



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

FACULTAD DE QUÍMICA

VALIDACION DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA LA  
CUANTIFICACIÓN DE CASIOPEINA IIGLY EN ORINA POR  
CLAR, PARA SU APLICACIÓN EN UN ESTUDIO  
PRECLÍNICO EN RATAS.

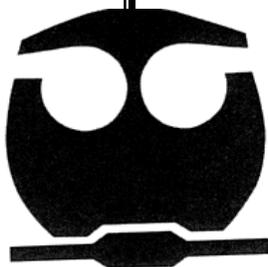
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A

GLADYS JANET REYES SANCHEZ



MÉXICO, D.F.

2007

---



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: Dra. Lena Ruiz Azuara**

**Vocal: Dra. Inés Fuentes Noriega**

**Secretario: Prof. Sofía Margarita Rodríguez Alvarado**

**1er. Suplente: Prof. Lauro Misael del Rivero Ramírez**

**2º. Suplente: Prof. Luis Jesús García Aguirre**

**El presente trabajo se realizó en los Laboratorios 112 y 113 de Biofarmacia del Conjunto E, en la Facultad de Química de la UNAM.**

---

**Asesora: Dra. Inés Fuentes Noriega**

---

**Supervisor técnico: M. en C. Roberto Carlos Cañas Alonso**

---

**Sustentante: Reyes Sánchez Gladys Janet**

## *AGRADECIMIENTOS*

*Un hombre sabio  
se procurará más oportunidades  
de las que se le presentan.*

*Francis Bacon*

*Agradezco por el apoyo*

*A los proyectos*

**PAPIIT No. IN204706-3**

**CONACYT Sectorial Salud C01-7677**

**PAIP 6390-05**

**PAPIME PE 205805**

*Al Subprograma 127 de la Facultad de Química.*

*Estar preparado es importante,  
saber esperar lo es aún más,  
pero aprovechar el momento adecuado  
es la clave de la vida.*

*Arthur Schnitzler*

*A la Universidad Nacional Autónoma de México por todo las enseñanzas que me dió a lo largo de los años en ella.*

*A la Facultad de Química, que me formó tanto en el aspecto profesional como personal.*

*A todos mis maestros de la Universidad, quienes me brindaron sus conocimientos y experiencia para lograr en mí una mejor profesionista.*

*A mis amigos y compañeros de la Facultad de Química: Mario, Lulu, Jenny, América, Rocío, Erika, Malena, Edgar y Pao. Porque gracias a ellos la estancia en la Universidad fue aún más placentera.*

*Que nuestra amistad perdure a través de los años.*

*A la Unidad de Experimentación Animal, en especial a las MVZ's Lucía Macías y Marisol Rivera por su apoyo para la realización de este trabajo.*

*A la Dra. Inés Fuentes Noriega. Gracias por haber creído en mí y aceptarme en su grupo de trabajo.*

*A la Dra. Lena Ruiz Azuara, gracias por haber creado el Gran Proyecto de Casiopeínas y por su colaboración en mi trabajo.*

*A mis compañeros del laboratorio de Biofarmacia: Amada, Lupita, Pilar, Luz, Roberto, Alberto, Nils, Nohemí, Yolanda. Gracias por su apoyo y por los conocimientos que en su momento me brindaron.*

*Dedico este trabajo:*

*En especial y con gran agradecimiento a mis padres  
Martha Sánchez y Onofre Reyes, que me apoyaron incondicionalmente  
durante mi preparación profesional y durante la elaboración de este  
trabajo.*

*Su fuerza y amor me enseñaron el camino de la vida y me dieron las alas  
que necesitaba para volar.*

*A mis hermanos Araceli y Ernesto, por su apoyo y comprensión en todos  
los años que llevamos juntos, así como a mi cuñada Susana, en los pocos  
años que llevamos de conocernos.*

*A Omar Romero, por su comprensión, apoyo incondicional y entusiasmo  
con que siempre vió y ve mi trabajo. Gracias por un montón de hermosos  
momentos compartidos y por los que aún nos quedan por compartir.*

*A mi Tía Olga y mis primos Rafael, Lidia y Selene.*

*A mi Abuelita Elvira.*

*A todos GRACIAS, los quiero mucho.*

*Le doy gracias a la vida por todas las oportunidades que ha puesto  
en mi camino para mejorar día a día.*



[ *ÍNDICE* ]



INDICE DE CONTENIDO

**I. Introducción**

1.1 Resumen.....14

**II. Antecedentes**

2.1 Cáncer.....15

    2.1.1 Orígenes y etapas del cáncer.....15

    2.1.2 Metástasis.....16

    2.1.3 Tipos de cáncer.....17

    2.1.4 Estadísticas del cáncer.....17

2.2 Tratamiento del cáncer.....18

    2.2.1 Quimioterapia.....18

    2.2.2 Fármacos de Base Metálica.....20

2.3 Cobre.....21

    2.3.1 Toxicocinética.....21

        2.3.1.1 Absorción.....21

        2.3.1.2 Distribución..... 22

        2.3.1.3 Metabolismo.....22

        2.3.1.4 Excreción.....22

    2.3.2 Mecanismo de acción.....23

    2.3.3 Efectos en la salud por exceso del cobre.....23

2.4 Casiopeínas.....24

    2.4.1 Casiopeína II-gly.....25



2.5 Proceso de Desarrollo de un Fármaco Nuevo.....	29
2.5.1 Estudio para el Desarrollo de las Casiopeínas.....	31
2.6 Métodos Bioanalíticos.....	32
2.6.1 Validación de Métodos Bioanalíticos.....	32
2.7 Cromatografía .....	34
2.8 Farmacocinética.....	39
2.9 Justificación.....	41
2.10 Hipótesis .....	42
2.11 Objetivos .....	42
<b>III. Parte Experimental.</b>	
3.1 Material.....	51
3.1.1 Estándares.....	51
3.1.2 Reactivos.....	51
3.1.3 Equipos e instrumentos.....	52
3.1.4 Material Biológico.....	53
3.2 Preparación de Reactivos y Soluciones.....	53
3.2.1 Soluciones y reactivos para el desarrollo y validación del Método.....	53
3.2.2 Soluciones para el Estudio Preclínico.....	56
3.2.3 Fase Móvil.....	57
3.2.4 Curvas de Calibración y Puntos Control.....	58
3.3 Desarrollo del Método Analítico.....	59
3.3.1 Elección de las Condiciones Cromatográficas.....	59



3.3.2 Selección del Estándar Interno (EI).....	60
3.3.3 Condiciones Cromatográficas Optimizadas.....	61
3.3.4 Procesamiento de las muestras de orina.....	61
3.4 Validación del Método Analítico.....	63
3.4.1 Intervalo de trabajo.....	64
3.4.2 Linealidad del Sistema.....	64
3.4.3 Linealidad del Método.....	64
3.4.4 Precisión del Método.....	65
3.4.5 Exactitud del Método.....	66
3.4.6 Recuperación Absoluta.....	67
3.4.7 Selectividad del Método.....	67
3.4.8 Límite de detección.....	68
3.4.9 Límite de cuantificación.....	69
3.4.10 Estabilidad de la muestra.....	69
3.5 Farmacocinética preclínica en ratas macho Wistar.....	71

#### **IV. Resultados y Discusión.**

4.1 Desarrollo del Método Cromatográfico.....	73
4.1.1 Elección de las Condiciones Cromatográficas.....	73
4.1.2 Selección del Estándar Interno.....	74
4.2 Validación del Método Analítico.....	75
4.2.1 Linealidad del Sistema.....	75



4.2.2 Linealidad del Método.....	76
4.2.3 Precisión del Método.....	77
4.2.4 Exactitud del Método.....	78
4.2.5 Recuperación Absoluta.....	78
4.2.6 Selectividad del Método.....	79
4.2.7 Límite de detección.....	82
4.2.8 Límite de cuantificación.....	82
4.2.9 Estabilidad de la Muestra.....	83
4.3 Discusión de la Validación del Método Analítico.....	85
4.4 Farmacocinética preclínica en ratas macho Wistar.....	87
4.5 Discusión de la Farmacocinética preclínica en ratas macho Wistar.....	91
<b>V. Conclusiones</b>	
5.1 Conclusiones.....	95
5.2 Perspectivas.....	96
<b>VI. Bibliografía.....</b>	<b>97</b>
<b>INDICE DE TABLAS</b>	
Tabla 1. Dosis letal para Casiopeína II-gly.....	31
Tabla 2. Curva patrón de casiopeína II-gly en orina y solución de fase móvil.....	58
Tabla 3. Puntos Control de casiopeína II-gly en orina y solución de fase móvil.....	58



Tabla 4. Requisitos para elección de condiciones cromatográficas.....	59
Tabla 5. Parámetros obtenidos para optimización de condiciones cromatográficas.....	73
Tabla 6. Linealidad del sistema para la cuantificación de Casiopeína II-gly.....	75
Tabla 7. Linealidad del método analítico para la cuantificación de Casiopeína II-gly....	76
Tabla 8. Repetibilidad del método para la cuantificación de Casiopeína II-gly.....	77
Tabla 9. Reproducibilidad del método para la cuantificación de Casiopeína II-gly.....	77
Tabla 10 . Exactitud del método para la cuantificación de Casiopeína II-gly.....	78
Tabla 11. Recobro absoluto de Casiopeína II-gly en tres niveles de concentración .....	78
Tabla 12. Límite de Cuantificación de Casiopeína II-gly .....	82
Tabla 13. Estabilidad de la muestra en congelación por tres días.....	83
Tabla 14. Estabilidad de la muestra en congelación por siete días.....	83
Tabla 15. Estabilidad de Casiopeína II-gly durante dos ciclos de congelación-descongelación.....	84
Tabla 16. Estabilidad de la muestra procesada.....	84
Tabla 17. Resultados de Urianálisis (Rata administrada con Casiopeína 23-30 horas).	88

**INDICE DE FIGURAS.**

Figura 1. Moléculas del cisplatino y carboplatino.....	23
Figura 2. Molécula de la Casiopeína II-gly.....	30
Figura 3. Proceso de Desarrollo de un Fármaco Nuevo.....	36
Figura 4. Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución. Componentes.....	41
Figura 5. Diagrama de Cromatografía de par iónico.....	44



Figura 6. Diagrama de flujo del procesamiento de la muestra.....	62
Figura 7. Estudio de Farmacocinética preclínica en ratas.....	71
Figura 8. Estándar Interno (Guaifenesina) y Casiopeína II-gly.....	74
Figura 9. Gráfica de Linealidad del Sistema para Casiopeína II-gly.....	75
Figura 10. Gráfica de Linealidad del Método para Casiopeína II-gly.....	76
Figura 11. Cromatograma de Blanco de orina.....	79
Figura 12. Cromatograma de Orina adicionada con 150 µg/mL de Guaifenesina (EI)...	79
Figura 13. Cromatograma de Orina adicionada con Casiopeína II-gly y Guaifenesina .....	80
Figura 14. Cromatograma de Orina adicionada de 3 µg/mL de Casiopeína IIgly.....	80
Figura 15. Cromatograma de orina adicionada con 4,7-dimetil-1,10-fenantrolina y EI...81	
Figura 16. Cromatograma de Orina adicionada con [Fe(4,7-dimetil-1,10 fenantrolina) <sub>3</sub> ] SO <sub>4</sub> ...y EI.....	81
Figura 17. Cromatograma de muestra de orina de rata Control.....	89
Figura 18. Cromatograma de muestra de orina de rata administrada con Casiopeína IIgly (tiempo 48-80 hr).....	89
Figura 19. Cromatograma de una muestra de orina de rata administrada con 4,7-dimetil-1,10-fenantrolina (tiempo (48-80 hr).....	90
Figura 20. Coloración de orina de ratas del estudio A) Control, B) 4,7-dimetil-1,10-fenantrolina y C) Casiopeína II-gly.....	90



[ *I. INTRODUCCIÓN* ]



### 1.1 RESUMEN

El cáncer ocupa el tercer lugar de causa de muerte en México. En la búsqueda de nuevos fármacos antineoplásicos con menor toxicidad, que puedan combatir tumores refractarios y que posean selectividad citotóxica, en la Facultad de Química de la UNAM se diseñaron y sintetizaron las CASIOPEINAS®, compuestos de coordinación de cobre (II) con un ligante bidentado (N,N) y otro aminoacidato (N,O). De estos compuestos, uno de los más prometedores es la Casiopeína II-gly®, debido a su ya probada actividad citotóxica, la cual actúa contra tumores como L1210, B16 y S180; células tumorales humanas como HeLa, CaLo y CH1 Calo, y CH1. Dicho compuesto fue objeto de estudio en el presente trabajo.

El objetivo del proyecto fue optimizar, desarrollar y validar un Método Analítico por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR), para cuantificar la Casiopeína II-gly en orina de rata, con el fin de utilizarlo en un estudio preclínico de farmacocinética.

Se validó el método de acuerdo a la NOM-177-SSA1-1998, utilizando un Cromatógrafo Agilent 1100, Columna C18 Phenomenex Luna a 25°C. La fase móvil: Hexansulfonato de sodio 5 mM, EDTA 2mM; pH 3.5/ Metanol (55:45) a 1 mL/min y  $\lambda=273$  nm. Se inyectaron 50  $\mu$ L. El estándar Interno fue Guaifenesina 150  $\mu$ g/mL.



Se realizó un estudio preclínico Farmacocinético utilizando 15 ratas divididas en tres grupos: 1) dos ratas control, 2) 11 ratas administradas con una dosis de 3.9 mg/kg de Casiopeína II-gly 3) dos ratas administradas con una dosis de 1.8 mg/kg de 4,7-dimetil-1,10-fenantrolina, con el objetivo de conocer datos farmacocinéticos de ambos compuestos y compararlos, siendo la 4,7-dimetil-1,10-fenantrolina un componente de la Casiopeína II-gly en un 46.91%.

La administración se realizó por bolo intravenoso en la cola; las muestras de orina se recolectaron de: 0-1, 1-2, 2-3, 3-4, 4-7, 7-11, 11-23, 23-30, 30-48 y 48-80 horas.

El Método fue lineal ( $r^2 = 0.9980$ ) en el intervalo de 5 a 50  $\mu\text{g/mL}$  y sensible hasta 5  $\mu\text{g/mL}$ . Fue preciso con un máximo coeficiente de variación de 13.05%. El recobro absoluto promedio fue 95.38%.

En el estudio preclínico, no se logró cuantificar Casiopeína II-gly y 4, 7-dimetil-1,10-fenantrolina en orina, observándose un cambio en la coloración del fluido; en los primeros tiempos de recolección se observó una coloración rosado-naranja en muestras de ratas administradas tanto con Casiopeína II-gly y 4,7-dimetil-1,10-fenantrolina, adicionalmente se observó una coloración vino intenso únicamente en el 63% de las ratas administradas con Casiopeína II-gly en el intervalo de 23 a 30 horas. En base a los resultados obtenidos se piensa que la Casiopeína II gly pudo ser metabolizada o excretada por otra vía.



**[** *II. ANTECEDENTES* **]**



### 2.1 **CANCER**

El cáncer consiste en el crecimiento descontrolado y la diseminación de células anormales en el organismo, que invaden y dañan tejidos y órganos. Su aparición no se debe a un único factor sino a la combinación de varios factores que se engloban en dos grupos: la herencia genética y el ambiente (multigénico y multifactorial). Por otra parte, en la aparición de la mayoría de los tipos de cáncer influye sobre todo la exposición a agentes químicos y radiaciones que afectan a las células alterándolas genéticamente, así como los hábitos de vida (tabaco, alcohol, dieta...) y algunas infecciones (ciertos virus causantes de papilomas genitales, de la hepatitis B,...) <sup>(1)</sup>.

#### 2.1.1 **Orígenes y etapas del Cáncer**

El cáncer se origina debido a alteraciones en el ADN que provocan una proliferación celular incontrolada. La mayoría de estas alteraciones implica cambios en la secuencia real del ADN (mutación), que pueden originarse como consecuencia de errores aleatorios de repetición, exposición a carcinógenos o defectos en los procesos de reparación del ADN.

Dos son los aspectos característicos que definen al cáncer: el crecimiento celular no regulado por señales externas (autónomo) y la capacidad de invadir tejidos y metastizar y colonizar lugares a distancia. El cáncer es más frecuente en tejidos con un recambio rápido, sobre todo en los expuestos a carcinógenos ambientales y en aquellos cuya proliferación está regulada por hormonas. Las alteraciones genéticas más frecuentes consisten en la activación de protooncogenes o la inactivación de genes supresores tumorales.



## II. ANTECEDENTES

---



La primera fase de un tumor se le llama *iniciación*, es la alteración de la capacidad de proliferación de una célula como resultado de una mutación en uno de los genes que la controlan. Esta célula iniciada crece a una velocidad ligeramente superior a las normales, y puede pasar inadvertida durante un periodo de tiempo muy largo.

El aumento de la incidencia del cáncer provocado por una repetida exposición a un carcinógeno de cualquier tipo indica la necesidad de mutaciones sucesivas. La incidencia es posible aumentarla por tratamiento con sustancias llamadas promotores tumorales. Estos actúan modificando los productos de genes implicados en el control de la proliferación celular, de modo que su papel es colaborar con la mutación iniciadora, y solo causan cáncer cuando actúan de modo repetido tras el carcinógeno iniciador.

La siguiente fase, *la promoción*, es aquella en la que el agente promotor estimula el crecimiento de las escasas células iniciadas que con una sola mutación tenían ligeramente alterado el crecimiento. Este aumento de células con una mutación favorece la posibilidad de que alguna de ellas acumule una nueva mutación, que la haga proliferar de forma más rápida, ya que la división celular aumenta el riesgo de adquirir mutaciones.

La tercera fase es la *progresión tumoral* o adquisición de nuevas alteraciones genéticas que provocan un aumento de la malignidad, con adquisición de capacidad invasiva y metastásica <sup>(1)</sup>.



### 2.1.2 Metástasis

El fallo de los tratamientos y la muerte de los pacientes con cáncer son casi siempre debido a la metástasis. La capacidad de formar metástasis se basa en la adquisición de invasividad por las células del tumor primario. Por tanto, la *invasividad* es una característica esencial del cáncer. La metástasis requiere tumorigenicidad e invasividad, procesos que se inician en este orden pero que se solapan parcialmente, de modo que mutaciones que proporcionan a las células tumorales la capacidad de invadir y formar posteriormente metástasis se comienzan a acumular ya durante la fase de crecimiento del tumor primario. El crecimiento de un tumor, tanto primario como secundario, mayor de 5-10 mm de diámetro requiere de vascularización. Sin la cercanía de vasos sanguíneos, las células tumorales no solo no pueden diseminarse, sino que mueren por deficiencia de nutrientes y oxígeno, y la incapacidad de eliminar sustancias de desecho. La angiogénesis, o formación de nuevos vasos sanguíneos es fundamental tanto al comienzo como al final del proceso de carcinogénesis. Al principio para el aumento del tamaño del tumor primario y para el acceso al torrente circulatorio de las células tumorales, lo que permitirá su diseminación. Y al final, cuando alguna célula ha sobrevivido a la extravasación y coloniza tejidos distantes, para poder reiniciar el crecimiento de nuevos tumores secundarios <sup>(1)</sup>.

### 2.1.3 Tipos de Cáncer

En nuestro organismo existe variedad de tipos celulares, y si en principio cualquiera de ellas puede potencialmente originar un tumor, en realidad el 90 % de los tumores se originan a partir de células epiteliales (carcinomas).



Otros tipos mayoritarios de tumores son los derivados de tejido conectivo o muscular (sarcomas), de la sangre (leucemias, linfomas, mielomas), o de células del sistema nervioso (neuroblastomas, gliomas).

### **2.1.4 Estadísticas del Cáncer**

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha indicado que desde la edad madura hasta la vejez, una de las principales causas de muerte en las mujeres es el cáncer, y las cardiopatías en los hombres.

En México en 2005, los tumores malignos fueron la *tercera causa de muerte*, 63 128 personas fallecieron por dichos problemas, lo que representó el 12.7 % del total de las defunciones registradas.

En varones, el mayor porcentaje de las defunciones por tumores malignos corresponden a los de tráquea, bronquios y pulmón con un 15.6 %, el cáncer de próstata y estómago ocasionan el 15.5 % y 9.1 % respectivamente.

En las mujeres, el 13.3% de las defunciones se presentan por cáncer cérvico-uterino y un 13.1% muere por cáncer de mama; además el 7.9% de las muertes es ocasionado por cáncer de hígado <sup>(2)</sup>.

## **2.2 TRATAMIENTO DEL CANCER**

El objetivo primario del tratamiento del cáncer es erradicarlo. Si este objetivo no puede lograrse, el objetivo pasa a ser la paliación, la disminución de los síntomas y la conservación de la calidad de vida al tiempo que se intenta prolongar ésta. Todos los tratamientos contra el cáncer tienen el potencial de causar daño.



El índice terapéutico de muchas intervenciones es muy estrecho, y la mayoría de los tratamientos se administran a una dosis que provoca toxicidad. Uno de los desafíos del tratamiento del cáncer radica en utilizar las diversas modalidades de tratamiento de forma aislada y en combinación para aumentar al máximo las posibilidades de beneficio para el paciente.

Los tratamientos contra el cáncer se dividen en cuatro grupos principales: cirugía, radioterapia, *quimioterapia* (incluida la terapia hormonal) y terapia biológica (incluida inmunoterapia). Estos tratamientos se utilizan frecuentemente en combinación.

### 2.2.1 Quimioterapia

Los agentes quimioterapéuticos se utilizan habitualmente para el tratamiento del cáncer que desarrolla metástasis. Si un tumor está localizado en un único sitio, debe considerarse seriamente la posibilidad de cirugía o radioterapia primaria. La quimioterapia puede utilizarse tras el fracaso de estas modalidades para erradicar un tumor local o como parte de un enfoque multimodal para ofrecer tratamiento primario a un tumor clínicamente localizado. La quimioterapia puede administrarse como adyuvante de la cirugía o de la radiación <sup>(3)</sup>.

Todos los fármacos antineoplásicos son citotóxicos lo que significa que afectan el desarrollo tanto de células normales como neoplásicas. Sin embargo, dado que las células neoplásicas son mucho más efectivas y se multiplican con mayor rapidez que las normales, son más susceptibles al efecto de los fármacos <sup>(4)</sup>.



Se pueden agrupar los fármacos en categorías generales:

- I) Agentes Alquilantes. Forman uniones covalentes con los grupos amino, carboxilo, sulfhidrilo y fosfato en importantes moléculas biológicas. Los más importante sitios de alquilación son en DNA, RNA y proteínas. Estos fármacos dependen de la proliferación celular para tener actividad, pero no son específicos de alguna fase del ciclo celular. Esta clase de fármacos, incluye mostazas nitrogenadas, nitrosureas y *complejos de platino* además de otros agentes antineoplásicos.
- II) Antimetabolitos. Análogos estructurales de metabolitos naturales involucrados en la síntesis de DNA y RNA. Son más activos cuando la célula está en la fase S y tiene poco efecto en fase G<sub>0</sub>. Por lo tanto son más activos contra tumores con un alto factor de crecimiento.(Metotrexano, mercaptopurina, fluorouracil, hidroxiurea).
- III) Productos Naturales. Obtenidos de plantas, hongos y bacterias. Tienen potentes efectos citotóxicos. Se dividen en: antibióticos antitumorales (bleomicina), antraciclinas, Epidofilotoxinas (etopósido), Alcaloides de la Vinca, Taxanos y Análogos de la campotecina.
- IV) Anticuerpos Monoclonales. Han sido ya utilizados desde los años 90's. El primer anticuerpo que mostró utilidad en oncología médica fue rituximab para linfoma de Hodgkin. Desde entonces el número de anticuerpos ha ido incrementando.<sup>(5)</sup>



## 2.2.2 Fármacos De Base Metálica

### Compuestos de Platino.

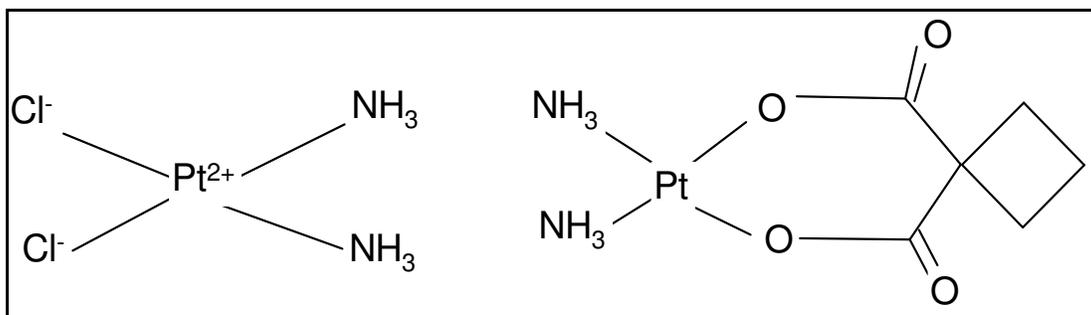


Figura 1. Moléculas del Cisplatino y Carboplatino

El Cisplatino (*cis*-diaminodicloroplatino (II)) es un miembro de los complejos de coordinación de platino. El cisplatino y sus derivados (Fig. 1), forman fuertes intermediarios electrofílicos que actúan vía reacciones de sustitución nucleofílica para formar inter- e intra-uniones con el DNA, es utilizado en el tratamiento de tumores sólidos y metástasis de vejiga, testículos y carcinomas ováricos. Es administrado vía intravenosa o intraperitoneal, se une a proteínas en un 90%, se distribuye en la mayoría de los tejidos y es excretado sin cambio en su estructura por el riñón.

El mecanismo de acción del cisplatino involucra la interacción con el DNA, lo cual resulta en la desnaturalización de la cadena de DNA.

El cisplatino daña la mitocondria de la célula, inhibe la actividad ATPasa, altera el sistema de transporte celular y eventualmente causa apoptosis, inflamación, necrosis y muerte de la célula.



## II. ANTECEDENTES

---



Se ha observado que el cisplatino induce daño y necrosis en el riñón predominantemente en el segmento S3 de los túbulos proximales en la región corticomedular.

El cisplatino tiene una acción sinérgica citotóxica con radiación y otros agentes quimioterapéuticos. La mayor limitación en la aplicación de cisplatino a la clínica ha sido el desarrollo de resistencia a este por algunos tumores.

Los efectos tóxicos de este fármaco en humanos y animales incluyen nefrotoxicidad, ototoxicidad, neurotoxicidad y supresión en médula ósea.

Alrededor del 20% de daño agudo renal que ocurre en pacientes hospitalizados es debido a la nefrotoxicidad del cisplatino, la cual es debida a una vía metabólica compleja que activa el fármaco a una toxina potente. Debido a las medidas profilácticas intensivas, el daño renal irreversible ocurre en un tercio de pacientes tratados con cisplatino <sup>(6)</sup>.



### 2.3 COBRE

El cobre es el primer elemento del Grupo IB o grupo 11 de la tabla periódica y presenta cuatro estados de oxidación: Cu(O), Cu (I), Cu (II), y Cu (III), siendo el segundo y tercero los más comunes. Es un metal que se presenta naturalmente en rocas, aceites, agua, sedimentos y en el aire en bajas concentraciones. También se encuentra en plantas y animales. Es un elemento esencial para todos los organismos vivos. Es el componente de un número de metaloenzimas como catalasa, peroxidasa y citocromo oxidasa, y es esencial para la utilización de hierro en el organismo<sup>(7)</sup>.

#### 2.3.1 Toxicocinética<sup>(7,8)</sup>

##### 2.3.1.1 Absorción.

La absorción de cobre ingerido, ocurre principalmente en la porción superior del tracto gastrointestinal. Se absorbe como cobre iónico o unido a aminoácidos. El mecanismo de absorción involucra la liberación del cobre a la superficie celular, para así unirse a la metalotioneina o a alguna otra proteína intestinal. El cobre unido a metalotioneina puede ser lentamente liberado a la sangre (unido a albúmina y aminoácidos 1 a 2 horas después de la administración) o ser excretado. Un factor que afecta su absorción, es la competencia con otros metales (zinc, hierro y cadmio).



### *2.3.1.2 Distribución.*

El cobre unido a la albúmina plasmática y a aminoácidos en la sangre portal es transportada al hígado donde es incorporada a la ceruloplasmina y más tarde liberada al plasma. La ceruloplasmina se une a 6 o 7 átomos de cobre, y es la proteína de cobre más abundante en el plasma; 60-95% de cobre plasmático está unido a ella en plasma humano de adulto. El Cobre hepático es distribuido en muchas fracciones subcelulares asociadas con enzimas y proteínas cobre-dependientes. También se une a eritrocitos en forma de eritrocupreína (superóxido dismutasa) y otras proteínas, y en médula ósea unido a metalotioneina. En la enfermedad de Wilson (desorden genético caracterizado por deterioro del metabolismo del cobre) son encontrados altos niveles de cobre en hígado, riñón, cerebro, huesos y córnea de pacientes.

### *2.3.1.3 Metabolismo*

El metabolismo del cobre consiste principalmente en su interacción con varios ligantes orgánicos, más notablemente grupos sulfhidrilo e imidazol de aminoácidos y proteínas. El hígado, es el órgano más importante involucrado en la disposición del cobre, sirve como depósito de cobre; como sitio de síntesis de ceruloplasmina, la cual es liberada a la sangre; y como un sitio de formación de varios complejos de cobre para su subsecuente eliminación. La vida media del cobre inyectado en humanos normales fue aproximadamente de 4 semanas <sup>(7)</sup>.



### *2.3.1.4 Excreción.*

La vía biliar es la principal vía para su excreción. El cobre biliar es regresado al intestino y excretado en heces. Un trabajo realizado mostró que después de la administración oral de cobre radiactivo como acetato de cobre en humanos saludables, el 72% de cobre fue excretado en las heces. <sup>(8)</sup>

Sólo del 2 al 4% de cobre absorbido es excretado en la orina. Después de una inyección intravenosa de cobre radiactivo, se excretó después de 72 horas en orina y heces solo alrededor del 10 % de la dosis administrada. Aunque pacientes con enfermedad de Wilson presentan un incremento en la excreción urinaria, ellos excretan el cobre aproximadamente a la mitad de la velocidad de los individuos sanos.

### *2.3.2 Mecanismo de Acción.*

La habilidad del cobre para ciclar entre un estado oxidado, Cu (II), y el estado reducido, Cu (I), es utilizado por las cuproenzimas involucradas en reacciones redox. Sin embargo, esta propiedad es también potencialmente tóxica porque las transiciones entre Cu (II) y Cu (I) pueden resultar en la generación de radicales superóxido e hidroxilo.

### *2.3.3 Efectos en la salud por exceso de cobre.*

En humanos, la ingestión de cantidades en gramos de sales de cobre, pueden causar efectos gastrointestinales, hepáticos y renales. Los síntomas pueden ser dolor abdominal severo, vómito, diarrea, hemólisis, necrosis hepática, hematuria, proteinuria, hipotensión, taquicardia, convulsiones, coma y muerte. También se puede presentar irritación en el tracto respiratorio. Se ha visto daño en ratas en los túbulos contorneados proximales.

---



Se ha demostrado que las ratas son mucho más sensibles a la hepatotoxicidad del cobre. En las ratas, con una dieta de 16 mg/kg/día durante 13 semanas resultaron en un incremento en la actividad de alanina aminotransferasa; se observó una inflamación crónica activa del hígado con 66 mgCu/kg/día. En contraste, no hubo evidencia de daño al hígado en ratones con exposición a 814 mg Cu/kg/día por 13 semanas. La mayoría de los experimentos sobre toxicidad del cobre vienen de estudios en los cuales se utilizaron ratas. Los requerimientos de cobre en la dieta para ratas son de 5 mg Cu/kg, mientras que para humanos los requerimientos son de 0.65 mgCu/kg/día.<sup>(8)</sup>

Debido a que el cobre es un elemento esencial se consideró para desarrollar nuevos fármacos antineoplásicos en México: las Casiopeínas.

### **2.4 CASIOPEINAS®**

Los recientes avances científicos han permitido la identificación de un gran número de nuevas terapias contra el cáncer. Lo anterior, ha resultado en una expansión en el desarrollo de fármacos, los cuales aunque potentes contra la enfermedad llegan a ocasionar problemas de toxicidad.

Por ello, en la búsqueda de nuevos agentes quimioterapéuticos más efectivos, menos tóxicos y de más amplio espectro, a principios de los años 80's en la Facultad de Química de la UNAM bajo la dirección de la Dra. Lena Ruiz Azuara, se diseñó y sintetizó un nuevo grupo de compuestos de coordinación con cobre (II) como núcleo metálico denominados CASIOPEINAS®, que en la esfera de coordinación presentan un ligante bidentado del tipo diimina(N-N) y otro que puede ser aminoacidato (N-O) o donador (O-O). Algunos de ellos han mostrado ser moléculas con potencial antineoplásico.<sup>(9)</sup>



## II. ANTECEDENTES

---



Se tomó en cuenta que las moléculas fueran planas para que pudieran intercalarse en el ADN, que fuera un metal esencial el núcleo metálico de las Casiopeínas, que tuvieran un ligante que pudiera salir fácilmente y que además una parte de la molécula fuera hidrofílica y la otra hidrofóbica, para que pudieran atravesar membranas <sup>(10)</sup>.

Las Casiopeínas integran una familia de 100 compuestos metálicos, que tienen más alta actividad que cualquier otro fármaco empleado en tratamientos oncológicos. Las casiopeínas inducen muerte celular programada y se asocian con algunas proteínas que ayudan a trasportarlas a puntos determinados del organismo <sup>(11)</sup>.

Cabe señalar que los costos de la quimioterapia con Casiopeínas se reducen, pues el cobre es más económico que el platino y las dosis que se requieren son mucho menores en comparación con las de cisplatino. Con la misma cantidad de dinero se podrían tratar a entre 10 y 15 pacientes, en lugar de uno con los fármacos importados. En 1983, se obtuvieron los primeros resultados sólidos, importantes, en la síntesis de dos compuestos, la Casiopeína II gly y la Casiopeína IIIia. Son los más prometedores por su solubilidad, selectividad, actividad y a la baja toxicidad para combatir carcinomas y leucemia <sup>(11)</sup>. Entre estas, existen algunas con mayor actividad pero también son más tóxicas.



### 2.4.1 Casiopeína II-Gly

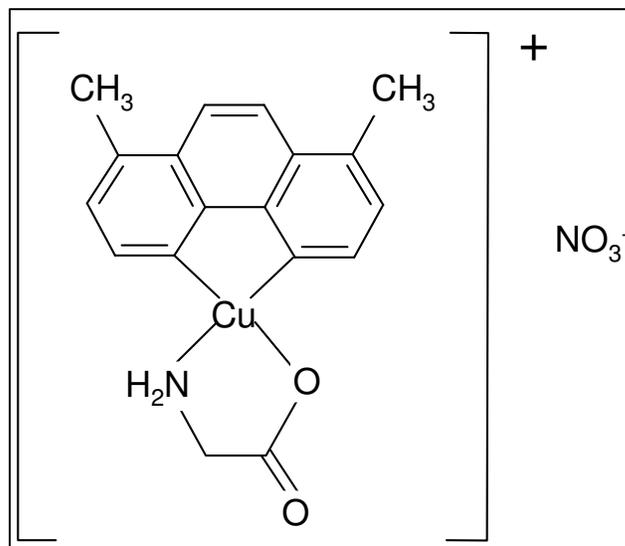


Figura 2. Molécula de la Casiopeína II-gly  
[Cu (4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(glicinato)]NO<sub>3</sub> • 2 H<sub>2</sub>O

❖ *Propiedades Fisicoquímicas:*

- pKa 5.4 <sup>(12)</sup>
- Características físicas: Sólido en polvo fino de color azul.
- Peso Molecular: 443.90 g/mol
- Solubilidad: Muy Soluble en Metanol, Etanol y mezcla de agua-Alcohol (50:50), Soluble en agua, poco soluble en solución amortiguadora. <sup>(13)</sup>
- *Estabilidad.*
  - El compuesto es estable en agua a fuerza iónica y a temperatura constante a pH cercano a 7 por aproximadamente 7 días.



- Casiopeína II-gly en solución salina (NaCl) precipita. En IR se observa del precipitado que los nitratos desaparecen, ya que estos fueron sustituidos por cloruros.
- Es estable por una semana en solución dextrosada.<sup>(14)</sup>
- De Estudios de estabilidad en disolución acuosa, se dedujo que el fármaco no se puede administrar por vía oral, pues el pH del estómago tiene un valor cercano a 1 en el cual los compuestos se podrían degradar y posiblemente no presentarían actividad farmacológica, sin embargo pueden ser administrados por vía intravenosa, ya que son inertes frente al agua inclusive hasta pH 8<sup>(10,15)</sup>.

❖ *Antecedentes de su actividad biológica.*

- Presenta unión a proteínas por arriba del 90% <sup>(13)</sup>.
- En estudios realizados sobre toxicidad aguda en rata y ratón se obtuvieron como Dosis Letales 50 (DL<sub>50</sub>) <sup>(16)</sup>:

**Tabla 1. Dosis Letal para Casiopeína II-gly**

Ratas	Wistar macho		Wistar hembra
	I.P. mg/kg	I.V. mg/kg	I.P. mg/kg
<b>DL50</b>	6.66	7.83	8.83
DL90	9.81	-	10.69
Ratones	ICR Macho		ICR Hembra
	I.P. mg/kg	I.V. mg/kg	I.P. mg/kg
DL50	15.59	15.5	15.67
DL90	19.79	17.95	17.71



## II. ANTECEDENTES

---



La realización de pruebas *in vivo* e *in vitro* de las casiopeínas genera una coloración “rosa” tanto en el cultivo de bacterias, como en los medios de *Drosophila* y en las muestras de orina de ratas y ratones que se encuentran en experimentación con casiopeínas<sup>(17)</sup>, por lo que se propone la formación de derivados del tipo  $[\text{Fe}(\text{N-N})_3]^{2+}$ .

Se ha sugerido que la Casiopeína II-gly tiene una muy baja probabilidad de provocar inestabilidad genómica mediante recombinación, similarmente a la vincristina. Lo anterior evitaría el peligro de tumores secundarios debido a la aplicación de la Casiopeína<sup>(18)</sup>.

Uno de los mayores efectos tóxicos de la Casiopeína II-gly es a nivel hematológico. Se ha visto que se presenta anemia hemolítica con una dosis de 5mg/kg en ratas. El daño se observó con la reducción de hemoglobina, del hematocrito y de células rojas 12 horas después de la administración, obteniéndose el mayor daño a los 5 días. Lo anterior se piensa puede ser debido a la habilidad del cobre para oxidar proteínas y lípidos además de potenciar la formación de radicales libres por la reducción de Cu (II) a Cu (I).<sup>(19)</sup>

La mayoría de los experimentos con cultivos de tejidos tanto normales como neoplásicos, indican que las casiopeínas causan daños a las mitocondrias por bloqueo de algunas vías, desacoplamiento de la cadena respiratoria y de la síntesis de ATP, comprometiendo a la duplicación celular<sup>(20)</sup>.



## II. ANTECEDENTES

---



En cultivos de células C6 (provenientes de glioma), la Casiopeína II-gly causó translocación mitocondrio-nuclear del factor de inducción de apoptosis (AIF) y endonucleasa G a concentraciones bajas y altas, mientras que la fragmentación de DNA nucleosomal, liberación de citocromo C y activación de caspasa -3 fueron observadas a altas concentraciones. Estos resultados sugirieron que la muerte por apoptosis, es a través de las vías independiente y dependiente de las caspasas. En este mismo estudio se utilizaron ratas con Glioma C6 y al tratarlas con la Casiopeína II-gly se redujo el tumor en volumen, así mismo los índices mitóticos y de proliferación celular disminuyeron, y se aumentó el índice apoptótico. Por lo anterior se pensaría en utilizar esta Casiopeína para el tratamiento de gliomas malignos<sup>(21)</sup>.

Se ha demostrado que la Casiopeína II-gly induce una menor cardiotoxicidad que la adriamicina (antineoplásico cardiotóxico más potente), lo cual es una ventaja para el tratamiento de neoplasias.<sup>(22)</sup>

Se ha sugerido que la Casiopeína II-gly rompe al DNA tanto in vivo como in Vitro por generación de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) (principalmente radicales •OH), y a ello se atribuye su efecto citotóxico, y por lo tanto su actividad antineoplásica<sup>(23)</sup>.

Las enfermedades que posiblemente serán atacadas con la Casiopeína II-gly son: cáncer cervicouterino, de mama, de colon y carcinomas. También son especialmente prometedoras para caso de leucemia y de neuroblastos, tumores en el sistema nervioso central, para los que hasta ahora no hay medicina.<sup>(10)</sup>



## 2.5 PROCESO DE DESARROLLO DE UN FARMACO NUEVO

El objetivo de seguir un proceso para el desarrollo de fármacos nuevos (Fig.3) es asegurar que la población tenga acceso a fármacos seguros y eficaces. Las diferentes fases para ello son <sup>(24)</sup>:

El **estudio pre-clínico** tiene como propósito obtener suficientes datos que apoyen con cierto nivel de seguridad la decisión para el uso del fármaco en seres humanos. Se evalúan los efectos tóxicos y farmacológicos del fármaco a través de pruebas *in vitro* e *in vivo* en animales de laboratorio. Se hacen ensayos de genotoxicidad y también estudios de la absorción y metabolismo del fármaco, la toxicidad de los metabolitos y la velocidad con que el fármaco y sus metabolitos se excretan del cuerpo.

Los **estudios clínicos** constituyen la prueba clave antes de la comercialización de los fármacos que no han sido aprobados. Durante estos estudios, se administra un compuesto de investigación a seres humanos y se evalúa su seguridad y eficacia para tratar, prevenir o diagnosticar una enfermedad o estado de salud específico. El resultado de esta prueba encierra el factor principal para la aprobación o el rechazo de un NDA (New Drug Application).

**Estudios Clínicos de la Fase 1.** Es la introducción inicial de un fármaco nuevo en seres humanos. Se vigilan rigurosamente y pueden realizarse en pacientes, pero por lo general se realizan en voluntarios saludables. Su propósito es determinar los efectos metabólicos y farmacológicos en seres humanos, los efectos colaterales relacionados con mayores dosis, y si fuera posible, obtener las primeras pruebas de eficacia.



Se evalúan también las relaciones de estructura-actividad, y el mecanismo de acción en seres humanos. En estos estudios se determinan además los fármacos que se emplearán como medios de investigación para explorar fenómenos biológicos o procesos patológicos. El número total de voluntarios que se utilizan en dichos estudios depende del fármaco. Por lo general se emplea entre veinte y ochenta individuos.

**Estudios Clínicos de la Fase 2.** Incluye los primeros estudios clínicos controlados que intentan conseguir datos preliminares sobre la eficacia del fármaco en indicaciones específicas en pacientes enfermos o en mal estado de salud. Esta fase del estudio ayuda también a determinar los efectos colaterales a corto plazo y los riesgos comunes del fármaco. Siempre están muy controlados y vigilados y se realizan en un número relativamente pequeño de pacientes, por lo general de varios cientos de personas.

**Estudios Clínicos de la Fase 3.** Estudios más extensos, controlados y no controlados. Se realizan después que los estudios preliminares de la Fase 2 han indicado la eficacia del fármaco, para poder evaluar la relación de beneficio y riesgo del fármaco. Esta fase de estudios también brinda una base adecuada para extrapolar los resultados a la población general y transmitir esa información en el etiquetado médico. Los estudios de la Fase 3 incluyen usualmente desde varios cientos hasta miles de pacientes.

El Departamento de **Farmacovigilancia** y Epidemiología (DPE) lleva también a cabo una función epidemiológica en la supervisión de la seguridad del fármaco. Cumple esta función el personal profesional multidisciplinario de médicos y epidemiólogos, farmacéuticos y coordinadores del programa y proyecto. El principal objetivo es la evaluación postcomercial de los riesgos de los fármacos que puedan afectar el ambiente, empleando las herramientas de la epidemiología.

---

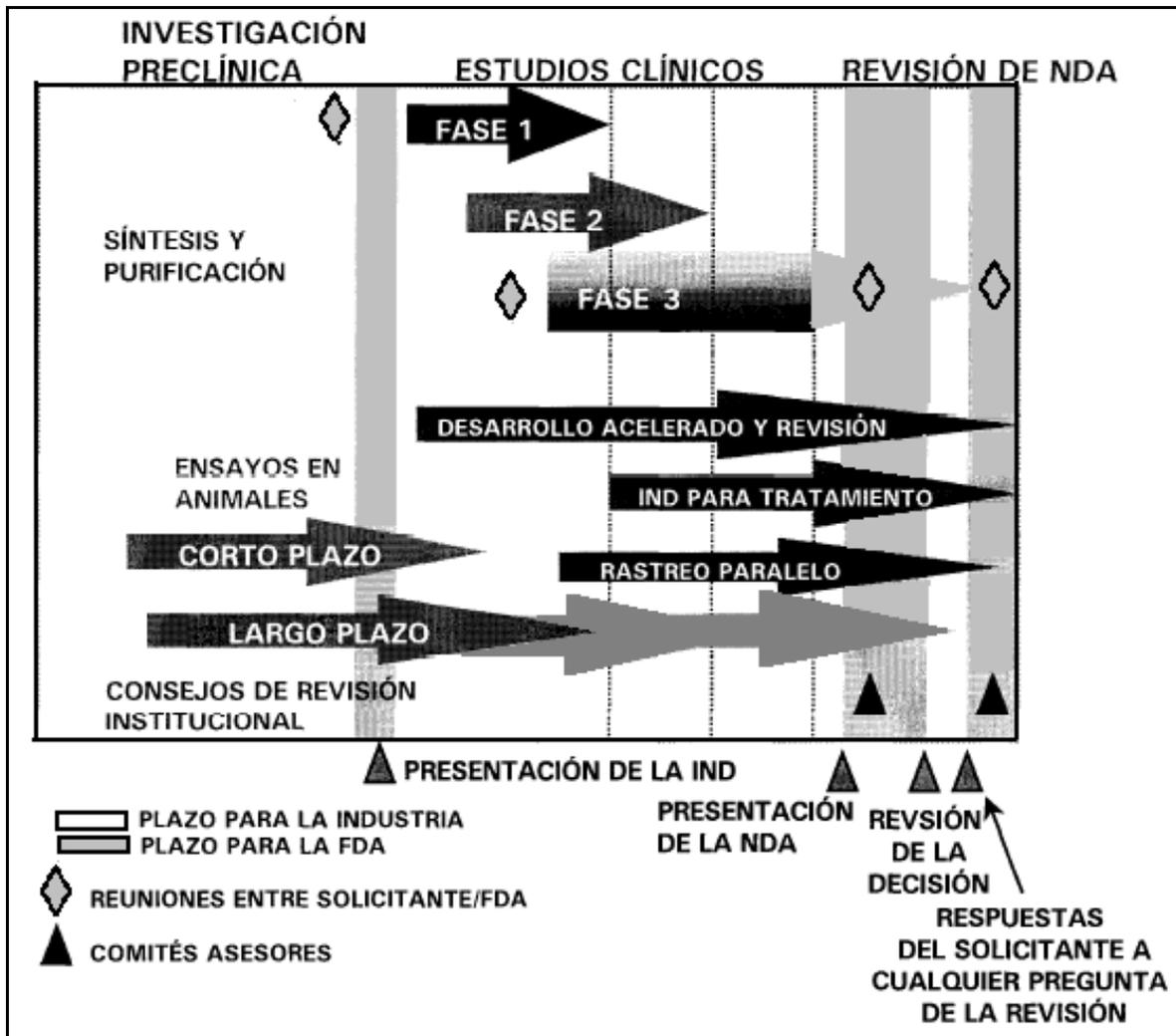


Figura 3. Proceso de Desarrollo de un Fármaco Nuevo <sup>(24)</sup>  
IND: Investigational New Drug Applications

### 2.5.1 Estudio para el Desarrollo de las Casiopeínas

Una pauta óptima para la demostración de la actividad antineoplásica en animales se define adicionalmente en los estudios preclínicos, al igual que la formulación óptima para una vía de administración <sup>(4)</sup>.



Tras la experimentación de las Casiopeínas en animales, lo que sigue es su aplicación en humanos. Se tendrá que puntualizar los protocolos y cómo se aplicará, lo que será resuelto por los comités Académico y de Ética del InCa (Instituto Nacional de Cancerología).

Se tiene contemplado que el uso de las Casiopeínas se haga en cuatro fases: la fase I se hará con enfermos terminales, a los cuales se les aplicarán los fármacos nuevos en dosis muy bajas. En la fase II, una vez ajustada la dosis, los enfermos tienen tumores avanzados, pero ya se puede esperar alguna posible mejoría. La fase III es un tumor menos avanzado y se trata al paciente con una terapéutica formal. En la fase IV se trata a enfermos iniciales sin mayor problema terapéutico. <sup>(10)</sup>

### **2.6 MÉTODOS BIOANALÍTICOS.**

Algunas de las pautas importantes en el desarrollo de un nuevo fármaco es lo concerniente al estudio de los procesos LADME (Liberación, Absorción, Distribución, Metabolismo y Excreción del fármaco), estudios farmacocinéticos, monitoreo y toxicidad, los que para llevarse a cabo, se hace necesario contar con un método analítico en fluidos biológicos, confiable y validado, que ayude a medir las concentraciones del fármaco inalterado en suero, plasma u orina.

El Método analítico se define como la descripción de la secuencia de actividades, recursos materiales y parámetros que se deben cumplir, para llevar a cabo el análisis de un componente específico de la muestra. <sup>(25)</sup>



### 2.6.1 Validación de Métodos Bioanalíticos

El Método Analítico mide un componente específico (analito) en una muestra y como todo proceso de medición, éste debe ser confiable para ser utilizado con un propósito definido. Para ello, se lleva a cabo la validación de los métodos Analíticos. <sup>(25,26)</sup>

La Validación, es la evidencia experimental documentada de que un procedimiento cumple con el propósito para el que fue diseñado. <sup>(27)</sup>

Para la validación se deben de incluir como mínimo los parámetros que se describen a continuación:

- ❖ *Rango*. Intervalo de un Método analítico, definido por las concentraciones comprendidas entre los niveles superior e inferior del compuesto, en el cual se ha demostrado que el método es preciso, exacto y lineal.
- ❖ *Linealidad*. Capacidad de un método analítico, en un intervalo de trabajo, para obtener resultados que sean directamente proporcionales a la concentración del compuesto en la muestra;
- ❖ *Precisión*. Grado de concordancia entre resultados analíticos individuales, cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea del producto. Se evalúa como repetibilidad y reproducibilidad.
- *Repetibilidad*. Precisión de un método analítico que expresa la variación dentro de un mismo laboratorio obtenida entre determinaciones independientes realizadas en las mismas condiciones.



- *Reproducibilidad* intralaboratorio. Precisión de un método analítico que expresa la variación obtenida entre determinaciones independientes, realizadas en el mismo laboratorio, pero en diferentes condiciones de análisis, tales como días, equipo, columnas o analistas.
- ❖ *Exactitud*. Concordancia entre el valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia.
- ❖ *Recuperación absoluta*. Eficiencia de un método analítico para cuantificar el o los compuestos por analizar en la muestra biológica.
- ❖ *Selectividad*. Capacidad de un método analítico para cuantificar específicamente el compuesto a analizar, en presencia de otros compuestos que pudieran estar presentes en la muestra.
- ❖ *Límite de detección*. Mínima concentración de un compuesto en una muestra el cual puede ser detectado, pero no necesariamente cuantificado
- ❖ *Límite de cuantificación*. Concentración más baja del compuesto que puede cuantificarse cumpliendo con la precisión y exactitud establecidas en el método.
- ❖ *Estabilidad de la muestra*. Propiedad del compuesto por analizar, de conservar sus características, desde el momento del muestreo hasta su análisis.
- ❖ *Tolerancia*. Capacidad del Método analítico para obtener resultados precisos y exactos ante variaciones pequeñas pero deliberadas, en sus parámetros y condiciones de trabajo y que proporciona una indicación de su confiabilidad durante el uso normal. <sup>(26,27)</sup>



## 2.7 CROMATOGRAFÍA

La Cromatografía es una técnica analítica que permite separar los componentes de la muestra, en la cual los componentes se distribuyen entre dos fases, una es la fase estacionaria y otra es la fase móvil, de tal forma que cada uno de los componentes de la muestra es selectivamente retenido por la fase estacionaria.

Los Métodos Cromatográficos son comúnmente usados para análisis cualitativo y cuantitativo de fármacos, productos y componentes de ellos en fluidos o matrices biológicas.

Los métodos cromatográficos más comunes son <sup>(30)</sup>:

### A. Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución

La Cromatografía de líquidos (CLAR o HPLC por sus siglas) ha tenido una creciente difusión desde comienzos de la década de los 70' y hoy representa una de las herramientas más empleadas en el laboratorio analítico moderno, ya sea éste dedicado a la investigación básica o aplicada, industrial y biológico. <sup>(28)</sup>

Utiliza una fase móvil Líquida para separar los componentes de la mezcla. Dichos componentes son primero disueltos en un disolvente, y entonces forzados con un flujo determinado a pasar a través de la columna Cromatográfica a alta presión

Básicamente los componentes de un equipo cromatográfico (Fig. 4) son los siguientes: bombas, inyectores, columna, detectores y sistema de toma y procesamiento de datos <sup>(30)</sup>.

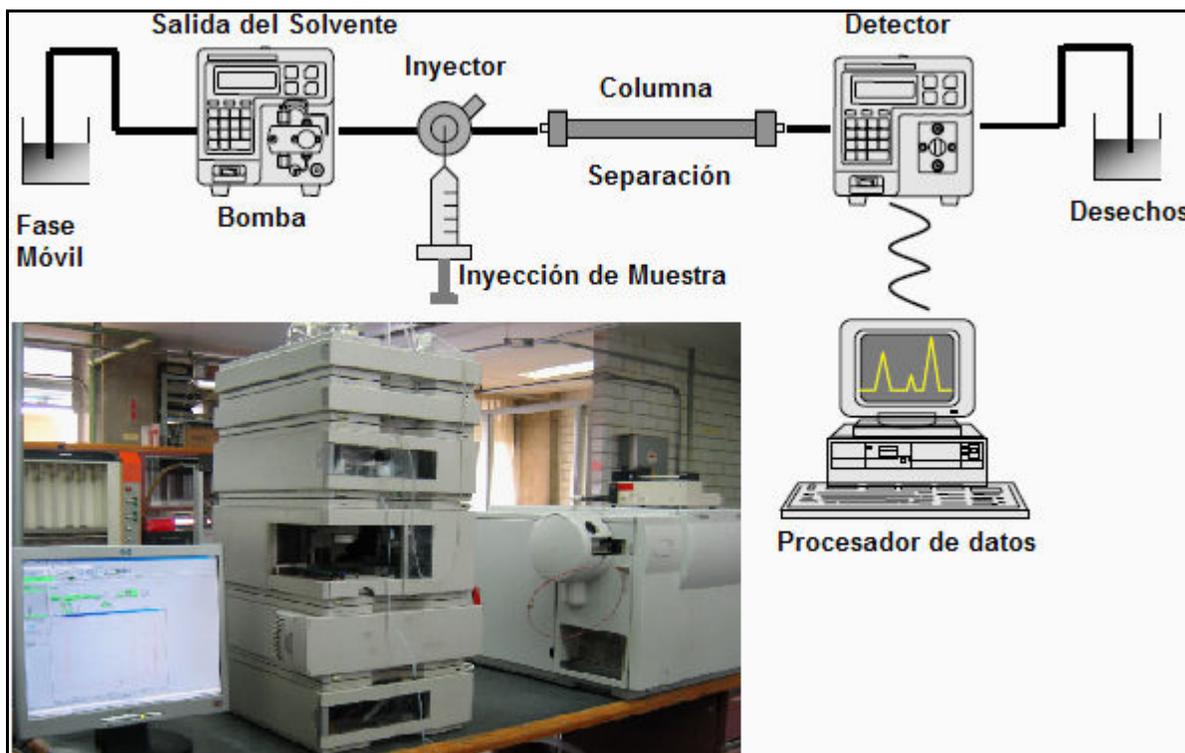


Figura 4. Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución. Componentes. <sup>(29)</sup>

Los métodos más comúnmente utilizados son <sup>(31)</sup>:

1. *Fase Normal*

Técnica Cromatográfica que utiliza solventes orgánicos para la fase móvil y una fase estacionaria polar. Los componentes menos polares eluyen más rápido que los más polares.

2. *Fase reversa*

Técnica cromatográfica más utilizada, la base de la fase móvil es agua, y como fase estacionaria una fase no polar. La separación se lleva a cabo por la fuerza del disolvente, y la selectividad se ve afectada por la temperatura de la columna y el pH. Los Componentes más polares eluyen más rápido que los menos polares.



### 3. Par iónico/afinidad

Uno de los tipos de Cromatografía utilizados para compuestos catiónicos o aniónicos es la *Cromatografía de líquidos de par iónico*, el cual es un método para mejorar la separación de analitos cargados. <sup>(32)</sup>

La selectividad de dicha separación es determinada principalmente por la fase móvil: reactivo de par iónico (RPI) y solvente orgánico. El reactivo de par iónico es una larga molécula iónica que contiene una carga opuesta al analito de interés. Usualmente tiene dos regiones, una hidrofóbica para interaccionar con la fase estacionaria y una región con carga para interaccionar con el analito. Para la Fase estacionaria suele utilizarse fase neutra, resinas hidrofóbica o sílica.

Uno de los modelos del mecanismo de retención es un intercambio iónico dinámico (Fig. 5), que menciona que la porción hidrofóbica del RPI se adsorbe a la fase estacionaria hidrofóbica para formar una superficie dinámica de intercambio iónico. El analito es retenido en esta superficie. El solvente orgánico puede impedir la interacción del RPI con la fase estacionaria. Un incremento en el porcentaje de solvente orgánico en el eluente decrece la interacción de pares iónicos con la fase estacionaria y se reduce su retención.



El tiempo de retención del analito incrementará mientras la concentración del RPI incremente. Las concentraciones que normalmente se usan están entre 0.5 y 20 mM

La separación de aniones, incluyen como RPI sales de amonio: tetrametil-, tetraetil-, tetrapropil- y tetrabutilamonio.<sup>(33)</sup>

Para separación de cationes, se debe considerar el tipo de reactivo de par iónico, la naturaleza de un ligante eluente<sup>(34)</sup> y el pH.

RPI para separación de cationes incluyen ácidos como clorhídrico, perclórico y sales como pentan-, hexan-, heptan- y octansulfonatos. La elusión del soluto puede ser mejorada por complejación con un ligante.<sup>(33)</sup>

Las ventajas de este tipo de cromatografía son<sup>(32)</sup>:

- Simple preparación de buffers.
- Reducción en el tiempo de separación.
- Separación simultánea de solutos ionizados y no ionizados.
- Resultados con alta reproducibilidad
- Mejora de la forma del pico
- La retención del soluto con la misma carga que el RPI decrece cuando el RPI es adicionado.
- La retención de solutos con la carga opuesta al RPI incrementa cuando se adiciona RPI.

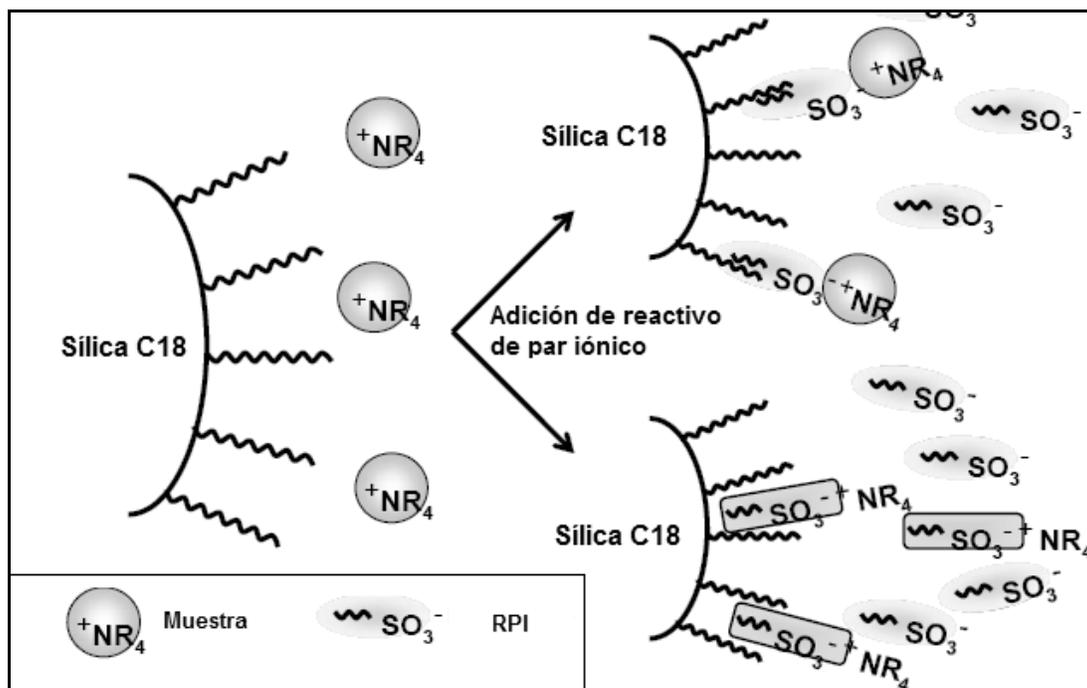


Figura 5. Diagrama de Cromatografía de par iónico<sup>(29)</sup>.

#### 4. Intercambio iónico

La fase estacionaria tiene una superficie iónica con carga opuesta a los iones de la muestra. Es utilizada casi exclusivamente para muestras iónicas o ionizables.

#### 5. Exclusión

También conocida como permeación en gel o filtración. La separación está basada en el tamaño de la molécula. Moléculas muy grandes pasan por los poros del material poroso, las moléculas pequeñas entran en los poros eluyendo al último.

#### 6. Quiral

La separación de enantiómeros puede realizarse en fases estacionarias quirales por formación de diasterómeros con agentes derivatizantes o aditivos de la fase móvil sobre fases estacionarias aquirales.



### **B. Cromatografía de Gases (GC)**

Se basa en volatilizar la muestra transportada por un gas como fase móvil a través de la fase estacionaria de la columna. Las muestras son normalmente de bajos pesos moleculares y volátiles además de estables a altas temperaturas.

### **C. Cromatografía de capa fina.**

Es el método más simple. La separación se basa en la migración de la muestra sobre una lámina con una fase estacionaria, la cual es colocada dentro de la fase móvil. El sistema completo es colocado dentro de un reservorio cerrado para permitir la migración.

## **2.8 FARMACOCINÉTICA**

Las personas, las poblaciones y los grupos étnicos varían sustancialmente en su respuesta a los fármacos y, por tanto, requiere dosis individualizadas de los mismos. Esta variabilidad tiene numerosos orígenes, pero en líneas generales estos pueden dividirse en las dos fases principales de la acción de los fármacos: farmacocinética (aquello que el organismo hace al fármaco) y farmacodinamia (aquello que el fármaco hace al organismo).

La farmacocinética describe la relación entre la dosis y la concentración de fármaco libre en el lugar de acción (un receptor para un fármaco), así como la evolución de la concentración del fármaco en el organismo. La disposición del fármaco es un término amplio que abarca todos los procesos mediante los cuales el organismo hace frente a las sustancias químicas extrañas, incluidos los fármacos <sup>(35)</sup>. Estos procesos son la liberación, absorción, distribución, el metabolismo y la excreción (LADME):

---



*Liberación.* Tomando como ejemplo la administración por vía oral, la liberación es la primera etapa que sufre el principio activo, finalizando con la disolución del mismo, que en el caso de la administración de un fármaco en solución intravenosa, tal paso no existe.

*Absorción.* La absorción es un proceso mediante el cual las moléculas del fármaco alcanzan la circulación sanguínea, dicha etapa no existe en el caso de administración parenteral intravenosa, aunque sí cuando se trata de una administración parenteral extravasal, como intramuscular o subcutánea.

*Distribución.* Es el proceso mediante el cual el fármaco se incorpora desde la circulación sanguínea a los diferentes órganos y tejidos corporales.

*Eliminación.* Desde el momento en que el fármaco llega a la circulación sanguínea, y al mismo tiempo en que se va dando la distribución, tiene lugar la eliminación del fármaco, que puede ser mediante metabolismo y/o excreción como fármaco inalterado por orina y/o bilis mayoritariamente. <sup>(30)</sup>

El estudio LADME puede ser abordado mediante dos tipos de datos: concentraciones plasmáticas y/o cantidades excretadas de fármaco inalterado en orina, obtenidas a distintos tiempos después de su administración.

Algunas consideraciones para realizar estudios de excreción urinaria son <sup>(27)</sup>:

- El fármaco se debe eliminar por vía renal en proporción de cuando menos 50% en forma intacta.
- Se debe vaciar la vejiga antes de la administración del fármaco y guardar muestra de orina que servirá como blanco de análisis.



## II. ANTECEDENTES

---



- Se debe administrar una cantidad suficiente de agua para provocar diuresis y poder obtener un número suficiente de muestras de orina durante las primeras horas.
- Para cada muestra es necesario anotar el lapso a partir del vaciado anterior y la cantidad total de orina eliminada.
- El fármaco no debe unirse a proteínas plasmáticas y su vía de excreción debe ser solamente por filtración glomerular.
- Se asume que la fracción de Fármaco excretado en orina es constante.
- La orina debe colectarse por un periodo de tiempo cuando menos  $7 t_{1/2} = 99.2\%$  o bien  $10 t_{1/2} = 99.9\%$ .

El proceso de excreción urinaria de un fármaco se caracteriza por una cinética de orden uno; por lo tanto, es posible establecer que la velocidad con que el principio activo inalterado aparece en el fluido urinario, es proporcional a la cantidad de fármaco que existe en el organismo (y esta cantidad a su vez, está directamente relacionada con la concentración plasmática del mismo).<sup>(30)</sup>



### 2.9 JUSTIFICACIÓN

Uno de los mayores problemas de salud pública que amenaza la vida es el cáncer, en México en 2005, los tumores malignos fueron la tercera causa de muerte <sup>(2)</sup> y la primera en mujeres mayores de 40 años <sup>(36)</sup>. Para contrarrestar a este mal, el fármaco más importante por su utilización y actividad antineoplásica es el cisplatino, el cual es utilizado en el tratamiento de tumores sólidos y metástasis de vejiga, testículos y carcinomas ováricos; pero tiene desventajas tales como su alta toxicidad <sup>(6)</sup>, diversos tumores son refractarios a dicho fármaco y su alto costo económico. Esto ha llevado a la búsqueda de agentes quimioterapéuticos más efectivos, menos tóxicos, de más amplio espectro y con un menor costo en nuestro país, ya que la importación de compuestos antineoplásicos es de un alto costo económico.

A principios de los años 80's en la Facultad de Química de la UNAM bajo la dirección de la Dra. Lena Ruiz Azuara, se diseñó y sintetizó un nuevo grupo de compuestos de coordinación con cobre (II) como núcleo metálico denominados CASIOPEINAS®, que en la esfera de coordinación presentan un ligante bidentado del tipo diimina (N-N) y otro que puede ser aminoacidato (N-O) o donador (O-O).

De estos compuestos, uno de los más prometedores es la Casiopeína II-gly, debido a su ya probada actividad citotóxica.

Si bien los antecedentes mostrados evidencian la actividad de la Casiopeína II-gly y por lo tanto la importancia de su estudio. Para lo cual se requiere de investigaciones preclínicas para conocer su eficacia, así como su toxicidad, comportamiento y eliminación del organismo. Y de esta manera, poder utilizar a la Casiopeína II-gly en un estudio Fase clínica 1.



## 2.10 HIPÓTESIS

La Casiopeína II-gly al administrarse vía intravenosa a ratas macho Wistar, se eliminará en mayor proporción y de manera inalterada por orina y los datos farmacocinéticos se ajustarán a un modelo bicompartimental.

## 2.11 OBJETIVO

El objetivo primordial del presente trabajo consiste en Desarrollar y Validar un procedimiento analítico para cuantificar la Casiopeína II-gly en orina de rata macho Wistar por Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (CLAR o HPLC), el cual pueda utilizarse en estudios de farmacocinética para conocer parámetros farmacocinéticos que caractericen a dicho fármaco.

Para el cumplimiento del objetivo general de este proyecto se plantearon los siguientes objetivos particulares:

- Desarrollar y Optimizar un método analítico por HPLC para cuantificar la Casiopeína II-gly en orina de rata macho Wistar.
- Validar el método analítico desarrollado para demostrar su selectividad, linealidad, precisión, exactitud, límite de detección, límite de cuantificación, recobro absoluto y estabilidad analítica de la muestra.
- Realizar un estudio de farmacocinética de Casiopeína IIgly y 4,7-dimetil-1,10-fenantrolina en rata macho Wistar



*III. PARTE  
EXPERIMENTAL*



### 3.1 MATERIAL

#### 3.1.1 Estándares

- ◆ [Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(glicina)]NO<sub>3</sub> • 2 H<sub>2</sub>O  
Casiopeína IIgly PM 443.90 g/mol Lote 170MBG030305
- ◆ Guaifenesina ETPRI 022 COSUFAR
- ◆ 4,7-dimetil-1,10-fenantrolina (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C<sub>12</sub>H<sub>6</sub>N<sub>2</sub> PM 208.26 g/mol lote s/n
- ◆ [Cu(glicina)<sub>2</sub>] 27/II/07 Lote s/n
- ◆ [Cu(4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina)(acetilacetonato)]NO<sub>3</sub> • 2 H<sub>2</sub>O  
Casiopeína III ia PM 444.93 g/ mol Lote 173MBG300305
- ◆ [Fe (fen)<sub>3</sub>] SO<sub>4</sub> o [Fe(4,7-dimetil-1,10 fenantrolina)<sub>3</sub>] SO<sub>4</sub> 830.74 g/mol Lote s/n

#### 3.1.2 Reactivos

- ◆ Metanol TecnoLab grado HPLC Lote 267 04/11/07
- ◆ Tiras reactivas de pH 0- 14 Machery-Nagel
- ◆ Agua HPLC
- ◆ Acido Acético Glacial Baker RA Lote G49464
- ◆ EDTA Técnica Química lote s/n
- ◆ Hexansulfonato de sodio (C<sub>6</sub>H<sub>13</sub>NaO<sub>3</sub>S) grado HPLC Sigma Ultra Lote 041K54412
- ◆ Solución Salina Isotónica CS Pisa Lote D057571
- ◆ Etanol Mena Lote 09106Med1



**3.1.3 Equipos e instrumentos**

◆ Cromatógrafo Agilent 1100

Computadora HP

Bomba Cuaternaria modelo G1313A

Detector DAD modelo G1315B

Inyector Automático modelo G1313A

Desgasificador G1322A

Programa Chemstation. Agilent Technologies

◆ Potenciómetro Thermorion Modelo 410

◆ Baño de Ultrasonido Fischer-Scientific FS60

◆ Vortex Genie 2 E096/07

◆ Centrífuga Micromax RF Termo IEC

◆ Desionizador de agua Millipore Milli-Q Water System, 0.22  $\mu\text{m}$

◆ Centrífuga Eppendorf modelo 5416

◆ Columna: Phenomenex Luna 5  $\mu\text{C18(2)}$  100Å 250 x 4.6 mm

◆ Precolumna: Security Guard cartridge system C18

◆ Viales de Cromatografía 2 mL Agilent ámbar.

◆ Tubos eppendorf 1 y 2 mL

◆ Micropipeta Eppendorf 100-1000  $\mu\text{L}$

◆ Micropipeta Eppendorf 20-200  $\mu\text{L}$

◆ Matraces volumétricos de 10, 50 y 500 mL

◆ Vasos de precipitados de 500 y 1000 mL

◆ Frascos para Fase Móvil 500 y 1000 mL



- ◆ Balanza Analítica estándar Ohaus, modelo AS200
- ◆ Tubos de vidrio 16 X 100 mm
- ◆ Cajas Metabólicas Harlan
- ◆ 15 Jeringas BD Plastipack 1 mL 27Gx13mm Lote 6334652
- ◆ 15 Catéteres

#### 3.1.4 Material biológico

- ◆ Pool de orina de rata macho Wistar. Para la preparación de curvas y puntos control, se utilizó un pool de orina de 10 ratas Macho Wistar (300 g  $\pm$  20) colocadas separadamente en cajas metabólicas durante la noche, quitando el alimento y dejando únicamente con agua *ad libitum*, por 12 horas, después de lo cual se recolectó la orina.
- ◆ 15 ratas macho Wistar 450g $\pm$ 20 para estudio preclínico de farmacocinética.

#### 3.2 Preparación de reactivos y soluciones

##### 3.2.1 Soluciones y reactivos para el desarrollo y validación del Método.

###### **i. Solución estándar de Casiopeína II-gly en solución. (1000 $\mu$ g/mL)**

Se pesó con exactitud 10 mg de Casiopeína II-gly, se transfirieron cuantitativamente a un matraz volumétrico de 10 mL, se disolvieron y llevaron al aforo con metanol HPLC.

###### **ii. Solución estándar de Casiopeína II-gly en orina. (1000 $\mu$ g/mL)**

Se pesó con exactitud 10 mg de Casiopeína II-gly, se transfirieron cuantitativamente a un matraz volumétrico de 10 mL, se disolvieron y llevaron al aforo con pool de orina.



**iii. Solución de Casiopeína II-gly en solución (400µg/mL)**

Se transfirió cuantitativamente una alícuota de 4 mL de la Solución de 1000 µg/mL (Sol. i) a un matraz volumétrico de 10 mL y se llevó al aforo con Metanol HPLC.

**iv. Solución de Casiopeína II-gly en orina (400µg/mL)**

Se transfirió cuantitativamente una alícuota de 4 mL de la Solución de 1000 µg/mL en orina (Sol. ii) a un matraz volumétrico de 10 mL y se llevó al aforo con pool de orina.

**v. Solución de Estándar Interno (600 µg/mL)**

Se pesaron con exactitud 0.03 g de Guaifenesina, se transfirieron cuantitativamente a un matraz volumétrico de 50 mL y se llevó a volumen con MeOH HPLC.

**vi. Solución de Hexansulfonato de sodio 20 mM pH 4.0**

Se pesaron con exactitud 0.1883 g de Hexansulfonato de Sodio, se transfirieron cuantitativamente a un matraz volumétrico de 50 mL, se ajustó el pH a 4 con solución de Ac. Acético- agua (50:50) y se llevó a volumen con agua HPLC.

**vii. Solución de ácido acético- agua 50:50**

Se mezclaron 10 mL de ácido Acético con 10 mL de Agua HPLC, y se agitó.

**viii. Hidróxido de Sodio 0.5 M**

Se pesaron con exactitud 0.2 g de NaOH , se transfirieron a un matraz volumétrico de 10 mL y se llevó al aforo con agua HPLC.



**ix. Solución de 4,7-dimetil-1,10-fenantrolina en orina (1000 µg/mL)**

Se pesó con exactitud 10 mg de 4,7-dimetil-1,10-fenantrolina, se transfirieron cuantitativamente a un matraz volumétrico de 10 mL, se disolvieron y llevaron al aforo con pool de orina.

**x. Solución Muestra de 4,7-dimetil-1,10-fenantrolina en orina (100 µg/mL)**

De la solución x. se tomaron 100 µL y se llevó al aforo de 1 mL con pool de orina.

**xi. Solución de [Cu (glicina)<sub>2</sub>] en orina (1000 µg/mL)**

Se pesó con exactitud 10 mg de [Cu (glicina)<sub>2</sub>], se transfirieron cuantitativamente a un matraz volumétrico de 10 mL, se disolvieron y llevaron al aforo con pool de orina.

**xii. Solución Muestra de [Cu (glicina)<sub>2</sub>] en orina (100 µg/mL)**

De la solución xi. se tomaron 100 µL y se llevó al aforo de 1 mL con pool de orina.

**xiii. Solución de [Fe (4,7-dimetil-1,10 fenantrolina)<sub>3</sub>] SO<sub>4</sub> en orina (1000 µg/mL)**

Se pesó con exactitud 10 mg de [Fe (4,7-dimetil-1,10 fenantrolina)<sub>3</sub>] SO<sub>4</sub>, se transfirieron cuantitativamente a un matraz volumétrico de 10 mL, se disolvieron y llevaron al aforo con pool de orina.

**xiv. Solución Muestra de [Fe (4,7-dimetil-1,10 fenantrolina)<sub>3</sub>] SO<sub>4</sub> en orina (100 µg/mL)**

De la solución xiv. Se tomaron 100 µL y se llevó al aforo de 1 mL con pool de orina.



☑ 3.2.2 Soluciones para el Estudio preclínico.

**xv. Solución de Casiopeína II-gly en Solución Salina Isotónica (SSI) (6mg/mL)**

Se utilizó la mitad de la dosis letal de Casiopeína IIgly (3.9 mg/kg) para evitar que las ratas murieran. Para administrarla en un volumen pequeño (0.2-0.3 mL), se requirió una solución de 6 mg/mL, para lo cual se pesaron 30 mg de Casiopeína II-gly y se transfirieron cuantitativamente a un matraz volumétrico de 5 mL, se disolvió en SSI y se llevó al aforo con esta misma. A partir de la solución se llevaron a cabo los cálculos de volumen para administrar la dosis a cada rata.

**xvi. Solución de 4,7-dimetil-1,10-fenantrolina en etanol-agua (50 mg/mL)**

Al no contarse con la LD<sub>50</sub> de dicho compuesto se calculó la cantidad de 4,7-dimetil-1,10-fenantrolina (mg) contenida en la dosis probable a administrar de Casiopeína II gly; considerando el peso molecular de ambas. Se disolvieron 50 mg del compuesto en 1 mL de Etanol-Agua (90:10) debido a que el compuesto es soluble únicamente en alcoholes.

**xvii. Solución de 4,7-dimetil-1,10-fenantrolina en etanol-SSI (90:10) (2.95 mg/mL)**

Se tomó una alícuota de 59 µL de la solución de 50 mg/mL de 4,7-dimetil-1,10-fenantrolina y se transfirió cuantitativamente a un tubo eppendorf de 2 mL, se llevó a volumen de 1 mL con la mezcla de Etanol-SSI (90:10). A partir de esta solución, se realizaron los cálculos pertinentes para la administración de la fenantrolina en las ratas a utilizar.



**xviii. Solución mezcla de Etanol-agua y Etanol-SSI (90:10)**

Se tomó 1 mL de agua o Solución Salina, y se llevó a volumen de 10 mL con Etanol.

**3.2.3 Fase Móvil**

55 % Fase acuosa de sales: Hexansulfonato de sodio 5mM / EDTA 2mM (pH 3.5)

45 % Fase Orgánica: Metanol HPLC

Para 500 mL de solución de sales se realizó el siguiente procedimiento:

Se pesó con exactitud 0.4705 g de Hexansulfonato de sodio y 0.3722 g de EDTA, se transfirieron cuantitativamente a un matraz volumétrico de 500 mL; se llevó a volumen aproximado de 480 mL. Se agitó y se ajustó el pH con la solución de Ac. Acético-agua a un pH de 3.5 (aproximadamente 8 gotas con pipeta Pasteur), y se llevó al aforo con agua HPLC.

Se colocaron en frascos reservorios por separado la solución de sales y el metanol, previamente filtrados y desgasificados. Por medio del programa computacional del equipo cromatográfico se ajustaron las proporciones de sales 55% y metanol 45%.



☑ 3.2.4 Preparación de Curvas de Calibración y Puntos Control

**Tabla 2. Curva patrón de Casiopeína II-gly en orina y solución de fase móvil**

Concentración (µg/mL)	Alícuota (µL) de solución estándar	Aforo en orina o fase móvil (mL)	Concentración final después del tratamiento(µg/mL)
100	100 *	1	<b>50</b>
75	175 **	1	<b>35</b>
50	125 **	1	<b>25</b>
30	75 **	1	<b>15</b>
10	25 **	1	<b>5</b>

**Tabla 3. Puntos Control de Casiopeína II-gly en orina y solución de fase móvil**

Concentración (µg/mL)	Alícuota (µL) de solución estándar	Aforo en orina o fase móvil(mL)	Concentración final después del tratamiento(µg/mL)
16	40 **	1	<b>8</b>
40	100 **	1	<b>20</b>
90	90 *	1	<b>45</b>

\* Alícuota de la solución de 1000 µg/ mL de Casiopeína II-gly. (Solución i ó ii según sea el caso)

\*\*Alícuota de la solución de 400 µg/mL de Casiopeína II-gly (solución iii ó iv según sea el caso)

De cada solución se tomaron 500 µL para procesarlas.



● 3.3 DESARROLLO DEL METODO ANALITICO

☑ 3.3.1 Elección de las Condiciones Cromatográficas

Se determinaron las condiciones cromatográficas, de acuerdo a los siguientes criterios:

**Tabla 4. Requisitos para elección de condiciones cromatográficas.**

Parámetro	Criterio
Tiempo de retención	Libre de interferencias a componentes endógenos de la orina y que el pico de la Casiopeína se encuentre entre 8 y 12 minutos.
Resolución	Mayor o igual a 2
Factor de coleo	Menor o igual a 2
Eficiencia	Superior a 3000 platos teóricos.

- a) Fase estacionaria (Columna): Trabajos anteriores, demostraron que la Fase Reversa, es la indicada para trabajar con las Casiopeínas <sup>(12, 30,37-39)</sup>. En un estudio realizado anteriormente con la Casiopeína II-gly <sup>(13)</sup> aún no publicado, se utilizó una columna con las mismas características.
- b) Fase Móvil: Se utilizaron las mismas concentraciones de sales usadas en el trabajo realizado por *García Rojas* <sup>(13)</sup> cambiando las proporciones debido a las interferencias de la orina en el tiempo de retención de la Casiopeína II-gly.
- c) Flujo, volumen de inyección y longitud de onda de detección: Se tiene como referencia dos trabajos realizados en plasma <sup>(13,38)</sup>, en los cuales, la detección se realizó a una misma longitud de onda (273nm), flujo de 1mL/min y se inyectaron 50 µL.



- d) Temperatura: Se eligió la Temperatura de 25°C debido a que la Casiopeína II-gly no es estable a temperaturas elevadas, pero se decidió una temperatura controlada para evitar el ruido por variaciones de Temperatura.

**3.3.2 SELECCIÓN DE ESTANDAR INTERNO (EI)**

Se probaron distintos estándares, entre ellos ácido salicílico, sulfadoxina, Cafeína, hidroclorotiazida, Teofilina, Alopurinol, Trimetoprim, Nizatidina, piridoxal y Guaifenesina. La Concentración del Estándar Interno se estableció en base a la respuesta cromatográfica (área), la cual debería corresponder a la mitad del punto más alto de la curva estándar en orina. El estándar elegido fue la Guaifenesina.



**3.3.3 CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS OPTIMIZADAS**

- Cromatógrafo Agilent serie 1100
- Columna: Phenomenex Luna 5  $\mu$  C18(2) 100Å 250 x 4.6 mm
- Precolumna: Security Guard cartridge system C18
- Fase móvil: 55 % EDTA 2mM/Hexansulfonato de sodio 5mM (pH 3.5 )  
45 % Metanol HPLC
- Flujo: 1mL/min
- Longitud de onda: 273 nm
- Volumen de inyección : 50 $\mu$ L
- Tiempo de corrida: 14 minutos
- Estándar Interno: Guaifenesina 150  $\mu$ g/mL
- Respuesta medida: Áreas relativas (Casiopéina II-gly / Guaifenesina)

**3.3.4 PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS DE ORINA.**

En un tubo eppendorf de 2mL se depositó una alícuota de 500  $\mu$ L de muestra (Fig. 6), se verificó y/o ajustó el pH de la orina a 8 con NaOH 0.5 M (1 gota aproximadamente). Posteriormente se le adicionaron 250  $\mu$ L de MeOH con el correspondiente Estándar Interno (Guaifenesina) en concentración 600  $\mu$ g/mL, se agitó por 10 segundos en vórtex, se adicionaron 250  $\mu$ L de solución de Hexansulfonato de sodio 20mM pH 4.0, se agitó en vórtex 20 segundos y se centrifugó 15 000 rpm durante 15 minutos, y se transfirieron 500  $\mu$ L a viales del equipo Cromatográfico y se inyectaron 50  $\mu$ L.

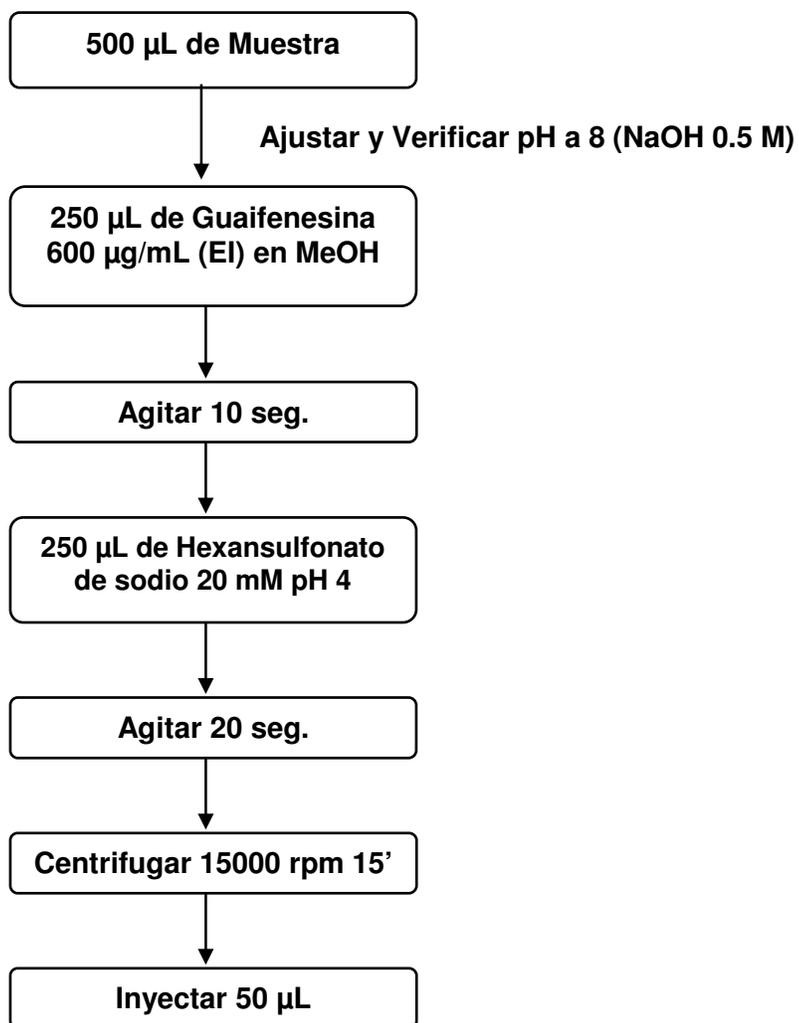


Figura 6. Diagrama de flujo del procesamiento de la muestra



### ● 3.4 VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

El método analítico desarrollado se validó siguiendo algunas de las indicaciones de la Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998 <sup>(27)</sup> la cual contiene los siguientes parámetros:

- Linealidad
- Precisión
  - >Repetibilidad
  - >Reproducibilidad
- Exactitud
- Recobro absoluto
- Especificidad
- Límite de detección
- Límite de cuantificación
- Estabilidad
  - >Condiciones de Almacenamiento
  - >Ciclos de congelación-descongelación
  - >Muestra procesada

En cada corrida analítica se realizó una curva de calibración en orina (sección 3.2.3) preparada el mismo día de análisis. Para cada determinación se calculó la relación de áreas del analito de interés y el estándar interno (Casiopeína II-gly/Guaifenesina), posteriormente se graficó la relación de áreas contra la concentración.



Se calculó la pendiente (m), la ordenada al origen (b) y el coeficiente de correlación (r). La ecuación de la recta obtenida se utilizó para el cálculo de la concentración recuperada de cada una de las muestras, interpolando los valores de la relación de áreas en la curva de calibración.

#### ● 3.4.1 Intervalo de trabajo

Se basó en un estudio en plasma realizado anteriormente <sup>(38)</sup>, ajustándolo a la matriz biológica utilizada, que en este caso fue orina.

#### ● 3.4.2 Linealidad del sistema.

La evaluación de estos parámetros consistió en preparar dos curvas de calibración en solución de fase móvil en el intervalo de trabajo de 5 a 50  $\mu\text{g/mL}$ . Se determinó el coeficiente de correlación (r), pendiente (m), ordenada al origen (b) y coeficiente de variación (CV%) del factor de respuesta (Área de Casiopeína IIgly / Concentración).

*Criterio de aceptación.* El sistema es lineal en el rango de concentraciones establecido si el coeficiente de correlación (r) es igual o mayor a 0.99.

#### ● 3.4.3 Linealidad del método

Para determinar la linealidad del método se prepararon tres curvas de calibración en orina en el intervalo de concentración 5 a 50  $\mu\text{g/mL}$  (de acuerdo al procedimiento en la sección 3.2.3). Se graficó la relación de áreas de Casiopeína II-gly/ Guaifenesina contra la concentración ( $\mu\text{g/mL}$ ). Se determinó el coeficiente de correlación (r), pendiente (m), y ordenada al origen (b).



*Criterio de aceptación.* El método es lineal en el rango de concentraciones establecido si el coeficiente de correlación (r) es igual o mayor a 0.99.

#### ● 3.4.4 Precisión del Método

La precisión del método se evaluó con la repetibilidad y reproducibilidad del método.

##### ❖ Repetibilidad

La repetibilidad del método se evaluó en un mismo día analizando por quintuplicado por un mismo analista tres niveles de concentración conocidas: baja, media y alta de Casiopeína II-gly en orina (8, 20 y 45 µg/mL, sección 3.2.4). De cada una de las determinaciones se calculó la concentración obtenida o recuperada. Se determinó el promedio (x), la desviación estándar (DE) y el coeficiente de variación (CV%) para cada nivel de concentración. El coeficiente de variación se obtuvo mediante la siguiente fórmula:

$$\% CV = \frac{\text{Desviación estándar}}{\text{Promedio}} \times 100$$

*Criterio de aceptación.* La repetibilidad se acepta si el coeficiente de variación (CV%) en cada nivel de concentración es menor o igual al 15%.

##### ❖ Reproducibilidad

La reproducibilidad del método se evaluó analizando por duplicado durante tres días diferentes, por el mismo analista tres niveles de concentración conocidas: baja, media y alta de Casiopeína II-gly en orina (8, 20 y 45 µg/mL, sección 3.2.4). Para el día 1, se eligieron dos resultados de los datos de repetibilidad para cada concentración.



Se determinó la cantidad obtenida o recuperada promedio ( $\bar{x}$ ), la desviación estándar (DE) y el coeficiente de variación (CV%) utilizando los datos de los tres días.

*Criterio de aceptación.* La reproducibilidad del método se acepta si el coeficiente de variación (CV%) en cada nivel de concentración durante los tres días es menor o igual al 15%.

#### ● 3.4.5 Exactitud

La exactitud del método se evaluó, tomando los datos de la repetibilidad y reproducibilidad. Tomando en cuenta que para la exactitud se requiere de tres niveles de concentración preparados por quintuplicado en orina. Se determina el porcentaje de

$$\text{Porcentaje de desviación absoluta} = \frac{\text{concentración nominal} - \text{concentración recuperada}}{\text{Concentración nominal}} \times 100$$

desviación absoluta de los datos:

Donde: Concentración nominal = valor teórico, en este caso puede ser 8, 20 o 45  $\mu\text{g/mL}$

Concentración recuperada= valor obtenido experimentalmente

*Criterio de aceptación.* El método es exacto si el valor promedio del porcentaje de desviación absoluta de cada nivel de concentración es  $\pm 15\%$ .



#### ● 3.4.6 Recuperación Absoluta

La recuperación absoluta, se evaluó analizando tres niveles de concentración: baja, media y alta por triplicado de la Casiopeína II-gly en orina y en solución de fase móvil, de acuerdo a los puntos control mostrados en la sección 3.2.4.

Para cada una de las muestras (en solución y orina) se calculó la concentración experimental obtenida mediante una curva de calibración y se determinó el porcentaje de recobro de cada nivel de concentración comparando el promedio de la respuesta obtenida en orina con respecto a la obtenida en solución a la misma concentración. La fórmula utilizada fue:

$$\% \text{ Recobro Absoluto: } \frac{\text{Respuesta de muestra en orina}}{\text{Respuesta de la solución en fase móvil}} \times 100$$

*Criterio de aceptación.* El porcentaje de recobro absoluto no necesariamente será del 100%, pero sí debe ser reproducible en todo el intervalo de concentraciones analizadas.

#### ● 3.4.7 Selectividad del Método.

Para evaluar la selectividad del método se analizaron las siguientes muestras:

- Muestras blanco de orina obtenidas de seis o más ratas macho Wistar
- Muestra blanco de orina adicionada de estándar interno (150 µg/mL).
- Muestra de orina adicionada del Estándar Interno (150 µg/mL) y de Casiopeína II-gly (50 µg/mL).



Adicionalmente, se evaluó el método contra posibles interferencias por metabolitos o productos importantes de degradación. Los compuestos analizados fueron:

- Productos de Degradación:
  - 4,7-dimetil-1,10-fenantrolina (50 µg/mL)
  - [Cu(glicina)<sub>2</sub>] (50 µg/mL)
  
- Posible metabolito
  - [Fe(4,7-dimetil-1,10 fenantrolina)<sub>3</sub>] SO<sub>4</sub> (50 µg/mL)

Los anteriores analitos fueron realizados tomando 500 µL de las soluciones x., xii y xiv respectivamente (sección 3.2.1) y procesándolos de acuerdo al tratamiento establecido (sección 3.3.4).

*Criterio de aceptación:* El método es selectivo si no se presentan interferencias en el tiempo de retención de los analitos de interés y el estándar interno.

#### ● 3.4.8 Límite de detección

El límite de detección, se evaluó preparando muestras de blanco de orina, en el cual la señal de la Casiopeína IIgly debe superar al ruido por lo menos tres veces.



#### ● 3.4.9 Límite de cuantificación.

El límite de detección se evaluó considerando el siguiente criterio:

Se analizó por quintuplicado muestras en orina con la concentración más baja del rango (5 µg/mL) de Casiopeína IIgly en orina. Se calculó el coeficiente de variación (%CV) y el porcentaje de desviación absoluta (%DEA).

*Criterio de aceptación.* Se considera que el punto tiene validez como límite de cuantificación si su valor promedio cae dentro del  $\pm 20\%$  del valor nominal y si el coeficiente de variación no es mayor al 20 %.

#### ● 3.4.10 Estabilidad de la muestra

Por medio de las pruebas de estabilidad se determinan las condiciones a las cuales la Casiopeína II-gly permanece estable, durante su almacenamiento o proceso.

Para cada una de las pruebas de estabilidad se calculó la concentración recuperada, esto se realizó interpolando la relación de áreas en la curva de calibración preparada en cada día de análisis.

*Criterio de aceptación.* Se consideran estables en las diferentes condiciones evaluadas, si el porcentaje de desviación absoluta se encuentra dentro del  $\pm 15\%$  del valor nominal de concentraciones.



- ❖ Estabilidad de la muestra a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 3 y 7 días en condiciones de almacenamiento.

Se prepararon tres niveles de concentración: baja, media y alta (8,20 y 45  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) de Casiopeína II-gly en orina, por duplicado. Se congelaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  y se analizaron muestras en los tiempos: 3 días y 7 días de congelación.

- ❖ Ciclos de Congelación-Descongelación

Se analizaron dos ciclos de congelación-descongelación, en tres niveles de concentración: baja, media y alta (8,20 y 45  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) de Casiopeína II-gly en orina por duplicado, se realizaron dos series. Con una serie se prepararon las muestras y se congelaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 24 horas, tiempo después del cual se descongelan a Temperatura ambiente, ya descongeladas, se congelan nuevamente por 24 horas, después de lo cual se procesan e inyectan. La otra serie sirvió como referencia, ésta fue congelada durante todo el tiempo en que se realizaron los ciclos de congelación-descongelación de la otra serie, y ambas series fueron analizadas conjuntamente.

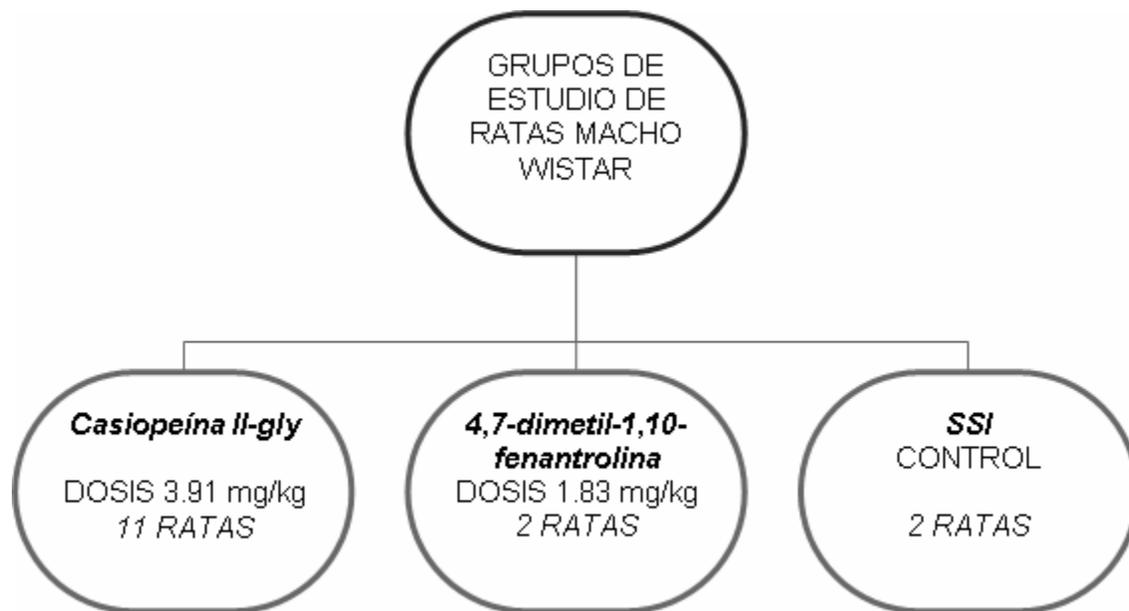
- ❖ Estabilidad de la muestra procesada

Se prepararon por triplicado los puntos control en tres niveles de concentración, bajo, medio y alto (8,20 y 45  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , sección 3.2.4). Se realizaron dos series. Se procesaron las muestras de ambas series, una de las series se inyectó en el cromatógrafo inmediatamente (cero horas). La otra serie se mantuvo en el automuestreador durante 16 horas a temperatura ambiente y transcurrido ese tiempo se inyectó en el cromatógrafo. Las muestras de las 16 horas se compararon con las de cero horas.



### ● 3.5 FARMACOCINÉTICA PRECLÍNICA EN RATAS MACHO WISTAR.

El estudio farmacocinético fue llevado a cabo con 15 ratas Wistar (macho, peso 450 g ± 20). Las ratas utilizadas se dividieron en tres grupos:



**Figura 7. Estudio farmacocinético preclínico en ratas**

Antes de la administración, se les retiró el alimento a las ratas por 12 horas, pero les fue permitido el acceso al agua *ad libitum* durante todo el periodo del experimento. A todos los animales se les dió alimento cuatro horas después de la administración del bolo intravenoso en la cola. La Casiopeína II-gly fue administrada en dosis de 3.91 mg/kg, mientras que la 4,7-dimetil-1,10-fenantrolina en 1.83 mg/kg, utilizando las soluciones *xv* y *xvii* respectivamente. Las Muestras de orina fueron recolectadas en tubos de vidrio en diferentes periodos de tiempo (0-1, 1-2, 2-3, 3-4, 4-7, 7-11, 11-23, 23-30, 30-48, 48-80 horas). Las muestras fueron congeladas hasta su análisis. Se procesaron según el método establecido (Fig.6).



*IV. RESULTADOS Y  
DISCUSIÓN*



● 4.1 DESARROLLO DEL MÉTODO CROMATOGRÁFICO

☑ 4.1.1 Elección de las Condiciones Cromatográficas

Los criterios para elegir las condiciones cromatográficas (sección 3.3.1), se aceptaron debido a que se encontró en tres curvas de calibración, como promedio los siguientes parámetros:

**Tabla 5. Parámetros obtenidos para optimización de condiciones cromatográficas.**

Parámetro	Resultado	Criterio	Dictamen
Tiempo de retención	Guaifenesina <b>6.7</b> minutos Casiopéina II-gly <b>11.8</b> minutos	Libre de interferencias y que la Casiopéina se encuentre entre 8 y 12 minutos.	Cumplió
Resolución	3.05	Mayor o igual a 2	Cumplió
Factor de coleo	0.556	Menor o igual a 2	Cumplió
Eficiencia	6024 platos teóricos	Superior a 3000 platos teóricos.	Cumplió

a) Fase estacionaria (Columna): La columna Phenomenex Luna 5 $\mu$ C18(2) 100<sup>a</sup> 250x4.6mm utilizada mostró buenos resultados para la Casiopéina II-gly y el Estándar Interno.

b) Fase Móvil: Se manipularon las proporciones hasta lograr separar la Casiopéina de los compuestos endógenos de la orina y del frente de disolvente. Se eligió la proporción:

55 % EDTA 2mM/Hexansulfonato de sodio 5 mM (pH3.5)

45% Metanol HPLC

c) Flujo, volumen de inyección y longitud de onda de detección: Los tres parámetros resultaron adecuados para el método: 1 mL/min, 50  $\mu$ L y 273 nm

d) Temperatura: 25 °C.



☑ 4.1.2 Selección De Estándar Interno (EI)

La mayoría de los estándares probados se presentaron en un tiempo de retención menor a 5 minutos por lo que interferían con el frente de la orina en la señal cromatográfica, la Casiopeína IIIa se obtuvo en un tiempo de retención de 20 minutos, por lo que no fue adecuada para una corrida cromatográfica. El estándar que se logró separar de componentes endógenos de la orina y de la Casiopeína IIgly fue la Guaifenesina presentándose en el tiempo de 6.7 minutos. La Concentración de la Guaifenesina se estableció en base a la respuesta cromatográfica (área), la cual debería corresponder a la mitad del punto más alto de la curva estándar en orina, lo cual se obtuvo con una concentración de 150  $\mu\text{g/mL}$  de Guaifenesina en la muestra. Se realizó un espectro de absorción para la Guaifenesina presentando uno de sus máximos de absorción en 273 nm.

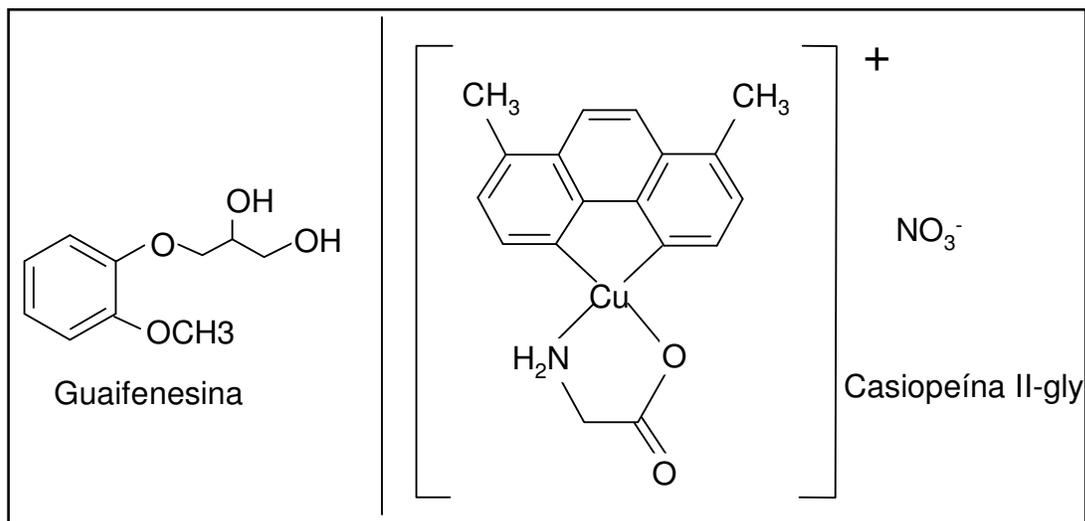


Figura 8. Estándar Interno (Guaifenesina) y Casiopeína II-gly



● 4.2 VALIDACION DEL MÉTODO ANALÍTICO

☑ 4.2.1 Linealidad del Sistema

El sistema mostró ser lineal (Fig. 9, Tabla 6) en el rango de concentraciones 5-50 µg/mL para la Casiopeína IIgly en fase móvil; encontrando que el coeficiente de correlación (r) fue mayor a 0.99. Se encontró un %CV del factor de respuesta del 4.7%

Tabla 6. Linealidad del sistema para la cuantificación de Casiopeína II-gly.

Concentración Casiopeína II-gly(µg/mL)	Curva 1	Curva 2	Factor de respuesta= Área/concentración	
5	1457.66	1499.66	291.53	299.93
15	4418.49	4526.45	294.57	304.40
25	8104.42	8260.07	324.18	330.40
35	11304.80	11495.80	322.99	328.45
50	15066.40	15386.80	301.33	307.74
m	308.21	314.1	<b>Media (n=10)</b>	<b>310.29</b>
b	56.85	67.165	<b>DE (n=10)</b>	<b>14.74</b>
r	<b>0.9975</b>	<b>0.9978</b>	<b>% CV (n=10)</b>	<b>4.75</b>

Ecuación promedio:  $y = 311.16x - 62.01$

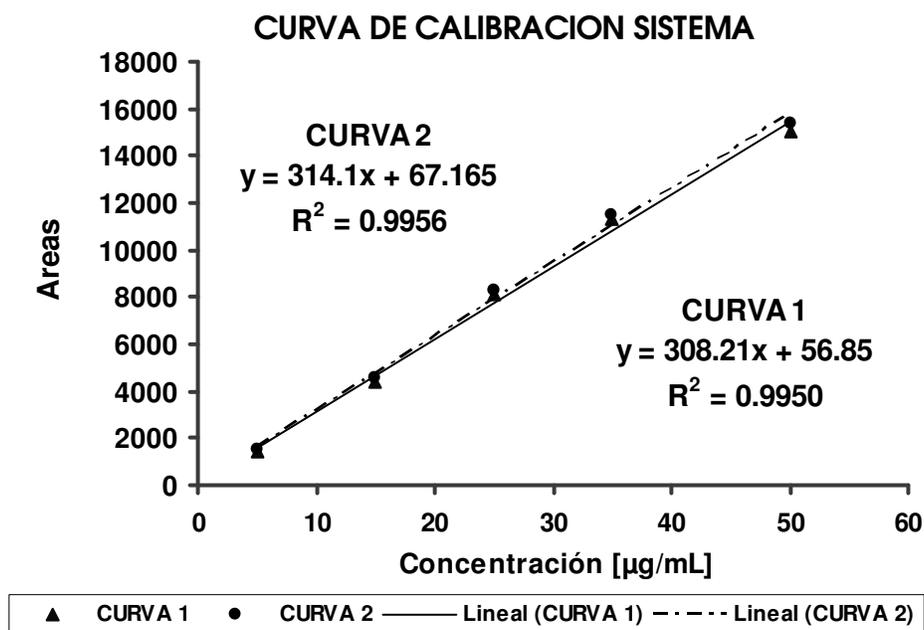


Figura 9. Gráfica de Linealidad del Sistema para Casiopeína II gly



4.2.2 Linealidad del método

El Método mostró ser lineal (Fig. 10, Tabla 7) en el rango de concentraciones 5-50 µg/mL para Casiopeína II gly en orina; debido a que el coeficiente de correlación (r) fue mayor a 0.99. Los resultados fueron:

Tabla 7. Linealidad del método analítico para la cuantificación de Casiopeína II-gly

Concentración Casiopeína II-gly(µg/mL)	Curva 1	Curva 2	Curva 3
5	0.2033	0.2131	0.1963
15	0.5559	0.5770	0.5446
25	0.9318	1.0427	0.8908
35	1.3829	1.3760	1.3122
50	1.8998	1.9020	1.8710
m	0.0383	0.0378	0.0375
b	-0.001	0.0383	-0.0111
r	0.9990	0.9984	0.9994

Ecuación promedio:  $y = 0.0379 x + 0.0087$

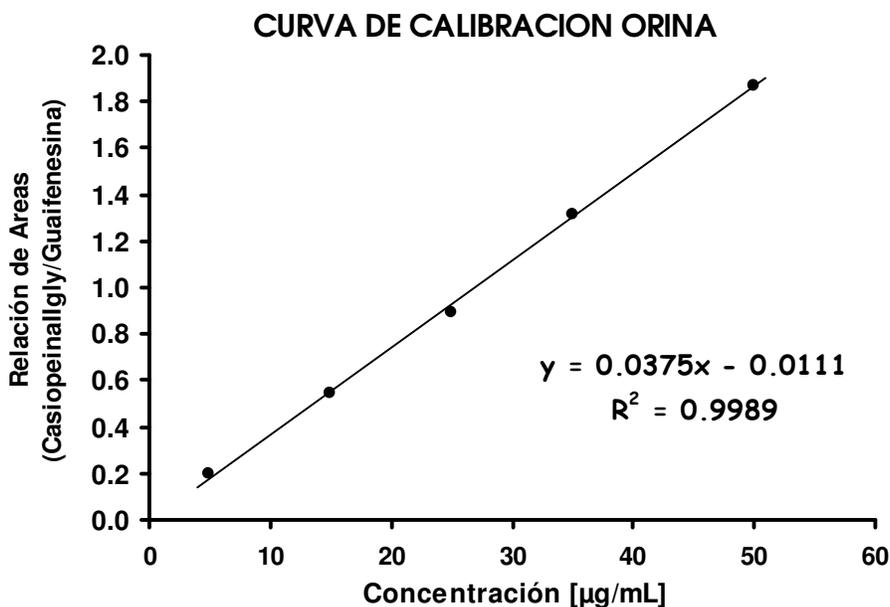


Figura 10. Gráfica de Linealidad del Método para Casiopeína II gly



☑ 4.2.3 Precisión del Método

Las siguientes tablas muestran los resultados obtenidos para precisión:

❖ Repetibilidad

**Tabla 8. Repetibilidad del método para la cuantificación de Casiopeína II-gly**

	Punto control bajo 8µg/mL Concentración recuperada	Punto control medio 20µg/mL Concentración recuperada	Punto control alto 45µg/mL Concentración recuperada
Replica 1	8.58	14.67	37.10
Replica 2	7.44	14.27	35.66
Replica 3	7.28	18.61	34.07
Replica 4	6.86	15.45	33.54
Replica 5	8.74	14.15	33.23
Promedio	7.78	15.43	34.72
DE	0.83	1.85	1.62
<b>CV%</b>	<b>10.69</b>	<b>11.99</b>	<b>4.68</b>

❖ Reproducibilidad

**Tabla 9. Reproducibilidad del método para la cuantificación de Casiopeína II-gly**

Día	No. replica	Punto control bajo 8µg/mL Concentración recuperada	Punto control medio 20µg/mL Concentración recuperada	Punto control alto 45µg/mL Concentración recuperada
1	Replica 1	8.58	15.45	37.10
	Replica 2	8.74	18.61	35.66
2	Replica 1	9.98	20.34	46.88
	Replica 2	10.29	20.24	50.12
3	Replica 1	9.28	19.79	43.19
	Replica 2	7.40	16.31	44.62
	Promedio	9.04	18.46	42.92
	DE	1.05	2.11	5.61
	<b>CV%</b>	<b>11.60</b>	<b>11.41</b>	<b>13.06</b>



4.2.4 Exactitud

La siguiente tabla muestra los resultados obtenidos para la exactitud del método:

**Tabla 10. Exactitud del método para la cuantificación de Casiopeína II-gly**

	Punto control bajo 8µg/mL		Punto control medio 20µg/mL		Punto control alto 45µg/mL	
	Concentración recuperada	%DEA	Concentración recuperada	%DEA	Concentración recuperada	%DEA
Replica 1	8.58	7.25	14.67	26.66	37.10	17.56
Replica 2	7.44	6.9	14.27	28.63	35.66	20.76
Replica 3	7.28	8.9	18.61	6.93	34.07	24.28
Replica 4	6.86	14.25	15.45	22.74	33.54	25.47
Replica 5	8.74	9.23	14.15	29.23	33.23	26.15
Replica 6	9.98	24.77	20.34	1.70	46.88	4.17
Replica 7	10.29	28.67	20.24	1.22	50.12	0.85
Replica 8	9.28	15.98	19.79	1.07	43.19	4.03
Replica 9	7.40	7.495	16.31	18.46	44.62	11.39
<b>Promedio</b>	<b>8.43</b>	<b>13.72</b>	<b>17.09</b>	<b>15.18</b>	<b>39.82</b>	<b>14.96</b>

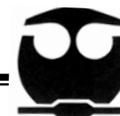
Replica 1-5: Datos de Repetibilidad, Replica 6-9: Datos de Reproducibilidad

4.2.5 Recuperación Absoluta

Para la cantidad recuperada de Casiopeína II-gly, el porcentaje de recobro estuvo alrededor del 100 %, como lo muestra la siguiente tabla:

**Tabla 11. Recobro absoluto de Casiopeína II-gly en tres niveles de concentración**

	Punto control bajo 8µg/mL		Punto control medio 20µg/mL		Punto control alto 45µg/mL	
	SOLUCION	ORINA	SOLUCION	ORINA	SOLUCION	ORINA
Replica 1	8.14	9.69	20.0363	16.87	43.79	41.77
Replica 2	8.13	9.35	19.3742	16.38	41.71	30.14
Replica 3	7.60	6.85	20.6269	20.88	43.42	40.91
Promedio	7.96	8.63	20.0125	18.04	42.98	37.61
DE	0.31	1.55	0.6267	2.47	1.11	6.48
<b>% RECOBRO</b>	<b>108.48</b>		<b>90.16</b>		<b>87.52</b>	
	<b>Promedio 95.38%</b>					



4.2.6 Selectividad del Método.

Las figuras 11-13 muestran los cromatogramas correspondientes para selectividad a componentes de la orina y al *EI*.

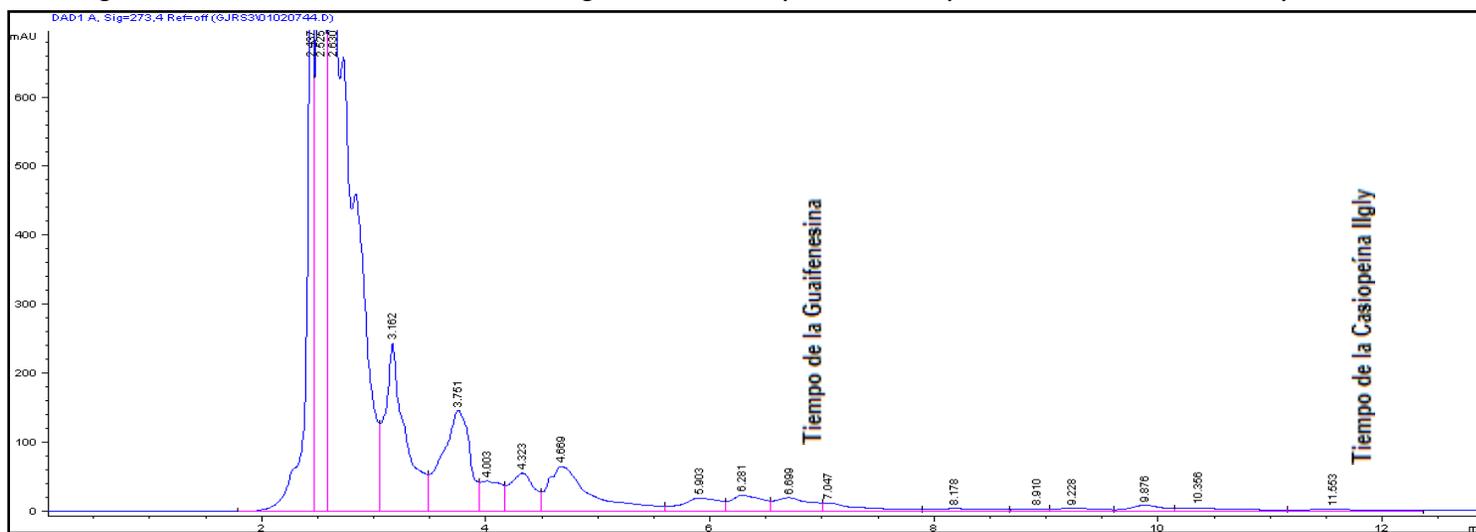


Figura 11.  
Cromatograma de  
Blanco de orina

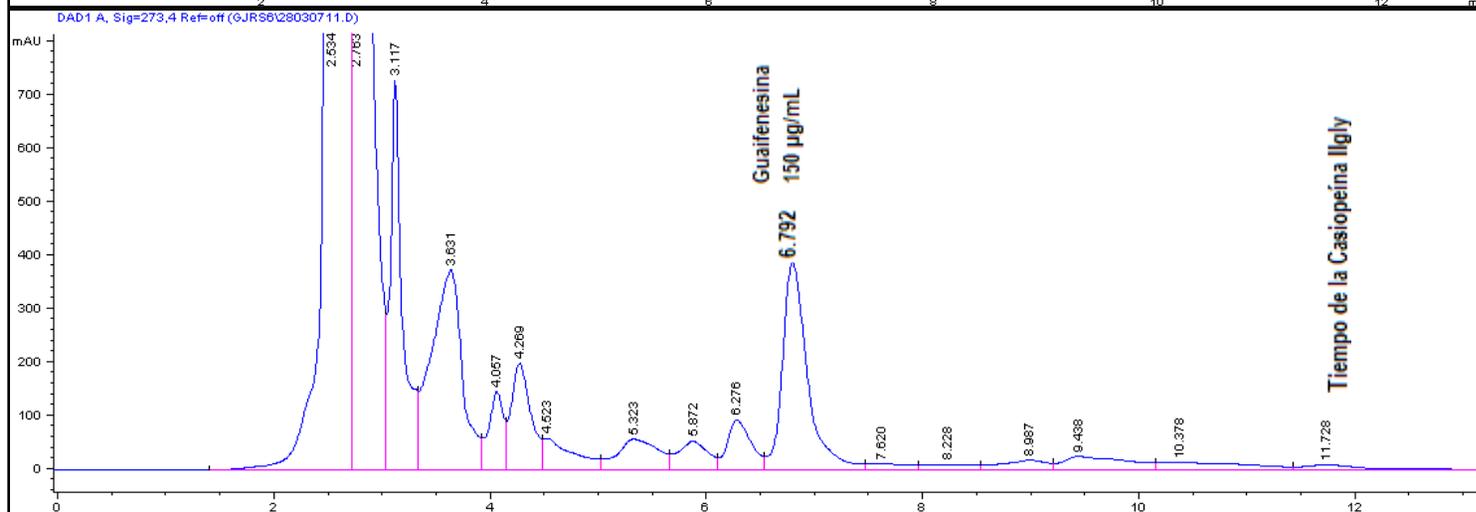


Figura 12.  
Cromatograma de  
Orina adicionada de  
Guaifenesina (EI)



#### IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

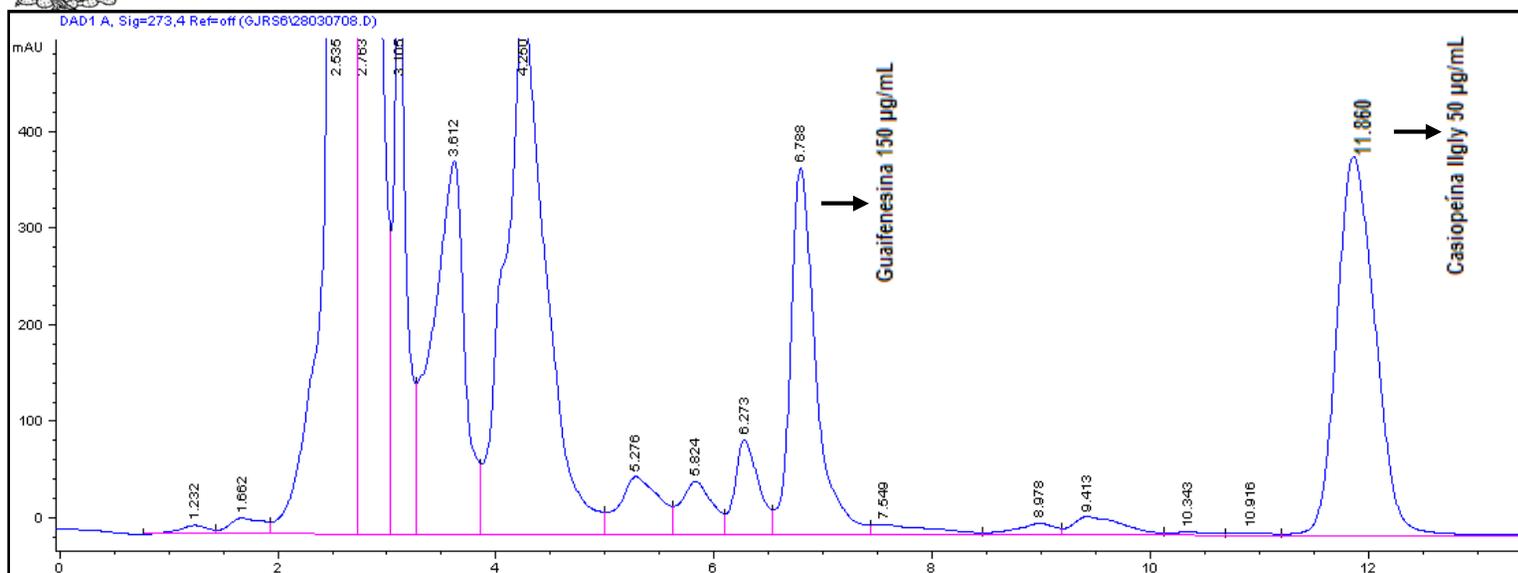


Figura 13. Cromatograma de Orina adicionada con Casiopeína Ilgly y Guaifenesina.

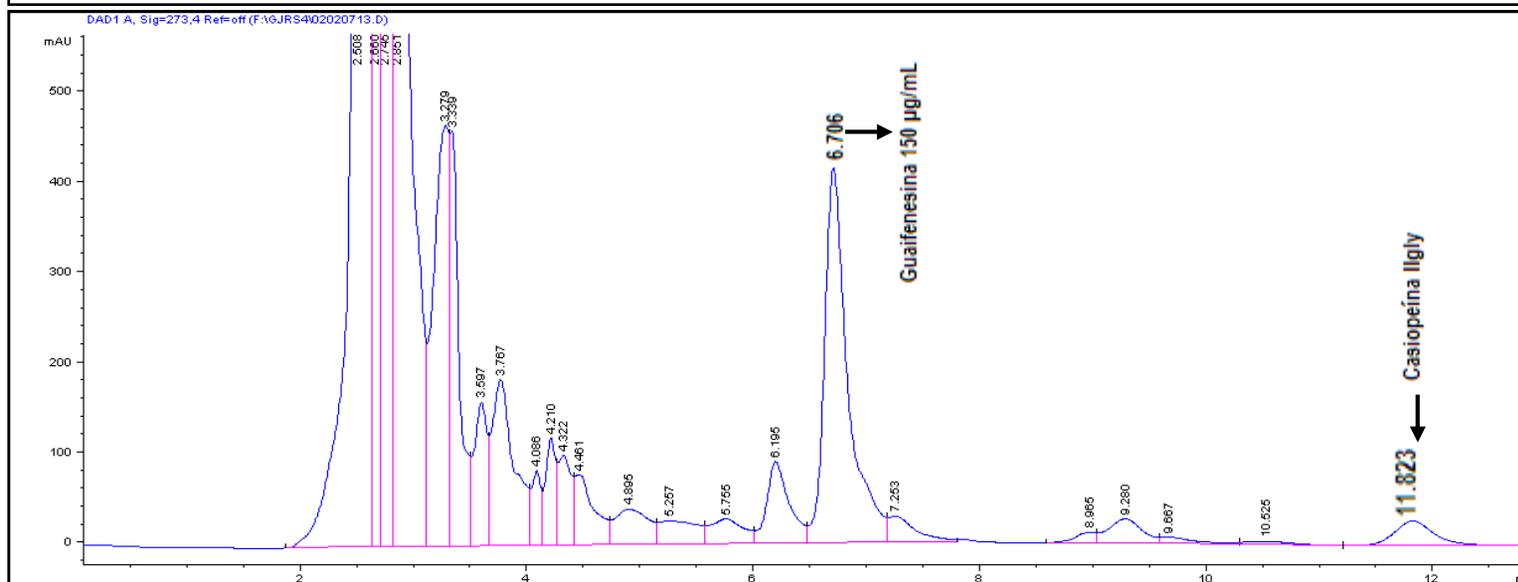
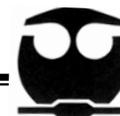


Figura 14. Cromatograma de Casiopeína Ilgly 3 µg/mL



#### IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN



Los siguientes Cromatogramas muestran los posibles productos de desintegración o metabolitos de la Casiopeína II-gly:

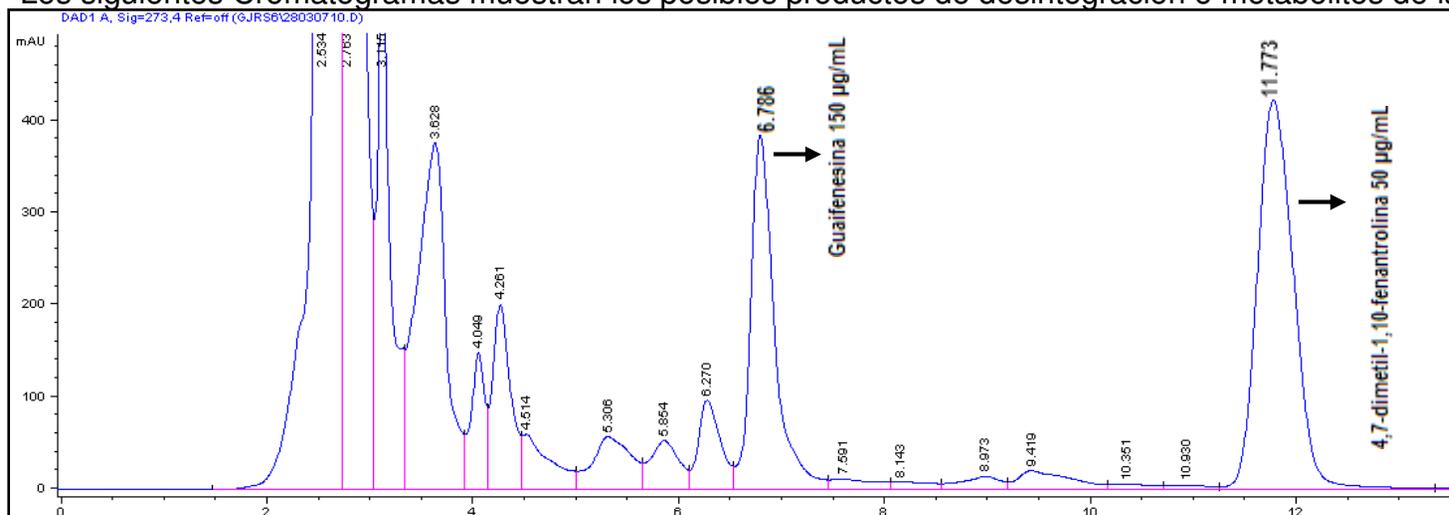


Figura 15.  
Cromatograma de Orina adicionada con 4,7-dimetil-1,10-fenantrolina y EI

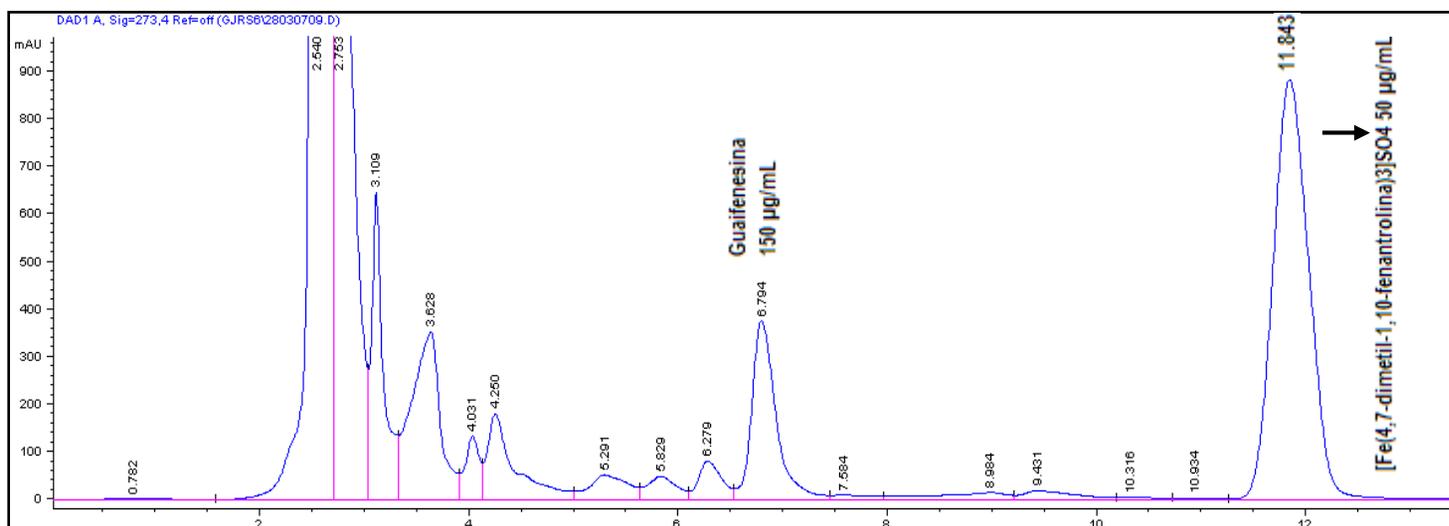


Figura 16.  
Cromatograma de Orina adicionada con [Fe(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)<sub>3</sub>] SO<sub>4</sub> y EI



4.2.7 Límite de detección

El límite de detección se estimó en 3  $\mu\text{g/mL}$

4.2.8 Límite de cuantificación.

Se calculó el coeficiente de variación y el porcentaje de desviación absoluta para el límite de cuantificación de 5  $\mu\text{g/mL}$  obteniéndose lo mostrado en la siguiente tabla:

**Tabla 12. Límite de Cuantificación de Casiopeína II-gly**

<b>5 <math>\mu\text{g/mL}</math> Concentración nominal</b>	Concentración recuperada	% Desviación Absoluta
Replica 1	6.16	23.13
Replica 2	5.71	14.13
Replica 3	6.01	20.30
Replica 4	5.78	15.64
Replica 5	5.56	11.14
Promedio	5.84	<b>16.87</b>
DE	0.24	4.82
<b>CV%</b>	<b>4.12</b>	



☑ 4.2.9 Estabilidad de la muestra

Los resultados de estabilidad se muestran en las tablas 13 a 16:

- ❖ Estabilidad de la muestra en condiciones de almacenamiento.

**Tabla 13. Estabilidad de la muestra en congelación por 3 días.**

Tiempo en congelación (-20°)		Cero horas (control)	72 horas	% Desviación absoluta
Concentración nominal Casiopeína IIgly (µg/mL)	Replica	Concentración encontrada Casiopeína II gly (µg/mL)	Concentración encontrada Casiopeína II gly (µg/mL)	
8	1	9.28	9.17	9.91
	2	7.40	7.73	7.30
	Promedio	8.34	8.45	8.61
20	1	19.79	17.72	1.79
	2	16.31	17.99	0.32
	Promedio	18.31	17.86	1.05
45	1	43.19	36.92	15.89
	2	44.62	39.26	10.56
	Promedio	43.90	38.29	13.23

**Tabla 14. Estabilidad de la muestra en congelación por una 7 días.**

Tiempo en congelación (-20°)		Cero horas (control)	Una semana	% Desviación absoluta
Concentración nominal Casiopeína IIgly (µg/mL)	Replica	Concentración encontrada Casiopeína II gly (µg/mL)	Concentración encontrada Casiopeína II gly (µg/mL)	
8	1	9.28	7.31	12.36
	2	7.40	6.98	16.28
	Promedio	8.34	7.14	14.32
20	1	19.79	15.81	12.41
	2	16.31	16.24	10.03
	Promedio	18.31	16.02	11.22
45	1	43.19	35.06	20.14
	2	44.62	35.36	19.45
	Promedio	43.90	35.21	19.79



❖ Estabilidad de la muestra durante Ciclos de Congelación-Descongelación

**Tabla 15. Estabilidad de Casiopeína II-gly durante dos ciclos de congelación-descongelación**

Ciclos de Cong-Descong		Congelación por 72 hr sin Descongelar	Dos ciclos congelación-descongelación	% Desviación absoluta (conc refer 72 hr)
Concentración nominal Casiopeína IIgly (µg/mL)	Replica	Concentración encontrada Casiopeína II gly (µg/mL)	Concentración encontrada Casiopeína II gly (µg/mL)	
8	1	9.17	5.10	39.52
	2	7.73	4.260	49.60
	Promedio	8.45	4.68	44.56
20	1	17.72	11.20	37.27
	2	17.99	11.04	38.19
	Promedio	17.86	11.12	37.73
45	1	36.92	28.03	26.79
	2	39.26	28.01	26.84
	Promedio	38.29	28.02	26.82

❖ Estabilidad de la muestra procesada

**Tabla 16. Estabilidad de la muestra procesada**

Tiempo en automuestreador		Cero horas (control)	16 horas	% Desviación absoluta
Concentración nominal Casiopeína IIgly (µg/mL)	Replica	Concentración encontrada Casiopeína II gly (µg/mL)	Concentración encontrada Casiopeína II gly (µg/mL)	
8	1	9.28	8.37	0.40
	2	7.40	6.77	18.84
	Promedio	8.34	7.57	9.62
20	1	19.79	18.69	3.57
	2	16.31	15.38	14.78
	Promedio	18.31	17.03	9.17
45	1	43.19	42.61	2.93
	2	44.62	46.89	6.82
	Promedio	43.90	44.75	4.88



### ● 4.3 DISCUSIÓN DE LA VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

La Validación nos indicó que el Método Analítico demostró ser un procedimiento que cumplió con los requisitos para la aplicación analítica que se deseaba.

Se logró una separación satisfactoria de Casiopeína II-gly de componentes endógenos de la orina de rata y del Estándar Interno. El tiempo de retención para la Casiopeína II-gly fue de 11.8 y de Guaifenesina 6.7 minutos. Los probables compuestos de descomposición son 4,7-dm-1,10-fen y Cobre-Glicina, ambos fueron analizados encontrándose que la primera presenta tiempo de retención en 11.8 min, mientras que Cu-gly no presentó ninguna señal a la longitud de onda utilizada. Se sabe que existe un probable intercambio *in vivo* de Cobre por Hierro (II) en la molécula <sup>(17)</sup> formándose el compuesto  $[\text{Fe}(\text{N-N})_3]^{2+}$ , por lo que se analizó el compuesto  $[\text{Fe}(\text{fen})_3]\text{SO}_4$ , el cual presentó tiempo de retención en 11.7 minutos. Así que si existe cambio en la molécula el compuesto podría ser Casiopeína o el compuesto mencionado, ya que no se diferencian en su separación.

La linealidad del Sistema fue aceptable obteniéndose  $r = 0.9977$  con la ecuación  $y = 311.16x - 62.01$ . Se encontró un %CV del factor de respuesta de 4.7%, lo cual indicaría que no cumple el sistema con la precisión; sin embargo, la Norma 177 no lo exige, por lo tanto únicamente se toma en cuenta el resultado de la linealidad y precisión del método.



La linealidad del método fue evaluado con curvas de calibración realizadas en orina de rata en el rango de 5-50  $\mu\text{g/mL}$ . Una buena relación lineal fue encontrada con la siguiente ecuación  $y=0.0379x + 0.0087$  ( $r = 0.9989$ ).

El límite de Detección fue  $3\mu\text{g/mL}$  (Fig. 14), concentración en la cual la señal de la Casiopeína Ilgly es tres veces la señal de ruido. El límite de Cuantificación fue de  $5\mu\text{g/mL}$ , el cual presentó un  $\%CV= 4.12$  y  $\% DEA= 16.87\%$ .

La precisión se evaluó en tres niveles de concentración obteniendo un  $\% CV$  para repetibilidad de 10.69, 11.99 y 4.68 y para reproducibilidad de 11.60, 11.41 y 13.06  $\%CV$ , obteniéndose para ambas un  $\%CV$  menor al 15 por ciento por lo que el método se considera preciso y exacto.

El Recobro fue determinado comparando tres niveles de concentración ( $n=3$  por cada nivel) en orina y en fase móvil, procesándolos de la misma manera, se encontró un  $\%Recobro$  absoluto promedio de 95.38%.

La estabilidad de la muestra dió como resultado que es estable en orina congelada por 3 días, y después de su procesamiento por al menos 16 horas con un porcentaje de coeficiente de variación menor al 15%. No es estable a congelación por 7 días o más, ni a dos ciclos de congelación descongelación, ya que en ellas se encuentra un  $\%CV$  por encima del 15 %

El método fue consistente según la Norma 177 por lo que se utilizó en el estudio preclínico de farmacocinética.



#### ● 4.4 FARMACOCINÉTICA PRECLÍNICA EN RATAS MACHO WISTAR

Después de realizar la administración intravenosa de la Casiopeína II-gly y la 4,7-dimetil-1,10-fenantrolina en las ratas, no se logró detectar ninguno de los compuestos con el Método Analítico ya validado.

Durante el análisis de las muestras de orina, se observó una señal entre los 9.5 y 10 minutos como tiempo de retención (Fig. 18 y 19). Dicha señal se presentó en 7 de las ratas administradas con Casiopeína II-gly y 1 rata administrada con 4,7-dimetil-1,10-fenantrolina.

Se observó aumento de área de dicha señal entre las 11 y 30 horas después de la administración (con mayor frecuencia en el intervalo de 23 a 30 horas de muestreo). La disminución del área se observó en la mayoría (63 %ratas con Casiopeína IIgly) a las 48 horas, mientras que en la muestra de la rata administrada con 4,7-dimetil-1,10-fenantrolina siguió aumentando hasta las 80 horas.

Cabe señalar que se observó un cambio de coloración en la orina de las ratas (Fig. 20). En las ratas administradas con 4,7-dimetil-1,10-fenantrolina, la coloración de la orina fue rosado-naranja en las dos primeras horas de muestreo. En cuatro ratas administradas con Casiopeína II-gly se observó la coloración *rosado-naranja* pero menos intensa que para la 4,7-dimetil-1,10-fenantrolina.



En seis de las ratas administradas con Casiopeína II-gly se observó una coloración *vino intenso*, la cual se presentó entre las 23 y 30 horas, desapareciendo para 5 de ellas a las 48 horas y para una rata hasta las 80 horas.

Durante la eliminación de orina con dicha coloración, el estado de las ratas se observó deteriorado, ya que se observaron síntomas tales como debilidad, falta de movimiento, y respiración agitada, mejorándose al desaparecer la coloración vino.

A una muestra de orina de rata de coloración vino correspondiente al intervalo de tiempo 23 a 30 horas, se realizó un urianálisis en el cual se reporta:

**Tabla 17. Resultados de Urianálisis (Rata administrada con Casiopeína 23-30 horas)**

Realizado en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia  
(Departamento de Patología, sección Patología clínica)

Examen Físico	Examen Microscópico
Apariencia: Turbio 3+ Color : Vino tinto pH : 8.0 Densidad 1.048	Eritrocitos 0-1 / campo  No hubo presencia de leucocitos, ningún tipo de célula epitelial.
Examen Químico	Cilindros: Granular fino escasos
Proteínas: 5 g/L Cetonas (-) Glucosa 0 mmol/L Bilirrubina (-) Urobilinógeno 0 Sangre 0 eri./µL Hemoglobina (+)	Cristeles: Estruvita 2+  Lípidos Escasos



#### IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

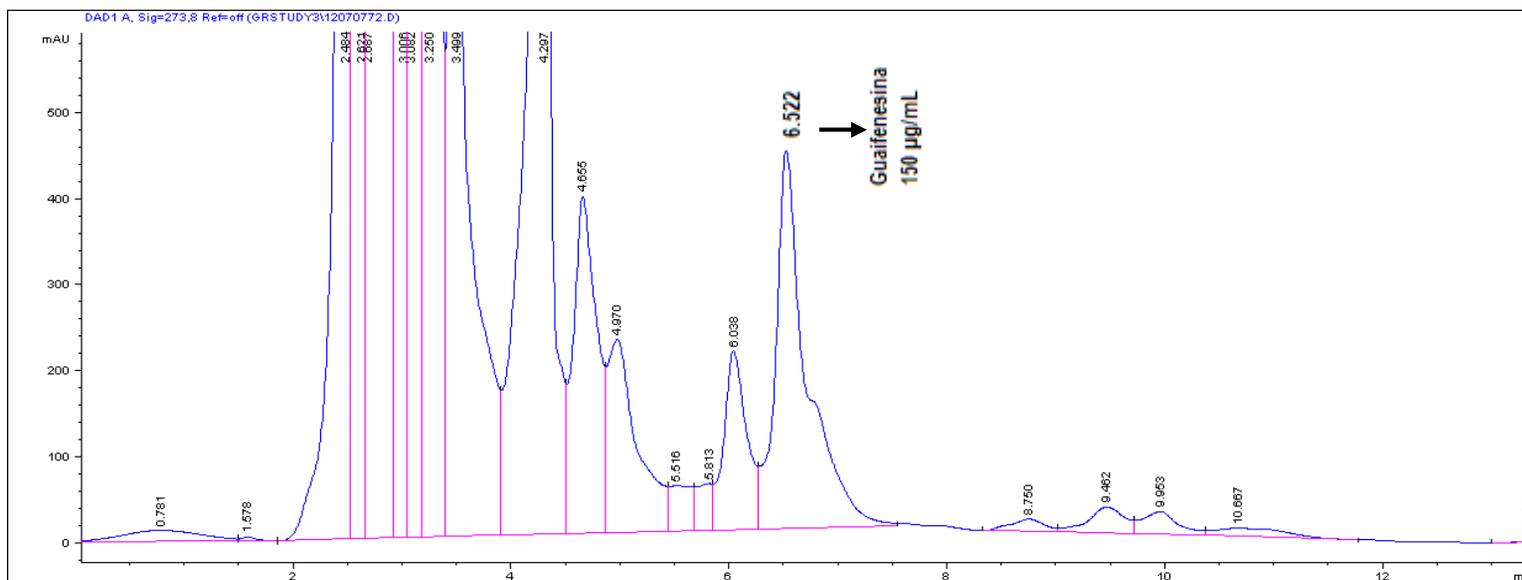


Figura 17.  
Cromatograma  
de una muestra  
de orina de rata  
Control

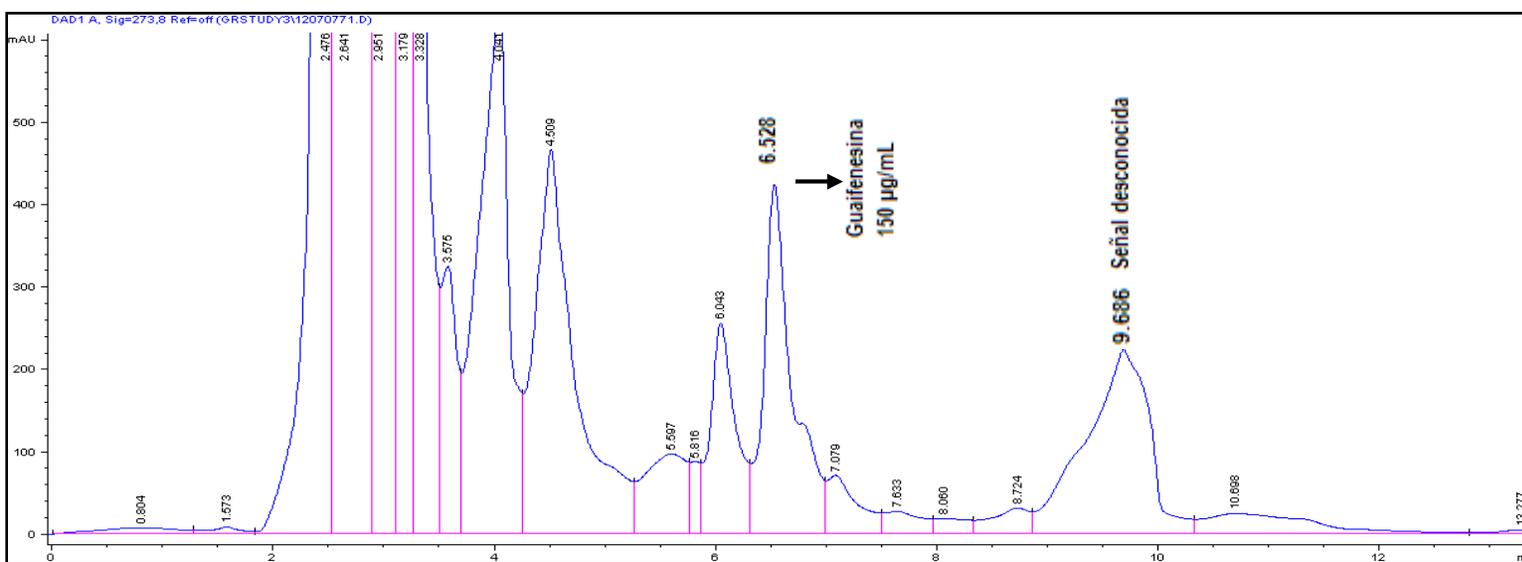


Figura 18.  
Cromatograma  
de una muestra  
de orina de rata  
administrada  
con Casiopeína  
Ilgly (tiempo  
48-80 hr)



#### IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

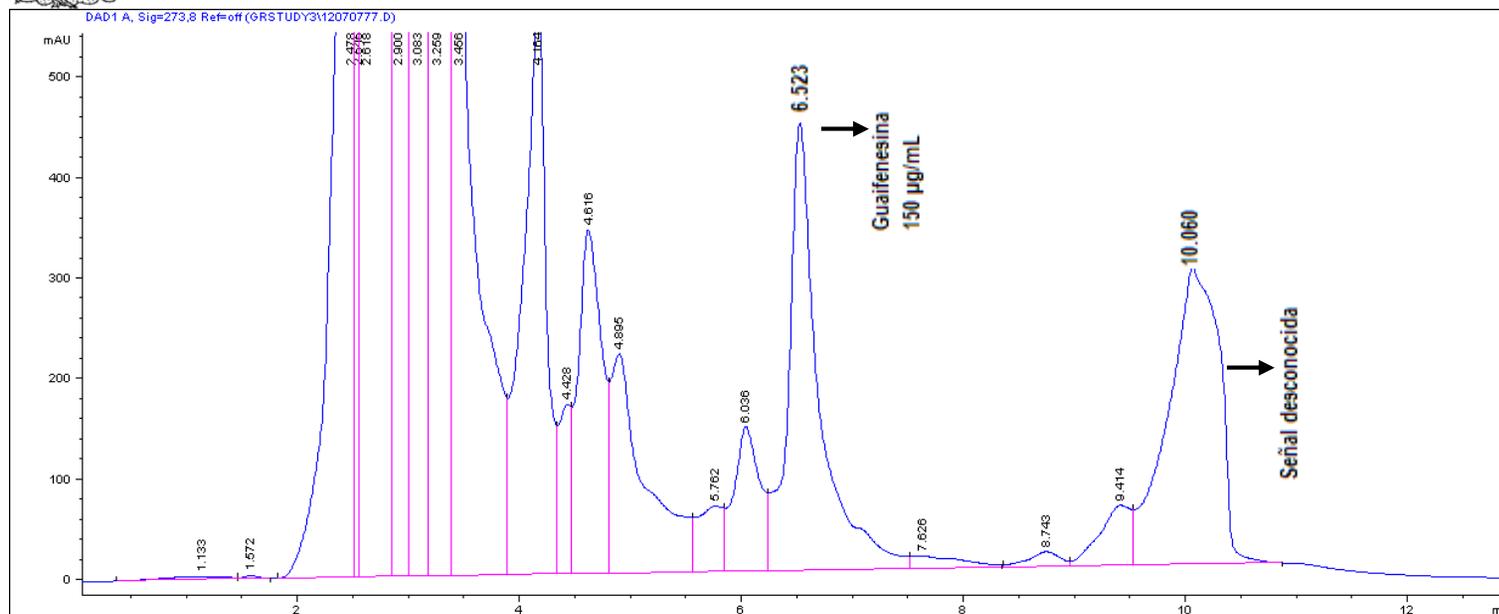
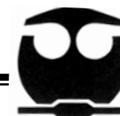


Figura 19. Cromatograma de una muestra de orina de rata administrada con 4,7-dimetil-1,10-fenantrolina (tiempo 48-80 hr)

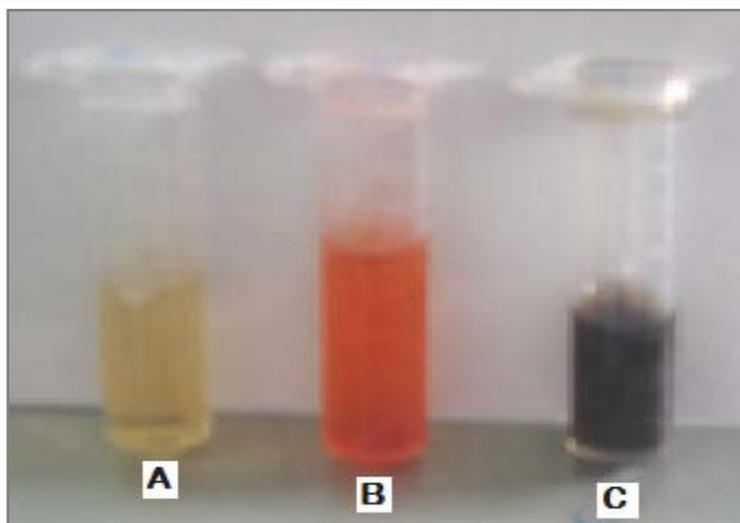


Figura 20. Coloración de orina de ratas A) Control, B) 4,7-dimetil-1,10-fenantrolina (1-2 hr) y C) Casiopéina IIgly (23-30 hr)



#### ■ 4.5 DISCUSIÓN DEL ESTUDIO PRECLÍNICO EN RATAS

No se detectó ni Casiopeína II-gly ni 4,7-dimetil-1,10-fenantrolina en las muestras de orina, motivo Por el cual no se lograron obtener los datos farmacocinéticos. De esta forma, la hipótesis propuesta es rechazada. A pesar de ello, se obtuvieron datos muy importantes que pueden contribuir a entender el comportamiento Biofarmacéutico de la Casiopeína II-gly.

La señal observada al tiempo de retención aproximado de 10 minutos (Fig. 18 y 19) nos podría estar indicando la presencia de un metabolito, dicho metabolito se estaría presentando aproximadamente a las 30 horas después de la administración de Casiopeína II-gly y 4,7-dimetil-1,10-fenantrolina..

Un aspecto de interés fue la coloración de la orina ya que en ambos compuestos se observó una coloración *rosado-naranja* en los primeros tiempos de muestreo, lo cual estaría planteando que posiblemente dicha coloración es debida a la 4,7-dimetil-1,10-fenantrolina y este hecho estaría abriendo más la posibilidad de que la 4,7-dimetil-1,10-fenantrolina pudiera estar interaccionando con el Fierro del organismo <sup>(17.)</sup> Además la coloración vino estaría siendo desarrollada probablemente debido a la presencia del cobre en la molécula.



El urianálisis (Tabla 17) nos reveló que no se presenta sangre en orina, sin embargo se reporta Hemoglobina positiva, lo cual nos podría hablar de una hemoglobinuria.

En ocasiones la presencia de sangre en orina da resultados positivos en pruebas bioquímicas para hemoglobina, debido a que los eritrocitos pueden ser lisados en la orina.

Lo anterior nos puede indicar que la coloración vino es debida al cobre, ya que el cobre al entrar a la circulación sanguínea, daña la membrana de los eritrocitos causando la liberación de hemoglobina por hemólisis intravascular<sup>(40)</sup>, la cual puede resultar en hemoglobinuria, y por ello presentar una orina de color rojo o vino oscuro por la presencia de hemoglobina en la orina.

El urianálisis también indicó una posible elevación de proteínas, posiblemente debido a la presencia de hemoglobina.

Se sugiere realizar un estudio más completo de la posible crisis hemolítica debida a la Casiopeína, para determinar si efectivamente se trata de hematuria y/o hemoglobinuria, ya que si es el caso podría indicar la presencia de una insuficiencia renal.

Lo anterior expuesto, nos podría estar indicando que probablemente la Casiopeína Il-gly se metaboliza o se distribuye en otros tejidos. Se puede considerar también que exista otra vía de excreción, ya que se sabe que la excreción del cobre es principalmente vía biliar (80%) para excretarse por heces <sup>(7)</sup>, además de que su excreción por orina podría ser muy baja.



Otra razón, podría ser que al unirse a proteínas la Casiopeína II-gly se presente en plasma unida a ellas y no se libere rápidamente, pudiendo excretarse en un tiempo prologado.

En la solución de Casiopeína II-gly administrada a las ratas, se observó precipitación, por lo que para evitarla se recomienda una agitación constante de la solución y se sugiere hacer la administración en solución glucosada, ya que es más estable en ella.

(14)



[ *V. CONCLUSIONES* ]



### 5.1 CONCLUSIONES

Se logró validar un método, el cual provee una eficiente extracción de la Casiopeína II-gly de la orina. El Método fue lineal con  $r \geq 0.99$  en el intervalo de 5 a 50  $\mu\text{g/mL}$ , fue preciso y exacto con  $\text{CV}\% < 15\%$ , el recobro fue reproducible y constante obteniéndose en promedio un 95.38%, presenta un Límite de Detección de 3  $\mu\text{g/mL}$  y Límite de Cuantificación de 5  $\mu\text{g/mL}$ . Es estable en congelación ( $-20^\circ\text{C}$ ) por 3 días y 16 horas después de procesarla en el automuestreador.

Por lo que se consideró usarlo en el estudio preclínico.

El estudio preclínico realizado, muestra que probablemente la Casiopeína II-gly se metaboliza o se distribuye en otros tejidos. Otra posibilidad es que la vía de excreción sea distinta, por ejemplo por heces.



## ● 5.2 PERSPECTIVAS

Las perspectivas que se proponen para seguir el proyecto de Casiopeína II-gly en estudios preclínicos son:

- Desarrollar un Método Analítico con menor Límite de Cuantificación (incluso en nanogramos), para de esta manera detectar Casiopeína II-gly en muy bajas concentraciones.
  
- Conocer el comportamiento del Cobre de la Casiopeína en el organismo, para determinar cómo contribuye este en la toxicidad y eliminación de la Casiopeína II-gly, utilizando técnicas tales como Absorción atómica, Cromatografía de intercambio Iónico o Espectrometría de Masas.
  
- Búsqueda de posibles metabolitos
  
- Análisis de Casiopeína IIgly en heces fecales
  
- Estudio de la posible crisis hemolítica causada por el cobre presente en la Casiopeína II-gly.



[ *VI. BIBLIOGRAFÍA* ]



## 6. BIBLIOGRAFIA

---



- 1) Muñoz Alberto. Cáncer: Genes y nuevas terapias. Madrid; Hélice 1997
- 2) INEGI. Estadísticas Demográficas 2005, Edición 2006
- 3) Harrison, *Principios de Medicina Interna*. 15<sup>a</sup>. ed. Mc Graw Hill Interamericana 2002 México, 625-637
- 4) Goodman and Gilman. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. 10<sup>a</sup>. ed. México: Mc Graw Hill Interamericana, 2003.
- 5) Cancernetwork.com [homepage on the Internet] CMP Healthcare Media LLC. "Cancer Management: Principles of Oncologic Pharmacotherapy". 2007 Disponible en <http://www.cancernetwork.com/index.jhtml> (septiembre 2007)
- 6) Badreldin H. Ali, Manssur S. Al Moundhri. Agents ameliorating or augmenting the nephrotoxicity of cisplatin and other platinum compounds: A review of some recent research. *Food and Chemical Toxicology* 44, 1173-1183 (2006).
- 7) Rosmarie A. Faus, Ph.D, Chemical Hazard Evaluation and Communication Group, Biomedical and Environmental Information Analysis Section, Health and Safety Research Division, Oak Ridge, Tennessee. Toxicity profiles, Toxicity Summary for Copper. December 1992. Disponible en <http://rais.ornl.gov/tox/profiles/copper.shtml> (sept. 2007)



- 8) Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) Toxicological profile for copper. 2004. Atlanta, GA: US. Department of Health and Human Services, Public Health Source. Disponible en <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/> (Julio 2007)
- 9) Gracia-Mora, Ruiz-Ramirez, Gomez-Ruiz, Tinoco-Mendez, Marquez-Quinones, Lira, Marin-Hernández, Macias-Rosales, Bravo-Gómez, 2001. Knight's move in the periodic table, from copper to platinum, novel antitumor mixed chelate copper compounds, casiopeína, evaluated by an *in Vitro* human and murine cancer cell line panel. *Met. Based Drugs* 8, 19-28.
- 10) Mas Oliva J., Advances in cancer Research at UNAM, El Manuel Moderno, México, D.F. Cap. 15.
- 11) Bravo Ma. Elena, Tovar Araceli, et al. Diseño , síntesis y caracterización de compuestos de coordinación de cobre Casiopeínas, historia Química de un proyecto exitoso. Memorias del Primer Congreso en Casiopeínas y 5ª. Jornada de Trabajo en Casiopeínas, Diciembre 2 y 3, Taxco Guerrero pp 1-5.
- 12) Zepeda Benítez B. Cinética *in Vitro* de Casiopeína II-gly en sangre total de rata por HPLC (tesis de licenciatura). Facultad de Química, UNAM, 2004



- 13) García Rojas M. Unión a Proteínas de la Casiopeína II por el Método de Ultrafiltración (tesis de Maestría aún no publicada), Facultad de Química, UNAM. Biofarmacia.
- 14) Romero de L, *et al.* Memorias 2a Jornada de trabajo de Casiopeínas pp 20; 1996, abril 22 y 23, Facultad de Química, UNAM.
- 15) Redón de la Fuente. Estudio de la Estabilidad en Disolución acuosa a diferentes valores de pH de complejos mixtos de Cu (II). (Tesis de licenciatura) Facultad de Química, UNAM 1993.
- 16) Rivera Huerta, *et al.* Toxicidad Aguda en rata y ratón de la Casiopeína II. Memorias 2º Congreso Nacional de Química Médica; 2006 septiembre 4-8, Querétaro QRO.
- 17) De la Rosa Ma Esther, Maycotte Paola, *et al.* Estudio de Subproductos del metabolismo de Casiopeínas in vivo. Memorias 3ª Jornada de Trabajo de Casiopeínas pp 73; 1998 mayo 18 y 19; Facultad de Química, UNAM.
- 18) Arnaudeau, Tenorio-Miranda, Jenssen Dag, Helleday Thomas. Inhibition of DNA synthesis is a potent mechanism by which cytostatic drugs induce homologous recombination in mammalian cells. *Mutat. Res.* 461, 221-228 (2000).



- 19) De Vizcaya-Ruiz, Rivero-Müller, Ruiz-Ramírez, *et al.* Hematotoxicity response in rats by the novel copper-based anticancer agent: casiopeína II. *Toxicology* 194, 103-113 (2003).
- 20) Marín-Hernández, Gracia-Mora, Ruiz-Ramírez, Moreno-Sánchez. Toxic effects of copper-based antineoplastic drug (Casiopeinas®) on mitochondrial functions. *Biochem. Pharmacol.* 65, 1979-1989 (2003).
- 21) Trejo-Solís C., Palencia G., Zúñiga S., Rodríguez-Ropon, *et al.* Cas IIgly Induces Apoptosis in Glioma C6 In Vitro and In Vivo through Caspase-Dependent and Caspase-Independent Mechanisms. *Neoplasia* 7 No.6; 563-574 (2005).
- 22) Hernández-Esquivel, Marín-Hernández, Pavón N, *et al.* Cardiotoxicity of copper-based antineoplastic drugs casiopeinas is related to inhibition of energy metabolism. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 212, 79-88 (2006).
- 23) Rivero-Müller, De Vizcaya-Ruiz, N Plant, Lena Ruiz, Miloslav Dobrota. Mixed chelate copper complex. Casiopeina II-gly, binds and degrades nucleic acids: A mechanism of cytotoxicity. *Chemico-Biological Interactions* 165, 189-199 (2007).



- 24) Emelio John, Dan Luckabaugh. Manual del Centro para la evaluación e Investigación de Fármacos (CDER). Ministerio de Salud y servicios Sociales. *Food and Drug Administration. Centro para la Evaluación e Investigación de Fármacos*. 1998. Disponible en <http://www.fda.gov/cder> (febrero 2007)
- 25) Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México, A.C. Guía de Validación de Métodos Analíticos. 2002, México, D.F.
- 26) Department of Health and Human Services. *Food and Drug Administration. Center of Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM), Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation*; Mayo 2001 US. Disponible en <http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm> (diciembre 2006)
- 27) NORMA Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998, Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados que realicen las pruebas. *Diario Oficial Primera Sección*, 7 de mayo de 1999.
- 28) Quattrocchi Oscar Alberto, Abelaira Sara Inés, Laba Raúl Felipe. Introducción a la HPLC. Aplicación y Práctica. Artes Gráficas Farro. Buenos Aires, Argentina 1992.



29) JASCO Internacional Co., Ltd. HPLC seminar. 2006

Disponible en <http://www.jascofrance.fr/pdf/hplc.pdf> (agosto 2007)

30) Romero Ramírez A. Estudio preliminar de Farmacocinética de Casiopeína IIIa (un nuevo anticancerígeno) en ratas, a partir de análisis de datos urinarios.

(Tesis de Licenciatura), Facultad de Química UNAM, 2007

31) Center for Drug Evaluation and Research-(CDER). *Food and Drug Administration*. Reviewer Guidance, Validation of Chromatographic Methods. US, November 1994.

32) Regis Technologies, Inc. [homepage on the internet]. Ion Pair Chromatography. USA 1998-2002. Disponible en: <http://www.gegistech.com/ionpair/index.html> (noviembre 2006)

33) Dionex Corporation [homepage on the Internet] Technical Note 12 Methods Development Using Ion-Pair Chromatography with Suppressed Conductivity Detection. Sunnyvale; USA 2007.

Disponible en [http://www1.dionex.com/en-us/webdocs/4696\\_tn12.pdf](http://www1.dionex.com/en-us/webdocs/4696_tn12.pdf) (nov. 2006)

34) Heftmann. Chromatography, 5th edition. Fundamentals and applications of chromatography and related differential migration methods. Part B applications.

Journal of Chromatography Library volume 51B Amsterdam: Elsevier, 1992



- 35) Birkett Donald. Farmacocinética Fácil. España Madrid. McGraw-Hill Interamericana, 2005
- 36) Tovar Huerta S, Gracia Mora I, Ruiz-Azuara L. Evaluación antineoplásica de dos compuestos de coordinación mediante el empleo de modelos *in Vitro*. Memorias 2º Congreso Nacional de Química Médica; 2006 septiembre 4-8; Querétaro QRO.
- 37) Fuentes-Noriega, Ruiz, *et al.* Development and validation of a liquid chromatographic method for Casiopeína IIIi in rat plasma. *J. Chromatogr., B* 772, 115-121 (2002).
- 38) Reyes, Fuentes-Noriega, *et al.* Development and validation of a liquid chromatographic method for Casiopeína IIgly in rat plasma. *J. Chromatogr., B* 791, 111-116 (2003).
- 39) Gómez Ramos Irma. Optimización y Validación de un Método Analítico para Casiopeína IIIi en orina por HPLC. (tesis de Licenciatura) Facultad de Química, UNAM, 2003
- 40) Konnie. H. Plumlee, Clinical Veterinary Toxicology, St. Louis, Missouri: Mosby 2004.