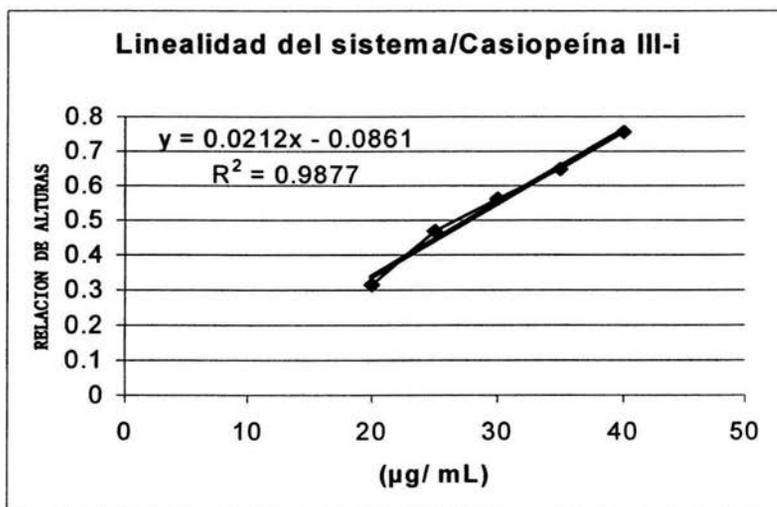
**Tabla 10 Linealidad del sistema para Casiopeína III-i.**

| Conc.(µg/mL) | Curva 1<br>*R altura 1 | Curva 2<br>*R altura 2 | Curva3<br>*R altura 3 | Promedio<br>*R altura 3 | Desvest  | C.V % |
|--------------|------------------------|------------------------|-----------------------|-------------------------|----------|-------|
| 20           | 0.3186                 | 0.3097                 | 0.3155                | 0.3146                  | 0.004558 | 1.44  |
| 25           | 0.4723                 | 0.4637                 | 0.4695                | 0.4685                  | 0.004393 | 0.93  |
| 30           | 0.5730                 | 0.5520                 | 0.5586                | 0.5612                  | 0.01072  | 1.91  |
| 35           | 0.6620                 | 0.6433                 | 0.6391                | 0.6481                  | 0.01202  | 1.88  |
| 40           | 0.7568                 | 0.7470                 | 0.7593                | 0.7544                  | 0.00647  | 0.85  |

\*Relación de alturas = Altura de la Casiopeína III-i / Altura estándar de Furosemida



La curva promedio de las tres curvas es la siguiente:



**Figura 21** Linealidad del sistema para Casiopéina III-i

En la figura 21 se presenta la Curva de calibración de Casiopéina III-i en solución (Metanol: agua, 1:1 v/v) a 274nm, cuya ecuación fue  $Y = 0.0212X - 0.0061$ ,  $r^2 = 0.9877$

#### 4.7.3 Precisión del sistema/ Casiopéina III-i.

**Repetibilidad.(día 1).**- Se realizó con el análisis por cuadruplicado de los puntos controles (concentraciones de casiopéina III-i, baja: 22 µg/mL, media: 28 µg/mL y alta: 38 µg/mL) verificando que el coeficiente de variación (CV.) fuera menor al 2%, tabla 12.



**Tabla 11 Precisión del sistema Casiopeína III-i (día 1).**

| Conc.<br>( $\mu\text{g/mL}$ ) | Rep. 1 | Rep. 2 | Rep. 3 | Rep. 4 | Promedio | Desv.<br>Est. | C.V. % |
|-------------------------------|--------|--------|--------|--------|----------|---------------|--------|
| 22                            | 17566  | 17636  | 17275  | 17578  | 17498.75 | 156.838       | 0.89   |
| 28                            | 21084  | 21067  | 21003  | 21418  | 21143    | 186.62        | 0.88   |
| 38                            | 22266  | 21648  | 21849  | 21614  | 21844.25 | 299.68        | 1.37   |

**Repetibilidad (día 2).**- Los puntos controles se analizaron por cuadruplicado en dos días diferentes, verificando que el CV. fuera menor al 2%. Tabla 13.

**Tabla 12. Precisión del sistema Casiopeína III-i (día 2).**

| Conc.<br>( $\mu\text{g/mL}$ ) | Rep. 1 | Rep. 2 | Rep. 3 | Rep. 4 | Promedio | Desv.<br>Est. | C.V. % |
|-------------------------------|--------|--------|--------|--------|----------|---------------|--------|
| 22                            | 15496  | 15741  | 15929  | 15800  | 15741.5  | 181.52        | 1.15   |
| 28                            | 18726  | 18539  | 18636  | 18464  | 18591.25 | 114.138       | 0.61   |
| 38                            | 21899  | 21648  | 21849  | 21614  | 21752.5  | 142.45        | 0.65   |



**4.7.4 Reproducibilidad/ Casiopeína III-i.**- Con los datos de repetibilidad se evalúa la reproducibilidad del sistema entre el día 1 y día 2 verificando que el CV. fuera menor al 2%. Tabla 14.

**Tabla 13 Reproducibilidad del sistema Casiopeína III-i.**

| Conc.<br>µg/mL | Rep. 1 | Rep. 2 | Rep. 3 | Rep. 4 | Rep. 5 | Rep. 6 | Rep. 7 | Rep. 8 | Prom      | Desv.<br>Est. | C.V.<br>% |
|----------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|-----------|---------------|-----------|
| 22             | 17566  | 17636  | 17275  | 17578  | 15496  | 15741  | 15929  | 15800  | 16627.6   | 960.6         | 5.77      |
| 28             | 21084  | 21067  | 21003  | 21418  | 18726  | 18539  | 18636  | 18464  | 19867.125 | 1371.46       | 1.90      |
| 38             | 22266  | 21648  | 21849  | 21614  | 21899  | 21648  | 21849  | 21614  | 21798.375 | 222.69        | 1.02      |

#### **4.7.5 Exactitud del sistema/ Casiopeína III-i**

Con base en los resultados de repetibilidad y reproducibilidad del sistema, se calculó la concentración para cada uno de los puntos controles (baja 22µg/mL, media 28µg/mL, alta 38 µg/mL) en función al valor nominal de cada concentración, por medio de la fórmula:  
(Concentración real- Concentración experimental / Concentración real) \* 100

El valor obtenido se interpola en la curva de calibración (que se corre el mismo día del análisis) se compara el valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia, ambos resultados deben presentar concordancia según lo especificado en la guía de validación para métodos analíticos Q2A Noviembre 1996, ICH. ( Tablas 15 y 16 ).



**Tabla 14 Exactitud del sistema Casiopeína III-i (Día 1)**

|             | CASIO<br>III-i<br>22µg/mL | FURO<br>SEMI<br>DA | A/Asi | Conc.<br>Inter | CASIO<br>III-i<br>28µg/<br>mL | FURO<br>SEMI<br>DA | A/Asi | Conc.<br>Inter | CASIO<br>III-i<br>38µg/<br>mL | FURO<br>SEMI<br>DA | A/Asi | Conc<br>Inter |
|-------------|---------------------------|--------------------|-------|----------------|-------------------------------|--------------------|-------|----------------|-------------------------------|--------------------|-------|---------------|
| REP<br>1    | 17566                     | 40992              | 0.428 | 18.37          | 21084                         | 34953              | 0.603 | 27.72          | 28736                         | 36328              | 0.791 | 37.78         |
| REP<br>2    | 17636                     | 40077              | 0.440 | 18.99          | 21067                         | 34671              | 0.607 | 27.96          | 28745                         | 35792              | 0.803 | 38.42         |
| REP<br>3    | 17275                     | 39251              | 0.440 | 18.99          | 21003                         | 34378              | 0.610 | 28.14          | 28918                         | 36534              | 0.791 | 37.80         |
| REP<br>4    | 17518                     | 39360              | 0.445 | 19.26          | 21418                         | 36122              | 0.592 | 27.17          | 28505                         | 35555              | 0.801 | 38.35         |
| PROM        | 17498.75                  | -----              | ----- | 18.90          | 21143                         | -----              | ----- | 27.75          | -----                         | -----              | ----- | 38.09         |
| DESV<br>EST | 156.83                    | -----              | ----- | 0.375          | 186.62                        | -----              | ----- | 0.419          | -----                         | -----              | ----- | 0.345         |
| CV %        | 0.89                      | -----              | ----- | 1.98           | 0.88                          | -----              | ----- | 1.51           | -----                         | -----              | ----- | 0.90          |

Relación de alturas (A/Asi) = Altura de la Casiopeína III-i / Altura estándar de Furosemida.





**Tabla 15 Exactitud del sistema Casiopeina III-i. (Día 2).**

|             | CASIO<br>III-i<br>22µg/<br>mL | FURO<br>SEMI<br>DA | A/Asi | Con<br>Inter | CASIO<br>III-i<br>28µg/<br>mL | FURO<br>SEMI<br>DA | A/Asi | Conc.<br>Inter | CASIO<br>III-i<br>38µg/<br>mL | FURO<br>SEMI<br>DA | A/Asi | Conc.<br>Inter |
|-------------|-------------------------------|--------------------|-------|--------------|-------------------------------|--------------------|-------|----------------|-------------------------------|--------------------|-------|----------------|
| REP<br>1    | 15496                         | 32473              | 0.477 | 20.98        | 18726                         | 32431              | 0.577 | 26.34          | 21899                         | 31352              | 0.698 | 32.82          |
| REP<br>2    | 15741                         | 32324              | 0.486 | 21.50        | 18539                         | 32649              | 0.567 | 25.83          | 21648                         | 30956              | 0.699 | 32.87          |
| REP<br>3    | 15929                         | 33022              | 0.482 | 21.26        | 18636                         | 32690              | 0.570 | 25.95          | 21849                         | 31028              | 0.704 | 33.13          |
| REP<br>4    | 15800                         | 32902              | 0.480 | 21.14        | 18464                         | 32229              | 0.572 | 26.10          | 21614                         | 30751              | 0.702 | 33.06          |
| PROM        | 15741.5                       | .....              | ..... | 21.22        | 18591                         | .....              | ..... | 26.06          | 21752                         | .....              | ..... | 32.97          |
| DESV<br>EST | 181.52                        | .....              | ..... | 0.22         | 114.13                        | .....              | ..... | 0.221          | 142.4                         | .....              | ..... | 0.146          |
| CV %        | 1.15                          | .....              | ..... | 1.03         | 0.61                          | .....              | ..... | 0.84           | 0.65                          | .....              | ..... | 0.44           |

Relación de alturas (A/Asi) = Altura de la Casiopeina III-i / Altura estándar de Furosemida.



---

**4.7.6 Límite de detección (LD)/Casiopéina III-i.-** Para la determinación de LD se utilizaron muestras blanco (agua), en los cromatogramas obtenidos se determinó el nivel de ruido ( $r$ ) el cual fue  $0.1 \mu\text{g} / \text{mL}$ , y con este valor se calcula LD con la siguiente fórmula:  $LD=3 r$ , por lo tanto  $LD=3(0.1) = 0.3 \mu\text{g} / \text{mL}$  ( donde  $r$  es el nivel de ruido expresado en  $\mu\text{g} / \text{mL}$  ).

La concentración correspondiente se determina con la curva de calibración del mismo día de análisis.

**4.7.7 Límite de cuantificación (LC)/Casiopéina III-i.-** El LC se determinó utilizando el mismo procedimiento que para LD, considerando ahora la siguiente fórmula:  $LC= 10r$ , por lo tanto  $LC= 10 (0.1)= 1 r$  (donde  $r$  es el nivel de ruido expresado en  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ).

La concentración correspondiente se determina con la curva de calibración del mismo día de análisis.





---

## ANALISIS DE RESULTADOS





## **5 ANALISIS DE RESULTADOS.**

### **5.1 Densidad real, aparente y velocidad de flujo**

Los tres lotes analizados de Casiopeína IIgly y Casiopeína III-i No presentaron diferencias en los resultados de densidad aparente y real, en los análisis de velocidad de flujo los tres lotes presentaron el mismo comportamiento, lo que nos indica que no hay diferencia en los resultados entre un lote y otro.

Por lo tanto se considera que el proceso de síntesis entre lote y lote es consistente.

### **5.2 Tamaño de partícula.**

Para la determinación del **Tamaño de Partícula de Casiopeína IIgly** se analizaron tres lotes:

- A) Casiopeína IIgly, lote 02MRG3101024f, sintetizada en la Facultad de Química, Departamento de Química Inorgánica de la Universidad Nacional Autónoma de México.
- B) Casiopeína IIgly, lote 59MRG230402, sintetizada en la Facultad de Química, Departamento de Química Inorgánica, de la Universidad Nacional Autónoma de México.
- C) Casiopeína IIgly, lote 152MEB100203, sintetizada en la Facultad de Química, Departamento de Química Inorgánica de la Universidad Nacional Autónoma de México.

En el análisis del Tamaño de partícula los resultados entre los lotes A, B y C presentaron resultados parecidos, ya que el intervalo total de todos los lotes se encontró entre  $>40 <50$  micras, que representa un 70% a 80% de un total de 100 partículas medidas, estos resultados nos indican que no existe diferencia significativa del compuesto en cuanto a diseño y síntesis se refiere, además que nos proporciona información confiable acerca de



---

la uniformidad de partícula que tiene el lote. Por último cabe mencionar que los tres lotes analizados (A, B y C), presentaron características de homogeneidad. Apéndice I (Fig.1y2) Para la determinación del **Tamaño de Partícula de Casiopeína III-i** se analizaron tres lotes:

- Casiopeína III-i, lote 11MRG0402031f , sintetizada en la Facultad de Química, Departamento de Química Inorgánica de la Universidad Nacional Autónoma de México.
- Casiopeína III-i, lote 33MRG050402, sintetizada en la Facultad de Química, Departamento de Química Inorgánica de la Universidad Nacional Autónoma de México.
- Casiopeína III-i, lote Meb 145, sintetizada en la Facultad de Química, Departamento de Química Inorgánica de la Universidad Nacional Autónoma de México.

En los tres lotes analizados (A, B y C), no se presenta mucha variación entre un lote y otro, se observa que la mayoría de las partículas se encontraban en el intervalo comprendido entre  $>50 <60$ , lo que representa aproximadamente un 40% de un total de 100 partículas analizadas. Los tres lotes presentaron características de homogéneas .Apéndice I (Fig. 2 y 3)

### **5.3 Espectroscopia uv-visible.**

**5.3.1 Uv-Visible Casiopeína Ilgly.**- Con el barrido espectral realizado a la Casiopeína Ilgly en la región de UV-Visible, podemos observar que la concentración de 10  $\mu\text{g/mL}$  se detectan dos picos máximos de absorción en una longitud de onda de 274 nm y 209 nm, con una absorbancia de 0.957 y 1.227 respectivamente.



---

Estos picos se deben a la presencia de dobles ligaduras que tiene el compuesto en su estructura, ya que este tipo de análisis detecta las transiciones electrónicas de los electrones ( $\Pi$ ) presentes en los dobles enlaces de los grupos cromóforos de las moléculas.

En la concentración de  $7\mu\text{g/mL}$  se presentan máximos de absorción con una longitud de onda de  $274\text{ nm}$  y  $208.5\text{nm}$ , con una absorbancia de  $0.629$  y  $0.882$  respectivamente, lo que nos indica que los picos de absorción aparecen en las mismas longitudes de onda, siendo prácticamente los mismos para fines de identificación del compuesto, observándose una variabilidad muy baja entre los máximos de absorción de ambas soluciones ( $10\mu\text{g/mL}$  y  $7\mu\text{g/mL}$ ). Por lo tanto se establece que existe una proporcionalidad entre la concentración y la absorbancia.

**5.3.2 Uv-visible para Casiopeína III-i.-** En el espectrograma obtenido en el análisis por UV-visible para la Casiopeína III-i, se observa que en la concentración de  $5\mu\text{g/mL}$  se presentan picos de absorción en una longitud de onda de  $295.5$  y  $208$  con una absorción de  $0.229$  y  $0.563$  respectivamente, los cuales representan los grupos (cromóforos) de dobles ligaduras que están asociadas al compuesto en su estructura.

En la concentración de  $7\mu\text{g/mL}$  se presentan máximos de absorción a una longitud de onda de  $295.5\text{nm}$  y  $208\text{ nm}$  con una absorbancia de  $0.296\text{nm}$  y  $0.817$  respectivamente, en esta concentración se presentan los mismos máximos de absorción que se presentan en la solución de  $5\mu\text{g/mL}$ , pero las absorbancias cambian a  $0.296\text{nm}$  y  $0.817\text{nm}$  presentando proporcionalidad con respecto a la concentración. Con los máximos de absorción obtenidos podemos identificar a la Casiopeína III-i por que estas señales son específicas para este compuesto, además con la ayuda de otras técnicas instrumentales (IR, CLAR ) podemos caracterizar a este compuesto con un alto grado de confiabilidad.



#### **5.4 Espectroscopia de Infrarrojo.**

Se realizó el análisis por espectrofotometría de Infrarrojo a la Casiopeína IIgly, observándose que el compuesto presentó las siguientes señales (grupos funcionales), tabla 16.

**Tabla 16 Espectroscopia de Infrarrojo Casiopeína IIgly**

| GRUPO FUNCIONAL  | VALORES<br>TEÓRICOS<br>Número de Onda:<br>cm-1 | VALORES<br>EXPERIMENTALES<br>Numero de Onda: cm-1 |
|------------------|--|---|
| AMINA SECUNDARIA | 3100-3500                                      | 3000-2850   |
| GRUPO NO3        | 1380   | ~1380   |
| CARBONILO        | 1601   | 1601  |
| FENANTROLINA     | 1620   | 1524  |
|                  | 1510   | 1429  |
|                  | 850  | 871   |
|                  | 725  | 726   |
| -C=N             | 1689-1471                                      | 1524  |

Estas señales representan la huella digital del compuesto, con las cuales se pueden identificar plenamente a los grupos funcionales que tiene la Casiopeína IIgly, con un alto grado de confiabilidad por medio de este tipo de análisis instrumental.

Se realizó el análisis por espectrofotometría de Infrarrojo a la Casiopeína III-i, observándose que el compuesto presentó las siguientes señales (grupos funcionales), tabla 17.



**Tabla 17 Espectroscopia de Infrarrojo Casiopeína III-i**

| GRUPO FUNCIONAL  | VALORES<br>TEÓRICOS<br>Número de Onda:<br>cm-1 | VALORES<br>EXPERIMENTALES<br>Numero de Onda: cm-1 |
|------------------|--|---|
| AMINA SECUNDARIA | 3100-3500                                      | 3464, 3031  |
| GRUPO NO3        | 1380   | ~1384   |
| AROMATICO        | 1601   | 1587  |
| BIPIRIDINA       | 1610   | 1617  |
|                  | 1490   | 1491  |
|                  | 775  | 777   |
|                  | 730  | 730   |
| -C=N             | 1689-1471                                      | 1525  |

Estas señales representan la huella digital del compuesto, con las cuales se pueden identificar plenamente a los grupos funcionales que tiene la Casiopeína III-i, con un alto grado de confiabilidad por medio de este tipo de análisis instrumental.

## **5.5 Análisis térmico**

**5.5.1 Casiopeína IIgly.-** Por DSC se observa una transición endotérmica aproximadamente de 70°C que puede deberse a la eliminación de disolvente contenido en la muestra y alrededor de 261.5°C una transición endotérmica debida a la temperatura de sublimación del compuesto.

Por TGA se tiene en la curva de calentamiento tres pérdidas de peso, una aproximadamente a 70°C, otra a 225°C y por último a 355°C, estas señales nos indican que la casiopeína IIgly es más estable que la casiopeína III-i.





---

En DTG se verifican las pérdidas de peso como transiciones endotérmicas y en DTA se corroboran los resultados de DSC con un pico menor de resolución.

**5.5.2 Casiopeína III-I.-** Por DSC se observa una transición endotérmica alrededor de 70°C debida a la presencia de material volátil (que puede ser disolvente: metanol) y una transición endotérmica en 100°C la cual se debe a la deshidratación con pérdida de una molécula de agua( verificado por TG), posteriormente aparece un pico exotérmico alrededor de 250°C, probablemente se deba a la sublimación del compuesto.

Por TGA/ STDA: en la gráfica de la curva se observaron las pérdidas que se mencionan en DSC, disolvente, agua y temperatura de sublimación.

En DTG se verifican las pérdidas de peso como transiciones endotérmicas y en DTA se corroboran los resultados de DSC con un pico menor de resolución.

## **5.6 Validación del método analítico para cuantificar** **Casiopeína IIgly como materia prima.**

### **5.6.1 Especificidad / Casiopeína IIgly**

En los cromatogramas mostrados en las figuras 16 y 17, el tiempo de retención obtenido para la casiopeína IIgly fue de 2.7 minutos. No se presentó interferencia alguna de otra sustancia para el tiempo de retención de la casiopeína IIgly. El posible compuesto de descomposición fue [Cu II (4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)] el cual se demostró, mediante su análisis por CLAR, que el tiempo de retención obtenido para éste compuesto fue de 3.02. el cual no muestra interferencia alguna en comparación con el T.R. de casiopeína IIgly, de esta forma el sistema para determinar casiopeína IIgly en solución como materia prima es específico por lo anteriormente expuesto.



### **5.6.2 Linealidad/ Casiopeína Igly.**

El sistema en solución para casiopeína Igly fue lineal dentro del intervalo de concentraciones establecidas de 10 a 100  $\mu\text{g/mL}$ , el coeficiente de correlación "r" fue de 0.9992. La ecuación de la curva promedio de casiopeína III-i en solución fue,  $y = 0.0237x - 0.0869$  y el coeficiente de determinación  $r^2=0.9986$ , el coeficiente de variación(%CV) fue 0.47 a 1.84 esto implica que el método fue lineal en el intervalo de concentraciones empleadas.

### **5.6.3 Precisión/ Casiopeína Igly**

#### ***Repetibilidad.***

Al evaluar este parámetro de precisión se observó que cumple de los criterios de aceptación, puesto que el coeficiente de variación (%CV) en cada uno de los niveles de concentraciones empleadas (40, 60, 90  $\mu\text{g/mL}$  casiopeína Igly fue menor al 2% (0.81, 0.83, y 1.62 respectivamente).

Al evaluar la precisión se encontró un aumento del coeficiente de variación conforme disminuye la concentración de casiopeína Igly, lo anterior puede ser originado por errores en el manejo del instrumental empleado en la técnica. En un segundo día de análisis de los puntos control de casiopeína Igly se observó que el coeficiente de variación tiene los siguientes valores 0.77, 0.96, 1.41, los cuales cumplen con el criterio de ser menores al 2% de %CV, lo que nos indica que el método es precisión en los niveles bajo, medio y alto.

### **5.6.4 Reproducibilidad/ Casiopeína Igly.**

Tomando como referencia los valores de las repeticiones para las muestras de control de calidad del día 1 y día 2 de repetibilidad se evaluó el parámetro de reproducibilidad en el cual se observó que no cumple con los criterios de aceptación, puesto que el coeficiente de variación en cada uno de los niveles de concentraciones empleadas baja, media y alta





(40, 60 y 90 µg/mL) fue mayor al 2% obteniéndose los siguientes datos de coeficiente de variación 3.44, 4.47 y 4.97, con estos resultados podemos observar que la reproducibilidad del sistema disminuye conforme aumenta la concentración.

#### 5.6.5 Exactitud/ Casiopeína Igly.

Al evaluar el parámetro de exactitud se observó que cumple con los criterios de aceptación según lo especificado en la guía de validación para métodos analíticos Q2A Noviembre 1996, ICH, se compara el valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia, ambos resultados deben presentar concordancia según lo especificado en la guía Q2A, ya que en los valores obtenidos experimentalmente fueron 36.5, 60.5 y 90.6 µg/mL para cada uno de los niveles de concentración empleados (40, 60,90 µg/mL), lo que indica que cada nivel de concentración se presenta una ligera variabilidad con respecto al valor exacto empleado

En un segundo día de análisis de los puntos control de casiopeína Igly se encontró que los valores obtenidos experimentalmente fueron 35.16, 59.0 y 103.3 3 µg/mL para cada nivel de concentración empleados (40, 60 y 90 µg/ mL) en este caso se observa una mayor variabilidad con respecto al día anterior, este incremento en la variabilidad puede ser debido a la mala manipulación del instrumental al realizar los aforos, tomar las alícuotas o incluso al mismo pesado de las materias primas.

#### 5.6.6 Limite de Detección/ Casiopeína Igly.

El límite de detección para la casiopeína Igly fue de 3.3 µg/mL ya que en esta concentración la señal de la casiopeína III-I en solución es tres veces mayor que el nivel de ruido, considerándose que en esta concentración la Casiopeína Igly puede ser aun detectable, calculada por medio de la fórmula  $LD= 3 r$  ( donde r es el nivel de ruido expresado en µg/mL ).



### **5.6.7 Limite de Cuantificación/ Casiopeína IIgly.**

El límite de Cuantificación para la casiopeína IIgly es de 11.0  $\mu\text{g/mL}$ , este parámetro se determina igual que el LD, pero el valor numérico se calcula por medio de la fórmula  $LC = 10 r$  ( donde  $r$  es el nivel de ruido expresado en  $\mu\text{g/ mL}$  ).

## **5.7 Validación del método analítico para cuantificar** **Casiopeína III-i, como materia prima.**

### **5.7.1 Especificidad/ Casiopeína III-i**

En los cromatogramas mostrados en las figuras 18 y 19, el tiempo de retención obtenido para la casiopeína III-i fue de 5.7 minutos. No se presentó interferencia alguna de otra sustancia para el tiempo de retención de la casiopeína III-i. El posible compuesto de descomposición fue la solución A: Cu-4,4 dimetil el cual se demostró, mediante su análisis por CLAR, que el tiempo de retención obtenido para éste compuesto fueron 4.6. No mostró interferencia alguna en comparación con el T.R. de casiopeína III-i, de esta forma el sistema para determinar casiopeína III-i en solución como materia prima es específico por lo anteriormente expuesto.

### **5.7.2 Linealidad/ Casiopeína III-i**

El sistema en solución para casiopeína III-i fue lineal dentro del intervalo de concentraciones establecidas de 20 a 40  $\mu\text{g/mL}$ , el coeficiente de correlación " $r$ " fue de 0.9938. La ecuación de la curva promedio de casiopeína III-i en solución fue,  $Y = 0.0212x - 0.0061$  y el coeficiente de determinación  $r^2 = 0.9877$ , el coeficiente de variación ( %CV ) fue 0.85 a 1.91 esto implica que el método fue lineal en el intervalo de concentraciones empleadas.



### 5.7.3 Precisión/ Casiopeína III-i.

#### Repetibilidad

Al evaluar este parámetro de precisión se observó que cumple de los criterios de aceptación, puesto que el coeficiente de variación (%CV) en cada uno de los niveles de concentraciones empleadas (22, 28, 38  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) casiopeína III-i fue menor al 2% obteniéndose valores de CV de 0.88,0.89,1.37  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

Como se puede observar al evaluar la precisión se encontró un aumento del coeficiente de variación conforme disminuye la concentración de casiopeína III-i, lo anterior puede ser originado por errores en la preparación de la muestra o del manejo del instrumental empleado en la técnica.

En un segundo día de análisis de los puntos control de casiopeína III-i se observó que el coeficiente de variación tiene los siguientes valores 0.61, 0.65, 1.15, los cuales cumplen con el criterio de ser menores al 2% de %CV, lo que nos indica que el método es repetible en los niveles bajo, medio y alto.

### 5.7.4 Reproducibilidad/ Casiopeína III-i.

Tomando como referencia los valores de las repeticiones para las muestras de control de calidad del día 1 y día 2 de repetibilidad se evaluó el parámetro de reproducibilidad en el cual se observó que no cumple con los criterios de aceptación, puesto que el coeficiente de variación en cada uno de los niveles de concentraciones empleadas baja, media y alta (22,28, y 38  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) fue mayor al 2% obteniéndose los siguientes de % en los coeficientes de variación 1.02, 5.77 y 6.9  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , con estos resultados podemos observar que la reproducibilidad del sistema no es consistente.





### **5.7.5 Exactitud/ Casiopeína III-i.**

Al evaluar el parámetro de exactitud se observó que cumple con los criterios de aceptación según lo especificado en la guía de validación para métodos analíticos Q2A Noviembre 1996, ICH, se compara el valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia, ambos resultados deben presentar concordancia según lo especificado en la guía Q2A, ya que en los valores obtenidos experimentalmente fueron 18.9, 27.75 y 38.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para cada uno de los niveles de concentración empleados ( 22, 28 y 38  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), lo que indica que en cada nivel de concentración se presenta una ligera variabilidad con respecto al valor exacto empleado

En un segundo día de análisis de los puntos control de casiopeína IIgly se encontró que los valores obtenidos experimentalmente fueron 21.2, 26 y 35.9  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para cada nivel de concentración empleados (22, 28, y 38  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) en este caso se observa una ligera variabilidad con respecto al día anterior, este incremento en la variabilidad puede ser debido a la mala manipulación del instrumental al realizar los aforos, tomar las alícuotas o incluso al mismo pesado de las materias primas.

Estos resultados nos permite observar que el método para la casiopeína III-i es exacto en el rango de las concentraciones empleadas.

### **5.7.6 Limite de Detección/ Casiopeína III-i.**

El límite de detección para la casiopeína III-i fue de 0.3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ya que en esta concentración la señal de la casiopeína III-i en solución es tres veces mayor que el nivel de ruido, calculada por medio de la fórmula  $LD= 3 r$  ( donde r es el nivel de ruido expresado en  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

### **5.7.7 Limite de Cuantificación/ Casiopeína III-i.**

El límite de Cuantificación para la casiopeína III-i es de 1.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , este parámetro se determina igual que el LD, pero el valor numérico se calcula por medio de la fórmula  $LC=10 r$  ( donde r es el nivel de ruido expresado en  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )



# CONCLUSIONES



## 6.1 CONCLUSIONES

Las pruebas físicas realizadas (descripción, densidad aparente, densidad real, velocidad de flujo y Tamaño de Partícula), son parámetros importantes para ser evaluados en el Control de Calidad de una materia prima, nos proporciona información acerca de las diferencias que existe entre un lote y otro para una misma materia prima, los resultados obtenidos muestran que los lotes analizados son homogéneos entre ellos, además podemos predecir su comportamiento en el producto final desde el punto de vista de formulación del medicamento.

En la determinación de espectroscopia por UV-visible se obtuvieron los máximos de detección específicos para las materias primas analizadas (Casiopéina IIgly y III-i), los cuales se pueden tomar como un parámetro de referencia Identidad para la caracterización de estos compuestos, finalmente se logran detectar las transiciones electrónicas que se dan en estos compuestos manifestadas por los máximos de absorción a diferentes longitudes de onda.

Al obtener los espectrogramas en la región de infrarrojo para cada una de las materias primas, se obtienen las señales características que nos proporcionan información acerca de los grupos funcionales que forman la molécula, por medio de estas señales podemos identificar y caracterizar la familia de las Casiopéinas.

El método analítico para determinar Casiopéina IIgly en solución por CLAR, es específico, lineal, exacto, preciso y repetible en el intervalo de concentraciones 10,30, 50, 70 y 100  $\mu\text{g/mL}$ , el Limite de Detección es 3.3  $\mu\text{g/mL}$  y el Limite de Cuantificación 11.0  $\mu\text{g/mL}$ .

El método analítico para determinar Casiopéina III-i en solución por CLAR, es específico, lineal, exacto y preciso en el intervalo de concentraciones 20,25, 30, 35 y 40  $\mu\text{g/mL}$ , el limite de detección es 0.3  $\mu\text{g/mL}$  y el Limite de Cuantificación es 1.0  $\mu\text{g/mL}$ .



---

# BIBLIOGRAFIA





---

## 7.1 BIBLIOGRAFIA

1. Bakhtiar R. and Ochiai E. PHARMACOLOGICAL APPLICATIONS OF INORGANIC COMPLEXES. *General Pharmacology* **32**, 525-540, 1999.
2. Barret J. and Hill B.T. DNA REPAIR MECHANISMS ASSOCIATED WITH CELLULAR RESISTANCE TO ANTITUMOR DURGS: POTENTIAL NOVEL TARGETS. *Anti-Cancer Drugs* **9**, 103-123, 1998.
3. Bravo M.E., Ruiz-Ramirez L., Tinoco M. KNIGHT'S MOVE IN THE PERIODIC TABLE, FROM PLATINUM TO COPPER, NEW ANTICANCER COMPOUNDS, CASIOPEINAS. *IN VIVO EVALUATION II. Metal Based Drugs*, 2002.
4. Capizz Robert L. QUIMIOTERAPIA DEL CÁNCER. BASES FARMACOLÓGICAS. Editorial Médica Panamericana., México, 196-197.
5. Cunico L. Robert, BASIC HPLC AND CE OF BIOMOLECULES, by Bay Bioanalytical Laboratory, Inc, pp.359-370, Richmond, California, 1998.
6. De Vizcaya-Ruiz A., Rivero-Müller A., Ruiz-Ramirez L., Kass G.E.N., Kelland L.R., Orr R.M. and Dobrota M. L1210 AND CH1 CELLS TREATED WITH NOVEL COPPER-BASED ANTICANCER COMPOUND-CASIOPEINA II DIE BY APOPTOSIS. *Anticancer Research* **18**, 48-53, 1998.
7. De Vizcaya-Ruiz A., Rivero-Müller A., Ruiz-Ramirez L., Kass G.E.N., Kelland L.R. Orr R.M. and Dobrota M. INDUCTION OF APOPTOSIS BY NOVEL COPPER-BASED ANTICANCER COMPOUND-CASIOPEINA II IN L1210 AND CH1 CELLS. *Toxicology in Vitro* **14**, 1-5, 2000.
8. De Vizcaya-Ruiz A.M.G. DISTRIBUTION, TOXICITY AND MODE OF ACTION OF THE NOVEL COPPER-BASED COMPOUND: CASIOPEINA IIGLY. PhD Thesis, School of Biological Sciences, University of Surrey, U.K. 1999.
9. De Vizcaya-Ruiz A.M.G., Rivero-Müller A., Ruiz-Ramirez L., Dobrota M. HEMATOLOGICAL EFFECT OF CASIOPEINA IIGLY A NOVEL COPPER-



- 
- BASED ANTICANCER AGENT. *Proceedings of the American Association for Cancer Research* **39**, 328. New Orleans, LA, USA. 1998.
10. DeGeorge J.J., Ahn C., Andrews P.A., Brower M.E., Giorgio D.W., Goheer M.A., Lee-Han D.Y., McGuinn W.D., Schmitd W., Sun J.C. and Tripathi S.C. REGULATORY CONSIDERATIONS FOR PRECLINICAL DEVELOPMENT OF
  11. Ford James L, PHARMACEUTICAL THERMAL ANALYSIS THECHNIQUES AND APPLICATIONS, ELLIS HOWOORT LIMITED, pp. 25-67, first published in 1989.
  12. Franks L.M. INTRODUCTION TO THE CELLULAR AND MOLECULAR BIOLOGY OF CANCER. Oxford Univ. Press. 1996.
  13. Fricker S.P. METAL COMPOUNDS IN CANCER THERAPY. 1<sup>st</sup> edn. Chapman and Hall. London U.K. 1994.
  14. Girón Danielle, APPLICATIONS OF THERMAL ANALYSIS AND COUPLED TECHNIQUES IN PHARMACEUTICAL INDUSTRY, JOURNAL OF THERMAL ANALYSIS AND CALORIMETRY, pp.335-357, vol 68 (2002).
  15. Gracia I., Ruiz-Ramirez L., Huerta M.L., Mayet M.L., Tinoco M. KNIGHT'S MOVE IN THE PERIODIC TABLE, FROM PLATINUM TO COPPER, NEW ANTICANCER COMPOUNDS, CASIOPEINAS. *IN VIVO* EVALUATION I. *Metal Based Drugs*, 2002.
  16. Gracia I., Ruiz-Ramirez L., Romero L., Márquez A., Gómez-Ruiz C., Tinoco M., Bravo M.E. KNIGHT'S MOVE IN THE PERIODIC TABLE, FROM PLATINUM TO COPPER, NEW ANTICANCER COMPOUNDS, CASIOPEINAS. *IN VITRO* EVALUATION. *Metal Based Drugs* **8**, 19-28, 2001.
  17. Hellman S. and Vokes E.E. ADVANCING CURRENT TREATMENTS FOR CANCER IMPROVING CONVENTIONAL THERAPY. *Scientific American* (What you need to know about cancer) **275**, 84-89, 1996.





- 
18. Hickinsh T. PRINCIPLES OF MEDICAL ONCOLOGY. In: *A Multidisciplinary Textbook*, Horwich A. (Ed.), pp. 135-146. Chapman and Hall, London U.K. 1995.
  19. Hnatowich D.J. THE *IN VIVO* AND *IN VITRO* USE OF METALLIC RADIOISOTOPES IN CANCER THERAPY. In: *Metal Compounds in Cancer Therapy*. Fricker S.P. (Ed.), pp. 215-247. Chapman and Hall, London, U.K. 1994.
  20. Hobart H, Willard, INSTRUMENTAL METHODS OF ANALYSIS, Sixth Edition, D. Van Nostrand Company, pp. 175-209, New York, Toronto, London 1989.
  21. Kelland L.R. PLATINUM ANTICANCER DRUGS. In: *Metal Compounds in Cancer Therapy*. Fricker S.P. (Ed.) 1<sup>st</sup> edn, pp. 32-45. London: Chapman and Hall. London U.K, 1994.
  22. Kelley S.L., Basu A., Teicher B.A., Hacker M.P., Hamer D.H. and Lazo J.S. OVEREXPRESSION OF METALLOTHIONEIN CONFER RESISTANCE TO ANTICANCER DRUGS. *Science* **241**, 1813-1815, 1988.
  23. Keppler B.K. METAL COMPLEXES IN CANCER CHEMOTHERAPY. First edn. Weinheim: VCH. Germany, 1993.
  24. Köpf-Maier P. COMPLEXES OF METALS OTHER THAN PLATINUM AS ANTITUMOR AGENTS. *European Journal of Clinical Pharmacology* **47**, 1-16, 1994.
  25. Kratz F. and Schütte M.T. ANTICANCER METAL COMPLEXES AND TUMOR TARGETING STRATEGIES. *Cancer Journal* **11**, 176-182.
  26. Lechatelier H, BULL. SOC. FR. MINER. CRYSTALOGR. **10**, 204, 1987.
  27. Mark Tittle: CASIOPEINA. Reg 407543 SECOFI, 1992.
  28. Miller Y.I. Felikman Y. and Shaklai N. HEMOGLOBIN INDUCED APOLIPOPROTEIN B CROSSLINKING IN LOW-DENSITY LIPOPROTEIN PEROXIDATION. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **236**, 252-260, 1996.



- 
29. Nobel C.S.I., Kimland M., Lind B., Orreius S. and Slater A.F.G. DITHIOCARMABATES INDUCE APOPTOSIS IN THYOMOCYTES BY RAISING THE INTRACELLULAR LEVEL OF REDOX-ACTIVE COPPER. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 26202-26208, 1995.
  30. Patterson J.S., Battersley L.A. and Edwards D.G. REVIEW OF THE CLINICAL AND INTERNATIONAL EXPERIENCE WITH TAMOXIFEN IN ADVANCED BREAST CANCER. *Endocrine Treatment Reviews* **9**, 563-582, 1981.
  31. Remington, Joseph Prince: Farmacia, edición 17, Medical Panamerica, 1987
  32. Rivero-Müller A., Plant N., Ruiz-Ramirez L., De Vizcaya-Ruiz A. and Dobrota M. COPPER COMPLEXES WITH ANTICANCER ACTIVITY RAPIDLY DEGRADE DNA. *Anticancer Research* **18**, 4936, 1998.
  33. Rivero-Müller A., Plant N., Ruiz-Ramirez L., De Vizcaya-Ruiz A. and Dobrota M. DEGRADATION OF DNA BY THE COPPER-BASED ANTICANCER AGENT CASIOPEINA II. *Human and Experimental Toxicology* **17**, 531, 1998.
  34. Ruiz Azuara L, DIRECCIÓN GENERAL DE INVERSIONES, MARCAS Y DESARROLLO TECNOLÓGICO. SECIFI. Registros Núm 18801-120579 y 188802-120580. U.S. Patent Number Ap.21 (1992), 5, 107, 005.
  35. Ruiz -Azuara L. PROCES TO OBTAIN NEW MIXED COPPER AMINOACIDATE COMPLEXES FROM PHENYLATEPHENANTROLINE TO BE USED AS ANTICANCERIGENIC AGENT. U.S. Patent aplicacion serial No. 07/628,843, Ap21 (1992) Number 5, 107, 005. U.S. Patent Re35, 458, Feb. 18, 1997.
  36. Ruiz Ramirez 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. and Natarajan A.T. CASIOPEINAS, METAL-BASED DRUGS A NEW CLASS OF ANTINEOPLASTIC AND GENOTOXIC COMPOUNDS. *Journal of Inorganic Biochemistry* **59**, 207, 1995.





37. Ruiz-Azuara L. PROCES TO OBTAIN NEW MIXED COPPER AMINOACIDATE FROM METHYL PHENANTROLINE COMPLEXES TO BE USED AS ANTICANCERIGENIC AGENTS. U.S. Patent applications serial No. 07/628,628., (1992), Pat. No. A5,576,326. Nov. 19,1996.
38. Skoog Douglas A. QUIMICA ANALITICA INSTRUMENTAL, Editorial Reverté, S.A, Cuarta Edición, Barcelona,pp.562-580, España 1997.
39. Strobel,Hower A. CHEMICALINSTRUMENTATION A SISTEMATIC APPROACH, Third dition, A Whiley-Interscience publications, pp.64-67, Canada 1989.
40. Tannock I.F. EXPERIMENTAL CHEMOTHERAPY. In: Tannock I.F. and Hill R.P. (Eds.) *The Basic Science of Oncology*, Second edn. pp. 338-359. Baskerville: McGraw-Hill. 1992.
41. THE AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS.(ASTM), DESIGNACIÓN E 473-00, STANDAR TERMINOLOGY RELATING TO THERMAL ANALISIS, Copyright 2003: ASTM, International.
42. THE UNITED STATES PHARMACOPEIA, USP XXIV, 2000, UNITED STATES PHARMACOPEIAL CONVENTION, INC. pp. 1971-1978
43. Valls Oriol, Del Castillo Benito, TÉCNICAS INSTRUMENTALES EN FARMACIA Y CIENCIAS DE LA SALUD, EDICIÓN MEXICANA, pp. 643-650, México, Abril 2002.
44. Voigt, R. TRATADO DE TECNOLOGIA FARMACEUTICA ( LEHRBUCH DER PHARMAZEUTISCHEN), Editorial Acribia, pp. 66-82. Zaragoza España. 1982.





---

# APENDICE





## APÉNDICE

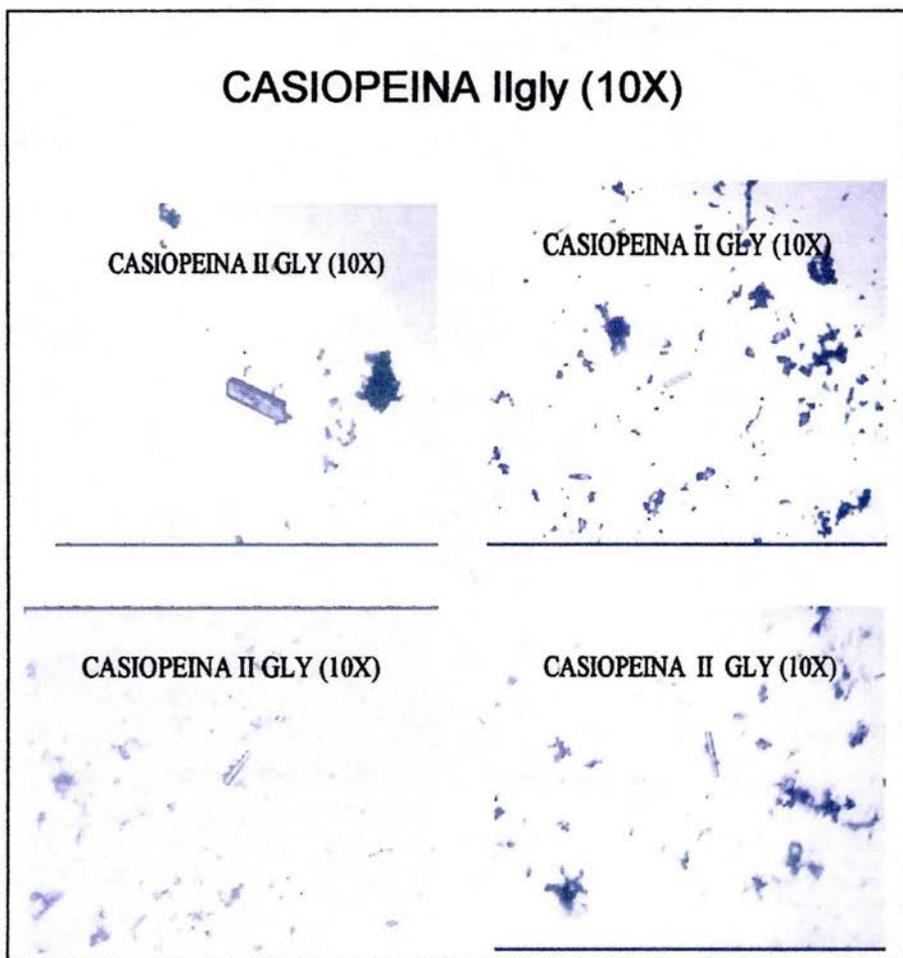


Fig.22 Micrografia Casiopeína IIgly, con un aumento de ocular 10X



## CASIOPEINA IIgly (40X)

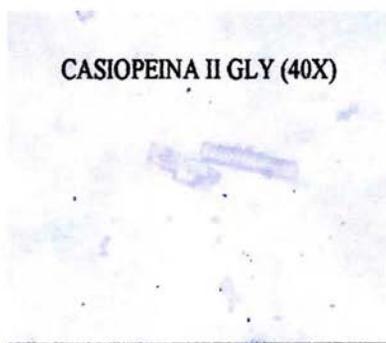


Fig.23 Micrografía Casiopeína IIgly, con un aumento de ocular 40X



## CASIOPEINA III-i (10X)

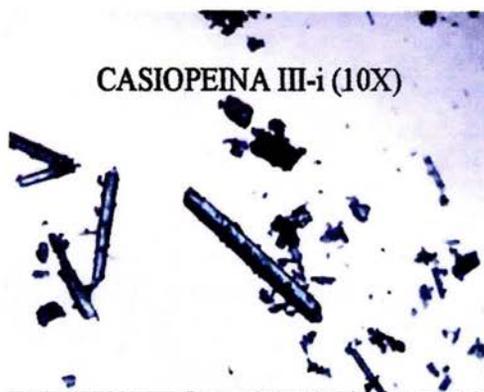
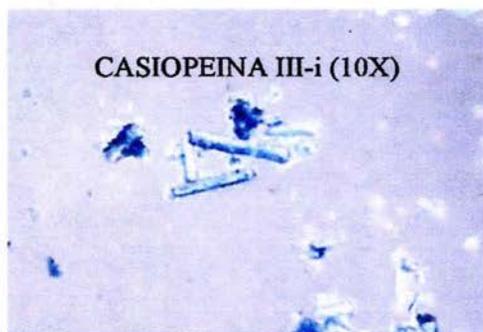


Fig. 24 Micrografía Casiopeína III-i, con un aumento de ocular 10X



## CASIOPEINA III-I (40X)



Fig.25 Micrografía Casiopeína III-i, con un aumento de ocular 40