



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Química

Desarrollo y validación de una metodología de extracción para Casiopeina IIIa en orina con el uso de cartuchos aniónicos de fase sólida y su análisis por HPLC.

TESIS

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA**

PRESENTA

AMADA HUERTA PALACIOS



México, D.F.

2008



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 Ruíz Azuara.
Vocal	Dra. Inés Fuentes Noriega.
Secretaria	M. en C. Sofía Margarita Rodríguez Alvarado.
Primer suplente	M. en C. María de Lourdes Mayet Cruz
Segundo suplente	M. en C. Luis Jesús García Aguirre.

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

Asesora

Dra. Inés Fuentes Noriega

Sustentante

Amada Huerta Palacios



Dedico este trabajo

A la memoria de **mamá Juanita** que siempre confió en mí.

A mi **abuelita Cata** que nos bendice desde el cielo.

A **mí mamá Celia** por su apoyo, comprensión, su tiempo para escuchar, desvelos en fin por su amor incondicional para alcanzar mis metas.

A **mí papá J. Guadalupe** por su apoyo y amor durante toda mi vida.

A mis hermanos **Alicia, Alejandra, Six y Tomás** por su amor y apoyo.

A **Abel** que ha sido el motor en mi vida.

A **Fer y Omar** por llenar la vida de sonrisas.

Nunca te detengas

Siempre ten presente que la piel se arruga, el pelo se vuelve blanco, los días se convierten en años...

Pero lo importante no cambia; tu fuerza y tu convicción no tienen edad.

Tu espíritu es el plumero de cualquier tela de araña.

Detrás de cada línea de llegada, hay una de partida.

Detrás de cada logro, hay otro desafío.

Mientras estés viva, siéntete viva.

Madre Teresa de Calcuta

Agradezco

- A Dios por haberme acompañado siempre. Gracias por los logros y los fracasos. Gracias por el libre albedrío.
- A mi familia por todo el amor y el apoyo incondicional.
- A la Universidad Autónoma de México por haberme permitido ser parte de de una de las universidades más importantes del mundo.
- A la Facultad de Química por proporcionarme los conocimientos necesarios para mi formación personal y profesional.
- A la Dra. Lena Ruíz Azuara por su apoyo, orientación y sobre todo incluirme en el sueño Casiopeínas.
- A la Dra. Inés Fuentes Noriega por su apoyo y por acogerme en su grupo de investigación de Biofarmacia.
- A Lupita Vertiz por todo su apoyo y sus enseñanzas durante todo el tiempo. Y sobre todo por su amistad.
- A Mirna por haberme introducido al manejo del HPLC pero sobre todo por su amistad.
- A mis compañeros de Biofarmacia Gladis, Yolanda, Alberto, Luz y Pilar por su compañía y amistad.
- A todo el grupo Casiopeínas.
- M en C María Elena Gómez Bravo por la síntesis de los compuestos.
- A la Unidad de Experimentación Animal: M en C Isabel Gracia, MVZ. Lucía Macías y MVZ. Marisol Rivera Huerta por su apoyo en el manejo de animales. Gracias a las ratas del estudio.

-
- Al los proyectos

PAIP 6390-05

PAPIIT IN-204706

CONACYT SECTORIAL SALUD 2002-C01-7677.

- A la M en C Sofía Margarita Rodríguez Alvarado por sus observaciones y recomendaciones.
- Al M en F. Luis Jesús García Aguirre por su orientación y consejo.

Índice de contenido.

Capítulo 1 Introducción

1.1 Introducción.....	2
1.2 Objetivos.....	3

Capítulo 2 Generalidades

2.1 Proceso de investigación de nuevos fármacos.....	5
2.1.1 Estudios Preclínicos.....	5
2.1.2 Farmacocinética.....	7
2.2 Cáncer.....	8
2.1.1 Tratamiento.....	9
2.1.2 Clasificación de los resultados terapéuticos.....	10
2.1.3 Quimioterapia.....	11
2.1.4 Cáncer en México.....	11
2.2 Casiopeinas.....	14
2.3 Cobre (Cu).....	15
2.3.1 Toxicocinética.....	15
2.4 Casiopeina IIIa.....	17
2.4.1 Propiedades fisicoquímicas.....	17
2.4.2 Estabilidad en soluciones compatibles fisiológicamente:.....	17
2.4.3 Actividad.....	18
2.4.4 Dosis Letal.....	18
2.6 Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución. HPLC (High Performance Liquid Chromatography).....	19
2.7 Desarrollo de un método analítico por HPLC.....	20

2.8 Tratamiento previo de las muestras.....	20
2.8.1 Extracción fase sólida SPE	21
2.9 Optimización de métodos cromatográficos.....	23
2.10 Validación de Métodos Analíticos.....	23
2.10.1 Selectividad.....	24
2.10.2 Linealidad.....	24
2.10.4 Exactitud.....	24
2.10.5 Precisión.....	24
2.10.6 Límite de cuantificación.....	25
2.10.7 Límite de detección.....	25
2.10.8 Estabilidad de la muestra.....	25
2.10.9 Recuperación absoluta (Recobro).....	25

Capítulo 3 Parte experimental

3.1 Equipos.....	27
3.2 Material Biológico.....	27
3.3 Estándares.....	28
3.4 Reactivos.....	28
3.5 Soluciones.....	28
3.6 Preparación de soluciones.....	29
3.7 Desarrollo del método analítico.....	31
3.8 Desarrollo del método de extracción por SPE (Extracción fase sólida).....	32
3.8.1 Cartuchos Oasis MAX® Waters.....	32
3.9 Validación.....	34
3.9.1 Validación del sistema.....	34
3.9.2 Validación del método.....	34

3.10	Curvas.....	37
3.11	Estudio preliminar.....	38

Capítulo 4 Resultados

4.1	Desarrollo del método cromatográfico.....	39
4.1.1	Longitud de onda máximo.....	39
4.1.2	Fase móvil.....	39
4.1.3	Columna.....	41
4.1.4	Temperatura.....	41
4.2	Optimización.....	41
4.2.1	Proporción del modificador en la fase móvil.....	41
4.2.2	Velocidad de flujo.....	41
4.2.3	Volumen de inyección.....	42
4.2.4	Estándar interno.....	42
4.3	Optimización del proceso de extracción.....	43
4.4	Validación.....	45
4.4.1	Linealidad del sistema.....	45
4.4.2	Linealidad método.....	46
4.4.3	Precisión.....	47
4.4.3.1	Repetibilidad.....	47
4.4.3.2	Reproducibilidad.....	47
4.4.4	Exactitud.....	48
4.4.5	Límite de detección.....	48
4.4.6	Límite de cuantificación.....	48
4.4.7	Estabilidad.....	49

4.4.8 Recobro50
4.4.9 Selectividad51
4.5 Ensayo preliminar con ratas55

Capítulo 5 Análisis de Resultados

5.1 Análisis de resultados.....59
5.1.1 Desarrollo del método cromatográfico.....59
5.1.2 Desarrollo del método de extracción.....61
5.1.3 Validación.....63
5.1.4 Ensayo preliminar con ratas.....66

Capitulo 6 Conclusiones.

6.1 Conclusiones.....69
6.2 Perspectivas... ..70
Anexo.....71
Bibliografía.....77

Índice de figuras

Figura 2.1 Etapas del estudio desarrollo de un nuevo fármaco.....	5
Figura 2.2 Mortalidad por cáncer en México.....	11
Figura 2.3 Estructura química de cisplatino y carboplatino.	13
Figura 2.4 Casiopeína IIIa.	17
Figura 2.5 Esquema básica de los componentes de un cromatografo. de líquidos.	19
Figura 2.6 Desarrollo de un método analítico cromatográficas.....	20
Figura 3.1 Amina Cuaternaria presente en el sorbente de los cartuchos Oasis MAX.	32
Figura 3.2 Diagrama de trabajo del estudio preliminar.....	38
Figura 4.1 Espectro en UV de Cas IIIa en solución amortiguadora de fosfatos pH=8.	40
Figura 4.2 Tratamiento de muestras de orina de rata con los cartuchos Oasis MAX.	44
Figura 4.3 Gráfica linealidad del sistema.	45
Figura 4.4 Gráfica de linealidad del método.	46
Figura 4.5 Cromatograma de Casiopeína IIIa en solución.	51
Figura 4.6 Cromatograma de $[\text{Cu}(\text{acac})_2]$ en solución.	51
Figura 4.7 Comparación de cas IIIa en solución con de $[\text{Cu}(\text{acac})_2]$ en solución.	52

Figura 4.8 Cromatograma de $[\text{Cu} (4,4\text{dimetil} - 2,2\text{bipiridina})_2]^{2+}$ en solución.	52
Figura 4.9 Cromatograma de $[\text{Fe} (4,4\text{dimetil} - 2,2\text{bipiridina})_3]$. en solución...	53
Figura 4.10 Cromatograma de blanco de orina de rata macho.	53
Figura 4.11 Cromatograma de casiopeína IIIa en orina.	54
Figura 4.12 Cromatograma de $[\text{Cu} (\text{acac})_2]$ en orina.	54
Figura 4.13 Cromatograma de rata control en el ensayo preliminar.	55
Figura 4.14 Color de la muestras de orina de las ratas del estudio preliminar.	56
Figura 4.15 Comparación entre el blanco de orina y la muestra de t=3 hrs de la rata 2.	56
Figura 4.16 Comparación entre el blanco de orina y la muestra de t=3 hrs de la rata 3.	57
Figura 5.1 Estructura química de Casiopeína IIIa y Metilparabeno indicando los tiempos de retención.	59

Índice de tablas

Tabla 2.1 Clasificación de los fármacos utilizados para quimioterapia.	12
Tabla 2.2 Dosis letal de Casiopeína IIIa.	18
Tabla 3.1 Condiciones recomendadas para el uso de los cartuchos Oasis MAX.	33

Tabla 3.2 Curvas de calibración de Casiopeína IIIia.	37
Tabla 3.3 Puntos control.	37
Tabla 4.1 Condiciones cromatográficas optimizadas.	42
Tabla 4.2 Resultados de la linealidad del sistema.	45
Tabla 4.3 Resultados de la linealidad del método.	46
Tabla 4.4 Resultados de repetibilidad.	47
Tabla 4.5 Resultados de reproducibilidad.	47
Tabla 4.6 Resultados de exactitud del método.	48
Tabla 4.7 Resultados del límite de cuantificación.	48
Tabla 4.8 Resultados de estabilidad de las muestras a temperatura ambiente.	49
Tabla 4.9 Resultados de estabilidad de muestras en ciclos de congelación.	50
Tabla 4.10 Resultados de recuperación absoluta de muestras en orina.	50
Tabla 4.11 Tiempos de muestreo y volumen recolectado en el ensayo preliminar.	55
Tabla 5.1 Cuadro comparativo de condiciones cromatográficas.	58
Tabla 5.2 Resultados de la validación y criterios de aceptación.	62

Lista de abreviaturas.

- **HPLC.** High Performance Liquid Chromatography. En español CLAR
- **CLAR.** Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.
- **SPE.** Solid Phase Extraction. Extracción Fase Sólida.
- **CE.** Coeficiente de extinción molar.
- **Cas IIIa.** Casiopeína IIIa.
- **DL50.** Dosis letal 50.
- **DL90.** Dosis letal 90.
- **HLB.** Cartuchos de extracción fase sólida con polímero de Balance hidrofílico- lipofílico.
- **R** cociente del área de cas IIIa entre área de metilparabeno
- **DEA.** Desviación estándar absoluta. Expresada en porcentaje.
- **DE.** Desviación estándar. Expresado en porcentaje.
- **CV.** Coeficiente de variación. Expresado en porcentaje
- **Tr.** Tiempo de retención.

Capítulo 1

Introducción

1.1 Introducción.

El proyecto de **Casiopeinas®** ha sido desarrollado por la doctora Lena Ruiz Azuara, en la Facultad de Química UNAM, con el apoyo de un grupo interdisciplinario que tiene como objetivo principal analizar la actividad antineoplásica de esta familia de compuestos que fueron sintetizados a la luz del conocimiento de *cis*-platino.

El conjunto de resultados llevará al desarrollo de una alternativa terapéutica para el cáncer, enfermedad que ha incrementado su presencia en la sociedad mexicana en los últimos años. Actualmente las **Casiopeinas®** se encuentran en una fase de evaluación preclínica.

El subgrupo de Biofarmacia, con su coordinadora Dra. Inés Fuentes Noriega, tiene como tarea desarrollar métodos que permitan evaluar la farmacocinética de dicha familia de compuestos para lo cual se requieren métodos analíticos validados.

Dentro de los experimentos ya realizados han desarrollado métodos para la cuantificación de Casiopeína IIIa y Casiopeína II gly en diferentes fluidos biológicos. En lo que se refiere a los métodos desarrollados para la cuantificación de Casiopeína IIIa en orina por HPLC se han presentado problemas; ya que se observan señales intensas, que corresponden a los elementos endógenos de la orina, que interfieren directamente con la señal de la Casiopeína IIIa.

De aquí la necesidad de encontrar un mejor método de extracción para obtener muestras limpias que permitan un mejor análisis.

Ya que la preparación de las muestras es una etapa decisiva en el análisis en la determinación de cantidades muy pequeñas del analito.

La extracción en fase sólida es una de las modalidades más usadas en la actualidad para el tratamiento de las muestras. Consiste en una extracción líquido- sólido a través de un cartucho mediante mecanismos sorción-desorción de los analitos en la superficie del material activo de los cartuchos.

El desarrollo y validación de métodos analíticos se requiere para establecer evidencia documentada, para garantizar que un método analítico es lineal, exacto, preciso, reproducible y específico, en el intervalo en que el compuesto será analizado.

En el presente trabajo se logró encontrar las condiciones óptimas para el método de extracción Casiopeína IIIa en orina de rata por SPE (Extracción Fase Sólida) así como las condiciones cromatográficas adecuadas para el análisis de las muestras

Se validó el método dando como resultado un método: lineal ($r^2=0.99$) en el intervalo de 3 a 30 $\mu\text{g/mL}$ con un límite de detección de **3 $\mu\text{g/mL}$** , preciso, exacto y reproducible con un coeficiente de variación menor al **15%**. El porcentaje de recobro promedio de **93.42 %**.

El método se aplicó en un estudio preliminar de farmacocinética en orina de rata, en donde se utilizaron 2 ratas como control y 3 ratas a las que se les administró **Casiopeína IIIa** vía intravenosa. Con el cual no se logró cuantificar la Casiopeína IIIa en orina.

1.2 Objetivos.

- Desarrollar y optimizar un método cromatográfico para el análisis de Casiopeína IIIa.
- Desarrollar, optimizar y validar un método de extracción por SPE (Extracción Fase Sólida) que permita obtener una mejor respuesta en la determinación de Casiopeína IIIa en orina analizada por HPLC.
- Comprobar la efectividad del método en el análisis de muestras *in vivo* con un ensayo preliminar.

Capítulo 2

Generalidades

2.1 Proceso de investigación de nuevos fármacos. (1)

El proceso de investigación de nuevos fármacos tiene como objetivo asegurar que la población tenga acceso a fármacos seguros y eficaces. El proceso de investigación es costoso complicado y lento, además de no ofrecer garantías de ser favorable. En realidad se sintetizan cientos de compuestos químicos hasta encontrar uno que produzca el resultado favorable.



Figura 2.1 Etapas del desarrollo de un nuevo fármaco.

2.1.1 Estudios Preclínicos.

En el estudio preclínico se debe obtener información sobre el comportamiento del fármaco que asegure su uso en estudios clínicos iniciales.

Se evalúa:

- Efectos tóxicos a través de pruebas *in vivo* como *in vitro*. Toxicidad aguda al menos dos especies diferentes además de toxicidad a corto plazo. Toxicidad de los metabolitos.

- Efectos farmacológicos a través de pruebas *in vivo* como *in vitro*.
- Efectos genotóxicos a través de pruebas *in vivo* como *in vitro*.
- Farmacocinética: estudios de absorción y metabolismo además de la velocidad de excreción tanto del fármaco como de los metabolitos.

2.1.1.1 Fase I

Es la introducción de un nuevo fármaco en seres humanos por lo general se administra a voluntarios sanos; estos estudios son vigilados rigurosamente. Esta fase tiene como propósito determinar efectos metabólicos, farmacológicos y colaterales, estos últimos relacionados con dosis mayores, además de pruebas de eficacia.

En esta etapa se debe conseguir información en los efectos farmacocinéticos y farmacológicos del fármaco para permitir el planteamiento de estudios bien controlados y científicamente válidos.

2.1.1.2 Fase II

Fase II son estudios controlados ; esta etapa tiene como objetivo conseguir datos preliminares sobre la eficacia del fármaco e indicaciones específicas de pacientes enfermos o en mal estado además de evaluar los efectos colaterales a corto plazo y riesgos comunes del fármaco.

2.1.1.3 Fase III

Esta fase se realiza para completar los datos de la fase II y evalúa la relación riesgo- beneficio del fármaco; además brinda una base adecuada para extrapolar los resultados a la población general y transmitir esa información al etiquetado médico.

2.1.2 Farmacocinética. (2)

Farmacocinética involucra la cinética del fármaco: absorción, distribución y eliminación (metabolismo y excreción). Después de la administración del fármaco y una vez absorbido en el sistema circulatorio, es distribuido en todos los tejidos y simultáneamente es eliminado. La eliminación puede pasar por un proceso de excreción o biotransformación.

El estudio farmacocinético involucra dos aspectos importantes como son:

1. Experimental: desarrollo de técnicas analíticas para la cuantificación del fármaco y metabolitos en diferentes matrices biológicas.
2. Teórico: desarrollo de modelos farmacocinéticos que predigan la disposición del fármaco después de la administración.

La medición de niveles del fármaco en sangre, suero o plasma es el método directo de conocer la farmacocinética en el cuerpo. La sangre total contiene todos los elementos celulares (eritrocitos, células blancas, plaquetas y varias proteínas como albumina y globina). El plasma es más utilizado para la cuantificación ya que atraviesa tejidos incluyendo elementos celulares de la sangre. El cambio de la concentración del fármaco en plasma puede reflejar cambio de la concentración en los tejidos; asumiendo que el plasma tiene un equilibrio dinámico con los tejidos.

La cuantificación del fármaco en la orina es un método indirecto para determinar la biodisponibilidad del fármaco. La velocidad y cantidad de fármaco excretada en la orina refleja la velocidad y grado de absorción del fármaco.

Por lo que se requieren métodos analíticos sensibles exactos y precisos para la medición de fármaco en muestras biológicas saliva, plasma y orina. En general los métodos cromatográficos son muy utilizados para el análisis pues resultan discriminatorios.

2.2 Cáncer. (3)

El cáncer engloba a una familia compleja de enfermedades cuya característica principal es la alteración del control de la proliferación celular. Las células malignas experimentan cambios en su estructura y aspecto, y al multiplicarse dan origen a una colonia de células diferentes que se reproducen rápidamente invadiendo y destruyendo los tejidos normales. La transformación maligna de las células es el resultado de un proceso muy complejo, que ocurre en varias etapas, y en el que interviene factores múltiples en su origen y mecanismo.

- Etapa iniciación, en la cual se produce una mutación en el material genético de una célula y ésta transmite a la descendencia dicha mutación.
- Etapa de promoción, con la transformación maligna.
- Etapa de progresión de la lesión local a enfermedad general.

El cáncer se desencadena por diferentes factores tanto endógenos como exógenos:

Factores exógenos que causan cáncer (efecto carcinógeno) los cuales se pueden clasificar en:

- Químicos: como la exposición a algunas sustancias químicas, consumo de alcohol, consumo de tabaco además de la dieta.
- Físicos radiaciones solares, radiaciones ionizantes.
- Biológicos. Infecciones virales como *Helicobacter pylori*, *Papilomavirus* entre otras.

Los factores endógenos son la herencia, inmunidad, nutrición y hormonal. Un aspecto muy importante es el tiempo de exposición al carcinógeno.

La historia de una enfermedad y sus secuelas se refiere no sólo a la interacción de varios agentes causales y las respuestas biológicas del individuo, sino también de los factores sociales, culturales y psicológicos.

El avance del cáncer se mide en las siguientes etapas de desarrollo:

- Etapa 0. El cáncer se encuentra en las primeras fases de desarrollo. Esto significa que está concentrado en un área específica.
- Etapa I. El cáncer se ha extendido a otras áreas cercanas, pero sigue estando concentrado dentro del tejido u órgano de origen.
- Etapa II. El cáncer se ha extendido a otros tejidos u órganos cercanos, pero no ha atacado ganglios linfáticos cercanos.
- Etapa III. El cáncer ha atacado ganglios linfáticos cercanos pero aún no ha afectado otras áreas del cuerpo.
- Etapa IV. El cáncer ha avanzado y está atacando áreas más remotas del cuerpo y órganos lejanos al punto de origen.

Recurrente. El cáncer se vuelve a desarrollar después del tratamiento.

2.2.1 Tratamiento

Su tratamiento es complicado y diverso con resultados variables, de allí que la investigación se desarrolla en relación al cáncer involucre aspectos científicos básicos como clínicos.

Los medios terapéuticos disponibles en el momento actual para tratar el cáncer, solos o en combinaciones estratégicas, son los siguientes:

- a. **Cirugía** útil para realizar el estudio histológico definitivo del tumor y nos permite extirpar totalmente el tumor primario y las metástasis regionales.
- b. **Radioterapia** puede curar tumores localizados si son radiosensibles, pero su mejor aplicación es como tratamiento complementario de la cirugía.
- c. **Quimioterapia** ha alcanzado avances sorprendentes por la aparición de fármacos de alta potencia terapéutica; de los cuales sobresalen Carboplatino, Vinorelbine, Gencitabina entre otros.

- d. **Inmunoterapia** se basa en la inmunodeficiencia como favorecedora del desarrollo tumoral. El levamisol, que es un inmunomodulador, y el interferón son dos medicamentos de uso común en el tratamiento de cáncer.

Además de terapias alternativas como hormonoterapia, fototerapia entre otras.

2.2.2 Clasificación de los resultados terapéuticos.

La importancia de homologar internacionalmente los resultados terapéuticos ha impuesto la necesidad de definir los tipos de respuesta terapéutica siguiendo unos criterios uniformes. Según la OMS los conceptos son los siguientes.

- a. **Remisión completa.** Es la desaparición completa (100%) del tumor, sus síntomas o enfermedades subjetiva; signos clínicos y sus marcadores biológicos; aunque se admite remisión completa la presencia de alguna secuela propia del tratamiento utilizado.
- b. **Remisión parcial.** Implica una remisión de la masa tumoral medible en un 50% del tamaño total, aún cuando unas masas no disminuyan, y siempre que ninguna parte aumente de tamaño.
- c. **Mejoría.** Se refiere a regresiones mínimas en la masa tumoral, entre el 25% y el 50%.
- d. **No respuesta.** No hay cambios en la masa tumoral ni en los síntomas clínicos; pero si los hay serían menores al 25 %.
- e. **Progresión.** Situación en la cual el tumor crece por lo menos un 25 %.
- f. **Recaída y recidiva.** La curación fue solo aparente. La recidiva puede ser local, regional y sistémica o también mixta. Todo tumor maligno tratado debe someterse a revisión periódica para el diagnóstico de las recidivas.

2.2.3 Cáncer en México

En México el cáncer es la tercera causa de muerte con un 12.9 % de muertes totales en la población. En la actualidad, hay millones de personas en el mundo que viven con cáncer que han padecido esta enfermedad. La tendencia de mortalidad por cáncer ha aumentado casi 3 puntos porcentuales, de 1990 a 2006, de las defunciones totales en la población mexicana. Que nos indica que es problema creciente y de inmediata atención. (4)

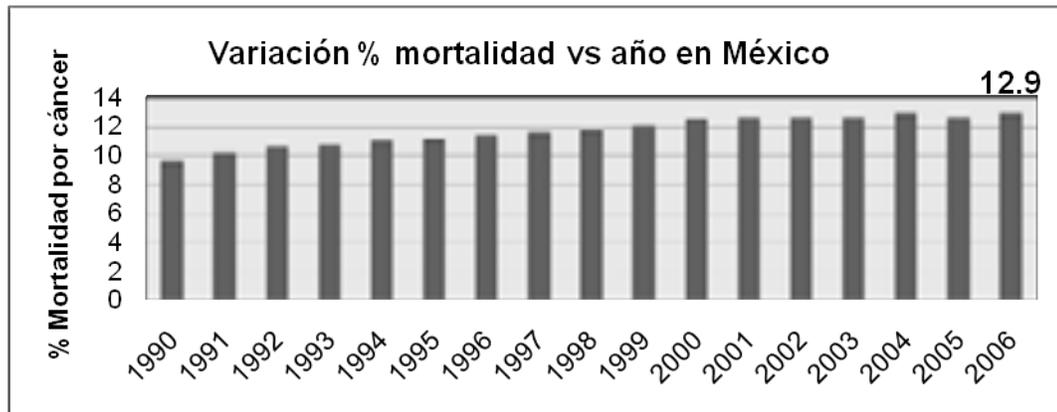


Figura 2.2 Mortalidad por cáncer en México. Variación de porcentaje de mortalidad por cáncer en la población mexicana desde 1990 donde el % es de 9.7 hasta 2006 donde es de 12.9. Observando una tendencia de aumento. Datos obtenidos del INEGI

2.2.4 Quimioterapia (5)

Dentro de la quimioterapia se han desarrollado diferentes fármacos que solos o en combinación han sido efectivos en los tratamientos de cáncer sobre todo las nuevas combinaciones y estrategias han permitido resultados excelentes en tumores antes invulnerables. La quimioterapia es muy útil sola en el tratamiento de las leucemias, linfomas malignos, tumores de testículos, entre otras; y como tratamiento adyuvante complementaria del tratamiento quirúrgico del cáncer de mama y de colon. También se ha empleado antes de la cirugía para reducir el tamaño del tumor y facilitar la operabilidad, lo que se conoce como quimioterapia neoadyuvante. Hoy se disponen con más de 50 fármacos antineoplásicos activos contra el cáncer.

Tabla 2.1 Clasificación de los fármacos utilizados para quimioterapia.

Clasificación	Características	Ejemplos
1. Agentes alquilantes.	Atacan directamente al ADN ya que forman uniones covalentes con grupos amino, carboxilo, sulfhidrilo y fosfatos más importantes, desnaturalizándolo. Operan principalmente durante la síntesis de ADN.	Mostazas nitrogenadas. Complejos de platino. Mecloretamina.
2. Antimetabolitos	Estos medicamentos operan simulando una sustancia que participa en la síntesis de ADN e inhiben la producción de un ácido necesario para que el ADN sea sintetizado.	Metrotexato 6-mercaptopurina 5-fluorouracilo
3. Productos naturales	Son obtenidos de plantas, hongos y bacterias. Antibióticos antitumorales: se unen al ADN para evitar la síntesis del ARN. Alcaloides: Impiden la división celular al impedir la formación del huso mitótico	Antibióticos Antitumorales: doxorubicina Mitomicina-C Alcaloides Vincristina vinblastina
4.Otros	Hormonas esteroides: modifican el crecimiento de cánceres con dependencia hormonal.	Tamoxifeno flutamida

2.2.4.1 Complejos de coordinación con platino. ⁽⁵⁾ ⁽⁶⁾

Entre los agentes quimioterapéuticos más empleados se encuentran los compuestos de coordinación de platino, identificados por (Rosenberg y col) como agentes citotóxicos. En la actualidad se han sintetizado y probado más de mil compuestos con platino de los cuales cis-diaminodicloroplatinolII (cisplatino) fue una de la más activa en sistemas tumorales experimentales (1973).

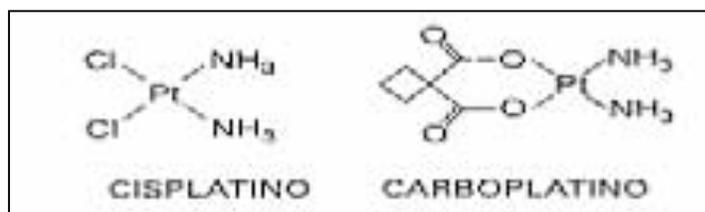


Figura 2.3 Estructura química del cisplatino y carboplatino.

Aplicaciones terapéuticas.

Tratamiento de tumores sólidos: Buena respuesta de cánceres de vejiga, cabeza, cuello y endometrio. ⁽⁶⁾

Mecanismo de acción.

- Involucra interacción con el ADN; ya que forma intermediarios electrofílicos que actúan en reacciones de sustitución nucleofílica para formar uniones covalentes con el ADN. Lo que resulta en una desnaturalización de la cadena del ADN.
- Daña la mitocondria celular, inhibe la ATPasa, altera el transporte celular y ocasionalmente causa apoptosis, necrosis y muerte celular. ⁽⁶⁾

Limitaciones.

- Desarrollo de resistencias en algunos tumores.
- Toxicidad: Induce daño y necrosis en el riñón (nefrotóxicidad), ototoxicidad, neurotoxicidad y supresión de médula. ⁽⁵⁾ ⁽⁶⁾

2.3 Casiopeinas.

Actualmente existen 5 fármacos comerciales antineoplásicos de origen inorgánico que han demostrado eficiencia; pero también se han presentado tumores refractarios a estos tratamientos además de una elevada toxicidad y alto costo. En México particularmente la necesidad de importación incrementa su costo; lo que ha estimulado la búsqueda de nuevas moléculas con tecnología mexicana.

Como respuesta a esta imperante necesidad en la década de los 70's la **Dra. Lena Ruiz Azuara** y su grupo de trabajo diseñó y sintetizó en la Facultad de Química de la UNAM, un nuevo grupo de compuestos de coordinación con centro metálico. Estas moléculas se desarrollaron a partir de metales de transición esenciales biológicamente, con el propósito de disminuir la toxicidad y el costo. Además se están sintetizando familias de compuestos con variantes estructurales que permitan la selectividad tumoral. (7)

La familia de compuestos de **Casiopeínas®** es un grupo de compuestos de coordinación de cobre (II) como centro metálico, que en la esfera de coordinación presentan un ligante bidentado del tipo diimina (N-N) y otro aminoacidato (N-O) o donador (O-O) siguiendo una geometría cuadrada plana o pirámide de base cuadrada.

La familia de compuestos **Casiopeínas®** han demostrado actividad citostática y antineoplásica importante, principalmente las Casiopeínas II y III, pero sobre todo lo que ha llamado la atención es su baja toxicidad, por lo que han generado muchas expectativas para una posible aplicación clínica a corto plazo. Actualmente las Casiopeínas se encuentran en una fase de evaluación preclínica.

2.4 Cobre (Cu).^{(8) (9) (10) (11) (12)}

El cobre (Cu) es un metal de transición con número atómico 29 ($[\text{Ar}]4s^13d^{10}$) y masa atómica de 63 g/mol es el elemento 26^{avo} más abundante en la corteza terrestre. El cobre es esencial en los sistemas biológicos, sus propiedades químicas permiten su participación en procesos que involucran la transferencia de electrones asociadas con enzimas oxidativas. La concentración de cobre dentro de las células no excede de 10^{-15} M . Una buena parte de los complejos de coordinación de este ión presentan coloración azul o verde debido a la existencia de banda ancha y asimétrica entre 600-900 nm.⁽⁸⁾

2.4.1 Toxicocinética.⁽⁹⁾

Los niveles fisiológicos normales de cobre en el cuerpo están sujetos a la cantidad y la velocidad con la que se absorbe, se distribuye y se excreta.

2.4.1.1 *Absorción.*

Se ingiere a través de la dieta y es absorbido (2 mg por día) a través del estómago y el intestino delgado. En ratas el cobre es absorbido principalmente en el duodeno. Un factor que afecta su absorción es la competencia con otros metales como (Zinc, Hierro y Cadmio)

2.4.1.2 *Distribución.*⁽⁸⁾

Aún no se ha esclarecido como llega a la sangre; una vez estando ahí se enlaza mayoritariamente a la *ceruplasmina* (90%) y una pequeña parte a la *albúmina* y aminoácidos. La sangre conduce el metal hasta los tejidos periféricos y el hígado en donde se generan oxidasas.

Como promedio, un adulto sano de 70 Kg de peso, tiene 110 mg de cobre, que aproximadamente se distribuye de la siguiente forma: en suero o plasma de 0.3-1.4 mg/L, 46 mg en hueso, 26 mg en músculo y concentraciones más pequeñas en hígado (10 mg), cerebro (9 mg), sangre (6 mg), riñones (3 mg) y corazón (1.5 mg).

2.4.1.3 Metabolismo.

El cobre libre es controlado por las metalotioneínas y aminoácidos con la asociación de enzimas cobre-dependientes.

El metabolismo del cobre consiste mayoritariamente de su transferencia con varios ligantes orgánicos; los más notables son los grupos sulfhidrilo e imidazol en aminoácidos y proteínas. La vida media del cobre inyectado en humanos normales fue aproximadamente 4 semanas.

2.4.1.4 Excreción. (9)(12)

La vía biliar es la principal vía de excreción; el cobre biliar es regresado al intestino y excretado por heces. Normalmente el cobre es excretada en la orina del 0.5-3 % diariamente (15 a 36 µg/24 h).

Después de una administración intravenosa la excreción biliar no incrementa proporcionalmente con la dosis pues el transporte hepatobiliar es saturable así que la excreción urinaria del cobre inalterado se incrementa. (11)

2.4.1.5 Efectos del cobre sobre la salud.

Pese a que el cobre es un elemento esencial para los organismos superiores, puede ser significativamente tóxico, pues los márgenes entre las concentraciones necesarias y las tóxicas están muy próximos. En humanos la ingestión de grandes cantidades de cobre pueden causar diferentes síntomas como: dolor abdominal, vómito severo, diarrea, hemólisis, necrosis hepática, hematuria, proteinuria, hipotensión taquicardia, convulsiones, coma y muerte.

2.5 Casiopeína IIIa

La casiopeína IIIa tiene como centro metálico el Cu^{2+} ; acetilacetato como ligante bidentado donador de oxígeno y 4,4'-dimetil bipiridina como ligante bidentado donador de nitrógeno con una geometría cuadrada plana.

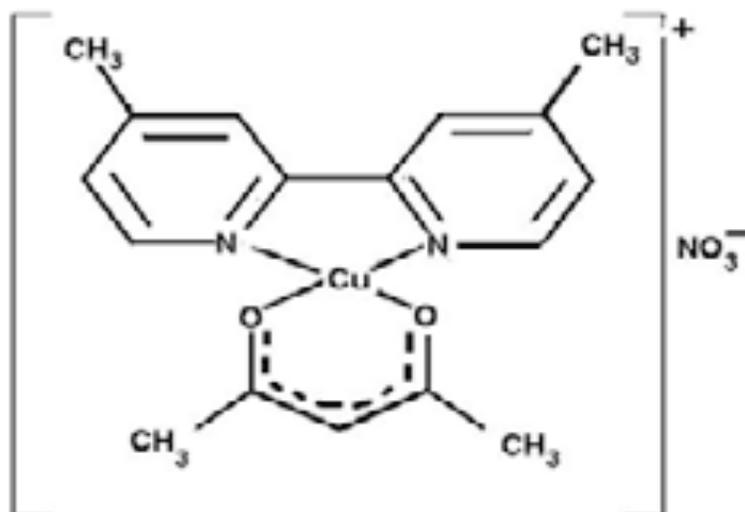


Figura 2.4 Casiopeína IIIa. $[\text{Cu} (4,4'\text{-dimetil-2-2'-bipiridina) acetilacetato}] \text{NO}_3$

2.5.1 Propiedades fisicoquímicas

- **Peso molecular** 408.71 g/mol
- **pKa**= 8.25₍₁₃₎
- **Características físicas.** Polvo azul cristalino.
- **Coefficiente de partición** = 0.3580₍₁₃₎
- **Solubilidad** agua > alcoholes > solución salina.
- **Longitud de onda máxima**= 296 nm.
- **Coefficiente de extinción molar en agua.**₍₁₄₎

$$\text{CE}=0.1448174 \text{ g/L} \text{ o } (12) \text{ CE}=58.914679 \text{ mol/L}$$

2.5.2 Estabilidad en soluciones compatibles fisiológicamente ₍₁₄₎

- Solución de cloruro de sodio al 0.9 % nueve días.
- Solución dextrosada al 5 % cuatro días.
- Solución Hartman tres semanas.

2.5.3 Actividad.

- Actividad citotóxica y citostática.
- Actividad antineoplásica sobre líneas SiHa (carcinoma de células escamosas de cérvix), Hela (célula de adenocarcinoma de cérvix) y contra leucemia linfoide LI210.⁽¹⁵⁾
- Actividad en mitocondrias hepáticas de rata: actúa como inhibidor de la fosforilación oxidativa. Colapsa el potencial transmembranal; el efecto inhibitorio es dependiente del tiempo de exposición y de la concentración.⁽¹⁶⁾
- Demostró ser un agente altamente recombinógeno, su mecanismo de acción puede ser la inhibición de la topoisomerasa I y II.⁽¹⁵⁾

2.4.4 Dosis Letal.

En estudios realizados sobre la toxicidad aguda en ratas se obtuvieron las dosis letal 50 y dosis letal 90 representadas en la **tabla 2.2**.

Tabla 2.2 Dosis letal de Casiopeina IIIa. Datos de obtenidos con animales Harlan proporcionados por MVZ Marisol Rivero Huerta.

Dosis	Rata Wistar macho		Rata Wistar hembra	
	I.P.	I.V.	I.P.	I.V.
	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg
DL50	14.36	5.51	19.93	5.96
Límite superior	14.94	6.85	21.25	7.31
Límite inferior	13.41	4.02	18.43	4.7
DL90	15.44	7.73	22.53	8.07
Límite superior	18.36	13.34	27.11	15.27
Límite inferior	14.76	6.21	20.99	6.57

2.6 Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución. HPLC (High Performance Liquid Chromatography) . (18)

El término cromatografía se aplica a los procesos de separación donde los componentes de una mezcla se encuentran en equilibrio repetidamente entre dos fases; una de ellas fija o estacionaria y la otra móvil. La fase estacionaria puede ser un líquido o un sólido y la fase móvil puede ser un gas o un líquido.

La cromatografía esta basada en la migración diferencial. El soluto es la fase móvil siguen a través de la fase estacionaria. Los solutos con gran afinidad a la fase estacionaria tardarán más tiempo en esta fase en comparación a los solutos menos afines a esta. Cuando los solutos siguen a través de la fase estacionaria estos se separan.

La cromatografía de líquidos de Alta Resolución representa una de las herramientas analíticas más utilizadas en un laboratorio moderno ya sea para investigación básica o aplicada y en la industria. Utiliza una fase móvil líquida para separar los componentes de una mezcla. Los cuales son disueltos y forzados a pasar por una fase estacionaria (columna) en un flujo determinado.

Básicamente los componentes de un equipo de HPLC son: bomba, inyector, columna, detector y un dispositivo que almacene y procese los resultados.

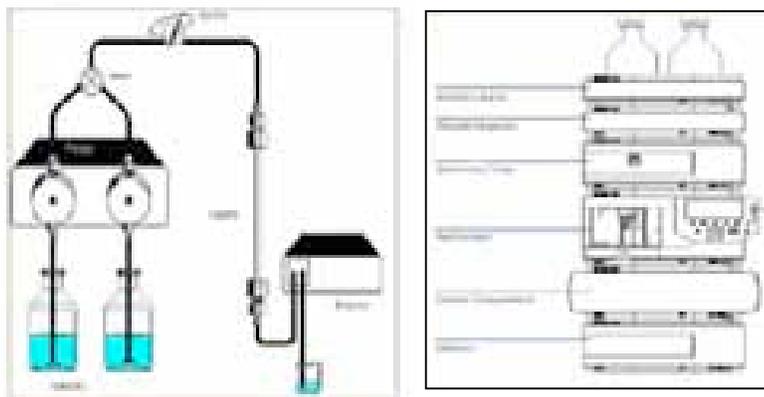


Figura 2.5 Esquema básico de los componentes de un cromatógrafo de líquidos. HPLC

2.7 Desarrollo de un método analítico por HPLC.

En muchos casos, el desarrollo de un método se aborda desde un punto de vista empírico. Dado que el desarrollo es costoso, es preferible emplear caminos sistemáticos, evitando ensayos innecesarios y documentando los resultados para futuras revisiones.

En la figura 2.6 se muestra un diagrama recomendado en el desarrollo de un método cromatográfico, donde se contempla la importancia de cada uno de los pasos a desarrollar.



Figura 2.6 Desarrollo de un método analíticos cromatográfico.

2.8 Tratamiento previo de las muestras.

La información sobre las características fisicoquímicas del analito así como las características de la matriz son determinantes para el tratamiento previo de las muestras.

Para el tratamiento previo de las muestras pueden utilizarse todas las operaciones conocidas en química analítica: liofilización, evaporación, filtración, centrifugación, precipitación y solubilización. La naturaleza de la muestra dicta el modo básico de preparar la solución a inyectar.

Los métodos más frecuentes son:

- **Desproteínización:** Las proteínas presentes en las matrices biológicas deben eliminarse antes de inyectar la muestra para evitar que precipiten dentro del equipo cromatográfico.
- **Filtración:** todas las muestras a inyectar deben estar totalmente libres de partículas en suspensión.
- **Extracción líquido- sólido** consiste en la solubilización del analito presente en una muestra sólida.
- **Extracción líquido- líquido** consiste en la distribución de un analito entre dos líquidos inmiscibles.

2.8.1 Extracción fase sólida SPE. (18)(19)(20)(21)(22)

La SPE consiste en una extracción líquido-sólido a través de un cartucho o pequeñas columnas. Actualmente la extracción fase sólida es utilizada ampliamente por su fácil manejo, alto recobro, fuerte retención, reproducibilidad y selectividad. Además de disminuir la cantidad de disolventes.

Las pequeñas columnas o cartuchos se rellenan con cantidades variables de distintos materiales similares a las columnas cromatográficas. La capacidad de retención de solutos de un cartucho de SPE depende del: tipo de material de relleno, tamaño de la columna, tipo del analito y las condiciones de extracción. El proceso de extracción en fase sólida tiene lugar mediante mecanismos de sorción-desorción de los analitos en la superficie activa de las columnas. (18)

2.8.1.1 Metodología para la extracción. (19)

La selección de las condiciones óptimas para la extracción depende de la naturaleza del analito y de la matriz que la rodea.

- **Lavado y activación de la columna.** Esta operación tiene como objeto solvatar los grupos funcionales del material de relleno del cartucho. El

lavado se utiliza para eliminar sustancias provenientes de anteriores análisis. El segundo paso se utiliza para equilibrar el cartucho con solvente similar al empleado como medio de disolución de las muestras.

- **Aplicación de la muestra.** La muestra se aplica en el cartucho utilizando un flujo determinado (1- 10 ml/min),¹ este paso debe efectuarse lentamente; porque flujos demasiado rápidos a través del cartucho pueden producir efectos cinéticos del material de relleno que conducen a bajas recuperaciones del analito.
- **Lavado de cartucho.** Esta operación se refiere a la eliminación de impurezas retenidas en el paso anterior utilizando un disolvente relativamente débil con el cual no eluye el analito.
- **Elución del analito.** El analito se eluye con un disolvente que posea la fuerza para una adecuada elución.

En la actualidad existen diferentes tipos de cartuchos cubriendo las necesidades de los usuarios: entre los más destacados son los HLB, los aniónicos y catiónicos que se encuentran en diferentes tamaños.

2.8.1.1.1 Sustancias ionizables

La retención de las sustancias ionizables está regulada por el valor del pH del medio en el que se encuentran, puede estar ionizado o no ionizado. Las sustancias ionizables de carácter ácido pueden retenerse en cartuchos intercambiadores de aniones y las carácter básico pueden retener en cartuchos intercambiadores de cationes si se encuentran en su forma ionizada.²

¹ Este paso se realiza con un dispositivo al vacío. Manifold.

²

Sustancias ionizables con carácter	$\text{pH} \gg \text{pKa}$	$\text{pH} \ll \text{pKa}$
Ácido	Ionizado	No ionizado
Básico	No ionizado	Ionizado

2.9 Optimización de métodos cromatográficos.

El objetivo primario de la cromatografía es la separación de los componentes de una mezcla y el grado de esta separación; estas características están determinadas por el parámetro cromatográfico **resolución** que depende del factor de capacidad, eficiencia y selectividad. La modificación de estos factores, que dependen directamente del analito, permitirá aumentar a la resolución.

- **Factor de capacidad (k).** Las proporciones en la fase móvil del modificador (no polar) y la solución amortiguadora (polar) influyen directamente, además de los cambios de pH que provoca cambios drásticos.

Solución amortiguadora > modificador entonces mayor retención ó
Solución amortiguadora < modificador, menor retención.

- **Eficiencia (N).** Para modificarla experimentalmente se podría:
 - Modificar el flujo.
 - Emplear columnas largas
 - Usar columnas con tamaño de partícula menor.
 - Emplear columnas acopladas o nuevas.
 - Aumentar la temperatura.
- **Selectividad α .** Depende de la naturaleza de cada uno de los componentes; fase móvil, columna y muestra, de su afinidad mutua y del modo que interactúan.

2.10 Validación de Métodos Analíticos. ⁽²³⁾⁽²⁸⁾⁽²⁹⁾

Una vez desarrollado un método analítico debe validarse, es decir se debe confirmar y documentar que los resultados por él producidos son confiables.

En la validación deben considerarse los siguientes parámetros:

2.10.1 Selectividad.

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

2.10.2 Linealidad.

La linealidad es la capacidad de un sistema o método analítico, en un intervalo de trabajo, para obtener resultados que sean directamente proporcionales a la concentración del compuesto de la muestra.

Criterio de aceptación: $r^2 = 0.99$

2.10.3 Rango.

El rango se refiere al intervalo de un método analítico definido por las concentraciones comprendidas entre los niveles superiores e inferior del compuesto en el cual se ha demostrado que el método es preciso, exacto y lineal.

2.10.4 Exactitud.

Es la concordancia entre un valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia. Es también conocida como error sistemático o tendencia.

Criterio de aceptación: $DEA \leq 15\%$

2.10.5 Precisión.

La precisión de un método analítico corresponde al grado de concordancia entre ensayos individuales cuando el método se aplica repetidamente a múltiples alícuotas de una muestra homogénea. La precisión es una medida del grado de reproducibilidad y/o repetibilidad del método analítico bajo las condiciones normales de operación.

Criterio de aceptación: $CV \leq 2\%$

2.10.5.1 Repetibilidad.

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

Criterio de aceptación: $CV \leq 15\%$

2.10.5.2 Reproducibilidad.

Es la precisión de un método analítico expresada como la variación entre determinaciones independientes realizadas bajo diferentes condiciones de análisis (analistas, días, equipos, etc.).

Criterio de aceptación: $CV \leq 15\%$

2.10.6 Límite de cuantificación.

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

Criterio de aceptación: $CV \leq 20\%$

2.10.7 Límite de detección.

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

2.10.8 Estabilidad de la muestra.

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

Criterio de aceptación: $DEA \leq 15\%$

2.10.9 Recuperación absoluta (Recobro).

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

Capitulo 3

Parte experimental

3.1 Equipos

- I. Balanza analítica estándar Ohaus, modelo AS200.
- II. Balanza analítica Sartorius, modelo A201P.
- III. Desionizador de agua Millipore Milli –Q Waters system, 0.22 μm .
- IV. Equipo de filtración Millipore, con membrana tipo HB o HA de 0.45 μm .
- V. Vórtex Termolyne, modelo M16715.
- VI. Potenciómetro Thermo Orion, modelo 410.
- VII. Baño de ultrasonido Fisher-scientific FS60.
- VIII. Baño de ultrasonido Transsonic 700/H.
- IX. Espectrofotómetro Simadzu.
- X. Micropipeta Eppendorf de 100-1000 μL No. Serie 1585257.
- XI. Micropipeta BIOHIT *mLINE*® de 10-100 μL . Serie 5505662
- XII. Puntas para micropipetas.
- XIII. Columna Xterra RP18, 250x 4.5 mm, 5 μm . lote 0182371491
- XIV. Precolumna Security guard Phenomenex C18, 50x 4.6 mm, 5 μm .
- XV. Cartuchos de extracción fase sólida Oasis ®MAX Waters, 30 μm tipo 1 cc 30 mg lote 001337096A.
- XVI. Equipo Manifold de 12 unidades lab. 112.
- XVII. Cromatógrafo de líquidos de alta resolución Agilent 1100 con las siguientes características.
 - Inyector DE11113489.
 - Bomba cuaternaria DE115898.
 - Detector UV-visible DE11113489.
 - Horno DE43650359.

3.2 Material Biológico.

- I. Pool de orina rata macho Wistar.
- II. Ratas macho Wistar Harlan México, UNEXA Facultad de Química.

3.3 Estándares.

- I. Casiopeína IIIia [Cu (4,4-dimetil-2,2'-bipiridina) (acetilacetato)] $NO_3 \cdot 2H_2O$, lote173MBG300305. Laboratorio 210 Química Inorgánica Facultad de Química.
- II. $[Cu(acac)_2]$ lote meb2124feb97. Laboratorio 210 Química Inorgánica Facultad de Química.
- III. $[Cu(4,4'dimetil - 2,2bipiridina)_2]$ lote meb7040297. Laboratorio 210 Química Inorgánica Facultad de Química.
- IV. $[Fe(4,4' - dimetil - 2.2 bipiridina)_3]SO_4$. 904.63 g/mol Laboratorio 210 Química Inorgánica Facultad de Química. s/n lote ETF-011.
- V. Metilparabeno.

3.4 Reactivos.

- I. Metanol grado HPLC, Mallinckrodt Chemicals lote E07D041.
- II. Fosfato de sodios monobásico monohidratado $(NaH_2PO_4 \cdot H_2O)$ Mallinckrodt RA analytic reagent. Lote 7892KJAZ.
- III. Fosfato de sodio dibásico dodecahidratado $(NaHPO_4 \cdot 12H_2O)$ grado R.A. J. T. Baker lote3822-05.
- IV. Acetato de sodio trihidratado cristal. $(CH_3COONa \cdot 3H_2O)$ grado R.A. J. T. Baker lote B30C08.
- V. Hidróxido de sodio perlas (NaOH) grado R.A. Baker lote A18C66.
- VI. Ácido fosfórico grado R.A. J.T. Baker.
- VII. Solución reguladora (biftalato) pH4, grado R.A. J.T. Baker.
- VIII. Solución reguladora (fosfatos) pH7, grado R.A. J.T. Baker.
- IX. Solución reguladora (boratos) pH10, grado R.A. J.T. Baker.

3.5 Soluciones.

- I. Solución amortiguadora de fosfatos 0.01 M, pH= 8.
- II. Solución de acetato de sodio pH= 7 50 mM en 5 % de metanol.
- III. Solución de ácido fosfórico 0.01M en metanol (1:1)
- IV. Solución patrón de casiopeína III ia en agua 500 μ g/mL.

- V. Solución patrón de casiopeína IIIa en agua 50 µg/mL.
- VI. Solución patrón de casiopeína IIIa en orina 500 µg/mL.
- VII. Solución patrón de casiopeína IIIa en orina 50 µg/mL.
- VIII. Solución patrón de $[\text{Cu}(\text{acac})_2]$ en orina 500 µg/mL.
- IX. Solución patrón de $[\text{Cu}(\text{acac})_2]$ en orina 50 µg/mL.
- X. Solución patrón de $[\text{Cu}(\text{4,4dimetil} - 2,2\text{bipiridina})_2]^{2+}$ en orina 500 µg/mL.
- XI. Solución patrón de $[\text{Cu}(\text{4,4dimetil} - 2,2\text{bipiridina})_2]^{2+}$ en orina 50 µg/mL.
- XII. Solución patrón de $[\text{Fe}(\text{4,4dimetil} - 2,2\text{bipiridina})_3]^{2+}$ en orina 500 µg/mL.
- XIII. Solución patrón de $[\text{Fe}(\text{4,4dimetil} - 2,2\text{bipiridina})_3]^{2+}$ en orina 50 µg/mL.
- XIV. Solución patrón de Metilparabeno en MeOH 1000 µg/mL.
- XV. Solución patrón de Metilparabeno en MeOH 250 µg/mL.
- XVI. Solución de Casiopeína IIIa en agua inyectable 6 mg/mL.

3.6 Preparación de soluciones.

I. Solución amortiguadora de fosfatos 0.01 M pH= 8.

Pesar 0.1888 g de fosfato de sodio mono básico monohidratado y 3.091 g de fosfato de sodio dibásico dodecahidratado, transferir cuantitativamente a un matraz volumétrico de 1 L; disolver con agua desionizada, llevar a un volumen aproximado de 980 mL, ajustar el pH y aforar. Filtrar al vacío dos veces la solución por medio de una membrana millipore de 0.45 µm.

II. Solución de acetato de sodio pH=7 50 mM en 5 % de metanol.

Pesar 0.6804 g de acetato de sodio trihidratado, transferir cuantitativamente a un matraz volumétrico de 100 mL; disolver con agua desionizada; agregar 5 mL de MeOH ajustar el pH y aforar.

III. Solución de ácido Fosfórico 0.01 M.

Transferir una alícuota de 465 µL de ácido fosfórico concentrado a un matraz volumétrico de 100 mL con 50 mL de agua y aforar con metanol. Agitar.

IV. Solución patrón de casiopeína IIIa en agua 500 µg/mL. Solución A agua.

Pesar 0.0050 g de casiopeína IIIa transferirla cuantitativamente a un matraz aforado de 10 mL disolver con agua desionizada y aforar.

V. Solución patrón de casiopeína IIIa en agua 50 µg/mL.

Tomar una alícuota cuantitativamente de 1 mL de la solución A y transferirla a un matraz aforado de 10 mL; aforar con agua.

VI. Solución patrón de casiopeína IIIa en orina de rata macho. Solución B

Pesar 0.0050 g de casiopeína IIIa transferirla cuantitativamente a un matraz aforado de 10 mL disolver con la menor cantidad de agua desionizada y aforar con orina de rata.

VII. Solución patrón de casiopeína IIIa en agua 50 µg/mL.

Tomar una alícuota cuantitativamente de 1 mL de la solución B y transferirla a un matraz aforado de 10 mL; aforar con orina de rata macho.

VIII. Solución patrón de $[\text{Cu}(\text{acac})_2]$ en orina de rata macho. Solución C

Pesar 0.0050 g de casiopeína IIIa transferirla cuantitativamente a un matraz aforado de 10 mL disolver con la menor cantidad de agua desionizada y aforar con orina de rata.

IX. Solución patrón de $[\text{Cu}(\text{acac})_2]$ en agua 50 µg/mL.

Tomar una alícuota cuantitativamente de 1 mL de la solución C y transferirla a un matraz aforado de 10 mL; aforar con orina de rata macho.

X. Solución patrón de $[\text{Cu}(4,4\text{dimetil} - 2,2\text{bipiridina})_2]^{2+}$ en orina de rata macho. Solución D

Pesar 0.0050 g de casiopeína IIIa transferirla cuantitativamente a un matraz aforado de 10 mL disolver con la menor cantidad de agua desionizada y aforar con pool de orina de rata macho.

XI. Solución patrón de $[\text{Cu}(4,4\text{dimetil} - 2,2\text{bipiridina})_2]^{2+}$ en agua 50 µg/mL.

Tomar una alícuota cuantitativamente de 1 mL de la solución D y transferirla a un matraz aforado de 10 mL; aforar con orina de rata macho.

XII. Solución patrón de $[\text{Fe}(\text{4,4dimetil} - \text{2,2bipiridina})_3]^{2+}$ en orina de rata macho. Solución E

Pesar 0.0050 g de casiopeina III ia transferirla cuantitativamente a un matraz aforado de 10 mL disolver con la menor cantidad de agua desionizada y aforar con orina de rata.

XIII. Solución patrón de $[\text{Fe}(\text{4,4dimetil} - \text{2,2bipiridina})_3]^{2+}$ en agua 50 $\mu\text{g/mL}$.

Tomar una alícuota cuantitativamente de 1 mL de la solución E y transferirla a un matraz aforado de 10 mL; aforar con orina de rata macho.

XIV. Solución patrón Metilparabeno 1000 $\mu\text{g/mL}$.

Pesar 0.005 g de Metilparabeno transferir cuantitativamente a un matraz aforado de 5 mL disolver y aforar con MeOH.

XV. Solución patrón Metilparabeno 250 $\mu\text{g/mL}$.

Transferir una alícuota de 2.5 mL de la solución anterior a un matraz aforado de 10 mL y aforar con MeOH.

XVI. Solución de Casiopeina IIIia en agua inyectable.

Pesar 0.030 g de casiopeina III ia transferirla cuantitativamente a un matraz aforado de 5 mL disolver y aforar con agua inyectable.

3.7 Desarrollo del método analítico.

Para el desarrollo de un método analítico en HPLC se debe definir las condiciones del análisis como la fase móvil, columna, velocidad de flujo, volumen de inyección y detectores. Para la definición de estas condiciones se deben de tomar en cuenta diversos factores como la estructura química, pKa, solubilidad y espectro UV de la muestra problema así como la naturaleza de la matriz (plasma, orina; etc.).

3.8 Desarrollo del método de extracción por SPE (Extracción fase sólida).

La extracción fase sólida ha obtenido una importancia tal que en el mercado hay una gran variedad de cartuchos que satisfacen las diferentes necesidades de los analistas. Por lo que se requiere conocer, como ya se ha mencionado, las características fisicoquímicas del analito así como la matriz en donde se encuentra ya que estos marcan las características del tipo de cartucho. Después de varias pruebas con diferentes cartuchos se obtuvieron resultados favorables con Oasis® MAX.

3.8.1 Cartuchos Oasis MAX® Waters. ⁽¹⁹⁾⁽²⁵⁾

Los cartuchos Oasis MAX contienen una amina cuaternaria que es un fuerte intercambiador aniónico que le proporciona una alta selectividad para compuestos ácidos. Se obtienen

- Muestras ácidas, básicas y neutras de la misma muestra.
- Extracciones limpias de orina, suero, plasma y sangre.

Además se utilizan para la extracción, monitoreo, screening, confirmación y cuantificación de fármacos. ⁽²⁰⁾⁽²¹⁾

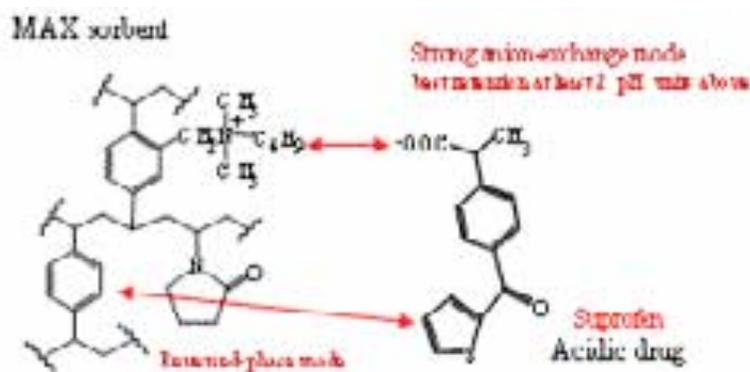


Figura 3.1 Amina cuaternaria presente en el sorbente de los cartuchos Oasis MAX

3.8.1.1 Proceso de la extracción en cartuchos Oasis MAX.

Tabla 3.1 Condiciones recomendadas para el uso de los cartuchos Oasis MAX.

Paso	Propósito
Acondicionamiento y equilibrio 1 mL de MeOH/ 1 mL de agua	Preparar el sorbente para su uso
Cargar la muestra acidificada	A pH bajo las base están ionizadas las sustancias neutras y ácidas están neutras y viceversa. Los analitos están retenidos con interacciones fase reversa.
Lavado 1 1 mL de Acetato de sodio 50 mM pH=7 en MeOH al 5%.	Remueve proteínas e interferencias del sorbente .Por un mecanismo de intercambio iónico.
Elución 1 1 mL de MeOH	Remueve interferencias retenidas por interacciones hidrofóbicas. Se puede usar como elución de compuestos básicos o neutros.
Elución 2 1-2 mL de ácido fosfórico al 2 % en metanol	Remueve las partículas ácidas
Evaporación y reconstitución	Concentra la muestra además de tener la posibilidad de cambiar de disolvente.

3.9 Validación.

3.9.1 Validación del sistema.

3.9.1.1 Linealidad.

La linealidad se demostró al preparar dos curvas patrón con cinco puntos, a partir de una solución estándar.

3.9.1.2 Precisión.

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

3.9.2 Validación del método.

El método analítico se evaluó con los siguientes parámetros analíticos de acuerdo con lo especificado en los Procedimientos Normalizados de Operación ⁽²⁸⁾ y la NOM-177-SSA1-1998. ⁽²³⁾

Todas las muestras utilizadas para cada paso de la validación fueron procesadas de acuerdo con la optimización del método de extracción.

3.9.2.1 Selectividad.

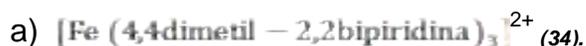
Se evaluó la estructura química de la Casiopeína IIIa, postulando las diferentes rutas de degradación; estas pruebas se realizaron como complemento de un trabajo anterior de tesis de Licenciatura ⁽³⁰⁾, por lo que se utilizó las condiciones cromatográficas de dicho trabajo, donde se evaluó la estabilidad ante diferentes estados de estrés como son ⁽¹⁸⁾. Pruebas descritas en el Anexo

- a) Hidrólisis ácida.
- b) Hidrólisis básica.
- c) Fotólisis.
- d) Oxidación.

Además se analizaron las posibles interferencias como son los precursores de síntesis como

- a) $[\text{Cu}(\text{acac})_2]$.
- b) $[\text{Cu}(\text{4,4dimetil} - 2,2\text{bipiridina})_2]^{2+}$.

Y un probable metabolito como es



3.9.2.2 *Linealidad.*

La linealidad se demostró al preparar tres curvas patrón de Casiopeína IIIa en orina, a partir de la misma solución estándar el análisis fue realizado un mismo día bajo las mismas condiciones de operación.

3.9.2.3 *Precisión.*

La precisión se evaluó por medio de: **repetibilidad y reproducibilidad**. Para evaluar estos parámetros: se analizaron por quintuplicado los puntos control en orina; determinando el promedio, desviación estándar y % de coeficiente de variación.

3.9.2.3.1 **Repetibilidad (día 1):** La repetibilidad fue analizada en un mismo día.

3.9.2.3.2 **Reproducibilidad (día 2):** Se analizó en un segundo día la misma cantidad de puntos control de la misma manera que el día 1.

3.9.2.4 *Exactitud.*

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

$$\% \text{ Desv absoluta} = \frac{\text{valor nominal} - \text{valor experimental}}{\text{valor nominal}} \times 100$$

$$\% \text{ Coeficiente de variación}(\% \text{ CV}) = \left[\frac{\text{Desviación Estándar}}{\text{promedio}} \right] \times 100$$

3.9.2.5 *Límite de detección*

El límite de detección se determinó con la concentración en la cual la señal del compuesto por analizar en la matriz biológica puede distinguirse de los niveles de ruido o de una muestra libre del compuesto de interés.

3.9.2.6 *Límite de cuantificación*

El límite de cuantificación es la menor concentración del analito que puede determinarse con precisión y exactitud en las condiciones establecidas. Se analizó por quintuplicado la concentración más baja del intervalo de trabajo (3 µg/mL).

3.9.2.7 *Estabilidad*

Se evaluó la estabilidad del compuesto en muestras de concentración conocida en la matriz biológica.

3.9.2.7.1 *Congelación.*

Se preparó por duplicado puntos control en orina, se realizó 1 ciclo congelación - descongelación a -20°C antes de analizar las muestras.

3.9.2.7.2 *Temperatura ambiente.*

Se analizó una primera serie (5,15 ,25 µg/mL) de puntos control a temperatura ambiente. Dos series de puntos control más se analizaron a las 4 horas y otras dos series de puntos control a las 24 hrs.

3.9.2.8 *Recobro (Recuperación absoluta).*

Puntos control por triplicado de Casiopeina IIIa en orina, los cuales se sometieron a un proceso de extracción y se analizaron para determinar su respuesta. De igual manera se inyectaron por triplicado los puntos control en solución y se determinó su respuesta.

Los valores obtenidos de las muestras se compararon entre sí determinando el porcentaje de recobro absoluto.

$$\% \text{ Recobro absoluto} = \left[\frac{\text{Respuesta de la muestra}}{\text{Respuesta de la solución}} \right] \times 100$$

3.10 Curvas.

Tabla 3.2 Curvas de calibración de Casiopeína IIIia.

Concentración de Casiopeína IIIia en $\mu\text{g/mL}$	Volumen en μL de alícuota de solución de casiopeína IIIia [$50 \mu\text{g/mL}$]	Aforar a 1 mL volumen en μL
3	60	940
6	120	880
12	240	760
24	480	520
30	600	400

Este diseño se utilizó en la preparación de curvas de Casiopeína IIIia en agua y en orina. Las alícuotas descritas están tomadas de las soluciones de Casiopeína IIIia con concentración de $50 \mu\text{g/mL}$ en agua u orina, según el caso.

Tabla 3.3 Puntos control.

Concentración de Casiopeína IIIia en $\mu\text{g/mL}$	Volumen en μL de alícuota de solución Casiopeína IIIia [$50 \mu\text{g/mL}$]	Aforar a 1 mL volumen en μL
5	100	900
15	300	700
25	500	500

Este diseño se utilizó en la preparación de puntos control de Casiopeína IIIia en agua y en orina. Las alícuotas descritas están tomadas de las soluciones de Casiopeína IIIia con concentración de $50 \mu\text{g/mL}$ en agua u orina según el caso.

3.11 Estudio preliminar.

Una vez validado el método se procede a hacer un estudio preliminar, donde se prueba su eficiencia en el análisis de muestras urinarias obtenidas de la administración intravenosa de casiopeína IIIa en ratas macho.



Figura 3.2 Diagrama de trabajo del estudio preliminar, para la cuantificación de casiopeína IIIa en orina.

Capítulo 4

Resultados

4.1 Desarrollo del método cromatográfico.

Las características fisicoquímicas de la casiopeína IIIa condujeron al desarrollo de un nuevo método por cromatografía fase reversa, tomando como base los trabajos realizados sobre este tema. (33) (34)

4.1.1 Longitud de onda máximo.

Con los ensayos de estabilidad de la casiopeína IIIa en diferentes soluciones amortiguadoras, se hicieron varios barridos los cuales arrojaron que el máximo de absorción adecuado para su medición con un detector UV es 296 nm.

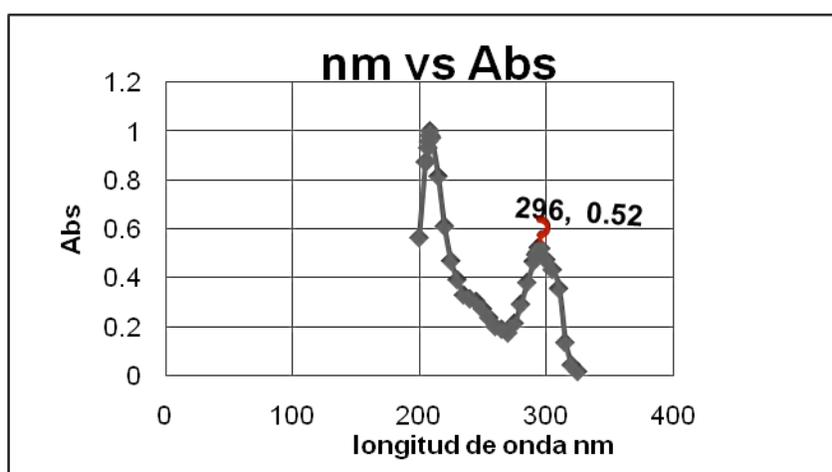


Figura 4.1 Espectro en UV de Cas IIIa en solución amortiguadora de fosfatos pH=8. Barrido de Casiopeína IIIa [100 µg/mL], en solución amortiguadora de fosfatos 0.01M pH=8, en un espectrofotómetro en la región UV. Observando un máximo de absorción de 296 nm. Datos en el anexo I.

4.1.2 Fase móvil.

Una molécula que es ionizable está influida directamente por la variación del pH ya que en las proximidades del pKa el pico puede presentar asimetría debido a la presencia simultánea de las dos especies. Esto se puede solucionar con el ajuste del pH para que la molécula no esté ionizada.

Se hicieron ensayos en donde se observaba el comportamiento de la casiopeína IIIa en diferentes valores de pH, concluyendo que el pH óptimo de trabajo de la fase móvil es de pH=8 ya que la respuesta obtenida con el detector UV es más

mayor que con las soluciones amortiguadoras con otro valor de pH. Además de que la concentración de los fosfatos debe ser pequeña, ya que pueden llegar a coordinarse con la casiopeína, la concentración adecuada de solución amortiguadora es **0.01 M**.

Una vez determinado el valor del pH la solución amortiguadora las proporciones de ésta y el modificador dependen de la optimización del sistema.

4.1.3 Columna.

Una vez determinada la fase móvil se procede a la selección de la columna (fase estacionaria) adecuada. La mayoría de las columnas son poco tolerantes a los cambios bruscos de pH; la elección fue restringida por este factor. Además se probaron columnas con diferentes tamaños de partículas y longitudes obteniendo mejores resultados con: ***Xterra RP18*** ® ***Waters*** ,250x4.6 mm, 5 µm. que tiene como matriz C18 con un ***intervalo de pH (2-12)***.

4.1.4 Temperatura.

Para evitar ruido por variaciones; la temperatura se mantuvo constante a 25 °C además que la casiopeína IIIa no es estable a altas temperaturas.

4.2 Optimización.

Una vez determinadas la fase móvil y la fase estacionaria, debe optimizarse el método cromatográfico.

4.2.1 Proporción del modificador en la fase móvil.

Se probaron varias proporciones hasta encontrar la más adecuada para el análisis; que resultó ser de 40 % de Metanol (modificador) y 60 % de solución amortiguadora de fosfatos.

4.2.2 Velocidad de flujo.

Al hacer las pruebas de las proporciones también se probaron diferentes velocidades de flujo obteniendo que la más adecuada fue de **1 mL/min**.

4.2.3 Volumen de inyección.

Una vez adecuando la velocidad de flujo se evaluaron diferentes volúmenes de inyección (50,20 y 15 μL) obteniendo un **volumen óptimo de 20 μL** ya que se obtiene picos bien definidos y con una resolución adecuada.

4.2.4 Estándar interno.

Considerando las condiciones cromatográficas y tomando en cuenta las propiedades fisicoquímicas de estándares disponibles (Clorhidrato de ranitidina, Nizatidina, propilparabeno y Metilparabeno) se hicieron varias pruebas para encontrar el estándar adecuado así como su concentración óptima (se probaron 15,10,5, 2.5 y 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Dando como resultado **Metilparabeno 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$** .

Tabla 4.1 Condiciones cromatográficas optimizadas.

Fase estacionaria	Columna Xterra RP18 ® Waters ,250x4.6 mm, 5 μm .
Fase móvil	Metanol HPLC / Solución amortiguadora de fosfatos 0.01M pH 8 (40/60)
Flujo	1 mL/min.
Longitud de onda	296 nm.
Estándar interno	Metilparabeno 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$
Volumen de inyección	20 μL .
Tiempo de corrida	10 minutos.
Precolumna	Security guard Phenomenex C18, 50x 4.6 mm, 5 μm .

4.3 Optimización del proceso de extracción.

El sorbente de los cartucho Oasis MAX pueden ser utilizados en un rango de pH de (0-14) por lo que puede ser optimizado dependiendo del pH óptimo del analito. Por las características fisicoquímicas de la **Casiopeína IIIa** y las características de la matriz:

- Se utilizaron cartuchos Oasis MAX de 1 mL con 30 mg de sorbente.
- La orina de rata macho es la matriz de la cual se extrae la casiopeína IIIa. El método es efectivo en forma indistinta entre géneros de rata.
- La muestra no se acidifica; pues la casiopeína IIIa no es estable a pH bajos. El pH de la muestra de orina oscilaba entre 6-7 lo que permitía que la molécula estuviera disociada para poder interactuar con el sorbente.
- Se adecuó el volumen de la muestra, ya que las muestras de orina de rata son de poco volumen, se probaron 1mL, 500 y 250µL de muestra.
- Se adecuaron también los volúmenes de lavados con acetato de sodio y ácido fosfórico. Utilizando 500 µL y 1 mL respectivamente.
- La **casiopeína IIIa** eluye con metanol esto es tiene un carácter básico o neutro **elución 1**.
- Como el analito de interés se recupera en la elución 1; la elución 2 se realiza solo como un lavado más.

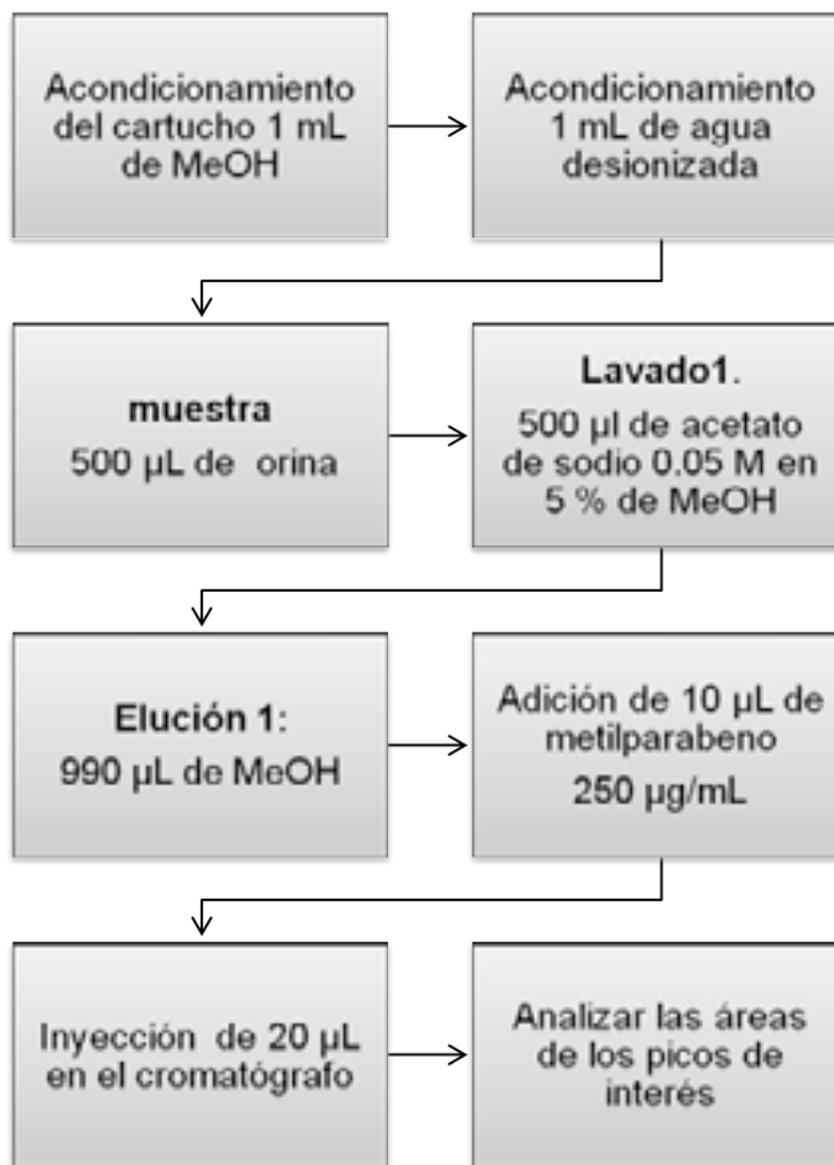


Figura 4.2 Tratamiento de muestras de orina de rata con los cartuchos Oasis MAX

4.4 Validación

4.4.1 Linealidad del sistema

Tabla 4.2. Resultados de la linealidad del sistema

Concentración de Casiopeína IIIia $\mu\text{g/mL}$	R	Factor de respuesta Concentración/respuesta
3	0.1402	4.6721
6	0.2924	4.8738
12	0.5760	4.7998
24	1.1447	4.7696
30	1.4319	4.7731
3	0.1362	4.5395
6	0.2853	4.7546
12	0.5701	4.7510
24	1.1295	4.7062
30	1.4323	4.7744
promedio		4.7414
DE		0.0888
%CV		1.8718

Resultados obtenidos en la prueba de linealidad de sistema utilizando casiopeina IIIia en solución y el método de extracción optimizado. Factor de respuesta (concentración/ relación de áreas)

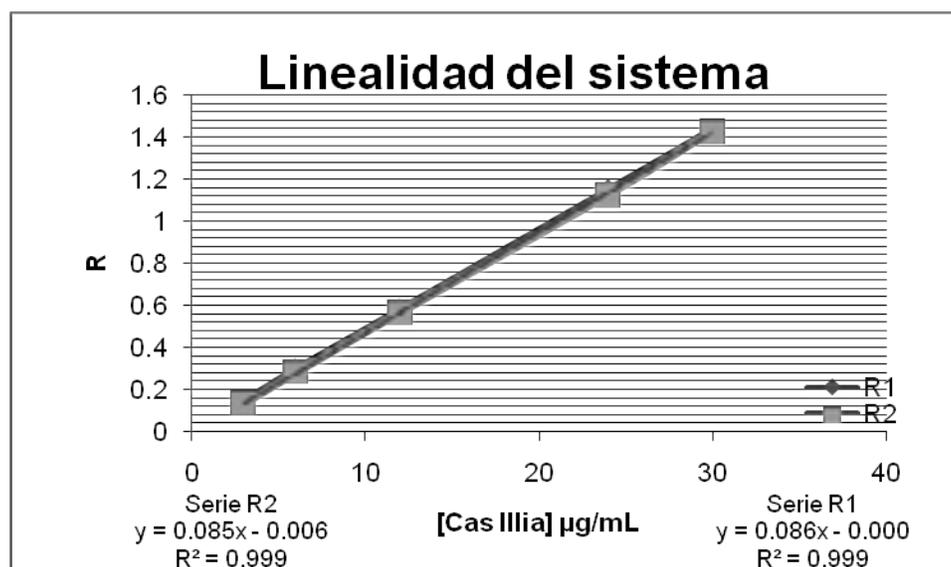


Figura 4.3 Gráfica linealidad del sistema. Representación gráfica de R vs Concentración de Casiopeína IIIia [Cas IIIia], donde R es el cociente del área de Cas IIIia entre área del Metilparabeno en solución.

4.4.2 Linealidad método

Tabla 4.3 Resultados de la linealidad del método

Concentración de Casiopeína Illia $\mu\text{g/mL}$	Curva1 R	Curva2 R	Curva3 R	PROMEDIO	DE	%CV
3	0.0506	0.0457	0.0474	0.0479	0.0025	5.16
6	0.1044	0.1097	0.1047	0.1063	0.0030	2.81
12	0.2413	0.2585	0.2599	0.2532	0.0104	4.09
24	0.6181	0.6356	0.6397	0.6311	0.0115	1.82
30	0.7493	0.7217	0.7217	0.7309	0.0159	2.18
r	0.9970	0.9955	0.9950			
r ²	0.9940	0.9910	0.9900			

Resultados obtenidos utilizando el método de extracción y método cromatográfico optimizados en el procesamiento de tres curvas de Casiopeína Illia en pool de orina de rata macho. Donde R es el cociente entre el área de la cas Illia y el área del Metilparabeno

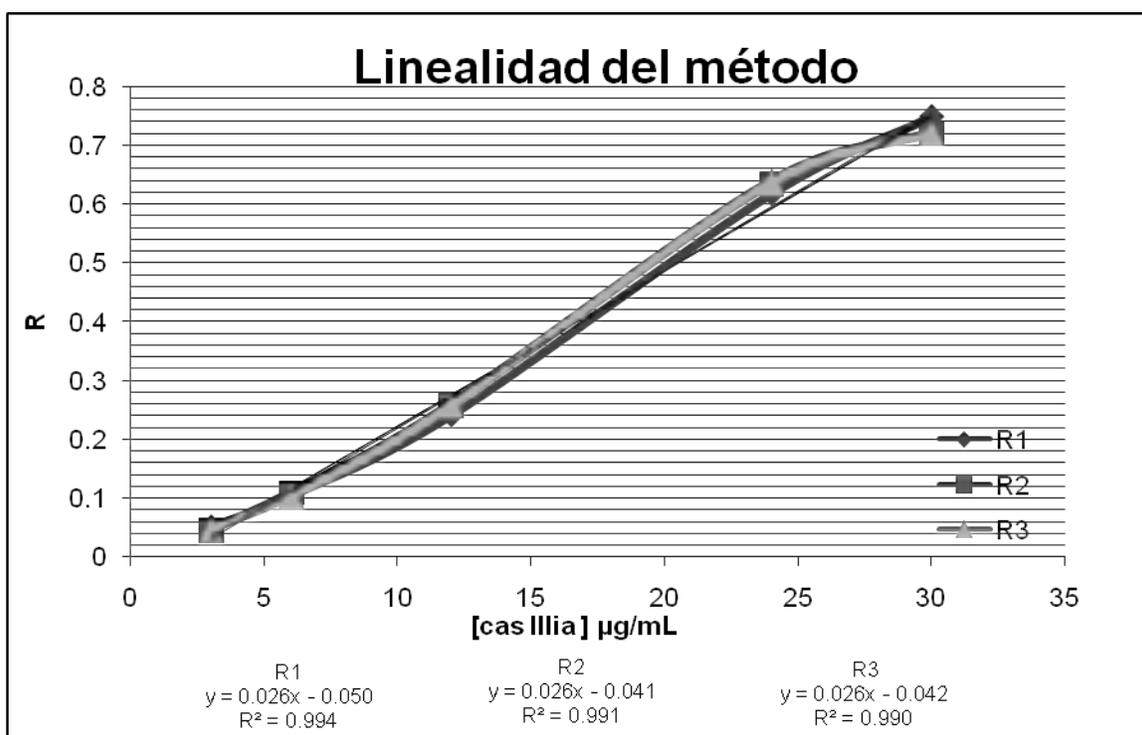


Figura 4.4 Gráfica de linealidad del método. Representación gráfica de R vs Concentración de Casiopeína Illia [Cas Illia], donde R es el cociente del área de Cas Illia entre área del Metilparabeno en solución.

4.4.3 Precisión

4.4.3.1 Repetibilidad

Tabla 4.4 Resultados de repetibilidad.

No. réplica	Punto control bajo 5µg/mL	Punto control medio 15µg/mL	Punto control alto 25µg/mL
	Concentración Experimental µg/mL	Concentración Experimental µg/mL	Concentración Experimental µg/mL
1	4.95	15.51	24.24
2	4.90	14.76	23.88
3	5.53	17.13	25.59
4	5.62	18.92	23.30
5	5.25	15.33	22.73
Promedio	5.25	16.33	23.95
DE	0.33	1.69	1.08
%CV	6.28	10.36	4.52

Resultados obtenidos del procesamiento de los puntos control de Casiopeina Illia en orina. Cada concentración fue calculada interpolando las respuestas en una curva realizada el mismo día del análisis.

4.4.3.2 Reproducibilidad

Tabla 4.5 Resultados de reproducibilidad.

Día de análisis	No. réplica	Punto control bajo 5µg/mL	Punto control medio 15µg/mL	Punto control alto 25µg/mL
		Concentración Experimental µg/mL	Concentración Experimental µg/mL	Concentración Experimental µg/mL
<i>Día 1</i>	1	4.95	15.51	24.24
	2	4.90	14.76	23.59
<i>Día 2</i>	3	5.01	12.81	22.37
	4	4.89	12.74	21.08
<i>Día 3</i>	5	5.56	13.62	22.81
	6	5.44	13.08	22.63
	promedio	5.12	13.75	22.79
	DE	0.30	1.14	1.08
	%CV	5.81	8.28	4.75

Resultados obtenidos del procesamiento de los puntos control de Casiopeina Illia en orina en diferentes días de trabajo. Cada concentración fue calculada interpolando las respuestas a una curva realizada el día del análisis.

4.4.4 Exactitud

Tabla 4.6 Resultados de exactitud del método.

No réplica	Punto control bajo 5µg/mL		Punto control medio 15µg/mL		Punto control alto 25µg/mL	
	Concentración Experimental µg/mL	% DEA	Concentración Experimental µg/mL	% DEA	Concentración Experimental µg/mL	%DEA
1	4.95	1.03	15.51	3.39	24.24	3.05
2	4.90	2.05	14.76	1.61	23.59	5.65
3	5.01	0.21	12.81	14.63	22.37	10.53
4	4.89	2.30	12.74	15.06	21.08	15.67
5	5.56	11.20	13.62	9.19	22.81	8.75
6	5.44	8.86	13.08	12.77	22.63	9.49
7	5.53	10.69	17.13	14.17	25.59	-2.35
8	5.62	12.47	18.92	26.11	23.30	6.81
9	5.25	5.08	15.33	2.23	22.73	9.09
promedio	5.24	5.99	14.88	1.57	23.15	7.41

Se procesaron por duplicado los puntos control en pool de orina de rata. Cada concentración fue calculada interpolando en la curva que se preparó el mismo día. Además se calculó la DEA

4.4.5 Límite de detección.

El método permite detectar hasta una concentración de 1.5 µg/mL.

4.4.6 Límite de cuantificación.

Tabla 4.7 Resultados del límite de cuantificación

Concentración nominal 3µg/mL	Réplica	R	Concentración experimental µg/mL
	1	0.04	3.56
	2	0.05	3.52
	3	0.05	3.33
	4	0.05	3.40
	5	0.04	3.13
Promedio		0.05	3.39
DE		0.004	0.17
%CV		8.82	5.06

Resultados obtenidos del procesamiento por quintuplicado de muestras de orina con una concentración de Casiopeína IIIa de 3 µg/mL en orina para determinar el límite de cuantificación. Donde R es el cociente entre el área de la cas IIIa y el área del Metilparabeno

4.4.7 Estabilidad

4.4.7.1 Estabilidad a Temperatura ambiente

Tabla 4.8 Resultados de estabilidad de las muestras a temperatura ambiente

Concentración nominal $\mu\text{g/mL}$	Réplica	Concentración inicial $\mu\text{g/mL}$	Concentración recuperada 4 horas $\mu\text{g/mL}$	%DEA	Concentración recuperada 12 horas $\mu\text{g/mL}$	%DEA
5	1	5.56	4.02	19.69	3.45	31.10
	2	5.44	4.40	12.04	3.23	35.32
	Promedio	5.50	4.21	15.86	3.34	33.21
	DE	0.08	0.27		0.15	
15	1	14.83	10.87	27.53	9.24	38.37
	2	14.76	10.07	32.89	9.54	36.38
	Promedio	14.80	10.47	30.21	9.39	37.37
	DE	0.05	0.57		0.21	
25	1	25.83	19.73	21.06	14.21	43.15
	2	24.24	19.44	22.25	13.99	44.05
	Promedio	25.04	19.59	21.65	14.10	43.60
	DE	1.13	1.13		1.13	

Resultados obtenidos por el procesamiento de puntos control en orina; los cuales fueron procesados después de haber permanecido 4 y 12 horas a temperatura ambiente; esto con el fin de evaluar la estabilidad de la muestra en la matriz biológica (orina).

Las muestras procesadas después de 4 horas presentaron 75.18 % de recuperación de la muestra así como las muestras procesadas después de 12 hrs presentaron el 60.1873% de recuperación de la muestra.

4.4.7.2 Ciclos de congelación

Tabla 4.9 Resultados de estabilidad de muestras en ciclos de congelación

Concentración µg/mL	Réplica	Concentración Experimental µg/mL	Concentración Recuperada µg/mL	%DEA
5	1	5.56	3.40	31.96
	2	5.44	3.55	28.94
	promedio	5.50	3.48	30.45
	DE	0.08	0.11	
15	1	14.83	9.59	36.06
	2	14.76	8.63	42.48
	promedio	14.8	9.11	39.27
	DE	0.05	0.68	
25	1	25.83	15.83	36.67
	2	24.24	15.91	36.35
	promedio	25.04	15.87	36.51
	DE	1.13	0.06	

Resultados obtenidos por el procesamiento de los puntos control en orina, expuestos a 1 ciclo de congelación para evaluar la estabilidad.

4.4.8 Recobro

Tabla 4.10 Resultados de recuperación absoluta de muestras en orina

Concentración nominal µg/mL	Concentración recuperada en µg/mL		% Recobro
	Solución	Orina	
5	5.02	4.81	95.86
	5.45	4.53	83.12
	5.07	5.01	98.91
promedio	5.18	4.79	92.63
15	14.66	14.78	100.77
	13.91	12.35	88.78
	14.26	12.81	89.81
promedio	14.28	13.31	93.23
25	22.40	18.56	82.85
	21.59	21.27	98.48
	21.88	22.37	102.24
promedio	21.96	20.73	94.41
		Promedio total	93.42
		DE	6.38

Datos obtenidos de la comparación de muestras de cas Illia en solución con muestras de cas Illia en orina para determinar cual es el recobro del método desarrollado.

4.4.9 Selectividad

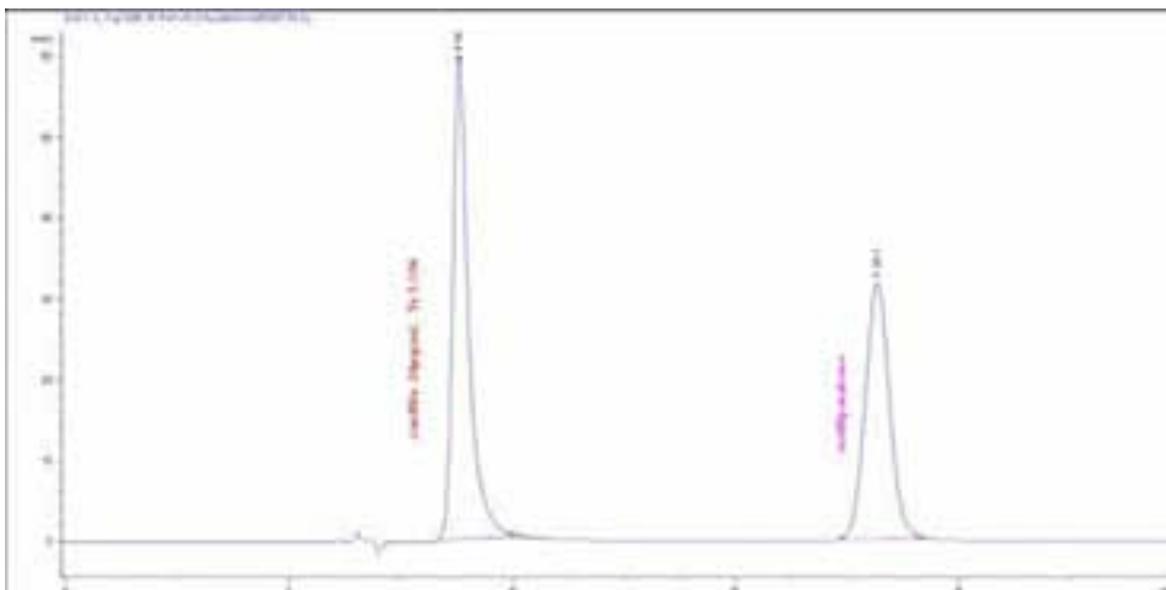


Figura 4.5 Cromatograma de Casiopeína IIIa en solución. Resultado del procesamiento de cas IIIa en MeOH; con el método extracción desarrollado. Donde la cas IIIa tiene un $t_r=3.5\text{min}$ y el Metilparabeno $t_r=7.6\text{min}$.

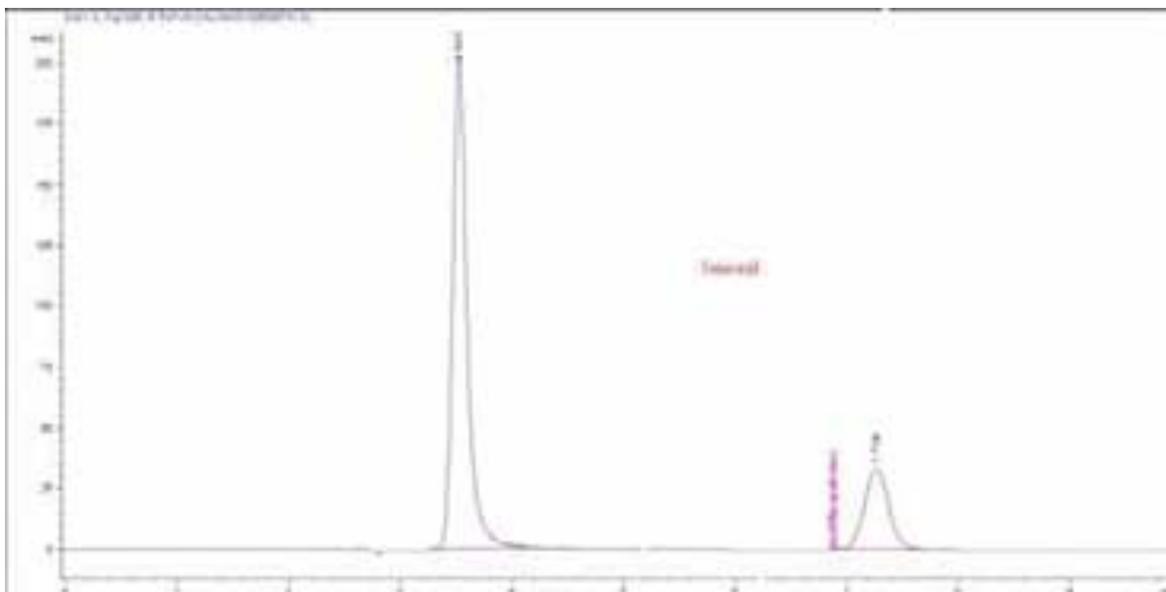


Figura 4.6 Cromatograma de $[\text{Cu}(\text{acac})_2]$ en MeOH. Resultado del procesamiento de una muestra de $[\text{Cu}(\text{acac})_2]$ en solución además del Metilparabeno.

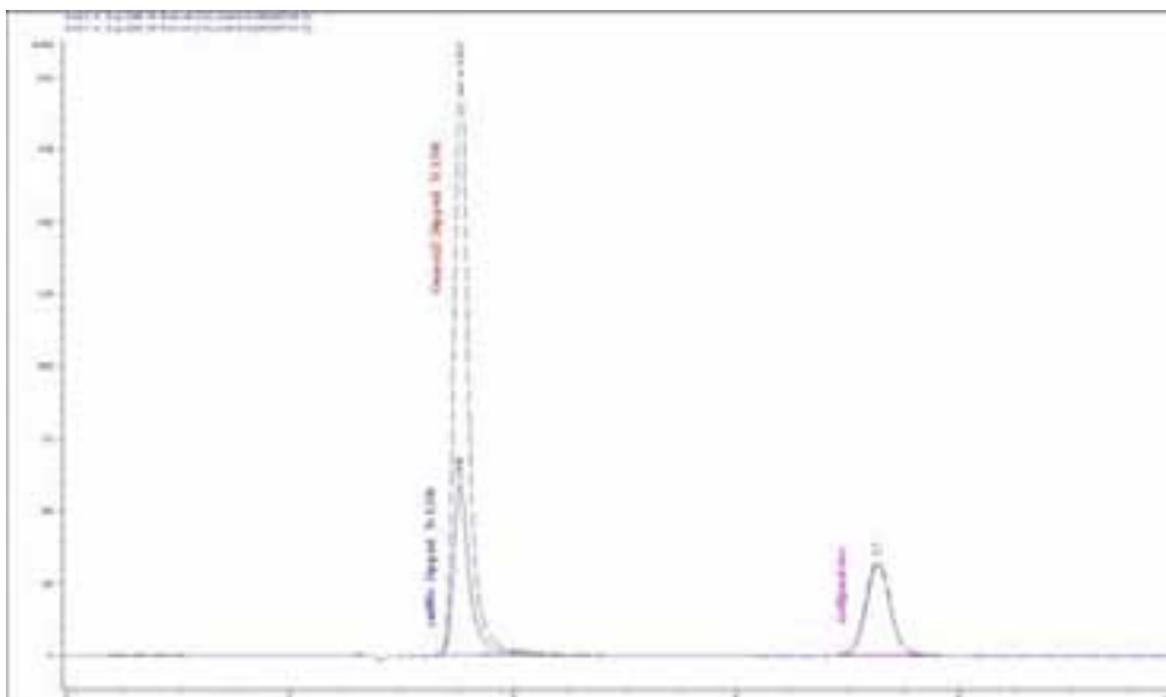


Figura 4.7 Comparación de cas IIIa en MeOH con de $[\text{Cu}(\text{acac})_2]$ en MeOH. Se observa el mismo tiempo de retención para Cas IIIa ($\text{tr}=3.5$) y para $[\text{Cu}(\text{acac})_2]$ ($\text{tr}= 3.5$). En presencia del estándar Metilparabeno ($\text{tr}=7.6$).

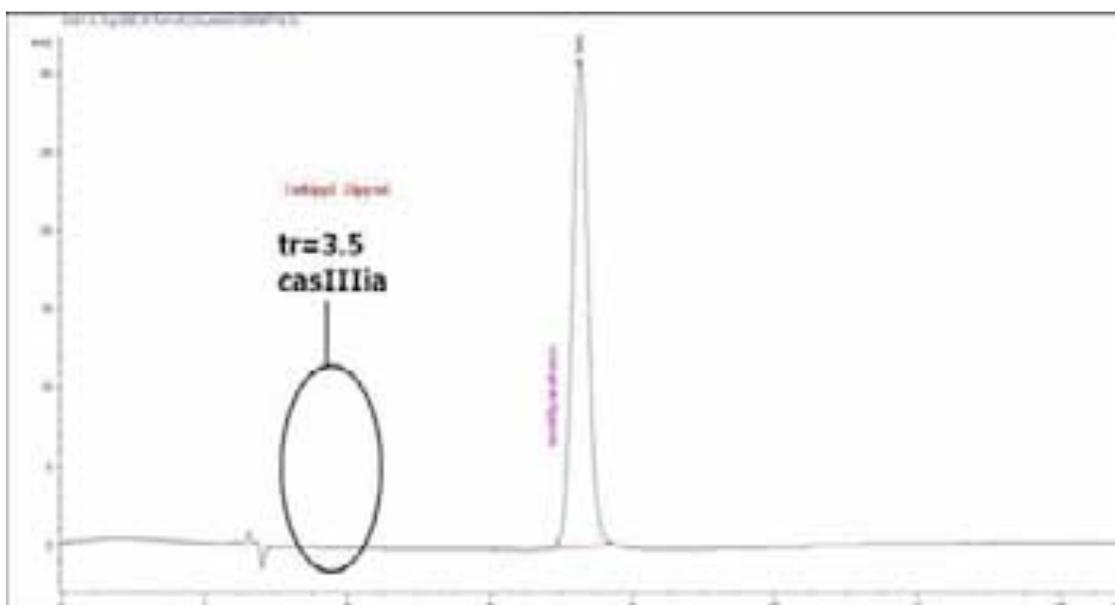


Figura 4.8 Cromatograma de $[\text{Cu}(4,4\text{-dimetil} - 2,2\text{bipiridina})_2]^{2+}$ en MeOH. Cromatograma resultado de un procesamiento de $[\text{Cu}(4,4\text{-dimetil} - 2,2\text{bipiridina})_2]^{2+}$ en solución donde no se observa ninguna señal solo la señal del estándar Metilparabeno $\text{tr}= 7.62$

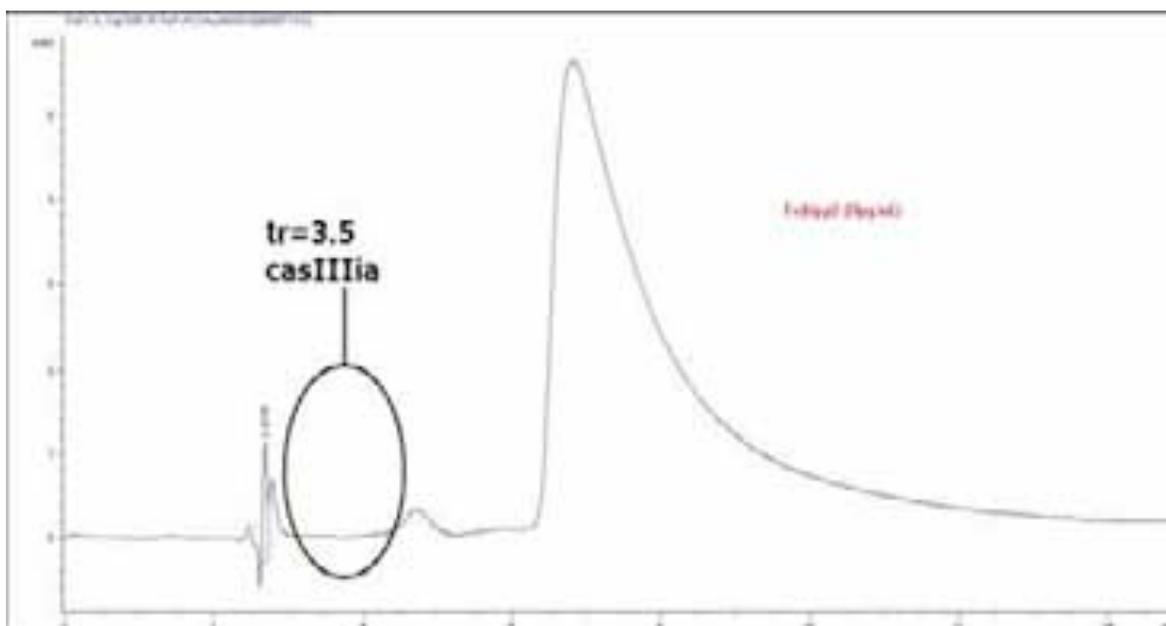


Figura 4.9 Cromatograma de $[\text{Fe}(\text{4,4-dimetil} - 2,2\text{-bipiridina})_3]^{2+}$ en MeOH. Resultado del procesamiento de muestra $[\text{Fe}(\text{4,4-dimetil} - 2,2\text{-bipiridina})_3]^{2+}$. Se observa que no presenta ninguna señal en el tiempo de retención de la Cas IIIa.

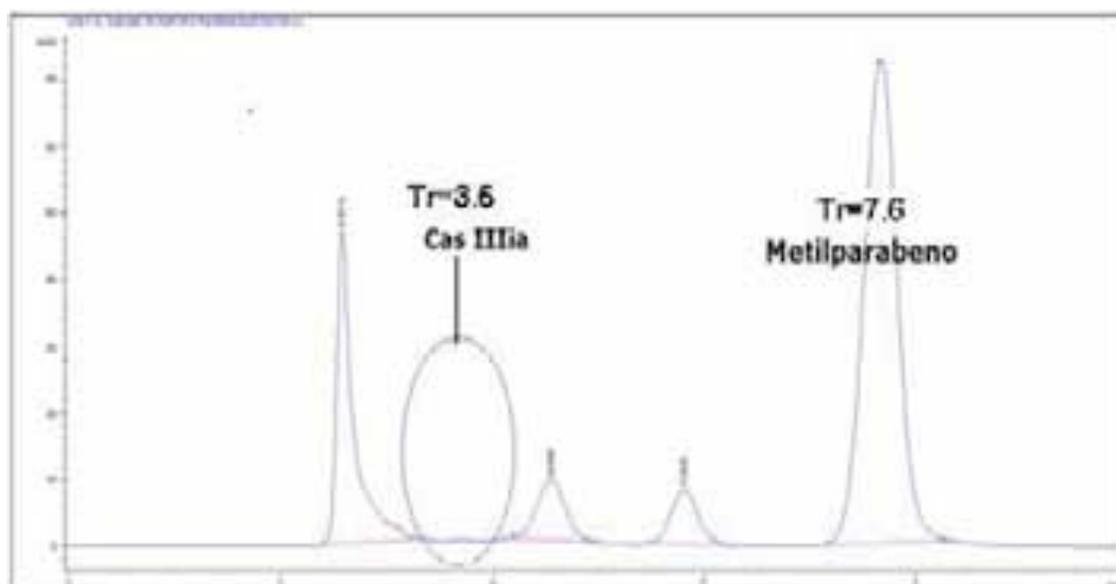


Figura 4.10 Cromatograma de blanco de orina de rata macho. La presente figura representa el resultado del procesamiento de un blanco de orina de rata macho donde los picos con tiempo de retención 2.58, 4.48 y 5.68 corresponden a componentes endógenos de la orina y el estándar Metilparabeno con un tiempo de retención de 7.675 min.

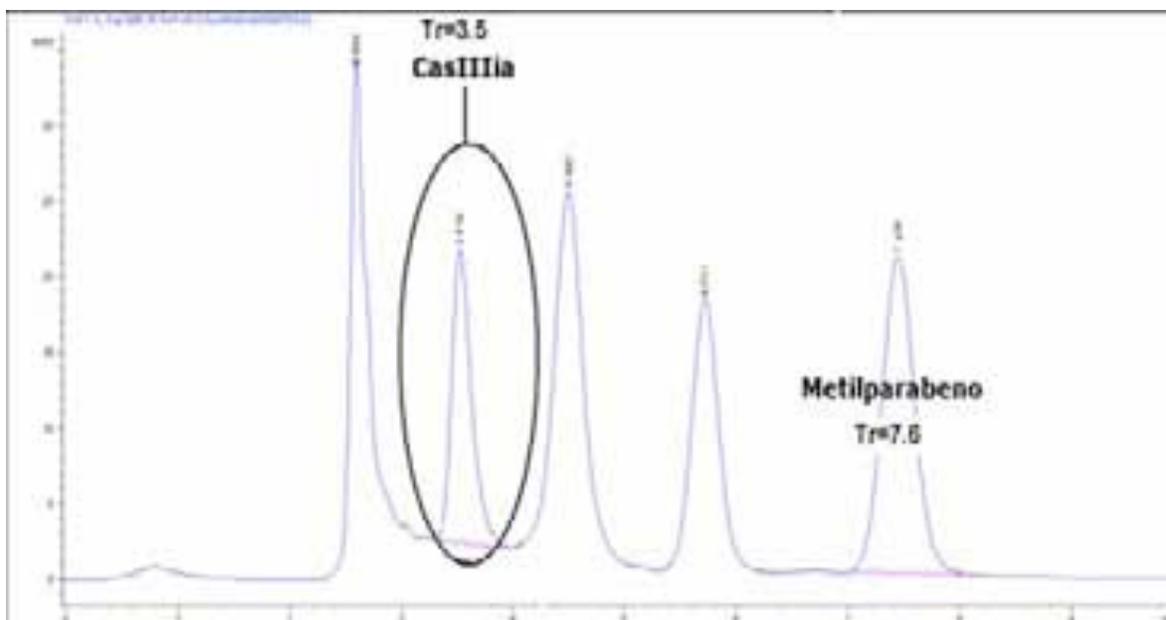


Figura 4.11 Cromatograma de casiopeína IIIa en orina. La Casiopeína IIIa en orina se observa en un tiempo de retención de 3.5 min., igual que en solución.

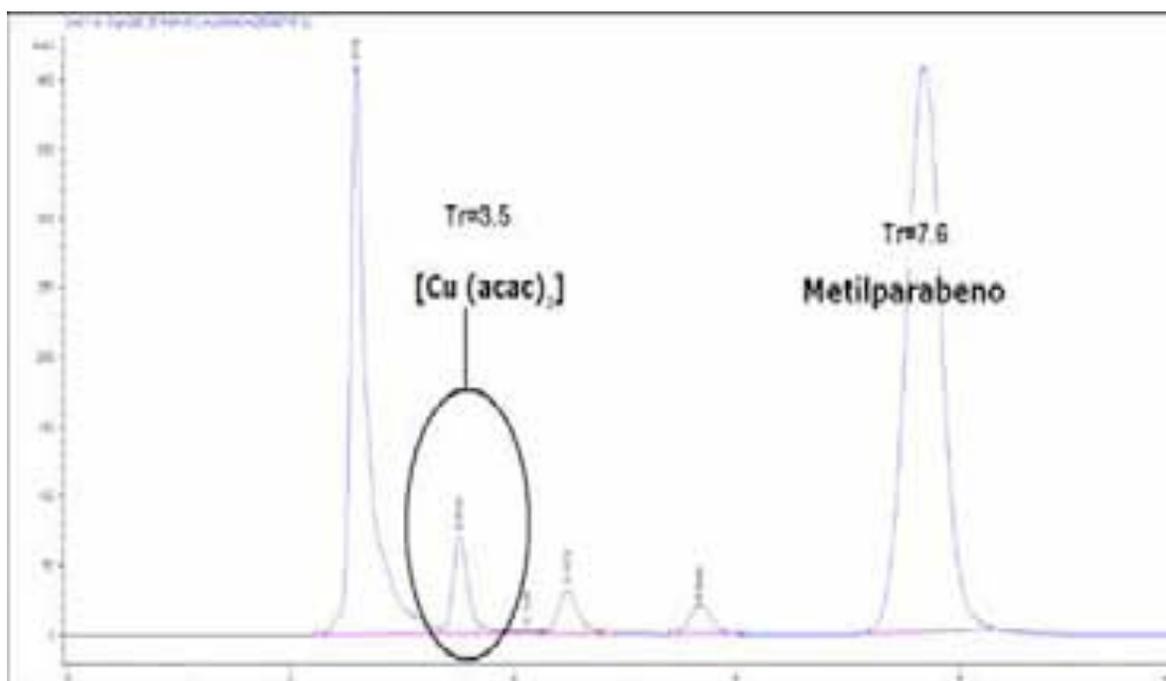


Figura 4.12 Cromatograma de $[\text{Cu}(\text{acac})_2]$ en orina. El $[\text{Cu}(\text{acac})_2]$ en la orina tiene un tiempo de retención de 3.5 min. igual que en solución. La casiopeína IIIa tiene el mismo tiempo de retención como se observa en la Figura 4.11, por lo que el método no es selectivo para $[\text{Cu}(\text{acac})_2]$.

4.5 Ensayo preliminar con ratas

Después de haber administrado las ratas con casiopeína en agua inyectable con una dosis de (4 mg/Kg peso), se adecuó el tiempo de muestreo para obtener el volumen necesario para su análisis con el método ya validado.

Los tiempos de muestreo se adecuaron de acuerdo con el volumen obtenido como se indica en la **tabla 4.11**.

Tabla 4.11 Tiempos de muestreo y volumen recolectado en el ensayo preliminar.

Rata	Volumen de orina recolectado (mL)						Volumen total
	3 h	4 h	7 h	12 h	24 h	30 h	
Control 1	0.5	-----	0.5	-----	1.25	1	3.25
Control 2	0.55	0.5	0.5	-----	2.0	0.9	4.45
Rata 1	0.5	0.6	1	.75	2.10	1.5	5.7
Rata 2	0.6	0.5	1	1.5	1.75	0.8	6.15
Rata 3	0.8	0.5	1	3.75	1	1.3	8.35

Volumen de orina obtenido de cada rata después de su administración; los tiempos de muestreo se fueron variando en función de el volumen de orina obtenido. Cabe mencionar que las ratas administradas con la Cas IIIa eran las más grandes.

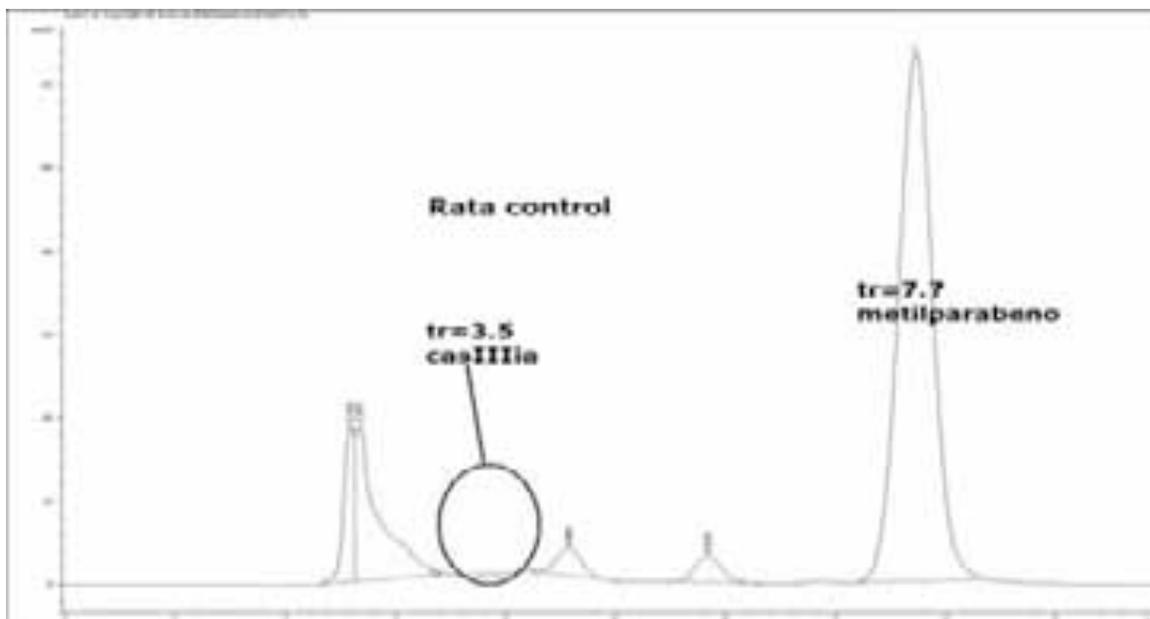


Figura 4.13 Cromatograma de rata control en el ensayo preliminar. Resultado de las muestras de rata control a tiempo 3 hrs donde se observa claramente la ausencia del pico característico de la Casiopeina IIIa al tr= 3.5 mín.

Una vez analizadas las muestras urinarias de las tres ratas pruebas se observó, una coloración rojiza en la orina (**figura 4.14**), y una señal en el tiempo de retención 3.5 mín. (tr. característico de la casiopeína IIIa) en los tiempos de muestreo 3 horas y 7 horas (**figuras 4.14 y 4.15**).

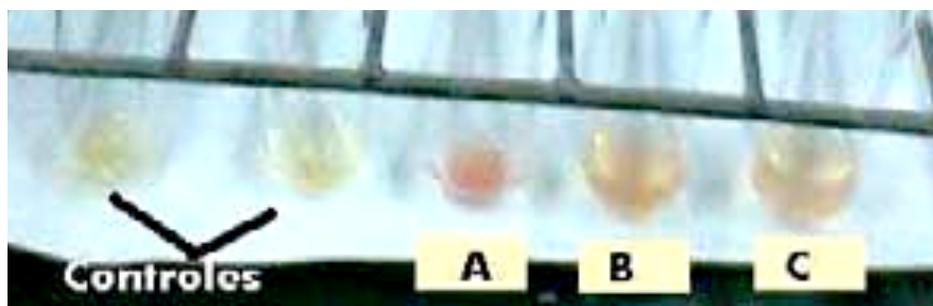


Figura 4.14 Color de las muestras de orina de las ratas del estudio preliminar.; donde A representa la rata 1, B rata 2 y C rata 3 en donde se observa que se presenta hematuria.

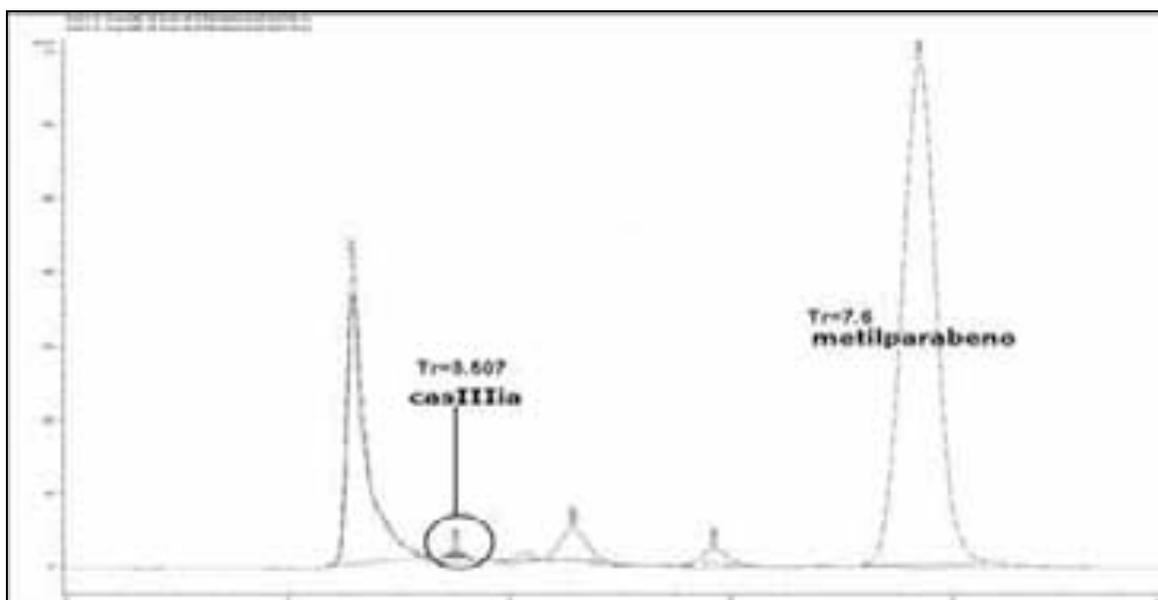


Figura 4.15 Comparación entre el blanco de orina y la muestra de t=3 hrs de la rata 2. Es una comparación del cromatograma de una muestra de orina blanca de la rata 2 con el cromatograma de la orina de la rata 2 al tiempo 3 hrs superpuestos; donde se observa claramente la presencia del pico característico de las Cas IIIa aunque fuera del alcance de cuantificación.

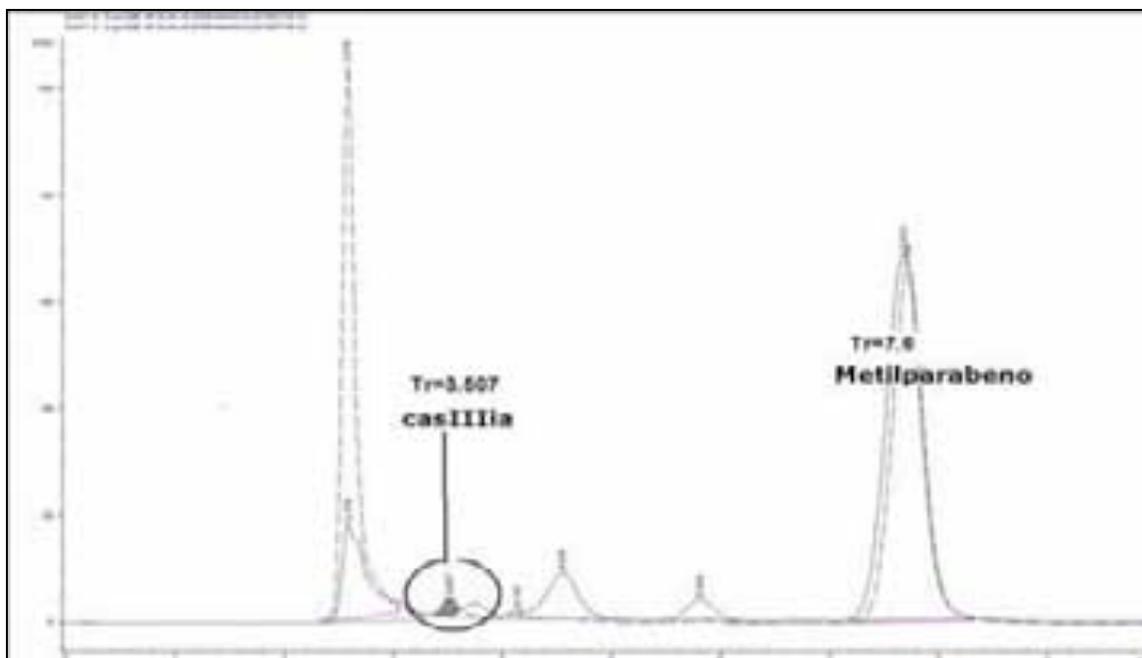


Figura 4.16 Comparación entre el blanco de orina y la muestra de $t=7$ hrs de la rata 3. Es una comparación del cromatograma del blanco de orina de la rata 3 con el cromatograma de la orina de la rata 3 al tiempo 7 hrs sobrepuestos; donde se observa claramente la presencia del pico característico de las Cas IIIa aunque fuera del alcance de cuantificación.

Capítulo 5

Análisis de resultados.

5.1 Análisis de resultados

5.1.1 Desarrollo del método cromatográfico.

Para el desarrollo del método cromatográfico se retomaron los resultados de los estudios de estabilidad de la Casiopeína IIIa en disolución a diferentes valores de pH^{(30) (31)}; los cuales nos proporcionaron las herramientas necesarias para crear un método cromatográfico donde se obtuviera una mejor señal.

En la **tabla 5.1** se hace una comparación del presente trabajo con el método desarrollado anteriormente⁽³¹⁾ donde se observan las diferencias. Cabe mencionar que el cambio del valor del pH de la fase móvil derivó a la optimización de las demás condiciones cromatográficas. Sobre este aspecto se debe señalar que la Casiopeína IIIa es susceptible a los cambios de pH por su condición de compuesto ionizable⁽¹⁰⁾; así como a la coordinación de grupos fosfatos; sales utilizadas en la elaboración de las soluciones amortiguadoras, por su condición de compuesto de coordinación⁽³⁷⁾; se hicieron los ensayos necesarios para encontrar la concentración adecuada para el análisis.

La optimización del método permitió reducir el volumen de inyección y el tiempo de análisis como las aportaciones más claras. La disminución del volumen de inyección fue importante para que el pico de interés tuviera una mejor definición, pues se debe tomar en cuenta que al aumentar el volumen de inyección por encima de 20 μL el pico tiende a ensancharse.⁽¹⁷⁾

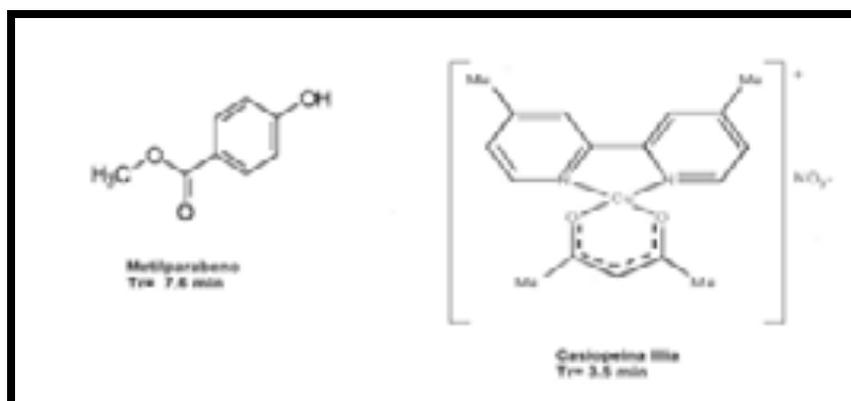


Figura 5.1 Estructuras químicas de la Casiopeína IIIa y el Metilparabeno indicando los tiempos de retención en el método desarrollado.

Tabla 5.1 Cuadro comparativo de condiciones cromatográficas.

	Método anterior	Método desarrollado
Fase estacionaria	Columna Hypersil Elite C18, 250x4.6 mm,5 µm.	Columna Xterra RP18 ® Waters ,250x4.6 mm, 5µm.
Fase móvil	Metanol/Solución amortiguadora de fosfatos 0.01 M pH 6.7 / Hexansulfonato de sodio (0.05 M) (35/65/5)	Metanol / Solución amortiguadora de fosfatos 0.01 M pH 8 (40/60)
Flujo	0.8 mL/min	1 mL/min
Longitud de onda	274 nm	296 nm.
Estándar externo	Clorhidrato de ranitidina 5 µg/mL Tr=10.6mín.	Metilparabeno 2.5 µg/mL Tr=7.6 mín.
Volumen de inyección	50 µL	20 µL
Tiempo de corrida	13 min	10 minutos.
Precolumna	Security guard Phenomenex C18, 50 x 4.6mm, 5 µm	Security guard Phenomenex C18, 50 x 4.6 mm, 5 µm
Tiempo de retención de Casiopeína IIIa	6.8 mín.	3.5 mín.

Cuadro comparativo de las condiciones cromatográficas del presente trabajo con el realizado por Q.F.B. Irma E. Gómez ⁽³¹⁾.

Además de las ventajas con lo que se refiere a tiempo de análisis se amplió el rango de concentraciones de trabajo ⁽³²⁾ ⁽³³⁾ pues el método cromatográfico es capaz de cuantificar **Casiopeína IIIa** en solución desde 750 ng /mL.

Esto derivó en el diseño de un método de extracción de muestras en matriz biológica que nos permitiera mantener las claras ventajas obtenidas.

5.1.2 Desarrollo del método de extracción.

Para el análisis de muestras biológicas es necesario obtener muestras limpias para que los componentes endógenos de la matriz biológica (suero, sangre, orina, entre otras) no interfieran con los picos de interés.

La presencia de los compuestos endógenos de la orina, los cuales tenían una señal muy alta que ocultaban la señal de la Casiopeína², marcaban la necesidad de aplicar un método de extracción más eficiente; sin embargo las características fisicoquímicas de la Casiopeína IIIa limitaban la utilización de muchos de estos métodos pues utilizan técnicas que rompen la molécula; lo que complicaban su extracción.

Durante la búsqueda del método de extracción de la Casiopeína IIIa en orina de rata se probaron distintos métodos desde filtración, salting out, donde se agregaba $ZnSO_4$, hasta un análisis cromatográfico por gradientes los cuales no proporcionaron ninguna mejoría.

Al realizar la investigación bibliográfica y con la sugerencia del M. en C. Luis García se decide probar la **Extracción Fase Sólida (SPE)** técnica que cada día adquiere mayor importancia ya que ofrece diferentes y variados tipos de cartuchos para las necesidades específicas de diferentes análisis.

Tomando en cuenta las propiedades fisicoquímicas de la molécula y las características de la matriz biológica (orina); se realizaron ensayos en los cuales se probaron cartuchos de naturaleza aniónica y catiónica. De los cuales los cartuchos aniónicos cumplieron con las necesidades de la extracción de Casiopeína IIIa en orina de rata.

Tomando como guía las sugerencias de uso de los cartuchos Oasis MAX⁽²⁵⁾ se modificaron y adecuaron éstas para la optimización del método de extracción.

² Observar figuras en el Anexo.

Algunas de las observaciones sobre el método de extracción son:

- No hay diferencias significativas entre género (hembra y macho) se puede utilizar indistintamente la orina, tomando en cuenta que era una de las limitantes mencionadas en el método anterior⁽³³⁾. Ya que se hicieron pruebas con muestras de orina de rata macho y rata hembra comparando los resultados.
- Para que el análisis sea eficiente el volumen de orina necesario; es menor que el requerido anteriormente⁽³²⁾⁽³³⁾; este fue adecuado por que el volumen de orina de rata que se puede obtener es limitado.
- Uno de los requerimientos para el uso de los cartuchos es que la muestra debe estar disociada, esto permite que la casiopeína interactúe con el material de relleno. Los métodos recomendados son agregar ácido o base según sea el caso; en nuestro análisis no fue necesario pues la *casiopeína Illia* en solución (agua) se encuentra disociada. Esto fue comprobado en pruebas donde se mantenía la *Casiopeína Illia* en metanol y al hacer al proceso de extracción por SPE salía completamente sin interactuar con el sorbente.
- La *Casiopeína Illia* tiene una interacción hidrofóbica con el material de relleno; lo que le permite salir al adicionar el metanol (**elución 1**).
- El volumen para la **elución 1** debe ser por lo menos el doble del volumen de la muestra; para poder considerar que la Casiopeína sale del material de relleno. Esto se determinó después de hacer pruebas con diferentes volúmenes de lavado.

- Lo anterior implica que la señal de la *Casiopéina Illia* esta afectada por un factor de dilución. Esta condición no pudo ser eliminada por que al probar la técnica de concentración de muestra la casiopéina desaparecía, lo que nos demuestra que la molécula no es estable en las condiciones de concentración³. Una de las posibles mejoras de este método es encontrar las condiciones adecuadas de concentración de la muestra esto ampliaría el rango de análisis y se mejoraría el límite de detección.
- Otra limitante es que se recomienda que el cartucho Oasis MAX sea utilizado solo una vez; esto se comprobó ya que al hacer las pruebas con cartuchos reutilizados en la extracción aumentaba las áreas tanto de los picos representantes de los componentes endógenos de la orina como de la casiopéina. Lavándolo adecuadamente se puede utilizar dos veces el cartucho. Lo que incrementa el costo del análisis.

5.1.3 Validación.

Una vez optimizado tanto el método cromatográfico como el método de extracción se continuó con la validación para documentar la eficiencia del método. Los resultados obtenidos en la validación se resumen en la **tabla 5.2** donde se pueden comparar con los criterios de aceptación ^{(28) (29)}. Lo que nos permite observar que el método validado cumplió con las especificaciones salvo algunos puntos a comentar.

³ Se utilizó un baño con aditamento especial que permite pasar un flujo de nitrógeno. El baño no excedió los 40 °C y la evaporación no duro más que 2 mín.

Siguiendo los resultados representados en la **tabla 5.2**; la estabilidad de la muestra en condiciones de almacenamiento (tanto en temperatura ambiente como en congelación) no resulto satisfactoria ya que al analizar las muestras mostraban clara disminución de la señal de *Casiopeína IIIa*; por lo tanto la muestra de **Casiopeína IIIa en orina no es estable** desde las 4 horas de exposición. Lo que nos lleva a pensar que tal vez la presencia de los componentes de la orina, que en su mayoría son sales⁽²⁾ y por las características de los compuestos de coordinación, *casiopeína IIIa*, podrían llegar a coordinarse; con esto la señal disminuiría por la formación de otro compuesto no identificado y no reconocido por el método de detección. Por lo que es recomendable analizar inmediatamente las muestras.

Tabla 5.2 Resultados de la validación y criterios de aceptación.

Parámetro de validación.		Criterio de aceptación	Resultados
Linealidad de sistema		$r^2 = 0.99$	$r^2 = 0.999$
Precisión del sistema		$\%CV \leq 2\%$	$\%CV = 1.87\%$
Linealidad del método		$r^2 = 0.99$	$r^2 = 0.99$
Repetibilidad		$\%CV \leq 15\%$	$(4.52-10.36) \leq 15\%$
Reproducibilidad		$\%CV \leq 15\%$	$(4.75-8.28) \leq 15\%$
Exactitud		DEA $\leq 15\%$	$(4.27-9.44) \leq 15\%$
% Recobro		No necesario 100% Solo repetible	Promedio 93.42 %
Límite de cuantificación		$\%CV \leq 20\%$	$CV = 5.06 \leq 15\%$
Estabilidad a temperatura ambiente	4 horas	DEA $\leq 15\%$	DEA ≥ 30
	12 horas	DEA $\leq 15\%$	DEA ≥ 30
Estabilidad en ciclo de congelación		DEA $\leq 15\%$	DEA ≥ 30

Además de la estabilidad de la muestra, otro parámetro importante de la validación a comentar es la **selectividad del método**.

- Pruebas en condiciones de estrés.
 1. De las pruebas en condiciones de estrés; se puede comentar que la muestra no es estable en condiciones ácidas, básicas y de oxidación como se observa en el Anexo I. Ninguna de estas condiciones señalan picos de interferencia con la señal de *casiopéina IIIa*, aunque se observa una clara disminución de la señal.
- Posibles interferencias.
 1. El $[\text{Cu}(\text{4,4dimetil} - \text{2,2bipiridina})_2]^{2+}$ como se observa en el **Figura 4.5** no presenta ninguna señal, lo que nos indica que el método cromatográfico utilizado no es capaz de detectarlo.
 2. El $[\text{Fe}(\text{4,4dimetil} - \text{2,2bipiridina})_3]^{2+}$ como se observa en el **Figura 4.6** aparecen señales que no interferirían con la señal de la *casiopéina IIIa*; además se observa que el pico no está definido por lo que se infiere que el método cromatográfico utilizado no es el adecuado para su análisis.
 3. El $[\text{Cu}(\text{acac})_2]$ como se observa en el **Figura 4.3** presenta el mismo tiempo de retención de la *casiopéina IIIa* (3.5 mín.); esta comparación se observa en el **Figura 4.4** lo que nos lleva a afirmar que el método **no es selectivo para el cobre acetilacetato** ($[\text{Cu}(\text{acac})_2]$). Estas características se presentan también en los resultados obtenidos con las muestras de orina; como se observan en las **figuras 4.8 y 4.9**.

Con lo anterior se puede decir que **el método es selectivo para la Casiopéina IIIa**; ya que solo la señal de ($[\text{Cu}(\text{acac})_2]$) interfiere con la señal de *casiopéina*; y este es un subproducto de síntesis.

5.1.4 Ensayo preliminar con ratas.

El método permitió detectar una señal de lo que se infiere es *Casiopeína IIIa* (figura 4.15 y figura 4.16) en un tiempo de retención de 3.5 min; pero el área de esta señal es de menor concentración que la detectable con este método. Esto da como resultado que el método desarrollado sirve como un ensayo cualitativo y no cuantitativo ya que el rango de trabajo no es el adecuado para la cuantificación de *casiopeína IIIa en la orina*. Por lo que no se pudieron obtener datos farmacocinéticos. Pero la presencia de *casiopeína IIIa* inalterada puede contribuir a conocer el comportamiento de esta en el organismo.

Como la cantidad de *Casiopeína IIIa* inalterada, es muy pequeña puede estar indicando que el resto de *Casiopeína IIIa* puede estar unida a proteínas plasmáticas o distribuida en otros tejidos, o probablemente se esta metabolizando o biotransformando en subproductos.

Otro aspecto interesante es la coloración naranja-rojizo de las muestras urinarias obtenidas durante los primeros tiempos del muestreo, que abre la posibilidad de la interacción de la diimina con el fierro del organismo⁽³⁴⁾. Esto se debe a que el cobre y el fierro comparten muchas características entre ellas su bioquímica (transportadores, proteínas)⁽⁸⁾. Además como el método no es adecuado para el análisis de $[\text{Fe}(\text{4,4dimetil} - 2,2\text{bipiridina})_2]^{2+}$, probable resultado de esta interacción, figura 4.6 no se puede asegurar la presencia de este por el método cromatográfico validado.

Aunque también al correlacionar la presencia de *Casiopeína IIIa* inalterada en la orina de los mismos tiempos de muestreo puede llevarnos a pensar que esta coloración es por la presencia de hemoglobina, esto puede estar relacionado con la acción del Cu (cobre) en el organismo; ya que este al entrar en torrente sanguíneo daña las membranas de los eritrocitos provocando lisis intravascular, liberando la hemoglobina lo que proporciona la coloración rojiza a la orina. Como no se realizó un análisis de la orina por falta de suficiente volumen de muestra, no se puede asegurar la presencia de hemoglobina en la muestra.⁽³⁵⁾

Pero tal vez se puedan presentar las dos posibilidades tomando en cuenta que la señal de la *Casiopeína IIIa* inalterada es muy pequeña, que puede estar interactuando con el organismo provocando la hematuria y con el hierro por la diimina presente en la molécula. Se debe considerar que la principal ruta de eliminación del cobre es por heces es decir vía hepatobiliar ⁽⁹⁾. Esto estaría relacionado con el monitoreo del cobre de la *casiopeína IIIa*, por absorción atómica, donde se encontró que se distribuye mayormente en hígado y riñón, ⁽³⁶⁾ cabe mencionar que es un método indirecto de cuantificación.

Tomando en cuenta lo anterior se pueden hacer observaciones para el mejoramiento de este análisis.

- Realizar un análisis de la orina obtenida para medir hemoglobina.
- Adecuar el método cromatográfico para poder observar un pico definido de $[\text{Fe}(\text{4,4dimetil} - 2,2\text{bipiridina})_3]^{2+}$ y así observar la presencia de este como metabolito.
- Desarrollar un método para la cuantificación de *Casiopeína IIIa* en heces y así saber la proporción de eliminación por esta vía.
- Además de adecuar el método de concentración para ampliar el intervalo de trabajo y disminuir el límite de cuantificación.

Capítulo 6

Conclusiones

6.1 Conclusiones.

- ❖ Se obtuvo un método cromatográfico que permitió una mayor sensibilidad en el análisis de Casiopeína IIIa.
- ❖ Se logró desarrollar y optimizar, un método de extracción para muestras de Casiopeína IIIa en orina, utilizando cartuchos aniónicos de fase sólida; que permitió obtener muestras más limpias facilitando su análisis por HPLC.
- ❖ Con lo anterior se amplió el intervalo de detección y cuantificación de Casiopeína IIIa en muestras urinarias.
- ❖ El método de extracción para Casiopeína IIIa en orina y su análisis por HPLC, es un método lineal, exacto, preciso, selectivo con un recobro reproducible y constante.
- ❖ El método fue adecuado para la aplicación en un ensayo preliminar con ratas macho; donde se observó que el método detecta más no permite la cuantificación de Casiopeína IIIa inalterada, ya que la concentración es menor al límite inferior de cuantificación Casiopeína IIIa en orina.

6.2 Perspectivas.

Las sugerencias para continuar con la evaluación de Casiopeina Illia en fluidos biológicos se presentan a continuación.

- ❖ Sobre el presente método: encontrar las condiciones adecuadas para la concentración de muestras y así poder ampliar el intervalo de análisis. Esto es disminuir el límite de detección y cuantificación.
- ❖ Por las características fisicoquímicas de la molécula podría cambiar el detector de UV a un detector electroquímico.
- ❖ Por la dificultad de mantener completa la molécula en las condiciones de análisis; se sugiere que se desarrollen métodos indirectos de cuantificación para Casiopeina Illia en cualquier matriz biológica. Como monitorear el cobre y utilizar técnicas analíticas adecuadas como absorción atómica.
- ❖ Adicionar al análisis muestras de heces fecales para observar y comparar el nivel de eliminación por esta vía.

ANEXO I

Dentro del desarrollo del método se realizaron pruebas extras para complementar la información sobre la estabilidad de la molécula ***casiopeina IIIia***; a continuación se presentan las características de las pruebas y su resultado.

1.1 Como se observaba antes del método de extracción.

Se presenta las siguientes figuras para justificar la necesidad del método de extracción.

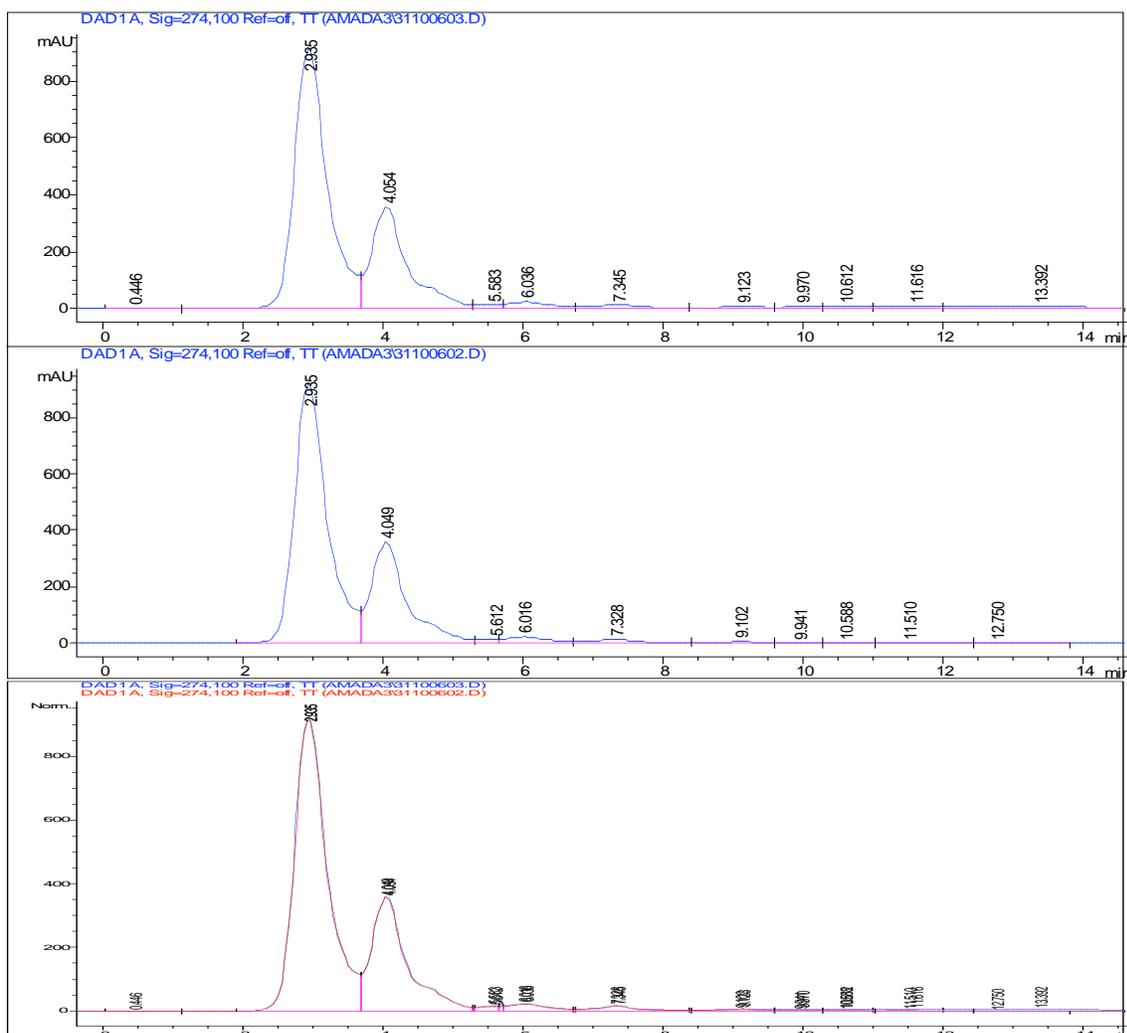


Figura 1 En la parte superior orina de rata hembra con cas IIIia en la parte media el blanco de orina de rata hembra. En la parte inferior Cromatogramas encimados de orina de rata hembra y orina con cas IIIia .Con fase móvil de MeOH/ solución amortiguadora de fosfatos pH=6.2 (40/60).

La figura 1 se observa que la casiopeína IIIia no presenta una señal clara ya que los compuestos endógenos de la orina presentan enormes picos que impiden observar la señal característica de la casiopeína IIIia

1.2 Pruebas de estabilidad a diferentes pH's.

Para el desarrollo del método cromatográfico se hicieron pruebas para observar el comportamiento de la casiopeína IIIia en diferentes valores de pH para encontrar las condiciones adecuadas para su análisis.

Tabla1. Resultados del análisis espectrofotométrico de casiopeína IIIia en diferentes valores de pH. La absorbancia de la longitud de onda de 207.6 nm pero no es adecuado para el análisis ya que en esa región absorben varios compuestos lo que impide una selectividad de las señales.

λ	agua	Abs pH=6.2	Abs pH=7	Abs pH=7.5	Abs pH= 8
296	0.671	0.436	0.448	0.428	0.549
274	0.231	0.169	0.181	0.193	0.228
270.6	0.178	0.156	0.165	0.183	0.197
207.6	1.398	1.129	1.108	1.088	1.022

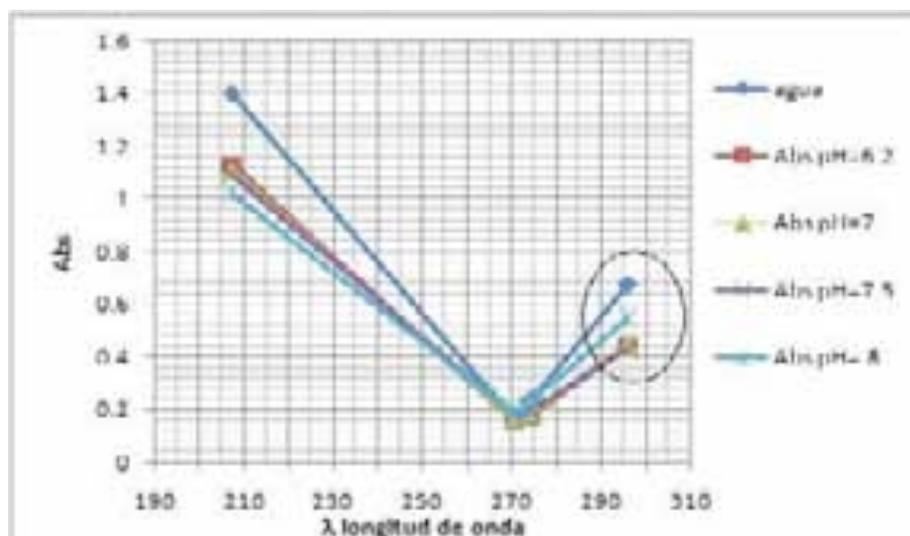


Figura 2 Gráfica donde se representa los resultados reportados en la tabla1.

Se observa que la casiopeína aunque en agua presenta mayor absorbancia se decide trabajar en pH=8 ya que el agua puede tener una variación de pH y complicar el análisis.

1.3 Pruebas de estabilidad

Se sometieron las soluciones de casiopeína IIIa **[40µg/mL]** a condiciones de estrés, de la siguiente manera:

Stock de casiopeína IIIa en agua [1000 µg/mL]

Pesar 0.0050 g de casiopeína IIIa transferirla cuantitativamente a un matraz aforado de 5 mL disolver con agua desionizada y aforar.

Solución Casiopeína IIIa [40µg/mL]

Tomar una alícuota cuantitativamente de 400µL del **Stock de casiopeína IIIa** transferirla a un matraz de 10 mL. Se siguen las condiciones de cada análisis.

- a) **Fotólisis:** Se expusieron 10 mL de 2 soluciones de Casiopeína IIIa [40µg/mL] a la luz UV durante 1 hr.
- b) **Hidrólisis ácida:** Se agrego a 2 soluciones de Casiopeína IIIa [40µg/mL], 1mL de HCl 1M antes de llevar a volumen de 10 mL con agua desionizada.
- c) **Hidrólisis básica:** Se agrego a 2 soluciones de Casiopeína IIIa [40µg/mL], 1mL de NaOH 1N antes de llevar a volumen de 10mL con agua desionizada.
- d) **Oxidación:** Se agrego a 2 soluciones de Casiopeína IIIa [40µg/mL], 1mL de H₂O₂ al 30% antes de llevar a volumen de 10mL con agua desionizada.

Para todos los tratamientos se inyecta 2 veces cada solución y se analiza al tiempo 0 y 1 día.

Aunque el método cromatográfico no es el mismo del presente trabajo se puede observar que la casiopeína no es estable a las condiciones de estrés, generando picos que no interfieren con la señal de la **Casiopeína IIIa**, pudiendo pensar que los posibles metabolitos generados por estas vías no interferirán a la señal característica de la casiopeína.

Fase estacionaria	Symetry C18 5 μ 4.6x 250mm.
Fase móvil	MeOH / Solución amortiguadora de fosfatos 0.01 M pH =7/ Hexansulfonato de sodio 0.005M (40/55/5)
Flujo	0.8 mL/min.
Longitud de onda	274 nm.
Volumen de inyección	50 μ L.
Tiempo de corrida	15 minutos.
Precolumna	Security guard Phenomenex C18, 50x 4.6 mm, 5 μ m.
Cromatógrafo	Cromatógrafo Agilent 1100 Inyector 1100 número de serie DE11116471. Detector 1100 número de serie DE11113489 Bomba 1100 número de serie DE11115898.

Tabla 1 Condiciones cromatográficas desarrolladas y optimizadas por Talina Uribe en el desarrollo de Tesis de licenciatura

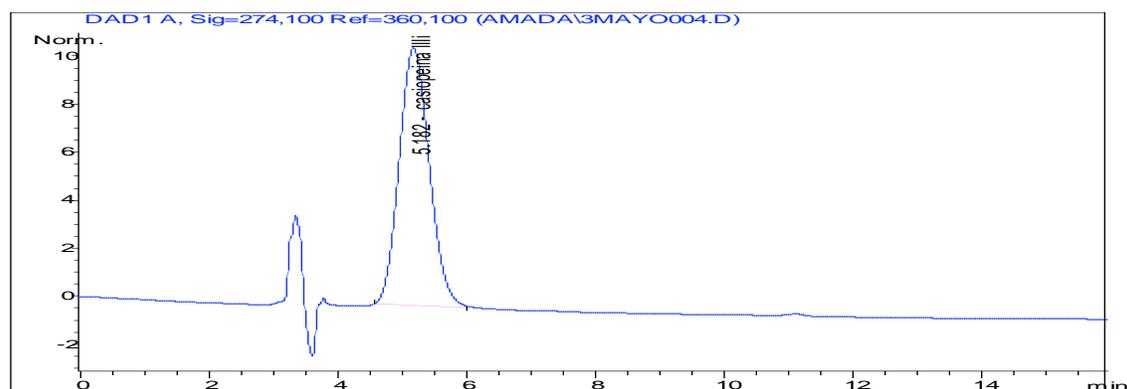


Figura.3 Cromatograma de Casiopeína IIIa (40 μ g/mL) en agua.

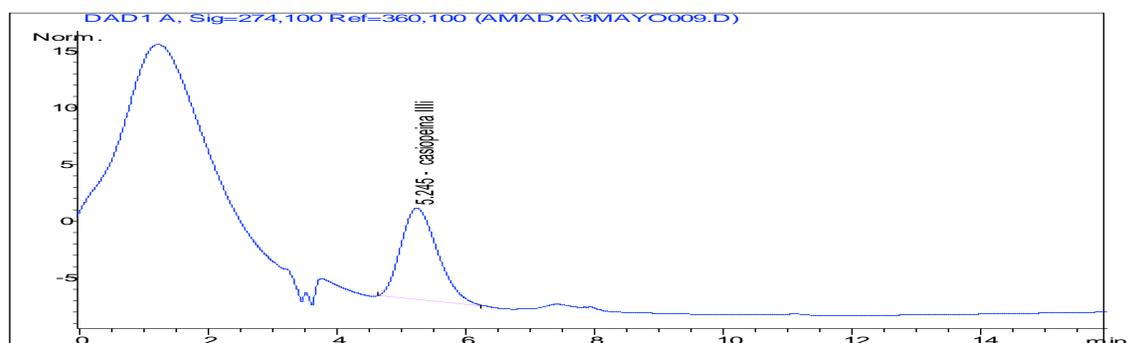


Figura 4. Cromatograma de Casiopeina IIIia (40 µg/mL) con HCl 1 M.

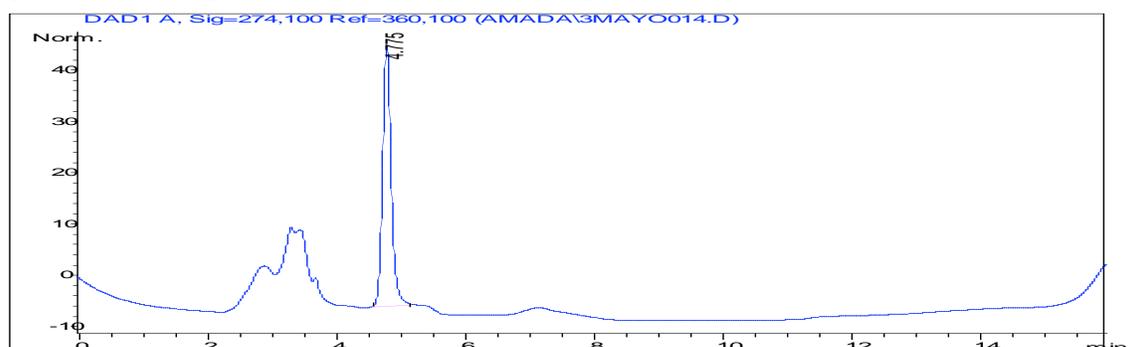


Figura 5. Cromatograma de Casiopeina IIIia (40 µg/mL) con NaOH 1 N.

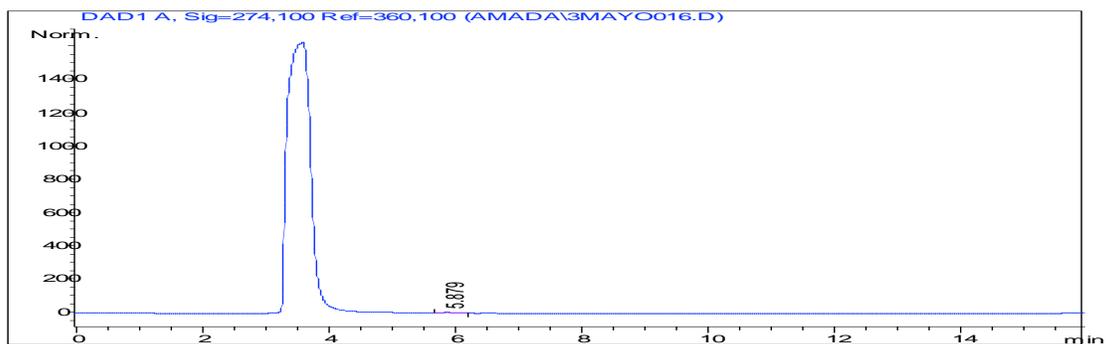


Figura 6. Cromatograma de casiopeina IIIia (40µg/mL) con H_2O_2 al 30%.

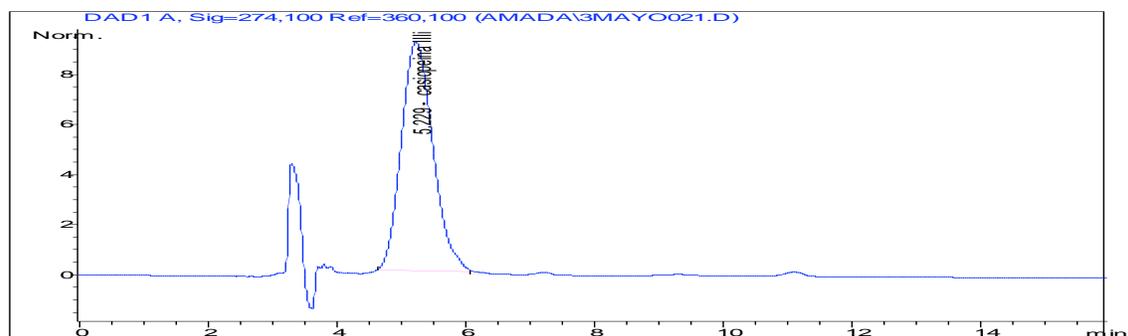


Figura 7 Cromatograma de Casiopeina III ia (40µg/mL) en agua expuesta a 1h con radiación UV.

Capítulo 7

Bibliografía

-
1. **Emilio John, Dan Luckabaugh.** *Manual de centro para la evaluación e investigación de fármacos (CDER)* . Centro para la evaluación e investigación de fármacos., Food and Drug Administration. feb.1998. <http://www.fda.gov/cder>.
 2. **Leon, Shargel.** *Applied Biopharmaceutics and Pharmacokinetics.* fourth Edition Appleton and Lange; Stanford Connecticut, 1999.
 3. *El cáncer ,epidemiología , etiología y prevención.* Madrid España : ediciones Hercort and Elsevier science imprint, 2002.
 4. **INEGI.** *Estadísticas demográficas 2005.* 2006.
 5. **Gilman, Goodman &.** *Las bases farmacológicas de la terapeutica.* novena. México : Mc Graw Hill Interamericana, 1996. Sección X . Vol. II.
 6. **Kendrick, Maureen.** *Metals in Biological System Ed.Ellis Horwood limited Great Britain 1992.*
 7. *Advances in Cancer Research at UNAM. Jaime mas-Oliva(2007)*
Researche on metal compounds with anticancer activity. Ed Manual Moderno P 295-307, **Lena Ruíz Azuara, Isabel Gracia Mora.**
 8. **Casas, J. Sergio.** *Química Bioinorgánica.* Editorial Síntesis. Madrid España 2002.
 9. **Agency for toxic substances and Disease registry (ATSDR),**
Toxicological profiles for cooper 2004 , Atlanta G: A. Us department of Health and Human services Public Health Source <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles> (julio 2007)
 10. **Stoeppler, RFM Herber and.** *Trace element analysis in Biological specimens.* [ed.] Elsevier. Neitherlands , 1994. Vol. 15 Techniques and instrumentation in analytical chemistry .

-
11. **Schewederski, Wolfgang Kavin and Brigthe.** *Bioinorgánica Chemistry Inorganic element in the Chemistry of life and introduction and guide.* [ed.] Inorganic Chemistry A textbook series by Wiley and sons. 1994. Chapter 10.
 12. *Excretion of copper complexed with thiomolybdate into the bile and blood in LEC rats.* **Komatsu, Yutaka.** 124, 2000, Chemical Biological Interaction, págs. 217-231.
 13. *Determinación del pKa y coeficiente de participación de la Casiopeína IIIa.* **A, Viveros Alpizar.** México : UNAM, 1998, Tercera Jornada de trabajo de Casiopeinas.
 14. *Estabilidad de la casiopeinas II y III en soluciones fisiológicamente compatibles.* **Romero C. Laura, Marques Q Adriana, Gracia Mora Isabel.** Mexico : UNAM, 1998, Tercera Jornada de trabajo Casiopeinas, págs. 4-7.
 15. *Isabel Gracia Mora, Lena Ruíz Azuara, celedonio Gómez, Mabel Tinoco Méndez, Adriana Márquez Quiñones, Laura Romero , Alvaro Marín Hernández; Lucía Macías Rosales, Ma. Elena Bravo Gómez. Knigth's Move in the Periodic Table, from Copper to Platinum, Novel antitumor mixed chelate copper compounds, Casiopeínas. Evaluated by an In vitro Human and murine cáncer cell line panel. Metal Based Drugs (2001) 8 No 1, 19-28. Artículo por invitación.*
 16. *Marín Hernández Alvaro, Gracia Mora Isabel, Ruíz Azuara Lena, Moreno Sánchez Rafael, Toxic effect of copper based antineoplastic drugs (Casiopeínas)* Biochemical Pharmacology, 65, (2003) 1979-1989.
 17. *Recombinogenic effects unduced by Casiopeina IIIa as detected by reverse mutations in SPD8 cells.* **M, De la Rosa Duque.** México : UNAM, 1998, Vol. Tercera Jornada de trabajo de Casiopeinas, págs. 37-39.

-
- 18. Quattrocchi Oscar Alberto, Abelaira Sara Inés, Laba Raúl Felipe.** *Introducción a la HPLC. Aplicación y práctica.* Buenos Aires : Artes Gráficas Farro, 1992.
- 19. Waters Corporation.** Pharmaceutical Applications Notebook. *Waters OASIS sample Extraction Products.* Massachusetts USA : Waters Corporation, 2000. 1.
- 20. Determinación of rutin in human plasma by high-performance liquid chromatography utilizing solid-phase extraction and ultraviolet detection. Ishii, Kazuo.** 759, 2001, Journal of chromatography B, pp. 161-168.
- 21. Determination of palladium in urine by high performance liquid chromatography and ultraviolet detection after ultraviolet photololysis and selective solid- phase extraction. Philippeit Gerde, Jürgen Angerer.** 2001, Journal of Chromatography B, Vol. 760, págs. 237-245.
- 22. Novel high-performance liquid chromatographic and solid-phase extraction methods for quantitating methadone and its metabolite in ppiked human urine, Young fong Cheng,** 1999, Journal of Chromatography B, Vol. 729, págs 19-31.
- 23. NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-177-SSA1-1998. QUE ESTABLECE LAS PUREBAS Y PROCEDIMIENTOS PARA DEMOSTRAR QUE UN MEDICAMENTO ES INTERCAMBIABLE. REQUISISTOS A QUE DEBEN SUJETARSE LOS TERCEROS AUTORIZADOS QUE REALICEN LAS PRUEBAS., Secretaria de Salud.** 7 de mayo de 1999, Diario oficial de la federación.
- 24. Development and validation of liquid chromatographic method for Casiopeína Illia in rat plasma. Inés Fuentes Noriega.** 772 (2002), Journal of Chromatography B , págs 115-121

-
25. *Oasis MAX General Information. Waters Oasis Sample Extraction Products.* 2000, Pharmaceutical Applications Notebook. Water, págs. vii-ix.
26. *Study of the solid-phase extraction of diclofenac sodium, indometacina y phenylbutazone for their analysis in human urine by liquid chromatography.* **A. Bakkali, E Corta, L.A. Berveta et al.** 729, 1999, Journal of Chromatography B, págs. 139-145.
27. *Determination of rutin in human plasma by high-performance liquid chromatography utilizing solid-phase extraction and ultraviolet detection.* **Kazuo Ishii, Takashi Furuta, Yasuji Kasuya.** 759, 2001, Journal of Chromatography B, págs. 161-168.
28. Desarrollo, optimización y validación de métodos analíticos para estudios de Bioequivalencia. *Procedimientos Normalizados de Operación.* s.l. : Lab. Biofarmacia Departamento de Farmacia; Facultad de Química. UNAM, 13 de JULIO de 2006. PNONo GEN-BIO-001. **M en C Lourdes Mayet. Unidad Analítica para estudios de Bioequivalencia.**
29. **Colegio Nacional de Químicos Farmaceuticos Biólogos A.C.,** *Guía de validación de métodos analíticos.* Edición 2002.
30. **Talina, Uribe.** Estudio de estabilidad de casiopeinas II gly y IIIa . Tesis de Licenciatura, Facultad de Química UNAM. **en proceso.**
31. **Ma. del Rocío Rendón de la Fuente.** Estudios de estabilidad en disolución acuosa a diferentes valores de pH de compuestos mixtos de Cu (II) , *Tesis de licenciatura.* Facultad de Química UNAM. 1993
32. **Estrella, Gómez Ramos Irma.** Optimización y validación de un método analítico para Casiopeína IIIa en orina por HPLC. *Tesis de Licenciatura.* Facultad de Química UNAM, 2003.

-
- 33. Alberto, Romero Ramírez.** Estudio preliminar de Farmacocinética de Casiopeína IIIa (Un nuevo anticancerígeno) en ratas, a partir del análisis de datos urinarios. *Tesis de Licenciatura.* Facultad de Química. UNAM , 2007.
- 34. Estudio de subproductos del metabolismo de casiopeínas in vivo. De la Rosa Ma Esther, Maycotte Paola et al.** s.l. : Facultad de Química UNAM, 18 y 19 de mayo de 1998, Memorias 3era Jornada de trabajo de casiopeínas, pág. 73.
- 35. Sánchez Reyes, Gladis Janeth.** Validación de un método analítico para la cuantificación de Casiopeína II gly en orina por CLAR para su aplicación en un estudio preclínico en ratas Facultad de Química UNAM, 2007.
- 36. Estudio de la distribución de casiopeínas II y III en ratón, por Absorción Atómica. Tenorio Miranda, Erika y Rendón Garrido, Elena** Tesis de Licenciatura, Facultad de Química. UNAM, 1998.
- 37. Fuentes Noriega Inés,** Farmacocinética preclínica de Casiopeína IIIa y su unión a proteínas plasmáticas. *Tesis de doctorado en Ciencias Químicas.* Facultad de Química UNAM, 2005.
- 38. Huheey James and col.** Química Inorgánica; Principios de estructura y reactividad. Ed. Oxford University Press -Alfaomega, 4ta edición, México 2005. Capítulo 13.
- 39. Miller, James N.,** Estadística y Quimiometría para Química Analítica; Ed. Prentice Hall, 4ta edición, España 2000, Cap. 5.