



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

TESIS

Desarrollo y optimización de un método analítico para la cuantificación de
Casiopeína Ilgly® en plasma humano por CLAR-MS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

Diana Margarita Riva Palacio Montes

MÉXICO, D.F.

DICIEMBRE

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:

Presidente

Q.F.B. Alfredo Rafael Garzón Serra

Vocal

Dra. Inés Fuentes Noriega

Secretario

M. en C. María Isabel Gracia Mora

1er Suplente

M. en C. María de Lourdes Beatriz Mayet Cruz

2do Suplente

M. en C. Roberto Carlos Cañas Alonso

Laboratorio de Biofarmacia
Departamento de Farmacia
Facultad de Química Edificio E, Laboratorio 112-113
UNAM

Asesor del tema:

Dra. Inés Fuentes Noriega

Supervisor técnico:

M. en C. Roberto Carlos Cañas Alonso

Sustentante:

Diana Margarita Riva Palacio Montes

AGRADECIMIENTOS

PAPIIT IN 209609

PAIP 63090-5

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, por el amor que les tengo.

A mi madre por todo su esfuerzo, apoyo y amor incondicional.

A Cris por ser como un padre para mí.

A Viris y Mariana por estar conmigo.

A Diana, Rebeca y Luis por brindarme su amistad.

A la Dra. Inés por la oportunidad de realizar este proyecto, por sus enseñanzas,
apoyo y paciencia.

A Roberto y a Kenneth por su trabajo y consejos

A Jovani por su apoyo y amor

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	1
I.- INTRODUCCIÓN.....	2
1.0 CÁNCER.....	2
1.1 PANORAMA ACTUAL.....	2
1.2 TRATAMIENTOS CONTRA EL CÁNCER.....	3
1.2.1 Quimioterapia.....	4
1.2.1.1 Cisplatino.....	5
1.3 RESISTENCIA A FÁRMACOS ANTINEOPLÁSICOS.....	6
1.4. CASIOPEÍNAS®.....	6
1.4.1 Antecedentes.....	6
1.4.2 Casiopeína Igly®.....	7
1.4.3 Propiedades fisicoquímicas.....	7
1.4.4 Actividad in vitro de la Casiopeína Igly®.....	8
1.4.5 Actividad antineoplásica in vivo de Casiopeína Igly®.....	8
1.4.6 Mecanismo de acción.....	9
1.4.7 Toxicidad aguda en rata y ratón.....	9
1.4.8 Estudios farmacocinéticos.....	10
1.4.8.1 Farmacocinética en ratas.....	10
1.4.8.2 Farmacocinética en perros.....	10
1.4.8.3 Métodos analíticos para cuantificación de Casiopeína Igly®.....	10
1.5 ETAPAS DE INVESTIGACIÓN DE UN NUEVO FÁRMACO.....	11
1.6 MÉTODOS BIOANALÍTICOS.....	12
1.7 CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS.....	13
1.8 ESPECTROMETRÍA DE MASAS (EM).....	14
II.-OBJETIVO.....	16
III.-JUSTIFICACIÓN.....	17

III.-PARTE EXPERIMENTAL.....	18
4.1 MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
4.1.1 Estándares.....	18
4.1.2 Reactivos.....	18
4.1.3 Materiales.....	18
4.1.4 Material biológico.....	19
4.1.5 Equipos e instrumentos.....	19
4.1.6 Software.....	20
4.2 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES.....	20
4.2.1 A. Solución estándar de Casiopeína Ilgly® 1000 µg/mL en metanol.....	20
4.2.2 B. Solución estándar de Casiopeína Ilgly® 100 µg/mL en fase de reconstitución.....	20
4.2.3 C. Solución estándar de Casiopeína Ilgly® 10 µg/mL en fase de reconstitución.....	20
4.2.4 D. Solución estándar de Casiopeína Ilgly® 10 µg/mL en metanol.....	21
4.2.5 E. Solución estándar de Prednisona 1000 µg/mL.....	21
4.2.6 F. Solución estándar de Prednisona 25 µg/mL.....	21
4.2.7 G. Solución de adecuabilidad Casiopeína Ilgly®/Prednisona 10/25 µg/mL.....	21
4.2.8 Solución de ácido heptafluorobutírico (HFBA) al 5%.....	21
4.2.9 Solución de ácido heptafluorobutírico (HFBA) al 0.1%.....	21
4.2.10 Fase móvil. HFBA 0.1%: Metanol, 60:40 v/v.....	22
4.2.11 Fase de reconstitución: HFBA 0.1%: Metanol, 60:40 v/v.....	22
4.3 DESARROLLO DEL MÉTODO.....	22
4.3.1 Espectro de masas.....	22
4.3.1.1 Espectro de masas de la Casiopeína® Ilgly.....	22

4.3.2 Fragmentación del ión molecular de la Casiopeína® Ilgly 345 m/z.....	23
4.3.3 Espectro de masas de la fase móvil.....	23
4.3.4 Espectro de masas de la Casiopeína Ilgly® en fase móvil.....	23
4.3.5 Condiciones de detección.....	23
4.3.5.1 Selección de los parámetros de detección (EM).....	23
4.3.5.2 Selección de parámetros cromatográficos.....	24
4.3.5.3 Elección de la columna cromatográfica.....	24
4.3.9 Selección de estándar interno	25
4.3.10 Extracción del analito de la matriz biológica.....	25
4.3.10.1 Precipitación de proteínas.....	25
4.3.10.2 Extracción en fase sólida.....	26
4.4 SELECTIVIDAD DEL MÉTODO.....	27
4.4.1 Preparación de los blancos.....	27
4.4.1.1 Blancos de plasma.....	27
4.4.1.2 Blanco de plasma con heparina.....	27
4.4.1.3 Blanco de plasma con estándar interno.....	27
4.5 LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN.....	28
4.6 EVALUACIÓN DE EFECTO MATRIZ.....	28
4.7 SUPRESIÓN IÓNICA.....	28
4.8 LINEALIDAD DEL SISTEMA.....	29
4.8.1 Preparación de la curva de calibración de sistema.....	29
4.9 LINEALIDAD DEL MÉTODO.....	30
4.9.1 Preparación de soluciones de trabajo para curva del método.....	30
4.9.2 Preparación de curva de calibración del método.....	30
4.10 PRECISIÓN.....	31
4.10.1 Repetibilidad.....	31
4.11 EXACTITUD.....	32
V.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	33

5.1 DESARROLLO DEL MÉTODO.....	33
5.1.1 Espectro de Masas.....	33
5.1.2 Fragmentación de Casiopeína Ilgly®	33
5.1.3 Espectro de Masas de la fase móvil.....	34
5.1.4 Espectro de masas de la Casiopeína Ilgly® en fase móvil.....	34
5.1.5 Elección de parámetros cromatográficos.....	35
5.1.6 Parámetros de detección (EM).....	36
5.1.7 Estándar interno.....	37
5.1.8 Condiciones finales.....	41
5.1.9 Extracción del analito de la matriz biológica.....	43
5.1.9.1 Método de procesamiento.....	44
5.2 SELECTIVIDAD DEL MÉTODO.....	45
5.3 LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN Y LÍMITE DE DETECCIÓN.....	47
5.4 EFECTO MATRIZ.....	48
5.5 SUPRESIÓN IÓNICA.....	49
5.6 LINEALIDAD DEL SISTEMA.....	49
5.7 LINEALIDAD DEL MÉTODO.....	50
5.8 RECOBRO.....	55
5.9 REPETIBILIDAD Y EXACTITUD.....	57
VII.- CONCLUSIONES.....	58
VIII.- REFERENCIAS.....	59

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Toxicidad de Casiopeína Ilgly®	9
Tabla 2. Parámetros utilizados en la infusión directa.....	21
Tabla 3. Método de extracción en fase sólida.....	26
Tabla 4. Curva de calibración para linealidad del sistema.....	29
Tabla 5. Soluciones de trabajo de Casiopeína Ilgly®	30
Tabla 6. Curva de calibración del método.....	31
Tabla 7. Preparación de soluciones de trabajo de Casiopeína Ilgly® para la preparación de controles.....	31
Tabla 8. Preparación de puntos control del método.....	31
Tabla 9. Infusión directa de sustancias a probar como estándar interno.....	38
Tabla 10. Pruebas de retención para el estándar interno.....	40
Tabla 11. Condiciones cromatográficas.....	42
Tabla 12 Parámetros del espectrómetro de masas.....	42
Tabla 13. Parámetros de la fuente de ionización.....	43
Tabla 14. Recuperación de la extracción en fase sólida.....	44
Tabla 15. Áreas obtenidas en la prueba de efecto matriz.....	49
Tabla 16. Linealidad del sistema.....	50
Tabla 17. Resultados obtenidos para la curva 1 del método.....	51
Tabla 18. Concentración recuperada para la curva 1 del método.....	51
Tabla 19. Resultados obtenidos para la curva 2 del método.....	52
Tabla 20. Concentración recuperada para la curva 2 del método.....	53
Tabla 21. Resultados obtenidos para la curva 3 del método.....	54
Tabla 22. Concentración recuperada para la curva 3 del método.....	54
Tabla 23. Recobro absoluto para Casiopeína Ilgly®.....	56
Tabla 24. Recobro absoluto para Prednisona (estándar interno).....	56
Tabla 25. Repetibilidad y exactitud del método.....	57

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química del cisplatino.....	5
Figura 2. Estructura química de la Casiopeína Ilgly®.....	7
Figura 3. Diagrama de la extracción en fase sólida.....	26
Figura 4. Prueba de supresión iónica.....	29
Figura 5. Espectro de masas de Casiopeína Ilgly® en metanol.....	33
Figura 6. Espectro de masas de la fragmentación del ión molecular de Casiopeína Ilgly® (345 m/z).....	33
Figura 7. Espectro de masas de la fase móvil.....	34
Figura 8. Espectro de masas de Casiopeína Ilgly® en fase móvil.....	35
Figura 9. Variación en el volumen de inyección de la muestra.....	36
Figura 10. Optimización del flujo de gas.....	37
Figura 11. Optimización del nebulizador.....	37
Figura 12. Espectro de masas de Acetaminofen.....	38
Figura 13. Espectro de masas de Diclofenaco.....	39
Figura 14. Espectro de masas de Clorhidrato de fenilefrina.....	39
Figura 15. Espectro de masas de Guaifenesina.....	39
Figura 16. Espectro de masas de Ketoprofen.....	39
Figura 17. Espectro de masas de Ibuprofen.....	40
Figura 18. Espectro de masas de Prednisona.....	40
Figura 19. Cromatograma obtenido al inyectar Ibuprofen con las condiciones cromatográficas para cuantificar Casiopeína Ilgly.....	41
Figura 20. Cromatograma obtenido al inyectar Ketoprofen con las condiciones cromatográficas para cuantificar Casiopeína Ilgly.....	41
Figura 21. Cromatograma obtenido al inyectar Prednisona con las condiciones cromatográficas para cuantificar Casiopeína Ilgly.....	41
Figura 22. Cromatograma del control medio.....	43
Figura 23. Cromatogramas de muestras de sistema y muestras extraídas.....	44

Figura 24. Diagrama de extracción en fase sólida.....	45
Figura 25. Cromatograma del blanco de reactivos.....	45
Figura 26. Cromatogramas de los blancos de plasma provenientes de 6 folios diferentes.....	46
Figura 27. Cromatograma del blanco de plasma (mezcla de 6 folios individuales o “pool”).....	46
Figura 28. Cromatograma del blanco de plasma con heparina.....	47
Figura 29. Cromatograma del blanco de plasma adicionado con estándar interno.....	47
Figura 30. Cromatograma del límite de cuantificación.....	48
Figura 31. Infusión directa de Casiopeína Ilgly® para la prueba de supresión iónica.....	49
Figura 32. Curva de calibración del sistema.....	50
Figura 33. Curva de calibración 1 del método.....	52
Figura 34. Curva de calibración 2 del método.....	53
Figura 35. Curva de calibración 3 del método.....	55

RESUMEN

En la actualidad el cáncer es una de las causas de mayor mortalidad a nivel mundial.

En el proyecto de Casiopeínas[®] encabezado por la Dra. Lena Ruiz en la Facultad de Química de la UNAM se diseñaron y sintetizaron nuevos compuestos de coordinación con Cu (II) análogos del cisplatino, que están patentados y registrados bajo el nombre de Casiopeínas[®]. Estos compuestos han sido estudiados para conocer su actividad antineoplásica, con la finalidad de desarrollar una nueva alternativa terapéutica para el tratamiento del cáncer. Los estudios para la Casiopeína IIgly[®] y Casiopeína III-ia[®] se encuentran finalizando la fase preclínica.

En el departamento de Biofarmacia se tiene como objetivo desarrollar métodos bioanalíticos para la cuantificación de la Casiopeína IIgly[®] y Casiopeína III-ia[®] en diferentes fluidos biológicos que permitan evaluar la farmacocinética de éstos compuestos.

En el presente estudio se desarrolló un método analítico por cromatografía de líquidos de alta resolución acoplado a espectrometría de masas (CLAR-EM) para la cuantificación de Casiopeína IIgly[®] en plasma humano, se disminuyó el límite de cuantificación reportado (de 100 a 25 ng/mL) y se utilizó Prednisona como estándar interno. La extracción del analito se realizó por extracción en fase sólida (EFS) previa precipitación de proteínas. El método fue lineal en un intervalo de 25 a 1000 ng/mL, selectivo, repetible y exacto.

I.- INTRODUCCIÓN

1.0 Cáncer

El cáncer es una entidad patológica caracterizada por el crecimiento anormal de células de un organismo, existen más de cien formas distintas con un comportamiento biológico y manifestaciones clínicas diferentes.⁽¹⁾

Esta enfermedad es resultado de una serie de alteraciones genéticas, que causan el comportamiento anormal de la célula, situación que es transmitida a células hijas y que se manifiesta por una reducción del control del crecimiento y la función celular.

En este comportamiento anormal se incluyen cambios en el crecimiento, tolerancia a alta densidad celular, crecimiento celular no regulado por señales externas (autónomo), pérdida de la inhibición por contacto, independencia en el anclaje y tumorigenicidad (capacidad de invadir tejidos, metastizar y colonizar lugares a distancia).

El cáncer se inicia cuando una célula comienza a proliferar de modo incontrolado, lo que puede provocar la formación de una masa de células denominada tumor. Cuando las células tumorales no se disipan, se dice que el tumor es benigno, y puede seguir creciendo sin invadir el tejido circundante, detener su crecimiento o reducirse. Cuando las células cancerosas tienen la capacidad de migrar e invadir otros tejidos y establecer un nuevo conjunto de células anormales, ocurre lo que se conoce como metástasis y el tumor se convierte en maligno.⁽²⁾⁽³⁾⁽⁴⁾

1.1 Panorama actual

Con más de 7 millones de nuevos casos cada año, el cáncer se ha convertido en una de las enfermedades más devastadoras en el mundo. Las causas y tipos de cáncer varían en diferentes regiones geográficas, pero en la mayoría de los países, el cáncer es una de las enfermedades con mayor índice de mortalidad.⁽⁴⁾

En 2007, fallecieron en el mundo por alguna neoplasia 7.9 millones de personas que representan 13% de las defunciones generales, debidas principalmente a cáncer de pulmón, estómago, hígado, colon y mama. De acuerdo con las estimaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS), se espera que las muertes por neoplasias sigan en aumento y alcancen 12 millones de casos para 2030.⁽⁴⁾

Más del 70% de todas las muertes por cáncer ocurren en países de bajos y medianos recursos, donde los recursos disponibles para la prevención, diagnóstico y tratamiento son limitados o no existen.

En México el cáncer se ubica en la tercera causa de muerte. Del total de defunciones registradas en el país durante 2009 (564,673), 12 de cada 100 tuvieron como causa principal algún tipo de cáncer (68,454).⁽⁴⁾

1.2 Tratamientos contra el cáncer

El principal objetivo del tratamiento contra el cáncer es erradicarlo, pero como esto no es posible en todos los casos, se busca la paliación, disminución de los síntomas, prolongación de la vida del paciente, tratando de conservar la calidad de vida del individuo.

Los tratamientos contra el cáncer pueden causar daño al organismo, debido a que no existe una total selectividad hacia las células cancerosas. Actualmente se utilizan tratamientos aislados o en combinación, para buscar una mayor efectividad, dependiendo del tipo de cáncer, la distribución y el estado del paciente. En estos se incluyen la cirugía, inmunoterapia, terapia génica, radioterapia y quimioterapia.

El tratamiento del cáncer se divide en cuatro grupos principales: cirugía (extirpación del tumor, transplante de médula ósea), radioterapia, terapia biológica (terapia génica e inmunoterapia) y quimioterapia (fármacos citotóxicos y terapia hormonal). En la mayoría de los casos, los tratamientos se combinan para tener un mejor resultado, pero sólo un porcentaje muy bajo de pacientes logran una recuperación total.⁽⁵⁾

La cirugía es el primer tratamiento utilizado para extirpar tumores sólidos, es la terapia más rápida utilizada para remover tumores primarios, pero insuficiente en caso de metástasis.⁽⁶⁾

La inmunoterapia se basa en la activación de una respuesta antitumoral específica como consecuencia de la expresión de nuevos antígenos por las células cancerosas, denominados tumor-específicos o tumor asociados, así uno de los principales inconvenientes es la adecuada caracterización de los antígenos tumorales y su escasa inmunogenicidad.⁽⁶⁾

La terapia génica utiliza la manipulación genética para dotar de una nueva propiedad a las células, que permite aprovecharlas en algún aspecto de la patología oncológica con fines terapéuticos.⁽⁷⁾

La radioterapia utiliza radiación de alta energía, que incide en las células.

Los tratamientos pueden ser neoadyuvantes (primer tratamiento), radicales (único tratamiento), adyuvantes (después de cirugía o quimioterapia), concomitantes (con otro tratamiento) o de dosis intraoperatoria (dosis única durante la cirugía).⁽⁸⁾

1.2.1 Quimioterapia

La quimioterapia se basa en la utilización de fármacos para erradicar tumores cancerosos, causando daño citotóxico que pueda disminuir la progresión del tumor.

Debido a que el cáncer no es comúnmente un proceso localizado, la quimioterapia suele usarse como adyuvante en la cirugía y la radiación para la obtención de mejores resultados. Se ha logrado un avance significativo en el tratamiento de diferentes tipos de cáncer por la implementación de radioterapias y nuevos fármacos. Sin embargo, algunos de los fármacos antineoplásicos más efectivos tienen efectos adversos severos como nefro y cardiotoxicidad.

El cisplatino es uno de los fármacos antineoplásicos más utilizados, es efectivo en el tratamiento de varios tipos de tumores sólidos, en especial cáncer de testículo. Su uso ha sido limitado por sus severos efectos adversos en la función del riñón y por el descubrimiento de muchas líneas celulares tumorales

resistentes. Por lo que se han buscado nuevos fármacos antineoplásicos.⁽⁹⁾

El interés en los fármacos antineoplásicos se originó desde el descubrimiento del cisplatino como uno de los fármacos más exitosos en el tratamiento de tumores, principalmente para el testicular y de ovarios. Este y la segunda generación de fármacos a base de platino como el carboplatino y el oxaliplatino, han generado que se prueben gran número de fármacos con un metal como base, para evaluar su actividad antineoplásica. Fármacos basados en compuestos metálicos (galio, germanio, bismuto, etc.), complejos con metales de baja transición (titanio, vanadio, niobio, molibdeno y rhenio) y complejos con metales de alta transición (rutenio, rodio, iridio, platino, cobre y oro) han mostrado potencial para quimioterapia.⁽¹⁰⁾

Todos los fármacos antineoplásicos son citotóxicos, por lo que afectan tanto el desarrollo de células normales como neoplásicas, dando lugar a efectos colaterales, causados por su falta de selectividad, dado que los fármacos quimioterapéuticos existentes tienen como blanco a los mecanismos utilizados por las células en proliferación y no a anomalías específicas asociadas a las células tumorales. Sin embargo, dado que las células neoplásicas son mucho más efectivas y se multiplican con mayor rapidez que las células normales, son más susceptibles al efecto de los fármacos antineoplásicos.

1.2.1.1 Cisplatino

Compuesto inorgánico, cis-diaminodicloroplatino en el que el platino se encuentra en estado de oxidación +2. Actúa sobre las bases del ADN, y se comporta como un agente bifuncional produciendo enlaces cruzados entre las dos cadenas del ADN. Es ampliamente utilizado como quimioterapia, pero sus efectos adversos son severos.

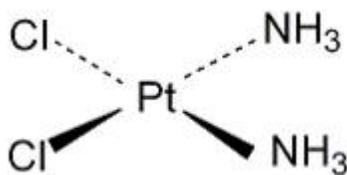


Figura 1. Estructura química del cisplatino

1.3 Resistencia a fármacos antineoplásicos

Se ha reportado que tumores, como el de pulmón y colon son resistentes a algunos agentes terapéuticos (cisplatino, ciclofosfamida, etc.).

La mezcla heterogénea de las células que forman el tejido tumoral contiene un número de células resistentes y sensibles. Después del tratamiento, las células resistentes no son afectadas, permaneciendo activas y posiblemente proliferando más rápido como respuesta al daño tisular. El mecanismo de resistencia es probablemente un proceso multifactorial debido a que la resistencia de células tumorales a un agente quimioterapéutico puede ser comunicada por otras, aún si los fármacos tienen diferentes mecanismos de acción.⁽¹¹⁾

1.4. Casiopeínas®

1.4.1 Antecedentes

Se sintetizó una familia de compuestos de coordinación con Cu(II) como centro metálico, los cuales presentan en la esfera de coordinación un ligante bidentado del tipo diiminas (N-N) y otro que puede ser aminoacidato (N-O) o donador por oxígeno (O-O), con la fórmula general $[\text{Cu}(\text{N-N})(\text{O-O})]\text{NO}_3$ o $[\text{Cu}(\text{N-N})(\text{O-N})]\text{NO}_3$, llamados Casiopeínas®. Tienen alta actividad antineoplásica en modelos experimentales *in vitro* contra varias líneas celulares tumorales, y también ha mostrado actividad *in vivo*. Patentados por Lena Ruiz.⁽¹²⁾

Debido al centro metálico, un probable mecanismo de acción de estas moléculas es la generación de radicales libres que causarían daño oxidativo.

El diseño de las moléculas se basó en tres factores: el compuesto debía contener un metal esencial para disminuir la toxicidad; contener quelatos que favorecieran la configuración cis alrededor del ión metálico y contener quelatos mixtos que favorecieran diferentes niveles de hidrofobicidad.⁽¹³⁾

La Dra. Lena Ruiz, tomó como base la estructura del cisplatino (figura 1), un fármaco con actividad antineoplásica alta, pero que tiene efectos adversos severos. Se trabajó con otros metales que resultaban menos tóxicos y que

podieran ser eliminados fácilmente por proceso homeostáticos. Las Casiopeínas[®] resultaron muy similares geoméricamente a los compuestos de platino,⁽¹³⁾ debido a que la molécula es plana, y posiblemente pueda intercalarse en el ADN. El centro metálico puede participar en reacciones rédox para liberar especies reactivas de oxígeno que oxiden al ADN dando como resultado daños irreparables en su estructura, adicionalmente el cobre puede o no intercambiar alguno de sus ligantes presumiblemente el donador O-O para coordinarse directamente con los donadores por nitrógeno de las bases.⁽¹⁴⁾

Todas las Casiopeínas[®] tienen un ligante diimina distinto, con características hidrofóbicas, y por otro lado tienen un ligante hidrofílico, lo que le permite a la molécula ser transportada con facilidad y atravesar membranas. La variabilidad en el tipo, número y posición de los ligantes, son los responsables de su actividad.⁽¹³⁾

1.4.2 Casiopeína IIgly[®]

Fórmula química y estructura

La Casiopeína IIgly[®]: [Acua (4,7- dimetil-1,10-fenantrolina) (glicina) Cu (II)] NO₃, tiene un peso molecular de 425,87 g/mol (monohidratada).

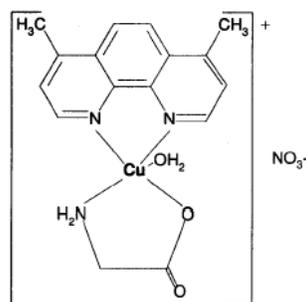


Figura 2. Estructura química de la Casiopeína II-gly[®], [Acua (4,7- dimetil-1,10-fenantrolina) (glicina) Cu (II)]

1.4.3 Propiedades fisicoquímicas.

Características físicas: Polvo fino de color azul intenso.

Solubilidad: Muy soluble en metanol, etanol y mezcla de agua-alcohol (50:50),

soluble en agua, poco soluble en solución amortiguadora.

Pka: 5,4⁽¹⁵⁾

-Estabilidad: Estable en agua y en solución dextrosada a pH de 7 a 8 por aproximadamente 7 días.⁽¹⁶⁾

Precipita con NaCl

La Casiopeína Ilgly[®] presenta dos picos máximos de absorción a longitudes de onda de 274 nm y 209 nm.

1.4.4 Actividad *in vitro* de la Casiopeína Ilgly[®]

Se determinó que la Casiopeína Ilgly[®] es más activa en estudios *in vitro* que el cisplatino en diferentes líneas tumorales humanas: HeLa, SiHa, InBI (cáncer cervicouterino), PC-3 (próstata), HCT-15 (colon), MCF-7 (mama).⁽¹⁷⁾

A dosis bajas, la Casiopeína Ilgly[®] induce muerte a través de la generación de especies reactivas de oxígeno y apoptosis relacionada con activación de caspasas.⁽¹⁸⁾

También se ha reportado la inducción de apoptosis con Casiopeína Ilgly[®] en células murinas de leucemia L1210 y células humanas de cáncer de ovario CH1, tanto en células sensibles, como refractarias a cisplatino, donde se observó condensación de cromatina y fragmentación nuclear.⁽¹⁹⁾

La Casiopeína Ilgly[®] es más efectiva que el cisplatino para alcanzar la muerte celular en células de meduloblastoma humano HTB-186, siendo esto por apoptosis principalmente.

1.4.5 Actividad antineoplásica *in vivo* de Casiopeína Ilgly[®]

Se ha demostrado actividad antineoplásica *in vivo* de la Casiopeína Ilgly[®] en tumores murinos isotransplantados con diferentes líneas celulares, mostrando índices altos de supervivencia⁽²⁰⁾, en ratones xenotransplantados subcutáneamente con células de carcinoma de colon humano HCT-15⁽²⁰⁾⁽²¹⁾ actividad antitumoral parcial sobre HeLa transplantado al ratón desnudo⁽²¹⁾ y sobre el crecimiento del glioma C6 *in vitro* e *in vivo*.⁽²²⁾

1.4.6 Mecanismo de acción

Se ha propuesto la generación inicial de especies reactivas de oxígeno (ERO) que causarían daño oxidativo (promovido por la reducción del centro metálico de cobre) a diversas estructuras celulares como las mitocondrias o el ADN. Además puede intervenir en reacciones de óxido-reducción de tipo Fenton y Haber-Weiss en las que el cobre puede participar provocando daño por radicales libres⁽²³⁾ así como la unión al ADN, con una alta afinidad, para degradar a los ácidos nucleicos ADN y ARN, en presencia de agentes reductores como el ácido ascórbico.⁽²⁴⁾

La mayoría de los experimentos con cultivos de tejidos tanto normales como neoplásicos, indican que las Casiopeínas[®] causan daños a las mitocondrias y a la membrana por bloqueo de algunas vías y desacoplamiento de la cadena respiratoria⁽²⁵⁾⁽²⁶⁾ por la interacción con succinato y 2-oxoglutarato deshidrogenasa,⁽²⁵⁾⁽²⁷⁾ así como lipoperoxidación de membrana tanto a tejidos normales como neoplásicos⁽²⁴⁾ y en la mayoría de los casos el resultado es la muerte por apoptosis, a través de las vías, independiente y dependiente de las caspasas.⁽²⁸⁾

1.4.7 Toxicidad aguda en rata y ratón

Los estudios de toxicidad constituyen una parte muy importante dentro del desarrollo de un nuevo fármaco, su objetivo es evaluar el riesgo o peligro potencial que un agente químico puede ocasionar sobre la salud humana cuando es objeto de exposiciones agudas o crónicas.

En la tabla 1 se presentan los estudios de toxicidad aguda en ratas, ratones y perros. DL 50, DL90 y DL99.⁽¹¹⁾⁽²⁹⁾

Tabla 1. Toxicidad de Casiopeína Ilgly®

Rats	Wstr nado		Wstr hertra
	i.p.mg/kg	i.v.mg/kg	i.p.mg/kg
D.50	6,6	7,8	8,8
D.90	9,8	—	10,9
Ratnes	ICR acb		ICR hertra
	i.p.mg/kg	i.v.mg/kg	i.p.mg/kg
D.50	15,9	15,5	15,7
D.9	19,9	17,95	17,1
Perros	i.v.mg/kg		
D.50	5,0		
D.99	8,0		

1.4.8 Estudios farmacocinéticos

1.4.8.1 Farmacocinética en ratas

Estudios farmacocinéticos en ratas a dosis de 8 mg/kg por vía i.v. (intravenosa) en vena la caudal de la cola reportaron que el modelo que mejor se ajusta a los datos farmacocinéticos obtenidos fue el modelo abierto de dos compartimentos para administración por bolo intravenoso.

Los parámetros farmacocinéticos de acuerdo a un modelo de dos compartimentos encontrados fueron: depuración (Cl= 1,114 mL/min), volumen de distribución (Vd= 0,065 L), vida media de eliminación ($t_{1/2}$ = 228,18 min), constante de eliminación (β = 0,003 min⁻¹), constante de distribución α =0,068 min⁻¹) y concentración plasmática a tiempo cero (Co= 33,79 µg/mL).⁽¹¹⁾

1.4.8.2 Farmacocinética en perros

Los estudios farmacocinéticos en perros Beagle a dosis de 1.5 y 3 mg/Kg indicaron un tiempo de vida media de 2.45 h y 1.9 h, depuración de 1.46 y 3.09 L/h/Kg, volumen de distribución de 5.15 y 8.3 L/Kg y área bajo la curva de 0.345 y 0.512 µg h/mL.⁽³⁰⁾

1.4.8.3 Métodos analíticos para cuantificación de Casiopeína Ilgly®

Se tienen reportados pocos métodos analíticos para la cuantificación de Casiopeína Ilgly®, la mayoría por cromatografía de líquidos de alta resolución acoplado a detección UV (CLAR-UV) en plasma y orina de rata y por CLAR-EM en

plasma de perro⁽³⁰⁾. Con un límite de cuantificación de 2.5 µg/mL para UV y de 0.1 µg/mL para CLAR-EM, este último no consideró un análisis con estándar interno.⁽¹¹⁾⁽¹⁶⁾

1.5 Etapas de investigación de un nuevo fármaco: preclínica y clínica^{(31)(32) (33)}

Una vez que la molécula es sintetizada o extraída de fuentes naturales, debe pasar por la etapa preclínica en donde se realizan un conjunto de estudios de laboratorio físico-químico, toxicológico y farmacológico, y de una etapa clínica, en donde la investigación se realiza en humanos. Esta última incluye cuatro fases.

La investigación clínica pretende observar en los seres humanos el comportamiento de un medicamento y demostrar su eficacia y seguridad. Este tipo de investigación se lleva a cabo inicialmente en unidades de farmacología clínica (fase I) y posteriormente en áreas de atención médica, hospitales o consulta externa (fase II, III y IV).

En la fase I se busca evaluar el efecto principal en el órgano blanco, determinar la dosis efectiva y corroborar las propiedades farmacológicas, así como determinar los valores farmacocinéticos y farmacodinámicos, identificar una dosis segura, para realizar estudios posteriores, describir la toxicidad en humanos, identificar la toxicidad limitante y la dosis máxima tolerada.

En la fase II se busca corroborar el efecto deseado en el órgano blanco, evaluar los efectos en otros órganos y se compara el nuevo medicamento con uno ya comercializado o con un placebo.

La fase III se enfoca a conocer la eficacia del medicamento, se comprueba la eficacia de las dosis elegidas, se obtiene información de calidad de vida y economía de la salud.

La fase IV se realiza después de que el medicamento ha conseguido permiso para su comercialización, también se conoce como farmacovigilancia y ayuda a enriquecer el perfil de seguridad del producto. Se utiliza como extensión de la fase III para recabar datos de seguridad con el uso prolongado.

1.6 Métodos bioanalíticos. ⁽³⁴⁾⁽³⁵⁾⁽³⁶⁾

Los métodos analíticos deben ser selectivos, sensibles, exactos y reproducibles para la evaluación cuantitativa de fármacos y son críticos para conducir a un estudio preclínico o clínico biofarmacéutico.

La selectividad es la capacidad de un método analítico para diferenciar y cuantificar el analito en la presencia de otros componentes en la muestra. La selectividad debe asegurarse en todo el intervalo de trabajo.

No deben de presentarse interferencias para los analitos, en caso de existir, estas deben ser menores al 20% para el analito de interés con respecto al límite de cuantificación del método y menores al 5% para el estándar interno.⁽³⁶⁾

Las sustancias interferentes potenciales en una matriz biológica incluyen componentes endógenos de la matriz, metabolitos, productos de descomposición, entre otros.

La exactitud de un método analítico describe que tan cerca están los resultados obtenidos por el método del valor verdadero (concentración) del analito. La exactitud es determinada por la réplica de análisis de muestras que contienen una cantidad conocida del analito.

La precisión de un método analítico describe que tan cerca están los resultados individuales de un analito cuando el procedimiento es aplicado repetidamente a múltiples alícuotas de un muestra homogénea de la matriz biológica. La precisión determinada a cada nivel de concentración no debe exceder el 15% de coeficiente de variación (CV). La precisión se divide en repetibilidad y reproducibilidad, la primera es determinada con las mismas condiciones de trabajo y la reproducibilidad, mediante determinaciones con diferentes condiciones como analistas, equipo, o laboratorios.

El recobro de un analito se debe realizar comparando la respuesta del analito después de aplicar la técnica de extracción en el fluido biológico contra la respuesta del analito en solución. El recobro pone de manifiesto la eficiencia de la extracción de un método analítico dentro de los límites de variabilidad. El recobro de un analito no necesita ser del 100%, pero necesariamente el recobro del analito

y del estándar interno debe ser consistente, preciso y reproducible. Los experimentos de recobro deben funcionar comparando los resultados analíticos de muestras extraídas a tres concentraciones (baja, media y alta) con estándares en solución que representen el 100% de recobro.

Una curva de calibración (estándar) es una relación entre la respuesta instrumental y la concentración conocida del analito. La curva de calibración debe ser generada para cada analito en la muestra y debe ser preparada en la misma matriz biológica que las muestras en el estudio mediante la adición a la matriz de concentraciones conocidas del analito. Las concentraciones del estándar debe ser elegido en base al rango de concentración que se espera observar en el estudio. La curva de calibración debe consistir en una muestra blanco (muestra de la matriz procesada sin estándar interno), una muestra cero (muestra de la matriz procesada con el estándar interno), y por lo menos 5 puntos que cubran el rango esperado, incluyendo el límite de cuantificación.

La concentración menor del estándar en la curva debe ser aceptado como el límite de cuantificación si las siguientes condiciones se cumplen: la respuesta del analito deben ser al menos cinco veces la respuesta comparada a la respuesta del blanco: el pico del analito (respuesta) debe ser identificable y reproducible con una precisión de 20% y una exactitud de 80-120%.

1.7 Cromatografía de líquidos ⁽³⁷⁾

La cromatografía es un método físico de separación en el que los componentes a separar se distribuyen entre dos fases, una está en reposo (fase estacionaria) y la otra se mueve en una dirección definida (fase móvil). La separación cromatográfica ocurre cuando los componentes de una mezcla interactúan de diferente manera con la fase móvil y/o la fase estacionaria y por lo tanto toman diferentes tiempos para moverse desde la posición donde se introduce la muestra hasta el detector. El cromatograma resultante muestra cada compuesto en forma de picos con un tiempo de retención característico, con lo que se puede identificar a cada compuesto.

Existen detectores de fluorescencia, de índice de refracción, de UV-VIS, de arreglo de diodos y el de espectrometría de masas.

1.8 Espectrometría de masas (EM)⁽³⁸⁾

La espectrometría de masas está basada en el análisis de iones que se mueven a través de vacío. La ionización de la muestra ocurre en la fuente de ionización y los iones formados son analizados por un analizador de masas (filtro de masas) que controla el movimiento de los iones mientras éstos viajan al detector para convertirse en señales.

Un analizador de masas de cuadrupolo consiste en cuatro rodillos paralelos a los cuales se aplican voltajes específicos. Éstos filtran los iones y deja pasar sólo a algunos de ellos con valores de la relación de masa/carga (m/z) en particular, determinado por los voltajes aplicados.

Todos los iones que comprenden la muestra son generados en la fuente. Cuando una combinación de voltaje específica es aplicada, sólo los iones correspondientes a determinada m/z pueden pasar a través del cuadrupolo para alcanzar el detector. Cuando se incrementan los voltajes, los iones con otros valores de m/z pueden pasar.

El acoplamiento de un detector de espectrometría de masas a un sistema de separación cromatográfico constituye una herramienta importante para la identificación y cuantificación de sustancias.

Cuando el detector de masas se opera en modo “scan”, proporciona una información espectral muy precisa sobre la identidad del compuesto, el “scaneo” completo es obtenido cuando se incrementan los voltajes aplicados a los 4 rodillos en un cuadrupolo. Cuando se opera en modo SIM (modo de selección de ión) proporciona una excelente sensibilidad con una alta especificidad, lo que posibilita el análisis cuantitativo.

Existen diferentes tipos de interfases, cada una debe eliminar el gas y vapor procedente de la fase móvil antes de entrar en la región de alto vacío del espectrómetro de masas (EM) y transformar las moléculas que se encuentran en

solución en la fase móvil en iones en fase gaseosa, sin que se produzca degradación térmica. La sensibilidad del análisis por cromatografía de líquidos de alta resolución acoplado a espectrometría de masas (CLAR-EM) depende del analito a analizar y de la interfase empleada.

Las técnicas de ionización a presión atmosférica (API) más utilizadas son la ionización por electrospray (ESI) y la ionización química a presión atmosférica (APCI). En éstas técnicas, los iones formados son transportados de la fuente a las regiones de alto vacío del analizador a través de diferentes etapas de vacío separadas por diferentes lentes. En la siguiente etapa los iones son enfocados y guiados a través de los orificios de los lentes hacia el interior del EM gracias a la aplicación de campos eléctricos adecuados.

II.- OBJETIVO

Desarrollar y optimizar un método analítico por CLAR-EM, para la cuantificación de Casiopeína Igly en plasma humano.

III.-JUSTIFICACIÓN

La Casiopeína-Ilgly[®] ha demostrado tener actividad *in vitro* e *in vivo* frente a diferentes células cancerígenas, además de una toxicidad menor a los fármacos utilizados comúnmente en quimioterapia, por lo que es necesario el desarrollo de un método analítico para cuantificar la Casiopeína-Ilgly[®] en plasma humano para utilizarlo en estudios posteriores.

Anteriormente se han desarrollado métodos para la cuantificación de Casiopeína Ilgly[®] por CLAR-UV con un límite de cuantificación de 2.5 µg/mL y de 0,1 µg/mL por espectrometría de masas, sin embargo se ha observado que estos límites son muy altos para obtener una adecuada área bajo la curva para definir la extensión del fármaco y por otro lado, por CLAR-EM no se ha reportado un análisis con estándar interno.

Por tal razón el objetivo del estudio es desarrollar un método analítico por CLAR-EM para la cuantificación de Casiopeína-Ilgly[®] en plasma humano, disminuyendo el límite de cuantificación reportado y utilizar un estándar interno.

IV.- PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Materiales y métodos

4.1.1 Estándares

- [Cu (4,7-dimetil-1, 10-fenantrolina) (glicina)]NO₃•2 H₂O (Casiopéina Ilgly®)
Lote: 181MBG160106 Sintetizada por el Departamento de Inorgánica y Química Nuclear (UNAM)
Pureza 100 %, determinación por análisis elemental
- Prednisona USP lote: K
Pureza 100 %

4.1.2 Reactivos

- Ácido heptafluorobutírico 97% (HFBA) Sigma-Aldrich
- Metanol (grado HPLC) Tecnolab
- Agua desionizada
- Diclorometano J.T. Baker

4.1.3 Materiales

- Cartuchos de extracción en fase sólida Strata X (33µm, 60mg/3 mL) Phenomenex
- Columna cromatográfica Synergi Polar RP 30x2 mm, 4µm. Phenomenex
- Precolumna Security Guard Cartridge 4x3 mm. Phenomenex
- Matraces volumétricos de 10 mL
- Matraz volumétrico de 1L
- Puntas para pipetas automáticas de 200, 1000 y 5000 µL
- Probetas de 100 y 1000 mL
- Frascos reservorios para fase móvil y/o soluciones de 100, 250, 500 y 1000 mL
- Viales con tapa de 1.5 mL

- Insertos de 200 μ L
- Pipetas Pasteur
- Tubos eppendorf de 2 mL
- Tubos de vidrio de 13X100 mm
- Vasos de precipitado de 25, 100 y 250 mL
- Naves de pesado
- Espátulas
- Gradillas

4.1.4 Material biológico

El fluido biológico utilizado fue plasma humano fresco congelado, con citratos como anticoagulante, proporcionado por Médica Sur (donación) y que resultó negativo a las pruebas de VIH, HCV, VDRL y AgsHb.

4.1.5 Equipos e instrumentos

- Balanza analítica Sartorius A210 P
- Vortex Genie 2. Modelo G-560
- Desionizador Milli Q Water System. Millipore No. 01395
- Equipo para filtración de disolventes Millipore
- Sonicador Fisher Scientific FS60
- Sistema de vacío para extracción en fase sólida (EFS) Manifold Waters
- Bomba de vacío Millipore
- Centrífuga refrigerada, Termo IEC modelo Micromax RF
- Termoagitador, modelo CIVEQ JB-2
- Sistema evaporador con flujo de nitrógeno. Sin marca
- Pipeta automática Eppendorf de 100- 1000 μ L
- Pipeta automática Eppendorf de 20- 200 μ L
- Pipeta automática Eppendorf de 1000-5000 μ L
- Adaptador T para HPLC-EM
- Bomba de infusión directa para espectrómetro de masas, jeringa y adaptador

-Instrumentación CLAR (HPLC) Agilent 1200 –EM QQQ 6400

Sistema de CL Agilent (Waldbronn Alemania)- EM (Palo alto CA, USA):

Bomba binaria Agilent Modelo G1312B

Automuestreador Agilent Modelo G1367B

Termostato del automuestreador Modelo G1330B

Desgasificador Agilent Modelo G1379B

Compartimento para columna Modelo G1316A

Detector de MS Triple Cuadrupolo Agilent Modelo G6410A

4.1.6 Software

Integrador computacional Mass Hunter. Agilent

4.2 Preparación de soluciones

4.2.1 A. Solución estándar de Casiopeína Ilgly[®] 1000 µg/mL en metanol

Pesar con exactitud 10.0 mg de Casiopeína Ilgly[®], transferir cuantitativamente a un matraz volumétrico de 10 mL, disolver y llevar a volumen de aforo con metanol grado HPLC.

4.2.2 B. Solución estándar de Casiopeína Ilgly[®] 100 µg/mL en fase de reconstitución

Tomar 1000 µL de la solución A (Casiopeína Ilgly[®] 1000 µg/mL) y transferir a un matraz volumétrico de 10 mL, llevar a volumen de aforo con fase de reconstitución (HFBA 0,1%: MeOH, 6:4 v/v).

4.2.3 C. Solución estándar de Casiopeína Ilgly[®] 10 µg/mL en fase de reconstitución

Tomar 100 µL de la solución A (Casiopeína Ilgly[®] 1000 µg/mL) y transferir a un matraz volumétrico de 10 mL, llevar a volumen de aforo con fase de reconstitución (HFBA 0,1%:MeOH, 6:4 v/v)

4.2.4 D. Solución estándar de Casiopeína Ilgly® 10 µg/mL en metanol

Tomar 100 µL de la solución A (Casiopeína Ilgly® 1000 µg/mL) y transferir a un matraz volumétrico de 10 mL, llevar a volumen de aforo con metanol.

4.2.5 E. Solución estándar de Prednisona 1000 µg/mL

Pesar con exactitud 10.0 mg de Prednisona, transferir cuantitativamente a un matraz volumétrico de 10 mL, disolver y llevar a volumen de aforo con metanol grado HPLC.

4.2.6 F. Solución estándar de Prednisona 25 µg/mL

Transferir 250 µL de solución estándar de Prednisona 1000 µg/mL a un matraz volumétrico de 10 mL y llevar a volumen de aforo con metanol grado HPLC.

4.2.7 G. Solución de adecuabilidad Casiopeína Ilgly®/Prednisona 10/25 µg/mL

Transferir 100 µL de solución estándar de Casiopeína Ilgly® 1000 µg/mL y 250 µL de solución estándar de Prednisona 1000 µg/mL a un matraz volumétrico de 10 mL y llevar a volumen de aforo con fase de reconstitución.

4.2.8 Solución de ácido heptafluorobutírico (HFBA) al 5%

Colocar 50 mL de agua desionizada en un matraz volumétrico de 100 mL, y añadir 5.15 mL de HFBA (97%), llevar a volumen de aforo con agua desionizada.

4.2.9 Solución de ácido heptafluorobutírico (HFBA) al 0.1%

Colocar 500 mL de agua desionizada en un matraz volumétrico de 1000 mL, agregar 1030 µL HFBA (97%), llevar a volumen de aforo con agua desionizada. Filtrar por membrana de 0,22 µm. Sonicar 15 minutos.

4.2.10 Fase móvil: HFBA 0.1%: Metanol, 60:40 v/v

La mezcla de la fase móvil se realizó de manera automática en el equipo, colocando en la línea A de la bomba el HFBA 0.1% y el Metanol en B.

4.2.11 Fase de reconstitución: HFBA 0.1%: Metanol, 60:40 v/v

Colocar 60 mL de HFBA 0.1% y 40 mL de metanol en un frasco reservorio de 100 mL, mezclar.

4.3 Desarrollo del método

4.3.1 Espectro de masas

Como primer paso en el desarrollo del método fue necesario la determinación del espectro de masas del analito en solución, para identificar los iones producidos por la molécula. También se determinó el espectro de masas del disolvente utilizado para descartar la presencia de interferencias debidas a los iones producidos por el disolvente.

4.3.1.1 Espectro de masas de la Casiopeína Ilgly®

Para determinar el espectro de masas de Casiopeína Ilgly® se utilizó una solución de 10 µg/mL en metanol, la cual se infundió directamente al detector de masas, bajo las condiciones normales de trabajo del detector (condiciones “default”). La prueba se realizó con la ayuda de una bomba de infusión, la cual hace pasar la solución a una velocidad constante.

Tabla 2 Parámetros del detector utilizados en la infusión directa

Parámetro	Valor
Nebulizador	15 psi
Gas de secado	5 L/min
Temperatura	325 °C
Velocidad de infusión	0.4 mL/h

4.3.2 Fragmentación del ión molecular de la Casiopeína® Ilgly 345 m/z

Mediante infusión directa de la solución de Casiopeína Ilgly® 10 µg/mL en metanol, se obtuvo el patrón de fragmentación del ión molecular. Utilizando los mismos parámetros del detector descritos en la tabla 2. Se programó el detector para seleccionar el ión 345 m/z y fragmentarlo.

4.3.3 Espectro de masas de la fase móvil

Se realizó una infusión directa de la fase móvil para observar los iones aportados por la fase y se descartó la formación de algún ion que pudiera interferir con el análisis.

4.3.4 Espectro de masas de la Casiopeína Ilgly® en fase móvil

Mediante una infusión directa de la solución de Casiopeína Ilgly® 10 µg/mL en fase móvil se determinó el espectro de masas con las condiciones descritas en la Tabla 2.

4.3.5 Condiciones de detección.

Debido a que uno de los objetivos fue disminuir el límite de cuantificación, se utilizó como método de cuantificación la espectrometría de masas, ya que es de las más sensibles.

4.3.5.1 Selección de los parámetros de detección (EM)

Fue importante optimizar los parámetros del detector para obtener una mejor respuesta. A partir de los valores de configuración inicial para los parámetros del detector, se determinaron los valores con los cuales se obtuvo una mayor señal del analito de interés, mediante la variación de valores de voltaje en el equipo.

Esta optimización se llevó a cabo a partir de la infusión directa del analito de interés en la fase móvil y el monitoreo de la cantidad de iones de cuantificación

formados. Los parámetros del detector se variaron y se observó el decremento o incremento en la formación de iones. Esto se realizó para cada parámetro para así determinar el valor óptimo de cada uno, que favoreciera la respuesta del analito.

4.3.5.2 Selección de parámetros cromatográficos.

El siguiente paso del desarrollo del método fue establecer las condiciones cromatográficas que resultaron más adecuadas para la cuantificación de la Casiopeína Ilgly[®].

4.3.5.3 Elección de la columna cromatográfica.

La elección de la columna toma importancia ya que en esta se realiza la separación del analito de interés de los demás componentes de la muestra.

Se tomaron como referencia los experimentos realizados previamente⁽³⁰⁾ con columnas C8, C12 y C18 de diferentes marcas y composiciones de fase móvil, dónde se describió que la Casiopeína Ilgly[®] es inestable en condiciones cromatográficas estándares, ya que ocurre una disociación del complejo de coordinación debido a la ruptura de enlaces entre el ligando bidentado de glicinato y cobre. En ese estudio se obtuvieron mejores resultados (mejor forma de pico y resolución) utilizando fase estacionaria aromática (Synergi polar RP, grupo fenilo unido a base silica por medio de grupo éter) y un agente para formar un par iónico⁽³³⁾. La fase móvil con metanol se seleccionó en tal estudio entre otras por el incremento en la interacción π entre sistemas aromáticos. El agente formador de pares iónicos (HFBA) se eligió debido a que el ión formado con la Casiopeína fue estable a las condiciones de ionización y mostró mejor intensidad que otros.

En este desarrollo se consideraron las condiciones cromatográficas reportadas anteriormente como punto de partida. Se utilizó HFBA en la fase móvil para la formación de un par iónico más estable y una columna con fase estacionaria de características aromáticas. Partiendo de estas condiciones cromatográficas, se variaron algunos parámetros cromatográficos para optimizarlos.

4.3.6 Selección de estándar interno

En la búsqueda de un estándar interno se recomienda utilizar moléculas de estructura similar a la del analito de interés, pero dada la complejidad de la estructura de las Casiopeínas[®] y su inestabilidad para su análisis por EM⁽³⁰⁾ se probaron diferentes fármacos (sin tomar en cuenta la similitud en estructura).

Mediante infusión directa de diferentes compuestos en las condiciones de cuantificación de la Casiopeína Ilgly[®], se obtuvieron los espectros de masas y se observó si a las condiciones de detección de la Casiopeína Ilgly[®] se obtenía algún ion que pudiera ser cuantificado, excluyendo a los compuestos que presentaran iones con m/z similar a la Casiopeína Ilgly[®]. Posteriormente se inyectó el analito bajo las condiciones de cuantificación de la Casiopeína Ilgly[®] y se determinó si se observaba el pico de cuantificación de dicho analito y su tiempo de retención.

4.3.7 Extracción del analito de la matriz biológica

Una vez que se tuvieron las condiciones cromatográficas para cuantificar el analito de interés, se desarrolló un método para extraer el analito de la matriz biológica. Para lo cual se realizaron pruebas por precipitación de proteínas y extracción en fase sólida (EFS).

4.3.7.1 Precipitación de proteínas.

Se llevó a cabo la precipitación de las proteínas plasmáticas con acetonitrilo (1:1 v/v), con metanol (1:2 v/v), ácido fosfórico concentrado (10 µL) y HFBA 5% (500 µL).

Muestras plasmáticas de Casiopeína Ilgly[®] 750 µg/mL fueron adicionadas con los agentes precipitantes mencionados, posteriormente las muestras se agitaron y centrifugaron por 5 min a 15000 rpm. El sobrenadante se inyectó al sistema cromatográfico.

4.3.7.2 Extracción en fase sólida (EFS)

La extracción en fase sólida (EFS) es una técnica de limpieza de muestras que consiste en el uso de un cartucho que permite la concentración de las muestras con un riesgo mínimo de pérdida y contaminación. Los componentes de interés se retienen en la fase sólida, mientras que los contaminantes de la matriz se eluyen.

Se realizó EFS previa precipitación de proteínas con 500 μ L HFBA 5%, se añadió 100 μ L de estándar interno (Prednisona 25 μ g/mL) la muestra se agitó y se centrifugó por 5 min a 15000 rpm, el sobrenadante se sometió a EFS.

Para determinar el procedimiento de extracción se variaron disolventes en la fase de acondicionamiento, lavado y elusión durante la EFS, se realizaron pruebas con los siguientes métodos:

Tabla 3. Métodos de EFS

Método	Disolvente		
	Equilibrio	Lavado	Elusión
A	HFBA 5%	HFBA 5%	Diclorometano
B	HFBA 5%	Metanol 5%	Diclorometano
C	HFBA 5%	HFBA 5%	Metanol
D	HFBA 5%	Metanol 5%	Metanol
E	Agua	Metanol 5%	Metanol
F	HFBA 0,1%	Metanol 5%	Metanol

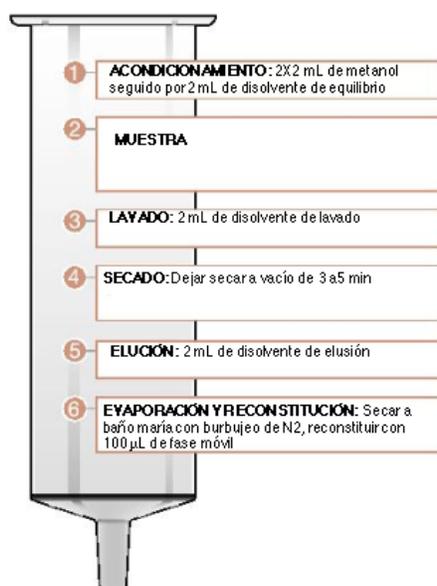


Figura 3. Diagrama de la extracción en fase sólida

4.4 Selectividad del método

Se estableció la selectividad del método analizando muestras blanco de la matriz biológica (plasma humano) de 6 donadores y la mezcla de los mismos, una muestra blanco de la mezcla adicionada con el analito a la concentración más baja y el estándar interno, muestra blanco de la mezcla adicionada sólo con el estándar interno y muestra blanco de la mezcla con heparina.

No debían presentar interferencias en el tiempo de retención del analito de interés, ni en el del estándar interno. En caso de que se presentara alguna señal, esta debería ser menor del 20% de la respuesta de la concentración más baja de la curva de calibración.

4.4.1 Preparación de los blancos

4.4.1.1 Blancos de plasma

Se colocó 1.0 mL de plasma (6 muestras individuales y la mezcla) en tubo eppendorf se agregaron 100 μ L de metanol y 500 μ L de HFBA 5%, se agitó por 30 segundos y se centrifugó por 5 min a 15000 rpm. Posteriormente se llevó a cabo la EFS.

4.4.1.2 Blanco de plasma con heparina

Se colocó 1.0 mL de plasma (mezcla) y 100 μ L de metanol en un tubo heparinizado, se agitó y se agregaron 500 μ L de HFBA 5%, se agitó por 30 segundos, se centrifugó por 5 min a 15000 rpm. Posteriormente se llevó a cabo la EFS.

4.4.1.3 Blanco de plasma con estándar interno

Se colocó 1.0 mL de plasma (mezcla) y 100 μ L de Prednisona 25 μ g/mL en un tubo eppendorf, se agitó y se agregaron 500 μ L de HFBA 5%, se agitó por 30 segundos, se centrifugó por 5 min a 15000 rpm. Posteriormente se llevó a cabo la EFS.

4.5 Límite de cuantificación

Para la concentración más baja de la curva de calibración se colocaron 950 μL de plasma (mezcla) a los que se adicionaron 50 μL de Casiopeína IIgly[®] 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 100 μL de Prednisona 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, se agitó y se agregaron 500 μL de HFBA 5%, se agitó por 30 segundos, se centrifugó por 5 min a 15000 rpm. Posteriormente se llevó a cabo la EFS.

4.6 Evaluación de efecto matriz

El efecto matriz se evaluó con blancos de plasmas procesados, reconstituidos con solución de Casiopeína IIgly[®] y el estándar interno después de evaporar a sequedad (último paso del método), la respuesta obtenida al analizar la muestra de plasma reconstituida con solución y la solución misma no debe verse reducida de manera considerable para considerar que no existe efecto debido a la matriz biológica.

4.7 Supresión iónica

La supresión iónica se evaluó con una prueba con un adaptador en forma de "T", donde se hizo pasar una solución del analito de interés al detector por medio de infusión directa (por un lado de la T, la cual es un adaptador) y por el otro lado se conecta el HPLC, al que se inyecta un blanco de plasma. La señal constante de los iones que provienen de la infusión directa no deben verse afectados por el blanco de plasma al tiempo de retención del analito de interés, indicando que no existe supresión de iones, en caso de suceder esto, se observará un pico negativo (un decremento en los iones detectados).

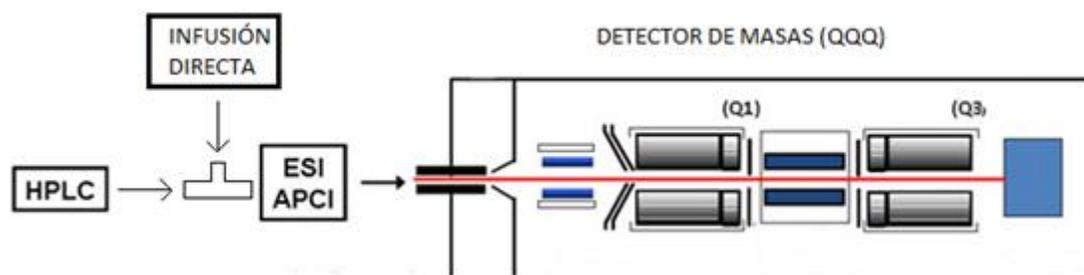


Figura 4. Prueba de supresión iónica

4.8 Linealidad del sistema

Se prepararon 2 curvas de calibración del sistema. Se debe demostrar una linealidad con un coeficiente de regresión mayor o igual a 0.99

4.8.1 Preparación de la curva de calibración de sistema

A partir de las soluciones stock de Casiopeína IIgly[®] descritas en los puntos 4.2.1 al 4.2.4 se preparó la curva de calibración en sistema como se describe en la tabla 4.

Tabla 4. Curva de calibración para linealidad del sistema

Nivel	Solución CIgly stock ($\mu\text{g/mL}$)	Alícuota (μL)	Prednisona μL 1000 $\mu\text{g/mL}$	Aforo \dagger (mL)	Conc. Final ng/mL
1	10	250	250	10	250
2	10	500	250	10	500
3	10	1000	250	10	1000
4	100	400	250	10	4000
5	100	800	250	10	8000
6	100	1000	250	10	10000

\dagger Aforo con fase móvil.

Nota. Las concentraciones de la curva de calibración en sistema tienen una concentración 10 veces mayor a la curva en método debido a que las muestras plasmáticas se concentran 10 veces (se parte de 1 mL de muestra y se reconstituye en 100 μL)

4.9 Linealidad del método

Para determinar la linealidad del método se prepararon 3 curvas de calibración en plasma en el intervalo de 25 a 1000 ng/mL y se obtuvo la ecuación derivada de la regresión lineal por mínimos cuadrados resultante de graficar la relación de áreas de Casiopeína IIgly®/Prednisona contra la concentración nominal de Casiopeína IIgly®.

Se consideraron las siguientes condiciones para el desarrollo de una curva de calibración: desviación menor al 20% de la concentración mínima en la curva a la concentración nominal; desviación menor al 15% en otras concentraciones diferentes a la concentración mínima en la curva y coeficiente de regresión lineal mayor o igual a 0.99

4.9.1 Preparación de soluciones de trabajo para curva del método

Las soluciones de trabajo se prepararon a partir de las soluciones de Casiopeína IIgly® a concentraciones de 10 y 100 µg/mL, realizando las diluciones que se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Soluciones de trabajo Casiopeína IIgly®

Solución de trabajo	Solución CIIgly stock (µg/mL)	Alícuota (µL)	Aforo (mL)	Conc. Final µg/mL
1	10	500	10	0.5
2	10	1000	10	1.0
3	10	2000	10	2.0
4	100	800	10	8.0
5	100	1600	10	16.0
6	100	2000	10	20.0

4.9.2 Preparación de curva de calibración del método

La curva de calibración del método se preparó a partir de las soluciones de trabajo, como se muestra en la tabla 6.

Tabla 6. Curva de calibración del método

Nivel	Solución CIIgly (µg/mL)	Alícuota (µL)	Vol. de plasma (µL)	Conc. Final ng/mL
1	0.5	50	950	25
2	1.0	50	950	50
3	2.0	50	950	100
4	8.0	50	950	400
5	16.0	50	950	800
6	20.0	50	950	1000

4.10 Precisión

4.10.1 Repetibilidad.

Para evaluar la repetibilidad durante el mismo día se analizaron por quintuplicado, un mínimo de tres concentraciones conocidas: baja, media y alta de Casiopeína Igly[®], estas concentraciones fueron diferentes a las de la curva de calibración, pero se encuentran dentro del intervalo. Se calculó la concentración recuperada para cada nivel de concentración, interpolando la respuesta de los puntos control en la curva de calibración. Los cuales se prepararon como se describe en las siguientes tablas.

Tabla 7. Preparación soluciones de trabajo de Casiopeína Igly[®] para la preparación de controles

Solución de trabajo	Solución CIIgly stock (µg/mL)	Alícuota (µL)	Aforo (mL)	Conc. Final µg/mL
CB	10	1500	10	1.5
CM	100	1000	10	10.0
CA	100	1800	10	18.0

Tabla 8. Preparación de puntos control del método

CONTROL	Solución CIIgly (µg/mL)	Alícuota (µL)	Vol. de plasma (µL)	Conc. Final ng/mL
CB	1.5	50	950	75
CM	10.0	50	950	500
CA	18.0	50	950	900

El coeficiente de variación no debe ser mayor al 15%.

4.11 Exactitud.

Este parámetro se determinó calculando la desviación absoluta (Desv. Abs.%). Para ello, se tomaron los valores de las determinaciones de cada nivel de concentración. Se evaluaron por quintuplicado los tres niveles de concentración.

Para calcular el porcentaje de desviación absoluta, se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Desv. Abs. \%} = 100 \times (C_{\text{ad}} - C_{\text{rec}}) / C_{\text{ad}}$$

C_{ad} = Concentración adicionada

C_{rec} = Concentración recuperada

El promedio debe estar dentro del 15% del valor verdadero. La desviación del valor promedio del valor verdadero sirve como una medida de exactitud.

V.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Desarrollo del método

5.1.1 Espectro de Masas

Se obtuvo el espectro de masas de Casiopeína Igly[®] en metanol, por infusión directa. Se observó el ión molecular, entre otros iones correspondientes a fragmentos de la molécula.

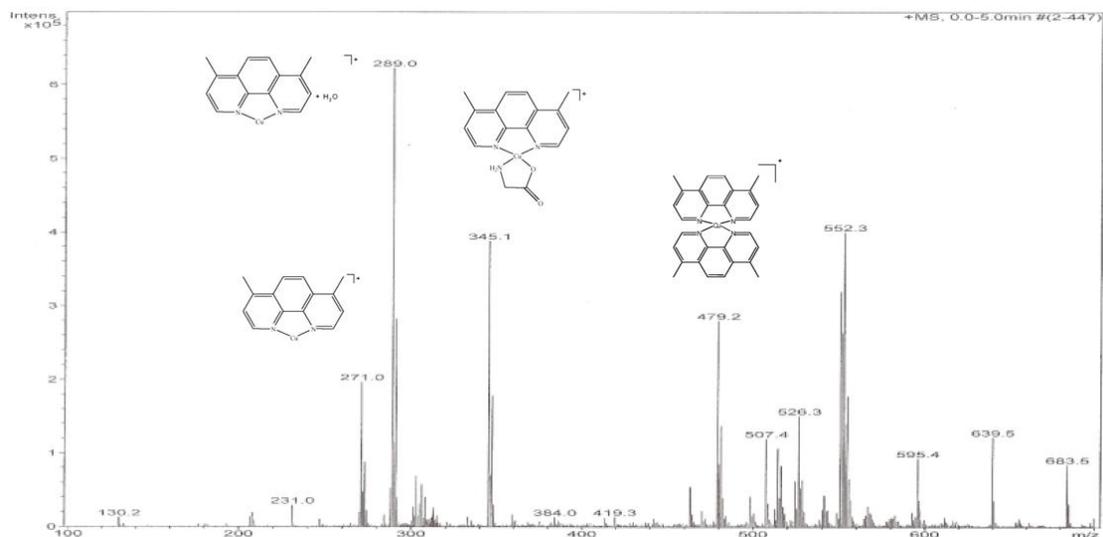


Figura 5. Espectro de masas de Casiopeína Igly[®] en metanol

5.1.2 Fragmentación de Casiopeína Igly[®]

Al fragmentar la molécula, se obtuvo el espectro siguiente.

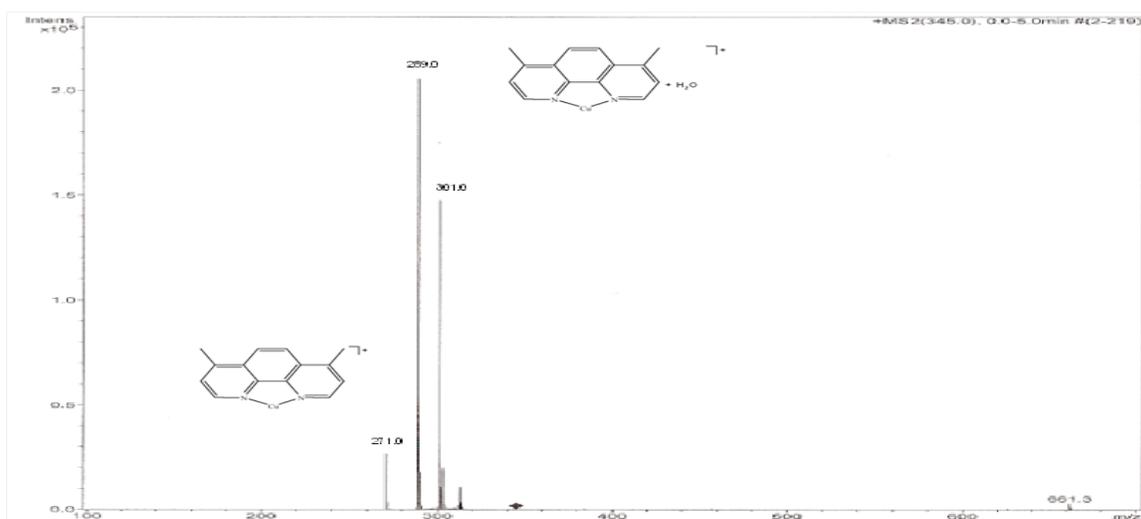


Figura 6. Espectro de masas de la fragmentación del ión molecular de Casiopeína Igly[®] (345 m/z)

5.1.3 Espectro de masas de la fase móvil

Se obtuvo el espectro de masas de la fase móvil utilizada, en la que se observaron iones diferentes a los del analito de interés, debidos a las moléculas presentes en la fase.

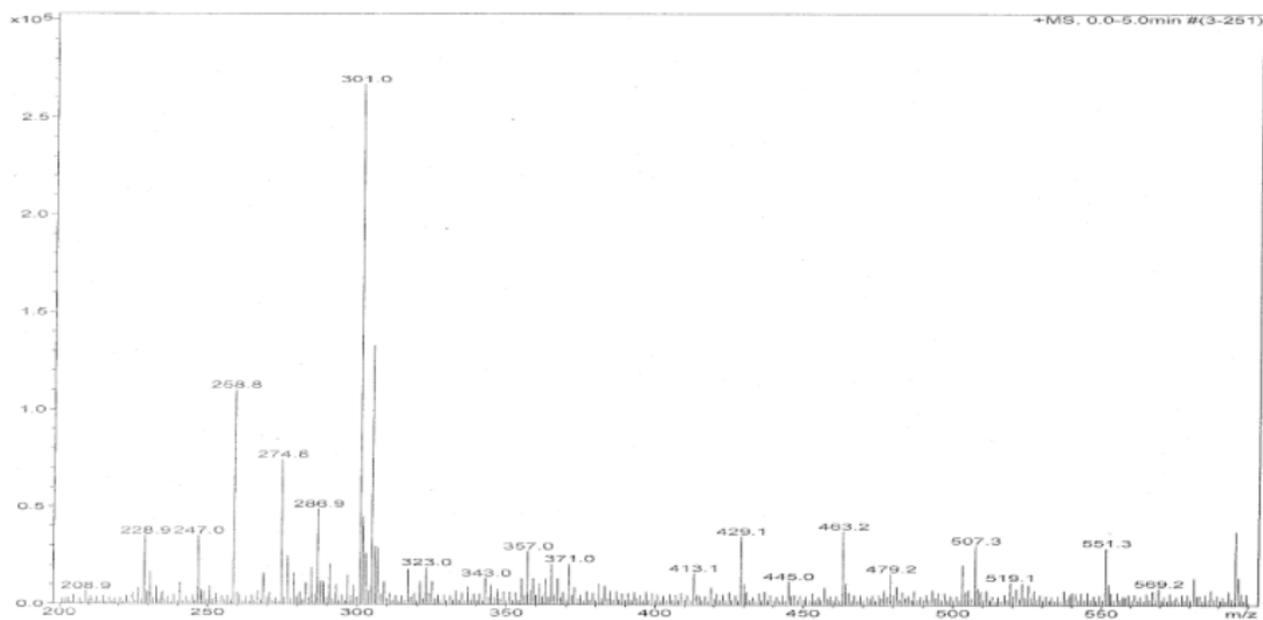


Figura 7. Espectro de masas de la fase móvil

5.1.4 Espectro de masas de la Casiopeína Ilgly® en fase móvil.

La fase móvil utilizada tuvo como objeto producir un par iónico entre la Casiopeína y el HFBA, en el espectro de masas obtenido, se observó la formación del ión.

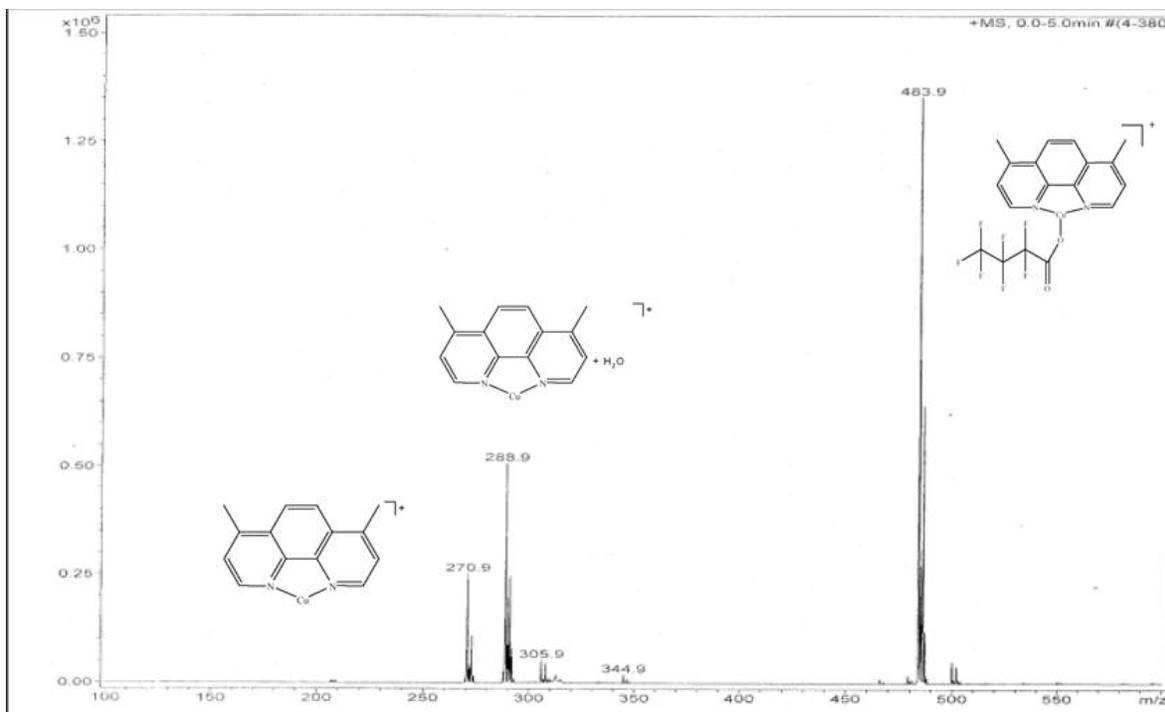


Figura 8. Espectro de masas de Casiopeína Ilgly® en fase móvil.

5.1.5 Elección de parámetros cromatográficos

- Fase estacionaria: Columna analítica Synergi Polar RP (50 mm X 2 mm, tamaño de partícula de 4µm, Phenomenex). Columna con propiedades aromáticas; fenilos unidos a sílica a través de grupos éter, lo cual proporciona retención para moléculas aromáticas y polares. Esta columna retuvo al par iónico (Casiopeína Ilgly- HFBA), se mostró un tiempo de 1.7± 0.3 min. La columna fue precedida por un Security guard cartridge (4 X 3 mm, Phenomenex) para protegerla contra componentes plasmáticos que no se hayan eliminado en el proceso de extracción.

-Fase móvil: Metanol:HFBA 0,1% en agua (4:6 v/v). Se variaron las proporciones desde 7:3 v/v hasta 4:6 (v/v) y también se probó fase terciaria Metanol: HFBA: Agua, en diferentes proporciones.

Con un porcentaje mayor de disolvente orgánico, el pico no tuvo retención y con la utilización de la fase terciaria el pico sufrió deformaciones. Se conservó la proporción 4:6 v/v, ya que es en la cual la forma de pico se observó menos afectada. Con esta proporción de fase móvil el tiempo de retención aproximado

fue de 1.7 minutos.

-Volumen de inyección.

Se realizaron pruebas con el volumen de inyección (1, 2 y 3 μL) se decidió utilizar un volumen de inyección de 3 μL , las áreas obtenidas de una solución de Casiopeína Igly 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ con los diferentes volúmenes de inyección aumentó proporcionalmente.

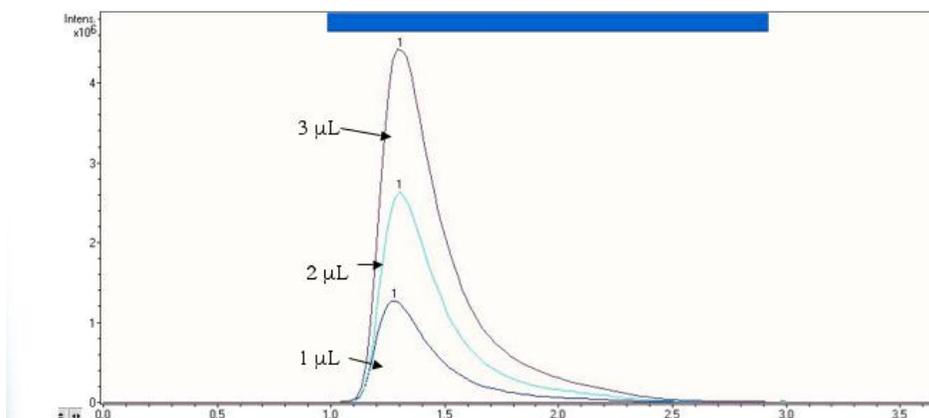


Figura 9. Variación en el volumen de inyección de la muestra

La velocidad de flujo fue de 0,5 mL/min.

Se eligió una temperatura de 30°C, para mantener la temperatura de la columna controlada y evitar errores debidos a cambios en ésta.

5.1.6 Parámetros de detección (EM)

Se realizó la optimización de los parámetros de detección: fragmentador, capilar, delta EMV, flujo de gas y nebulizador.

Se evaluaron valores del fragmentador desde 60 V hasta 300 V, los cambios en el fragmentador no incrementaron notablemente la respuesta, pero se observó un pequeño incremento al utilizar un valor de 260.

En el caso del capilar, no se observaron variaciones en la respuesta al cambiar los valores en un rango de 3000 a 5500 V, por lo que se manejó un valor intermedio; 4000 V.

El Delta EMV se manejó en 500V. Se probaron valores de 0 a 500V. Se observó un incremento en la respuesta al aumentar el Delta EMV.

Los valores óptimos encontrados fueron de 8 L/min y 30 psi para el flujo de gas y el nebulizador respectivamente.

Los resultados de la optimización se pueden observar en las figuras 10 y 11.

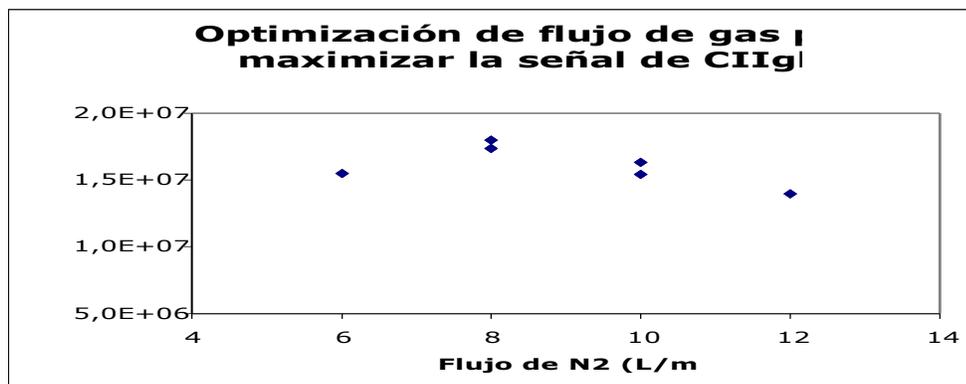


Figura 10. Optimización del flujo de gas

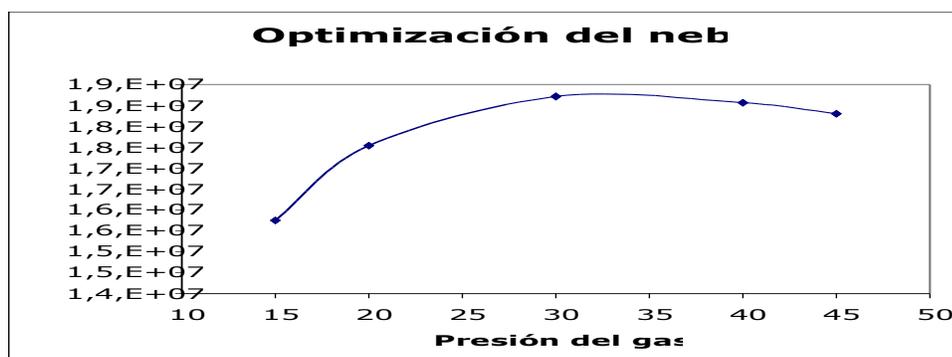


Figura 11. Optimización del nebulizador

5.1.7 Estándar interno

Se realizaron pruebas para encontrar un compuesto que pudiera ser utilizado como estándar interno; que mostrara un tiempo de retención o un ión de cuantificación diferente, que sea fácilmente ionizable para ser detectado por EM y que no interaccione con la Casiopeína IIgly.

Se determinaron los espectros de masas para cada analito, mediante la infusión directa (0,3 mL/h) de solución en fase móvil bajo los parámetros de cuantificación de la Casiopeína IIgly, y se observó el ión que posiblemente se

podría cuantificar, mediante la comparación con el espectro de masas de la fase móvil. Las condiciones utilizadas por el EM fueron las mismas que para la Casiopeína IIgly

Tabla 9. Infusión directa de sustancias a probar como estándar interno

Compuesto	Ión de cuantificación	de	Concentración utilizada ($\mu\text{g/mL}$)	Intensidad del ión
Ketoprofen	299		10	$1,8 \times 10^5$
Ibuprofeno	251		10	$2,1 \times 10^4$
Diclofenaco	213,9		10	$2,7 \times 10^5$
Acetaminofen	291,1		10	3×10^4
Metilparabeno	-		10	-
Fenilefrina	-		10	-
Guaifenesina *	288,9		10	6×10^4
Naproxen	291,1		10	5×10^4
Fenitoina *	182		20	$0,8 \times 10^5$
Prednisona	381		20	3×10^7

*Mostraron en su espectro de masas un ión 483,9 m/z que posiblemente podría afectar la cuantificación de la Casiopeína IIgly

A continuación se muestran algunos espectros de masas obtenidos en la infusión directa de diferentes estándares.

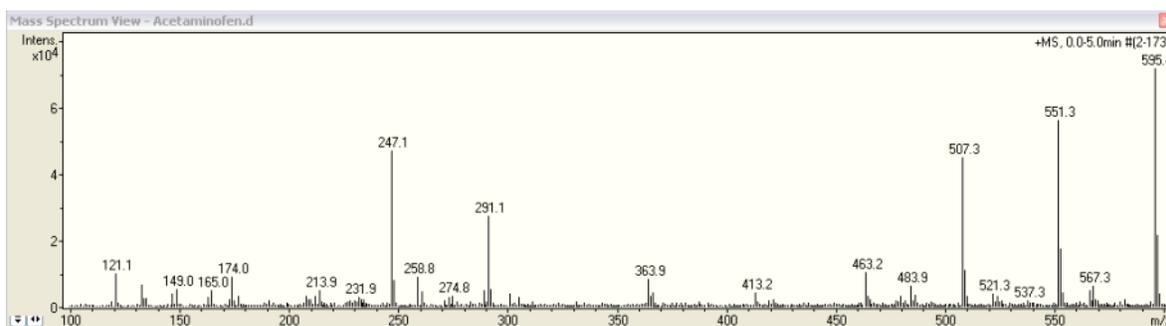


Figura 12. Espectro de masas de Acetaminofen

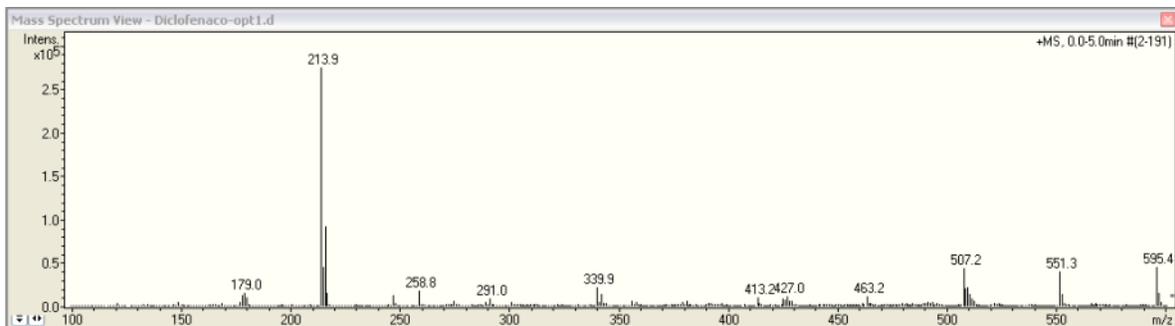


Figura 13. Espectro de masas de Diclofenaco

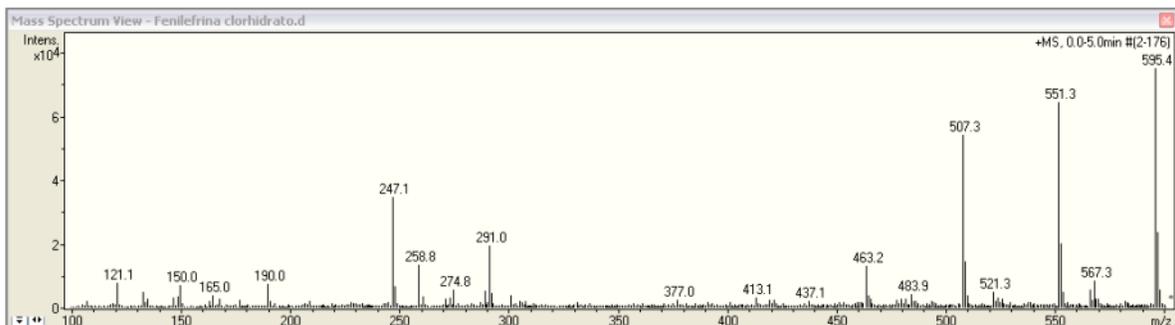


Figura 14. Espectro de masas de Clorhidrato de fenilefrina

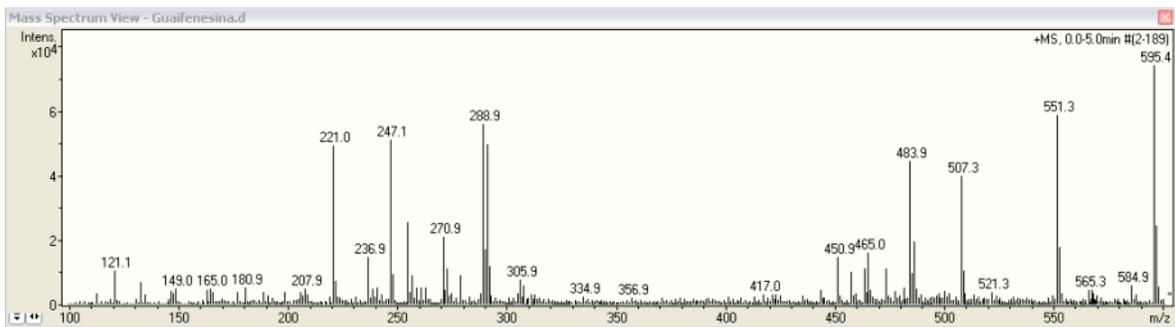


Figura 15. Espectro de masas de Guaifenesina

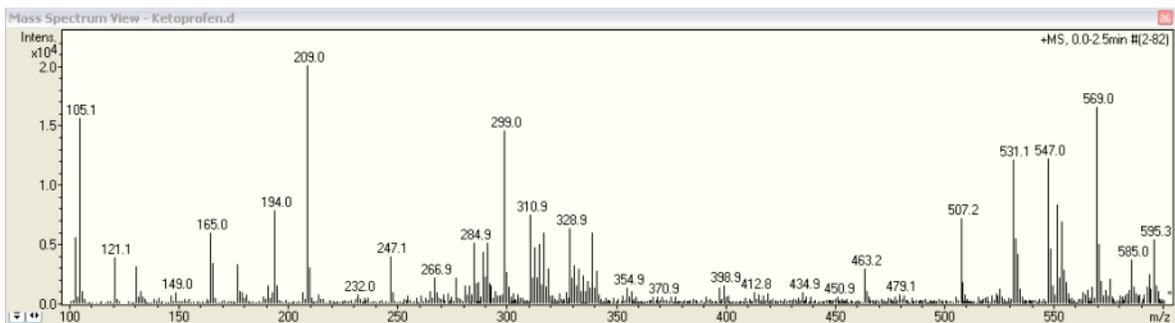


Figura 16. Espectro de masas de Ketoprofen

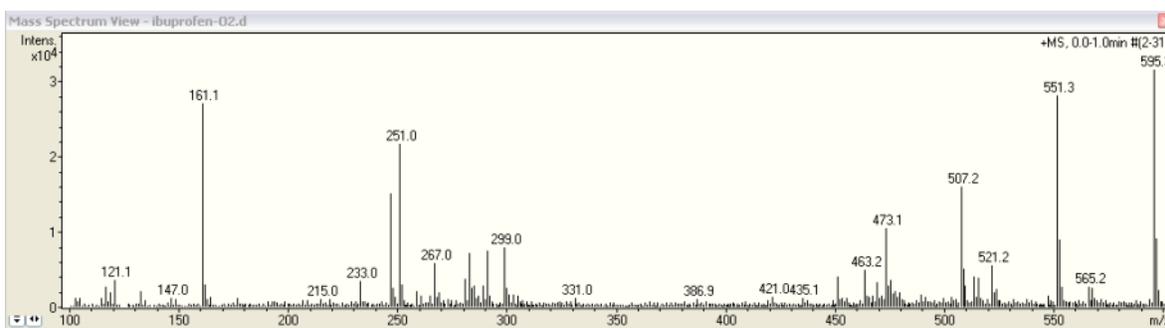


Figura 17. Espectro de Ibuprofen

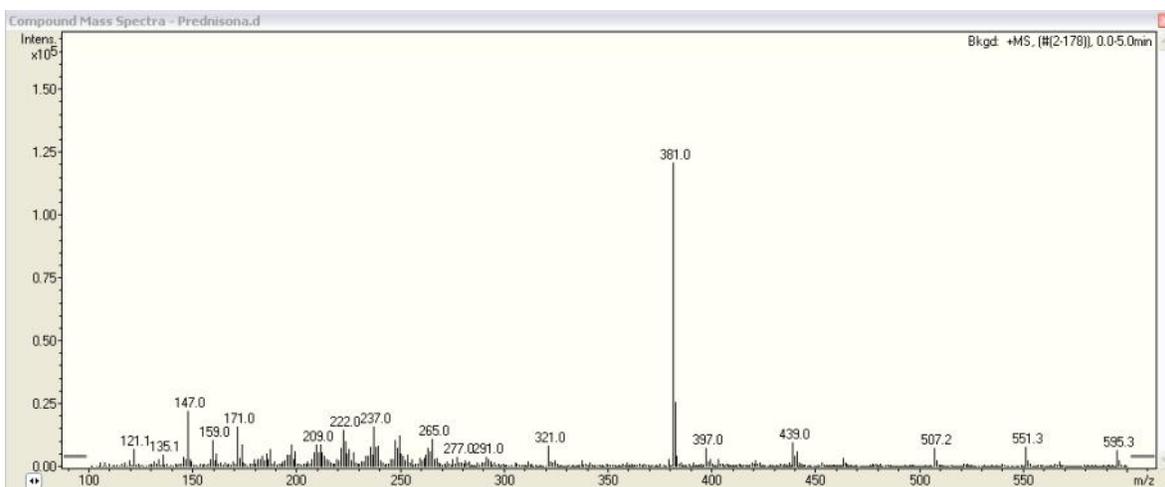


Figura 18. Espectro de masas de Prednisona

Posteriormente se hicieron inyecciones de los compuestos en el CLAR-EM, y se obtuvo el tiempo de retención de los compuestos que mostraron un pico.

Tabla 10. Pruebas de retención para el estándar interno

Compuesto	Ión de cuantificación	Concentración (µg/mL)	Tiempo de retención (min)	Intensidad
Ketoprofen	299	25	6,1	9X10 ⁴
Ibuprofen	251	24	10.8	1,35X10 ⁴
Prednisona	381	20	3.9	1,24X10 ⁵

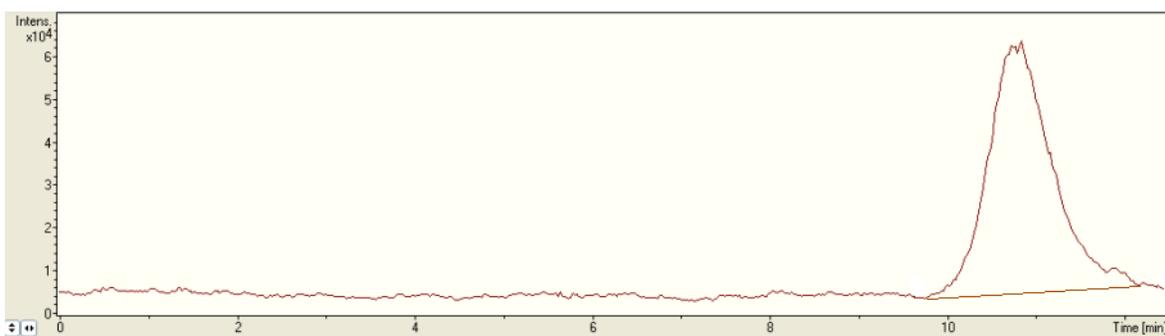


Figura 19. Cromatograma obtenido al inyectar Ibuprofen con las condiciones cromatográficas para cuantificar Casiopeína Igly

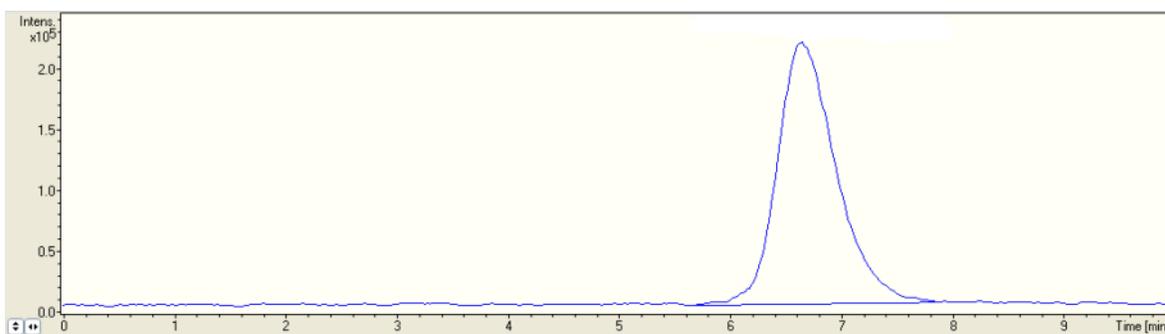


Figura 20. Cromatograma obtenido al inyectar Ketoprofen con las condiciones cromatográficas para cuantificar Casiopeína Igly

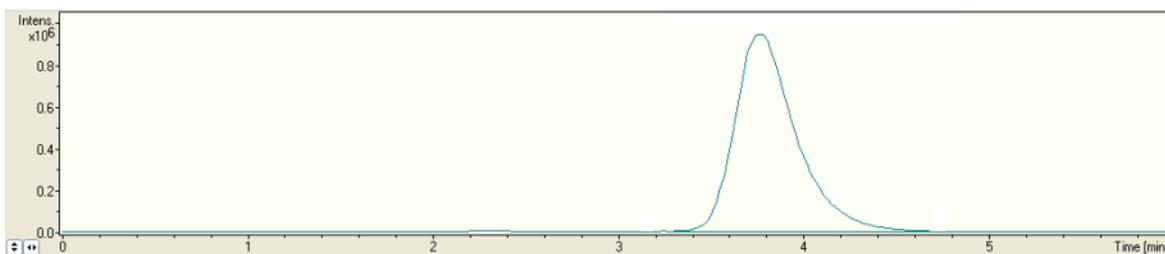


Figura 21. Cromatograma obtenido al inyectar Prednisona con las condiciones cromatográficas para cuantificar Casiopeína Igly

Se eligió a la Prednisona como estándar interno dado que mostró buena señal y un tiempo de retención razonable (3.8 min) ya que los demás compuestos mostraban tiempo de retención (T.R.) muy alto (entre 6.5 y 11 min).

5.1.8 Condiciones finales

Las condiciones finales para la cuantificación de Casiopeína Ilgly se muestran en las tablas 11, 12 y 13.

Tabla 11. Condiciones cromatográficas

Parámetro	Condición
Columna	Synergi polar RP (50 mm X 2 mm, tamaño de partícula de 4µm)
Precolumna	Security guard cartridge RP polar 4X3 mm Phenomenex
Fase móvil	HFBA 0,1% :Metanol 60:40 v/v
Flujo	0,5 mL/min
Temperatura de la columna	30 °C
Volumen de inyección	3 µL
Detección	MS Modo de operación SIM
Tiempo de retención de la Casiopeína Ilgly	1.6 min.
Tiempo de retención del estándar interno (Prednisona)	3.8 min.
Temperatura del Automuestreador	4°C
Detector	Triple Cuadropolo CLAR/EM

Tabla 12. Parámetros del espectrómetro de masas

Parámetro	Condición
Modo de operación	SIM
Modo de ionización	ESI
Polaridad	Positiva
Delta EMV	500V
Dwell	200
Fragmentor	260 V
Ión de cuantificación Casiopeína Ilgly	484 m/z
Ión de cuantificación Prednisona (EI)	381 m/z

Tabla 13. Parámetros de la fuente de ionización

Parámetro	Valor
Temperatura de la fuente	350°C
Flujo del gas	8 L/min
Nebulizador	30 psi
Capilar	4000 V

A continuación se muestra el cromatogramas del control medio:

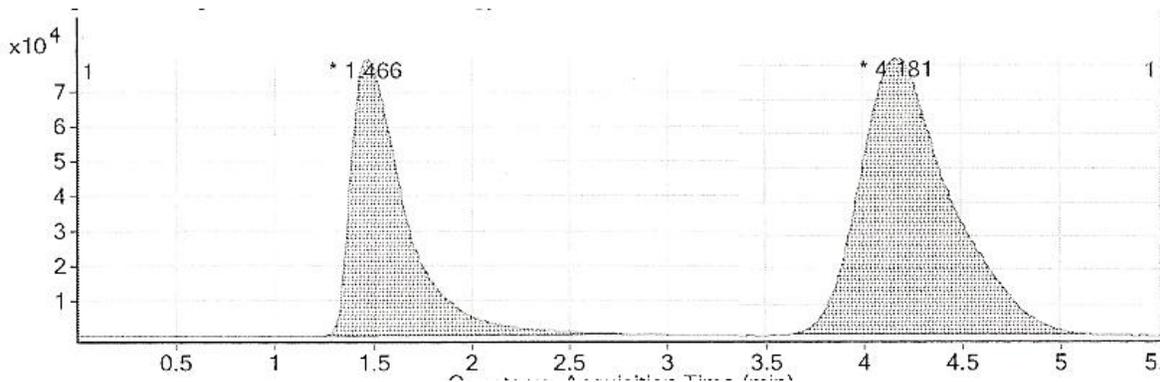


Figura 22. Cromatograma del control medio

5.1.9 Extracción del analito de la matriz biológica.

En los métodos realizados por precipitación de proteínas no se observó señal del analito a excepción de la precipitación con HFBA 5%, pero debido a que se esperaba obtener el menor límite de cuantificación posible, se realizaron pruebas con EFS una vez precipitada la muestra.

Se realizó la EFS como se indica en la metodología (5.7.2) y se observó que en la extracción con el método A y B se obtuvieron los mejores resultados, no se observaron diferencias entre estas dos extracciones.

Las muestras extraídas se compararon con muestras en solución. Se eligió el método con lavado de metanol 5%. Los resultados se presentan en la tabla 14.

Tabla 14. Recuperación de la extracción en fase sólida

Método	Recuperación %	
	Casiopéina Igly®	Prednisona
A	49.3	68.21
B	50.7	68.94
C	24.2	10.33
D	22.1	11.45
E	16.8	15.04
F	18.6	14.87

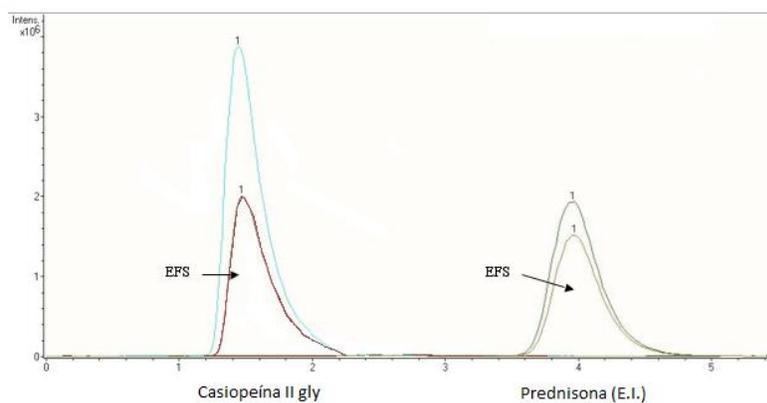


Figura 23. Cromatogramas de muestras en sistema y muestras extraídas

5.1.9.1 Método de procesamiento

La metodología a seguir para la cuantificación de Casiopéina Igly® fue la siguiente: A 1.0 mL de muestra plasmática se adicionaron 100 µL de solución de estándar interno (Prednisona 25 µg/mL), y 500 µL de HFBA 5%, posteriormente se agitó por 30 segundos y se centrifugó por 5 min a 15000 rpm. El sobrenadante se decantó a los cartuchos de extracción de fase sólida, como se describe en el siguiente diagrama de extracción.

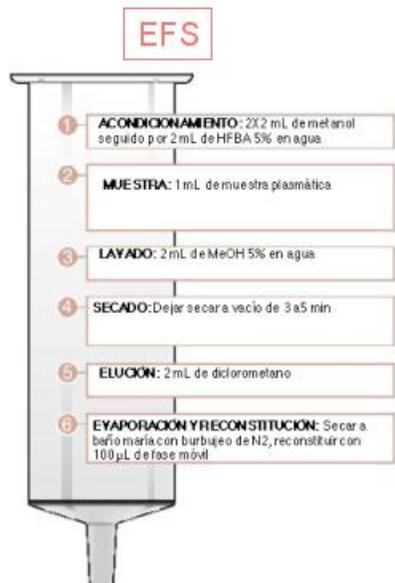


Figura 24. Diagrama de extracción en fase sólida

5.2 Selectividad del método

El método mostró ser selectivo, ya que los reactivos no mostraron interferencias y no hubo componentes del plasma que interfirieran en el análisis. A continuación se muestran los blancos de reactivos, blancos de plasma y blanco de plasma con adición del estándar interno.

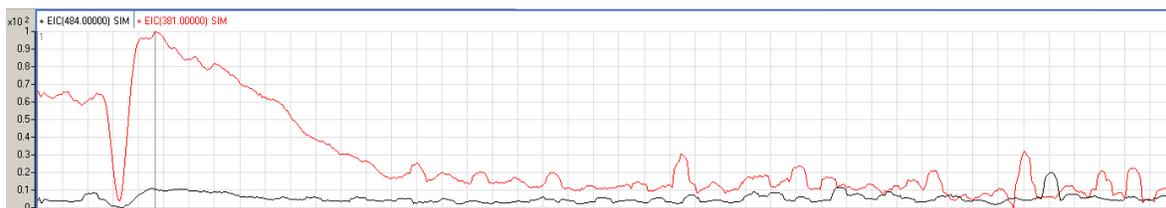


Figura 25. Cromatograma del blanco de reactivos.

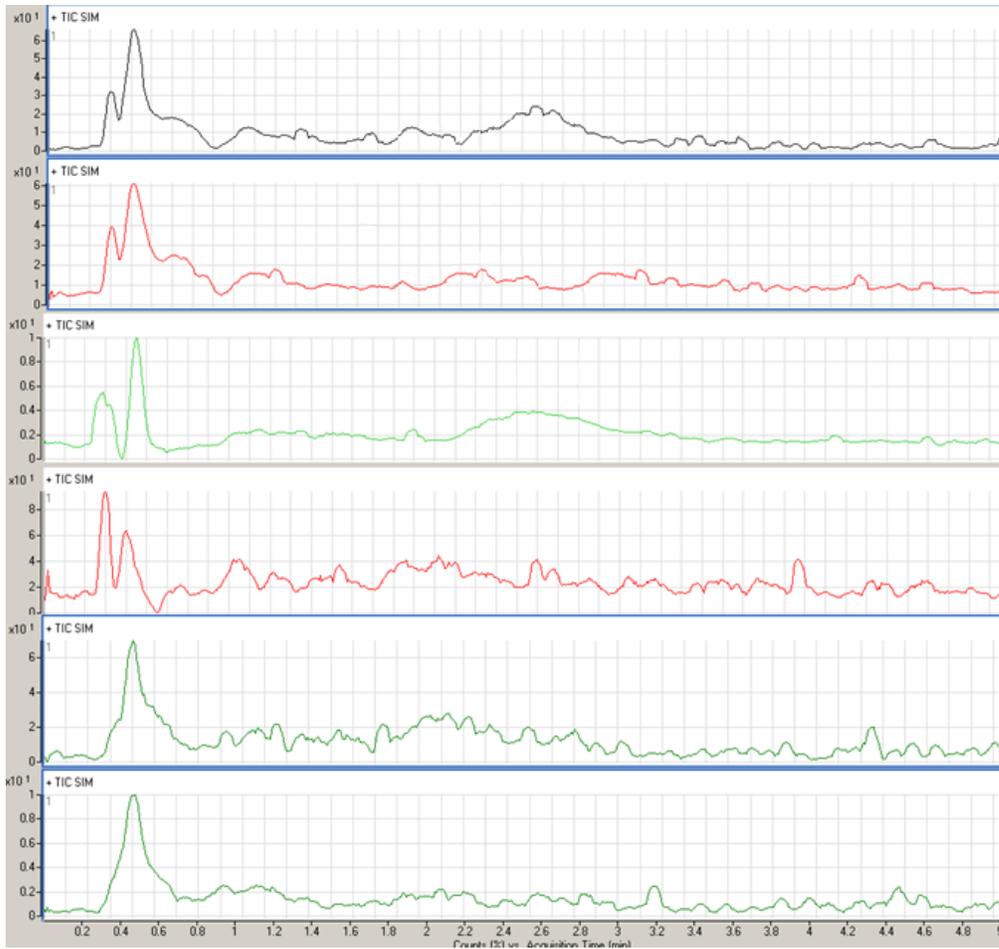


Figura 26. Cromatogramas de los blancos de plasma provenientes de 6 folios diferentes.

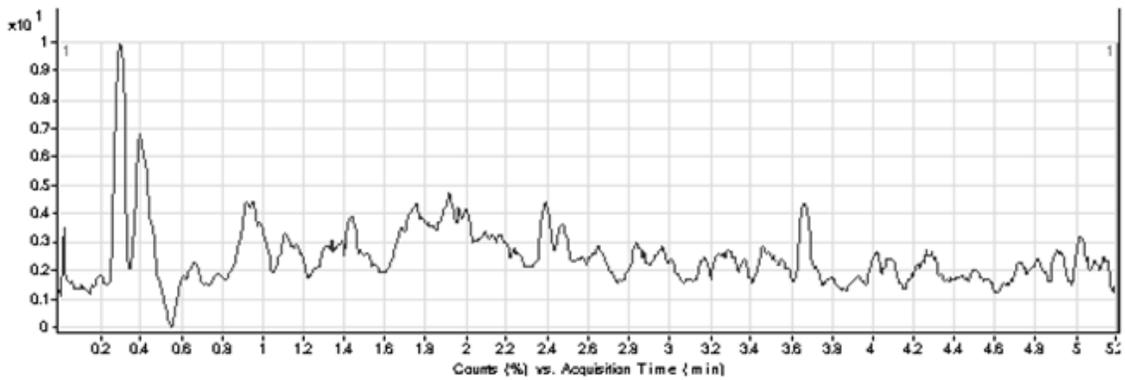


Figura 27. Cromatograma del blanco de plasma (mezcla de los 6 folios individuales o "pool")

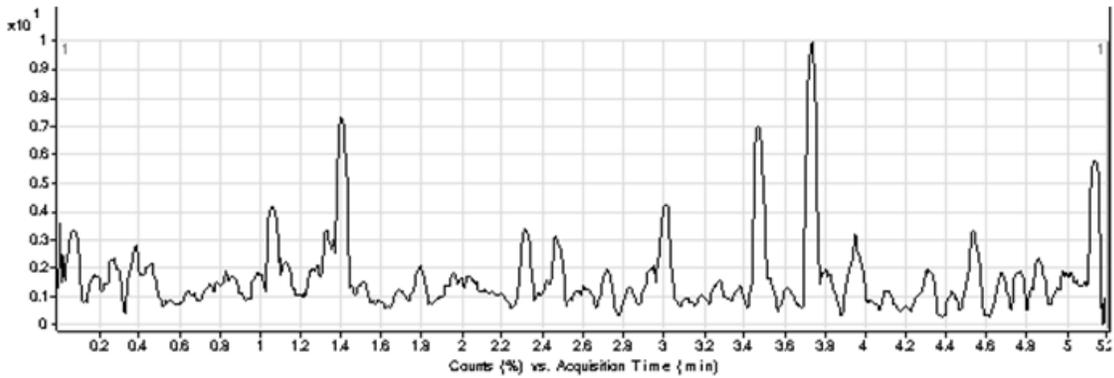


Figura 28. Cromatograma del blanco de plasma con heparina.

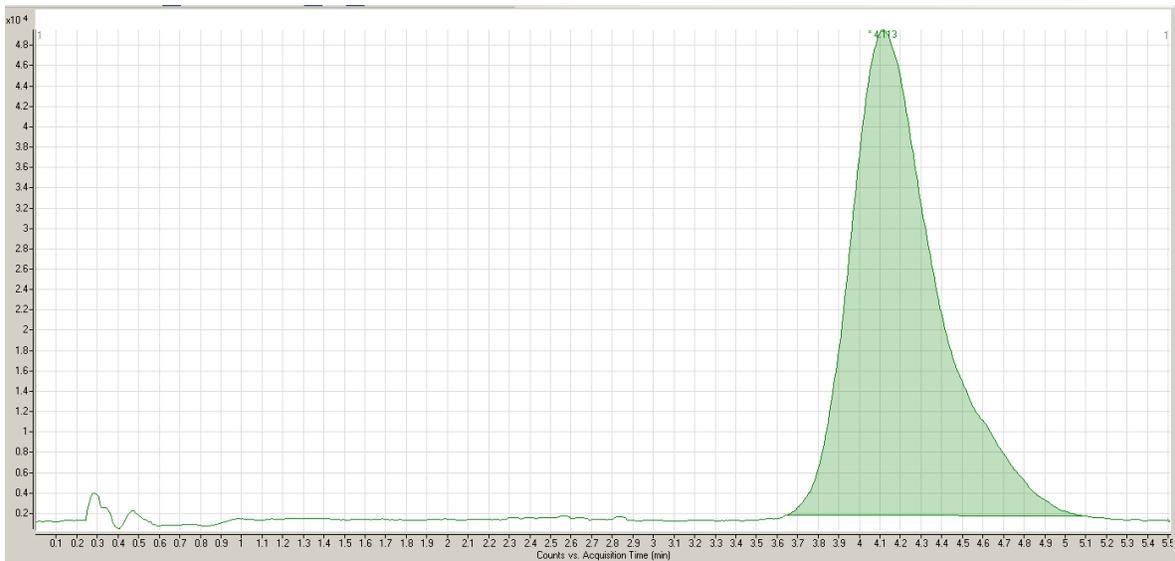


Figura 29. Cromatograma del blanco de plasma adicionado con estándar interno

5.3 Límite de cuantificación y límite de detección

Para determinar la sensibilidad del método analítico se calculó la concentración mínima cuantificable (CMC) o límite de cuantificación (LC). El LC fue la concentración más baja del intervalo de trabajo cuyo valor promedio estuvo dentro del $\pm 20\%$ del valor nominal (cantidad adicionada) con un coeficiente de

variación no mayor al 20%. El límite de cuantificación obtenido fue de 25 ng/mL, con un coeficiente de variación de 4.57% y un valor de desviación absoluta de 18.32%.

El límite de detección (LOD) se calculó a partir de la siguiente fórmula:
$$\text{LOD} = 3.3 \text{ desviación estándar del intercepto} / \text{Promedio de las pendientes.}$$

Se obtuvo un límite de detección de 19.37 ng/mL.

A continuación se muestra un cromatograma del límite de cuantificación.

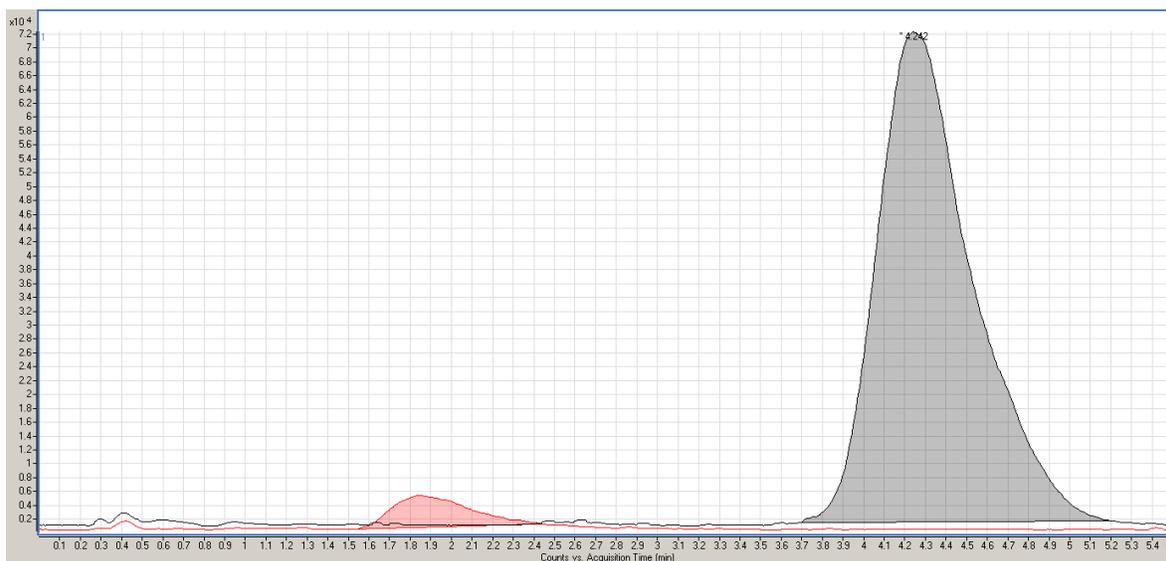


Figura 30. Cromatograma del límite de cuantificación (LC). Arriba se observa el cromatograma con los iones 484 m/z (pico de la izquierda) y 381 m/z (derecha).

5.4 Efecto matriz

Para la prueba se procesaron blancos de plasma y se reconstituyeron con solución de Casiopeína IIg/Prednisona 0.5µg/mL/ 25 µg/mL respectivamente (control medio en sistema). Las áreas obtenidas para la solución en sistema y el blanco de plasma reconstituido en esa solución no se desviaron más del 15%. Al realizar la prueba no hubo disminución en las áreas para el analito de interés, por lo que no se tuvo efecto matriz.

En la tabla 15 se muestran las áreas de Prednisona obtenidas.

Tabla 15. Áreas obtenidas en la prueba de efecto matriz

	Casiopeina ligly		Prednisona	
	Area Prueba	Area sistema	Area Prueba	Area sistema
1	2263564,00	2028078,50	1438978,00	1711089,00
2	2141739,00	2180280,00	1411844,00	1615230,00
3	2137610,00	2267128,50	1526230,00	1583568,00
Promedio	2180971,00	2158495,67	1459017,33	1636629,00
% Desv	1,04	%	10,85	%

5.5 Supresión iónica

La supresión iónica se evaluó como se describe anteriormente en el punto 4.7. No se observó la existencia de supresión, ya que al inyectar blancos de plasma y al mismo tiempo realizar infusión directa de solución de Casiopeína Igly, la cantidad de iones formados no fue afectada en los tiempos de retención de cada analito.

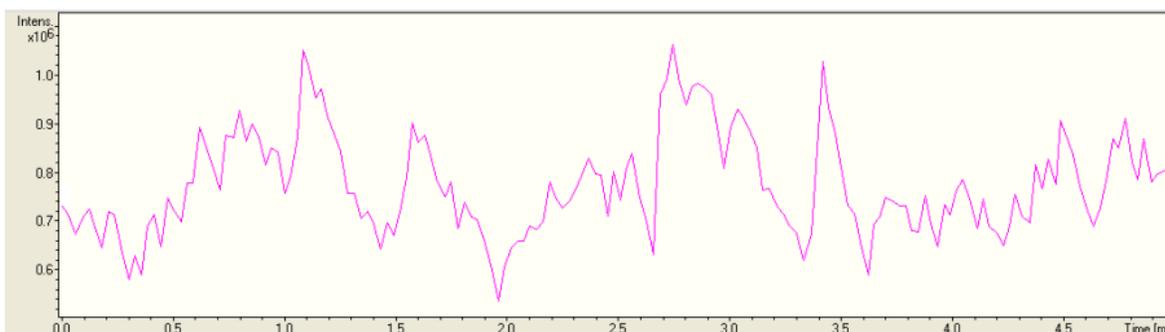


Figura 31. Infusión directa de Casiopeína Igly® para la prueba de supresión iónica. Se observa la constante formación de iones a lo largo del tiempo de corrida.

5.6 Linealidad del sistema

La linealidad del sistema se evaluó con dos curvas de calibración.

El sistema fue lineal, ya que la curva se ajustó a una regresión lineal con un coeficiente de correlación de 0.9999, la pendiente fue de 0.000258. Las concentraciones recuperadas se encuentran con un % de desviación \leq del 6.702%

En la tabla 16 se muestran los resultados.

Tabla 16. Linealidad del sistema

Curva	Concentración Nominal ng/mL	Relación de áreas	Concentración recuperada	Pendiente	Ordenada al origen	Coficiente de correlación
1	250	0.010	252.152	0.000258	-0.05464	0.9999
	500	0.083	533.508			
	1000	0.199	982.473			
	4000	0.971	3973.848			
	8000	2.007	7990.900			
	10000	2.530	10019.846			
2	250	0.009	291.269	0.000259	-0.06607	0.9992
	500	0.082	572.848			
	1000	0.191	993.700			
	4000	0.916	3790.154			
	8000	2.033	8105.031			
	10000	2.522	9992.227			

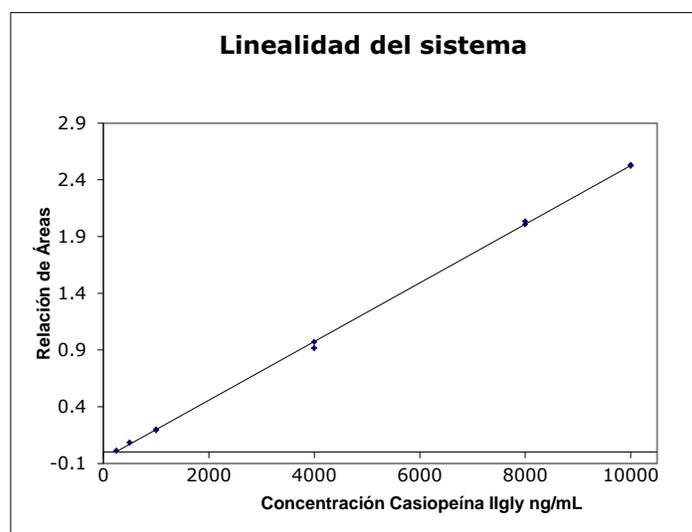


Figura 32. Curva de calibración del sistema.

5.7 Linealidad del método

La linealidad del método se evaluó con tres curvas de calibración. Se graficó la relación de áreas de Casiopeína Ilgly®/Prednisona contra la concentración nominal. Para cada curva se procesaron los datos con regresión de tipo lineal con ponderación ($1/x$ y $1/x^2$) y sin ponderación con el programa computacional Mass Hunter (Agilent). Se obtuvo para cada punto de la curva la concentración

recuperada y el % de desviación para cada regresión. Los resultados se muestran en las tablas siguientes.

Curva 1 en método:

Tabla 17. Resultados obtenidos para la curva 1 en método.

Curva 1		Casiopeína Ilgly			Prednisona EI	
Nivel	Conc. Nominal	TR (min)	Respuesta	RA	TR (min)	Respuesta
1	25	1.812	188397	0.088	4.263	2150443
2	50	1.785	227379	0.125	4.235	1823599
3	100	1.774	419416	0.201	4.263	2084747
4	400	1.629	1513728	0.758	4.217	1997886
5	800	1.595	3255129	1.614	4.230	2017070
6	1000	1.588	2967260	1.933	4.087	1535088

Tabla 18. Concentración recuperada para la curva 1 del método

Regresión lineal								
Sin Ponderación			Ponderación 1/x			Ponderación 1/x ²		
y= 0.0019x+0.0292		R ² =0.9986	y=0.0019x + 0.0325		R ² =0.9979	y = 0.0018x + 0.0397		R ² =0.9916
Conc. calculada	Exactitud	% Desv.	Conc. calculada	Exactitud	% Desv.	Conc. calculada	Exactitud	% Desv.
34.4889	137.956	37.956	28.9489	115.796	15.796	26.4018	105.607	5.607
53.6645	107.329	7.329	48.4185	96.837	-3.163	46.8377	93.675	-6.325
93.2254	93.225	-6.775	88.586	88.586	-11.414	88.9989	88.999	-11.001
381.0164	95.254	-4.746	380.7893	95.197	-4.803	395.7053	98.926	-1.074
823.7719	102.971	2.971	830.3329	103.792	3.792	867.5616	108.445	8.445
988.833	98.883	-1.117	997.9246	99.792	-0.208	1043.472	104.347	4.347

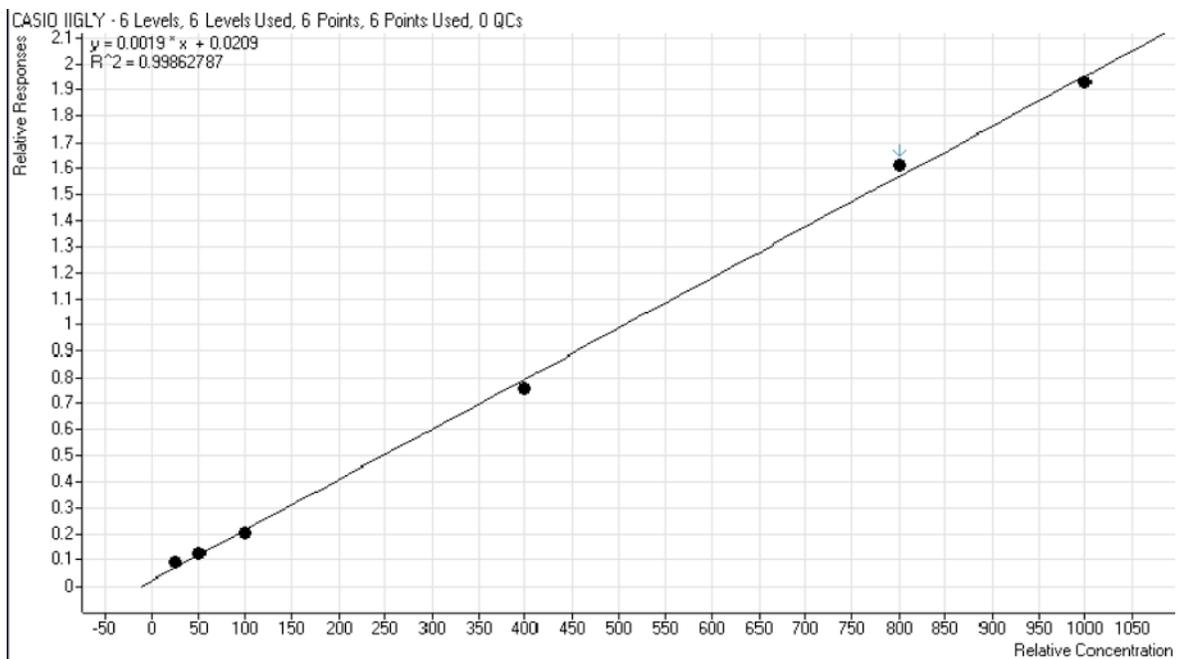


Figura 33. Curva de calibración 1 del método.

Curva 2 en método:

Tabla 19. Resultados obtenidos para la curva 2 del método.

Curva 2		Casiopeína Iigly			Prednisona EI	
Nivel	Conc. Nominal	TR (min)	Respuesta	RA	TR (min)	Respuesta
1	25	1.697	159346	0.100	4.066	1597155
2	50	1.575	196033	0.142	4.106	1383486
3	100	1.615	259544	0.193	4.100	1346113
4	400	2.063	1191731	0.678	4.161	1758261
5	800	1.962	2271386	1.308	4.126	1736562
6	1000	1.962	2647209	1.695	4.107	1561985

Tabla 20. Concentración recuperada para la curva 2 del método

Regresión lineal								
Sin Ponderación			Ponderación 1/x			Ponderación 1/x ²		
y= 0.0016x +0.0454		R ² =0.9988	y = 0.0016 x + 0.0567		R ² =0.9980	y = 0.0015 x +0.0611		R ² =0.9920
Conc. calculada	Exactitud	% Desv.	Conc. calculada	Exactitud	% Desv.	Conc. calculada	Exactitud	% Desv.
33.5864	134.346	34.346	27.0717	108.287	8.287	25.2007	100.803	0.803
59.5025	119.005	19.005	53.4538	106.908	6.908	52.5107	105.021	5.021
91.0983	91.098	-8.902	85.6179	85.618	-14.382	85.8061	85.806	-14.194
390.8804	97.720	-2.280	390.7913	97.698	-2.302	401.7128	100.428	0.428
780.4211	97.553	-2.447	787.3376	98.417	-1.583	812.2059	101.526	1.526
1019.512	101.951	1.951	1030.728	103.073	3.073	1064.156	106.416	6.416

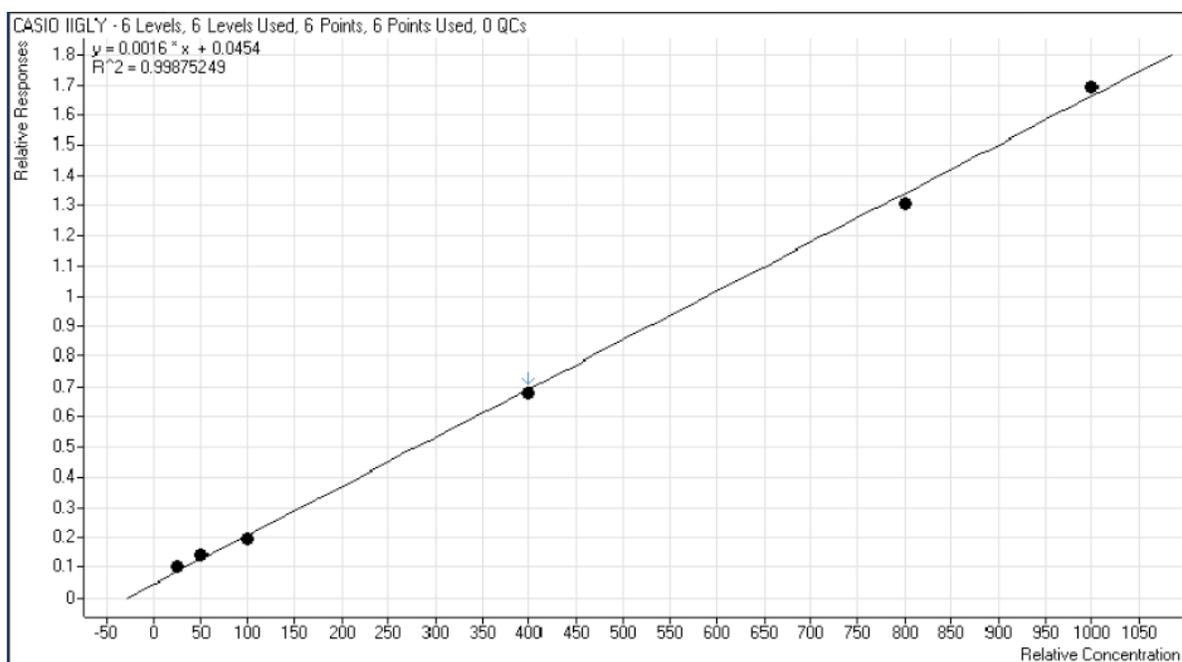


Figura 34. Curva de calibración 2 del método.

Curva 3 en método:

Tabla 21. Resultados obtenidos para la curva 3 del método.

Curva 3		Casiopeína Ilgly			Prednisona EI	
Nivel	Conc. nominal	TR (min)	Respuesta	RA	TR (min)	Respuesta
1	25	1.812	198661	0.091	4,263	2185514
2	50	1.765	233319	0.125	4,235	1871988
3	100	1.772	375337	0.193	4,263	1945765
4	400	1.629	1428519	0.767	4.215	1862909
5	800	1.595	2903782	1.477	4.229	1965423
6	1000	1.588	2821254	1.838	4,087	1535088

Tabla 22. Concentración recuperada para la curva 3 del método.

Regresión lineal								
Sin Ponderación			Ponderación 1/x			Ponderación 1/x ²		
y= 0.0018x + 0.0312		R ² =0.9996	y= 0.0018x + 0.0379		R ² =0.9978	y= 0.0017x + 0.0455		R ² =0.9852
Conc. calculada	Exactitud	% Desv.	Conc. calculada	Exactitud	% Desv.	Conc. calculada	Exactitud	% Desv.
33.013	132.052	32.052	29.5805	118.322	18.322	26.7656	107.062	7.062
51.6543	103.309	3.309	48.4094	96.819	-3.181	46.6401	93.280	-6.720
85.2092	85.209	-14.791	86.11081	86.111	-13.889	86.70556	86.706	-13.294
406.7034	101.676	1.676	406.8059	101.701	1.701	424.9404	106.235	6.235
799.5844	99.948	-0.052	803.3909	100.424	0.424	843.55	105.444	5.444
998.8476	99.885	-0.115	1004.533	100.453	0.453	1055.862	105.586	5.586

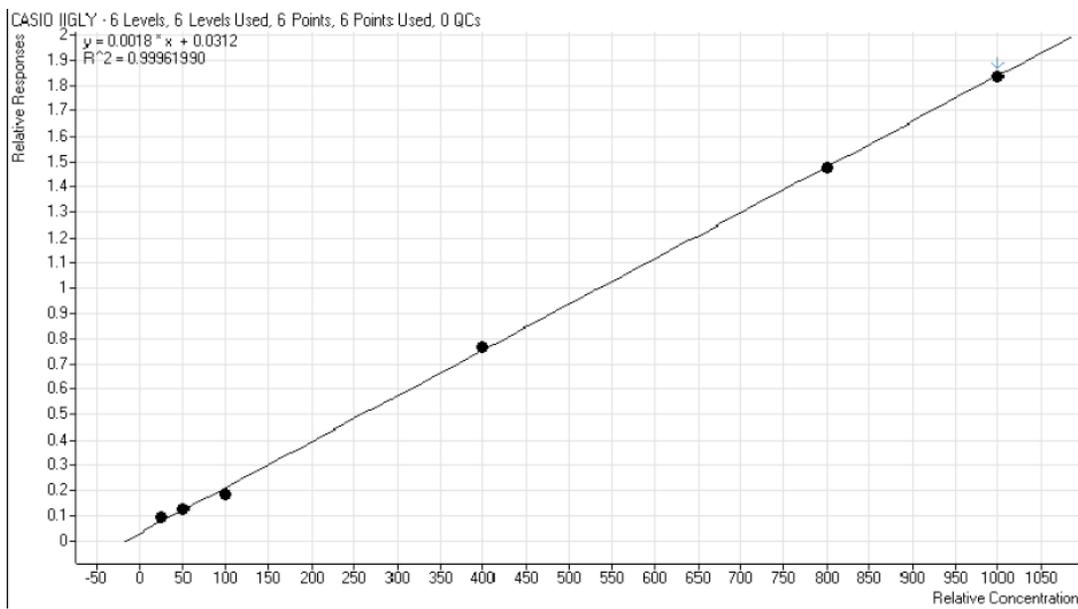


Figura 35. Curva 3 de calibración del método

La regresión lineal sin ponderación mostró un coeficiente de correlación lineal (R) mayor a 0.99, sin embargo también se observó que las concentraciones bajas mostraron un % de variación mayor al 20%. Utilizando regresión lineal con ponderación $1/x$ y $1/X^2$ se observó que las concentraciones bajas mostraron % de desviación menores. Se eligió la regresión lineal con ponderación $1/x$ ya que mostró un coeficiente de correlación lineal de 0.99 y las concentraciones calculadas tuvieron % de desviación $\leq 15\%$, a excepción del LC (% Desv. $\leq 20\%$)

5.8 Recobro

Para determinar el porcentaje de recobro se realizó la comparación de las áreas obtenidas después de la extracción de la muestra de la matriz biológica para concentraciones baja, media y alta con las áreas de las muestras no extraídas (sistema). Se consideró el área de sistema como 100%.

Se obtuvo una recuperación de 62.7% y 69.67% de Casiopeína Ilgly y Prednisona respectivamente. Aunque el recobro obtenido fue menor al 100 %, este fue constante en los tres niveles de concentración. Los resultados se muestran en las tablas 23 y 24.

Tabla 23. Recobro absoluto para Casiopeína Ilgly®

<i>Control</i>	<i>Área Plasma</i>	<i>Área Sistema</i>	<i>Recobro</i>	<i>Desviación (%)</i>
<i>Bajo 25 ng/mL</i>	419962.000	566354.000	63.40	1.11
	329353.000	544902.000		
	303516.000	549480.000		
<i>Promedio</i>	350943.667	553578.667		
<i>Medio 500 ng/mL</i>	1705253.000	2764652.000	59.77	4.68
	1594418.000	2617922.000		
	1563476.000	2754528.000		
<i>Promedio</i>	1621049.000	2712367.333		
<i>Alto 900 ng/mL</i>	3909715.000	5716698.000	64.94	3.57
	3831269.000	5791123.000		
	3482894.000	5775665.000		
<i>Promedio</i>	3741292.667	5761162.000		
	Recobro Promedio Global		62.70	

Tabla 24. Recobro absoluto para Prednisona (estándar interno)

<i>Control</i>	<i>Área Plasma</i>	<i>Área Sistema</i>	<i>Recobro</i>	<i>Desviación (%)</i>
<i>Bajo 0.3 µg/mL</i>	2564460.575	2925501.000	79.05	13.46
	2051065.000	2447537.000		
	1878619.000	2842678.000		
<i>Promedio</i>	2164714.858	2738572.000		
<i>Medio 6 µg/mL</i>	1795518.810	2824817.000	59.81	14.15
	1642169.419	2800272.000		
	1630325.863	2848567.000		
<i>Promedio</i>	1689338.031	2824552.000		
<i>Alto 9 µg/mL</i>	2015518.795	2734769.000	70.14	0.68
	2031584.000	2835200.000		
	1749604.723	2694385.000		
<i>Promedio</i>	1932235.839	2754784.667		
	Recobro Promedio Global		69.67	

5. 9 Repetibilidad y exactitud

Se evaluó la repetibilidad y exactitud con controles de nivel bajo, medio y alto por quintuplicado.

En la tabla 25 se muestran los resultados correspondientes a la repetibilidad del método, en los que el coeficiente de variación de cada uno de los niveles evaluados para Casiopeína IIgly es menor al 5.535 %, mientras que la desviación absoluta para cada nivel fue menor al 11.581 %.

Tabla 25. Repetibilidad y exactitud

Muestra	Concentración Recuperada (ng/mL)		
	Control bajo	Control medio	Control alto
1	69.085	482.751	1003.339
2	67.409	493.906	982.864
3	67.928	427.584	1030.618
4	72.416	487.629	1010.964
5	70.874	452.257	993.369
Promedio	69.542	468.825	1004.231
D.E.	1.865	25.108	16.229
C.V. (%)	2.682	5.355	1.616
Concentración Adicionada (ng/mL)	75.0	500.0	900.0
Desviación Absoluta	7.277	6.235	11.581

El método fue repetible y exacto, ya que los coeficientes de variación obtenidos fueron menores al 15% (repetibilidad) y las desviaciones absolutas fueron menores al 15% con respecto a la concentración nominal (exactitud).

VI.- CONCLUSIONES

Se desarrolló y optimizó un método analítico para cuantificar Casiopeína Igly en plasma humano mediante EFS, por CLAR-EM, el cual mostró ajustarse a una regresión de tipo lineal con ponderación $1/x$.

El método fue selectivo, lineal, repetible y exacto.

Se logró disminuir el límite de cuantificación reportado, de 100 a 25 ng/mL utilizando Prednisona como estándar interno.

El método desarrollado puede ser útil para próximos estudios de la Casiopeína Igly considerando la validación correspondiente.

VII.- REFERENCIAS

- 1.- Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI). Serie de estadísticas vitales. México. 2009
- 2.- Duffus, John, *et al. Fundamental Toxicology for Chemists*. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 1996.
- 3.- Secretaría de Salud Pública (SSP). Epidemiología del Cáncer. México. 2000.
- 4.- INEGI. Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer. Datos Nacionales. México. 2009
- 5.- Atilano, Arturo. "Evaluación de daño genotóxico, citotóxico y citostático inducido por Casiopeína Ilgly[®] en cultivos de linfocitos humanos". Tesis de licenciatura. FES Zaragoza. UNAM. 2007
- 6.- Ferriols, Francisco, *et al.* "Inmunoterapia tumoral. Vacunas y terapia génica". *Farmacia Hospitalaria* 21.3 (1997): 166-170.
- 7.- Roth, Cristiano. "Gene therapy for cancer: what we have done and where are we going?". *Journal National Cancer Institute* 89(1997): 21-39.
- 8.- SSP. Epidemiología del Cáncer. México. 2000.
- 9.- Hernández, L. *et al.* "Cardiotoxicity of copper-based antineoplastic drugs Casiopeínas[®] is related to inhibition of energy metabolism". *Toxicology and Applied Pharmacology* 212 (2006): 79 – 88
- 10.- Desoize, Bernad. "Metals and metal compounds in Cancer Treatment". *Anticancer research*. 24(2004):1529-1544.
- 11.- Reyes, Leobardo. "Farmacocinética preclínica de la Casiopeína Ilgly en ratas". Tesis de maestría. Facultad de Química. UNAM. 2003
- 12.- García, C. *et al.* Estudio del efecto genotóxico inducido *in vivo* por la Casiopeína Ilgly[®] y por la Casiopeína III-ia[®]. 2º Congreso Nacional de Química Médica. México. 2006
- 13.- Ruiz, L., Gracia-Mora I. *et al.* "The antitumor activity of several transition metal complexes". *Journal of Bioinorganic Chemistry*. 43.615 (1991):2-3

- 14.- Bravo, María, et al. "Diseño, síntesis y caracterización de compuestos de coordinación de cobre Casiopeínas[®]. Historia Química de un proyecto éxitos. Primer Congreso en Casiopeínas[®]. México. 2002.
- 15.- Gasque, Laura. et al. "Cu–O stretching frequency correlation with phenanthroline pKa values in mixed copper complexes". *Inorganic Chemistry* 288 (1999): 106–111.
- 16.- Reyes Sánchez, Janet "Validación de un método analítico para la cuantificación de Casiopeína IIgly[®] en orina por CLAR, para su aplicación en un estudio preclínico en ratas". Tesis de licenciatura. Facultad de Química. UNAM. 2007.
- 17.- Gracia, Isabel. et al. "Knight's move in the periodic table, from copper to platinum, novel antitumor mixed chelate copper compounds, Casiopeinas, evaluated by an *in vitro* human and murine cancer cell line panel". *Metal Based Drugs*. 8.1 (2001): 19-28.
- 18.- García, Juan. "Estudio QSAR de compuestos de coordinación de cobre del tipo [Cu (NN) (glicinato)]NO₃". Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM. 2007.
- 19.- De Vizcaya-Ruiz, A. Rivero-Müller, A. "Induction of Apoptosis by a novel Copper-based Anticancer Compound, Casiopeina IIgly, in L1210 Murine Leukaemia and CH1 Human Ovarian Carcinoma Cells". *Toxicology In Vitro*. 14.(2000()): 1-5.
- 20.- Carvallo, Francisco. "Efectos antiproliferativos y apoptóticos de las Casiopeínas[®] IIgly y III-ia en líneas tumorales humanas". Tesis de Doctorado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM. 2007.
- 21.- Carvallo, Rubén, et al. "Casiopeína III-ia[®] induces apoptosis in HCT-15 cells *in vitro* through caspase-dependent mechanisms and has antitumor effect *in vivo*". *Biometals. Springer Netherlands*. 21.1. (2008).
- 22.- Trejo, Cristina and Palencia, Guadalupe. "Casiopeína IIgly[®] Induces apoptosis in glioma C6 cells *in vitro* and *in vivo* through caspase-dependent and caspase-

independent mechanisms". *Neoplasia*. 7. 6 (2005): 563-574.

23.- Rivero, A. et al. "Mixed chelate copper complex, Casiopeína IIgly[®], binds and degrades nucleic acids: A mechanism of cytotoxicity". *Chemico-Biological Interactions*. 165 (2007):189-199.

24.- Alemón, Radamés, et al. "Casiopeína IIgly[®] induced cytotoxicity to heal cells depletes the levels of reduced glutathione and is prevented by dimethyl sulfoxide". *Toxicology InVitro*. 22 (2008): 710-715.

25.- Marín H.A. et al. "Toxic effects of copper based antineoplastic drugs (Casiopeínas[®]) on mitochondrial functions". *Biochemical Pharmacology*. 65 (2003): 1979-1989.

26.- Alemón, Radamés. "Inducción de daño oxidativo por antineoplásicos de tipo quelatos de cobre". Tesis de Maestría en Bioquímica. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. IPN. 2003.

27.- Hernández, L. et al. "Cardiotoxicity of copper-based antineoplastic drugs Casiopeínas[®] is related to inhibition of energy metabolism". *Toxicology and Applied Pharmacology*. 212 (2006): 79 -88.

28.- De Vizcaya-Ruiz, et al. "Induction of apoptosis by a novel copper-based anticancer compound, casiopeina II, in L1210 murine leukaemia and CH1 human ovarian carcinoma cells". *Toxicology in vitro*. 14 (2000):1-5.

29.- Rivera Huerta, et al. "Toxicidad aguda en rata y ratón de la Casiopeína IIgly[®]". 2º Congreso Nacional de Química Médica. México 2006.

30.- Cañas, Roberto, Fuentes, Inés. "Pharmacokinetics of Casiopeína IIgly[®] in beagle dog: A copper based compound with antineoplastic activity". *Journal of bioanalysis and biomedicine*. 2.2 (2010): 28-34.

31.- Fischer, David, et al. *Cancer Chemotherapy Handbook*. Philadelphia. 6th edition. Mosby. 2003.

32.- Flores J. *Farmacología Humana*. 3ª Edición. Barcelona. Masson. 1997.

33.- Goodman & Gilman. *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. 9ª Edición. Madrid. Interamericana McGraw Hill. 1996.

34.- Food and drug administration (FDA). Guidance for Industry. Bioanalytical Method Validation. USA. 2001

- 35.- SSA. Norma Oficial Mexicana. NOM-177 -SSA1-1998 Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un procedimiento es intercambiable.
- 36.- EMA European Medicines Agency. Guideline on bioanalytical method validation. 2011
- 37.- Snyder, L. et al. *Introduction to modern liquid chromatography*. New York. Wiley. 1979
- 38.- Robert, E. *Liquid Chromatography. Mass spectrometry: An introduction*. U.K. Wiley. 2003