



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**PERFIL DE DISOLUCIÓN INTRÍNSECA DE
CASIOPEINA III – ia, EN SOLUCIÓN AMORTIGUADORA
DE ACETATOS A pH=4.5, POR CROMATOGRAFÍA DE
LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A

LOAIZA FLORES GISELLE



MÉXICO, D.F.

2011



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	Prof.	Alfredo Rafael Garzón Serra
Vocal	Prof.	Inés Fuentes Noriega
Secretaria	Prof.	María de Lourdes Mayet Cruz
Primer suplente	Prof.	Luis Jesús García Aguirre
Segundo suplente	Prof.	Kenneth Rubio Carrasco

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorios 112 y 113, Departamento de Farmacia, Conjunto E, Facultad de Química, Ciudad Universitaria, UNAM.

Asesor del tema:

Dra. Inés Fuentes Noriega

Supervisor técnico:

M. en C. Kenneth Rubio Carrasco

Sustentante:

Giselle Loaiza Flores



A la gran casa de estudios UNAM y a mi querida Facultad de Química, que me han brindado el privilegio de formar parte de ellas, el abrir cada una de sus aulas donde adquirí una excelente formación académica.

A la Dra. Inés Fuentes Noriega por su tutoría y apoyo en el desarrollo de este trabajo. Por los conocimientos transmitidos y recomendaciones, pero sobre todo por su calidad humana que día a día se hace presente.

A la M.C. Kenneth Rubio Carrasco por su asesoría técnica, por compartir sus conocimientos y experiencias. La disposición y motivación.

A mis padres, herma@s y abuela por su infinito apoyo incondicional, paciencia, entusiasmo y sus sabios consejos. Por la educación y cariño que han sido un factor muy importante para ser la persona que hasta el día de hoy soy, Gracias por la fortaleza que me transmiten para seguir mi camino, porque cada logro ha sido y será posible a ustedes.

A la profa. María de Lourdes Mayet Cruz y al prof. Alfredo Rafael Garzón Serra por ser mis sinodales, sobre todo por el tiempo dedicado para la revisión de este trabajo. Los comentarios y sugerencias que aportaron para la mejoría del mismo.

A la profesora Margarita Rodríguez, por compartir sus experiencias, entusiasmo y tolerancia.

A la Dra Lena Ruíz Azuara por proporcionar la Casiopeina III-ia® para que este trabajo se realizara.

A unas increíbles personas que me permitieron hacerlas parte de mi estancia y trabajo en el laboratorio por hacer más liviana la carga de trabajo, por cada instante compartido, risa, paciencia, gesto de amabilidad, consejos, pero sobre



AGRADECIMIENTOS

todo el gran cariño....mil gracias Jess, Maggy, Danielito y Josecito. Espero que esta amistad se fortalezca y conserve, LQM.

A los compañeros del laboratorio 112 y 113 (Ana, Jacque, Gaby, Pao, Memox, César, Joel, Luis y Geovanny) por reafirmar el trabajo en equipo en un buen ambiente de cordialidad.

A Claus, Rosario, Janete, Eva, Edgar, Alejandra, Maga, Diana, Alex, Fer, Francisco y cada uno de mis compañeros que compartieron diferentes momentos durante mi trayectoria académica, por la motivación cuando se presentaban momentos difíciles pero gracias a ellos se hicieron divertidos y menos tediosos.

A Dios por permitirme respirar día a día, por tener una familia, cada oportunidad y poner a grandes personas en mi camino.

A los proyectos por brindar los medios para el desarrollo del proyecto
PAPIIT – IN - 209609
PAIP – 6390 05
CONACYT 635012N

ÍNDICE GENERAL

	pág
Abreviaturas	
1.0 INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 OBJETIVOS.....	5
2.0 GENERALIDADES.....	6
2.1 Disolución.....	7
2.1.1 Prueba de disolución.....	7
2.1.2 Importancia de la disolución.....	8
2.1.3 Factores que afectan la velocidad de disolución.....	8
2.2 Disolución Intrínseca.....	10
2.3 Teorías de disolución.....	11
2.3.1 Noyes y Whitney.....	11
2.3.2 Nernst y Brunner.....	12
2.4 Métodos para determinar la velocidad de disolución.....	15
2.4.1 Método de la tableta suspendida.....	15
2.4.2 Método del disco rotatorio.....	16
2.4.3 Método de Wood.....	16
2.5 Cáncer.....	18
2.5.1 Factores que originan el Cáncer.....	18
2.5.2 Epidemiología.....	19
2.5.3 Tratamiento.....	19
2.5.3.1 Quimioterapia.....	20
2.6 Casiopeinas®.....	21
2.6.1 Casiopeina III-ia®.....	23
3.0 PARTE EXPERIMENTAL.....	26
3.1 Material.....	27
3.1.1 Sustancia de referencia.....	27

3.1.2	Reactivos.....	27
3.1.3	Equipo e instrumentos.....	28
3.2	Preparación de soluciones.....	28
3.2.1	Medio de disolución: Solución amortiguadora de acetatos 0.01M, pH 4.5 ±0.05.....	28
3.2.2	Solución amortiguadora de fosfatos 0.01M, pH 7.7±0.05.....	29
3.2.3	Hidróxido de sodio 1M.....	29
3.2.4	Ácido fosfórico 1M.....	29
3.2.5	Fase móvil: Buffer de fosfatos 0.01M, pH 7.7/Metanol (62:38)v/v%.....	29
3.2.6	Solución stock de Casiopeina III-ia® [10µg/mL].....	29
3.3	Procedimiento experimental.....	30
3.3.1	Determinación de las condiciones cromatográficas finales.....	30
3.4	Formación de la tableta de Casiopeina III-ia®.....	31
3.5	Validación del método analítico para la cuantificación de Casiopeina III-ia® en solución amortiguadora de acetatos, pH4.5.....	33
3.5.1	Linealidad del sistema.....	33
3.5.2	Precisión del sistema.....	34
3.5.3	Reproducibilidad.....	34
3.5.4	Exactitud.....	35
3.5.5	Selectividad.....	35
3.5.6	Estabilidad.....	35
	Temperatura ambiente y refrigeración por 24 hrs.....	35
	Temperatura de 37°C por 90min.....	36
3.5.7	Influencia del filtro.....	36
3.6	Evaluación del perfil de disolución.....	37
3.6.1	Cálculos.....	38
4.0	RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS.....	40
4.1	Condiciones cromatograficas finales.....	41
4.2	Formación de la tableta de Casiopeina III-ia®.....	42

4.3 Validación del sistema para la cuantificación de Casiopeina III-ia®.....	43
4.3.1 Linealidad y precisión del sistema.....	43
4.3.2 Reproducibilidad.....	46
4.3.3 Exactitud.....	47
4.3.4 Selectividad.....	48
4.3.5 Estabilidad.....	49
4.3.6 Influencia del filtro.....	53
4.4 Perfil de disolución intrínseca.....	54
5.0 CONCLUSIONES.....	58
APÉNDICE.....	59
6.0 BIBLIOGRAFÍA.....	63

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág
Figura 1 Esquema de disolución de una forma farmacéutica.....	8
Figura 2 Modelo de la capa de difusión.....	13
Figura 3 Determinación de la constante de disolución intrínseca (K).....	14
Figura 4 Aparato de Wood.....	17
Figura 5 Estructura química de la Casiopeina III-ia ®.....	24
Figura 6 Procedimiento para la formación de la tableta.....	32
Figura 7 Relación entre la respuesta y concentración.....	41
Figura 8 Cromatograma representativo de la Casiopeina III-ia.....	43
Figura 9 Cromatogramas de las diferentes soluciones para evaluar las interferencias entre el medio de disolución y el analito de interés.....	48
Figura 10 % de recobro de la estabilidad de Casiopeina III-ia: a) temperatura ambiente, b) refrigeración y c) baño de agua a 37°C.....	52
Figura 11 Perfiles de disolución de Casiopeina®: a) mg disueltos en cada vaso; b) mg promedio disueltos.....	55
Figura 12 Perfiles de disolución de Casiopeina III-ia ® presente en: a) vaso1, b) vaso 2 y c) vaso 3.....	61

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág
Tabla 1 Propiedades fisicoquímicas de Casiopeina III-ia®.....	24
Tabla 2 Parámetros farmacocinéticos en tres especies para Casiopeina III-ia®.....	25
Tabla 3 Condiciones cromatográficas reportadas para la cuantificación del analito.....	30
Tabla 4 Cantidad y fuerza de compresión necesaria para la formación de la tableta.....	31
Tabla 5 Diluciones efectuadas para la preparación de la curva patrón.....	33
Tabla 6 Resultados para la formación de la tableta.....	42
Tabla 7 Linealidad del sistema para cuantificar Casiopeina III-ia®.....	43
Tabla 8 Precisión del sistema para cuantificar Casiopeina III-ia®.....	44
Tabla 9 Relación entre la concentración experimental vs nominal.....	44
Tabla 10 Resultados de repetibilidad.....	45
Tabla 11 Resultados de reproducibilidad del método para la cuantificación de Casiopeina III-ia®.....	46
Tabla 12 Resultados obtenidos para evaluar la exactitud del método.....	47
Tabla 13 Estabilidad de las muestras a temperatura ambiente.....	50
Tabla 14 Estabilidad de las muestras almacenadas en refrigeración.....	50
Tabla 15 Estabilidad a 37°C.....	51
Tabla 16 Evaluación de la influencia del filtro de teflón 35µm.....	53
Tabla 17 Cantidad disuelta de Casiopeina® en solución amortiguadora de acetatos pH 4.5.....	54
Tabla 18 Áreas (respuesta) de la curva patrón para la interpolación de las muestras del perfil de disolución	60
Tabla 19 Concentración experimental en cada vaso, obtenida por interpolación en la curva patrón	60

ABREVIATURAS

mg	Miligramos
µg	Microgramos
mL	Mililitros
µL	Microlitros
nm	Nanómetros
Kgf	Kilogramo fuerza
µm	Micrómetros
NOM	Norma Oficial Mexicana
M	Molar
FDA	Food and Drug Administration
FEUM	Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos
USP	Farmacopea de los Estados Unidos
MDCK	Células del epitelio intestinal de perro
IP	Intraperitoneal
IV	Intravenoso
ERR%	Error Relativo debido a la Regresión
DEA%	Desviación Estándar Absoluta
CV%	Coficiente de Variación
DE	Desviación Estándar
r^2	Coficiente de determinación
m	Pendiente
b	Ordenada
rpm	Revoluciones por minuto
MeOH	Metanol
BF	Solución amortiguadora de fosfatos



I. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS



Tras la búsqueda de nuevos fármacos para el tratamiento quimioterapéutico del cáncer se ha sintetizado por la Dra Lena Ruíz Azuara y colaboradores, un grupo de compuestos de coordinación de Cobre (Casiopeinas®), que han demostrado tener actividad antineoplásica, cabe señalar que solo se han continuado los estudios con los compuestos (Casiopeina III-ia, Casiopeina II-gly y Casiopeina III-Ea) que presentan mayor actividad, por tal motivo a estos compuestos se les considera como fármacos prometedores, sin embargo solo la Casiopeina III-ia se encuentra en fase de investigación preclínica.

Como parte de esta investigación la Secretaria de Salud en México o la FDA en Estados Unidos, se encargan de establecer los procedimientos de pruebas para medicamentos y el desarrollo de nuevas formulaciones. Durante el estudio preclínico se evalúan los efectos tóxicos y farmacológicos del fármaco a través de pruebas *in vitro* e *in vivo* en animales de laboratorio. Se hacen ensayos de genotoxicidad y también estudios de la absorción y metabolismo del fármaco, la toxicidad de los metabolitos y la velocidad con que el fármaco y sus metabolitos se excretan del cuerpo. Esta etapa es indispensable para verificar la seguridad de las primeras fases de ensayos en el hombre.^{1,2}

La prueba de disolución se aplica como un control de calidad rutinario de algunas formas farmacéuticas sólidas orales³. También puede ser utilizada para proporcionar información acerca de las características de un fármaco, así como predecir y estudiar problemas de absorción de fármacos, principalmente en las etapas iniciales del desarrollo de un nuevo medicamento (elección de excipientes correctos) o para fármacos que aún se encuentran en etapa de aprobación.^{4,5}

Para que un fármaco, pueda ejercer su efecto, debe encontrarse en estado molecular libre y disuelto, por tal motivo es importante conocer su disolución intrínseca que se define como la velocidad de disolución de sustancias puras bajo condiciones de área superficial constante expresada en $\text{mg}/\text{min}/\text{cm}^2$.¹⁶

Con base en lo mencionado, se dice que cuando un fármaco tiene baja disolución intrínseca, su disolución es el paso limitante en la cadena de eventos cinéticos. Kaplan y Wood en conjunto con sus colaboradores, indicaron que fármacos con una velocidad de disolución intrínseca mayor a 1 mg/min/cm^2 en general no presentan una velocidad de disolución limitante para su absorción. Los fármacos con velocidades de disolución intrínseca menores a 0.1 mg/min/cm^2 generalmente presentan una disolución lenta, que es limitante para su absorción.⁶

El objetivo será el método analítico por HPLC para la cuantificación de muestras del perfil de disolución intrínseca de Casiopeina III-ia (antineoplásico) empleando como medio solución amortiguadora de acetatos pH 4.5 que simula las condiciones en el intestino delgado, ya que es necesario contar con un método confiable para la evaluación de la constante de disolución intrínseca (K_{int}).

La validación del método analítico se realizó tomando en consideración lo indicado por la guía de validación de métodos analíticos (CNQFBM) y la NOM-177-SSA1-1998, los parámetros a evaluar son:

- Linealidad
- Precisión (repetibilidad y reproducibilidad)
- Exactitud
- Especificidad
- Estabilidad

Con un método lineal y preciso en el intervalo de concentración de $2\text{-}25\mu\text{g/mL}$, se realizó la prueba de disolución empleando el aparato de Wood, utilizando una tableta con superficie homogénea, bajo condiciones de temperatura, velocidad de agitación, pH y tiempos de muestreo establecidos previamente, el monitoreo se realizó por un lapso de 60min.



INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Una vez efectuada la cuantificación por HPLC-UV, se graficó la cantidad disuelta del fármaco vs tiempo para obtener la constante de disolución intrínseca la cual proporciona información de la cantidad de Casiopeina disuelta por minuto en condiciones ácidas, y poder determinar si la disolución es el paso limitante para su absorción.

Objetivos

- ❖ Desarrollo y validación del método analítico de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC), para la cuantificación de Casiopeina III-ia (antineoplásico).
- ❖ Realizar el perfil de disolución y determinar la constante de disolución intrínseca de la Casiopeina III-ia en solución amortiguadora de acetatos (pH=4.5) como medio de disolución. Empleando el aparato de Wood.

2. GENERALIDADES

2.1 DISOLUCIÓN

La disolución es el proceso por medio del cual una sustancia se dispersa en otra a nivel molecular y de forma homogénea, el proceso está determinado por la afinidad entre ambas especies moleculares.⁷

La velocidad de disolución se define como la cantidad de fármaco que va en la solución por unidad de tiempo bajo condiciones estandarizadas de la interfaz líquido / sólido, la temperatura y la composición de los disolventes..^{6,8}

2.1.1 Prueba de disolución

Es una prueba física de carácter farmacopeico, que determina la cantidad disuelta de un fármaco contenido en una forma farmacéutica sólida en función del tiempo,⁹ en condiciones experimentales controladas (temperatura, composición del medio, velocidad y tiempo de agitación, etc.).

Si el principio activo está incluido en una forma farmacéutica sólida deberá, ser liberado de ésta, seguido de la disolución (solubilización de las partículas del fármaco) en el medio y difundirse para ser absorbido. Dicho proceso se puede observar en la Figura 1.

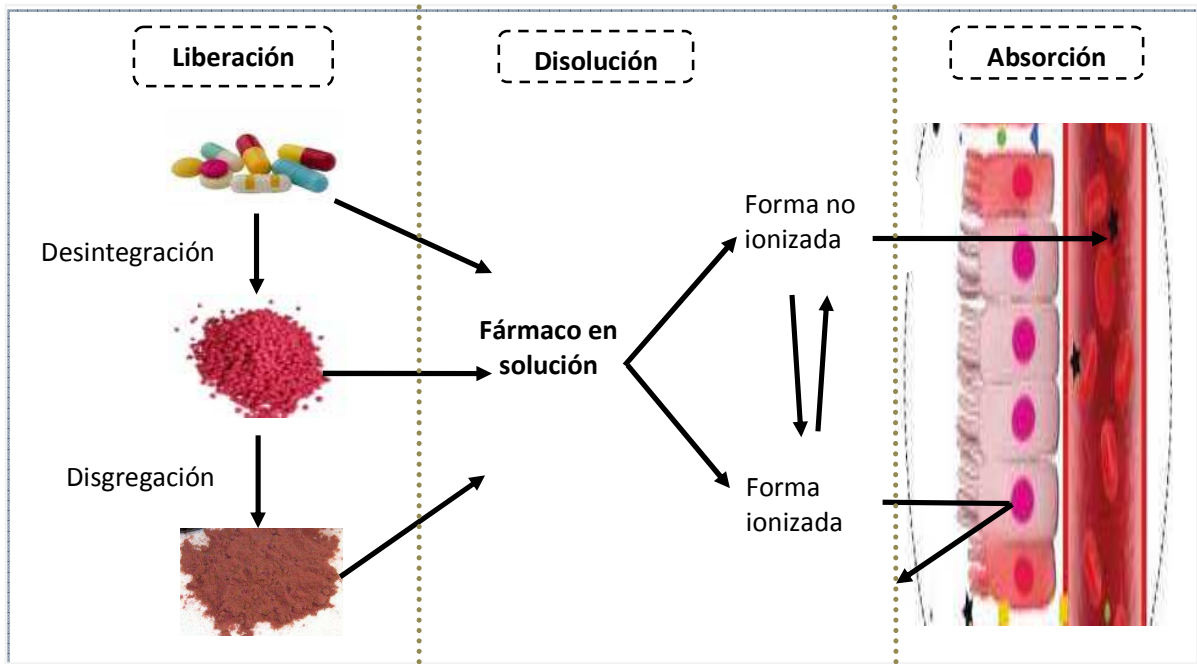


Figura 1. Esquema de disolución de una forma farmacéutica.

2.1.2 Importancia de la disolución^{10,11}

Las pruebas de disolución in vitro son utilizadas principalmente para:

- Evaluar la calidad en un producto farmacéutico
- Guiar el desarrollo de nuevas formulaciones
- Establecer una correlación in vitro/ in vivo, a efecto de establecer la bioequivalencia de productos genéricos.

2.1.3 Factores que afectan la velocidad de disolución^{5,6,12}

❖ Propiedades fisicoquímicas del fármaco

- Tamaño de partícula
- Estado cristalino o amorfo
- Densidad
- pKa
- Grado de hidratación

- Estado químico (ácido, base o sal)
- ❖ Formulación
 - Excipiente (aglutinantes, desintegrantes, diluentes, lubricantes, etc)
 - Fuerza de compresión
 - Humedad
 - Método de granulación
- ❖ Medio de disolución
 - Temperatura
 - pH
 - Viscosidad
 - Fuerza iónica
 - Gases disueltos
- ❖ Equipo utilizado para la evaluación
 - Tipo de aparato
 - Velocidad de agitación
 - Vibraciones del equipo
 - Volumen del medio de disolución
 - Bamboleo de los ejes
- ❖ Medio ambiente
 - Almacenaje
 - Empaque (temperatura y humedad)

Cuando el proceso de disolución del principio activo presenta una cinética de disolución y difusión inferiores a la velocidad de absorción, se dice que la disolución es el paso limitante para los procesos posteriores. Esto es particularmente aplicable a fármacos poco solubles en medio acuoso. Por el contrario, un fármaco muy hidrosoluble se disolverá con rapidez y el paso limitante puede ser la velocidad a la que atraviesa la membrana gastrointestinal (limitado por la permeabilidad).¹³

Generalmente se manejan dos términos relacionados con la disolución de un sólido en un líquido. Uno de ellos es la velocidad de disolución intrínseca para una sustancia pura. El segundo término es el de velocidad aparente de disolución, el cual se aplica al proceso de disolución de fármacos contenidos en un medicamento, sin considerar una superficie constante del sólido.^{14,15}

2.2 Disolución intrínseca

Se define como la velocidad de disolución de sustancias puras bajo condiciones de área superficial constante^{6,8}, también se dice que es la velocidad de transferencia de masa desde la superficie sólida a la fase líquida y suele expresarse en $\text{mg}/\text{min}/\text{cm}^2$.¹³

El conocimiento de disolución intrínseca es de vital importancia en la investigación de nuevos fármacos, debido a que mide las propiedades intrínsecas del fármaco¹³ y es una herramienta para la selección de los excipientes en la obtención de una formulación apropiada para la optimización de la eficacia fisiológica de nuevas formas de dosificación.⁴

La velocidad de disolución intrínseca de un fármaco debe ser determinada en función del pH dentro del rango fisiológico, en medios acuosos a 37 ± 0.5 °C y un volumen del disolvente entre cinco o diez veces mayor al de saturación. La técnica del disco rotante, diseñada por Wood (1965) es la más utilizada.¹⁶

2.3 Teorías de disolución

Una vez que el sólido ha comenzado a sufrir el proceso de humectación, se inicia el fenómeno de disolución de las moléculas de éste en el líquido.

Cuando se trata de una sustancia pura, cuyo tamaño de partícula es homogéneo (polvo monodisperso), la determinación del proceso físico que ocurre y el tratamiento matemático de datos experimentales de disolución son más simples que cuando se trata de formas farmacéuticas sólidas.¹⁶

2.3.1 Teoría de Noyes y Whitney

En 1897, Noyes y Whitney estudiaron en términos cuantitativos la velocidad a la cual un sólido se disuelve en un disolvente y publicaron la teoría de la velocidad de disolución en su artículo: "The rate of solution of solid substances in their own solution"

Sugieren que la velocidad de disolución está controlada por una capa muy delgada de solución saturada (capa estacionaria) que se forma instantáneamente alrededor de una partícula sólida. De esta manera, el principio activo disuelto en la capa estacionaria se difunde al medio de disolución de una región de alta concentración a una región de baja concentración.^{7,17}

Basado en la segunda Ley de difusión de Fick, ellos establecen una ecuación para explicar sus resultados.

$$\frac{dc}{dt} = K(C_s - C_t) \dots\dots\dots (1)$$

Donde:

dc/dt = velocidad de disolución del sólido en el líquido disolvente.

K = constante de proporcionalidad denominada constante de disolución y esta obedece primer orden cinético.

C_s = concentración de saturación del sólido.

C_t = concentración del sólido a tiempo t .

Esta ecuación establece que la velocidad de disolución, es directamente proporcional a un gradiente de concentración y la constante K, es característica de un sistema o condiciones dadas de disolución (temperatura, agitación, forma del recipiente, coeficiente de difusión).

Ellos demostraron que la velocidad de difusión intrínseca es proporcional al área superficial S del sólido expuesto a la acción disolvente de un líquido,¹⁸ obteniendo la siguiente ecuación:

$$\frac{dc}{dt} = KS(C_s - C_t) \dots\dots\dots (2)$$

Donde:

dc = velocidad de disolución del sólido en líquido solvente

S = superficie del sólido.

2.3.2 Teoría de Nernst y Brunner

En 1904, Nernst y Brunner incorporaron la primera ley de Fick de difusión estacionaria en la ecuación (2) para incluir una nueva relación entre la disolución constante y el coeficiente de difusión del soluto (D), el espesor de la capa de difusión estancada (h) y el volumen del medio de disolución (V).¹⁹

Propusieron que una capa delgada de líquido (de h espesor) se forma alrededor de la partícula del sólido y es estacionaria. La concentración del soluto en esta capa es igual a la concentración de saturación (Cs) y la concentración en el resto del líquido a una distancia h de la partícula sólida será Ct.¹⁸ el gradiente de concentración existe entre ambas.

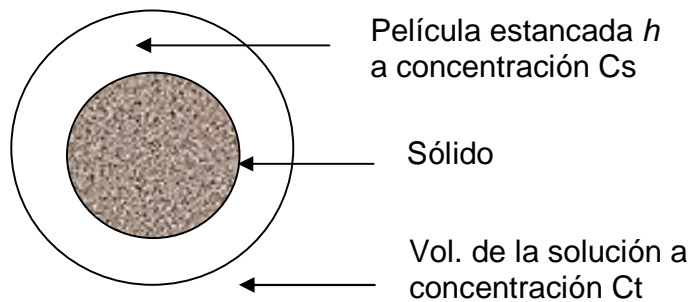


Figura 2. Modelo de la capa de difusión

La difusión ocurre desde esta capa hacia el volumen del solvente (figura 2).

Obteniéndose la siguiente ecuación:

$$\frac{dc}{dt} = K \frac{DS}{Vh} (Cs - Ct) \dots\dots\dots (3)$$

Donde:

dc/dt = velocidad de disolución del sólido en el líquido solvente.

D = Coeficiente de difusión de la molécula del soluto.

S = Superficie del sólido a partir del cual se realiza la disolución.

V = volumen del disolvente.

h = espesor de la capa estacionaria.

Si el movimiento es relativamente grande entonces $C_t \ll C_s$, se decide que la condición es sink y por tanto la concentración del fármaco en el medio de disolución, un vez disuelta en su totalidad del mismo, corresponde al 10- 30% de su C_s ^{6,20}. En este caso el gradiente de concentración podría ser reducido a C_s , el cual es una constante

$$\frac{dc}{dt} = K \frac{DS}{Vh} C_s \dots\dots\dots (4)$$

En condiciones sink a un volumen y área superficial constante, la ecuación se reduce a:

$$\frac{dc}{dt} = K \dots\dots\dots (5)$$

La ecuación (5) muestra el modelo de línea recta donde $m = K$ y el intercepto es igual a cero.

Al graficar cantidad disuelta del fármaco contra tiempo se obtiene una línea recta, cuya pendiente se divide entre el área superficial constante para obtener la Constante de disolución intrínseca K . (figura 3).

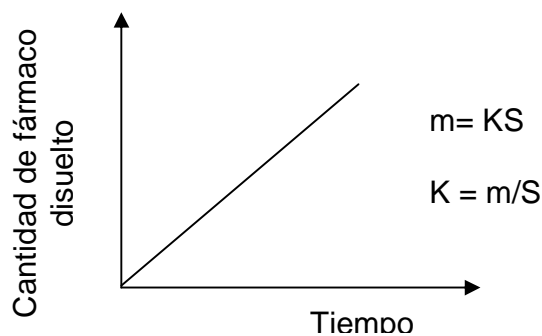


Figura 3. Determinación de la constante de disolución intrínseca (K)

La ecuación (5) indica que en condiciones de dilución infinita el proceso de disolución, estará caracterizado por una constante de velocidad K de orden cero, es decir, el proceso es independiente de la concentración del soluto.¹⁶

Por consiguiente, para fármacos que son escasamente solubles, la velocidad de disolución de las partículas juega un papel fundamental en la determinación de la biodisponibilidad⁶.

La teoría de la capa estacionaria (Nernst y Brunner) y la ecuación de Noyes-Whitney, permiten establecer que:

- ❖ Las partículas pequeñas de sólido se disuelven más rápidamente que las grandes, ya que presentan una mayor área disponible para interactuar con el disolvente.

En 1972 Kaplan determinó que si:

$K > 1\text{mg}/\text{min}/\text{cm}^2$ en general los fármacos no presentarán una velocidad de disolución limitante para su absorción, no deberían presentar problemas con la biodisponibilidad o la disolución.^{6, 13, 16}

$K < 0.1\text{mg}/\text{min}/\text{cm}^2$ los fármacos tienen una velocidad de disolución lenta, que es limitante para su absorción. Presentan problemas con la biodisponibilidad o la disolución.^{6, 13, 16}

2.4 Métodos para determinar la velocidad de disolución intrínseca.

Los métodos para la determinación de la disolución intrínseca de fármacos, son los siguientes:

2.4.1 Método de la tableta suspendida

Nelson (1958) diseñó un método para estudiar la velocidad de disolución, conocido como método de la tableta suspendida²⁰. El fármaco se comprime utilizando una presión de $1000\text{ Kg}/\text{cm}^2$ formando una tableta la que se coloca sobre una lámina de aluminio y se cubre con una capa de cera, de manera que solamente una cara circular es expuesta.

La lámina con la tableta se suspende desde un brazo (vastago) de una balanza. La disolución es después seguida por el registro de la pérdida del peso de la tableta durante un periodo de tiempo. El área superficial del fármaco expuesto hacia el medio de disolución es constante durante la prueba.⁸

2.4.2 Método del disco rotatorio^{18,21}

El método del disco rotatorio fue desarrollado por Eino Nelson y descrito por Levy y Salí (1962). El fármaco se comprime utilizando una prensa hidráulica, aplicando una fuerza de compresión de 50 000 Lb/in.

Las tabletas no desintegrables o discos son colocados en un soporte acrílico así que solamente un área de superficie es expuesta en el medio de disolución. El soporte es unido a través de una barra de metal, la cual se conecta a un motor de agitación. La tableta fija al soporte, se sumerge en un matraz de 3 bocas, conteniendo el medio de disolución. Se debe de estar libre de vibración; el motor debe mantener la velocidad de rotación en el período de tiempo establecido.

Levi y Tanski (1964) modificaron el aparato para la determinación de la velocidad intrínseca por el método del disco rotatorio. Proporcionando una mejor precisión en el control de rotación con un rango de 3 a 400 rpm manteniendo constante la velocidad. Un rango de esta magnitud es necesario para determinar velocidades de disolución a varias velocidades de agitación.

2.4.3 Método de Wood^{21,23,24}

En 1963 el Doctor John Wood, diseñó una técnica para la prueba de disolución intrínseca. La técnica consiste en compactar cierta cantidad de fármaco puro en una matriz de 0.5 cm² de área expuesta a una determinada presión, la cual se coloca en un vástago que se hace girar a cierto número de revoluciones por minuto.

El aparato de Wood (figura 4) consta de las siguientes partes:

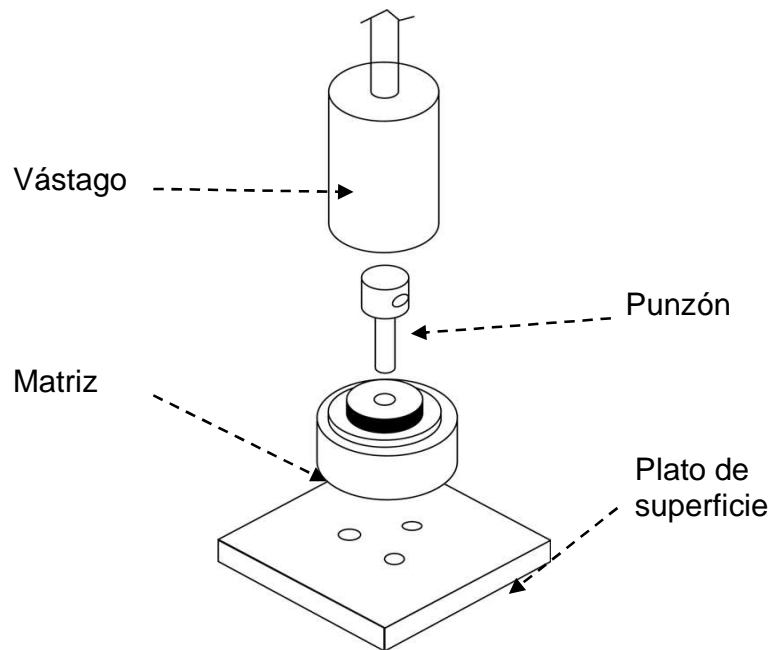


Figura 4. Aparato de Wood

Consta de un punzón, matriz donde se deposita el fármaco y una base que tiene agujeros roscados que atornillan a la matriz, posteriormente se coloca el punzón para llevar a cabo la compactación, una vez compactado el fármaco se desmonta el punzón y desatornilla la base para obtener una sola cara de la tableta que será expuesta al medio de disolución que se evaluará, bajo condiciones de temperatura, pH, agitación y volumen de medio de disolución ya establecidos previamente al estudio.

2.6 Cáncer

El cáncer es un conjunto de enfermedades que se caracterizan por el crecimiento y diseminación incontrolados de células (errores en los sistemas de control genético que regulan el crecimiento y muerte celular), la falta de diferenciación, la invasión de tejidos locales y metástasis en puntos distantes del organismo.^{25,26}

Si la célula pierde la capacidad de morir cuando debe y prolifera descontroladamente, producirá un tumor o neoplasma que puede ser maligno o benigno³³. Las principales características que diferencian a los tumores son: la capacidad de crecimiento y la invasividad hacia otros tejidos (metástasis).^{27,28}

Muchos tipos de cáncer se podrían prevenir evitando la exposición a factores de riesgo comunes como el humo de tabaco. Además, un porcentaje importante de cánceres pueden curarse mediante cirugía, radioterapia o quimioterapia, especialmente si se detectan en una fase temprana.

El cáncer o neoplasia se clasifica en cuatro tipos principales, de acuerdo al tipo celular y tejido a partir del cual se desarrollan: Carcinomas, aquellos que se desarrollan a partir del epitelio; Sarcomas, que se desarrollan a partir del tejido conectivo o células musculares; Derivado del sistema nervioso; Leucemias, las cuales son tipos de cáncer que se derivan de células hematopoyéticas.^{29,25}

2.6.1 Factores que originan el cáncer

El desarrollo del cáncer depende de diversos factores; la evidencia científica muestra correlaciones con el tabaquismo, consumo de alcohol, sedentarismo, sobrepeso y obesidad; la exposición a radiación ionizante y ultravioleta, a ciertos productos químicos y las infecciones por virus como hepatitis B y C, así como del Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) y el Virus de Papiloma Humano (VPH); algunos tipos de cáncer como el de mama, pueden tener además una correlación genética. Por otro lado, se han encontrado diferencias epidemiológicas entre los

países, las cuales pueden deberse a factores ambientales, estilos de vida, hábitos, genética y alimentación.^{30,31}

El daño causado por los factores antes mencionados puede ser a nivel: Genotóxico (lesión de material genético de la célula) y/o No genotóxico (alteración en factores que estimulan la proliferación celular).³²

2.6.2 Epidemiología del cáncer³³

A nivel mundial, el cáncer es la primera causa de mortalidad. En 2007, fallecieron en el mundo por alguna neoplasia 7.9 millones de personas de los cuales 11.3% del total son varones y 14.5% mujeres.

Los principales tipos de cáncer a nivel mundial que presentan mayor índice de muertes son:

- pulmonar (1,4 millones de defunciones)
- gástrico (740 000 defunciones)
- hepático (700 000 defunciones)
- colorrectal (610 000 defunciones)

Pese a que se cuenta con información para el pronóstico y comportamiento de los diferentes tipos de cáncer, las cifras no se ven disminuidas, debido que el tratamiento, factor importante para aumentar la calidad de vida de cualquier ser vivo, éste aún no es óptimo.

2.6.3 Tratamiento

El principal problema en la terapia del cáncer radica en la dificultad para eliminar solamente a las células cancerosas sin afectar a otras células o tejidos. En la actualidad se cuentan con cinco tratamientos para el cáncer los cuales son: cirugía, quimioterapia, terapia hormonal, terapia biológica, radioterapia. Pueden ser empleados de forma independiente o en combinación, esto dependerá del tipo de cáncer, el grado de diseminación, ubicación y edad, entre otros factores.^{34,35}

Abordando el tratamiento por Quimioterapia, esta consiste en la administración de agentes químicos (medicamentos) de acción intensa, para curar cualquier afección en un organismo de manera sistémica. Los medios que generalmente se emplean para su administración son la vía oral y la intravenosa.

La mayoría de los quimioterapéuticos actuales actúan de modo primario sobre la síntesis, la reparación o la función de macromoléculas; es decir, sobre la producción o la función de ADN, el ARN o las proteínas.³⁶

Los agentes quimioterapéuticos se pueden clasificar de acuerdo a: su naturaleza, efecto en el ciclo celular y mecanismo de acción.^{36,37}

Naturaleza: considera únicamente la procedencia de los compuestos usados:

- Extraídos de productos naturales
- Sintéticos: inorgánicos y orgánicos

Efecto en el ciclo celular: de acuerdo con los efectos que ejerce sobre el ciclo celular:^{36,37,38}

- Ciclo específico: es citotóxico sólo en la fase celular (G0, G1, G2, S o M).
- No ciclo específico: es citotóxico en cualquier fase del ciclo celular.

Mecanismo de acción: con base en los efectos biológicos que tienen en el organismo.

- Fármacos alquilantes
- Fármacos intercalantes
- Antimetabolitos (análogos estructurales)
- Antibióticos
- Enzimas
- Anticuerpos

- Hormonas e inhibidores de hormonas

Entre los medicamentos que actualmente están en desarrollo clínico se encuentran: los inhibidores de transición de microtúbulos, antimetastásicos, agentes antiangiogénicos, agentes hipóxicos específicos de células madre, fármacos radiosensibilizantes de células malignas y radioprotectores de células sanas, agentes citoprotectores, vacunas, factores de crecimiento, inhibidores de reparación del ADN y compuestos a base de metales de transición.

La finalidad de estos nuevos quimioterapéuticos es que sean económicos, menos tóxicos y más efectivos para combatir la enfermedad.^{36,37,38}

2.7 Casiopeinas

La investigación actual se centra en el diseño racional de nuevos complejos de cobre como agentes potenciales antitumorales. Debido a sus propiedades como un metal reactivo redox, el cobre y sus complejos tienen la habilidad de catalizar la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) que pueden causar la modificación oxidativa de componentes celulares (lípidos, proteínas y DNA) e invertir el balance redox en la célula, y/o puede o no intercambiar alguno de sus ligantes presumiblemente el donador O-O para coordinarse directamente con los donadores por nitrógeno de las bases.^{39,40,41}

A finales de los 70's, en la Facultad de Química de la UNAM, se inició un proyecto encaminado al desarrollo de antineoplásicos a partir de metales de transición, de preferencia esenciales biológicamente, con el propósito de disminuir toxicidad y costo. Se sintetizó una familia de compuestos de coordinación de Cobre (II) como centro metálico, nombrados Casiopeinas ®^{42,43}, en su esfera de coordinación presentan un ligante bidentado del tipo diimina sustituida aromática (1,10-fenantrolina ó 2,2'-bipiridina) y otro que puede ser aminoacidato (N-O) o donador de oxígeno (O-O). Estas características se reflejan en las propiedades de los

complejos en términos de solubilidad, potencial electroquímico, capacidad de transporte a través de membranas y estabilidad, de tal manera que se lleve a cabo una interacción de estos compuestos con el DNA (intercalación o no intercalación), lo cual se propone como mecanismo de acción.^{39,44,45}

Estos compuestos han demostrado tener actividad citostática, citotóxica, genotóxica y antineoplásica en modelos tanto *In vitro* como *In vivo*. Su modo de acción se encuentra basado en que pueden inhibir la proliferación celular y producir la muerte celular dosis-dependiente por apoptosis a través de mecanismos dependientes e independientes de activación de caspasas,^{46,47,48} debida a las señales que pueden estar mediadas por generación de ROS, por la toxicidad mitocondrial observada ó ambos. Como resultado del daño en los sitios mitocondriales se tienen la inhibición de la respiración y la síntesis de ATP, los cuales son procesos dependientes de energía en las células.⁴⁹

Tras la administración *In vivo* de las Casiopeinas® se ha observado que produce daños severos en los eritrocitos que se expresan como anemia hemolítica⁵⁰, por ello se tiene la hipótesis de que existen otros blancos celulares que están involucrados en el mecanismo. Con base en estos resultados se ha seleccionado a [(Cu(N-N)(acac)] NO₃ (figura 5) y [(Cu(N-N)(gly)] NO₃ con varios sustituyentes en el ligando diimina para estudios de relación estructura-actividad (QSAR) donde se encontró que la presencia del anillo aromático central en los complejos tipo fen, es necesario para preservar la actividad antiproliferativa y que los sustituyentes electrodonadores en el ligante diimina al ser oxidantes más débiles, una vez reducidos incrementan el desbalance redox en la célula y por ende se obtiene una mayor actividad.

Mediante los estudios QSAR se obtuvo que la hidrofobicidad puede participar tanto en la interacción con algún receptor como en el transporte pasivo a través de membranas.⁵¹

2.7.1 Casiopeina III-ia ®

La Casiopeina® ha demostrado tener actividad citostática, citotóxica y ligera genotoxicidad en linfocitos humanos tanto *in vitro* como *in vivo*, actividad antineoplásica sobre líneas de cáncer cervico-uterino (HeLa) y carcinoma de células escamosas de cérvix (SiHa).⁴⁵ Actúa como inhibidor de la fosforilación oxidativa en la mitocondrias.⁵²

Propiedades fisicoquímicas

Polvo fino, homogéneo color azul. A temperatura ambiente es soluble en agua, metanol, etanol y soluciones fisiológicas (MOPS y TRIS) a pH 7.4. Presenta inestabilidad a la luz en solución, se descompone a pH muy ácido (pH=2) o a pH muy básico (pH>8); es estable en solución de cloruro de sodio al 0.9% (9 días), solución de dextrosa al 5% (4 días) y en solución de Hartman (4 semanas).^{53,54}

Tabla 1 Propiedades Fisicoquímicas de la Casiopeina III-ia®.

Peso molecular	444.93 g/mol con dos moléculas de agua
Estado	Sólido
Coeficiente de reparto	0.3580
pKa	8.25

Nombre químico

[Cu(4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina)(acetilacetionato)]NO₃

Fórmula química condensada

C₁₇ H₁₉ Cu N₂ O₂ * NO₃⁴⁴

Estructura química

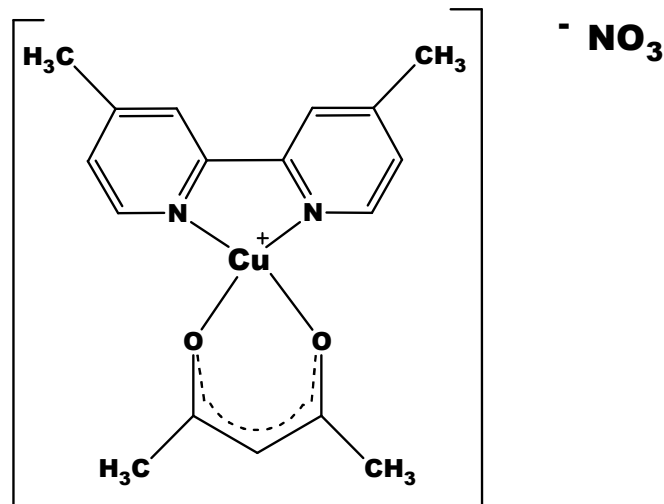


Figura 5. Estructura química de Casiopeina III-ia ®

Mecanismo de acción

Inhibe la fosforilación oxidativa en mitocondrias de hígado de rata. Se propone que el citocromo b-c1 o la citocromo oxidasa sean el sitio de acción⁵⁵

De acuerdo con las investigaciones realizadas de la posible interacción con el DNA, se ha encontrado que el grado de afinidad de la Casiopeina con las diferentes bases púricas y pirimídicas, se lleva a cabo únicamente con la adenina, al parecer a través del establecimiento de enlaces π, que tienden a romperse cuando cualquier compuesto con mayor afinidad se encuentra presente en el sistema. Sin embargo, se propone la intercalación de la Casiopeina con la molécula del DNA.⁵⁶

Por otra parte, se ha pensado que el cobre y sus propiedades electrónicas están directamente involucrados en reacciones de óxido-reducción mediadas por oxígeno, lo que puede causar la pérdida del potencial de membrana mitocondrial con cambios en su permeabilidad y liberación de factores apoptogénicos.⁴⁶

Farmacocinética

Tabla 2. Parámetros farmacocinéticos en tres especies para la Casiopeina® III-ia.⁵⁷

Parámetro farmacocinético	Rata	Perro	Conejo
Dosis	9.0 mg/Kg	3.0 mg/Kg	9.0 mg/Kg
Depuración	0.45 mL/min	-	1.46 mL/min
Volumen de distribución	0.462 L	-	0.0167 L
Tiempo medio de residencia	17.14 h	2 semanas	86 min
Vida media de eliminación	12.46 h	-	57 min

Los resultados obtenidos de permeabilidad en células MDCK, muestran que el transporte por el cual la Casiopeina III-ia atraviesa la membrana es difusión pasiva, favoreciendo la distribución en el organismo al administrarse por vía intraperitoneal, ubicándola en un compuesto que se absorbe bien (entre un 70-100%), por lo que se puede clasificar como un fármaco permeable.⁵⁴

Toxicidad

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

Dosis letal 50 en rata macho Wistar (I.P) es de 14.36 mg/Kg y 5.51 mg/Kg (I.V)

Dosis letal 90 en rata macho Wistar (I.P) es de 15.44 mg/Kg y 7.0 mg/Kg (I.V).⁵⁸

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Material

- Matraces volumétricos de 10 mL
- Matraz volumétrico de 100 mL
- Matraz volumétrico de 1000 mL
- Matraz volumétrico de 5000 mL
- Tubos de ensaye
- Naves de pesado
- Espátula
- Termómetro
- Cronómetro
- Piseta
- Probeta de 500 mL
- Filtros
- Jeringas de 5 mL

3.1.1 Sustancias de Referencia

Casiopeina III-ia [Cu (4,4'-dimetil-bipiridina)(acetilacetonato)](NO₃*H₂O; peso molecular 426.92 g/mol. Lote 206MBG290609. Se considera con una pureza del 100%.

3.1.2 Reactivos

- Metanol grado HPLC (CH₃OH), Tecnolab.
- Acetato de sodio anhidro (CH₃COONa), J.T. Baker, lote
- Fosfato de sodio monobásico monohidratado cristal (NaH₂PO₄ * H₂O), J.T.Baker, lote K15460
- Fosfato de sodio dibásico anhidro polvo (Na₂HPO₄), J.T. Baker, lote H34C14
- Ácido acético glacial), J.T. Baker, lote Y45C60
- Agua grado HPLC (destilada, desionizada y filtrada)

3.1.3 Equipos e instrumentos

Cromatógrafo de líquidos Shimadzu con:

- Bomba isocrática (modelo LC10Avp)
- Detector UV de longitud de onda variable (modelo SPD 10Avp)
- Inyector
- Columna xTerra Rp18, 5 μ m ,150mm
- Prensa hidráulica
- Aparato de Wood
- Equipo desionizador de agua Milli-Q
- Equipo de filtración de disolventes Millipore
- Potenciómetro Orion model 420A
- Balanza analítica Sartorius A210P
- Sonicador Fisher Scientific FS 60
- Disolutor Vankel VK7000
- Micropipeta Transferpette 100-1000 μ L
- Micropipeta Science Med 1000-5000 μ L

3.2 Preparación de disoluciones

3.2.1 Solución amortiguadora de acetato de sodio 0.01M pH 4.5.

Medio de disolución.

Pesar aproximadamente 0.3640g de acetato de sodio anhidro (CH_3COONa) y colocarlo en un matraz volumétrico de 1000mL. Adicionar agua desionizada y disolver, ajustar el pH a 4.5 con ácido acético glacial 1M ó hidróxido de sodio (NaOH) 1M, llevar a volumen con agua desionizada. Desgasificar por medio de un sistema de vacío.

3.2.2 Solución amortiguadora de fosfato de sodio 0.01M pH 7.7.

Preparación de la fase móvil

Pesar aproximadamente 1.1137g de fosfato de sodio monobásico monohidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) y 0.2738g de fosfato de sodio dibásico anhidro (Na_2HPO_4) en agua desionizada. Si es necesario ajustar el pH a 7.7 con ácido fosforito 1M ó hidróxido de sodio (NaOH) 1M llevar a volumen con agua desionizada.

3.2.3 Hidróxido de sodio 1M

Pesar aproximadamente 4g de NaOH, disolver en 50mL de agua desionizada. Transferir a un matraz aforado de 100mL, aforar con agua desionizada.

3.2.4 Ácido fosfórico 1M

Verter 5.8 mL de ácido fosfórico concentrado en 50 mL de agua desionizada. Transferir a un matraz aforado de 100 mL, aforar con agua desionizada.

Metanol. Preparación de la fase móvil

Filtrar 160 mL de Metanol grado HPLC por medio del equipo de filtración de disolventes Millipore.

3.2.5 Fase móvil. Solución amortiguadora de fosfatos 0.01 M pH7.7: Metanol (62: 38)

Para preparar 400mL mezclar 248 mL de solución amortiguadora de fosfatos y 152mL de metanol. Sonicar por 30min.

3.2.6 Solución stock de Casiopeina III-ia® (100µg/mL)

Pesar 0.0100 g de Casiopeina III-ia®, transferir a un matraz volumétrico de 100 mL disolver con agua desionizada y llevar al aforo con el mismo. Concentración final 100µg/mL.

3.3 Procedimiento experimental

3.3.1 Determinación de las condiciones cromatográficas para la cuantificación del analito de interés.

Tomando como base las condiciones de diferentes métodos analíticos ya reportados para la cuantificación por cromatografía de líquidos de alta resolución de Casiopeina III-ia® (Tabla 3). Se procedió al desarrollo del método analítico haciendo variaciones en velocidad de flujo, columna, composición y proporción de fase móvil, con la finalidad de generar condiciones cromatográficas óptimas.

Tabla 3. Condiciones cromatográficas reportadas para la cuantificación del analito.

	Columna	Fase móvil	Flujo (mL/min)	Longitud de onda (nm)	Tiempo de retención (min)	Ref. bibliográfica
Casiopeina III-ia	C18	Metanol:solución amortiguadora de fosfatos:Hexansulfonato de sodio pH 6.9	---	274	5.7	(60)
	C18, 250 x 4.6 mm	Solución amortiguadora de fosfatos:metanol (0.01M, pH 8) (60:40)	1 mL/min	296	3.5	(59)
	C18, 2.50 x 4.6 mm, 5 µm	Solución amortiguadora de fosfatos:metanol (0.01M, pH 6.2) (60:40)	0.8	262	5.0	(57)
	C18, 250 x 4.6 mm, 5 µm	Metanol: solución amortiguadora de fosfatos 0.01M, pH 6.7:Hexansulfonato de sodio 5mM (30:65:5)	0.8	274	6.73	(57)
	C18, 3.5mm, 4.6 x150mm	Solución amortiguadora de fosfatos:metanol (0.01M, pH 8) (60:40)	0.5	296	5.8	(54)

Una vez obtenidas las condiciones cromatográficas óptimas, se procede a la validación del método.

3.4 Formación de la tableta de Casiopeina III-ia®.

Se realizaron pruebas de compactación en el aparato de Wood y una prensa hidráulica (Figura 4) para conocer la cantidad mínima (mg) de Casiopeina III-ia® y la fuerza de compresión necesaria para obtener una tableta íntegra y uniforme.

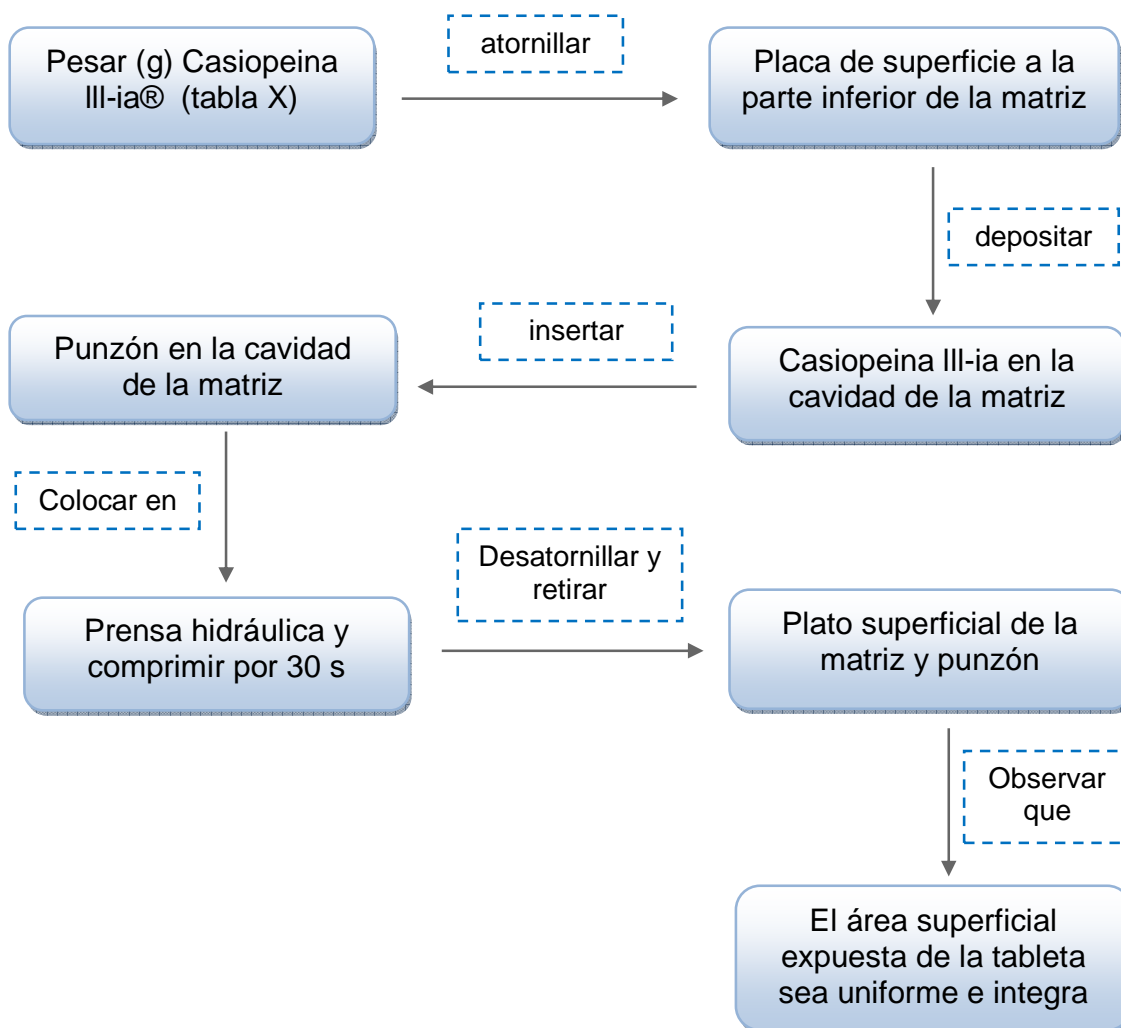
A continuación se presentan las cantidades (mg) y fuerza de compresión probadas (Kg/cm^2) para la formación de la tableta, (Tabla 4), que fue producida de acuerdo al procedimiento que se indica en la Figura 7.

Tabla 4. Cantidad y fuerza de compresión necesaria para la formación de la tableta.

Tableta	Casiopeina III-ia® (mg)	Fuerza de compresión (Kg/cm^2)
A	150	3000
B	200	4000

La cantidad y fuerza de compactación mínima necesaria, para obtener una tableta que cumple, con las especificaciones requeridas para el desarrollo del perfil de disolución intrínseca corresponden a la tableta B (Tabla 4).

Figura 6. Procedimiento para la formación de la tableta



3.5 Validación del método analítico para la cuantificación de Casiopeina III-ia® en solución amortiguadora de acetatos pH 4.5 ± 0.05

Preparación de la curva patrón

Tomar alícuotas de la solución stock de Casiopeina III-ia® [100µg/mL], tal y como se muestra en la Tabla 5. Aforar a 10mL con solución amortiguadora de acetatos [0.01 M], pH 4.5.

Tabla 5. Se presentan las diluciones efectuadas para la preparación de la curva patrón.

punto	Alícuota stock (mL)	Aforo (mL)	Concentración (µg/mL)
1	0.2	10.0	2.0
2	0.6	10.0	6.0
3	1.0	10.0	10.0
4	1,4	10.0	14.0
5	1.8	10.0	18.0
6	2.5	10.0	25.0

3.5.1 Linealidad del sistema

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

Para evaluar la linealidad del sistema se prepararon 3 curvas del analito en el medio de disolución, en el intervalo de concentraciones establecido (Tabla 5). Con estos datos calcular coeficiente de correlación (r), pendiente (m), e intercepto (b); error relativo debido a la regresión.

Criterio de aceptación

Coeficiente de determinación (r^2) mayor o igual que 0.99, error relativo debido a la regresión (ERR%) no mayor al 2%.

3.5.2 Precisión del sistema (repetibilidad)

La precisión es el grado de concordancia entre los resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea del producto.

Para evaluar la precisión del sistema se calcula el factor de respuesta, dividiendo la respuesta obtenida para cada uno de los puntos de la curva (área de los picos) entre su concentración correspondiente a partir de los datos de linealidad del sistema. Calcular el coeficiente de variación (%CV) para ambas curvas patrón.

De las 3 curvas de linealidad del método obtener media (\bar{x}), desviación estándar (DE) y coeficiente de variación (%CV), para cada una de las concentraciones de la curva.

Criterio de aceptación

El CV% del factor de respuesta no debe ser mayor al 2%

3.5.3 Reproducibilidad

Expresa la variación de determinaciones independientes realizadas en diferentes condiciones de análisis, ya sea diferentes días de análisis, equipos o analistas.

Para evaluar la reproducibilidad calcular el %CV para cada concentración de las seis curvas patrón; tres de las cuales corresponden a un día de análisis y las otras tres a un día diferente.

Criterio de aceptación

El %CV global para las seis curvas patrón analizadas bajo condiciones diferentes no debe ser mayor al 2%.

3.5.4 Exactitud

Es la concordancia entre el valor obtenido experimentalmente y el valor nominal. Se evalúa por medio del cálculo de la desviación estándar absoluta (%DEA) a partir de los datos obtenidos de tres curvas patrón.

$$\%DEA = \frac{(\text{Concentración nominal}) - (\text{concentración experimental})}{(\text{Concentración nominal})} \times 100$$

Criterio de aceptación

El promedio de los datos de linealidad expresados en concentración no debe variar con respecto a la cantidad nominal en más de 2% en cada punto.

3.5.5 Selectividad

Para evaluar este parámetro, se prepararon las siguientes soluciones, las cuales se inyectaron directamente al cromatógrafo:

- Fase móvil : Solución amortiguadora de fosfatos pH 7.7 : Metanol (62:38)
- Medio de disolución : Solución amortiguadora de acetatos pH 4.5
- Solución de Casiopeina III-ia [14µg/mL] en medio de disolución.

Criterio de aceptación

No debe haber interferencias en la señal cromatográfica de Casiopeina III-ia.

3.5.6 Estabilidad

Determinar las condiciones de temperatura y tiempo, en las que el compuesto permanece estable.

Temperatura ambiente en el cromatógrafo y refrigeración por 24 h

Preparar por triplicado una solución de Casiopeina III-ia en solución amortiguadora de acetatos pH 4.5 a la concentración de 6.0 µg/mL (conc. baja) y 18.0 µg/mL (conc. alta). Colocar en 6 viales diferentes. Conservar 3 viales dentro del

cromatógrafo y los otros 3 en refrigeración (2-8 °C), protegidas de la luz. Cuantificar las muestras a los tiempos de 0, 8 y 24 h a una longitud de 296nm.

Temperatura en baño a 37°C/90min

Preparar por triplicado soluciones de Casiopeina III-ia® en solución amortiguadora de acetatos pH 4.5 a la concentración de 6.0 µg/mL y 18 µg/mL. Transferir a un tubo de ensaye y colocar en un baño a 37°C ± 0.5.

A partir de esta solución tomar alícuotas de 1mL a los tiempos de muestreo de: 0, 5, 15, 45, 60 y 90 minutos. Analizar las muestras directamente en el cromatógrafo.

Criterio de aceptación

El coeficiente de variación global de las muestras evaluadas bajo las diferentes condiciones establecidas, debe ser menor al 2%.

3.5.7 Influencia del filtro

Preparar dos soluciones cuyas concentraciones son: 6.0 µg/mL y 18.0 µg/mL (25 mL de cada una). A partir de estas soluciones tomar una muestra sin filtrar y colocarla en un tubo de ensaye. Tomar una muestra de 3mL con el muestreador y un filtro de teflón de 35µm, colocar en otro tubo de ensaye. Repetir este procedimiento 6 veces utilizando el mismo muestreador y filtro de teflón, para cada uno de los niveles de concentración.

De los tubos tomar 1mL y colocarlo en un vial para ser procesado. Se considera la lectura de la muestra sin filtrar como el 100%, con respecto a las muestras filtradas.

Criterio de aceptación

El porcentaje retenido del promedio de las muestras filtradas no debe ser mayor al 4%.

3.6 Evaluación del Perfil de Disolución

De acuerdo a la cantidad disponible de materia prima con que se contaba, el perfil se evaluó con tres tabletas, bajo las siguientes condiciones:

- Aparato utilizado: Aparato de Wood
- Tabletillas de 200mg de Casiopeina III-ia® y 4000 Kg/cm² de fuerza de compactación.
- Medio de disolución: Solución amortiguadora de acetatos [0.01M] pH 4.5, (desgasificado)
- Temperatura del medio: 37°C ± 0.5
- Velocidad de agitación: 75 rpm
- Volumen de medio de disolución: 900 mL
- Tiempos de muestreo: 10, 15, 25, 30, 40 y 60 minutos
- Volumen de muestreo: 3mL (sin reposición del medio)
- Método de análisis: HPLC (296nm)

Las muestras, se diluyeron 1:5 utilizando medio de disolución, se colocó 1mL en un vial y se analizó de acuerdo con las condiciones cromatográficas descritas en 3.3.2.

3.6.1 Cálculos

- Los valores de área obtenidos, se interpolaron en la curva patrón preparada el mismo día de análisis y se determinó la concentración en $\mu\text{g/mL}$.
- Para obtener los miligramos del principio activo disueltos en el volumen de muestra tomada al i-ésimo tiempo de muestreo, se aplicó la siguiente fórmula:

$$E_i = (X_i)(F_d)(v)$$

$$X_i = \frac{(Y_i - A)}{B}$$

Donde:

E_i = Miligramos disueltos en el volumen de la muestra tomada al i-ésimo tiempo de muestreo

X_i = Concentración al i-ésimo tiempo de muestreo

F_d = Factor de dilución de la muestra

V = Volumen de muestra tomada

Y_i = Respuesta (área) de la muestra al i-ésimo tiempo de muestreo

A = Ordenada al origen de la curva patrón

B = Pendiente de la curva patrón

- Con los datos obtenidos en el punto anterior, se calculó la cantidad disuelta en mg a cada tiempo de cada vaso, empleando la siguiente fórmula:

$$D_i = (X_i)(F_d)(v) + \sum_{i=0}^{N-1} E_i$$

$$V_i = V_0 - [(N - 1)v]$$

Donde:

D_i = Miligramos disueltos al i-ésimo tiempo de muestreo

V_i = Volumen del medio de disolución al i-ésimo tiempo de muestreo

N = Número de extracciones al i-ésimo tiempo de muestreo

V_0 = Volumen inicial del medio de disolución

- Una vez obtenida la cantidad disuelta (mg) se grafico contra el tiempo (min) para obtener la ecuación de la recta. La pendiente (m), se dividió entre el área superficial de la tableta como se muestra en la siguiente ecuación:

$$K_{int} = \frac{m}{A}$$

Donde:

K_{int} = Constante de disolución intrínseca

m = Pendiente de la ecuación de la recta

A = Área superficial del fármaco (0.50 cm²)

4. RUSULTADOS Y ANÁLISIS

4.0 Resultados

4.1 Condiciones cromatográficas finales

- Cromatógrafo : Shimadzu
- Columna : xTerra RP₁₈ 5μm, 3.9 x 150mm
- Fase móvil : Solución amortiguadora de fosfatos pH 7.7 [0.01M] : MeOH (62:38)v/v %
- Flujo : 0.7 mL/ min
- Longitud de onda : 296nm, detector ultravioleta
- Presión : 156 Kgf/m²
- Volumen de inyección : 20μL
- Temperatura : ambiente
- Tiempo de corrida : 4.5 min

En la siguiente figura se observa un cromatograma representativo de Casiopeina III-ia® en solución amortiguadora de acetatos [0.01M], pH 4.5. El tiempo de retención obtenido para el analito fue 2.6 minutos observándose un pico definido y reproducible.

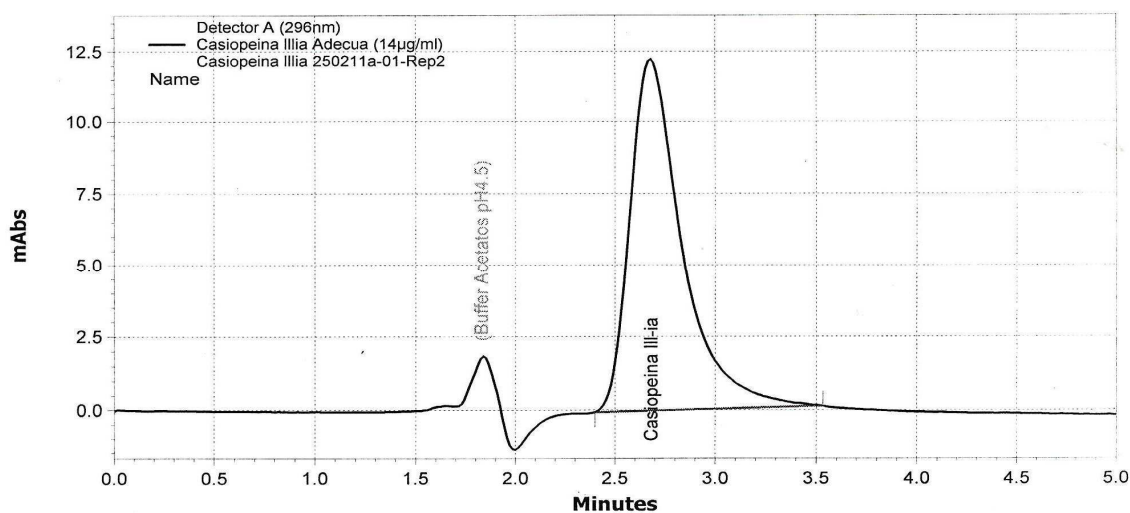


Figura 7. Cromatograma de Casiopeina III-ia® (20μL, 14μg/mL); fase móvil Solución amortiguadora de fosfatos pH 7.7 [0.01M]:MeOH (62:38)v/v%; columna: xTerra RP₁₈ 5μm, 3.9 x 150mm; detección UV,296nm.

4.2 Formación de la tableta de Casiopeina III-ia®

En la Tabla 6 se presentan los resultados obtenidos al comprimir las dos cantidades de Casiopeina III-ia® empleando el aparato de Wood.

Tabla 6. Resultados para la formación de la tableta

Tableta	Fuerza de compresión (Kg/cm ²)	Cantidad a tabletear (mg)	Observaciones
A	3000	150	No hay quebraduras se observa una superficie homogénea, fácil de romper
B	4000	200	No hay quebraduras se observa una superficie homogénea, resistente a romperse

Se observó que la cantidad adecuada y la fuerza de compresión necesaria para formar la tableta de Casiopeina III-ia® en el aparato de Wood corresponden a la tableta B. Bajo estas condiciones, las tabletas no presentaron quebraduras y eran resistentes con superficie homogénea, lo cual permitió caracterizar la K_{int} de manera confiable.

4.3 Validación del Sistema para cuantificar Casiopeina III-ia®

4.3.1 Linealidad y precisión del sistema

En la Tabla 7 se muestran los valores de %CV y %ERR, mientras que la Figura 8 muestra la relación entre la respuesta y concentración del analito evaluado en solución amortiguadora de acetatos 0.01M, pH 4.5.

Tabla 7. Linealidad del sistema para cuantificar Casiopeina III-ia®

Conc. (µg/ml)	Área del pico			Media
	Curva 1	Curva 2	Curva 3	
2.0	31402	31642	31036	31360
6.0	96494	96421	96496	96470.3
10.0	161192	160514	158521	160075.7
14.0	223622	221956	219493	221690.3
18.0	289853	285066	283048	285989
25.0	405901	403750	4000684	403445
b	-1592.0312	-1094.4532	-11252.7914	-1313.0
m	16240.2158	16078.876	15957.2633	16092.12
r²	0.99990	0.99972	0.99967	0.99979
ERR%	1.553011	1.191638	1.893238	

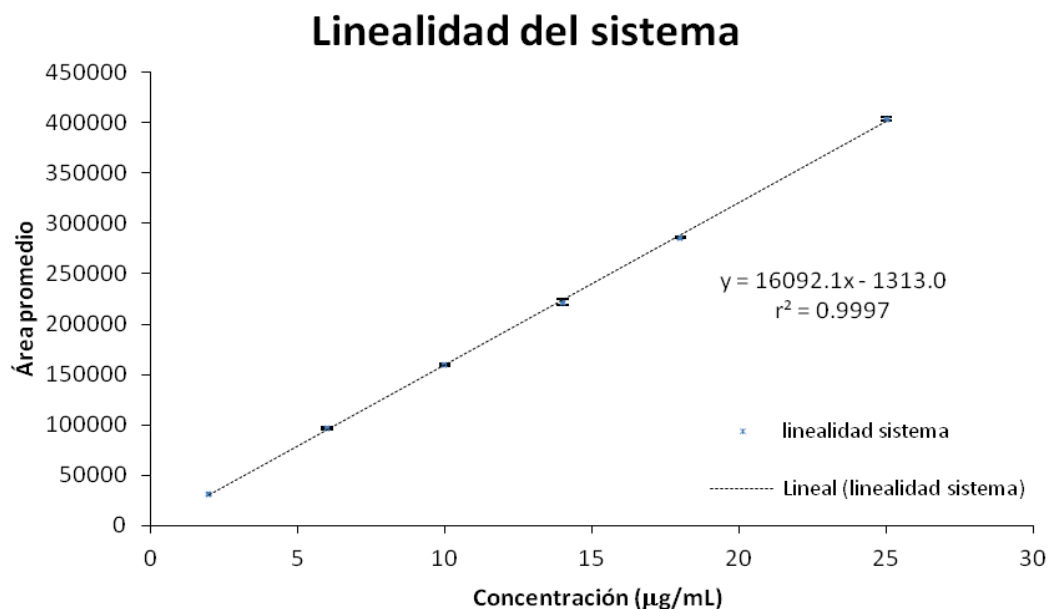


Figura 8. Relación entre la respuesta promedio y concentración

En la Tabla 8 se presentan los resultados de precisión del sistema (relación área concentración), mostrando promedio, desviación estándar y coeficiente de variación.

Tabla 8. Precisión del sistema para cuantificar Casiopeina III-ia

Factor respuesta					
Curva 1	Curva 2	Curva 3	Media	DE	CV%
15701	15821	15518	15937.8429	196.8849	1.2
16082.3	16070.1	16082.6			
16119.2	16051.4	15852.1			
15973	15854	15678.0			
16102.9	15837	15724.8			
16236.0	16150	16027.3			

Tabla 9. Relación entre la concentración experimental vs nominal

Conc. (µg /ml)	Concentración Experimental (µg/ml)		
	Curva 1	Curva 2	Curva 3
2.0	2.03	2.03	2.02
6.0	6.03	6.06	6.12
10.0	10.02	10.05	10.01
14.0	13.86	13.87	13.83
18.0	17.94	17.79	17.81
25.0	25.09	25.17	25.18
m	1.000003		
b	0.000001		
r²	0.999895		

Como se puede observar en las Tablas 8, 9 y en la Figura 8, el sistema es lineal en el rango de concentraciones utilizadas, ya que el coeficiente de determinación (r^2) es mayor a 0.99 y el %ERR menor al 2%. El sistema cumple con los parámetros de %CV planteados en la NOM 177 y CNQFBM que se tomaron como base para establecer un intervalo confiable al presentar un valor de

1.2353%, entre la relación área/ concentración, con base a este dato se concluye que el sistema es lineal y preciso en el rango de concentración de 2.0 a 25.0 µg/mL.

Los datos presentados en la Tabla 8 y 9 muestran una relación lineal entre las concentraciones nominales y las experimentales debido a que la pendiente presenta un valor de 1 y la ordenada al origen es de 0.

Los criterios que se consideran de mayor importancia para la validación del sistema, fueron la pendiente y la ordenada al origen calculadas a partir de los datos de concentración experimental vs concentración nominal. Los valores deseables son: 1 para la pendiente (m) y cercano a cero para la ordenada al origen (b).

4.3.2 Validación del método

4.3.2.1 Linealidad y repetibilidad del método

Tabla 10. Resultados de repetibilidad

Conc. (µg/ml)	Área del pico día 2			Media	DE	%CV
	Curva 1	Curva 2	Curva 3			
2.0	31116	31528	31164	31269.333	225.2938	0.7204
6.0	95148	95633	92752	94511	1542.5196	1.6321
10.0	155926	158346	156376	156882.667	1287.1026	0.8204
14.0	221967	222024	217010	220333.667	2878.5208	1.3064
18.0	281775	282390	282982	282382.333	603.5365	0.2137
25.0	395472	397090	393899	395487	1595.5528	0.4034
b	-621.56355	-52.69305	-1590.72902			
m	15801.77842	15831.02878	15783.03165			
r²	0.99988	0.99990	0.99991			
ERR%	0.811092	0.753872	0.731609			

El método es lineal y repetible en el rango de concentraciones evaluado para la Casiopeina III-ia®, debido a que el coeficiente de determinación (r^2) es mayor a 0.99, el error relativo debido a la regresión es menor al 2% y el %CV para las tres

curvas en cada nivel de concentración es menor al 2%. Estos datos se pueden observar en la Tabla 10.

4.2.2.2 Reproducibilidad del método

En la Tabla 11, se presentan los valores promedio de las concentraciones experimentales de las 6 curvas patrón realizadas con la Casiopeina III-ia®. Las primeras tres realizadas en un día de análisis y las otras tres curvas realizadas en un segundo día de análisis. Se puede observar que el método analítico es reproducible para el principio activo, ya que los valores de coeficiente de variación fueron menores al 2%.

Tabla 11. Resultados de reproducibilidad del método para la cuantificación de Casiopeina III-ia®.

Conc. ($\mu\text{g/ml}$)	Conc. Experimental ($\mu\text{g/mL}$) Promedio día 1 y 2			%DEA
	Media	DE	%CV	
2.0	2.02	0.027624	1.361951	1.41
6.0	6.05	0.047838	0.790431	0.86
10.0	10.00	0.049163	0.491561	0.01
14.0	13.92	0.106297	0.763461	0.54
18.0	17.88	0.088684	0.495895	0.64
25.0	25.11	0.057290	0.228142	0.44

4.2.2.3 Exactitud del método

Este parámetro se evaluó mediante el cálculo de la %DEA a partir del promedio de las 3 curvas patrón realizadas el mismo día. Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 12. Resultados obtenidos para evaluar la exactitud del método

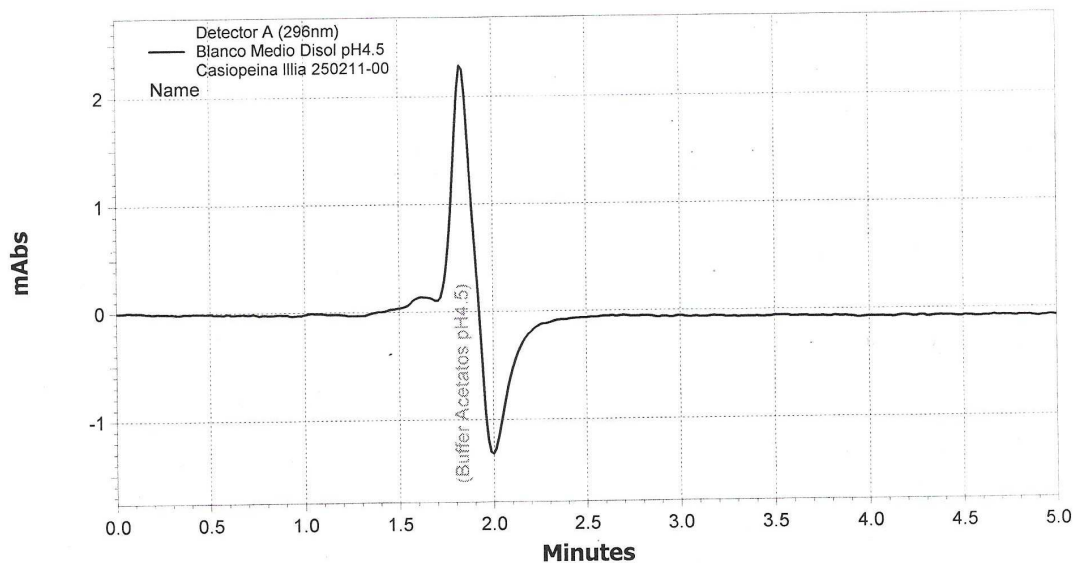
Conc. (µg/ml)	Conc. Experimental (µg/mL) día 1			%DEA
	Media	DE	%CV	
2.0	2.03	0.006340	0.312260	1.51
6.0	6.07	0.044263	0.728399	1.27
10.0	10.02	0.019663	0.196060	0.29
14.0	13.85	0.020979	0.151385	1.01
18.0	17.85	0.080823	0.452705	0.81
25.0	25.15	0.053366	0.212165	0.61

Como se observa en la Tabla 12 los valores correspondientes a las concentraciones experimentales son muy cercanos a los valores de las concentraciones nominales, presentan una desviación estándar absoluta (%DEA) menor al 3% para todo el intervalo de concentraciones, por lo que se considera el método exacto.

4.2.2.4 Selectividad

En la figura 9 se puede observar que no existe interferencia entre la Casiopeina III-ia® y la solución amortiguadora de acetatos (medio de disolución), por lo que el método se considera selectivo.

Medio de disolución: Solución amortiguadora de acetatos pH 4.5



Casiopeina III-ia® en solución amortiguadora de acetatos

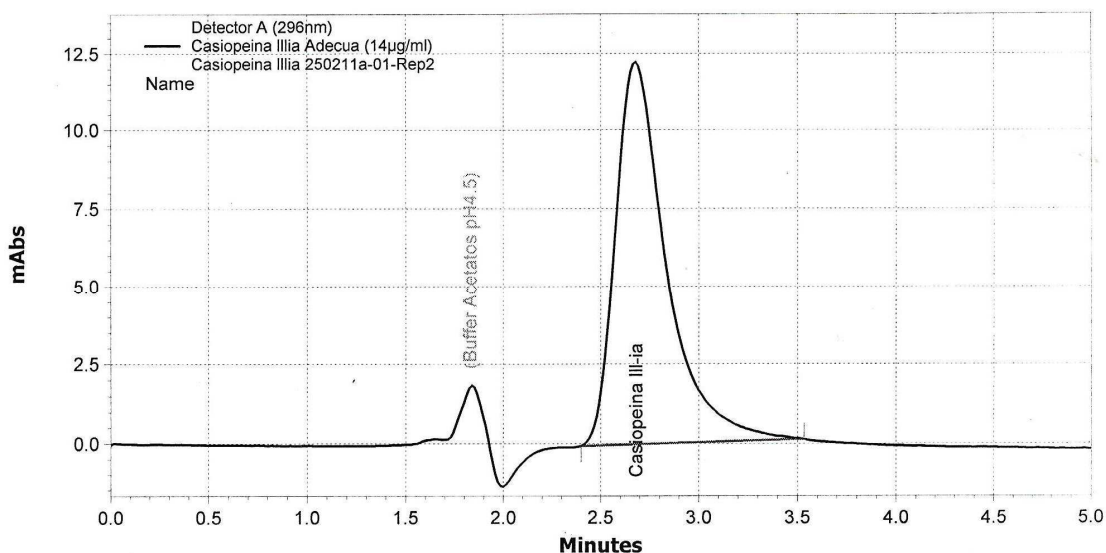


Figura 9. Cromatogramas de las diferentes soluciones inyectadas al Cromatógrafo para evaluar las interferencias entre el medio de disolución y el analito de interés.

4.2.2.5 Estabilidad

En la Tabla 13 se reporta el área de los picos y el porcentaje de recobro de tres muestras de cada nivel de concentración que permanecieron dentro del cromatógrafo a temperatura ambiente.

En las Tablas 14 y 15 se presentan datos de que tres muestras de cada nivel mantenidas en refrigeración y tres en un baño de agua a temperatura constante de 37°C.

En la Figura 10 se muestran las gráficas de estabilidad de las muestras bajo las distintas condiciones de almacenamiento, donde se puede observar claramente que después de las 24 horas de permanecer a temperatura ambiente se observa un descenso del 10%, mientras que en las otras dos condiciones se aprecia una disminución mínima.

Con base en los resultados reportados en la Tabla 13, 14 y 15, en la solución amortiguadora de acetatos, las muestras presentaron una buena estabilidad hasta las 8 horas ya que al realizar el monitoreo a las 24 horas se observa una notable disminución de la respuesta, lo que nos habla de una inestabilidad, esto se ve reflejado en un %CV mayor al 2%. Al almacenar las muestras en refrigeración hasta 24 horas presentaron una mejor estabilidad, debido a que los valores de %CV fueron menores al 2%. Con respecto a la estabilidad a 37°C, se observan %CV por debajo del 2% a las 1.5 horas, por lo que no hay problema de estabilidad a esta temperatura e intervalo de tiempo.

Esta evaluación de la estabilidad indicó que se deben refrigerar las muestras en caso de que el análisis sea prolongado ó deben ser analizadas a un tiempo no mayor a 8 horas si van a permanecer a temperatura ambiente. Mientras que a 37°C se observa una estabilidad en el lapso de tiempo de 90min, lo que nos indica que el analito no presenta inestabilidad durante el perfil de disolución.

Tabla 13. Estabilidad de las muestras a temperatura ambiente

Temperatura ambiente					
Conc. (6.0µg/mL)			Conc. (18.0µg/mL)		
tiempo (h)	Promedio Área	% Recobro	tiempo (h)	Promedio Área	% Recobro
0	94803.66	100	0	283017	100
8	94501.33	99.68	8	282701.66	99.88
24	87475	92.26	24	255981.66	90.44
X	92260			273900.1111	
DE	4146.6878			15518.6290	
%CV	4.4946			5.6658	

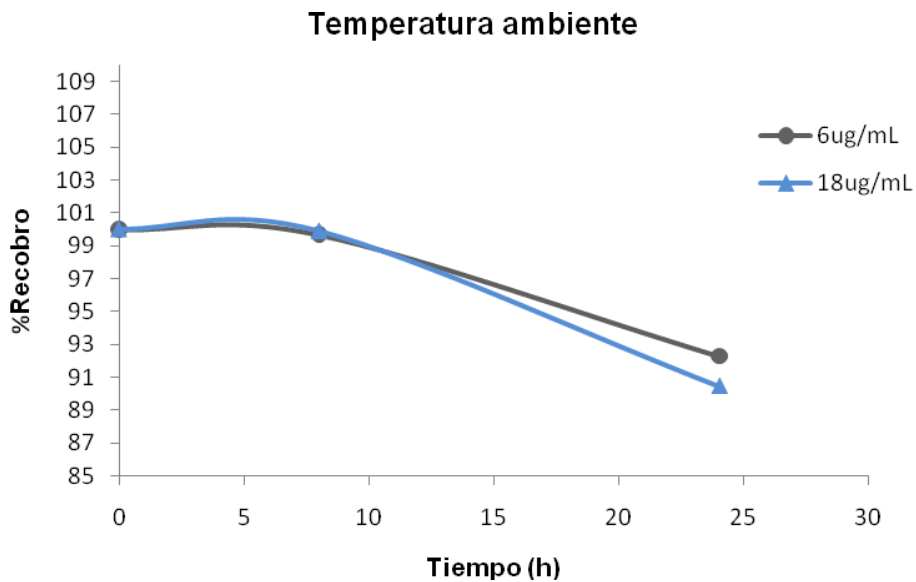
Tabla 14. Estabilidad de las muestras almacenadas en refrigeración

Temperatura 2-8°C					
Conc. (6.0µg/mL)			Conc. (18.0µg/mL)		
tiempo (h)	Promedio Área	% Recobro	tiempo (h)	Promedio Área	% Recobro
0	94803.66	100	0	283017	100
8	93470.33	98.59	8	281908.66	99.60
24	92952.33	98.04	24	273984.66	96.80
X	93742.1111			279636.7778	
DE	955.1210			4926.1416	
%CV	1.0189			1.7616	

Tabla 15. Estabilidad a 37°C

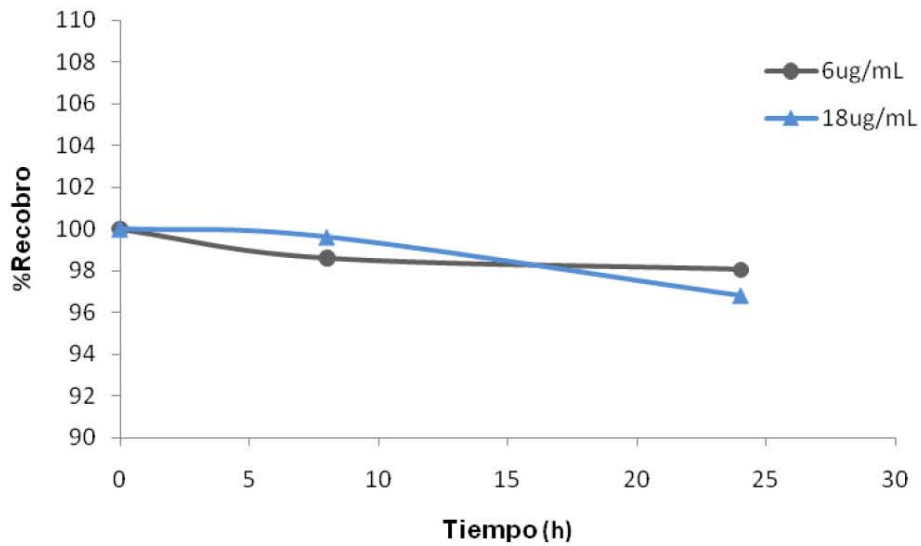
Temperatura 37°C					
Conc.(6.0µg/mL)			Conc.(18.0µg/mL)		
tiempo (min)	Promedio Área	%Recobro	tiempo (min)	Promedio Área	%Recobro
0	93818	100.00	0	281878	100.00
5	93665.66667	99.84	5	281540.6667	99.88
15	93785.66667	99.97	15	281410	99.83
45	94995	101.25	45	284878.6667	101.06
60	96058	102.39	60	288203.3333	102.24
90	96879.33333	103.26	90	289606.6667	102.74
X	94866.94444			284586.2222	
DE	1356.2621			3607.5516	
%CV	1.4296			1.2676	

a)



b)

Temperatura 2-8°C



c)

Temperatura 37°C

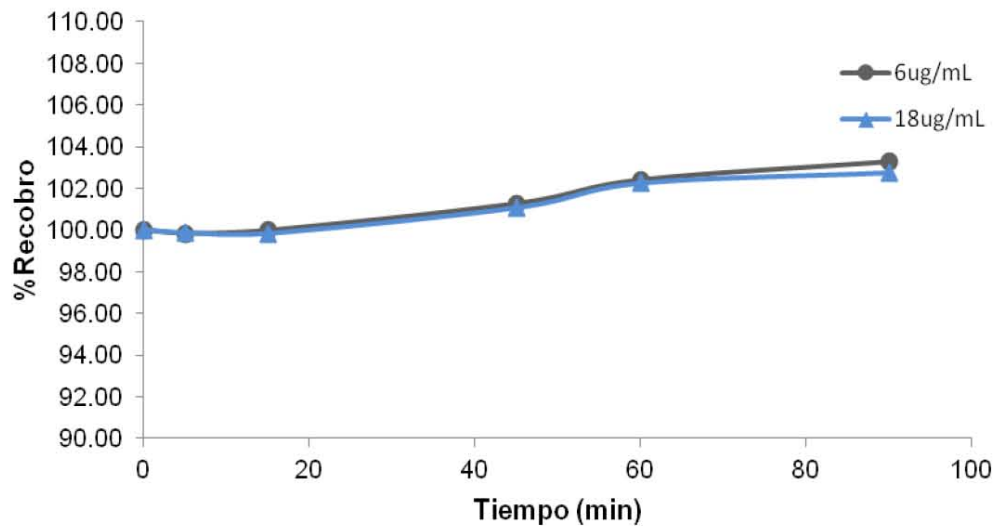


Figura 10. % de recobro de la estabilidad de Casiopeina III-ia®: a) temperatura ambiente, b) refrigeración y c) baño de agua a 37°C.

4.2.2.6 Influencia del filtro

En la Tabla 16 se puede observar que el uso del filtro de teflón de 35µm para la toma de muestra no afecta la cantidad de fármaco cuantificado, ya que se presenta una retención del fármaco menor del 4%, por lo que el uso de este tipo de filtros para la toma de muestra en el estudio del perfil de disolución es adecuado.

Tabla 16. Evaluación de la influencia del filtro de teflón 35µm

	Influencia del filtro			
	sin filtrar		Filtradas (teflón 35µm)	
	Conc. (6.0µg/mL)	Conc. (18.0µg/mL)	Conc. (6.0µg/mL)	Conc. (18.0µg/mL)
promedio	95516	282913.83	95542.50	283317.33
DE	228.7015	1130.1133	262.0257	2032.8974
%CV	0.2394	0.3994	0.2742	0.7175
% Retenido	0.0277	0.1426		

4.4 Perfil de Disolución intrínseca

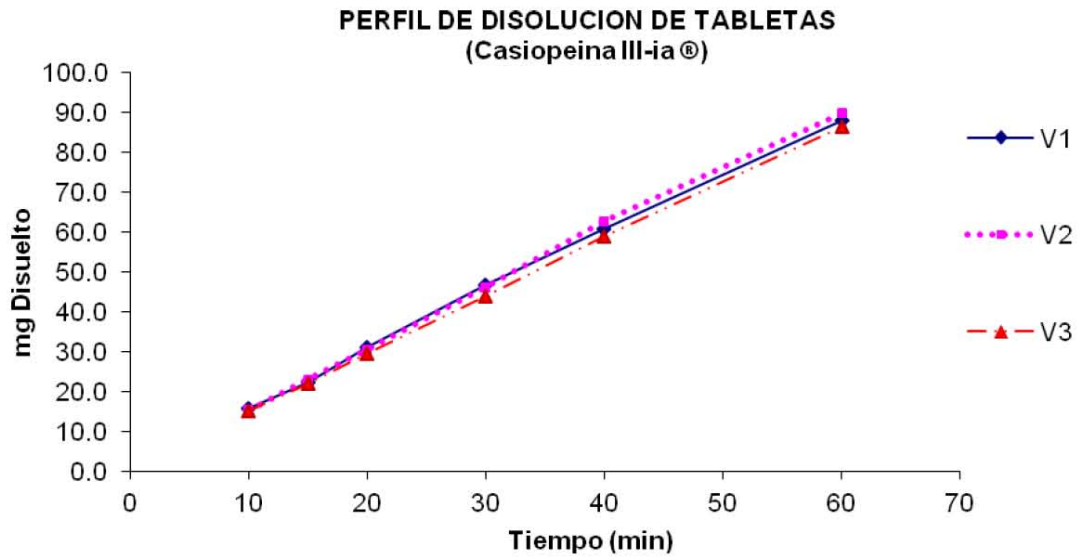
En la Tabla 17 se muestran los resultados individuales y promedio de la cantidad disuelta, desviación estándar, el %CV y la constante de disolución intrínseca de los tres vasos a cada tiempo de muestreo. En la Figura 11 se observan los perfiles de disolución de la Casiopeina®.

Hay que hacer notar que solo se llevó a cabo el monitoreo de tres vasos debido a la cantidad de Casiopeina® con la que se disponía. Las muestras obtenidas en la prueba de disolución se analizaron contra una curva de calibración para cuantificar la cantidad de fármaco disuelto.

Tabla 17. Cantidad disuelta de Casiopeina® en Solución amortiguadora de acetatos pH 4.5.

Tiempo (min)	Cantidad disuelta (mg)				DE	%CV
	V1	V2	V3	promedio		
10	15.73	15.29	15.18	15.40	0.290	1.880
15	22.47	22.94	22.03	22.48	0.455	2.025
20	31.10	30.59	29.49	30.39	0.826	2.717
30	46.53	46.20	43.92	45.55	1.420	3.118
40	60.79	62.65	58.98	60.81	1.835	3.018
60	87.90	89.64	86.30	87.95	1.674	1.904
m	1.455	1.4978	1.425	1.4592		
b	2.9099	2.1615	2.4407	2.504		
r²	0.9988	0.9989	0.9998	0.9993		
Kint (mg/min/cm²)	2.910	2.996	2.850	2.9184		

a)



b)

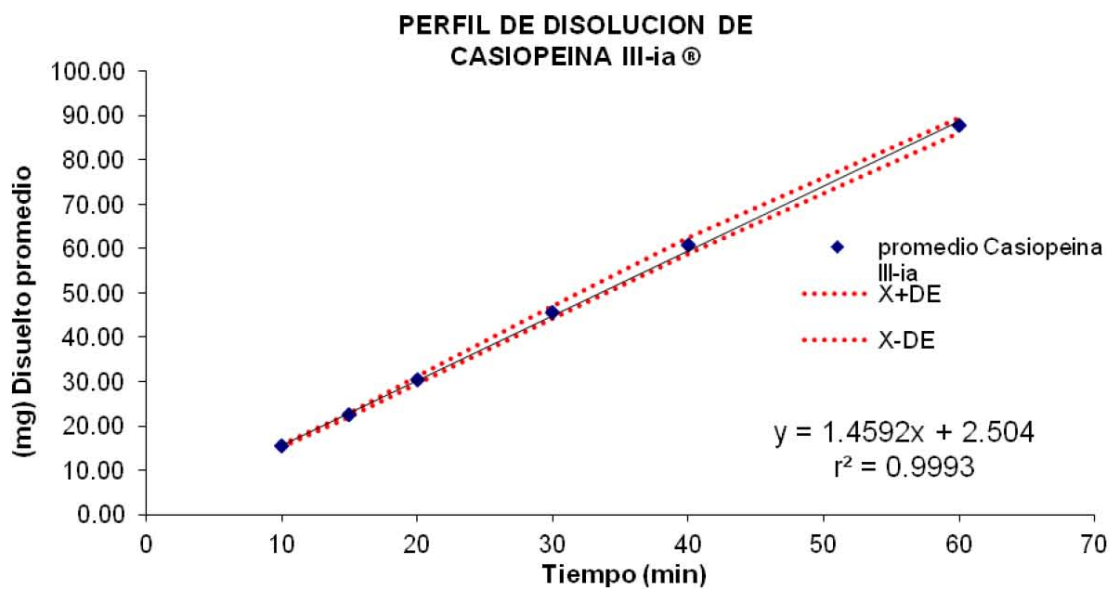


Figura 11. Perfiles de disolución de Casiopeina®: a) mg disueltos en cada vaso; b) mg promedio disuelto.

Tomando como base los datos reportados en la Tabla 17, se observa una ligera variación en la cantidad disuelta entre los diferentes vasos pero esta variación no es significativa ya que se cumple con los parámetros de %CV (para el primer tiempo el %CV menor al 15% y para los tiempos restantes menor al 10%), cabe mencionar que se realizó dilución 1:5. En este caso se disuelven 88.0 mg a los 60 minutos y el perfil presenta una cinética de orden cero.

Como se puede observar en la Figura 11, los gráficos de cantidad de fármaco disuelto vs tiempo, presentan un coeficiente de correlación > 0.99 (comportamiento lineal), a partir de estos gráficos se obtuvo una pendiente cuyo valor es 1.4592 mg/min, esta al ser dividida entre el área expuesta (0.5 cm^2), da como resultado $2.9184 \text{ mg/min/cm}^2$ la cual representa la constante de disolución intrínseca, que es superior a lo establecido por Kaplan and Wood (1 mg/min/cm^2). Lo anteriormente mencionado indica que la Casiopeina III-ia® no presentara una velocidad de disolución limitante para su absorción a pH de 4.5, por lo tanto no debería presentar problemas con la biodisponibilidad.

Considerando lo anterior y que la Casiopeina III-ia® no presenta problemas de permeabilidad en la línea celular MDCK, debido que el paso a través de las membranas es por difusión pasiva (tesis licenciatura, Sofía del Castillo, 2010), esto nos da la pauta para considerar a la Casiopeina III-ia® como un fármaco de alta solubilidad-alta permeabilidad, para corroborar dicho comportamiento se deberá realizar la prueba a otros pH's (6.3 y 7.4) del tracto gastro intestinal además de un número mayor de determinaciones ya que este estudio solo se realizó a pH 4.5 y con solo tres tabletas.

5. CONCLUSIONES

- ❖ Se desarrolló y validó el método analítico por HPLC para la cuantificación de Casiopeina III-ia®.
- ❖ El método analítico fue lineal, preciso, exacto, específico y estable en el rango de concentración 2.0 µg/mL – 25 µg/mL, en solución amortiguadora de acetatos pH 4.5.
- ❖ Se obtuvo la constante de disolución intrínseca (2.9184 mg/min/cm²) empleando la técnica de Wood.
- ❖ A pH 4.5 se obtuvo que la disolución no es el paso limitante, lo cual no impactaría en la biodisponibilidad del fármaco, de acuerdo con la constante de disolución intrínseca en el intervalo establecido por Wood y Kaplan ($K \geq 1$ mg/min/cm²)

APÉNDICE

Tabla 18. Áreas (respuesta) de la curva patrón para la interpolación de las muestras del perfil de disolución

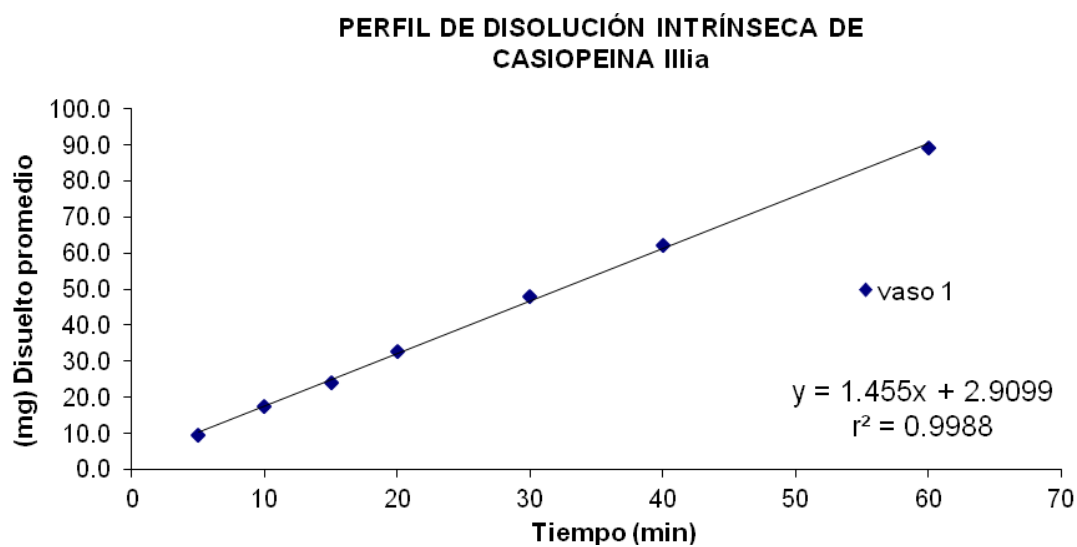
CURVA PATRÓN	
concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Áreas
2	31018
6	93920
10	162915
14	221957
18	286742
25	407706
r=	0.9998
b=	-2991.2
m=	16296.1

Tabla 19 .Concentración experimental en cada vaso, obtenida por interpolación en la curva patrón.

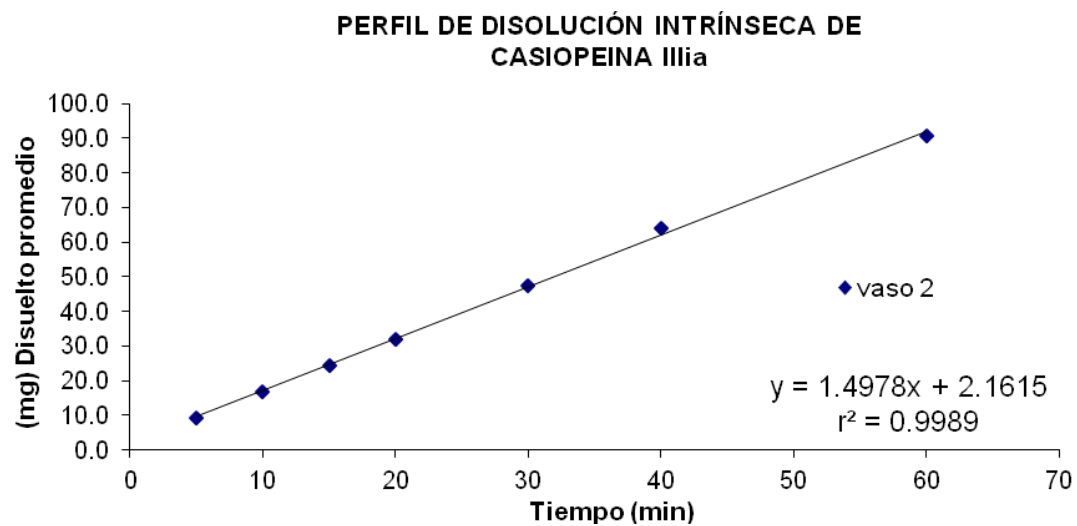
Tiempo (min)	Áreas			Conc. Interpolada ($\mu\text{g/mL}$)		
	V1	V2	V3	V1	V2	V3
10	59760	58184	57783	3.9	3.8	3.7
15	84159	85899	82604	5.3	5.5	5.3
20	115543	113660	109679	7.3	7.2	6.9
30	171777	170572	162298	10.7	10.7	10.1
40	223932	230758	217386	13.9	14.3	13.5
60	323452	329837	317648	20	20.4	19.7

Figura 12. Perfiles de disolución de Casiopeina III-ia ® presente en: a) vaso1, b) vaso 2 y c) vaso 3

a)

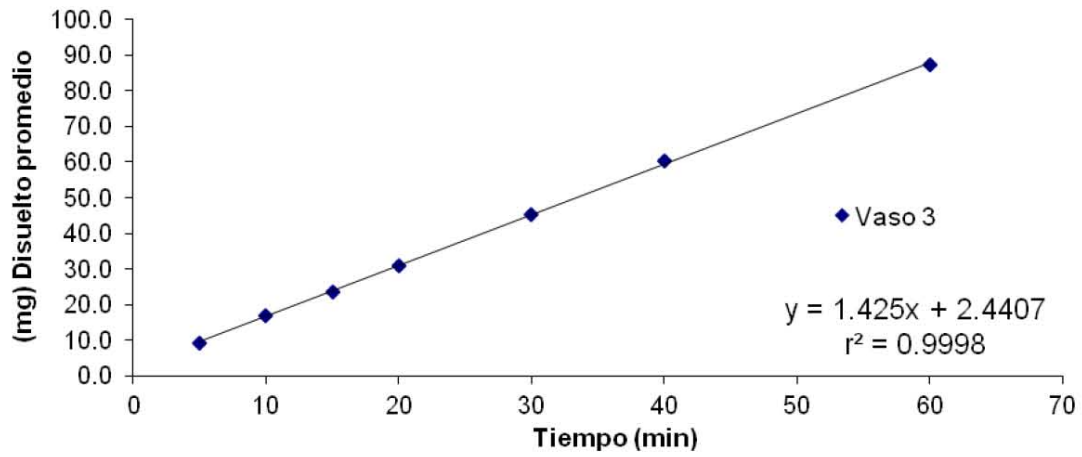


b)



c)

PERFIL DE DISOLUCIÓN INTRÍNSECA DE CASIOPEINA III_a



6. BIBLIOGRAFÍA

- 1.- FDA. Guidance for Industry: *Waiver of In vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate-Release Solid Oral Dose Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System*. US Department of Health and Human Services, Food and drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), August 2000 BP.
- 2.- Manual del Centro para la Evaluación e Investigación de Fármacos (CDER), US Department of Health and Human Services, Food and drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), 1998.
- 3.- Tovar, Concepción. *Disolución de Medicamentos Intercambiables: Ácido Acetilsalicílico y Naproxeno*. Facultad de Química, UNAM 2002.
- 4.- Espinoza, Guadalupe. *Desarrollo de un método específico para Estudios de Disolución Intrínseca en México*. Facultad de Química, UNAM 1986 pp 2-21.
- 5.- Christina Graffner. *Regulatory aspect of drug dissolution from a European perspective*. Eur.J.Pharm. Sci. 2006, 29:288-293.
- 6.- Abdou H, *Dissolution, bioavailability and bioequivalence*, Mack Publishing Co. USA, 1989. pp 12-13, 26-32
- 7.- Remington, J. 2003. *Farmacología*. 20ª edición. Editorial Panamericana. México. Tomo 1 pp.764-775.
- 8.- Remington, J. 2003. *The Science and Practice of pharmacy*. 21ª edición. Lippincott Williams & Wilkins Philadelphia. pp.672-687.
- 9.- Loredó Vázquez Erandi. 2010. *Evaluación de los perfiles de disolución de un producto que contiene Hidroclorotiazida, Losartan y Amlodipino en un medio biorrelevante*. Tesis de licenciatura.
- 10.- Fuente, Inés et al.2006. *Estudios de Perfiles de Disolución, Calorimetría Diferencial de Barrido y tamaño de partícula como elementos para determinar la calidad de materias primas*. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas. pp 43-57.
- 11.- Brown Cynthia K.;Choksgi Hitesh P.; Nickerson Beverly; Reed Robert A.; Rohrs Brian R.; Shanb Pankaj A. 2004. *Acceptable Analytical Practices for Dissolution Testing of Poorly Soluble Compounds*. Pharmaceutical Technology. pp 56-65.
- 12.- Banakar, U.V. 1992. *Drugs and the Pharmaceutical Sciences*. Pharmaceutical Dissolution Testing. Marcel Dekker, Inc. Volumen 49.

- 13.- Aulton, M.E. 2004. *Farmacia: La ciencia del diseño de las formas farmacéuticas*. 2ª edición. Elsevier España. pp 18-21, 116-117, 124, 219-225, 273-274.
- 14.- Custodio Joseph M; Wu Chi-Yuan; Benet Leslie Z. 2008. *Predicting drug disposition, absorption/elimination/transporter interplay and the role of food on drug absorption*. *Advanced drug Delivery Reviews* 60. Pp 717-733.
- 15.- Dressman Jennifer, Butler James, Hempenstall John, and Reppas Chirstos. 2001. *The BCS: Where do we go from here?*. *Pharmaceutical Technology*. Pp 68-76.
- 16.- Cárdenas H, Cortes A. 1996 *Aspectos Biofarmacéuticos de la evaluación de medicamentos*. UAM. México. pp 46-48, 52-55
- 17.- Noyes, Arthur. *A course of Study in Chemical Principles*. 1958. 2ª edición
- 18.- Olivia, R. O. 2001. *Estudios de la disolución para la evaluación de proveedores de materias primas: ácido acetilsalicílico y Naproxeno*. Facultad de Química UNAM.
- 19.- Wagner, J.G Phm. 1971. *Biopharmaceutics and relevant Pharmacokinetics*. Hamilton, I II: *Drug Intelligence Publications*. pp 104-109.
- 20.- Vila Jato J. L. 2001. *Tecnología Farmacéutica vol I: aspectos fundamentales de los sistemas farmacéuticos y operaciones básicas. Síntesis*. Madrid, España. pp 36-42, 147-148, 183-195.
- 21.- Cartensen, Jens T. 1990. *Drug stability: principles and practices. Drugs and the pharmaceutical sciences*, New York: M. Dekker. pp 58-91
- 22.- British Pharmacopeia. 2004. London, England, pp 1221-1222.
- 23.- Dressman, Jennifer. 2005. *Pharmaceutical Dissolution Testing*. Taylor & Francis. pp 429
- 24.- Intrinsic Dissolution Apparatus Operator's. VARIAN. P/N 70-9022 revisión C, 2004.
- 25.- Instituto Nacional de Cáncer <http://www.cancer.gov/espanol/cancer/que-es>
- 26.- King, J., *Cancer Biology*. 2000, Pearson Prentice-Hall: Singapore
- 27.- Lodish H., Berk A., Matsudaria p., Kaiser C.A, 2004. *Cancer, Molecular Cell Biology*. W.H. Freeman and Company: U.S.A. pp 935-969.
- 28.- Rubin Philip, J.W., 2002. *Biología del Cáncer, Oncología Clínica*. Elsevier Science Imprint: Madrid, España. pp 32-44.
- 29.- Alberts, B. Johnson, A. et al. 2002. *Molecular Biology of the Cell*. Ed. Garland Science. 4ª edición. EUA. Capítulo 23
- 30.- World Health Organization. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>
- 31.- <http://www.infocancer.org.mx/contenidos.php?idsubsubcontenido=343>

- 32.- Torrella Kouri, M, Villa Treviño, S. *Bases genéticas del cáncer*. Instituto Nacional de Cancerología. Fondo de Cultura Económica, México. 1998.
- 33.- <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/mamario> (460 000 defunciones)
- 34.- Centros para el control y la prevención de enfermedades (CDC)
http://www.cdc.gov/spanish/cancer/breast/basic_info/treatment.htm
- 35.- Smith , 2006. *Introduction to the principles of drug desing and action*. Taylor & Francis: U.S.A. capitulo 14.
- 36.- <http://www.cancer.org/Cancer/CancerBasics/TheHistoryofCancer/the-history-of-cancer-cancer-treatment-surgery>
- 37.- Katzung, B.G.,2001. *Chemotherapy of cáncer, Basic & Clinical Pharmacology*. Mc Graw-Hill: U.S.A. chapter 55. pp. 1011-1047.
- 38.- Cory, J.g.a.s.,1987. *The Biological Bases for the Design of Anticancer Agents, Cancer Biology and Therapeutics*. Plenum Press: Florida, U.S.A. pp. 20-34
- 39.- A.W. Ruili Huang, David G. Covell. *Biochem. Pharmacol.* 69, 2005. 1009-1039.
- 40.- L.M Gaetke, C.k Chow. *Toxicology* 189, 2003. 147-163
- 41.- Bravo, M.E. Tovar, A. et al. *Diseño síntesis y caracterización de compuestos de coordinación de cobre Casiopeinas, Historia Química de un proyecto éxitos*. Primer Congreso en Casiopeinas. Unidad de Seminarios Ex Hacienda El Chorrillo, Taxco, Guerrero. 2 y 3 de Diciembre de 2002.
- 42.- Ruiz- Azuara L. United States Patent 1992, vol. RE 35,458, February 18, 1997.
- 43.- Ruiz- Azuara L. United States Patent 1996, vol. 5,576,326
- 44.- Gasque L. Ruíz-Ramírez R. Moreno-Esparza. 1992. *Stabilities of ternary copper and nikel complexes with 1,10 phenanthroline, Journal of Inorganic Biochemistry.* 48 (2) 121.
- 45.- Lena Ruiz Azuara. *Procedimientos para la obtención de complejos metálicos como agentes anticancerígenos. Tipo 1*. Patente de invención, SECOFI, Enero 26, (1994) no.172967
- 46.- Trejo S C, Palencia G, Zúñiga S, Rodríguez RA, Osorio RL, Sánchez TL, et al. *Cass Ilgly induces apoptosis in glioma C6 cell in vitro and in vivo through caspasas-dependent and caspasas-independent mechanisms. Neoplasia* 20005;7:563-574

- 47.- A. De Vizcaya-Ruiz, A. Rivero-Muller, L.Ruiz_Ramirez, G.E.Kass, L.R. Kelland, R.M.Orr, M. Dobrota. *Toxicol. In Vitro* 13 (2000) 1-5
- 48.- R. Alemon-Medina, M. Brena-Valle, J.L.Munoz-Sánchez, M.I. Gracia-Mora, L Ruiz-Azuara, *Cáncer chemother. Pharmacol.* 60 (2007) 219-228
- 49.- S. Rodríguez-Enríquez, p.a. Vital-González, F.L. Flores Rodríguez, A. Marin-Hernandez, L. Ruíz-Azuara, r. Moreno-Sánchez, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 215 (2006) 208-217.
- 50.- A. De Vizcaya-Ruiz, A. Rivero-Muller, L.Ruiz, Ramirez, J.A.Howarth, M. Dobrota. *Toxicology* 194 (2003) 103-113
- 51.- María Elena Bravo-Gómez, Juan Carlos García-Ramos, Isabel Gracia-Mora, Lena Ruíz-Azuara, *Antiproliferative activity and QSAR study of copper (II) mixed chelate [Cu(N-N)(acetilacetionato)]NO₃ and [Cu(N-N)(glycinato)]NO₃ complexes, (Casiopeinas).* *Journal of Inorganic Biochemistry* 103 (2009) 299-309
- 52.- Marín Hernández Álvaro, Gracia Mora Isabel, Ruíz Azuara Lena, Moreno Sánchez Rafael. *Toxic effect of copper based antineoplastic drugs (Casiopeinas).* *Biochemical Pharmacology.* 65 (2003) 1979-1989
- 53.- Fuentes Noriega Inés, Ruíz-Ramírez Lena, R., Tovar Araceli, Rico_Morales Héctor, Gracia Mora Isabel. *Development and validation of a liquid chromatography B, 772* (2002) 115-121
- 54.- Del Castillo- García, S. *Desarrollo de Estudios de permeabilidad de Casiopeina III-ia a través de células MDCK.* Tesis de licenciatura. UNAM, 2010
- 55.- Ruíz-Ramírez L., de la Rosa M:E, Gracia I.,Mendoza A., Pérez G., Ferrer-Sueta G., Breña M., Gutiérrez P. *Casiopeinas, Metal Based-Drugs a New Class of antineoplastic and Genotoxic Compounds,* *J.of Inorganic Biochemistry,* 59 (2-3), 1995. P.206
- 56.- Araceli Tovar, Lena Ruíz Ramirez, Antonio Campero Celis. *Interacción entre Casiopeinas y Adenina. Primer Congreso en Casiopeinas, Taxco Guerrero.* 2002.
- 57.- Fuentes Noriega ,I. *Farmacocinética Preclínica de Casiopeina® III-ia y su unión a proteínas Plasmáticas.* Tesis de Doctorado. UNAM.2005
- 58.- Rivera Huerta M, Macías Rosales L, Gracia Mora I. *Toxicidad aguda en rata y ratón de las Casiopeinas II-gly y III-ia.* Segundo congreso Nacional de Química y Diabetes. 2006.



- 59.- Huerta-Palacios, A. *Desarrollo y validación de una metodología de extracción para Casiopeina III-ia en orina con el uso de cartuchos aniónicos de fase sólida y su análisis por HPLC*. Tesis de licenciatura. UNAM.2008
- 60.- Martínez-Chapa, Karen. *Compilación de los estudios químicos y farmacológicos de las Casiopeinas® III-ia y Igly*. Tesis de licenciatura. UNAM.2008