



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

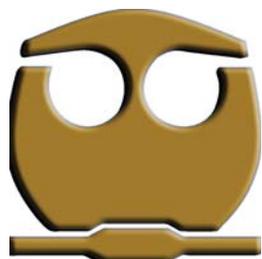
“ESTABILIDAD DE CASIOPEÍNA III-ia Y
CASIOPEÍNA II-gly A UNA TEMPERATURA”

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACEÚTICO BIÓLOGICO

PRESENTA

TALINA URIBE GUTIÉRREZ



MÉXICO D.F.

2011



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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:

PROFESORES:

PRESIDENTE	INES FUENTES NORIEGA
VOCAL	LAURO MISAEL DEL RIVERO RAMIREZ
SECRETARIO	FRANCISCO GARCIA OLIVARES
1er. SUPLENTE	LILIANA AGUILAR CONTRERAS
2o. SUPLENTE	LUIS JESUS GARCIA AGUIRRE

SITIÓ DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

DIVISIÓN DE ESTUDIO DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN CONJUNTO "E",
DEPARTAMENTO DE BIOFARMACIA, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.

NOMBRE Y FIRMA DEL ASESOR: Dra. INES FUENTES NORIEGA.....

NOMBRE Y FIRMA DEL SUSTENTANTE: TALINA URIBE GUTIÉRREZ.....





AGRADECIMENTOS

A mis padres Tomas Uribe Quintanar y Socorro Gutiérrez de Uribe por hacer suyas mis alegrías y mis tristezas, por ser mi motivo para lograr culminar mis estudios y mis metas.

A mis hermanos Miguel Ángel, Gabriel, Félix, Tomas David y Daniel por el apoyo y comprensión que me brindan siempre.

A la Dra. Inés Fuentes Noriega por brindarme sus conocimientos, su experiencia y su tiempo, ya que sin su ayuda no hubiera sido posible la realización de estos estudios.

A los proyectos PAPIIT IN 209609, PAPIME 6390-05 y CONACYT Sector Salud 7677 por la aportación económica para realizar estos estudios.





INDICE

CAPÍTULO 1 INTRODUCCION

Introducción.....	1
-------------------	---

CAPÍTULO 2 MARCO TEORICO

Generalidades.....	5
Casiopeínas.....	7
Casiopeína III-ia.....	9
Casiopeína II-gly.....	12
Efecto del Metabolismo sobre las Casiopeínas.....	14
Estudio de Estabilidad.....	15
Factores que intervienen en la Estabilidad de un producto farmacéutico.....	17
Generalidad de la Norma Oficial Mexicana NOM-073-SSA1-2005 Estabilidad de Fármacos y Medicamentos.....	19
Validación del método analítico.....	24



CAPÍTULO 3 HIPOTESIS

Hipótesis.....	28
----------------	----

CAPÍTULO 4 OBJETIVO

Objetivos.....	30
----------------	----

CAPÍTULO 5 PARTE EXPERIMENTAL

Método Analítico Para Cuantificar Casiopeína II-gly y Casiopeína III-ia para el estudio de Estabilidad.....	32
Material y reactivos.....	32
Método para cuantificar Casiopeína II-gly.....	35
Método para cuantificar Casiopeína III-ia.....	36
Linealidad del método para Casiopeína II-gly.....	37
Procedimiento.....	37
Linealidad del método para Casiopeína III-ia.....	40
Procedimiento.....	40
Estabilidad estrés para Casiopeína III-ia.....	44
Análisis de Casiopeína II-gly y Casiopeína III-ia sometida al estudio de estabilidad.....	46



CAPÍTULO 6 RESULTADOS

Resultados del método analítico para cuantificar Casiopeína II-gly.....	50
Resultados del método analítico para cuantificar Casiopeína III-ia.....	53
Resultados de Estabilidad Acelerada de Casiopeína II-gly.....	57
Resultados de Estabilidad Acelerada de Casiopeína III-ia.....	58
Resultados de Estabilidad en condiciones estrés de Casiopeína III-ia.....	59

CAPÍTULO 7 ANALISIS DE RESULTADOS

Análisis de Resultados.....	63
-----------------------------	----

CAPÍTULO 8 CONCLUSIONES

Conclusiones.....	66
-------------------	----

CAPÍTULO 9 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Referencias bibliográficas.....	68
---------------------------------	----





RESUMEN

En el desarrollo de una molécula nueva, se requiere realizar estudios de estabilidad centrados en el principio activo. Que incluye la estabilidad acelerada, estabilidad de stress y estabilidad a largo plazo, para esto se tienen que seleccionar los lotes, conocer las especificaciones, determinar la frecuencia de análisis y declaraciones en el etiquetado.

Las Casiopeínas son compuestos se ha desarrollado específicamente como un fármaco anticancerígeno que se encuentra en etapa preclínica: la Casiopeína II-Gly (Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina-glicina) $\text{NO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) actúa contra células Hela, células tipo Calo, murinas de leucemia L1210, es potencialmente citotóxica e induce apoptosis. La Casiopeína III-ia (Cu (4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina) (acetilacetato) $\text{NO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) tiene un alto potencial antineoplásico en líneas de carcinoma cérvico-uterino (SiHa y Hela). Por lo que se requiere conocer la estabilidad ya que sus propiedades fisicoquímicas pueden variar con el tiempo por la influencia de factores ambientales.

El objetivo de la estabilidad es, conocer la capacidad de un producto o materia prima, permanezca dentro de las especificaciones de calidad establecidas, en el envase que lo contienen durante su periodo de vida útil. Los requisitos de los estudios de estabilidad están cubiertos por: GMP, USP, FDA, Norma Oficial Mexicana NOM-073-SSA1-2005 Estabilidad de Fármacos y Medicamentos.





Para el estudio de Estabilidad Acelerada: Se utilizó muestra de Casiopeína III-ia y Casiopeína II-gly, se colocó en viales con tapa de rosca y se colocaron en la cámara climática a $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$ / $75 \pm 5\%$ HR con un total de 10 muestras para cada compuesto. Se analizaron 2 muestras por cada tiempo indicado en la norma (NOM-073-SSA1-2005). Se preparó una curva de calibración y se aplicó el método descrito en la tesis de licenciatura de Fernando Rosas Martínez (Título: Evaluación fisicoquímica de nuevos compuestos con actividad antineoplásica Casiopeína III-ia y Casiopeína II-gly. Año 2004). Para poder cuantificar cada uno de los compuestos.

Los resultados obtenidos demuestran que la valoración de los compuestos va disminuyendo, por lo tanto se demostró que si se puede evaluar a cada uno de los compuestos en el estudio de estabilidad acelerada.

CAPITULO 1

INTRODUCCIÓN

El principal propósito de un estudio de estabilidad es tener un programa de garantía de calidad con sistemas y procedimientos que brinden una alta probabilidad de que cada dosis o envase de un producto farmacéutico, tenga características y propiedades homogéneas dentro de los límites aceptables, para asegurar la eficacia clínica de la formulación. Los requisitos de los estudios de estabilidad están cubiertos por: GMP, USP, FDA, Norma Oficial Mexicana NOM-073-SSA1-2005 Estabilidad de Fármacos y Medicamentos.

Por lo que el estudio de estabilidad se centra en las siguientes condiciones:
Estabilidad Acelerada a $40 \pm 2^{\circ}\text{C} / 75 \pm 5\% \text{ HR}$ por 6 meses.

Para las Casiopeínas (Materia prima) que son compuestos de coordinación sintetizados a partir de una base orgánica y un metal, con propiedades anticancerígenas y citotóxicas, la familia de Casiopeínas contiene cobre (II) como metal y en la esfera de coordinación tienen dos ligantes bidentados, un de ellos es una diimina (N-N) y el otro puede ser un aminoacidato (N-O) o donador (O-O), cuya fórmula general es $\{\text{Cu}(\text{N-N})(\text{O-N})\} \text{NO}_3$ ó $\{\text{Cu}(\text{N-N})(\text{O-O})\} \text{NO}_3$. La Casiopeína II-Gly ($\text{Cu}(4,7\text{-dimetil-1,10-fenantrolina-glicina})\text{NO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) se ha desarrollado específicamente como un fármaco anticancerígeno que actúa contra células Hela, células tipo calo, murinas de leucemia L1210, contra los tipos de cáncer s180, B16 y LW1; es potencialmente citotóxica e induce apoptosis. La Casiopeína III-ia ($\text{Cu}(4,4'\text{-dimetil-2,2'-bipiridina})(\text{acetilacetonato})\text{NO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) se

encuentra en etapa preclínica con alto potencial antineoplásico en líneas de carcinoma cérvico-uterino (SiHa y Hela). Por lo que se determinó la estabilidad de los compuestos de Casiopeína III-ia y II-gly, como se indica en la NOM-073-SSA1-2005.

Para el estudio de Estabilidad Acelerada: Se colocaron aproximadamente 25 mg de muestra por separado de Casiopeína III-ia y Casiopeína II-gly en viales con tapa de rosca, se identificaron y se colocaron en la cámara climática a $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$ / $75 \pm 5\%$ HR con un total de 10 muestras para cada compuesto. Se analizaron 2 muestras por cada tiempo indicado en la norma (NOM-073-SSA1-2005). Se preparó una curva de calibración y se aplicó el método descrito en la tesis de licenciatura de Fernando Rosas Martínez (Título: Evaluación fisicoquímica de nuevos compuestos con actividad antineoplásica Casiopeína III-ia y Casiopeína II-gly. Año 2004). Para poder determinar la valoración de Casiopeína III-ia y Casiopeína II-gly en el estudio de estabilidad acelerada a $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$ / $75 \pm 5\%$ HR por seis meses.

CAPITULO 2

MARCO TEORICO

1.- Generalidades.

En la actualidad el cáncer o neoplasia maligna, constituye un grupo de enfermedades relacionadas que pueden ocurrir en cualquier tejido corporal y que se caracteriza por una multiplicación desordenada de células anormales que son susceptibles a las señales de control de las demás células normales del organismo. Actualmente no se conoce la causa de este desarrollo maligno; sin embargo se han propuesto diversos factores que solos o en combinación, pudieran iniciar dicho proceso (1). Por ejemplo desechos industriales, la radiación, la exposición a algunas sustancias potencialmente carcinogénicas que puedan estar presentes en contaminantes ambientales, la dieta, la posible predisposición genética y el proceso de envejecimiento (2).

La razón por la que no se ha podido encontrar una línea terapéutica general y eficaz contra el cáncer radica en la naturaleza de la enfermedad y su forma de presentación. El organismo puede detectar por medio del sistema inmune agentes extraños como bacterias, virus o parásitos. Sin embargo estos mecanismos de vigilancia no siempre pueden reconocer células propias que han sufrido transformaciones malignas (1).

El cáncer constituye hoy día un problema de salud pública no solo en México, sino en todo el mundo que exige cada vez más estructuras hospitalarias más complejas, tecnologías de diagnóstico avanzadas y tratamientos cuyos costos sean menos oneroso (1). Entre los esfuerzos desarrollados para encontrar tratamientos útiles contra el cáncer se cuenta con la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia, y en un buen número de casos la combinación de éstos.

Hace aproximadamente 500 años ya existía el concepto del tratamiento del cáncer con fármacos (6), se sabe que con este propósito se emplean preparaciones de plata, zinc o mercurio. Sin embargo, se documentó hasta 1865 el uso de tratamiento sistemático en neoplasias malignas cuando Lissauer (7) administró arseniato de potasio a pacientes con leucemia y observo efectos positivos; pese a estos antecedentes, la quimioterapia del cáncer como tal, se sistematizó 80 años después. Actualmente, existen numerosos fármacos disponibles que en su mayoría son compuestos orgánicos y solo unos pocos de origen inorgánico.

En 1975, la Dra Ruiz-Ramírez, de la división de estudios de posgrado de la facultad de química de la UNAM, concibió la idea de diseñar compuestos de coordinación con posible actividad antineoplásica, como el cisplatino y al carboplatino. Conocidos como Casiopeínas, son compuestos de coordinación sintetizados a partir de una base orgánica y un metal, con propiedades anticancerígenas y

citotóxicas, la familia de Casiopeínas contiene cobre (II) como metal y en la esfera de coordinación tienen dos ligantes bidentados, uno de ellos es una diimina (N-N) y el otro puede ser un aminoacidato (N-O) o donador (O-O), cuya fórmula general es $\{Cu(N-N)(O-N)\} NO_3$ o $\{Cu(N-N)(O-O)\} NO_3$.

2.- Casiopeínas.

En México la necesidad de importación de productos antineoplásicos y su elevado costo, hacen que el desarrollo de estos adquieran prioridad. Todo lo anterior ha llevado al desarrollo de fármacos a base de cobre, las Casiopeínas, nuevos compuestos de coordinación con potencial antineoplásico. Se ha demostrado que las Casiopeínas inhiben el crecimiento celular in Vitro en células tumorales humanas Hela y Calo, mostrando una curva dosis respuesta similar a la Mitomicina C y al Cisplatino. Además la dosis letal 50 y los estudios de toxicología indican que las Casiopeínas son menos toxicas. (2)

El diseño de los compuestos se realizó considerando varios parámetros como son: El metal, su estado de oxidación y el número de coordinación del mismo, con respecto a los quelantes se consideró su capacidad quelante y el grado de hidrofobicidad e hidrofiliidad de los mismos.

Para que un compuesto de coordinación tenga actividad antineoplásica se debe cumplir con los siguientes postulados:

- En las reacciones con moléculas biológicas intercambiar rápidamente solo algunos de sus ligantes.
- Los complejos deben ser eléctricamente neutros, aunque la forma activa puede estar cargada después de intercambiar algún ligante en la especie viva.
- Son necesarios dos ligantes cis monodentados o uno bidentado como grupos salientes. Los isómeros trans son inactivos.
- Las velocidades de intercambio de estos ligantes le dan intervalos específicos de labilidad a cada compuesto.
- Los ligantes no intercambiables en las moléculas deben estar fuertemente enlazados.

Las Casiopeínas han sido identificadas plenamente por IR, RPE, Rayos X y se encuentran patentadas (9). Las Casiopeínas se encuentran clasificadas en nueve familias de acuerdo a sus sustituyentes y estructura, de los más de 100 compuestos sintetizados de las familias de Casiopeínas. Actualmente las Casiopeína II-gly y Casiopeína III-ia han demostrado tener actividad antineoplásica in vivo (2) en los ensayos exigidos dentro del panel de cernimiento sugerido por el Cáncer Chemotherapy National Service Center del Instituto Nacional de Cancerología de los Estados Unidos y que contemplan el uso de líneas tumorales murinas transportables en cepas singénicas de ratón.

3.- Casiopeína III-ia.

La Casiopeína III-ia (Cu (4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina)(acetilacetonato) $\text{NO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) se muestra en la figura 1, la cual presenta un ligante bidentado donador de oxígeno y un ligante bidentado donador de nitrógeno, tiene una geometría cuadrado plana. Se encuentra en etapa preclínica con alto potencial antineoplásico en líneas de carcinoma cérvico-uterino Hela (Células de adenocarcinoma de cervix) y SiHa (carcinoma de células escamosas, de cerviz).

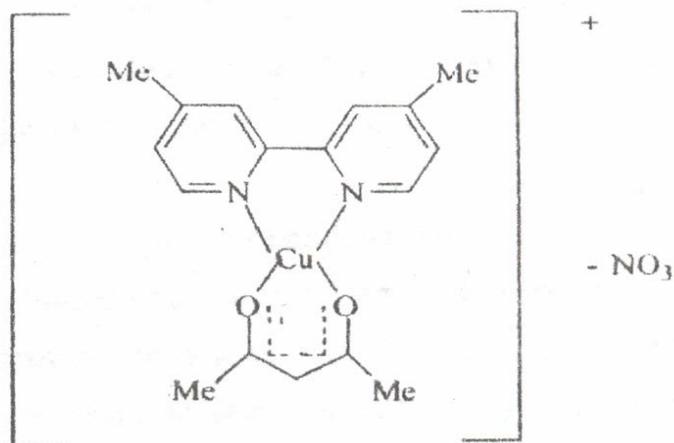


Figura.1 Estructura de la Casiopeína III-ia (Cu (4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina)(acetilacetonato) $\text{NO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)

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

1. La dosis letal 50 en ratón es de 14.6 mg/Kg por vía intraperitoneal. (25)
2. Su longitud de onda máxima de absorción es de 296.2 nm (25)
3. pKa es de 8.25. (25)
4. Peso Molecular es de 426.92 g/mol
5. No se une a proteínas plasmáticas. (24)
6. En plasma a temperatura ambiente es estable por 12 horas
7. En plasma en refrigeración es estable por 72 horas.
8. En solución salina en refrigeración es estable por 9 días.
9. En solución de dextrosa en refrigeración es estable por 4 días.
10. En solución de Harman en refrigeración es estable por 3 semanas.
11. Farmacocinética en conejos por vía de administración infusión intravenosa
(Modelo de un compartimiento MAUC).(25)
12. ABC: 25828.2 mg min/mL.
13. Ke es de 0.016 min⁻¹.
14. TMR es de 66.95 minutos.
15. Farmacocinética en ratas por vía de administración infusión intravenosa
(Modelo de un compartimiento MAUC).(25)
16. ABC: 11074.79 mg min/mL.
17. Ke es de 0.014 min⁻¹.

La toxicidad está regida aparentemente por el donador de N-N y los compuestos que poseen acetilacetato como segundo ligante, interaccionan por el DNA lineal (8).

Es muy soluble en agua así como en metanol. También es soluble en soluciones fisiológicamente compatibles: Cloruro de Sodio al 0.9%, Dextrosa al 5%. Su coeficiente de partición es de 0.01364.

Es notablemente activa contra leucemia linfocítica L1210 (14), lo cual dio la pauta para evaluar su actividad empleando la leucemia viral felina. Se observó que la Casiopeína III-ia es capaz de revertir a números normales todos los parámetros sanguíneos de la fórmula blanca (10). Hay evidencia que esta Casiopeína III-ia actúa como inhibidor de la fosforilización oxidativa (12), cuando se realizan estudios en mitocondrias de hígado de ratas. Se ha demostrado que tiene propiedades citostáticas y antineoplásicas en modelos tumorales murinos. En la línea celular SPD8 demostró ser un agente altamente recombinogénico, por lo cual su mecanismo de acción puede ser por inhibición de las topoisomerasas I y topoisomerasas II, induciendo acción recombinogénica débil en *Drosophila*.

4.- Casiopeína II-gly.

La Casiopeína II-gly ($\text{Cu}(4,7\text{-dimetil-1,10-fenantrolina-glicina})\text{NO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) ha mostrado actividad antineoplásica y una toxicidad menor que el cis-platino, hacia las células sanas. Se ha desarrollado específicamente como un fármaco anticancerígeno que actúa contra células Hela, células tipo Calo, murinas de leucemia L1210, contra los tipos de cáncer S180, B16 y LW1 y es potencialmente citotóxica e induce apoptosis.

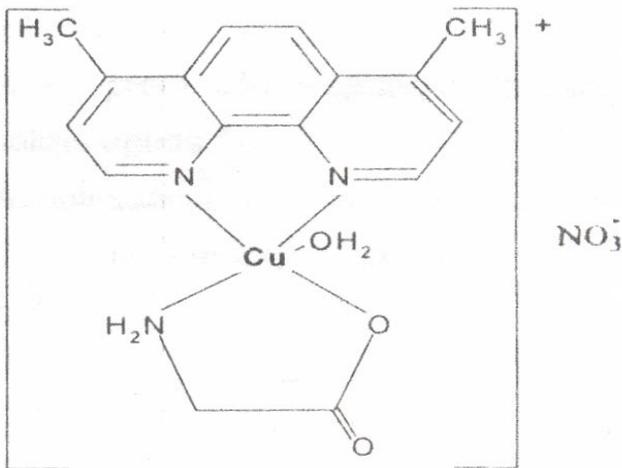


Figura.2 Estructura de la Casiopeína II-gly ($\text{Cu}(4,7\text{-dimetil-1,10-fenantrolina-glicina})\text{NO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$).

Lo que actualmente se sabe acerca de la Casiopeína II-gly es:

1. Soluble en agua, etanol y metanol.
2. Peso molecular es de 423.5 g/mol. (25)
3. pKa es de 5.4 (25)
4. Se une altamente a proteínas plasmáticas (24)
5. Estable en soluciones fisiológicas.
6. Por ser una molécula plana interacciona con el ADN.
7. La Dosis letal 50 por administración intraperitoneal en ratones es de 16.7mg/Kg. (25)
8. El efecto más serio in vivo de las Casiopeína II-gly es la hemólisis de glóbulos rojos, la cual se debe a la toxicidad del cobre.

La Casiopeína II-gly reduce la expresión de metalotioneina, la cual es uno de los medios conocidos usados por las células cancerosas resistentes para eliminar a los fármacos anticancerígenos basados en metales. También se une al ADN y aunque esto no es único, lo novedoso de su actividad puede deberse a que reacciona con agentes reductores y rompe la molécula de doble hélice en lugar de inhibir la replicación por cambios estructurales sobre la molécula de ADN o aumentando la reparación del ADN.(6,7,32,33).El mayor efecto adverso in vivo producido después

del tratamiento con Casiopeína II-Gly (dosis de 5 mg/Kg) es la hemólisis aguda. (5)
Los eritrocitos son células muy susceptibles al ataque del cobre debido a su contenido de oxígeno y la oxidación de la hemoglobina, los que pueden beneficiar a la lipoperoxidación y la hemólisis. (5)

5.- Efecto del metabolismo sobre las Casiopeínas.

Existen evidencias de que las Casiopeínas son activadas por las enzimas del metabolismo. Se ha descrito que los metales de transición y algunos de sus complejos son tóxicos en diferentes organismos, y dicha toxicidad se debe a los iones metálicos, especialmente a los iones de Hierro y Cobre, a su potencia para participar en reacciones de Fenton., a la oxidación de ácidos grasos en las membranas celulares y a la oxidación de los grupos (-SH) a disulfuro (S-S).

Algunas Casiopeínas han mostrado generar especies reactivas de oxígeno (ERO), además los compuestos de cobre están relacionados con la reacción de Fenton en la cual se genera el radical hidroxilo. (6)

6.- Estudio de Estabilidad.

El objetivo de los estudios de estabilidad es proporcionar evidencia documentada de cómo la calidad de un fármaco o un medicamento que varía con el tiempo, bajo la influencia de factores ambientales (temperatura, humedad o luz)

En todo el mundo se aceptan ahora el uso de estudios cinéticos y predictivos para establecer fechas confiables de vencimiento de los productos farmacéuticos. Los estudios son diseñados con rigor, confiables, significativos y específicos, utilizando conceptos estadísticos apropiados para analizar los datos obtenidos. De esta forma obtenemos la máxima cantidad de información válida para establecer una fecha de vencimiento confiable y defendible para cada formulación.

La estabilidad de un fármaco se puede definir como el tiempo desde la fecha de fabricación y envasado de la fórmula, hasta que su actividad química o biológica, no es menor que un nivel predeterminado de potencia rotulada y sus características físicas no han cambiado en forma apreciable.

La fecha de vencimiento se define como el tiempo en el cual el principio activo se mantendrá estable cuando se almacene bajo condiciones recomendadas. Una fecha de vencimiento se expresa tradicionalmente en términos de mes y año.

La fecha de vencimiento debe aparecer en el envase que contiene el producto y en la cubierta exterior de protección. Sin embargo, cuando se envasan recipientes de dosis única en cajas individuales de cartón. La fecha de vencimiento puede colocarse en la caja y no directamente en el envase del producto. Si un producto seco se debe reconstituir en el momento de dispensarlo, se asignan fechas de vencimiento tanto a la mezcla seca como al producto reconstituido.

Los requisitos de los estudios de estabilidad y la fecha de vencimiento están establecidos en las buenas prácticas de fabricación actuales, Current Good Manufacturing Practices (GMP), la Farmacopea de los Estados Unidos (USP) y la Food and Drug Administration (FDA), Norma Oficial Mexicana NOM-073-SSA1-2005. (15, 17, 19)

7.- Factores que intervienen en la estabilidad de un producto farmacéutico.

Muchos factores afectan la estabilidad de un producto farmacéutico como son: la estabilidad de los principios activos, la interacción potencial entre principio activo y excipientes, el proceso de fabricación de la forma farmacéutica, el sistema de envase-revestimiento-cierre y las condiciones ambientales halladas durante transporte, almacenamiento, manipulación y tiempo transcurrido entre la fabricación y el uso.

Clásicamente, las evaluaciones de estabilidad de los productos farmacéuticos han sido separadas en los estudios de estabilidad química y de estabilidad física de las formulaciones. El conocimiento de la estabilidad física de una formulación es muy importante por tres razones principales:

1. Un producto farmacéutico puede parecer fresco, elegante y profesional mientras se mantenga en el estante, pero cualquier cambio en el aspecto físico, pueden hacer que el paciente o el consumidor pierdan confianza en el producto.
2. Como algunos productos se venden en envases de dosis múltiple, debe asegurarse la uniformidad de contenido del principio activo con el tiempo ya que una solución turbia o una emulsión rota pueden conducir a un patrón no uniforme de dosificación.

3. El principio activo debe estar disponible para el paciente durante el almacenamiento del producto. Una ruptura en el sistema físico puede llevar a que el medicamento no esté disponible para el paciente.

Las causas químicas de deterioro de los fármacos han sido clasificadas en: oxidación, reducción, racemización, formación de precipitados, descarboxilaciones, reacciones fotoquímicas, hidrólisis, etc. (15, 19)

8.- Generalidades de la Norma Oficial Mexicana NOM-073-SSA1-2005, Estabilidad de Fármacos y Medicamentos.

Esta norma tiene como objeto establecer los requisitos para llevar a cabo y reportar los estudios de estabilidad de medicamentos para proveer evidencia documentada de cómo las características físicas, química, fisicoquímicas, microbiológicas y biológicas del medicamento, varía con el tiempo bajo la influencia de factores ambientales tales como: la temperatura, humedad y luz y así establecer las condiciones adecuadas y el periodo de caducidad. (17)

Condiciones de almacenamiento particulares: son las condiciones específicas y diferentes a las condiciones normales de almacenamiento, los cuales se indican en el marbete del medicamento. (17)

Condiciones de almacenamiento normales: la conservación de medicamentos en locales secos y bien ventilados y a temperatura ambiente protegidos de la luz y otras formas de contaminación. (17)

Condiciones específicas:

Estudio de estabilidad: Prueba que se efectúa a un producto por un tiempo determinado, bajo la influencia de temperatura, humedad o luz en el envase que lo contiene. (17)

Estudios de estabilidad acelerada: Estudio diseñado bajo condiciones exageradas de almacenamiento ($40 \pm 2^\circ\text{C}$), para incrementar la velocidad de degradación química, biológica o los cambios físicos de un producto, se emplean para un registro de medicamento. (17)

Estudio de estabilidad a largo plazo: Estudio diseñado bajo condiciones de almacenamiento controladas para evaluar las características físicas, químicas, biológicas microbiológicas del producto durante el periodo de reanálisis o de caducidad, respectivamente, se debe llevar a cabo en tres lotes piloto de producción a $30 \pm 2^\circ\text{C}$ o a las condiciones particulares, por un periodo mínimo, igual al periodo de caducidad tentativo, para confirmarlo, analizar cada tres meses durante el primer año, cada seis meses durante el segundo año y después anualmente.(17)

Estudio de anaquel: El número de lotes que se debe analizar anualmente. (17)

Estabilidad de estrés: Nos ayuda a identificar productos de degradación, puede ayudarnos a establecer la ruta de la degradación y verificar la estabilidad intrínseca de las moléculas y verificar los indicativos de estabilidad planteados. Para someter un fármaco nuevo a un estudio de estabilidad se tienen que: Seleccionar los lotes, al menos tres lotes piloto del fármaco fabricado por la misma ruta de síntesis y aplicando el método de manufactura que simule el proceso que será usado en la manufactura de los lotes de producción. Parámetros a evaluar y metodología analítica.

El protocolo del estudio debe incluir los parámetros o especificaciones de estabilidad que son susceptibles de cambiar durante el estudio y que pueden influir en su calidad, seguridad o eficacia. Las pruebas deben cubrir en su caso parámetros físicos, químicos, biológicos o microbiológicos. Se deben aplicar métodos analíticos indicativos de estabilidad validados. (17)

Condiciones del estudio. Las condiciones del estudio y duración debe ser suficiente para cubrir el almacenamiento, distribución y uso del fármaco; aplicar los cuadros siguientes:

Caso general:

Tipo de estudio	Condiciones de Almacenamiento	Periodo Mínimo	Frecuencia de Análisis
Estabilidad acelerada	$40 \pm 2^{\circ}\text{C} / 75 \pm 5\% \text{HR}$	6 meses	0, 3 y 6 meses
Estabilidad intermedia	$30 \pm 2^{\circ}\text{C} / 65 \pm 5\% \text{HR}$	6 meses	0, 3 y 6 meses
Estabilidad a largo plazo	$25 \pm 2^{\circ}\text{C} / 60 \pm 5\% \text{HR}$ $30 \pm 2^{\circ}\text{C} / 65 \pm 5\% \text{HR}$ $30 \pm 2^{\circ}\text{C} / 75 \pm 5\% \text{HR}$	12 meses	0, 3, 6, 9 y 12 meses
Estabilidad anual	$25 \pm 2^{\circ}\text{C} / 60 \pm 5\% \text{HR}$ $30 \pm 2^{\circ}\text{C} / 65 \pm 5\% \text{HR}$ $30 \pm 2^{\circ}\text{C} / 75 \pm 5\% \text{HR}$	12 meses	24 meses (cada año)
Estabilidad acelerada	$25 \pm 2^{\circ}\text{C} / 60 \pm 5\% \text{HR}$	6 meses	0, 3 y 6 meses
Estabilidad a largo plazo	$5 \pm 3^{\circ}\text{C}$	12 meses	0, 3, 6, 9 y 12 meses
Estabilidad a largo plazo	$-20 \pm 5^{\circ}\text{C}$	12 meses	0, 3, 6, 9 y 12 meses

Todos los análisis que se lleven a cabo durante el estudio de estabilidad de cualquier medicamento, debe hacerse por duplicado y reportarse con métodos indicativos de estabilidad. (17)

Método analítico indicativo de estabilidad: Método analítico cuantitativo basado en las características químicas estructurales o en las propiedades biológicas de cada fármaco de un medicamento, capaz de distinguir cada ingrediente activo de otras sustancias y de sus productos de degradación, de manera que el fármaco pueda ser cuantificado con exactitud y precisión. (17)

Fármaco: Toda sustancia natural, sintética o biotecnológica que tenga alguna actividad farmacológica y que se identifique por sus propiedades físicas, químicas o acciones biológicas, que no se presenta en forma farmacéutica y que reúna condiciones para ser empleada como medicamento o ingrediente de un medicamento. (17)

Fármaco conocido: Al fármaco que ha sido utilizado previamente en el país. (17)

Fármaco nuevo: Al fármaco que no ha sido utilizado previamente en el país. (17)

Protocolo de estabilidad. Conjunto de indicaciones relativas al manejo de las muestras, a las pruebas, métodos analíticos y condiciones del estudio de estabilidad (tiempo, temperaturas, humedad, luz, frecuencia de los análisis). (17)

Fecha de caducidad: Fecha en la que un fármaco a un activo se analiza para asegurar que sigue siendo adecuado para su uso. (17)

Fecha de reanálisis: Fecha en la que un fármaco o un aditivo se analiza para asegurar que sigue siendo adecuado para su uso. (17)

Lote: A la cantidad de un fármaco o medicamento que se produce en un ciclo de fabricación y cuya característica esencial es su homogeneidad. (17)

Lote Piloto: Lote elaborado por un procedimiento representativo que simule al de producción. (17)

Lote de producción: Lote destinado para comercialización. (17)

Vida útil: Es el intervalo de tiempo en el que un producto permanece dentro de las especificaciones establecidas, bajo las condiciones de almacenamiento indicadas en la etiqueta, en el envase de comercialización. (17)

Zona climática: Área geográfica clasificada por sus condiciones climáticas que prevalecen anualmente. (17)

Protocolo de estabilidad: Diseño del estudio relativo a pruebas y criterios de aceptación, características del lote, manejo de las muestras, condiciones del estudio, métodos analíticos y materiales de envases. (16, 17, 18)

Validación: Evidencia documentada que demuestra que a través de un proceso específico se obtiene un producto que cumple consistentemente con las especificaciones y los atributos de calidad establecidos. (17)

9.- Validación del Método Analítico.

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

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

1. **Especificidad.**- Es la capacidad que tiene un método analítico para que la respuesta obtenida proceda únicamente del fármaco de interés y no de otros componentes que estén presentes en la muestra de estudio como producto de degradación, se realiza de acuerdo a la aplicación que vaya a tener el método analítico. (17)
2. **Linealidad.**- Es la capacidad que tiene un método analítico para asegurar que los resultados analíticos obtenidos directamente, o bien mediante una transformación matemática bien definida, son proporcionales a la concentración de la sustancia de interés dentro de un intervalo. (17)

3. **Precisión.**- Es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales, cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea. (17)
4. **Repetibilidad.**- Es el grado de concordancia de los resultados analíticos obtenidos dentro de una serie de mediciones efectuadas en una misma muestra homogénea realizada por un solo analista, usando los mismos instrumentos. (17)
5. **Reproducibilidad.**- Es la concordancia entre los resultados individuales obtenidos con el mismo método y material de prueba, bajo diferentes condiciones de operación (analista, laboratorio). (17)
6. **Exactitud.**- Es la concordancia que existe entre un valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia. (17)
7. **Límite de Cuantificación.**- Es la mínima concentración en la cual el método analítico es lo suficientemente preciso y exacto para dar un estimado satisfactorio de una muestra de concentración desconocida. (17)
8. **Límite de Detección.**- Concentración mínima del analito en una muestra, que puede ser detectada, sin confundirse con el ruido del sistema. (17)

9. **Tolerancia.**- Es la capacidad del método analítico para obtener resultados precisos y exactos ante variaciones pequeñas pero deliberadas, en sus parámetros y condiciones de trabajo, indicando confiabilidad durante su uso normal. (17)

CAPITULO 3

HIPÓTESIS

Hipótesis

La Casiopeína III-ia y la Casiopeína II-gly como fármacos son estables a las condiciones de $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$ / $75 \pm 5\%$ HR por seis meses.

CAPITULO 4

OBJETIVO

Objetivos

1. Cuantificar Casiopeína III-ia y Casiopeína II-gly aplicando la metodología analítica por HPLC.
2. Determinar la estabilidad de los compuestos de Casiopeína III-ia y Casiopeína II-gly a 40 ± 2 °C / $75 \pm 5\%$ HR por seis meses.

CAPITULO 5

PARTE EXPERIMENTAL

5.- Método Analítico Para Cuantificar Casiopeína II-gly y Casiopeína III-ia para el Estudio De Estabilidad.

Para el análisis de la materia prima se aplicó el método analítico descrito en la Tesis de licenciatura de Fernando Rosas Martínez (Titulo: Evaluación fisicoquímica de nuevos compuestos con actividad antineoplásica Casiopeína III-ia y Casiopeína II-gly, Año 2004).

5.1.- Material y Reactivos.

1. Materia prima.

- Casiopeína II-gly, lote 170MBG030305, MM=443.90 g/mol, sintetizada en la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, Departamento de Química Inorgánica. (Manejar la materia prima con un cuidado especial ya que es toxico, evitar el contacto directo con la piel).
- Casiopeína III-ia, lote 173MBG030305, MM=444.93 g/mol, sintetizada en la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, Departamento de Química Inorgánica. (Manejar la materia prima con un cuidado especial ya que es toxico, evitar el contacto directo con la piel).
- Descripción de la muestra: polvo fino de color azul.

2. Estándares internos.

- Ketorolaco de Trometamina, Roche Sintex S. A. de C.V, pureza 100.2%.
- Furosemida, pureza 99.4%.

3. Reactivos.

- Metanol grado HPLC, Tecnolab.
- Agua desionizada grado millipore, 18 mega oms-cm.
- Acetonitrilo.
- Acido fosfórico.
- Solución reguladora de fosfatos pH=7.
- Hexansulfonato de sodio grado HPLC.
- Fosfato monobásico de sodio, Baker.
- Fosfato dibásico sodio, Baker.
- Ácido Clorhídrico 1M.
- Hidróxido de Sodio 1N.
- Peroxido de hidrógeno al 30%.

4. Equipo: Cromatógrafo de líquidos de alta resolución Shimadzu.
- Auto inyector modelo: SIL 10AD-VP, Loop de 50µL, Cat. No. 228-39005-92, No de serie C2105360009US.
 - Bomba isocrática modelo: LC 10AD-VP, Cat. No. 228-39000-92, No de serie C2096365042US.
 - Detector UV-VIS modelo: SPD 10 A-VP, Cat. No. 228-393000-92, No de serie C21013650227US.
 - Balanza analítica Sartorius, modelo: A210P, No de serie 40040065.
 - Desionizador Milli-Q Water System, Millipore No 01395-C, Millipore Corporation.
 - Sistema controlador modelo: SCL 10 A-VP, Cat. No 228-34350-92, No de serie C21013650227US.
 - Vortex Maxi Mix II, Thermolyne, modelo: M37615, No de serie 871990647059.
 - Potenciometro digital.
5. Software.
- Shimadzu Class-VP, version 5.2, Chromatography Laboratory Automated Software System, Shimadzu Corporation.

5.2.- Método Analítico Para Casiopeína II-gly.

Especificidad / Casiopeína II-gly: Para la evaluación de la selectividad, se realizó el análisis cromatográfico del diluyente (fase móvil), la Casiopeína II-gly en solución de fase móvil con estándar interno (Ketorolaco de Trometamina 50 µg/mL). El método analítico es selectivo si los Cromatogramas obtenidos no presentan ninguna señal que puedan causar alguna interferencia en los tiempos de retención correspondientes a la Casiopeína II-gly y el Ketorolaco de Trometamina.

Linealidad del sistema / Casiopeína II-gly: Se prepararon 3 curvas de calibración con al menos cinco diluciones preparadas a partir de una misma solución patrón (10, 30, 50, 70, 100 µg/mL) haciendo el análisis cuando menos por duplicado para cada dilución en un día de trabajo (Tabla 1). La curva se evaluó en un rango de 10 a 100 µg/mL de Casiopeína II-gly en fase móvil, con estándar interno de Ketorolaco de Trometamina (50 µg/mL), se reportó la relación de áreas entre la Casiopeína II-gly y el Ketorolaco de Trometamina.

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

5.3.- Método Analítico Para Casiopeína III-i.

Especificidad / Casiopeína III-ia: Para la evaluación de la selectividad, se realizó el análisis cromatográfico del diluyente (fase móvil), la Casiopeína III-ia en solución de fase móvil con estándar interno (Furosemida 25 µg/mL). El método analítico es selectivo si los Cromatogramas obtenidos no presentan ninguna señal que puedan causar alguna interferencia en los tiempos de retención correspondientes a la Casiopeína III-ia y la Furosemida.

Linealidad del sistema / Casiopeína III-ia: Se prepararon 3 curvas de calibración con al menos cinco diluciones preparadas a partir de una misma solución patrón (20, 25, 30, 35, y 40 µg/mL) haciendo el análisis cuando menos por duplicado para cada dilución en un día de trabajo (Tabla 2). La curva se evaluó en un rango de 20 a 40 µg/mL de Casiopeína III-ia en fase móvil, con estándar interno de Furosemida (25 µg/mL), se reportó la relación de áreas entre la Casiopeína III-ia y la Furosemida.

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

5.4.- Linealidad del Método Analítico para Casiopeína II-gly.

Procedimiento:

Preparación de la fase móvil Metano / H₂O / Acetonitrilo (72.5:24:3.5) v/v,

pH=3.0: Medir 435 mL de metanol grado HPLC, adicionar 144 mL de agua, agregar 21 mL de Acetonitrilo, mezclar y ajustar el pH de la mezcla a 3.0 con ácido fosfórico y filtrar con membrana de 0.45 µm de tamaño de poro.

Preparación de la solución de Ketorolaco de Trometamina 100 µg/mL

(Estándar interno de Casiopeína II-gly): Pesar 0.05 g de Ketorolaco de Trometamina (Estándar de referencia interno), disolver con la solución de Metanol: H₂O (1:1), transferir a un matraz volumétrico de 5 mL, llevar al aforo con la misma solución de Metanol: H₂O (1:1) de la solución anterior (10000 µg/mL), tomar 0.5 mL, transferir a un matraz volumétrico de 10 mL, llevar al aforo con una solución Metanol:H₂O (1:1). La concentración así obtenida es de 500 µg/mL.

Preparación de la solución Patrón de Casiopeína II-gly (1000 µg/mL) se realiza

por triplicado: Pesar 0.005 g de Casiopeína II-gly transferir a un matraz volumétrico de 5 mL, disolver con la solución Metanol: H₂O (1:1), aforar con la solución de Metanol: H₂O (1:1). La concentración así obtenida es de 1000 µg/mL.

Preparación de la curva de Calibración para Casiopeína II-gly:

De la solución Patrón de Casiopeína II-gly (1000 µg/mL), se realizaron las diluciones correspondientes para obtener las diferentes concentraciones de la curva de calibración (10, 30, 50, 70 y 100 µg/mL). Como se indica a continuación:

1.-Tomar 50 µL de la solución de 1000 µg/mL del Patrón de Casiopeína II-gly, llevar a un matraz volumétrico de 5 mL, aforar con la solución Metanol: H₂O (1:1), para obtener una concentración de 10 µg/mL de Casiopeína II- gly.

2.-Tomar 150 µL de la solución de 1000 µg/mL del patrón de Casiopeína II-gly, llevar a un matraz volumétrico de 5 mL, aforar con la solución Metanol:H₂O(1:1), para obtener una concentración de 30 µg/mL de Casiopeína II-gly.

3.-Tomar 250 µL de la solución de 1000 µg/mL del Patrón de Casiopeína II-gly, llevar a un matraz volumétrico de 5 mL, aforar con la solución Metanol: H₂O (1:1), para obtener una concentración de 50 µg/mL de Casiopeína II-gly.

4.-Tomar 350 µL de la solución de 1000 µg/mL del Patrón de Casiopeína II-gly, llevar a un matraz volumétrico de 5 mL, aforar con la solución Metanol: H₂O (1:1), para obtener una concentración de 70 µg/mL de Casiopeína II- gly.

5.-Tomar 500 µL de la solución de 1000 µg/mL del Patrón de Casiopeína II-gly, llevar a un matraz volumétrico de 5 mL, aforar con la solución Metanol: H₂O (1:1) para obtener una concentración de 100 µg/mL de Casiopeína II-gly.

Nota: adicionar 0.500 μL de estándar interno de Ketorolaco de Trometamina a cada punto de la curva de calibración para tener una concentración de 50 $\mu\text{g/mL}$ de Ketorolaco de Trometamina.

Condiciones Cromatográficas para Casiopeína II-gly.

1. Flujo: 0.7 mL/min.
2. Volumen de inyección: 50 μL .
3. Longitud de onda: 254 nm.
4. Fase móvil: Metanol: Agua: Acetonitrilo (72.5:24:3.5)v/v pH = 3.5.
5. Columna analítica: Phenomex luna C18, 5 μm , 250 x 4.6mm, Symmetry.
6. Tiempo de corrida: 11 minutos.
7. Temperatura de la columna: 25°C.

5.5.- Linealidad del Método Analítico para Casiopeína III-ia.

Procedimiento:

Preparación de la solución de Fosfatos 0.01M, pH=7: Pesar 0.42 g de fosfato de sodio monohidratado y 0.69 g de fosfato de sodio dibásico dodecahidratado transferir a un matraz volumétrico de 500 mL disolver y aforar con agua desionizada y medir el pH.

Preparación de la solución de Hexansulfonato de Sodio 0.005 M: Pesar 0.094 g de Hexansulfonato de Sodio, disolver con agua desionizada, transferir a un matraz volumétrico de 100 mL, y aforar con agua desionizada.

Preparación de la Fase móvil Metanol/Fosfatos/Hexansulfonato de sodio, (40:55:5) v/v, pH = 7.0: Medir 125 mL de metanol grado HPLC, adicionar 176 mL de solución de fosfatos 0.01 M, pH = 7.0, agregar 16 mL de Hexansulfonato de Sodio 0.005 M, ajustar el pH de la mezcla a 7.0 con ácido fosfórico y filtrar con membrana de 0.45 μm de tamaño de poro.

Preparación de la solución de Furosemida 25 µg/mL (Estándar interno de la Casiopeína III-ia): Pesar 0.05 g de Furosemida (Estándar de referencia interno), disolver en fase móvil, transferir a un matraz volumétrico de 5 mL, llevar al aforo con fase móvil, de la solución anterior (10000 µg/mL), tomar una alícuota de 500 µL, transferir a un matraz volumétrico de 10 mL, llevar al aforo con fase móvil. La concentración así obtenida es de 500 µg/mL.

Preparación de la solución Patrón de Casiopeína III-ia.

Pesar 0.005 g de Casiopeína III-ia, transferir a un matraz volumétrico de 5 mL, disolver y aforar con H₂O. La concentración así obtenida es de 1000 µg/mL.

Preparación de la curva de Calibración para Casiopeína III-ia.

De la solución Patrón de Casiopeína III-ia (1000 µg/mL), se realizaron las diluciones correspondientes para obtener las diferentes concentraciones de la curva de calibración (20, 25, 30, 35 y 40 µg/mL). Como se indica a continuación:

1.-Tomar 100 µL de la solución de 1000 µg/mL del Patrón de Casiopeína III-ia, llevar a un matraz volumétrico de 5 mL, aforar con H₂O, para obtener una concentración de 20 µg/mL de Casiopeína III-ia.

2.-Tomar 125 µL de la solución de 1000 µg/mL del Patrón de Casiopeína III-ia, llevar a un matraz volumétrico de 5 mL, aforar con H₂O, para obtener una concentración de 25 µg/mL de Casiopeína III-ia.

3.-Tomar 150 µL de la solución de 1000 µg/mL del Patrón de Casiopeína III-ia, llevar a un matraz volumétrico de 5 mL, aforar con H₂O, para obtener una concentración de 30 µg/mL de Casiopeína III-ia.

4.-Tomar 175 µL de la solución de 1000 µg/mL del Patrón de Casiopeína III-ia, llevar a un matraz volumétrico de 5 mL, aforar con H₂O, para obtener una concentración de 35 µg/mL de Casiopeína III-ia.

5.-Tomar 200 µL de la solución de 1000 µg/mL del Patrón de Casiopeína III-ia, llevar a un matraz volumétrico de 5 mL, aforar con H₂O, para obtener una concentración de 40 µg/mL de Casiopeína III-ia.

Nota: Adicionar 0.250 μL de estándar interno de Furosemida a cada punto de la curva de calibración para tener una concentración de 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Furosemida.

Condiciones Cromatográficas para Casiopeína III-ia.

1. Flujo: 0.8 mL/min.
2. Volumen de inyección: 50 μL .
3. Longitud de onda: 274 nm.
4. Fase móvil: Metanol: Fosfatos:Hexansulfonato de sodio(40:55:5) v/v pH =7.0
5. Columna analítica: Termo Hypersil Keystone C18, 5 μm , 250 x 4.6mm.
6. Tiempo de corrida: 12 minutos.
7. Temperatura de la columna: 25°C.

5.6.- Estabilidad estrés.

Procedimiento:

Preparación solución patrón A de Casiopeína III-ia:

Pesar 0.010 g de Casiopeína III-ia llevar a un matraz volumétrico de 10 mL disolver y aforar. Tomar 400 μ L de la solución A transferir a un matraz volumétrico de 10 mL y aforar con agua. Para obtener una solución de Casiopeína III-ia con una concentración aproximada a 40 μ g/mL (preparar por duplicado).

Someter las soluciones a las condiciones estrés como se indica a continuación:

1. Fotólisis: Exponer los 10 mL de la solución de Casiopeína III-ia a la luz UV durante 24 horas.
2. Hidrólisis ácida: Adicionar a la solución de Casiopeína III-ia, 100 μ L de ácido clorhídrico 1 M antes de llevar a volumen de 10 mL con agua.
3. Hidrólisis básica: Adicionar a la solución de Casiopeína III-ia, 100 μ L de hidróxido de sodio 1 M antes de llevar a volumen de 10 mL con agua.
4. Oxidación: Adicionar a la solución de Casiopeína III-ia, 100 μ L de peróxido de hidrogeno al 30% antes de llevar a volumen de 10 mL con agua.
5. Preparar un estándar de Casiopeína III-ia al 100 %. Se analizó el tiempo 0 y 1 día. Se inyectó por duplicado cada una de las soluciones. Dejar correr dos veces el tiempo de retención del pico principal. La resolución entre el pico principal y el pico de degradación es $\geq 2\%$.

Condiciones Cromatográficas Para Casiopeína III-ia.

1. Flujo: 0.8 mL/min.
2. Volumen de inyección: 50 µL.
3. Longitud de onda: 274 nm.
4. Fase móvil: Metanol: Fosfatos: Hexansulfonato de sodio(40:55:5) v/v pH = 7.0
5. Columna analítica: Symmetry C18, 5µm, 250 x 4.6mm.
6. Tiempo de corrida: 30 minutos.
7. Temperatura de la columna: 25°C.

5.7.- Análisis de la Casiopeína II-gly y Casiopeína III-ia sometida al estudio de estabilidad.

5.7.1.- Procedimiento de la materia prima sometida a Estabilidad Acelerada.

Se colocaron aproximadamente 25 mg de muestra para Casiopeína II-gly y Casiopeína III-ia en diferentes viales con tapa de rosca, se identificaron y se colocaron en la cámara climática a $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$ / $75 \pm 5\%$ HR (NOM-073-SSA1-2005, Estabilidad de Fármacos y Medicamentos), con un total de 10 muestras para Casiopeína II-gly y 10 muestra para Casiopeína III-ia.

Se analizaron 2 muestras para Casiopeína II-gly y 2 muestras Casiopeína III-ia por cada tiempo indicado en la Norma Oficial Mexicana NOM-073-SSA1-2005, Estabilidad de Fármacos y Medicamentos.

Se preparó una curva de calibración para Casiopeína II-gly y para Casiopeína III-ia, el día de análisis de las muestras sometidas a estabilidad. Se aplicó el método de indicado para cada uno de los componentes antes ya mencionados en el punto 5.4 y 5.5.

5.7.2.- Preparación de las muestras Casiopeína II-gly.

Pesar 10 mg la muestra de Casiopeína II-gly que se sometió a estabilidad llevar a un matraz volumétrico de 10 mL disolver y aforar con solución de Metanol: H₂O, (1:1), tomar una alícuota de 0.450 mL (450 µL) llevar a un matraz de 10 mL y adicionar una alícuota de 0.500 µL de estándar interno de Ketorolaco de Trometamina, aforar con solución de Metanol: H₂O, (1:1), para obtener una concentración aproximada a 45 µg/mL de Casiopeína II-gly y de 50 µg/mL de Ketorolaco de Trometamina. (Se realizó por duplicado) y se inyectó al cromatógrafo.

Condiciones Cromatográficas Para Casiopeína II-gly.

1. Flujo: 0.7 mL/min.
2. Volumen de inyección: 50 µL.
3. Longitud de onda: 254 nm.
4. Fase móvil: Metanol: Agua: Acetonitrilo (72.5:24:3.5)v/v pH = 3.5.
5. Columna analítica: Phenomex luna C18, 5µm, 250 x 4.6mm, Symmetry.
6. Tiempo de corrida: 11 minutos.
7. Temperatura de la columna: 25°C.

5.7.3.- Preparación de las muestras Casiopeína III-ia.

Pesar 10 mg la muestra de Casiopeína III-ia que se sometió a estabilidad llevar a un matraz volumétrico de 10 mL disolver y aforar con H₂O, tomar una alícuota de 0.280 mL (280 µL) llevar aun matraz de 10 mL y adicionar 0.250 µL de estándar interno de Furosemida, aforar con H₂O, para obtener una concentración aproximada a 28 µg/mL de Casiopeína III-ia y 25 µg/mL de Furosemida. (Se realizó por duplicado).

Condiciones Cromatográficas Para Casiopeína III-ia.

1. Flujo: 0.8 mL/min.
2. Volumen de inyección: 50 µL.
3. Longitud de onda: 274 nm.
4. Fase móvil: Metanol: Fosfatos: Hexansulfonato de sodio (40:55:5) v/v pH =7.0
5. Columna analítica: Termo Hypersil Keystone C18, 5µm, 250 x 4.6 mm.
6. Tiempo de corrida: 12 minutos.
7. Temperatura de la columna: 25°C.

CAPITULO 6

RESULTADOS

6.1.- Resultados del método analítico para cuantificar Casiopeína II-gly.

6.1.1.- Especificidad / Casiopeína II-gly: En el cromatógrama mostrado en la Figura 2. Se observa que el tiempo de retención obtenido para la Casiopeína II-gly es de 2.867 minutos. En el cromatógrama mostrado en la Figura 1. Se observa que no presentó interferencia alguna de otra sustancia para el tiempo de retención de la Casiopeína II-gly, de esta forma el sistema para determinar Casiopeína II-gly como materia prima es específico.

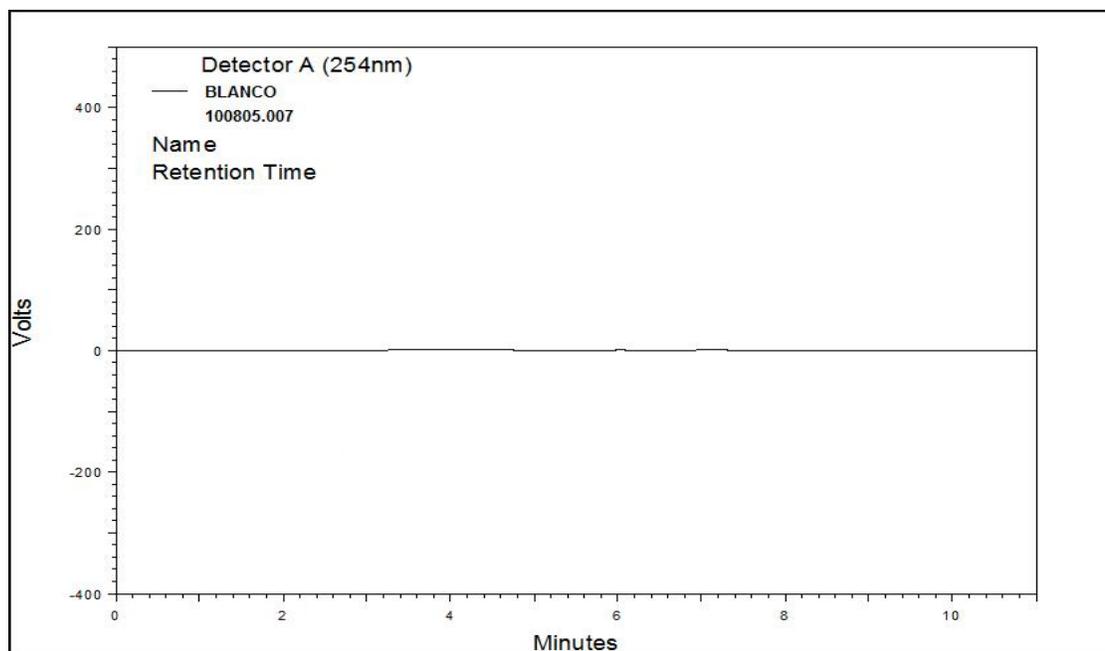


Figura 1. Cromatógrama del blanco para Casiopeína II-gly

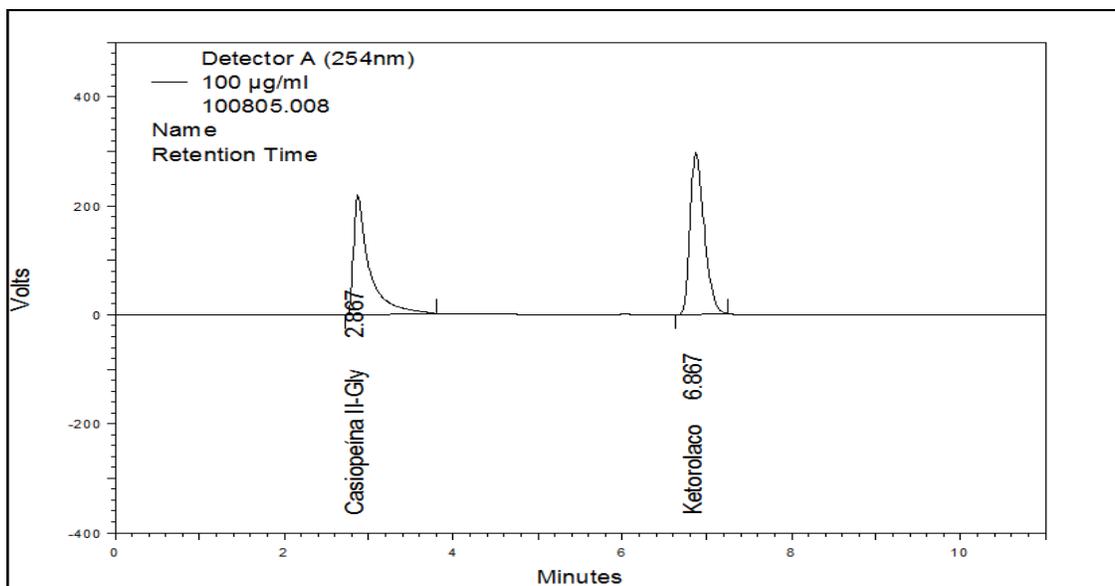


Figura 2. Cromatograma de Casiopeína II-gly 100 µg/mL con estándar interno (Ketorolaco 50 µg/mL), Tiempo de retención de Casiopeína II-gly es de 2.867 min. Tiempo de retención de Ketorolaco de Trometamina es de 6.86 min.

6.1.2.- Linealidad / Casiopeína II-gly: El sistema para Casiopeína II-gly es lineal dentro del intervalo de concentraciones establecidas (10, 30, 50, 70 y 100 µg/mL).

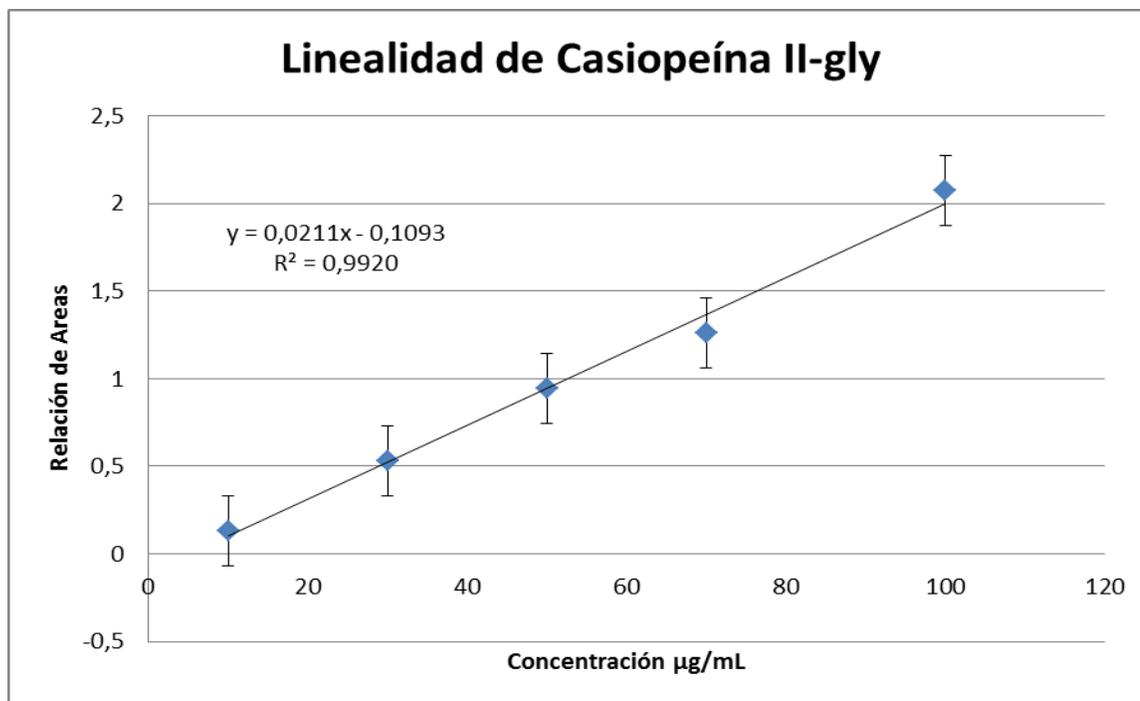
Grafica 1.

La ecuación de la curva promedio para obtenida es $y = 0.0211x - 0.1093$ y el coeficiente de correlación r es de 0.9960 y el coeficiente de determinación $r^2 = 0.9920$, el coeficiente de variación (%C.V) fue de 0.6659 a 1.7789 por lo que el método es lineal en el intervalo de concentraciones empleadas. Tabla 1

Linealidad / Casiopeína II-gly:

Concentración µg/mL	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Promedio	D.E	C.V.
10	0.1325	0.1360	0.1328	0.1337	0.0020	1.4613
30	0.5385	0.5218	0.5295	0.5299	0.0084	1.5783
50	0.9449	0.9483	0.9361	0.9431	0.0063	0.6659
70	1.2742	1.2719	1.2343	1.2601	0.0224	1.7789
100	2.0757	2.0670	2.0708	2.0712	0.0044	0.2111

Tabla 1. Relación de áreas = Área de la Casiopeína II-gly / Área del estándar interno Ketorolaco de Trometamina



Grafica 1. Linealidad del sistema para Casiopeína II-gly.

6.2.- Resultados del método analítico para cuantificar Casiopeína III-ia.

6.2.1.- Especificidad / Casiopeína III-ia: En el cromatograma mostrado en la Figura 4. Se observa que el tiempo de retención obtenido para la Casiopeína III-ia es de 5.475 minutos. En el cromatograma mostrado en la Figura 3. Se observa que no presenta interferencia alguna de otra sustancia para el tiempo de retención de la Casiopeína III-ia, de esta forma el sistema para determinar Casiopeína III-ia como materia prima es específico.

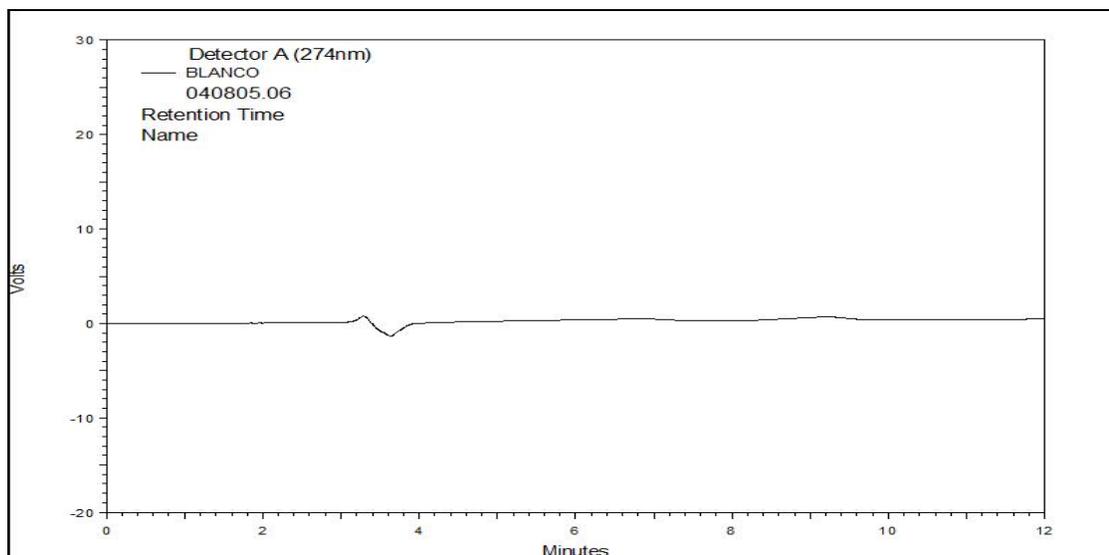


Figura 3. Cromatógrama del blanco para Casiopeína III-ia.

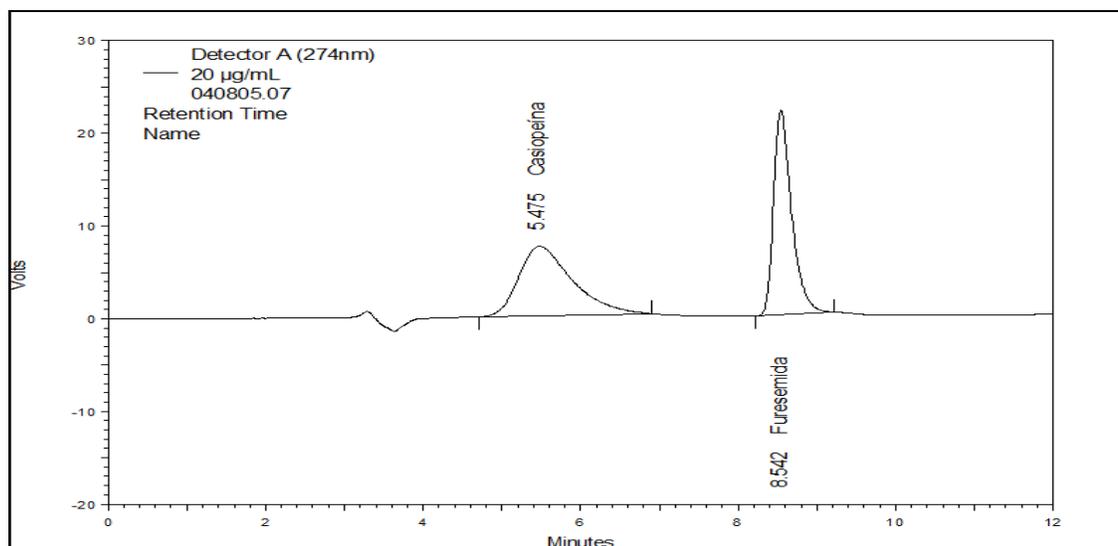


Figura 4. Cromatógrama de Casiopeína III-ia 20 µg/mL con estándar interno (Furosemida 25 µg/mL), tiempo de retención de Casiopeína III-ia es de 5.475 min y el tiempo de retención de Furosemida es de 8.542 min.

6.2.2.- Linealidad / Casiopeína III-ia: El sistema para Casiopeína III-ia es lineal dentro del intervalo de concentraciones establecidas (20, 25, 30, 35 y 40 µg/mL).

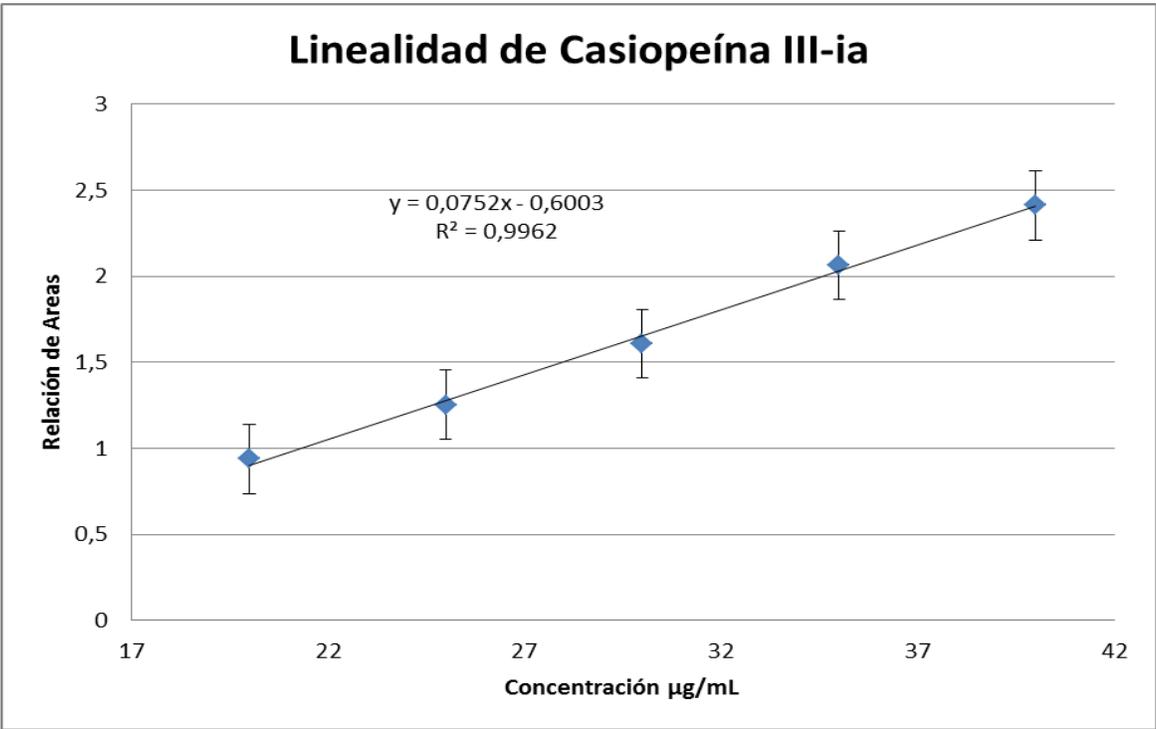
Grafica 2.

La ecuación de la curva promedio para obtenida es $y = 0.0752x - 0.6003$ y el coeficiente de correlación r es de 0.9981 y el coeficiente de determinación $r^2 = 0.9962$, el coeficiente de variación (%C.V) fue de 0.5317 a 1.6166 por lo que el método es lineal en el intervalo de concentraciones empleadas. Tabla 2.

Linealidad / Casiopeína III-ia:

Concentración µg/mL	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Promedio	D.E	C.V.
20	0.9461	0.9330	0.9340	0.9377	0.0073	0.7777
25	1.2297	1.2671	1.2620	1.2529	0.0203	1.6166
30	1.6126	1.6106	1.5969	1.6067	0.0085	0.5317
35	2.0670	2.0318	2.0938	2.0642	0.0311	1.5064
40	2.3770	2.4416	2.4147	2.4111	0.0324	1.3454

Tabla 2. Relación de áreas = Área de la Casiopeína III-ia / Área del estándar interno Furosemida.



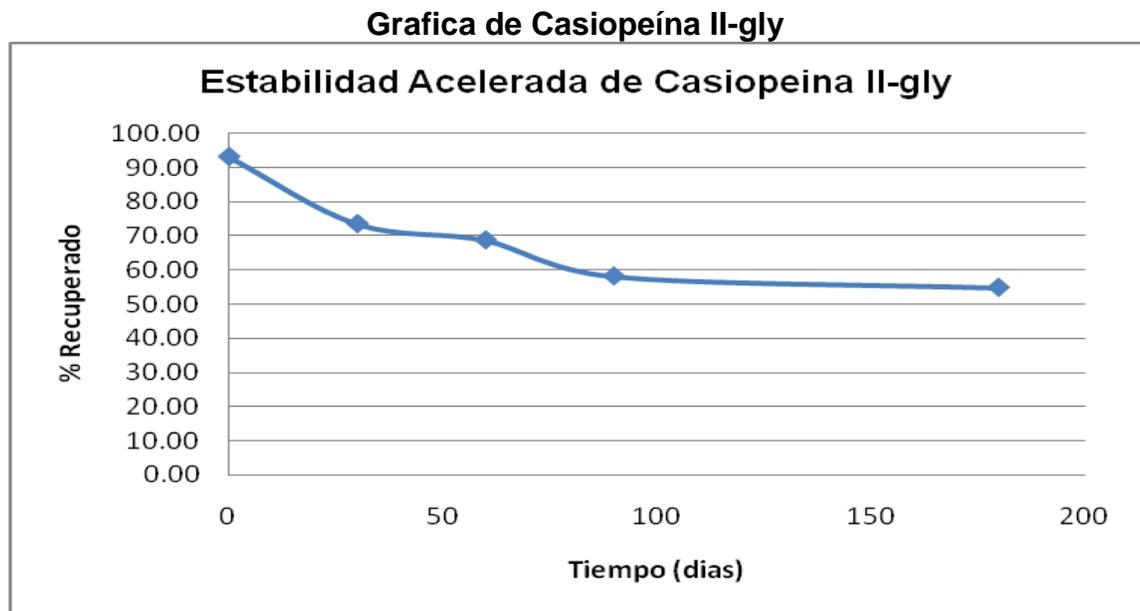
Grafica 2. Linealidad del sistema para Casiopeína III-i.

6.3.- Resultados de Estabilidad Acelerada de Casiopeína II-gly.

Las muestras de Casiopeína II-gly, sometidas a estabilidad a $40 \pm 2^\circ\text{C}/75 \pm 5\%$ HR por seis meses, se analizaron y los resultados se interpolaron en la curva de calibración correspondiente y los resultados que se obtuvieron (tabla 3) y tendencia (grafica 3) son los siguientes:

TIEMPO (MESES)	INICIO	1 MES	2 MESES	3 MESES	6 MESES
TIEMPO (DIAS)	0	30	60	90	180
VALORACIÓN (%)	93.31	73.57	68.77	58.15	54.79

Tabla 3. Resultados de evaluación de estabilidad de Casiopeína II-gly a $40 \pm 2^\circ\text{C}/75 \pm 5\%$ HR por seis meses.



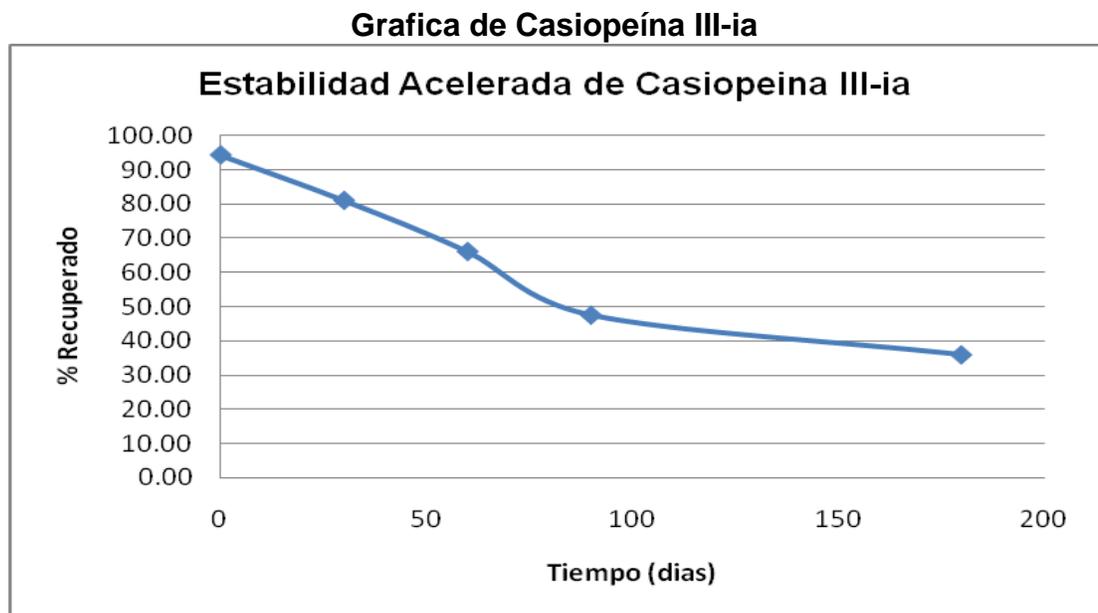
Grafica 3. Tendencia de la evaluación para Casiopeína II-gly

6.4.- Resultados de Estabilidad Acelerada de Casiopeína III-ia.

Las muestras de Casiopeína III-ia sometidas a estabilidad a $40 \pm 2^\circ\text{C}/75 \pm 5\%$ HR por seis meses, se analizaron y los resultados se interpolaron en la curva de calibración correspondiente y los resultados que se obtuvieron (tabla 4) y tendencia (grafica 4) son los siguientes:

TIEMPO (MESES)	INICIO	1 MES	2 MESES	3 MESES	6 MESES
TIEMPO (DIAS)	0	30	60	90	180
VALORACIÓN (%)	94.34	81.10	66.19	47.61	36.04

Tabla 4. Resultados de evaluación de estabilidad de Casiopeína III-ia a $40 \pm 2^\circ\text{C}$ $75 \pm 5\%$ HR por seis meses.



Grafica 4. Tendencia de la evaluación para Casiopeína III-ia

6.5.- Resultados de Estabilidad en condiciones estrés de Casiopeína III-ia.

Las muestras de Casiopeína III-ia sometidas a condiciones estrés se analizaron al igual que la muestra de Casiopeína III-ia en condiciones normales en el cromatógrama mostrado en la Figura 5. Se observa que no hay productos de degradación en cambio con la hidrólisis ácida (Figura 6), y con la hidrólisis básica (Figura 7), fotólisis (Figura 8), la oxidación (Figura 9) y la muestra inicial de Casiopeína III-ia, no presentan productos de degradación por lo que es indicativo de estabilidad.

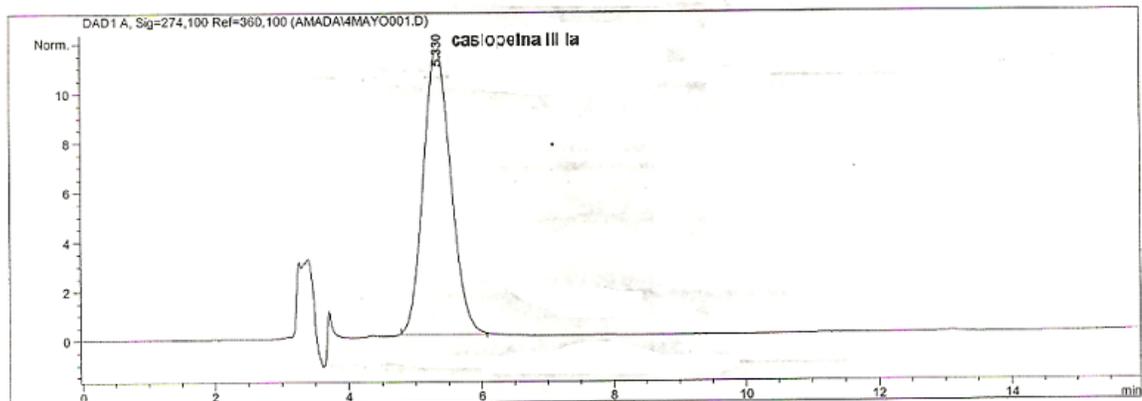


Figura 5. Cromatógrama de Casiopeína III-ia 40 µg/mL en condiciones normales de análisis. Tiempo de retención 5.330 min.

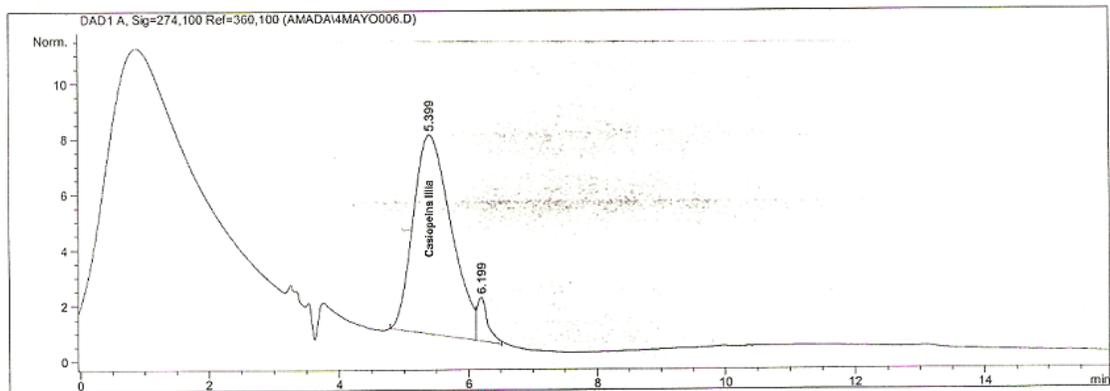


Figura 6. Cromatograma de Casiopeína III-ia 40 µg/mL en hidrólisis ácida se observa un pico que probablemente se debió a la degradación con el ácido clorhídrico.

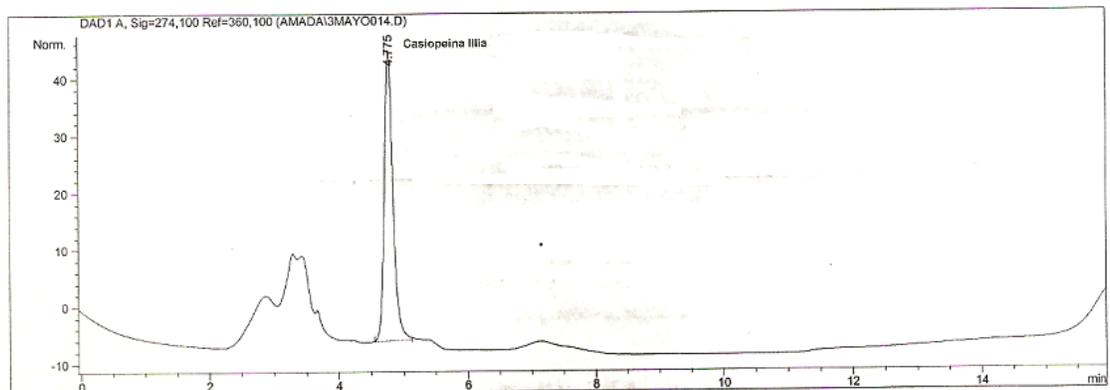


Figura 7. Cromatograma de Casiopeína III-ia 40 µg/mL en hidrólisis básica no se observan picos de degradación.

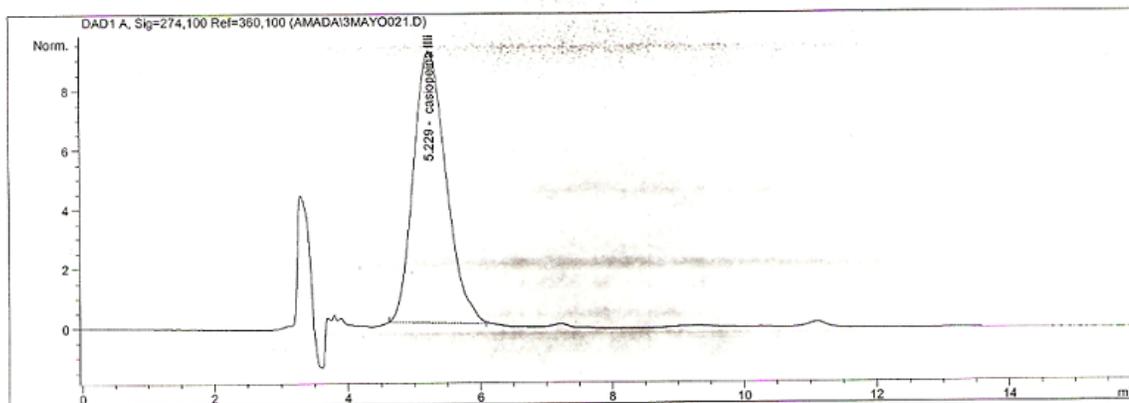


Figura 8. Cromatograma de Casiopeína III-ia 40 µg/mL en fotólisis no se observan picos de degradación.

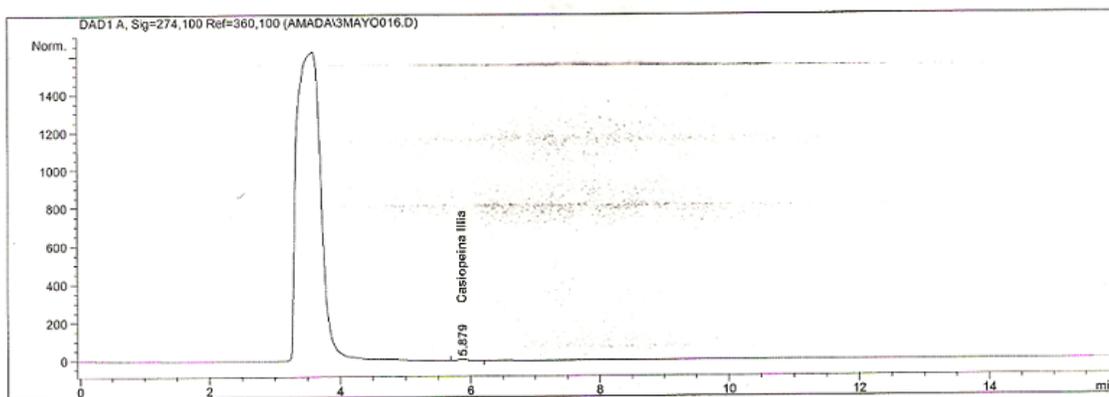


Figura 9. Cromatograma de Casiopeína III-ia 40 µg/mL en oxidación se observa la de degradación.

CAPITULO 7

ANALISIS DE RESULTADOS

El método analítico empleado para cuantificar Casiopeína II-gly y Casiopeína III-ia, cumple con los parámetros evaluados que son:

La especificidad que como se observa en la figura 1 y 2, no hay interferencia alguna por el diluyente (blanco) y el estándar interno por lo que solo se observan los picos de interés, por lo que es específico para el método de cuantificación de Casiopeína II-gly y Casiopeína III-ia.

La linealidad del sistema de la Casiopeína II-gly fue lineal dentro del intervalo de concentraciones establecidas de 10, 30, 50, 70 y 100 µg/mL, el coeficiente de correlación “r” es de 0.9960, la ecuación de la curva de Casiopeína II-gly es $y=0.0211X - 0.1093$ y el coeficiente de determinación es de $r^2=0.9920$, el coeficiente de variación (%C.V.) es de 0.6659 a 1.7789 esto implica que el método es lineal en el intervalo de concentraciones empleadas.

La linealidad del sistema de la Casiopeína III-ia fue lineal dentro del intervalo de concentraciones establecidas de 20, 25, 30, 35 y 40 µg/mL, el coeficiente de correlación “r” es de 0.9981, la ecuación de la curva de Casiopeína III-ia son $y=0.0752X - 0.6003$ y el coeficiente de determinación es de $r^2=0.9962$, el coeficiente da variación (%C.V.) es de 0.5317 a 1.6166 esto implica que el método es lineal en el intervalo de concentraciones empleadas.

Ya demostrado que el método es adecuado para la cuantificación de la Casiopeína II-gly y Casiopeína III-ia, se procede a realizar el análisis de las materias primas correspondientes, y los resultados obtenidos de la estabilidad acelerada, se puede observar en la tabla 3, grafica 3 para la Casiopeína II-gly y la tabla 4, grafica 4 para la Casiopeína III-ia, la tendencia en la valoración, es ha disminuir, por lo que hay un cambio significativo en la especificación de estabilidad establecida, al comparar los resultados iniciales con los resultados obtenidos de los seis meses sometidos a estabilidad acelerada a $40 \pm 2^{\circ}\text{C} / 75 \pm 5 \% \text{HR}$.

Las muestras de Casiopeína III-ia que se sometieron a estabilidad estrés:

Fotolisis: exposición de Casiopeína III-ia a luz UV durante 1 hora., hidrólisis ácida: se adicionó ácido clorhídrico 1 M y se analizó tiempo 0 y 1 día, hidrólisis básica: se adicionó hidróxido de sodio 1 M y se analizó tiempo 0 y 1 día y la oxidación: se adicionó peróxido de hidrogeno al 30% y se analizó tiempo 0 y 1 día, que se puede observar en la figura 5, 6, 7, 8 y 9, solo hay degradación del fármaco con ácido clorhídrico 1 M, por lo que se tendría que identificar y evaluar que el producto de degradación no representa un riesgo en la seguridad del fármaco y por otro lado el método es indicativo de estabilidad.

CAPITULO 8

CONCLUSIONES

El método analítico para cuantificar Casiopeína II-gly y Casiopeína III-ia en solución por HPLC es específico y lineal, como se había demostrado en la validación del método proveniente de la tesis de licenciatura de Fernando Rosas Martínez (Título: Evaluación fisicoquímica de nuevos compuestos con actividad antineoplásica Casiopeína III-ia y Casiopeína II-gly. Año 2004).

Por lo que se pudo cuantificar tanto la Casiopeína II-gly y Casiopeína III-ia (fármacos nuevos) y conocer el comportamiento bajo condiciones exageradas como son las de la estabilidad acelerada a $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$ / 75 ± 5 % HR por seis. indicada en la NOM – 073 – SSA1 – 2005.

Y en el estudio de estabilidad en condiciones estrés nos indica que el método para Casiopeína III-ia es indicativo de estabilidad, ya que se pueden detectar productos de degradación en hidrólisis ácida (ácido clorhídrico 1 M), ya que se observa el pico característico del compuesto Casiopeína III-ia y un pico de degradación. Que se tendría que verificar si es alguna impureza o algún producto derivado de la síntesis del compuesto de Casiopeína III-ia.

Y es estable en la fotólisis (luz UV), hidrólisis básica (hidróxido de sodio 1 M) y oxidación (peróxido de hidrogeno al 30%), ya que solo observa el pico correspondiente a Casiopeína III-ia.

CAPITULO 9

BIBLIOGRAFIA

1. - Bakhtiar R. And Ochiai E. PHARMACOLOGIAL APPLICATIONS OF INORGANIC COMPLEXES. General Pharmacology 32, 525-540, 1999.

2. - Barret J. and Hill B. T. DNA REPAIR MECHANISMS ASSOCIATED WITH CELLULAR RESISTENCE TO ANTITUMOR DURGS:POTENTIAL NOVEL TARGETS. Anti-Cancer Drugs 9, 103-123, 1998.

3. - Guideline for Submitting Documentation for the Stability of Human Drugs and Biologics, FDA, Center for Drugs and Biologics. Office of Drug Research Review, Feb 1987.

4. - Lachman L, et al. The theory and Practice of Industrial Pharmacy, 3rd,ed, lea & febiger, Philadelphia, 1986.

- 5.- De Vizcaya-Ruiz A., Rivero-Müller A., Ruiz-Ramirez L., Dobrota M. HEMATOLOGICAL EFFECT OF CASIOPEINA IIGLY A NOVEL COPPER-BASED ANTICANCER AGENT. Proccedings of the American Association for Cancer Research 39, 328. New Orleans, LA, USA. 1998.

6. - De Vizcaya-Ruiz A., Rivero-Müller A., Ruiz-Ramirez L., Kass G.E.N., Kelland L.R., Orr R.M. and Dobrota M. L1210 AND CH1 CELLS TREATED WITH NOVEL COPPER-BASED ANTICANCER COMPUND-CASIOPEINA II DIE BY APOPTOSIS. Anticancer Research 18, 48-53, 1998.

7. - De Vizcaya-Ruiz A., Rivero-Müller A., Ruiz-Ramírez L., Kass G.E.N., Kelland L.R., Orr R.M. and Dobrota M. INDUCTION OF APOPTOSIS BY NOVEL COPPER-BASED ANTICANCER COMPUND-CASIOPEINA II IN L210 AND CH1 CELLS. Toxicology in Vitro 14, 1-5, 2000.

8. - Ruiz-Azuara L. PROCES TO OBTAIN NEW MIXED COPPER AMINOACIDATE COMPLEXES FROM PHENYLATEPHENANTROLINE TO BE USE AS ANTICANCERIGENIC AGENT. U.S. Patent application serial No 07/628, 843, Ap21 (1992) Number 5, 107, 005. U.S. Patent Re35, 458, Feb. 18, 1997.

9.- Ruiz-Azuara L. DIRECCION GENERAL DE INVERSIONES, MARCAS Y DESARROLLO TECNOLOGICO SECIFI. Registro Num 18801-120579 y 18802-12580.u.s Patent Number Ap. 21 (1992), 5, 107, 2005.

10.- Ruiz Ramirez L., De la Rosa M.E., Gracia Mora I., Mendoza A., Pérez G., Ferre-Sueta G., Tovar A., Breña M., Gutiérrez P., Cruces Martinez M.P., Pimentel E. And Natarajan A.T. CASIOPEINAS, METAL-BASED DRUGS A NEW CLASS OF ANTINEOPLASTIC AND GENOTOXIC COMPOUNDS. *Journal of Inorganic Biochemistry* 59, 207, 1995.

11.- Bravo M. E., Ruíz-Ramirez L., Tinoco M. KNIGHT'S MOVE IN THE PERIODIC TABLE, FROM PLATINUM TO COPPER, NEW ANTICANCER COMPOUNDS, CASIOPEINAS. IN VIVO EVALUATION II. *Metal Based Drugs*, 2002.

12.- Nobel C.S.I., Kimland M., Lind B., Orreius S. and Slater A.F.G., DITHIOCARBAMATES INDUCE APOPTOSIS IN THYMOCYTES BY RAISING THE INTRACELLULAR LEVEL OF REDOX-ACTIVE COPPER. *Journal of Biological Chemistry* 270, 26202-26208, 1995.

13.- Cunico L. Robert, BASIC HPLC AND CE OF BIOMOLECULES, by Bay Bioanalytical Laboratory, inc, pp. 359-370, Richmond, California, 1998.

14.-Tesis de licenciatura de Fernando Rosas Martínez (Titulo: Evaluación fisicoquímica de nuevos compuestos con actividad antineoplásica Casiopeína III-ia y Casiopeína II-gly. Año 2004).

15. Jens T. Carstenesen. Drug stability. Principles and practices. 2 Edition. Revised and Expanded.Vol.68.

16.- NORMA Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-1993, Buenas Practicas de fabricación para establecimientos de la industria químico farmacéutica dedicada a la fabricación de medicamentos.

17.-NORMA Oficial Mexicana NOM-073-SSA1-2005, ESTABILIDAD DE FARMACOS Y MEDICAMENTOS.

18. - Current Good Manufacturing Practice, 21 CFR211.

19. - Connors KA. Amido GL, Stella JV. Chemical Stability of Pharmaceuticals, 2nd ed, Wiley, New York, 1986.

20. - Validation of Compendial Methods. General Chapter (1225),(1227) US Pharmacopeia 29, United States Pharmacopeical Convention, Inc., Rockville MD.2006

21.- Glosario de Medicamentos, Desarrollo Evaluación y uso. Organización Panamericana de la Salud.- Washington D.D.:OPS,c1999.

22. - Validation of Analytical Procedures: Text and methodology ICH Q2 (r1) Step 4 version, Nov 2005.

23.- Jorge c., Aplicación del método de estándar interno a la cromatografía, Laboratorio de Análisis Instrumental, 2000.

24.- Tesis Doctorado de Inés Fuentes Noriega (Titulo: Farmacocinética preclínica en Casiopeína III-ia y su unión a proteínas plasmáticas Año 2005).

25.- Tesis de licenciatura de Elena Eugenia Rendón Garrido (Titulo: Estudio de la distribución de Casiopeína II y III en órganos de ratón (NIH) por la determinación de cobre Año 1998).