



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

**Desarrollo de una metodología en fluido biológico por HPLC,
para cuantificar un nuevo anticancerígeno, Casiopeina[®] III-Ea.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:
LUIS ANTONIO CAMACHO CAMACHO

Ciudad Universitaria, CD. MX. 2021





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: LENA RUIZ AZUARA
VOCAL: INES FUENTES NORIEGA
SECRETARIO: JUAN MANUEL RODRIGUEZ
1er. SUPLENTE: BLANCA ESTELA RIVERO CRUZ
2° SUPLENTE: KENNETH RUBIO CARRASCO

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA
CONJUNTO E
EDIFICIO DE BIOQUIMICA Y FARMACIA, LABORATORIO 113**

ASESOR DEL TEMA:

SUPERVISOR TÉCNICO:

DRA. INES FUENTES NORIEGA

M. en C. KENNETH RUBIO CARRASCO

SUSTENTANTE:

LUIS ANTONIO CAMACHO CAMACHO



2.0 RECONOCIMIENTO

Este trabajo fue posible gracias al financiamiento otorgado por el proyecto **PAPIIT IN221118** con título Estudio de las propiedades fisicoquímicas y biofarmacéuticas del compuesto con actividad antineoplásica CasIII-Ea.



3.0 INDICE GENERAL

1.0 PORTADA.....	1
2.0 RECONOCIMIENTO.....	3
3.0 INDICE GENERAL.....	4
4.0 LISTADO DE ABREVIATURAS.....	8
5.0 INDICE DE TABLAS.....	10
6.0 LISTADO DE FIGURAS.....	11
7.0 INTRODUCCIÓN.....	12
8.0 ANTECEDENTES.....	14
8.1 Cáncer.....	14
8.1.1 Antineoplásicos en quimioterapia.....	14
8.2 Desarrollo de nuevos fármacos.....	15
8.3 Casiopéinas®.....	16
8.3.1 Casiopéina® III-Ea.....	17
8.4 Calidad analítica por diseño (AQbD).....	19
8.4.1 Implementación de AQbD.....	20
8.4.2 Perfil de calidad del producto objetivo / Perfil analítico del objetivo.....	20
8.4.3 Atributos críticos de calidad (CQA)/ Características de rendimiento del método analítico (AMPC).....	21
8.4.3.1 Evaluación inicial del riesgo.....	22
8.4.4 Parámetros críticos del proceso (CPP).....	22
8.4.5 Diseño de experimentos en QbD.....	23
8.4.5.1 Selección de diseño experimental.....	24
8.4.6 Espacio de diseño (DS)/Región de diseño operable del método (MODR).....	24
8.4.7 Implementación de la estrategia de control y mejora continua.....	25
8.5 Diseño de experimentos.....	25
8.5.1 Diseño de experimentos en la investigación.....	26
8.5.2 Modelo estadístico y denotaciones.....	26
8.5.3 Conceptos básicos en el DoE.....	28
8.5.3.1 Experimento.....	28
8.5.3.2 Respuesta.....	28
8.5.3.3 Factor.....	28
8.5.3.4 Nivel.....	29
8.5.3.5 Tratamientos.....	29
8.5.3.6 Efecto principal.....	29
8.5.3.7 Interacción.....	29
8.5.4 Principios básicos del diseño de experimentos.....	29
8.5.5 Diseños factoriales.....	31
8.5.5.1 Ventajas de los diseños factoriales.....	31
8.5.6 Representación de los efectos principales y la interacción de factores.....	32
8.5.6.1 Diagrama de Pareto de efectos.....	33



INDICE

8.5.7	Disminución del diseño experimental.....	34
8.5.8	Diseños de cribados.....	35
8.5.8.1	Diseño Plackett-Burman.....	35
8.5.8.2	Diseño Factorial Fraccionado 2^{k-1}	36
8.5.9	Metodología del diseño de experimentos.....	37
8.5.9.1	Reconocimiento y delimitación del problema.....	37
8.5.9.2	Elección de los factores, niveles y rangos.....	37
8.5.9.3	Elección de la variable de respuesta.....	38
8.5.9.4	Selección del diseño experimental.....	38
8.5.9.5	Realización del experimento.....	38
8.5.9.6	Análisis estadístico de los datos.....	39
8.5.9.7	Conclusiones y recomendaciones.....	39
8.6	Planificación de la experimentación.....	39
8.7	Desarrollo de métodos bioanalíticos.....	40
8.7.1	Bioanálisis.....	40
8.7.2	Métodos bioanalíticos.....	41
8.7.3	Técnicas de extracción.....	42
8.7.3.1	Extracción de fase sólida.....	42
8.7.3.2	Precipitación de proteínas.....	42
9.0	OBJETIVOS.....	44
9.1	Objetivo General.....	44
9.2	Objetivos Particulares.....	44
10.0	PARTE EXPERIMENTAL.....	45
10.1	Reactivos.....	45
10.2	Materiales, Equipos e Instrumentos.....	45
10.3	Preparación de soluciones.....	46
10.3.1	Solución stock de Casiopeina® III-Ea, 200 µg/mL.....	46
10.3.2	Solución acuosa de Casiopeina® III-Ea, 10 µg/mL.....	46
10.3.3	Plasma humano filtrado.....	46
10.3.4	Solución de Casiopeina® III-Ea en fluido biológico, 20 µg/mL.....	47
10.3.5	FM solución amortiguadora de Fosfatos pH 6.8, 10 µM acuoso.....	47
10.3.6	FM solución amortiguadora de Fosfatos pH 7.4, 10 µM acuoso.....	47
10.3.7	Fase móvil: metanol.....	47
10.3.8	Solución de sulfato de zinc al 10% acuoso.....	47
10.3.9	Solución de trabajo acuosa.....	47
10.4	Software especial.....	48
10.5	Estrategia de desarrollo de método bioanalítico y optimización.....	48
10.5.1	Muestra.....	48
10.5.2	Medición de la muestra.....	48
10.5.2.1	Longitud de onda.....	48
10.5.3	Estudio de estabilidad de la Casiopeina® III-Ea.....	49
10.5.4	Extracción de la Casiopeina® III-Ea de la matriz.....	50
10.5.5	Protocolo de calidad analítica por diseño (AQbD).....	53
10.5.5.1	Perfil analítico del objetivo (ATP).....	53



10.5.5.2 Atributos críticos de calidad (CQA) / Características de rendimiento del método analítico (AMPC).....	54
10.5.5.2.1 Estudio piloto	54
10.5.5.2.2 Análisis inicial del riesgo	54
10.5.5.3 Parámetros críticos del proceso (CPP).....	55
10.5.5.4 Selección del DoE experimental	55
10.5.5.4.1 Realización del experimento	55
10.5.5.5 Espacio de diseño (DS).....	56
10.5.5.6 Implementación de la estrategia de control y mejora continua	56
11.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	57
11.1 Estrategia de desarrollo del método bioanalítico y optimización	57
11.1.1 Muestra	57
11.1.1.1 Medición de la muestra	57
11.1.1.1.1 Longitud de onda óptima.....	57
11.1.1.2 Estabilidad de la Casiopeina® III-Ea	57
11.1.1.3 Extracción de la Casiopeina® III-Ea del fluido biológico	63
11.1.2 Aplicación del protocolo de calidad analítica por diseño	65
11.1.2.1 Selección del perfil analítico del objetivo (ATP)	65
11.1.2.2 Atributos críticos de calidad (CQA) / Características de rendimiento del método analítico (AMPC).....	65
11.1.2.2.1 Estudio piloto	66
11.1.2.2.2 Evaluación inicial de riesgos	72
11.1.2.3 Parámetros críticos del proceso (CPP).....	73
11.1.2.4 Consideraciones del diseño de experimentos	75
11.1.2.4.1 Selección de factores.....	75
11.1.2.4.1.1 pH de la fase móvil.....	75
11.1.2.4.1.2 Proporción de la fase orgánica (polaridad de la fase móvil).....	76
11.1.2.4.1.3 Velocidad de flujo.....	76
11.1.2.4.1.4 Columna	76
11.1.2.4.1.5 Temperatura de la columna.....	77
11.1.2.4.1.6 Volumen de inyección	77
11.1.2.4.1.7 Metodología de extracción de la matriz biológica.....	77
11.1.2.4.2 Niveles de trabajo.....	77
11.1.2.4.3 Selección de la variable de respuesta.....	78
11.1.2.4.4 Selección del diseño experimental	78
11.1.2.5 Aplicación del diseño de experimento	79
11.1.2.5.1 Diseño de “screening”	79
11.1.2.5.1.1 Aplicación del diseño tipo Plackett Burman	80
11.1.2.5.2 Diseño de optimización	86
11.1.2.5.2.1 Aplicación del diseño de optimización: Diseño factorial fraccionado 2^{4-1}	86
11.1.2.6 Espacio de diseño/Región de diseño operable del método	87
11.1.2.6.1.1 Combinación óptima de niveles de los factores.	88
11.1.2.7 Estrategia de control y mejora continua	89



INDICE

12.0	CONCLUSIONES Y ACCIONES.....	91
13.0	REFERENCIAS	92
14.0	ANEXOS.....	97



4.0 LISTADO DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
°C	Grados Celsius
μM	Micromol
ABC	Área bajo la curva
ADME	Absorción, Distribución, Metabolismo y Excreción
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AMPC	<i>Analytical Method Performance Characteristics</i> /Características de rendimiento del método analítico
ANOVA	<i>Analysis of variance</i> /Análisis de varianza
API	<i>Active pharmaceutical ingredient</i> /Principio activo
AQbD	<i>Analytical Quality by Design</i> /Calidad analítica por diseño
ATP	<i>Analytical Target Profile</i> /Perfil analítico del objetivo
CI50	Concentración inhibitoria 50
Cmax	Concentración sérica máxima
CPP	<i>Critical Process Parameters</i> /Parámetros críticos del proceso
CQA	<i>Critical Quality Attributes</i> /Atributos críticos de calidad
DL50	Dosis letal 50
DoE	<i>Design of Experiments</i> /Diseño de experimentos
DS	<i>Design Space</i> /Espacio de diseño
g	Gramo
kg	Kilogramo
MAD	<i>Multiple ascending dose</i> /Dosis ascendentes múltiples
mg	Miligramo
mL	Mililitro
mm	Milímetro
MODR	<i>Method Operable Design Region</i> /Región de diseño operable del método
NIR	<i>Near Infrared</i> /Infrarrojo cercano
nm	Nanometro
PDT	<i>Photodynamic therapy</i> /Terapia fotodinámica
QbD	<i>Quality by Design</i> /Calidad por diseño <i>Quality Target Product Profile</i> /Perfil de calidad del product objetivo
QTPP	
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> /Especies reactiva de oxígeno
SAD	<i>Single ascending dose</i> /Dosis ascendente simple <i>Structure–activity relationship</i> /Relación estructura-actividad
SAR	
SCE	Suma de cuadrados del error



LISTA DE ABREVIATURAS

Tmax	Tiempo máximo
µg	Microgramo
µL.	Microlitro
µm	Micrómetro



5.0 INDICE DE TABLAS

Tabla I. Subfamilias de Casiopeina®	17
Tabla II. Características fisicoquímicas de Casiopeina® III-Ea	19
Tabla III. Condiciones de estabilidad sometidas a la Casiopeina® III-Ea.....	49
Tabla IV. Condiciones de la precipitación de proteínas	52
Tabla V. Estabilidad de Casiopeina® III-Ea en diferentes condiciones.	58
Tabla VI. Remanente de Casiopeina® III-Ea.....	61
Tabla VII. Estimación del t90 de degradación de Casiopeina® III-Ea.	62
Tabla VIII. Resultados de extracción por precipitación de proteínas.	64
Tabla IX. Factores considerados para el diseño en medio acuoso	67
Tabla X. Diseño factorial 2^{5-1} de Casiopeina® III-Ea en medio acuoso.	68
Tabla XI. Análisis de Varianza para Tiempo de retención	69
Tabla XII. Análisis de Varianza para Área	71
Tabla XIII. Controles críticos del proceso.	74
Tabla XIV. Factores y niveles estudiados.	78
Tabla XV. Matriz de diseño Plackett Burman 2^7	80
Tabla XVI. Factores considerados para el diseño tipo Plackett Burmann	81
Tabla XVII. Resultados de la aplicación del diseño de Plackett Burmann.....	82
Tabla XVIII. Análisis de varianza para Simetría.	83
Tabla XIX. Análisis de varianza para Resolución.	84
Tabla XX. Resultados de la aplicación del diseño factorial fraccionado 2^{4-1}	87
Tabla XXI. Combinación óptima de niveles de los factores.	88
Tabla XXII. Valores de la respuesta en la combinación óptima de los factores.	88
Tabla XXIII. Reporte de validación de métodos analíticos para la cuantificación de Casiopeina III-EA en solución glucosada al 5 %.	97
Tabla XXIV. Reporte de validación de métodos analíticos para la cuantificación de Casiopeina III-EA en solución salina al 0.9 %.	98

**6.0 LISTADO DE FIGURAS**

Figura I. Estructura de la Casiopeina® III-Ea	18
Figura II. Correlación entre toxicidad aguda y actividad citostática. 4,7-diMephen, Casiopeina® III-Ea; 4,4-diMebipy, Casiopeina® III-Ia	18
Figura III. Ejemplo de diagrama de Ishikawa.....	22
Figura III. Factores y variables de un proceso.	29
Figura IV. Grafica de efectos principales. El efecto de B es mayor que el de A.....	33
Figura V. Ejemplo de diagrama de Pareto.....	34
Figura VII. Proceso para la extracción en cartuchos SPE Strata-X, Phenomenex.	51
Figura VIII. Proceso de extracción por precipitación de proteínas.	53
Figura X. Espectro de absorción en UV-VIS de Casiopeina® III-Ea.	57
Figura X. Estabilidad de Casiopeina® III-Ea en solución salina 0.9%.	59
Figura XI. Estabilidad de Casiopeina® III-Ea en solución glucosada 5%.	60
Figura XII. Estabilidad de Casiopeina® III-Ea en agua destilada.....	60
Figura XIII. Resultado visual del proceso de extracción por precipitación de proteínas. ...	64
Figura XIV. Diagrama de Pareto estandarizado para tiempo de retención	70
Figura XV. Diagrama de Pareto estandarizado para área	72
Figura XVI. Evaluación inicial de riesgos.....	73
Figura XVII. Curva de la potencia para diseño de Plackett-Burmann	81
Figura XVIII. Diagrama de Pareto para Simetría.....	84
Figura XIX. Diagrama de Pareto para Resolución.....	85
Figura XX. Gráfica de contornos de la optimización de ambas respuestas.	87
Figura XXI. Cromatograma con las condiciones optimizadas.	89



7.0 INTRODUCCIÓN

Las Casiopeinas® son un grupo de medicamentos recién sintetizados diseñados para tratar el cáncer. Estos complejos de cobre muestran actividades citostáticas, citotóxicas, genotóxicas y antineoplásicas a través de diferentes mecanismos de acción (1). La Casiopeina® III-Ea es un complejo de cobre con actividad anti-proliferativa y anti-tumoral, destinada a actuar a través de mecanismos alternativos al cisplatino, siendo un fármaco prometedor para el tratamiento del cáncer (2).

Cáncer es el nombre que se le da a una enfermedad que se caracteriza por la acumulación de células, provocando la formación de un tumor, que siempre es fatal si no se trata. En México, el cáncer ha seguido siendo una de las primeras 5 causas de muerte, en el año 2021 se encuentra como la cuarta causa de muerte, después de las enfermedades del corazón, COVID-19 y diabetes mellitus. En México el año 2020, la muerte derivada de problemas de la salud por cáncer representó el 9% del total de defunciones (3). En el mundo, el cáncer es la segunda causa de muerte (8.97 millones de muertes en 2018) después de la cardiopatía isquémica, pero probablemente se convertirá en la primera en el año 2060 (aproximadamente 18,.63 millones de muertes) (4).

Generalmente, la terapia contra el cáncer combina quimioterapia, radioterapia y cirugía. Aunque la gran mayoría de los compuestos quimioterapéuticos son moléculas orgánicas, en las últimas cinco décadas ha surgido una importante investigación sobre los sistemas inorgánicos como una alternativa importante y útil a los tratamientos más comunes. Los compuestos a base de platino, como el cisplatino, se han utilizado clínicamente para tratar varios tipos de cáncer, incluidos el cáncer de pulmón, colorrectal, de próstata y de ovario (1). Sin embargo, esta clase de compuestos presenta severos efectos secundarios, que incluyen nefrotoxicidad, cardiotoxicidad y caída del cabello, entre otros. Para superar estas desventajas, nuevos fármacos contra el cáncer basados en metales endógenos; principalmente hierro y cobre, se han desarrollado con resultados prometedores (5). En este sentido, las Casiopeinas® han sido desarrolladas con la premisa de que los metales endógenos son menos tóxicos, las Casiopeinas® se han estudiado en modelos *in vitro* e *in vivo*.



La Biofarmacia es una disciplina que aborda la relación existente entre las propiedades fisicoquímicas del fármaco, la forma farmacéutica y la vía de administración en la velocidad y cantidad de fármaco absorbido (6).

Antes de probar un fármaco en personas, fases clínicas, los investigadores averiguan el comportamiento de estos fármacos en diferentes matrices o animales. Estos estudios proporcionan información detallada sobre farmacocinética y la toxicidad del fármaco. Para ello, se emplea el bioanálisis, que se refiere a la identificación y cuantificación de analitos en varias matrices biológicas (sangre, plasma, suero, saliva, orina, heces, piel, cabello, tejido de órganos) (7). Los fármacos investigados están presentes en concentraciones bajas, mientras que los compuestos endógenos son numerosos y abundantes. Por esto, existe la necesidad de procedimientos confiables y eficientes para realizar análisis tanto cualitativos como cuantitativos con metodologías rentables y tiempo de análisis reducido (8).



8.0 ANTECEDENTES

8.1 Cáncer

El cáncer es un término general que describe una clase diversa de enfermedades en las que las células experimentan un crecimiento descontrolado con el potencial de volverse malignas mediante la adquisición de diversas características aberrantes (es decir, autosuficiencia en las señales de crecimiento, insensibilidad a las señales anti-crecimiento, potencial replicativo ilimitado, angiogénesis sostenida, evasión de la apoptosis, desregulación y reprogramación de vías metabólicas celulares, evasión inmune, inestabilidad genética o epigenética e inflamación promovida por tumores) durante su desarrollo como resultado de factores genéticos o ambientales (9–11).

El cáncer es una de las principales causas de muerte en el continente americano. En el año 2008, el cáncer representó 1.2 millones de muertes, de las cuales, el 45% ocurrió en América Latina y el Caribe. Se proyecta que la cantidad de muertes por cáncer en el continente americano aumentó de 1.2 millones a 2.1 millones entre 2008 y 2030. Muchos cánceres tienen una alta probabilidad de ser eliminados si se detectan temprano y se tratan adecuadamente (12).

En México, desde la década de 1960 el cáncer se ubicó entre las diez principales causas de muerte. Entre los años de 1960 y 1970 fue el sexto motivo de mortalidad ascendiendo, para 1990 ocupó la segunda posición hasta 2004, donde descendió al tercer lugar, mismo que ocupa hasta el 2014. En el año 2014, el cáncer representó el 12.2% de las defunciones, únicamente por debajo de las enfermedades cardíacas (19.2%) y la diabetes mellitus (14.8%). Mostrando datos donde la mortalidad por neoplasias fue mayor en mujeres (13.97%) que en hombres (10.74%). El 43.7% de las muertes correspondieron a población en edad productiva (15-64 años) y 54.4% a población adulta mayor (65 años o más) (13).

8.1.1 Antineoplásicos en quimioterapia.

Los diferentes fármacos antineoplásicos pueden actuar sobre una o varias fases del ciclo celular o sobre los mecanismos de control de la proliferación celular (14). La respuesta que se obtiene con la administración del medicamento se relaciona directamente con la capacidad proliferativa de la célula, que está determinada por el tiempo de duplicación del



ANTECEDENTES

tumor. Es decir, a mayor proliferación se prevé una mayor respuesta al tratamiento citostático (15):

- **Alquilantes:** Estos fármacos, son los más utilizados en la quimioterapia, dañan el ADN e interfieren en la replicación celular. Provocan su acción citotóxica mediante la formación de enlaces covalentes entre sus grupos alquilo y diversas moléculas nucleófilas presentes en las células, especialmente las bases nitrogenadas del ADN (14). La ciclofosfamida, es el agente alquilante más utilizado. Es una molécula inactiva que requiere activación hepática, con la que da lugar a la fosforamida, que es el principal metabolito activo.
- **Antibióticos citotóxicos:** Son sustancias de origen natural generadas principalmente por hongos. Estas sustancias son capaces de alterar el crecimiento de otras células (14).
- **Antimetabolitos:** Estos fármacos tienen una estructura similar a la de los componentes que participan en la síntesis de ácidos nucleicos, de modo que interfieren en su metabolismo y en concreto en la síntesis de ácidos nucleicos. Ejercen su acción principalmente sobre tumores en rápido crecimiento (15).

8.2 Desarrollo de nuevos fármacos.

El descubrimiento moderno de fármacos ha sido en gran medida objetivo y principalmente impulsados por enfoques quimiocéntricos, es decir, enfoques basados en un compuesto específico o clase de compuesto que sirvió como punto de partida para una mayor optimización. Estos quimiotipos se descubrieron a través del conocimiento etnobotánico o se derivaron de sustancias y ligandos naturales. Con el reciente conocimiento de los métodos modernos de biología molecular y del genoma humano, el descubrimiento de fármacos ahora se ha transformado en un enfoque que incluyen objetivos basados en el cribado (*target-based screening*), cribado fenotípico, la modificación de sustancias naturales y los enfoques basados en la biotecnología (16).



8.3 Casiopeinas®

En las últimas décadas, los agentes terapéuticos con un centro metálico han ganado un interés significativo como agentes quimioterapéuticos. Uno de los enfoques hacia el tratamiento contra el cáncer es la quimioterapia, de la cual en la actualidad se han diseñado nuevas moléculas para actuar específicamente dentro de una célula cancerosa. Dentro de este grupo de nuevas moléculas se encuentran las Casiopeinas®, cuyo nombre proviene de “la constelación Casiopea”, formada por seis estrellas, ordenadas con el mismo arreglo central de estos compuestos (17).

Las Casiopeinas® son una familia de más de cien compuestos de coordinación, los cuales han sido caracterizados y reorganizados en subfamilias al tener variaciones en la fórmula general. De estos más de cien compuestos, se eligieron veinticuatro, de los cuales se seleccionaron diez y, finalmente tres, los más prometedores por su solubilidad y selectividad. Estas dos moléculas llevan el nombre de Casiopeina® IIgly y Casiopeina® III ia y Casiopeina® III Ea , de los cuales hasta el momento se tienen nueve subfamilias, con distinta actividad *in vivo* e *in vitro* (18).

Las Casiopeinas® son un grupo de compuestos de coordinación con un centro de átomo de cobre , diseñadas como agentes quimioterapéuticos sobre la base de que los compuestos con cobre se metabolizan más fácil que otros cationes metálicos, con un menor riesgo de efectos secundarios y una mayor eficacia (19). Las Casiopeinas® poseen dos fórmulas generales, $[Cu(N-N)(O-N)]NO_3$, y $[Cu(N-N)(O-O)]NO_3$, donde N-N es una diimina aromática substituida (1,10-fenantrolina o 2,2'-bipiridina), N-O es un α - o β -aminoácidos, y O-O es un donador de oxígeno (acetilacetona o salicilaldehído). Estos compuestos son capaces de catalizar la reacción de Fenton, generando múltiples ROS como radicales libres hidroxilo ($\bullet OH$) y superóxido ($\bullet O_2^-$), además de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (20).

Diferentes aspectos químicos fueron considerados para el diseño de las Casiopeinas®, estos aspectos incluyen: a) la presencia de un metal esencial el cual disminuya el riesgo de toxicidad; b) la presencia de diiminas aromáticas con una alta afinidad relativa por complejos de cobre, que favorecen la configuración *Cis* alrededor del metal, brindándole a la molécula una estructura plana estable debida a su sistema de anillos aromáticos; c)



ANTECEDENTES

ligandos secundarios con baja toxicidad y alta afinidad al cobre. En conjunto, estas características estructurales brindan una amplia estabilidad, reactividad y solubilidad oleosa, que modulan las propiedades de esta familia de moléculas (18).

Estudios previos, usando diferentes modelos experimentales tanto *in vivo* como *in vitro*, han mostrado que las Casiopeinas[®] exhiben un mayor efecto antiproliferativo que el Cisplatino, esto ha sido reportado para cáncer murino y humano, entre esos; de mama, leucemia, adenocarcinoma colorectal y carcinomas cérvico uterino, neuroblastomas, carcinoma de pulmón, entre otros. Además, las Casiopeinas[®] han mostrado tener efectos citostáticos y citotóxicos *in vitro* en algunas células tumorales e *in vivo* en tumores implantados en ratones (18). Recientemente, se ha reportado que las Casiopeinas[®] son capaces de producir fragmentación del ADN y oxidación de bases, en la cual su acción parece ser relacionada a la generación de ROS después de la reducción del cobre. También puede inducir disfunción mitocondrial por sobre producción de ROS, provocando la muerte celular (21).

Tabla I. Subfamilias de Casiopeina[®] (22).

Subfamilia	Formula General
Casiopeina [®] I	Cu(4,7-difenil-fenantrolina)(O-N)NO ₃
Casiopeina [®] II	Cu(4,7-dimetil-fenantrolina)(O-N)NO ₃
Casiopeina [®] III	Cu(N-N)(O-O)NO ₃
Casiopeina [®] IV	Cu(4,4'-dimetil-bipiridina)(O-N)NO ₃
Casiopeina [®] V	Cu(5R-fenantrolina)(O-N)NO ₃
Casiopeina [®] VI	Cu(5,6-dimetil-fenantrolina)(O-N)NO ₃
Casiopeina [®] VII	Cu(fenantrolina)(O-N)NO ₃
Casiopeina [®] VIII	Cu(3,4,7,8-tetrametil-fenantrolina)(O-N)NO ₃
Casiopeina [®] IX	Cu(bipiridina)(O-N)NO ₃

8.3.1 Casiopeina[®] III-Ea

La Casiopeina[®] III-Ea [Cu(H₂O)(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(acetilacetato)]NO₃, es un complejo de cobre con actividad antiproliferativa y antitumoral, diseñada como una alternativa a los diferentes compuestos de platino (2). Los estudios estructura-actividad han asociado la influencia de la estructura de las Casiopeinas[®] con su toxicidad y su actividad, permitiendo seleccionar las moléculas más prometedoras. En un ensayo,



ANTECEDENTES

veintiún compuestos fueron probados empleando Cisplatino como referencia donde la Casiopeina® III-Ea mostró el más bajo CI50 en las líneas celulares HeLa y SiHa. Este complejo provee una mayor actividad citostática que Casiopeina® III-Ia (23).

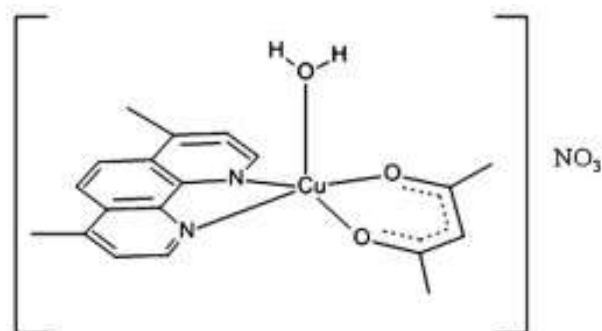


Figura I. Estructura de la Casiopeina® III-Ea (23).

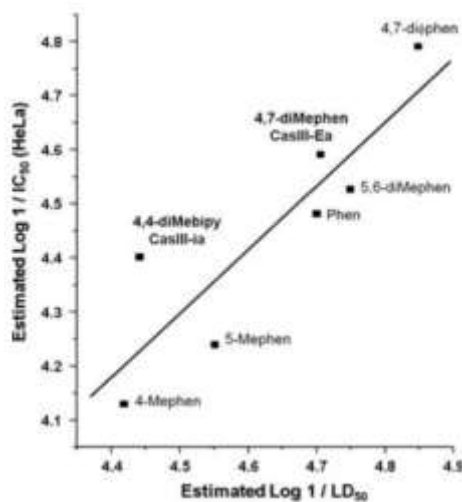


Figura II. Correlación entre toxicidad aguda y actividad citostática. 4,7-dimephen, Casiopeina® III-Ea; 4,4-dimebipy, Casiopeina® III-Ia (23).



Tabla II. Características fisicoquímicas de Casiopeina® III-Ea (23–25).

Característica	Descripción
Peso molecular	450.94 g/mol
Análisis elemental	C: 50.37%; N: 9.40%; H: 4.46%
Absorbancia máxima	273 nm
pKa	5.01
Solubilidad pH 6.8 y 7.4	180 mg/mL y 170 mg/mL
Log D	- 0.81
Dosis terapéutica	0.8 mg/kg
IC ₅₀	18 a 47 μM

8.4 Calidad analítica por diseño (AQbD)

La calidad por diseño (QbD) es un concepto desarrollado por primera vez por el pionero de la calidad, el Dr. Joseph M. Juran. El Dr. Juran creía que la calidad debe diseñarse en un producto y que la mayoría de las crisis y problemas de calidad se relacionan con la forma en que se diseñó un producto en primer lugar (26).

La calidad por diseño es un enfoque que tiene como objetivo garantizar la calidad de los medicamentos mediante el empleo de metodología estadística, analítica y de gestión de riesgos en el diseño, desarrollo y fabricación de medicamentos (27).

La calidad por diseño se centra en el uso de análisis multivariante, a menudo en combinación con métodos modernos de química analítica de procesos y herramientas de gestión del conocimiento para mejorar la identificación y comprensión de los atributos críticos de los materiales y los parámetros críticos del proceso de desarrollo de los medicamentos. Esta mayor comprensión del producto y el proceso se utiliza para incorporar la calidad en el desarrollo y proporcionar la base para la mejora continua de los productos y procesos (27).

Asimismo, entre los investigadores existe la necesidad de adoptar este concepto en el desarrollo de métodos analíticos, es por ello por lo que se ha informado de un nuevo concepto, calidad analítica por diseño (AQbD). AQbD ayuda en el desarrollo de un método analítico robusto y rentable que sea aplicable durante todo el ciclo de vida del producto, para facilitar la flexibilidad regulatoria en el método analítico. Significa la libertad de



ANTECEDENTES

cambiar los parámetros del método dentro del espacio de diseño de un método, denominado región de diseño operable del método (MODR) (28).

Entre los investigadores analíticos, hasta la fecha la experiencia o exposición con el enfoque AQbD para métodos analíticos es limitada o es insignificante. Al igual que hoy, las industrias farmacéuticas tienen muchas preguntas y requieren muchas más discusiones sobre la implementación de AQbD y su correlación con otros componentes de los sistemas de calidad farmacéutica (28).

8.4.1 Implementación de AQbD

La aplicación del concepto QbD al método analítico es justificable, debido a muchas variables que afectan significativamente los resultados del método. Estas variables son la configuración del instrumento, las características de la muestra, los parámetros del método y la elección de modelos de calibración (28).

La técnica cromatográfica es la herramienta analítica más común en el control de calidad farmacéutica, y el número de variables involucradas en la fase de desarrollo del método analítico es casi equivalente al número de variables involucradas en la formulación y protocolos de desarrollo para la forma farmacéutica. La implementación de QbD brinda la oportunidad de lograr flexibilidad regulatoria, pero requiere un alto grado de solidez, calidad del producto y comprensión del método analítico. Se recomienda adoptar un protocolo de diseño de experimentos (DOE) adecuado en el enfoque AQbD para identificar un MODR validado para un alto grado de comprensión del método analítico-producto-proceso (28).

8.4.2 Perfil de calidad del producto objetivo (QTPP) / Perfil analítico del objetivo (ATP)

AQbD se inicia con un perfil analítico del objetivo o ATP, que es análogo a QTPP. ATP define el objetivo del proceso de desarrollo del método analítico, relacionando los resultados del método para lograr el QTPP. En términos generales, el ATP se puede definir como una declaración que define el propósito del método que se utiliza para impulsar las actividades



ANTECEDENTES

de selección, diseño y desarrollo del método. El ATP es un parámetro clave en AQBd que facilita una mayor mejora continua de los métodos analíticos y su elección (29).

La identificación del ATP incluye la selección de requisitos del método, como los analitos objetivo (producto e impurezas), la categoría de la técnica analítica y las especificaciones del producto. Se realizaría una evaluación de riesgo inicial para anticipar los requisitos del método y las criticidades analíticas. El ATP general para los procedimientos analíticos es el siguiente (29):

- ✓ Selección de analitos objetivo (API e impurezas),
- ✓ Selección de técnica (HPLC, GC, HPTLC, cromatografía iónica, HPLC quirral, etc.),
- ✓ Selección de los requisitos del método (ensayo o perfil de impurezas o disolventes residuales).

8.4.3 Atributos críticos de calidad (CQA)/ Características de rendimiento del método analítico (AMPC)

Los CQA son una propiedad o característica física, química, biológica o microbiológica que debe estar dentro de un límite, rango o distribución apropiados para asegurar la calidad deseada del producto. Los CQA generalmente se asocian con la sustancia farmacéutica, los excipientes, los productos intermedios (materiales en proceso) y el producto farmacéutico (30). Los Atributos Críticos del Material (CMA) consisten en propiedades físicas, químicas, biológicas o microbiológicas que el material de entrada debe cumplir para asegurar el CQA deseado (31).

Las AMPC se definen para satisfacer las necesidades de ATP. El AMPC puede clasificarse en dos categorías, según la fuente del error: a) variabilidad sistemática (sesgo), que incluye precisión, especificidad y linealidad; y b) variabilidad aleatoria (aleatoria), que incluye precisión, límite de detección y límite de cuantificación. Además, el alcance y la robustez también se pueden establecer en la definición de AMPC. La selección de la técnica analítica (como ensayos cromatográficos, espectrofotométricos o microbiológicos) debe basarse en las definiciones de ATP y AMPC (31).



ANTECEDENTES

La gestión de riesgos de calidad se puede utilizar para priorizar la lista de CQA/AMPC potenciales para una evaluación posterior. Los CQA/AMPC relevantes pueden identificarse mediante un proceso iterativo de gestión de riesgos de calidad y experimentación que evalúa hasta qué punto su variación puede tener un impacto en la calidad del producto farmacéutico (30).

8.4.3.1 Evaluación inicial del riesgo

La evaluación de riesgos es un proceso basado en la ciencia que se utiliza en la gestión de riesgos de la calidad y puede identificar los atributos del material y los parámetros del método (ATP). La evaluación de riesgos se puede realizar desde la etapa inicial del desarrollo del método hasta el monitoreo continuo del método. El enfoque AQBd implica la identificación de riesgos en las primeras etapas de desarrollo, seguida de planes de mitigación adecuados con estrategias de control que se establecerán. En general, el diagrama de espina de pescado de Ishikawa se puede utilizar para la identificación y evaluación de riesgos (29).

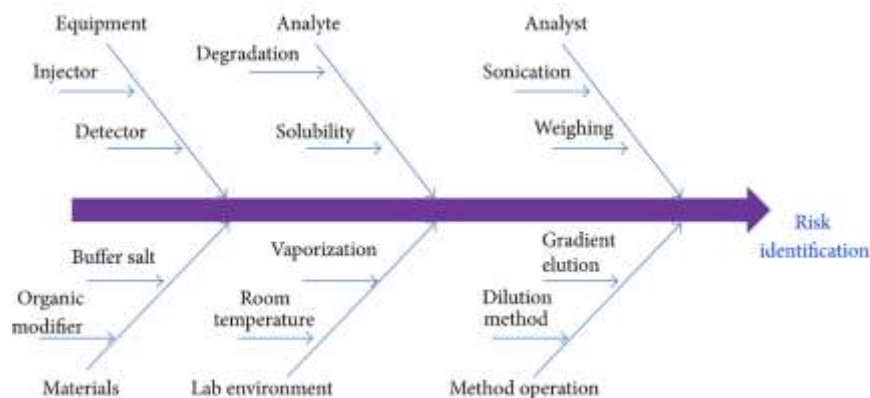


Figura III. Ejemplo de diagrama de Ishikawa (29).

8.4.4 Parámetros críticos del proceso (CPP)

La evaluación de riesgos es un valioso proceso basado en la ciencia que se utiliza en la gestión de riesgos de la calidad que puede ayudar a identificar qué atributos y parámetros de proceso tienen un efecto potencial en los CQA del producto. La evaluación de riesgos se realiza normalmente al principio del proceso de desarrollo farmacéutico y se repite a medida que se dispone de más información y se obtiene un mayor conocimiento (30).



ANTECEDENTES

Las herramientas de evaluación de riesgos se pueden utilizar para identificar y clasificar parámetros (por ejemplo, procesos, equipos, materiales de entrada) con potencial para tener un impacto en la calidad del producto, basándose en el conocimiento previo y los datos experimentales iniciales. La lista inicial de parámetros potenciales puede ser bastante extensa, pero puede ser modificada y priorizada por estudios adicionales (por ejemplo, a través de una combinación de diseño de experimentos, modelos mecánicos). La lista se puede refinar aún más mediante la experimentación para determinar la importancia de las variables individuales y las interacciones potenciales. Una vez que se identifican los parámetros significativos, se pueden estudiar más a fondo (mediante una combinación de diseño de experimentos, modelos matemáticos o estudios que conduzcan a la comprensión mecanicista) para lograr un mayor nivel de comprensión del proceso (30).

8.4.5 Diseño de experimentos en QbD

A principios del siglo XX, Sir Ronald Fisher introdujo el concepto de aplicar el análisis estadístico durante las etapas de planificación de la investigación en lugar de al final de la experimentación. Cuando se aplica el pensamiento estadístico desde la fase de diseño, permite incorporar la calidad al producto mediante la adopción del enfoque de conocimiento profundo de Deming, que comprende el pensamiento sistémico, la comprensión de variaciones, la teoría del conocimiento y la psicología (32).

Entre varios enfoques de modelado matemático, el diseño de experimentos se utiliza ampliamente para la implementación de QbD tanto en la investigación como en entornos industriales. En QbD, la comprensión del producto y del proceso es el factor clave para asegurar la calidad en el producto final. El conocimiento se logra estableciendo modelos que correlacionan las entradas con las salidas del proceso. Las relaciones matemáticas de los parámetros críticos del proceso y los atributos del material con los atributos críticos de calidad definen el espacio de diseño. En consecuencia, la comprensión del proceso está bien asegurada y conduce racionalmente a un producto final que cumple con el perfil de producto objetivo de calidad (32).



8.4.5.1 Selección de diseño experimental

La selección del mejor diseño experimental debe considerar varios aspectos, como los objetivos definidos, el número de factores de entrada y las interacciones que se estudiarán, la validez estadística y la eficacia de cada diseño. Con el fin de proporcionar una mejor comprensión de la aplicación del DoE, los diseños experimentales se pueden dividir en dos tipos: a) diseños de detección; y b) diseños de optimización (31).

8.4.6 Espacio de diseño (DS)/Región de diseño operable del método (MODR)

El DS se define según como la combinación e interacción multidimensional de variables de entrada y parámetros de proceso que se ha demostrado que proporcionan garantía de calidad. Por tanto, la combinación e interacción multidimensional de la variable de entrada corresponde a un subespacio, el denominado DS, donde se ha demostrado la garantía de calidad. El DS está necesariamente englobado dentro del dominio experimental, que es el espacio multidimensional formado por los rangos de factores utilizados durante el desarrollo del método. En el marco del desarrollo del método, el DS puede considerarse como una zona de robustez teórica ya que no deben observarse cambios drásticos en los niveles de los CQA del método. Por lo tanto, para definir un DS analítico, un número sabiamente seleccionado de factores, también llamados factores operativos de parámetros de proceso crítico (CPP) (por ejemplo, tiempo de retención en cromatografía, temperatura de la columna y concentración de reactivos) que impactan en la técnica analítica en desarrollo tienen que ser estudiados simultáneamente. Por lo general, los CPP se obtienen a partir de un análisis de riesgos y una estrategia de priorización. El DS analítico es finalmente un dominio multivariable de factores de entrada que asegura que las respuestas elegidas críticamente se incluyan dentro de límites predefinidos con un nivel aceptable de probabilidad. El método analítico se identifica mediante un rango de condiciones de operación que son definidas por el DS analítico (33).



8.4.7 Implementación de la estrategia de control y mejora continua

En QbD de productos, la estrategia de control está diseñada para garantizar la producción instantánea del producto con la calidad requerida (28). La estrategia de control es un conjunto planificado de controles, derivado de la naturaleza del analito y la comprensión de MODR. La estrategia de control del método se puede establecer en base a los datos estadísticos completos recopilados durante las etapas DoE y MODR como se discutió anteriormente. Usando estos datos experimentales estadísticos, se pueden establecer correlaciones entre el método y los atributos del analito para la capacidad de cumplir con los criterios de ATP. La estrategia de control resolverá la inconsistencia de los parámetros del método (por ejemplo, grado de reactivo, marca o tipo de instrumento y tipo de columna). La estrategia de control del método no parece dramáticamente diferente bajo el enfoque AQbD en comparación con el enfoque tradicional. Sin embargo, los controles del método se establecen en función de los datos experimentales de CQA, DoE y MODR para garantizar un vínculo más sólido entre el propósito del método y el rendimiento (29).

8.5 Diseño de experimentos

El diseño de experimentos se define como una metodología que aplica sistemáticamente la estadística en la experimentación. Consiste en realizar una serie de experimentos en los que se inducen cambios deliberados en las variables de un proceso, de manera que es posible observar e identificar las causas de los cambios en la respuesta de salida. Con esta técnica se puede conseguir, por ejemplo, mejorar el rendimiento de un proceso y reducir su variabilidad o los costos de producción (34).

El diseño de experimentos es la forma más eficaz de hacer pruebas. El diseño de experimentos consiste en determinar cuáles pruebas se deben realizar y de qué manera, para la obtención de información, que puede ser analizada y comprendida con el fin de proporcionar evidencia objetiva que permita responder a las interrogantes planteadas, y con ello clarificar aspectos inciertos de un proceso, resolver un problema o una mejora (35).



ANTECEDENTES

El diseño de experimentos es un conjunto de técnicas que son activas, es decir, no espera que el proceso mande señales que pueden ser observadas, sino que el proceso se manipula para que proporcione información de calidad que se requiere para su mejoría (35).

8.5.1 Diseño de experimentos en la investigación

El objetivo en la investigación es generar nuevas ideas y mejores respuestas a las interrogantes del investigador. Investigadores de prácticamente todos los campos de estudio llevan a cabo experimentos. La planeación es una actividad que permite eficacia, eficiencia y efectividad en el trabajo. En la investigación experimental, la planeación implica diseñar el experimento. El diseño estadístico de un experimento da la posibilidad de que éste sea realizado de una manera eficiente, es decir, con el mínimo de recursos materiales y tiempo. Un experimento es una prueba o serie de pruebas en las que se hacen cambios deliberados en las variables de entrada de un proceso o sistema con el objetivo de observar e identificar los cambios que pudieran reflejarse en la respuesta de salida (36).

La buena planeación de la experimentación ayuda al científico a organizar las tareas necesarias para un estudio de investigación. El estudio individual exige que el científico tome una serie de decisiones críticas (36).

8.5.2 Modelo estadístico y denotaciones

Al igual que en el análisis de regresión, el DoE se ocupa de modelar la dependencia de una variable objetivo-aleatoria Y en dependencia de un número de variables deterministas controlables x_1, \dots, x_k (llamadas factores). El objetivo principal del DoE es encontrar configuraciones para $x = (x_1, \dots, x_k)$ fuera de una región dada $V \subset R^k$ conduzcan a resultados “óptimos” para la variable objetivo bajo consideración. Las diferentes configuraciones $x_{(1)}, \dots, x_{(n)}$ para los factores se resumen en un diseño estadístico $d_n = (x_{(1)}, \dots, x_{(n)}) \in V^n$ de sizen. El criterio de optimalidad generalmente se define a través de alguna función objetivo, por ejemplo, la información o entropía asociada con un experimento, la varianza de algún predictor $\hat{Y}(x^*)$ para una configuración no observada $x^* = x_1^*, \dots, x_k^*$ etc. Las principales áreas de preocupación en el DoE son (37):



ANTECEDENTES

- a. diseño estadístico en análisis de regresión y análisis de varianza
- b. diseños factoriales
- c. identificación y eliminación de influencias perturbadoras (bloqueo)

Esto a menudo incluye, como primer paso, el diseño del tamaño del experimento; es decir, el número de observaciones n que deben tomarse para lograr un objetivo predefinido. La función media de $Y = Y(x)$ dado $x = (x_1, \dots, x_k) \in V$ se llama superficie de respuesta, generalmente denotada por $\eta(x) = EY(x)$ y el modelo se convierte en

$$Y(x) = \eta(x) + \varepsilon, x \in V$$

donde se supone que el término de error aleatorio es independiente de x y tal que $E(\varepsilon) = 0$ y $Var(\varepsilon) = \sigma^2$. Interpretando x como la realización de un vector aleatorio $X = (X_1, \dots, X_k)$, la respuesta de la función es simplemente la función de regresión de Y w.r.t. X . La superficie de respuesta desconocida a menudo se modela a través de una configuración lineal

$$\eta(x) = \beta_0 + \beta_1 f_1(x) + \dots + \beta_r f_r(x)$$

con funciones dadas f_1, \dots, f_r . Por ejemplo, $\eta(x)$ podría ser una configuración polinomial de segundo orden

$$\eta(x) = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i < j=1}^k \beta_{ij} x_i x_j$$

que surge de una expansión de Taylor de segundo orden de η . Aquí, la primera suma contiene todos los efectos principales x_1, \dots, x_k y la segunda suma contiene las interacciones (de segundo orden) $x_i x_j$ (37).



8.5.3 Conceptos básicos en el DoE

8.5.3.1 Experimento

Un experimento se puede definir como una prueba o serie de pruebas en las que se realizan cambios intencionados en las condiciones de entrada de operación de un sistema o proceso, con el objetivo de medir e identificar el efecto de estos cambios sobre una o varias respuestas de salida (34).

8.5.3.2 Respuesta

Variable o variables cuyo valor viene determinado por el efecto o los resultados de cada prueba experimental, por lo que puede ser característica de la calidad de un producto y/o variables que miden el desempeño de un proceso. El valor depende de igual manera de la combinación de factores y niveles establecidos (34).

8.5.3.3 Factor

Un factor es una variable de interés que es controlada hasta cierto punto por el experimentador, de la cual se desea estudiar sus efectos en una o varias respuestas. Cuando se considera que un factor puede influir en la respuesta o respuestas, estos se denominan factores potenciales o perturbadores del diseño. Estos factores, son los del interés del experimentador, ya que le permitirá encontrar las condiciones deseadas. Los factores estudiados pueden ser controlables o no controlables (34,38).

- **Factores controlables:** Son las variables de un proceso o características de los materiales experimentales que se pueden fijar en un nivel dado, por ejemplo, temperatura, velocidad de agitación, cantidad de reactivo, etc. A los factores controlables también se les llama variables de entrada, condiciones de proceso ó variables de diseño (35).
- **Factores no controlables o de ruido:** Son variables o características de los materiales y métodos que no se pueden controlar durante la experimentación o la operación normal del proceso, por ejemplo, la humedad, luz, etc (35).



ANTECEDENTES

8.5.3.4 Nivel

Un nivel se puede definir como las diversas categorías de un factor, es decir, los diferentes valores que se pueden asignar a cada factor estudiado en un diseño experimental (34,38).

8.5.3.5 Tratamientos

Son una combinación de niveles de todos los factores estudiados (35).

8.5.3.6 Efecto principal

Indica la contribución de cada factor tiene sobre las variables de respuesta. Se define como el cambio en la respuesta producido por un cambio en el nivel del factor. El efecto principal o efectos principales se refieren a los factores de interés primario en el experimento (34).

8.5.3.7 Interacción

Existe una interacción cuando uno de los factores no produce el mismo efecto en la respuesta con niveles diferentes de otro factor, el efecto de un factor depende del nivel en que esta el otro (35).

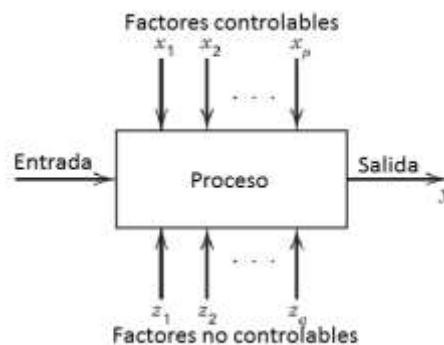


Figura IV. Factores y variables de un proceso (38).

8.5.4 Principios básicos del diseño de experimentos

El diseño de experimentos es el proceso de planear el experimento de tal forma que los datos recabados puedan analizarse con métodos estadísticos, con el fin de obtener conclusiones validas y objetivas. El enfoque estadístico del diseño experimental será útil al momento de obtener conclusiones significativas de los datos analizados (34).



ANTECEDENTES

En el diseño de experimentos existen tres principios básicos, realización de réplicas, aleatorización y la formación de bloques (34).

- **Réplicas:** Las réplicas son la repetición del experimento básico. La realización de réplicas tiene dos objetivos. El primero, permite que el experimentador obtenga una estimación del error experimental, con el que se determinan las diferencias observadas en los datos y concluir si son significativamente diferentes. La segunda, si se utiliza la media muestral para estimar el efecto de un factor en el experimento, el experimentador obtiene una estimación más precisa de este efecto (34).
- **Aleatorización:** Es la base en la que se fundamenta el uso de métodos estadísticos en el diseño experimental. La aleatorización se define como la realización de las corridas experimentales en orden aleatorio (al azar) y con la asignación de material experimental al azar. Esto aumenta la probabilidad de que el supuesto de independencia (variables aleatorias con distribuciones independientes) de los errores se cumpla, lo cual es un requisito para la validez de las pruebas estadísticas que se realizan. De igual manera, se asegura que las pequeñas diferencias provocadas por los factores no controlados se repartan de manera homogénea en todos los tratamientos, por el contrario, de no realizar la aleatorización, la experimentación estaría en un sesgo sistemático de los resultados experimentales (35). En ciertas ocasiones, los experimentadores se encuentran con situaciones en las que la aleatorización es complicada por distintos aspectos. Sin embargo, existen métodos de diseño estadístico para resolver restricciones en la aleatorización: el diseño anidado y el diseño de parcelas subdivididas (34).
- **Formación de bloques:** Es una técnica de diseño que se utiliza para mejorar la precisión de las comparaciones entre los factores de interés. Consiste en nulificar o tomar en cuenta, todos los posibles factores que puedan afectar la respuesta observada. Frecuentemente, la formación de bloques se utiliza para reducir o eliminar la variabilidad transmitida por los factores que puedan influir en la respuesta experimental, pero en los que no hay un interés específico. En general, un bloquees un conjunto de condiciones experimentales relativamente homogéneas (35).



8.5.5 Diseños factoriales

En la mayoría de los experimentos, se estudian el efecto de dos o más factores. El objetivo de un diseño factorial es estudiar el efecto de varios factores sobre una o varias respuestas, cuando el interés sobre los factores es el mismo, determinando una combinación de niveles y factores que permitan tener el desempeño óptimo del proceso. En el diseño factorial se investigan todas las posibles combinaciones de los niveles de los factores en cada ensayo o réplica (35).

En la experimentación surge la necesidad de estudiar conjuntamente más de un factor con diferentes niveles y combinaciones, es decir, que los factores interactúen, ya que, si un factor se estudia por separado, el resultado puede ser diferente al estudio conjunto, por ello son empleados los diseños factoriales. De igual forma se emplean los diseños factoriales cuando se requiere optimizar una respuesta, encontrando la combinación de los niveles y factores que brindarán una respuesta óptima (35).

Suponemos que la superficie de respuesta puede describirse suficientemente bien mediante un polinomio de grado $g \geq 1$ en $k \geq 2$ factores x_1, \dots, x_k . Para garantizar la no singularidad de la matriz de información es necesario que cada factor pueda tomar al menos $g + 1$ valores diferentes, estos últimos se denominan niveles de los factores. Un diseño factorial significa entonces un diseño que define un subconjunto de todas las combinaciones posibles de los niveles de los k factores. Se dice que es un diseño factorial completo si contiene todas las $(g + 1)^k$ combinaciones de los niveles; de lo contrario, se dice que es un diseño factorial fraccional. En la mayoría de las aplicaciones, la superficie de respuesta se investiga de forma secuencial. En un primer paso, se debe realizar un cribado de los factores esenciales, utilizando herramientas del análisis de regresión o del análisis multivariado (por ejemplo, análisis de componentes principales) (37).

8.5.5.1 Ventajas de los diseños factoriales

Los diseños factoriales son más eficientes que los diseños de un solo factor cuando se requiere estudiar dos o más factores. Además, con los diseños factoriales se pueden



ANTECEDENTES

mostrar las interacciones presentes con el fin de evitar llegar a conclusiones incorrectas. Algunas otras ventajas son las siguientes (35):

- Permiten estudiar el efecto individual y la interacción entre distintos factores.
- Se pueden aumentar, en el caso que se requiera de una exploración más completa.
- Pueden realizarse fracciones de los diseños factoriales, los cuales en las primeras etapas son de gran utilidad cuando el experimento involucra muchos factores.
- Pueden ser utilizados en combinación con el diseño de bloques en ciertas situaciones en las que no pueda realizarse todo el diseño factorial bajo las mismas condiciones.
- La interpretación y cálculo de los efectos en el diseño experimental se puede realizar con cálculos sencillos, en especial cuando se trata de solo dos niveles.

8.5.6 Representación de los efectos principales y la interacción de factores.

El efecto principal de un factor es mejor representado de manera visual, mediante una gráfica. El efecto principal indica la contribución de cada factor sobre la o las variables de respuesta. La gráfica consiste en colocar en el eje vertical la escala que representa la magnitud de la variable de respuesta (Y), después uno de los dos factores se representa con sus dos niveles en el eje horizontal y en dirección vertical de cada uno de estos niveles se coloca un punto que representa la respuesta promedio en cada nivel del otro factor. Al final, cada punto del lado izquierdo se une con su correspondiente punto del lado derecho mediante una línea recta. Cuando existe interacción las líneas obtenidas tienen una pendiente muy diferente, en cambio cuando no hay interacción las líneas tienen una pendiente similar y son aproximadamente paralelas (35).

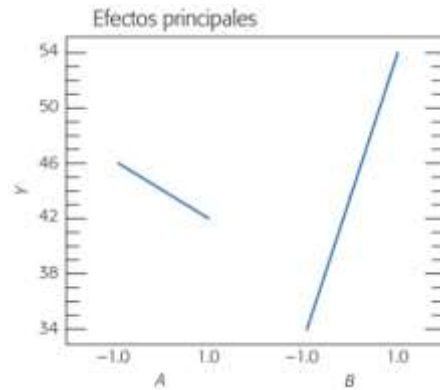


Figura V. Grafica de efectos principales. El efecto de B es mayor que el de A (35)

Definir A y B.

Cuando se llega a la conclusión de que existe una interacción con dos factores, su interpretación tiene prioridad sobre los correspondientes efectos principales, aunque estos sean significativos (35).

8.5.6.1 Diagrama de Pareto de efectos

Para observar la importancia de los efectos de los factores, además del análisis de varianza, existen métodos gráficos que lo complementan, por ejemplo, el diagrama de Pareto de efectos. El diagrama de Pareto de efectos sin estandarizar representa la manera gráfica de observar cuáles efectos son más grandes respecto a su magnitud, pero sin considerar supuestos distribucionales (38).

Con el diagrama de Pareto, muchas veces se logran detectar los efectos que son significativos, y con el ANOVA sólo se confirma lo que se ha encontrado en estos gráficos (38).

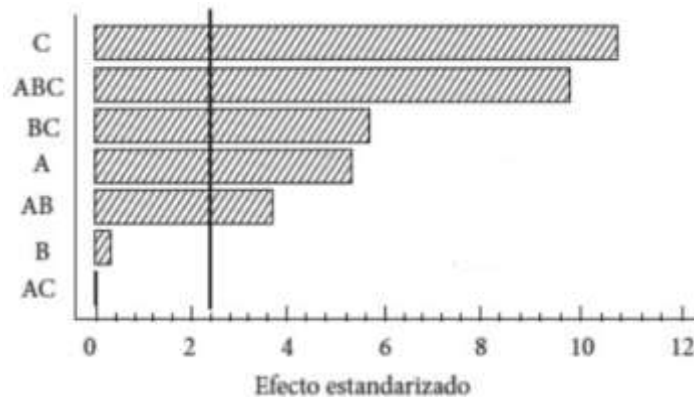


Figura VI. Ejemplo de diagrama de Pareto (38).

Cada barra en el diagrama es la representación del efecto estandarizado de cada factor, que es calculado mediante (38):

$$\frac{abs(efecto)}{Q}, \text{ y } Q = \left(\sqrt{CM_{error} / (n \bullet 2^{k-2})} \right)$$

El diagrama, de igual forma muestra una línea de referencia, con la cual indica cuáles efectos son estadísticamente significativos. Así, los efectos estandarizados se ordenan de mayor a menor y la línea se calcula mediante (38).

$$t(gl_{error}, \alpha=2)$$

8.5.7 Disminución del diseño experimental.

Cuando en el ANOVA y en los gráficos anteriores se detecta que un factor particular no es significativo, ya que su efecto principal y todas las interacciones en las que interviene no son importantes, este puede ser eliminado completamente del análisis, con lo que el diseño se reduce (35).

En general, si hay factores que se pueden eliminar, los datos se convierten en un diseño factorial 2^{k-p} con 2^p repeticiones en cada punto (35).



8.5.8 Diseños de cribados

Un "diseño de cribado" se refiere a un diseño experimental que se puede aplicar cuando se debe examinar un gran número de factores causales potenciales, para identificar los más importantes que pueden tener un efecto en una o más respuestas de interés. Esto reducirá el número de factores que se investigarán en la experimentación adicional. Para eliminar factores sin importancia antes de invertir tiempo y dinero en un experimento más elaborado, se podría realizar un diseño tipo Plackett-Burman (39).

8.5.8.1 Diseño Plackett-Burman

Los procesos pueden refinarse identificando los factores que influyen de una manera menos costosa. Minimizar el número de experimentos y maximizar la información es el objetivo final de un diseño tipo Plackett-Burman (39).

El diseño Plackett-Burman, desarrollado por RL Plackett y JP Burman en 1946, fue diseñado para mejorar el proceso de control de calidad que podría usarse para estudiar los efectos de los parámetros de diseño en el estado del sistema para que se puedan tomar decisiones inteligentes. Las matrices ortogonales diseñadas por Plackett y Burman son útiles para el cribado, que producen estimaciones imparciales de todos los efectos principales en el diseño más pequeño posible. Pueden seleccionarse varios factores de número o ' g ' en un diseño de Plackett-Burman ' $g + 1$ '. Un rasgo característico es que el tamaño de la muestra es un múltiplo de cuatro en lugar de una potencia de dos (4^k observaciones con $k = 1, 2, \dots, n$) (39).

Los diseños Plackett-Burman han sido utilizados para investigar $x_k - 1$ variables en n experimentos que proponen diseños experimentales para más de siete factores y especialmente para $n \geq 4$ experimentos, es decir, 8, 12, 16, 20, etc., que son adecuados para estudiar hasta 7, 11, 15, 19, etc., factores respectivamente. Dichos diseños se conocen como diseños saturados. La principal ventaja de los diseños saturados es el número mínimo de observaciones necesarias para calcular un efecto para un determinado factor. Una selección de diseños Plackett-Burman de dos niveles es igual a los diseños factoriales fraccionados saturados. Esto significa que siete factores se analizan con factorial fraccional



ANTECEDENTES

(27-4) y con un diseño Plackett-Burman que requieren ocho observaciones. Para estudiar 11 factores, se usa diseño Plackett-Burman con 12 corridas, mientras que los diseños factoriales fraccionales requieren 16 observaciones. De este modo, el diseño Plackett-Burman requiere menos experimentos que los diseños factoriales altamente fraccionados que incluyen el mismo número de factores. La propiedad proyectiva del diseño Plackett-Burman es que permite al experimentador seguir un diseño inicial con corridas que permiten una separación eficiente de los efectos principales y los efectos de interacción. Los diseños Plackett-Burman son diseños de la Resolución III con el atributo de requerir el menor número de corridas, pero no permiten la estimación de interacciones entre factores; puede identificar los principales factores importantes que conforman las posibles interacciones significativas (39).

Un análisis más detallado de los factores principales importantes permitiría al analista identificar y estimar los términos de interacción significativos. Por lo tanto, el uso de un diseño de Plackett-Burman es apropiado para la detección (39).

8.5.8.2 Diseño Factorial Fraccionado 2^{k-1}

Un diseño factorial fraccionado es un diseño en el cual los investigadores solo realizan un subconjunto seleccionado o "fracción" de las corridas experimentales incluidas en el diseño factorial completo. Los diseños factoriales fraccionados son una opción adecuada cuando los recursos son limitados o el número de factores incluidos en el diseño es grande, porque utilizan menos corridas que los diseños factoriales completos (40).

Un diseño factorial fraccionado utiliza un subconjunto de un diseño factorial completo, por lo que parte de los efectos principales y las interacciones de 2 factores se confunden y no se pueden separar de los efectos de otras interacciones de orden superior. Por lo general, los investigadores están dispuestos a presuponer que los efectos de orden superior son insignificantes para obtener información sobre los efectos principales y las interacciones de orden bajo con menos corridas (40).



8.5.9 Metodología del diseño de experimentos

Un diseño de experimentos implica decidir cuáles pruebas o tratamientos se van a realizar y cuantas repeticiones de cada uno se requieren, de tal forma que se obtenga la máxima información con los mínimos recursos. El arreglo formado por los distintos tratamientos que serán llevados a cabo, tomando en cuenta las repeticiones, recibe el nombre de matriz de diseño o diseño. Para ello hay considerar varias etapas, previas y posteriores a la ejecución para que un estudio experimental sea exitoso. En este sentido, la más importante etapa es la planeación del diseño experimental. A continuación, se presentan las pautas principales del desarrollo de un diseño de experimentos (34).

8.5.9.1 Reconocimiento y delimitación del problema

En esta etapa es conveniente realizar una lista de los problemas o preguntas específicas a abordarse en el experimento. La enunciación clara del problema ayuda a tener una mejor comprensión de los fenómenos bajo estudio y a encontrar la solución del problema, de tal manera que quede claro que se va a estudiar, la importancia del problema y la magnitud de este. En esta etapa se debe definir el objetivo principal, ya que en un experimento pueden existir demasiados objetivos. El objetivo debe tener ciertas características, debe ser establecidos a partir de perspectivas diversas, debe ser específico y debe ser medible (34).

8.5.9.2 Elección de los factores, niveles y rangos

Cuando un factor se considera que puede influir sobre la respuesta, el experimentador clasifica estos factores como factores potenciales del diseño o factores perturbadores. Estos factores son los que se desean varían en el experimento. En el diseño, es frecuente encontrarse con muchos factores potenciales, es por ello por lo que se deben ser clasificados adicionalmente como factores del diseño, factores que se mantienen constantes y factores que pueden variarse. Los factores que se mantienen constantes tienen un cierto efecto sobre la respuesta, pero no son de interés, por lo que se mantienen fijos. Los factores del diseño son los que se seleccionan para ser estudiados en el experimento. Cuando el experimentador ha seleccionado los factores del diseño a estudiar,



ANTECEDENTES

tiene que elegir los rangos en los que se variarán estos factores, de igual manera los niveles en los que se llevarán a cabo las corridas, como los controlará y como va a medirlos, para ello es indispensable el conocimiento del proceso. Resulta importante investigar todos los factores cuando se encuentra en las fases iniciales de la experimentación. En general, dos niveles brindan buena información en los estudios de tamizado de factores. En el tamizado de factores, el rango debe ser amplio. Conforme se conozcan las variables y niveles que afectan la respuesta, el rango se volverá más estrecho (34).

8.5.9.3 Elección de la variable de respuesta

La elección de la variable o variables de respuesta es de suma importancia, ya que ella el experimentador refleja el resultado de las pruebas. Suele ser de suma importancia identificar los aspectos relacionados con la definición de las respuestas de interés y como serán medidas antes de realizar el experimento. Con ello, se debe garantizar que los instrumentos y/o métodos de medición son capaces de repetir y reproducir una medición de manera precisa y exacta (34).

8.5.9.4 Selección del diseño experimental

Existen muchos diseños experimentales para poder estudiar los diversos problemas que ocurren en la práctica. La elección del diseño implica la consideración del tamaño de muestra, selección del orden de las corridas, las restricciones sobre la aleatorización, número de factores a estudiar, nivel de los factores, los efectos de interés, el costo, tiempo y precisión deseada. Al seleccionar el diseño adecuado, es importante considerar el objetivo global (34).

8.5.9.5 Realización del experimento

En esta parte de la experimentación es común la realización de pruebas iniciales o piloto. Se utilizan para estimar de manera preliminar la varianza del error experimental y afinar las técnicas experimentales. Cuando el experimento ya es llevado a cabo, se debe monitorear el proceso con el fin de asegurar que todo se está realizando conforme a la planeación, cualquier error podría hacer que el experimento pierda validez (34).



8.5.9.6 Análisis estadístico de los datos

En esta etapa se espera obtener resultados y conclusiones objetivas. En la actualidad, existen varios paquetes de software diseñados para auxiliar el análisis de datos. De la experimentación se desean resolver muchas preguntas, que se pueden insertar en el marco de la prueba de hipótesis. Un procedimiento confiable en la estadística inferencial es el llamado contraste de hipótesis. La técnica estadística central en el análisis de los experimentos es el llamado análisis de varianza ANOVA. Los métodos estadísticos agregarán una gran objetividad al proceso para la toma de decisiones. Estas técnicas estadísticas en conjunto con un buen conocimiento del proceso y además sentido común, llevarán a una conclusión sólida y objetiva (34).

8.5.9.7 Conclusiones y recomendaciones

Una vez analizados los datos, el experimentador debe obtener conclusiones objetivas de los resultados y recomendar un curso de acción. Es recomendable realizar corridas de seguimiento o pruebas de confirmación para validar las conclusiones del experimento. Los métodos gráficos suelen ser útiles en esta etapa para presentar los resultados. Para que el experimento sea exitoso, se requiere conocer los factores importantes, los rangos en los que se varían estos factores, el número apropiado de niveles y las unidades de medición de estas variables. En su mayoría, se aprenden sobre la marcha estas respuestas, a medida que avanza la experimentación, se incorporan, se abandonan o se modifican algunas variables de respuesta. Es por ello que la experimentación se realiza en forma secuencial (34).

8.6 Planificación de la experimentación

En el campo de la investigación y de la industria es común realizar experimentos o pruebas con el objetivo de resolver un problema o comprobar una hipótesis. El objetivo de llevar a cabo la experimentación es obtener información de calidad, que permita comprender mejor un sistema (3). Hay varias formas de realizar un experimento o pruebas, la primera es en base al ensayo y error, apelando a la experiencia y a la intuición, en vez de seguir un método que garantice una buena respuesta de las interrogantes medidas. La segunda



ANTECEDENTES

ocurre con el análisis de datos experimentales, donde se realiza un análisis informal en base a la intuición, ya que no es un análisis riguroso de toda la información obtenida. A pesar de esto, en ocasiones, se logran mejoras a pesar de que el experimento o prueba es en base a esto. Estas experimentaciones requieren mucho tiempo y muchos recursos. En ciertas situaciones, no es suficiente aplicar este tipo de experimentación, ya que el experimento requiere una forma eficaz que garantice la obtención de las respuestas a las interrogantes en un corto plazo y empleando los mínimos recursos (35).

8.7 Desarrollo de métodos bioanalíticos

8.7.1 Bioanálisis

Inicialmente, en la etapa de descubrimiento, el objetivo del bioanálisis podría ser simplemente proporcionar valores razonables de concentraciones y/o exposición que se usarían para formar una base científica para la identificación y/o discriminación entre varios candidatos principales. Por lo tanto, el objetivo del analista en esta etapa debe ser desarrollar un ensayo simple y rápido con un rendimiento significativo que actúe como una excelente herramienta de detección para informar algunos parámetros predefinidos de varios contendientes principales en todos los diversos andamios químicos (41).

El bioanálisis tiene un papel importante en el desarrollo de fármacos. Hoy en día, el bioanálisis es una parte esencial en la evaluación toxicológica y en los estudios farmacocinéticos y farmacodinámicos durante el desarrollo de fármacos. El desarrollo de métodos bioanalíticos es uno de los cuellos de botella para el desarrollo de fármacos. El procedimiento de bioanálisis incluye muestreo, preparación de muestras, análisis, calibración y evaluación e informes de datos (42).

En el bioanálisis moderno se requiere una buena preparación de la muestra y una instrumentación con guiones. En las empresas de investigación farmacéutica, el desarrollo de métodos bioanalíticos integrales es muy importante durante el proceso de descubrimiento y desarrollo de fármacos (42).



8.7.2 Métodos bioanalíticos

Para cumplir con los trámites de comercialización y de uso en humanos, los patrocinadores del desarrollo de nuevos medicamentos deben presentar estudios de farmacocinética (PK) incluyendo estudios de farmacología y toxicología no humana y estudios preclínicos, para tal fin es necesario desarrollar un método bioanalítico. Generalmente, los métodos bioanalíticos se desarrollan en matrices biológicas como sangre, suero, plasma u orina (43).

Antes del inicio del desarrollo del método bioanalítico, hay muchos puntos a considerar. Estos puntos son la estructura química del analito, el valor de pKa, las propiedades de solubilidad y estabilidad. El desarrollo de métodos bioanalíticos incluye dos secciones principales, preparación de muestras y separación y detección de muestras (43).

La medición de la concentración de un fármaco o fármacos en matrices biológicas (como suero, plasma, sangre, orina y saliva) es un importante aspecto para considerar en el desarrollo de productos medicinales (44). Antes del desarrollo de la metodología bioanalítica, el desarrollador debe comprender el analito de interés (propiedades fisicoquímicas del fármaco, unión a proteínas, etc.) y considerar aspectos de mayor prioridad que los que serán aplicados (45). La información obtenida de la medición de la concentración de fármaco o fármacos en la matriz biológica apoyará la aplicación de actividades subsecuentes, que darán sustento a la seguridad y eficacia del fármaco o fármacos de interés (44).

El propósito de el desarrollo de una metodología analítica es definir el diseño, condiciones de operación, limitaciones e idoneidad del método, para garantizar que el método esta optimizado para su validación. Esta metodología puede ser desarrollada mediante un diseño experimental, sin embargo, la experiencia previa, además de la bibliografía soportará esta metodología. Si el fármaco de interés será sometido a alguna entidad regulatoria, es necesario realizar una validación completa, pero si la metodología es exploratoria o con fines de investigación, puede no requerir una validación rigurosa (43).



8.7.3 Técnicas de extracción

La preparación de muestras es el paso más importante y crítico en el desarrollo y validación de métodos bioanalíticos. La tarea principal es eliminar las interferencias presentes en la muestra y hacer la muestra con la mayor concentración de analito, lo que contribuye a la sensibilidad del método (46).

8.7.3.1 Extracción de fase sólida

En la extracción en fase sólida, el reparto se produce entre la fase líquida y la sólida. La principal ventaja de SPE es eliminar las impurezas presentes en el analito, lo que ayuda a aumentar la sensibilidad del método. La eliminación de materia particulada del analito es un resultado importante de SPE. En SPE la recuperación de la muestra es mayor. Se emplea una pequeña columna o cartucho desechable para la división. El SPE consiste en una jeringa médica que está empaquetada con 0.1-0.5 g de sorbente, generalmente sílice C18. Se agregan muestras líquidas al cartucho y se selecciona el solvente de lavado para retener fuertemente o deshacer la retención del analito. Para minimizar la presencia de interferencias, este método es ventajoso. Aunque el analito quede retenido en el cartucho, las interferencias se pueden eluir o lavar, lo que da como resultado que el analito esté libre de interferencias. Luego, el analito se eluye con disolvente de elución y se inyecta directamente o se evapora hasta sequedad seguido de la dilución con la fase móvil de HPLC (46).

8.7.3.2 Precipitación de proteínas

La precipitación de proteínas es uno de los métodos para hacer que la matriz esté libre de interferencias. Esto se puede lograr mediante desnaturalización y precipitación. Varios disolventes orgánicos como metanol, acetonitrilo, acetona y etanol son la opción más amplia para eliminar las proteínas plasmáticas y son compatibles con la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) como fase móvil. Una parte de la matriz de la muestra se diluye con tres o cuatro partes del agente de precipitación y luego se lleva a cabo una mezcla con vórtice. Después de esa centrifugación, se realiza una filtración para eliminar la masa de proteína. El líquido sobrenadante o filtrado obtenido se analiza directamente para



ANTECEDENTES

el analito de interés. Para el análisis cuantitativo, el sobrenadante puede aislarse, evaporarse hasta sequedad y luego reconstituirse con un disolvente adecuado antes del análisis. En el método de precipitación de proteínas, el analito debe ser libremente soluble en el disolvente reconstituyente. Ya sea convirtiendo la proteína soluble a un estado insoluble que sal o por la adición de un solvente de precipitación miscible en agua o solventes orgánicos como acetona, etanol, acetonitrilo o metanol, esta técnica se puede lograr (46).



9.0 OBJETIVOS

9.1 Objetivo General

Desarrollar un método bioanalítico sensible y selectivo desde un enfoque de la calidad por diseño, aplicando el diseño de experimentos como herramienta para cuantificar la Casiopeina® III-Ea en plasma humano por medio de cromatografía de líquidos de alta resolución acoplado a un detector UV-VIS.

9.2 Objetivos Particulares

- Desarrollar un método bioanalítico optimizado con ayuda del diseño de experimentos aplicando los principios de la calidad por diseño por cromatografía de líquidos de alta resolución para cuantificar de Casiopeina® III-Ea en plasma humano.
- Definir los factores cromatográficos influyentes significativos para la cuantificación de Casiopeina® III-Ea en plasma humano por cromatografía de alta resolución.
- Obtener parámetros fisicoquímicos que permitan una correcta manipulación y futura investigación en modelos animales.



10.0 PARTE EXPERIMENTAL

10.1 Reactivos

- Estándar de Casiopeina[®] III-Ea, sintetizado por el Departamento de Química Inorgánica y Nuclear de la Facultad de Química de la UNAM de acuerdo con la patente correspondiente.
- Metanol grado HPLC, JT Baker.
- Fosfato monobásico de sodio, JT Baker.
- Fosfato dibásico de sodio, JT Baker.
- Cloruro de zinc, JT Baker.
- Hidróxido de sodio, JT Baker.
- Plasma humano proveniente de Medica Sur[®].
- Agua desionizada, procesada en el laboratorio de trabajo con el sistema Millipore con resistencia de 18 M Ω

10.2 Materiales, Equipos e Instrumentos

- Cromatógrafo de líquidos Agilent modelo 1100 series.
- Balanza analítica Sarttrourious.
- Centrífuga.
- Bortex.
- Desionizador de Agua Milli-Q, Millipore.
- Filtrador de disolventes Millipore
- Sonicador
- Concentrador Waters
- Cartuchos SPE Strata-X, Phenomenex, 33 μ m, 60 mg, 3cc.
- Viales ámbar, 1.5 mL



PARTE EXPERIMENTAL

- Insertos de plástico, 200 μ L
- Columna Cromatográfica Zorbax Eclipse Plus C18; 4.5x150 mm; 5 μ m, Agilent Technologies.
- Columna Cromatográfica Eclipse Plus C8; 4.6x150 mm; 3.5 μ m, Agilent Technologies.
- Pre-columna Eclipse Plus C8 4.6 x 12.5 mm; 5 μ m; Agilent Technologies.
- Extracción en fase sólida: Cartuchos SPE Strata-X, Phenomenex, 33 μ m, 60 mg, 3cc.
- Micropipeta BRAND 100-1000 μ L.
- Micropipeta BRAND 10-100 μ L
- Matraz volumétrico de 25.0 mL
- Matraz volumétrico de 50.0 mL

10.3 Preparación de soluciones

10.3.1 Solución stock de Casiopeina[®] III-Ea, 200 μ g/mL

Se pesó 10.0 mg de Casiopeina[®] III-Ea y se transfirió a un matraz volumétrico de 50.0 mL. Se colocó aproximadamente 20 mL de agua desionizada, se disolvió la Casiopeina[®] III-Ea y posteriormente se llevó al aforo con agua desionizada. La solución es almacenada en un frasco ambar en refrigeración.

10.3.2 Solución acuosa de Casiopeina[®] III-Ea, 10 μ g/mL

Se transfirieron 1.25 mL de la solución stock de Casiopeina[®] III-Ea 200 μ g/mL a un matraz volumétrico de 25.0 mL y se aforó con agua desionizada.

10.3.3 Plasma humano filtrado

El plasma humano fue proveniente de Medica Sur[®], el cual se filtró por medio de filtros Whatman[®] 40. Una vez filtrado, se transfirió a un frasco ambar y se mantuvo bajo refrigeración a temperatura entre 4-8°C.



10.3.4 Solución de Casiopeina® III-Ea en fluido biológico, 20 µg/mL

Se transfirieron 2.5 mL de la solución stock de Casiopeina® III-Ea a un matraz volumétrico de 25.0 mL. Se llevó al aforo con plasma humano. Esta solución se prepara el día de uso de esta.

10.3.5 FM solución amortiguadora de Fosfatos pH 6.8, 10 µM acuoso

En un matraz volumétrico de un 1000.0 mL, se agregó aproximadamente 0.3976 g de fosfato dibásico de sodio anhidro y 0.9934 g de fosfato monobásico de sodio anhidro en 200 mL de agua desionizada. Se disolvió y posteriormente se llevó al aforo con agua desionizada.

10.3.6 FM solución amortiguadora de Fosfatos pH 7.4, 10 µM acuoso

En un matraz volumétrico de un 1000.0 mL, se agregó aproximadamente 0.8657 g de fosfato dibásico de sodio anhidro y 0.6121 g de fosfato monobásico de sodio anhidro en 200 mL de agua desionizada. Se disolvió y posteriormente se llevó al aforo con agua desionizada.

10.3.7 Fase móvil: metanol.

Se filtró el Metanol grado HPLC JT, Baker, en filtros de 0.22 micras Millipore.

10.3.8 Solución de sulfato de zinc al 10% acuoso

Se pesó 10.0 g de sulfato de zinc y se disolvió en 50 mL de agua desionizada. Se transfirió a un matraz volumétrico de 100.0 mL. Se lleva al aforo con agua desionizada.

10.3.9 Solución de trabajo acuosa

Se transfirieron 1.25 mL de la solución stock de Casiopeina® 200 µg/mL en un matraz de 25.0 mL. Se llevó al aforo con agua desionizada.



10.4 Software especial

- Agilent ChemStation®
- Statgraphics Centurion 18®
- Minitab®

10.5 Estrategia de desarrollo de método bioanalítico y optimización

10.5.1 Muestra

La muestra se obtuvo del Estándar de Casiopeina® III-Ea, sintetizado por el Departamento de Química Inorgánica y Nuclear de la Facultad de Química de la UNAM de acuerdo con la patente correspondiente. La muestra se almacenó en un tubo Eppendorf de 2 mL sellado con papel Parafilm y envuelto en papel aluminio dentro de un desecador.

10.5.2 Medición de la muestra

La medición de la muestra de Casiopeina® III-Ea se realiza por Cromatografía de líquidos de alta resolución acoplado a un detector de UV-VIS, en donde las respuestas directas que obtenemos de este equipo son el área de los picos cromatográficos, el tiempo de retención de estos picos, la simetría y como respuesta indirecta se puede obtener la concentración de Casiopeina® III-Ea en la matriz.

10.5.2.1 Longitud de onda

Para obtener la longitud de onda se realiza un barrido en el espectrofotómetro de 200 a 400 nm de una muestra de Casiopeina® III-Ea de una concentración de 5 µg/mL. Para esto, se prepara la solución de 5 µg/mL a partir de la solución stock de 200 µg/mL. Se transfirieron 0.625 mL de la solución stock a un matraz volumétrico de 25.0 mL y se afora con agua destilada.

Una vez teniendo la solución de trabajo de 5 µg/mL, se toma 1 mL y se transfiere a una celda de cuarzo para su posterior lectura en el espectrofotómetro.



PARTE EXPERIMENTAL

En el espectrofotómetro, se selecciona la opción de barrido de 200 a 400 nm. A continuación, se añade el blanco, el cual es agua destilada y se realizó el barrido con la muestra recién preparada.

10.5.3 Estudio de estabilidad de la Casiopeina® III-Ea

Una vez encontrada la longitud de onda óptima a la cual se realizarán las lecturas de la Casiopeina® III-Ea por medio del espectrofotómetro, se realizó un pequeño estudio de estabilidad de la Casiopeina® III-Ea en agua destilada, solución salina y solución glucosada.

Estos estudios de estabilidad incluyeron diversos factores como lo es la temperatura alta, temperatura baja, presencia o limitación de luz.

La estabilidad se determinó a partir de la solución stock de 200 µg/mL, de la cual se transfirieron 0.625 mL a un matraz volumétrico de 25.0 mL y se aforó con solución salina isotónica, solución glucosada al 5% o agua destilada. Posteriormente fueron tomados 5 mL de cada una de las soluciones y transferidos a tubos de ensayo con tapón de rosca, este proceso se repitió hasta completar 4 tubos de ensayo con la muestra (4 de cada solución). Ya con las muestras en los tubos de ensayo, se sometieron a las siguientes condiciones:

Tabla III. Condiciones de estabilidad sometidas a la Casiopeina® III-Ea

Disolvente	Solución salina 0.9 %	Solución glucosada 5 %	Agua destilada
Condición	37°C	37°C	37°C
	4°C	4°C	4°C
	Presencia de luz	Presencia de luz	Presencia de luz
	Limitación de luz	Limitación de luz	Limitación de luz

La condición de 37°C se logró gracias a un baño de temperatura controlada, en el cual se colocaron los tubos de ensayo de cada solución. La temperatura fue de 4°C en el refrigerador con el que cuenta el laboratorio, el cual tiene un indicador digital de temperatura y tiene un control de temperatura. La ausencia o limitación de luz fue en condiciones de temperatura ambiente con los tubos cubiertos y no cubiertos con papel aluminio.



PARTE EXPERIMENTAL

Cuando las muestras se sometieron a las distintas condiciones, se tomaron muestras de 1 mL al tiempo 0, 24 horas y 48 horas después, las cuales se leyeron en celdas de cuarzo en el espectrofotómetro con la longitud de onda seleccionada del barrido.

Todo el proceso anterior fue realizado por triplicado para una obtención confiable de un tamaño de muestra representativo. Cabe señalar que en el laboratorio se llevó a cabo una validación de la metodología analítica para cuantificar Casiopeina® III-Ea en solución salina al 0.9% y solución glucosada al 5%, lo cual puede observarse en el anexo 1 y 2.

10.5.4 Extracción de la Casiopeina® III-Ea de la matriz

La extracción de la Casiopeina® III-Ea fue limitada a los recursos del laboratorio a 2 procesos simples:

a) Extracción en fase sólida

La extracción de la Casiopeina® III-Ea por fase sólida se llevó a cabo mediante los cartuchos SPE Strata-X, Phenomenex, 33 μm , 60 mg, 3cc, debido a la naturaleza de la Casiopeina® III-Ea y a las condiciones del diseño, el objetivo es trabajar en fase reversa en el HPLC. Estos cartuchos contienen una fase sólida polimérica que permite la extracción de Casiopeina® III-Ea.

Para la extracción, se siguieron las recomendaciones del fabricante, las cuales se detallan a continuación:

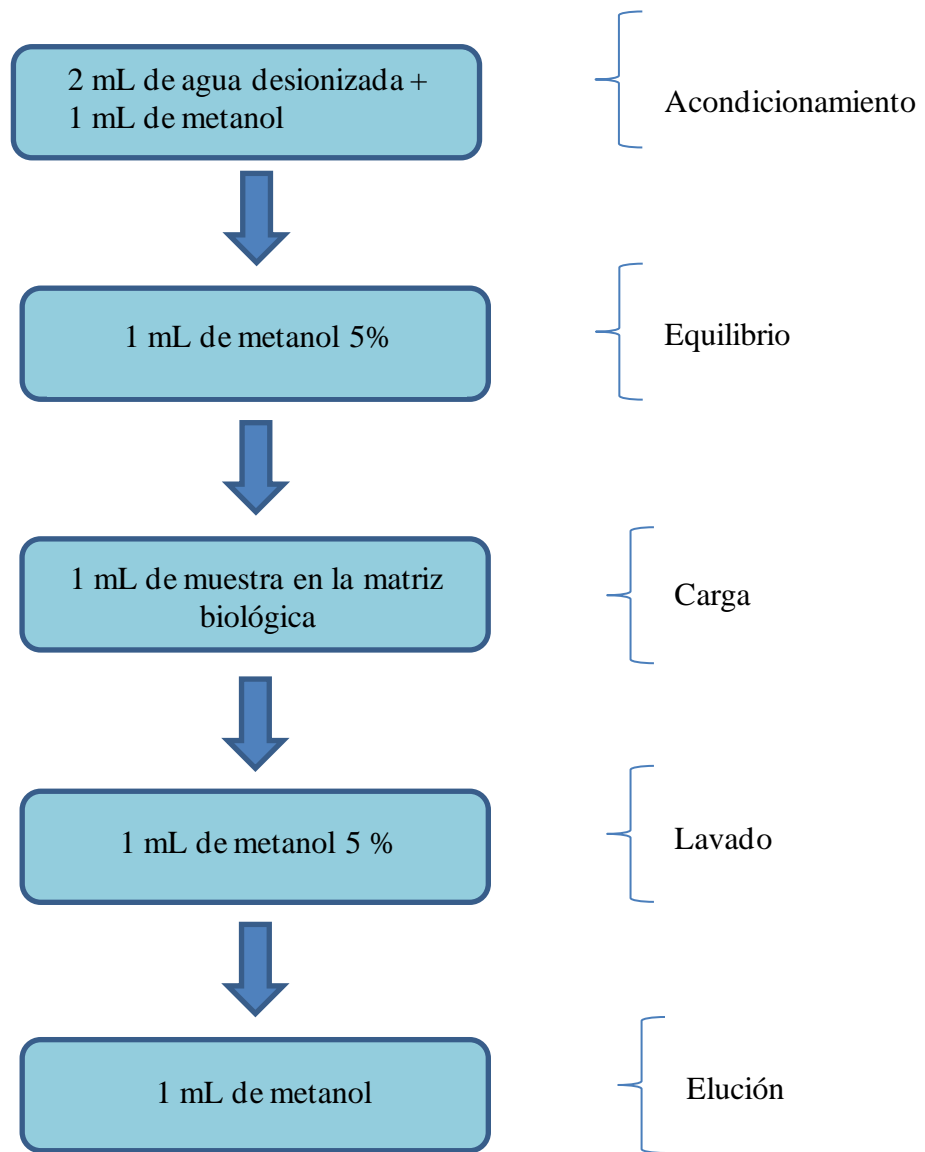


Figura VII. Proceso para la extracción en cartuchos SPE Strata-X, Phenomenex.

b) Precipitación de proteínas

La precipitación de proteínas fue un proceso sencillo en el cual la extracción de la Casiopeina® de la matriz biológica por precipitación de proteínas fue realizada por medio de una técnica previamente reportada (I. Fuentes, 2005), la cual fue empleada para la precipitación de proteínas. Se trató de optimizar esta técnica, cambiando las condiciones, las cuales se describen a continuación:



Tabla IV. Condiciones de la precipitación de proteínas

Numero de experimento	Precipitante 1	Precipitante 2	Volumen adicionado de Precipitante 1	Volumen adicionado de Precipitante 2	Volumen de muestra en matriz biológica
1	Metanol	ZnSO ₄	400 µL	100 µL	500 µL
2	Metanol	ZnSO ₄	600 µL	100 µL	500 µL
3	Metanol	-	500 µL	-	500 µL
4	Acetonitrilo	ZnSO ₄	400 µL	100 µL	500 µL
5	Acetonitrilo	ZnSO ₄	600 µL	100 µL	500 µL
6	Acetonitrilo	-	500 µL	-	500 µL



La técnica de extracción utilizada se resume a continuación:

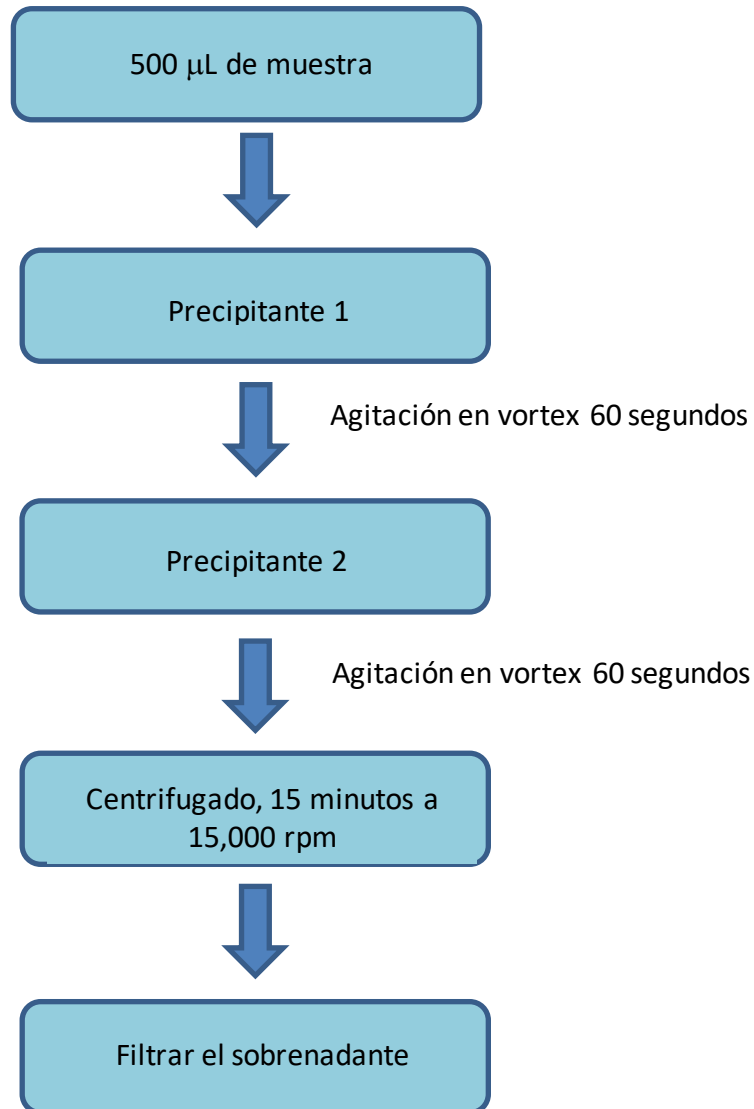


Figura VIII. Proceso de extracción por precipitación de proteínas.

10.5.5 Protocolo de calidad analítica por diseño (AQbD)

10.5.5.1 Perfil analítico del objetivo (ATP)

El ATP fue planteado con base en el objetivo principal de este proyecto, el cual es la base de toda esta experimentación. Este objetivo se enunció con ciertas características, las cuales son que es un objetivo específico y medible. Este objetivo fue elaborado tomando en cuenta todos los recursos disponibles, como lo fue material, equipo, molécula, recursos económicos, tiempo, calidad, etc.



PARTE EXPERIMENTAL

Es este punto se establecieron las características de la metodología a alcanzar, que incluyen características de desempeño deseadas para el método. Para esto, se consideró como características de desempeño las siguientes condiciones:

- Tiempo de las corridas analíticas en el cromatógrafo de alta resolución.
- Interferencias del pico cromatográfico de Casiopeina® III-Ea
- Selectividad y sensibilidad correspondiente a la Casiopeina® III-Ea.
- Eficiencia en recursos y disminución de residuos tóxicos.

10.5.5.2 Atributos críticos de calidad (CQA) / Características de rendimiento del método analítico (AMPC)

La identificación de las características de rendimiento del método analítico fue definida por medio de un análisis de riesgos posterior a la realización de un estudio piloto.

10.5.5.2.1 Estudio piloto

El estudio piloto fue llevado a cabo utilizando la Casiopeina® III-Ea como analito de interés disuelta en agua desionizada para su medición en HPLC acoplado a UV-Vis y para este estudio se empleó un diseño factorial fraccionado. Se preparó una solución de Casiopeina® III-Ea en agua desionizada a una concentración de 10 µm, se filtró por medio de las membranas de nylon de 0.45 µm y se depositó en los viales correspondientes. La muestra fue preparada por triplicado para cada corrida, obteniendo así 3 lecturas de muestras independientes.

Las condiciones y las respuestas fueron definidas por medio de la búsqueda en la literatura científica y trabajos de investigación sobre la cuantificación de los demás compuestos pertenecientes a la familia de Casiopeinas®.

10.5.5.2.2 Análisis inicial del riesgo

Una vez realizado el estudio piloto, lo siguiente fue establecer los factores controlables y no controlables del proceso de cuantificación de la Casiopeina® III-Ea por medio del HPLC



PARTE EXPERIMENTAL

UV-Vis. Definidos estos factores, se definieron las características de rendimiento del método analítico y los parámetros críticos del proceso.

Este análisis fue llevado a cabo por medio de la aplicación de una de las herramientas de la calidad, el diagrama de Ishikawa o de espina de pescado.

10.5.5.3 Parámetros críticos del proceso (CPP)

Al igual que las características de rendimiento del método analítico, los parámetros críticos del proceso fueron definidos posterior a la realización de las pruebas piloto y después de la aplicación del análisis de riesgos.

10.5.5.4 Selección del DoE experimental

Cuando el objetivo, los factores, niveles y variable de respuesta se establecen, la selección del diseño experimental es el siguiente paso. La selección del diseño dependió de diversas circunstancias como lo fue el tamaño de muestra, número de factores, niveles de los factores y principalmente el costo de realización del experimento y no menos importante, el tiempo invertido en la experimentación.

10.5.5.4.1 Realización del experimento

En esta parte, antes de comenzar con la realización del experimento, se trató de disminuir el sesgo aleatorizando las corridas, para ello se empleó el software Statgraphics centurion® 18. La realización del experimento se planteó con ejecución de pruebas iniciales o pruebas piloto, esto con el objetivo de disminuir la probabilidad de errores durante la experimentación que permitiera controlarlos, además de existir la posibilidad de cambiar los factores, niveles, respuestas, etc.

Cuando las pruebas piloto fueron finalizadas, lo siguiente fue la realización del experimento que permitiera cumplir con el objetivo principal del experimento.



10.5.5.5 Espacio de diseño (DS)

En este punto se llevó a cabo la elección del espacio de diseño operable, formado por los rangos de los factores utilizados durante el desarrollo del método. Estos valores fueron procesados por medio del software Statgraphics®, con lo cual se definió la región operable, así como las condiciones óptimas para tener una mejor respuesta.

10.5.5.6 Implementación de la estrategia de control y mejora continua

La estrategia de control se implementó con base a los CMA y CPP que están dentro de los límites esperados. Por lo tanto, los controles del método se establecerán en función de los datos experimentales de CQA, DoE y MODR para garantizar un vínculo más sólido entre el propósito del método y el rendimiento.



11.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

11.1 Estrategia de desarrollo del método bioanalítico y optimización

11.1.1 Muestra

11.1.1.1 Medición de la muestra

11.1.1.1.1 Longitud de onda óptima

Se obtuvo el espectro de absorción de la molécula mediante una disolución de Casiopeina® III-Ea de 5 µg/mL en agua destilada con un barrido de 200 a 400 nm, en el cual se encontró que la Casiopeina® III-Ea, tiene un máximo pico de absorción en 209 nm y 273 nm, siendo 273 nm la longitud de onda seleccionada para realizar el estudio, debido a que la reproducibilidad del pico fue más constante en comparación del pico de 209 nm.

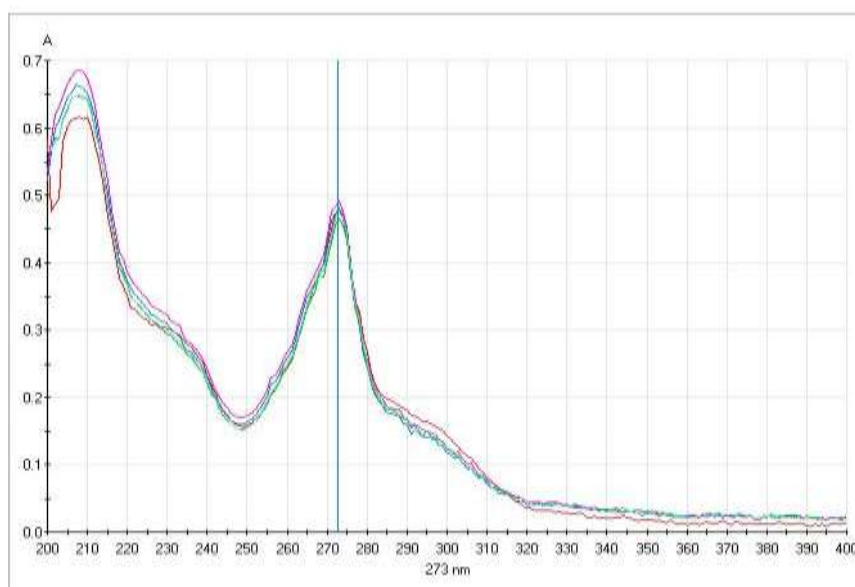


Figura IX. Espectro de absorción en UV-VIS de Casiopeina® III-Ea.

Una vez seleccionada la longitud de onda a la cual se medirá la respuesta, se desarrolló el método para su cuantificación por HPLC mediante el detector de UV-VIS ajustado a 273 nm para lograr una detección más sensible de Casiopeina® III-Ea.

11.1.1.2 Estabilidad de la Casiopeina® III-Ea

Antes de comenzar la experimentación, se consideró necesario realizar un pequeño estudio piloto de estabilidad de la Casiopeina® que permitiera conocer las condiciones de almacenamiento y tratamiento de la Casiopeina® III-Ea.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN



La estabilidad de la Casiopeina® III-Ea se determinó a cuatro condiciones, temperatura de 4 °C, temperatura de 37 °C y a temperatura ambiente en ausencia o presencia de luz (Tabla V). Los resultados de la absorbancia de las muestras de Casiopeina® II-Ea en las distintas soluciones se muestran en la siguiente tabla:

Tabla V. Estabilidad de Casiopeina® III-Ea en diferentes condiciones.

Tiempo	Condición	Solución salina 0.9 %	Solución glucosada 5 %	Agua destilada
Inicio	37°C	0.511	0.506	0.503
		0.515	0.499	0.509
		0.516	0.505	0.501
	4°C	0.517	0.497	0.504
		0.518	0.500	0.502
		0.520	0.491	0.512
	Presencia de luz	0.516	0.506	0.500
		0.513	0.501	0.508
		0.517	0.511	0.503
	Limitación de luz	0.521	0.502	0.504
		0.515	0.519	0.506
		0.522	0.507	0.501
24 h	37°C	0.482	0.462	0.459
		0.487	0.464	0.462
		0.484	0.462	0.455
	4°C	0.502	0.487	0.487
		0.505	0.492	0.480
		0.506	0.482	0.489
	Presencia de luz	0.499	0.475	0.472
		0.495	0.472	0.476
		0.496	0.478	0.473
	Limitación de luz	0.517	0.493	0.495
		0.512	0.505	0.492
		0.514	0.497	0.493
48 h	37°C	0.441	0.415	0.419



		0.432	0.421	0.413
		0.438	0.412	0.416
	4°C	0.502	0.478	0.480
		0.505	0.482	0.472
		0.506	0.473	0.477
	Presencia de luz	0.465	0.459	0.460
		0.469	0.465	0.466
		0.461	0.468	0.467
	Limitación de luz	0.502	0.487	0.488
		0.499	0.496	0.485
		0.505	0.484	0.487

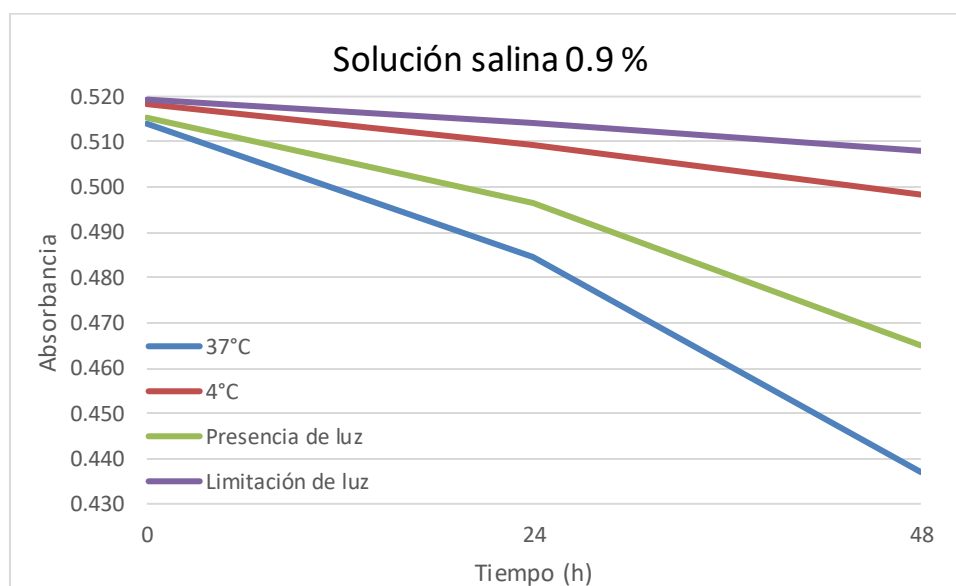


Figura X. Estabilidad de Casiopeina® III-Ea en solución salina 0.9%.

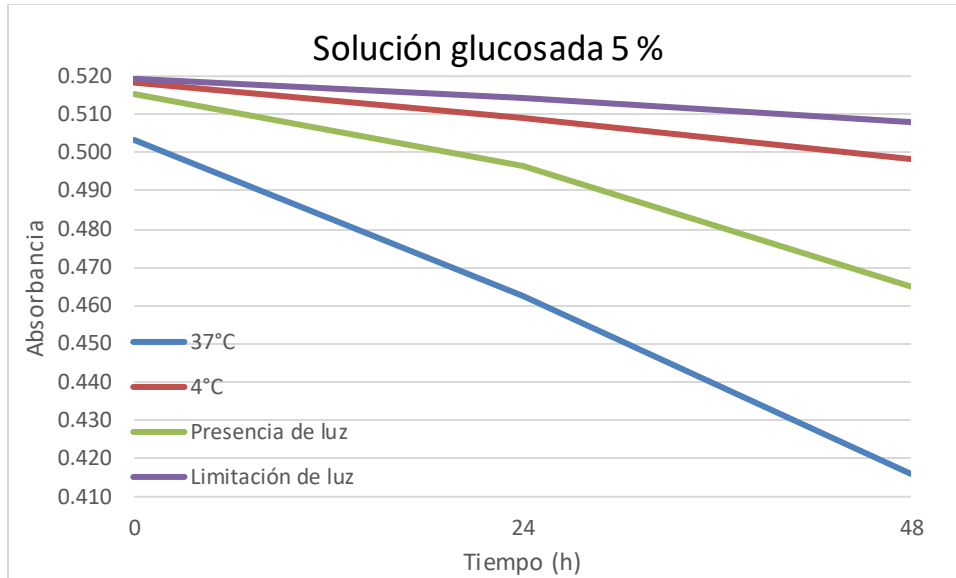


Figura XI. Estabilidad de Casiopeina® III-Ea en solución glucosada 5%.

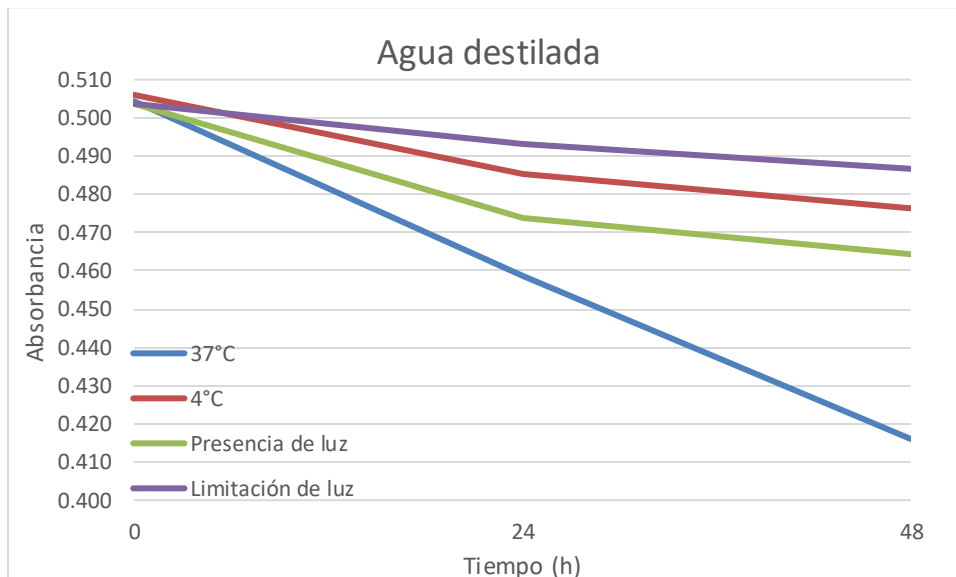


Figura XII. Estabilidad de Casiopeina® III-Ea en agua destilada.

Como puede observarse, la estabilidad de la Casiopeina® III-Ea se vio afectada por la temperatura y la presencia de luz. A continuación, se realizó el cálculo de t90 para cada condición, se calculó inicialmente el remanente de Casiopeina® III-Ea en cada condición y posteriormente se calculó el orden de reacción de la descomposición de la Casiopeina® III-

RESULTADOS Y DISCUSIÓN



Ea en SS 0.9%, SG 5% y AD. El orden de la reacción de degradación se determinó por el método de integración, el cual consistió en medir la concentración de la Casiopeina® III-Ea a diferentes intervalos de tiempo y sustituir los resultados en las siguientes ecuaciones:

- $[A] = -kt + [A]_0$: Orden cero.
- $\ln[A] = -kt + \ln[A]_0$: Primer orden.
- $\frac{1}{[A]} = kt + \frac{1}{[A]_0}$: Segundo orden.

La ecuación que mantuvo más constante el valor de la constante de rapidez durante la serie de intervalos es la que mejor corresponde al orden correcto de la reacción.

Tabla VI. Remanente de Casiopeina® III-Ea.

Tiempo (h)	Medio	37°C	4°C	PL	LL
0	SS 0.9%	100%	100%	100%	100%
	SG 5%	100%	100%	100%	100%
	AD	100%	100%	100%	100%
24	SS 0.9%	94%	98%	96%	99%
	SG 5%	92%	98%	94%	98%
	AD	91%	96%	94%	98%
48	SS 0.9%	85%	96%	90%	98%
	SG 5%	83%	96%	92%	97%
	AD	82%	94%	92%	97%

SS: Solución salina; SG: Solución glucosada; AD: Agua destilada; PL: Presencia de luz; LL: Limitación de luz.

La cinética calculada para cada una de las condiciones fue de orden cero, a continuación, se presenta un ejemplo del cálculo del orden de la reacción de degradación en SS 0.9% a 37°C.

t (h)= 0, 24 y 48.

(%)= 100, 98, 96

Cinética de orden cero: R² calculado en excel = 0.9827

Cinética de orden uno: R² calculado en excel = 0.9767



Cinética de orden dos: R^2 calculado en excel = 0.9699

Posteriormente se realizó el cálculo del t90 de degradación de la Casiopeina® III-Ea que se presenta a continuación:

Tabla VII. Estimación del t90 de degradación de Casiopeina® III-Ea.

Tiempo	Condición	SS 0.9%	SG 5%	AD
t90	37°C	32 h	27 h	27 h
	4°C	124 h	113 h	81 h
	Presencia de luz	49 h	57 h	61 h
	Limitación de luz	219 h	142 h	143 h

Como puede observarse en los resultados, la Casiopeina® III-Ea fue más estable en condiciones de limitación de luz y a una temperatura baja. Al comparar los resultados en las gráficas XII, XIII y XIV, se puede observar que todas presentan las mismas tendencias, y presentan el mismo comportamiento. Esto indica que el principal mecanismo de degradación de la Casiopeina® III-Ea es el de la temperatura, estos, es bien conocido debido a que la mayoría de los compuestos químicos presentan un incremento en la velocidad de degradación en relación con el incremento de la temperatura. En todos los casos, al incrementar la temperatura a 37°C, el t90 (tiempo en el que se alcanza el 90 % de la concentración) disminuye drásticamente a comparación de las demás condiciones. Otro mecanismo de degradación que presentó la Casiopeina® III-Ea es el de fotodegradación. La luz proveniente de la radiación solar comprende diferentes longitudes de onda, que inicia desde el infrarrojo (> 700 nm) y termina en el ultravioleta (>400 nm) a la cual se le asocia una energía (170-390 390 kJ·mol⁻¹), por lo que es de esperarse que la energía de la radiación UV rompa enlaces C-H (energía de enlace de 340 kJ·mol⁻¹). Lo que provoca una especie excitada e inestable de Casiopeina® III-Ea en la disolución.

Como puede observarse, en la tabla del cálculo del t90, las condiciones de almacenamiento de la Casiopeina® III-Ea deben ser en ausencia de luz y a temperatura baja, por lo que, para comenzar con la experimentación, se preparó el material necesario para su almacenamiento correcto.



11.1.1.3 Extracción de la Casiopeina® III-Ea del fluido biológico

Para poder continuar con la experimentación, se realizaron estudios de extracción de la Casiopeina® III-Ea de la matriz biológica que permitieran tener con mayor pureza a la Casiopeina® III-Ea para que pudiera ser medida eficazmente en el detector del HPLC. Para ello se emplearon 2 metodologías: extracción en fase sólida y precipitación de proteínas.

a) Extracción en fase sólida

La extracción en fase sólida se llevó a cabo por medio de cartuchos Phenomenex® Strata - X de acuerdo con la figura VIII, con la cual se siguió todas las recomendaciones del fabricante. Estos cartuchos fueron seleccionados debido a que poseen un adsorbente polimérico funcionalizado de fase inversa que proporciona una fuerte retención de compuestos neutros, ácidos o básicos en condiciones de lavado altamente orgánico y agresivas. Este adsorbente se basa en 3 mecanismos de retención: enlace pi-pi, enlace de hidrógeno (interacciones dipolo-dipolo) e interacción hidrofóbica.

De acuerdo con estudios previos, se conoce que la Casiopeina® III-Ea es una base débil y de acuerdo con su estructura (cuyo ácido conjugado es la sal nitrato de Casiopeina®), puede sufrir interacciones débiles, tipo dipolo-dipolo (puentes de hidrógeno), por lo que la elección de este tipo de cartucho facilitó su extracción de la matriz biológica. No obstante, es una metodología compleja y costosa, que requiere de una amplia experiencia el poder realizar los tratamientos.

En este caso, la metodología no se modificó ni fue alterada, debido a que la metodología del fabricante ya ha sido probada y validada por el mismo fabricante.

b) Precipitación de proteínas

La precipitación de proteínas se llevó a cabo con las condiciones descritas en la tabla V y con la metodología de la figura 9. Los resultados, más que evaluados de forma cuantitativa, fueron evaluados de forma cualitativa, siendo +++ el resultado visual con mayor turbidez y + el de menor turbidez.



Tabla VIII. Resultados de extracción por precipitación de proteínas.

Numero de experimento	Precipitante 1	Precipitante 2	Volumen adicionado de Precipitante 1	Volumen adicionado de Precipitante 2	Volumen de muestra en matriz biológica	Resultado visual
1	Metanol	ZnSO ₄	400 µL	100 µL	500 µL	+
2	Metanol	ZnSO ₄	600 µL	100 µL	500 µL	++
3	Metanol	-	500 µL	-	500 µL	+++
4	Acetonitrilo	ZnSO ₄	400 µL	100 µL	500 µL	+++
5	Acetonitrilo	ZnSO ₄	600 µL	100 µL	500 µL	++
6	Acetonitrilo	-	500 µL	-	500 µL	+++

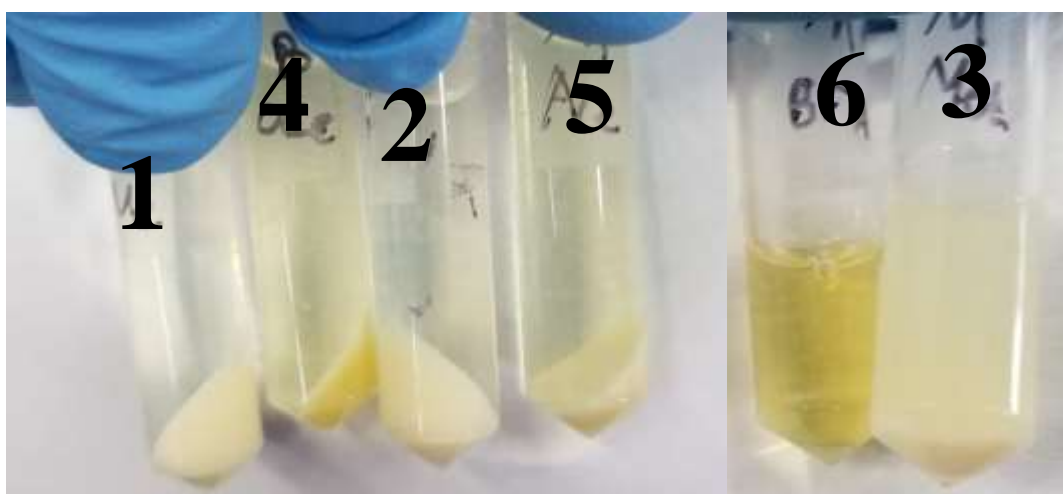


Figura XIII. Resultado visual del proceso de extracción por precipitación de proteínas.

Con los resultados obtenidos, se prefirió continuar con la metodología reportada por Fuentes, 2005. Debido a que está técnica empleando el metanol y sulfato de zinc a esas proporciones, permitió una menor turbidez, lo que permite pasar con facilidad el filtro de nylon de 0.45 µm y así evitar generar un gasto extra en cuanto a este filtro, ya que, al intentar filtrar las demás muestras, los filtros se tapaban con facilidad, generando un consumo mayor en el número de filtros.



11.1.2 Aplicación del protocolo de calidad analítica por diseño

11.1.2.1 Selección del perfil analítico del objetivo (ATP)

La selección del ATP fue delimitado y enfocado a el objetivo principal de la experimentación. El problema de esta experimentación fue desarrollar una metodología que permitiera cuantificar la Casiopeina® III-Ea en fluido biológico en un intervalo útil que posibilite estudios de farmacocinética futuros por medio de cromatografía de líquido de alta resolución acoplada a un detector de UV-VIS. Para cumplir con esto, se plantearon las siguientes declaraciones, en las que se consideró lo que debe medirse, en qué debe medirse, cuándo y porqué debe medirse y el valor objetivo:

- Tiempo de la corrida analítica por muestra en el cromatógrafo de líquidos de alta resolución para una mayor optimización de tiempo y recursos, así como el aseguramiento de la estabilidad de la muestra que sea menor a 10 minutos.
- Resolución del pico cromatográfico correspondiente a Casiopeina® III-Ea como respuesta proporcionada por el cromatógrafo de líquidos de alta resolución al final de la corrida analítica como indicador de interferencia del pico cromatográfico mayor a 1.5.
- Área del pico cromatográfico correspondiente a Casiopeina® III-Ea proporcionada por el cromatógrafo de líquidos de alta resolución al final de la corrida analítica como un indicador de sensibilidad que pueda ser cuantificable.

11.1.2.2 Atributos críticos de calidad (CQA) / Características de rendimiento del método analítico (AMPC)

La identificación de las características de rendimiento del método analítico fue el siguiente paso, las cuales fueron definidas para cumplir con los ATP. En este sentido, al no existir información previa del desarrollo de una metodología de cuantificación de Casiopeina® III-Ea en una matriz biológica, específicamente, plasma humano, tanto las AMPC/CQA como los CPP, se desconocen, por lo que se realizó un pequeño estudio piloto de cuantificación de la Casiopeina® en agua desionizada para poder realizar la primera evaluación de riesgos del proceso. Así como definir qué tipo de diseño experimental se podrá aplicar y conocer



más sobre el proceso. No obstante, derivado de las características del equipo a emplear, las AMPC/CQA empleadas fueron área y tiempo de retención del pico cromatográfico correspondiente a la Casiopeina® III-Ea.

11.1.2.2.1 Estudio piloto

Previo a realizar la experimentación, se decidió realizar un pequeño estudio piloto que permitiera comprender las necesidades de material, equipos a emplear, cantidad de reactivos a utilizar, sensibilidad del equipo, capacitación del operador y organización del tiempo en función de la estabilidad de la Casiopeina® III-Ea.

Este estudio se realizó con la Casiopeina® III-Ea disuelta en agua desionizada a una concentración de 10 µg/mL. Para este estudio se tomó en cuenta lo siguiente:

- Los factores de la metodología de extracción y volumen de inyección no fueron incluidos en este estudio, debido a que el analito se encontraba en agua desionizada y el volumen de inyección no fue relevante en esta etapa de aprendizaje.
- El objetivo del estudio piloto fue el de aportar a la experiencia sobre el uso y manejo de la Casiopeina® III-Ea, equipo e instrumentos, además de proporcionar una metodología que permita cuantificarla en agua desionizada para estudios posteriores.
- Se consideró la estabilidad de la Casiopeina® III-Ea, por lo que este experimento se realizó empleando la misma muestra, así estas pruebas piloto tuvieron una duración de 2 días.
- Para la selección del diseño experimental, se decidió comenzar con un diseño factorial fraccionado 2^{5-1} con 2 réplicas, es decir, 48 corridas aleatorizadas para la optimización de tiempo y recursos.
- El diseño se aleatorizó por medio del software estadístico, sin embargo, los resultados se presentan de forma ordenada.
- Debido a que el analito se encuentra en estado “puro”, se decidió tener como respuestas al área del pico y el tiempo de retención.



- Los factores, así como los niveles, fueron seleccionados de diversas fuentes bibliográficas, en donde se cuantifica a las diferentes Casiopeinas® por medio de cromatografía de líquidos de alta resolución, concluyendo que se tomarán en cuenta los factores de la tabla X.

Tabla IX. Factores considerados para el diseño en medio acuoso

Factor	Valor bajo (-)	Valor alto (-)
pH de la fase móvil	6.8	7.4
Proporción de fase orgánica	35 %	65 %
Columna	C18	C8
Flujo	0.5 mL/min	1.0 mL/min
Temperatura de la columna	25 °C	30 °C

Una vez teniendo en cuenta la información previa, se procedió a realizar la experimentación. Se prepararon las muestras y se inyectaron al cromatógrafo de líquidos de alta resolución acoplado a un detector UV-Vis. De este modo se obtuvieron los siguientes resultados presentados en la tabla XI.



Tabla X. Diseño factorial 2⁵⁻¹ de Casiopeina® III-Ea en medio acuoso.

Factores					Respuestas					
Proporción de FO	pH de la FM	Columna	Velocidad de Flujo	Temperatura de la columna	Área 1	Área 2	Área 3	Tr 1	Tr 2	Tr 3
40	6.7	C8	0.5	30	221.9	218	231.2	5.7	5.7	5.7
60	6.7	C8	0.5	25	333.8	327.9	289.6	4.3	4.3	4.3
40	7.4	C8	0.5	25	244.4	235.7	235.8	5.6	5.6	5.6
60	7.4	C8	0.5	30	396.2	405	400	4.1	4.1	4.1
40	6.7	C18	0.5	25	249.1	256	249.2	5.1	5.1	5.1
60	6.7	C18	0.5	30	393.2	395.8	381.2	3.3	3.9	3.9
40	7.4	C18	0.5	30	248.5	259	251.8	5.0	5.0	5.0
60	7.4	C18	0.5	25	385.8	396.8	384.9	3.9	3.9	3.9
40	6.7	C8	1	25	104.1	112.9	107.3	2.8	2.8	2.8
60	6.7	C8	1	30	188.5	196.1	191.7	2.1	2.1	2.1
40	7.4	C8	1	30	128.1	134.3	125.7	2.7	2.7	2.7
60	7.4	C8	1	25	206.8	209.9	203.2	2.1	2.1	2.1
40	6.7	C18	1	30	128.8	130.1	126.9	2.5	2.5	2.5
60	6.7	C18	1	25	236.7	240.1	238.8	2.0	1.9	1.9
40	7.4	C18	1	25	124.3	127.7	124.7	2.5	2.5	2.6
60	7.4	C18	1	30	206.0	208.6	203.7	1.9	1.9	1.9

Tr= Tiempo de retención; FO= Fase orgánica; FM= Fase móvil

RESULTADOS Y DISCUSIÓN



A continuación, se realizó el análisis estadístico, en donde se muestra el análisis de variancia y el diagrama de Pareto, en donde se observa que hay efecto de los factores estudiados en las respuestas de tiempo de retención y área del pico cromatográfico de Casiopeina® III-Ea en agua desionizada.

Tabla XI. Análisis de Varianza para Tiempo de retención

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: Proporción de la FO	11.702	1	11.702	1478.1	<0.05
B: pH de la FM	0.017	1	0.017	2.1	0.154
C: Columna	1.505	1	1.505	190.1	<0.05
D: Velocidad de flujo	66.505	1	66.505	8400.7	<0.05
E: Temperatura de la columna	0.060	1	0.060	7.6	<0.05
AB	0.010	1	0.010	1.3	0.265
AC	0.047	1	0.047	5.9	0.021
AD	1.577	1	1.577	199.2	<0.05
AE	0.017	1	0.017	2.1	0.154
BC	0.047	1	0.047	5.9	0.021
BD	0.002	1	0.002	0.2	0.630
BE	0.017	1	0.017	2.1	0.154
CD	0.255	1	0.255	32.2	<0.05
CE	0.005	1	0.005	0.7	0.423
DE	0.010	1	0.010	1.3	0.265
Error total	0.253	32	0.008	-	-
Total (corr.)	82.030	47	-	-	-

Tr= Tiempo de retención; FO= Fase orgánica; FM= Fase móvil

El análisis de variancia demostró que los factores de proporción de la fase orgánica, tipo de columna, velocidad de flujo y temperatura de la columna tienen un efecto estadísticamente significativo con un 95% de confianza (color verde) sobre el tiempo de retención. El pH de la fase móvil demostró no tener un efecto significativo sobre el tiempo de retención, ya



que como se muestra en la tabla, tiene un valor-P mayor a 0.05, por lo que no afecta el tiempo de retención en el intervalo de pH de 6.8 a 7.4.

En el diagrama de Pareto se puede observar estas mismas aseveraciones sobre la significancia estadística de los factores que afectan el tiempo de retención.

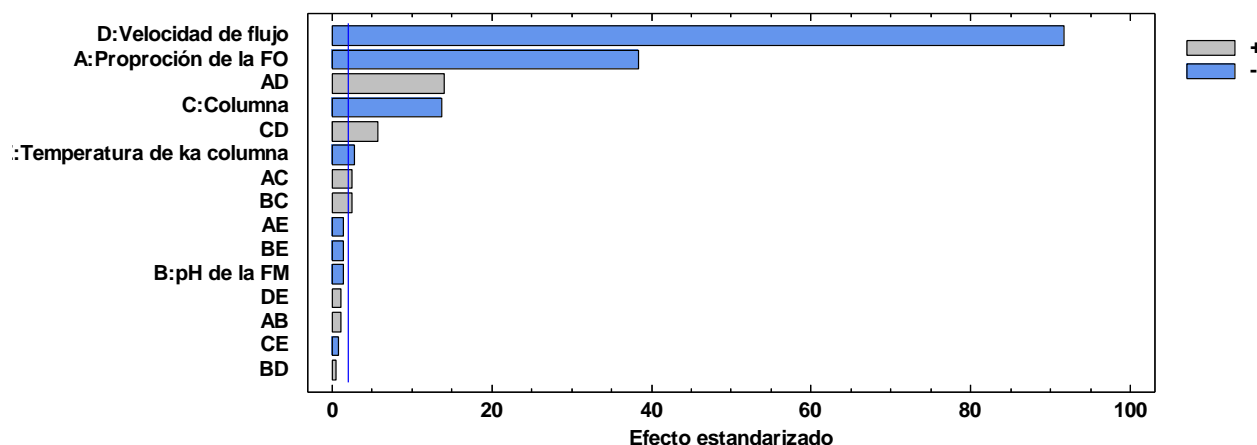


Figura XIV. Diagrama de Pareto estandarizado para tiempo de retención

Como se observa en el diagrama de Pareto y en análisis de varianza, el pH no tiene un efecto significativo sobre el tiempo de retención, aunque el pH modifica la naturaleza de la fase móvil, no es un factor que estadísticamente afecte el tiempo de retención como lo es el tipo de columna o la temperatura de la columna. El pH de la fase móvil es un parámetro importante, principalmente en compuestos iónicos que se disocian más a ciertos valores de pH. El pH de las fases móviles se suele controlar para estabilizar la retención y la resolución. Al ser el pKa de la Casiopeina[®] de III-EA de 5.01 y al ser una base débil, a los valores de pH de 6.8 y 7.4 (pH cercano al fisiológico), la Casiopeina[®] III-Ea se encontrará débilmente ionizado en ambos pH. El fabricante de las columnas sugiere mantener el pH de la fase móvil por lo menos a 1 unidad arriba del pKa, es por ello por lo que, se seleccionó este tipo de pH en la fase móvil. Por lo tanto, el pH de la fase móvil no tuvo efecto sobre el tiempo de retención, no obstante, el pH se debe controlar para obtener resultados reproducibles.



En cuanto al análisis de varianza del área, se presenta a continuación:

Tabla XII. Análisis de Varianza para Área

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: Proporción de la FO	145728.000	1	145728.000	3068.1	<0.05
B: pH de la FM	1850.080	1	1850.080	39.0	<0.05
C: Columna	5200.000	1	5200.000	109.5	<0.05
D: Velocidad de flujo	238826.000	1	238826.000	5028.1	<0.05
E: Temperatura de ka columna	436.813	1	436.813	9.2	<0.05
AB	165.021	1	165.021	3.5	0.072
AC	445.301	1	445.301	9.4	<0.05
AD	5949.650	1	5949.650	125.3	<0.05
AE	128.707	1	128.707	2.7	0.110
BC	5338.300	1	5338.300	112.4	<0.05
BD	1825.330	1	1825.330	38.4	<0.05
BE	17.521	1	17.521	0.4	0.548
CD	320.333	1	320.333	6.7	<0.05
CE	1948.200	1	1948.200	41.0	<0.05
DE	1642.680	1	1642.680	34.6	<0.05
bloques	366.391	2	183.196	3.9	<0.05
Error total	1424.940	30	47.498		
Total (corr.)	411614.000	47			

Tr= Tiempo de retención; FO= Fase orgánica; FM= Fase móvil

Como puede observarse, todos los factores muestran una respuesta significativa, por lo que, deben de ser considerados y estudiados en la experimentación de la Casiopeina® III-Ea en fluido biológico. Esto es confirmado en el diagrama de Pareto que se muestra a continuación:

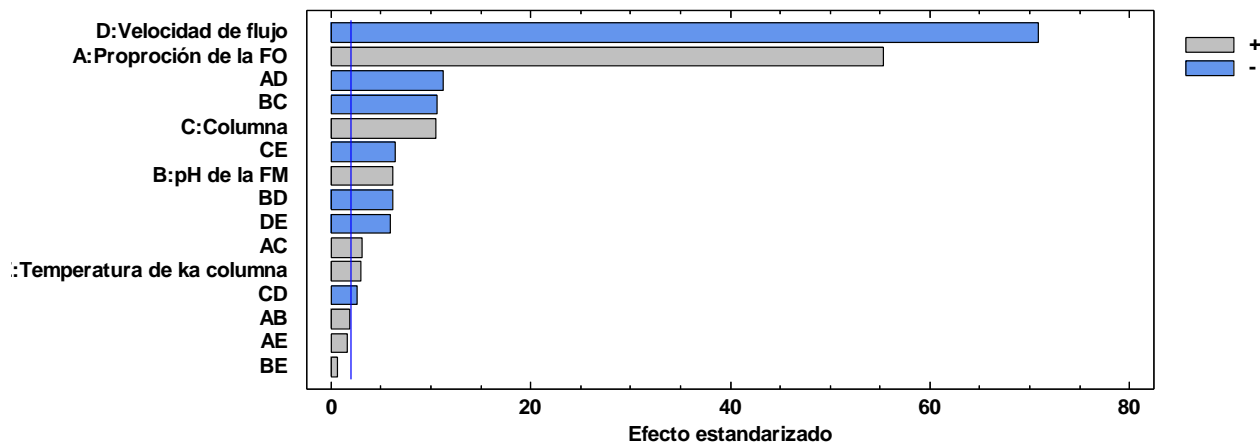


Figura XV. Diagrama de Pareto estandarizado para área

Para el caso del área, todos los factores jugaron un papel muy importante, debido a que los factores muestran un efecto estadísticamente significativo con un 95 % de confianza. Demostrando que las variaciones en estos factores pueden afectar significativamente el área.

Posterior a este análisis, se realizó mediante software la optimización de ambas respuestas. Como se observó en los resultados, los factores que tienen un mayor efecto sobre las respuestas son la velocidad de flujo y la proporción de la fase orgánica (porcentaje de metanol). Estos factores tienen una tendencia, al ser ajustada la proporción de la fase móvil en su valor alto, se presenta una mayor área del pico correspondiente a Casiopeina® III-Ea, esto es debido a que la Casiopeina® al estar poco ionizada y al ser más soluble.

11.1.2.2.2 Evaluación inicial de riesgos

Una vez finalizado el estudio piloto, se llevó a cabo un análisis de la evaluación de riesgos, principalmente para identificar las AMPC/CQA, además de los CPP. Tal como se establece en la ICH Q8 R2, al inicio del desarrollo de una metodología se debe llevar a cabo una evaluación de riesgos para tener un monitoreo continuo del proceso. Así, la identificación AMPC/CQA y CPP permitirán establecer estrategias de control. Para ello, se procedió a utilizar una de las herramientas de la calidad, el diagrama de espina de pescado o diagrama de Ishikawa, el cual se presenta a continuación.

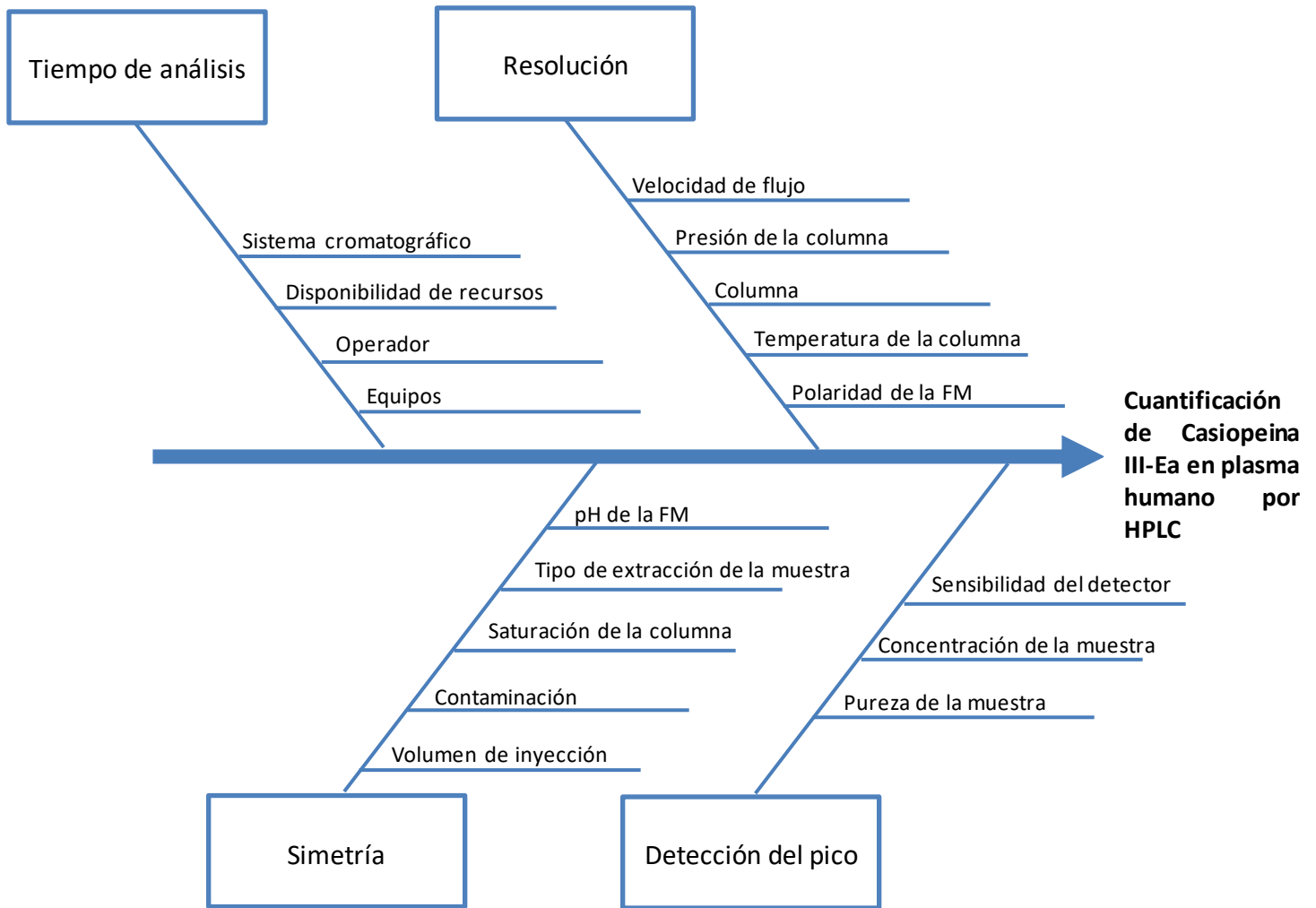


Figura XVI. Evaluación inicial de riesgos.

11.1.2.3 Parámetros críticos del proceso (CPP)

Con ayuda de la evaluación de riesgos realizada anteriormente, se establecieron los parámetros críticos del proceso que pueden tener un impacto directo o indirecto en los ATP. A continuación, se muestra una tabla a manera de resumen, en donde se presentan los CPP, que son los factores que pueden ser controlables o no controlables.



Tabla XIII. Controles críticos del proceso.

CPP	Controlables	Velocidad de flujo
		Columna
		Temperatura de la columna
		Polaridad de la fase móvil
		pH de la fase móvil
		Tipo de extracción de la muestra
		Volumen de inyección
	No controlables	Concentración de la muestra
		Presión de la columna
		Sistema cromatográfico
		Disponibilidad de recursos
		Operador
		Equipos
		Saturación de la columna
		Contaminación (impurezas)
Sensibilidad del detector		
Pureza de la muestra		

Una vez obtenidos estos factores o controles críticos del proceso, fueron agrupados como controlables y no controlables. Los factores controlables, fueron la velocidad de flujo, columna, temperatura de la columna, polaridad de la fase móvil, pH de la fase móvil, tipo de extracción de la muestra en la matriz, volumen de inyección y concentración de la muestra. Estos parámetros fueron clasificados como controlables, debido a que son fáciles de controlar, muchos de ellos mediante el software del equipo como la temperatura de la columna, volumen de inyección y la velocidad de flujo, otros cambiando la proporción de



la fase orgánica en la fase móvil, entre otros. Por lo que, su control puede ser llevado a cabo de forma relativamente fácil, haciendo así estos parámetros manipulables y pudiendo ser modificados para obtener valores en los que permitan cumplir con los ATP. Por el contrario, los factores no controlables que se encuentran en la tabla anterior fueron definidos así porque son aquellos que son difíciles de controlar, pues se carecen de los recursos, por ejemplo, para comprar un mejor detector o sintetizar una muestra de Casiopeina® III-Ea con mayor pureza.

11.1.2.4 Consideraciones del diseño de experimentos

11.1.2.4.1 Selección de factores

Como se revisó anteriormente en los parámetros críticos del proceso, existen parámetros o factores que se pueden modificar o controlar con el objetivo de poder cumplir con los ATP. Estos factores controlables se clasifican en factores cualitativos o cuantitativos. Para este proyecto, los factores de escala cualitativa fueron la selección de la columna y el pH de la fase móvil, mientras que los demás factores fueron de escala cuantitativa. A continuación, se muestran los factores seleccionados con sus características y pequeña justificación.

11.1.2.4.1.1 pH de la fase móvil

La Casiopeina® III-Ea se ha reportado como una base débil, la cual es ionizable por la variación del pH en respuesta a su pKa. Cuando el pH es diferente del pKa, la concentración de la Casiopeina® III-Ea podría verse afectada debido a la presencia simultánea de las dos especies ionizadas. Por ello, es necesario ajustar el pH de la fase móvil mediante soluciones amortiguadoras, en las cuales la Casiopeina® ha demostrado ser estable. Considerando la fase móvil a un pH de 6.8 y 7.4, debido a que ya ha sido reportada la estabilidad de la molécula en estos pH. Se consideró una concentración de la sal de fosatos baja, debido a que, a una alta concentración de fosatos, estos pueden coordinarse con la Casiopeina® III-Ea. Considerando lo anterior, se emplearon soluciones amortiguadoras de fosatos de pH 6.8 y 7.4 a una concentración de 10 μ M.



11.1.2.4.1.2 Proporción de la fase orgánica (polaridad de la fase móvil)

Se utilizó metanol en proporción de la fase orgánica debido a que ha sido ampliamente utilizado en estudios previos con diferentes Casiopeinas[®], además de que se ha encontrado que la Casiopeina[®] es muy soluble en metanol y se ha demostrado su estabilidad. La proporción de metanol se varió, de acuerdo con estudios previos, en los que se han utilizado proporciones de 40 a 60 % de metanol en las fases móviles. En este estudio, se seleccionó un intervalo más amplio para el estudio de este factor sobre la respuesta.

11.1.2.4.1.3 Velocidad de flujo

La velocidad de flujo de la fase móvil se varió de igual forma, con el objetivo de tener un pico con una buena resolución con un tiempo de retención aceptable, ya que cada compuesto tiene una velocidad de flujo óptima y se pretende encontrar el mejor valor de velocidad de flujo.

11.1.2.4.1.4 Columna

Ya seleccionada la fase móvil, y al ser esta una fase móvil polar, la columna debe ser no polar. Por ello, se seleccionaron 2 columnas ampliamente utilizadas en la cuantificación de Casiopeinas[®]. Además de ser estas dos columnas de las más empleadas en la cuantificación de Casiopeinas[®], la fase estacionaria ha demostrado ser tolerante a los cambios de pH y temperatura. Otro factor para considerar sobre la elección de estas columnas fue la disponibilidad y presupuesto para obtenerlas. Por lo que se trabajó con columnas Agilent C8 Eclipse XDB y Agilent C18 Eclipse plus, las cuales, de acuerdo con el fabricante son ideales para el desarrollo de metodologías, son especialmente diseñadas para compuestos de naturaleza básica y son perfectas para ser empleadas en un rango de pH de 2 a 9. Las similitudes podrían hacer percibir que emplear cualquiera de estas 2 columnas sería lo ideal, no obstante, tienen diferencias, como la C8 Eclipse XDB, la cual es mejor en el rango de pH de 6 a 8, pues los silanoles (donantes de hidrógeno) residuales son más activos y las interacciones de colas son más probables, mientras que en la C18 Eclipse Plus a pH 6-9, la estabilidad de la columna es superior operando a temperaturas <40 ° C y utilizando



concentraciones de tampón bajas (en el rango de 0.01-0.02 M), especialmente con tampones de fosfato y carbonato. Así mismo, la empresa recomienda el uso de las columnas Eclipse plus como primera opción en el desarrollo de metodologías analíticas, pues posee una tecnología patentada como fase estacionaria.

11.1.2.4.1.5 Temperatura de la columna

La temperatura de la columna es un factor que se debe de controlar para evitar aumento de presión en la columna. Considerando lo anterior y estudios previos de estabilidad de la Casiopeina® III-Ea, se decidió evaluar la temperatura como un factor, considerando la estabilidad de la molécula, el intervalo de temperatura de 25 °C a 30 °C.

11.1.2.4.1.6 Volumen de inyección

El volumen de inyección en toda cuantificación por cromatografía de líquidos debe ser un parámetro para variar, debido a que del volumen de inyección dependerá el área del pico del compuesto y en su resolución, al obtener una óptima respuesta, evita uno el saturar la columna. Es por ello por lo que la selección del volumen de inyección es de vital importancia, y lo fue así cuando se realizó el experimento de la Casiopeina® III-Ea en fluido biológico, debido a que los componentes del fluido biológico complicaban la resolución del pico de Casiopeina® III-Ea.

11.1.2.4.1.7 Metodología de extracción de la matriz biológica

La metodología de extracción de la Casiopeina® III-Ea de la matriz biológica igualmente formó parte de un factor, debido a que la metodología con la cual se extraía implicaba diferentes pasos, tiempo y costos, por lo que el empleo de una u otra se debía justificar para ser empleada como metodología óptima para el cumplimiento del problema del trabajo. Estas metodologías pueden verse con precisión en el apartado 8.1.1 Extracción de la Casiopeina® III-Ea del fluido biológico.

11.1.2.4.2 Niveles de trabajo

La selección de niveles es la asignación de valores a cada factor que se estudiará en el diseño de experimentos. Para este caso se emplearon 2 niveles, el nivel alto (+) y el nivel



bajo (-). La selección de los niveles se basó de la búsqueda en la literatura y en la realización del estudio piloto. Los factores y niveles estudiados en la experimentación se presentan a continuación:

Tabla XIV. Factores y niveles estudiados.

Factor	Nivel bajo (+)	Nivel alto (-)
pH de la fase móvil	6.8	7.4
Proporción de la fase orgánica	40 %	65 %
Velocidad de flujo	0.5 mL/min	1.0 mL/min
Columna	C8	C18
Temperatura de la columna	25 °C	30 °C
Volumen de inyección	15 µL	25 µL
Metodología de extracción	Precipitación de proteínas	Fase sólida

11.1.2.4.3 Selección de la variable de respuesta

La selección de la variable de respuesta se seleccionó de acuerdo con el tipo de instrumento que se empleó en la experimentación, así como en la consideración de las AMPC/CQA para el cumplimiento de los ATP. El HPLC está formado por una columna cromatográfica que retiene uno o más analitos de la fase móvil. Debido a esta capacidad de retención, se lleva a cabo una señal de la detección de estos analitos que se representa en un cromatograma, el cual brinda información útil del proceso de separación y detección de estos analitos. Para este caso, se emplearon 2 respuestas, la simetría del pico correspondiente a la Casiopeina® III-Ea y la resolución de este pico. Estos parámetros se determinan directamente por el software del equipo que interpreta la señal y brinda un resultado numérico, disminuyendo así la posibilidad de malas interpretaciones de las respuestas.

11.1.2.4.4 Selección del diseño experimental

Para la selección del diseño experimental, influyeron varios aspectos, los cuales determinaron el tipo de diseño que se emplearía.

- Perfil del objetivo analítico (ATP).



- Número de factores: El número de factores a estudiar fue un punto clave, debido a que en general a mayor número de factores, mayor número de experimentos y por lo tanto mayor tiempo y costos.
- Número de niveles: El número de niveles se simplificó a 2 para poder seleccionar un diseño experimental de menor complejidad.
- Efectos: De acuerdo con los efectos que se busca conseguir, en este caso determinar qué efectos de los factores tienen un impacto significativo en la variable de respuesta.
- Costo, tiempo y precisión: La aplicación del diseño experimental, buscó reducir el número de experimentos y con ello, el tiempo y el costo.

11.1.2.5 Aplicación del diseño de experimento

Como ya se pudo describir anteriormente, el diseño de experimentos (DoE) es un método organizado y estructurado que se emplea para establecer relaciones entre como los factores de entrada afectan a una o más respuestas, a través del establecimiento de modelos estadísticos.

Esta herramienta se aplicó al estudio debido a que permite un estudio más profundo de los CPP y AMPC/CQA del proceso, determinando como estos influyen en conducir una respuesta optimizada.

Para lograr esto, se emplearon dos diseños, el primero de ellos un diseño de barrido o “screening”, debido a que este tipo de diseños experimentales permiten el estudio de un número amplio de factores, reduciendo así el número de experimentos y disminuyendo los recursos. Por otra parte, se aplicó de igual forma un estudio de optimización que permitiera profundizar en los factores que tienen un efecto significativo sobre las respuestas.

11.1.2.5.1 Diseño de “screening”

En este sentido, dentro del DoE existen varias opciones que podrían ser consideradas para hacer un “screening” de los factores, como los diseños factoriales completos de dos niveles, los diseños factoriales fraccionados y los diseños tipo Plackett-Burman, todos estos son los diseños de cribado o “screening” más utilizados debido a sus ventajas rentables.



Como resultado del análisis de cada uno de estos aspectos y su relación entre sí, se decidió emplear inicialmente un diseño tipo Plackett Burman. Este diseño se utilizó partiendo del supuesto de que las interacciones entre los factores son insignificantes. Este tipo de diseños se emplea en las fases de desarrollo debido a que es un diseño de 2 niveles de resolución III, es decir, un diseño 2^k , que se emplea para optimizar los recursos, ya que se suelen emplear cuando el número de factores es mayor a 5.

11.1.2.5.1.1 Aplicación del diseño tipo Plackett Burman

El diseño tipo Plackett Burmann fue seleccionado debido a que el número de factores fue considerable, por lo que incrementaría el tiempo de la experimentación y por ende los costos. El diseño se realizó con la Casiopeina® III-Ea en fluido biológico, se consideraron 7 factores (tabla XVI) y 2 respuestas, las cuales, para cumplir con el objetivo de la experimentación, se seleccionó la resolución y el área del pico como respuestas.

La matriz de diseño tipo Plackett Burmann con la que se realizó el experimento se presenta a continuación:

Tabla XV. Matriz de diseño Plackett Burman 2^7 .

Experimento	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7
1	+	-	+	-	-	-	+
2	+	+	-	+	-	-	-
3	-	+	+	-	+	-	-
4	+	-	+	+	-	+	-
5	+	+	-	+	+	-	+
6	+	+	+	-	+	+	-
7	-	+	+	+	-	+	+
8	-	-	+	+	+	-	+
9	-	-	-	+	+	+	-
10	+	-	-	-	+	+	+
11	-	+	-	-	-	+	+
12	-	-	-	-	-	-	-



Tabla XVI. Factores considerados para el diseño tipo Plackett Burmann

Factor	Valor bajo (-)	Valor alto (-)
pH de la fase móvil	6.8	7.4
Proporción de fase orgánica	35 %	65 %
Columna	C8	C18
Flujo	0.5 mL/min	1.0 mL/min
Temperatura de la columna	25 °C	30 °C
Extracción	Precipitación	Fase sólida
Volumen de inyección	15 µL	25 µL

Antes de comenzar, se realizó el cálculo prospectivo del número de repeticiones por medio de la herramienta estadística Minitab, para la cual se consideró una confianza del 95%, una desviación estándar asumida de 1, 7 factores y 12 corridas por bloque, la cual estima que sean 3 repeticiones para una potencia estadística $\geq 80\%$ para que el diseño sea confiable, por lo cual el diseño se replicará 2 veces, dando un total de 36 corridas, lo cual es consistente con lo reportado por Gutierrez-Pulido (2008), el cual recomienda un mínimo de 3 repeticiones en la aplicación de diseño de experimentos.

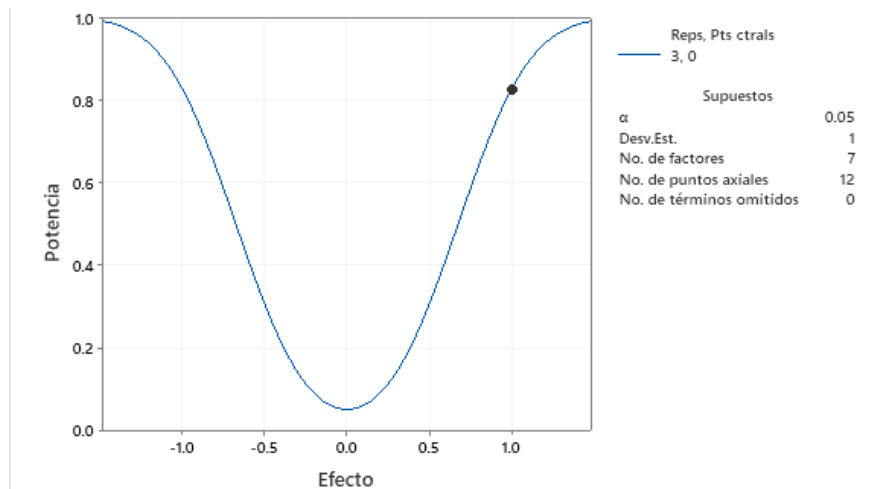


Figura XVII. Curva de la potencia para diseño de Plackett-Burmann

Los resultados de la aplicación del diseño se presentan a continuación:



Tabla XVII. Resultados de la aplicación del diseño de Plackett Burmann

Extracción	%F. orgánica	Temperatura	Columna	Flujo	pH	V. de iny.	Simetría			Resolución		
Fase sólida	40	30	C8	0.5	6.8	25	0.75	0.74	0.7	0.89	0.97	0.91
Fase sólida	65	25	C18	0.5	6.8	15	0.64	0.72	0.61	1.5	1.68	1.64
Precipitación	65	30	C8	1	6.8	15	0.43	0.4	0.5	1.3	1.15	1.21
Fase sólida	40	30	C18	0.5	7.4	15	0.59	0.64	0.55	1.26	1.37	1.42
Fase sólida	65	25	C18	1	6.8	25	0.49	0.55	0.58	1.3	1.33	1.15
Fase sólida	65	30	C8	1	7.4	15	0.62	0.68	0.59	1.41	1.32	1.36
Precipitación	65	30	C18	0.5	7.4	25	0.16	0.25	0.19	0.78	0.89	0.64
Precipitación	40	30	C18	1	6.8	25	0.44	0.37	0.45	0.78	0.67	0.92
Precipitación	40	25	C18	1	7.4	15	0.31	0.35	0.29	0.7	0.78	0.73
Fase sólida	40	25	C8	1	7.4	25	0.44	0.39	0.42	1.07	1.24	1.16
Precipitación	65	25	C8	0.5	7.4	25	0.63	0.68	0.65	1.57	1.48	1.69
Precipitación	40	25	C8	0.5	6.8	15	0.46	0.39	0.4	0.73	0.79	0.58



Una vez realizada la experimentación, el siguiente paso fue realizar el análisis de los datos obtenidos, para ello se utilizó la herramienta Statgraphics®. Se seleccionó el diseño de Plackett Burmann de 2 respuestas y 3 factores, con un nivel de confianza del 95%. El diseño fue replicado 2 veces, por lo que se generaron 3 bloques. Se analizó cada respuesta por separado, como se muestra a continuación:

Tabla XVIII. Análisis de varianza para Simetría.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: Extracción	0.311736	1	0.311736	24.1	<0.05
B: % F. orgánica	0.013225	1	0.013225	1.02	0.321
C: Temperatura	6.94444E-05	1	6.94444E-05	0.01	0.942
D: Columna	0.0793361	1	0.0793361	6.13	<0.05
E: Flujo	0.0584028	1	0.0584028	4.51	<0.05
F: pH	0.0393361	1	0.0393361	3.04	0.092
G: V. inyección	0.00233611	1	0.00233611	0.18	0.674
Error total	0.362189	28	0.0129353		
Total (corr.)	0.866631	35			

El análisis de varianza para simetría mostró que los factores tipo de extracción del analito, tipo de columna y velocidad de flujo tienen un efecto estadísticamente significativo sobre la simetría con un 95% de confianza (color verde) al ser la $p < 0.05$. Los factores de proporción de la fase orgánica dentro de la fase móvil, temperatura de la columna, pH de la fase móvil y volumen de inyección no presentaron un efecto estadísticamente significativo, por lo que, para la simetría, dentro de estos niveles investigados, el método es robusto.

A continuación, se presenta el diagrama de Pareto en el cual se puede observar estas mismas aseveraciones sobre la significancia estadística de los factores que afectan la simetría.



Diagrama de Pareto Estandarizada para Simetría

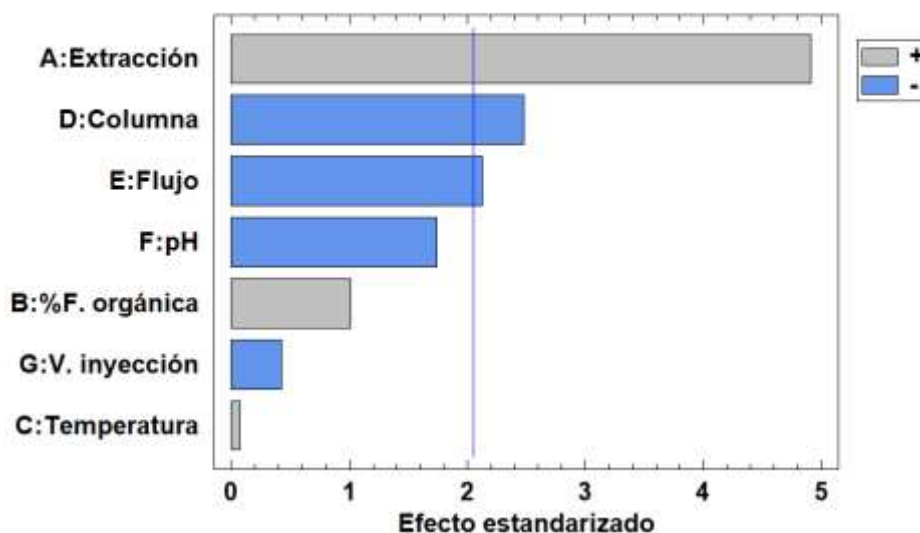


Figura XVIII. Diagrama de Pareto para Simetría.

Para el caso de la resolución, los resultados se muestran a continuación:

Tabla XIX. Análisis de varianza para Resolución.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: Extracción	0.868003	1	0.868003	16.93	<0.05
B: %F. orgánica	1.14847	1	1.14847	22.4	<0.05
C: Temperatura	0.0971361	1	0.0971361	1.89	0.180
D: Columna	0.046225	1	0.046225	0.9	0.350
E: Flujo	0.0406694	1	0.0406694	0.79	0.381
F: pH	0.0521361	1	0.0521361	1.02	0.322
G: V. inyección	0.0616694	1	0.0616694	1.2	0.282
Error total	1.43532	28	0.0512615		
Total (corr.)	3.74963	35			

Como se muestra en la tabla anterior, los factores que tienen un efecto estadísticamente significativo sobre la resolución con un 95% de confianza es el tipo de extracción del analito y la proporción de fase orgánica dentro de la fase móvil. Para los demás factores, se puede



asumir que, dentro de los niveles investigados, la metodología es robusta, pues no causaran efecto significativo sobre la resolución.

El diagrama de Pareto muestra más claramente los factores que ejercen un efecto significativo sobre la resolución:

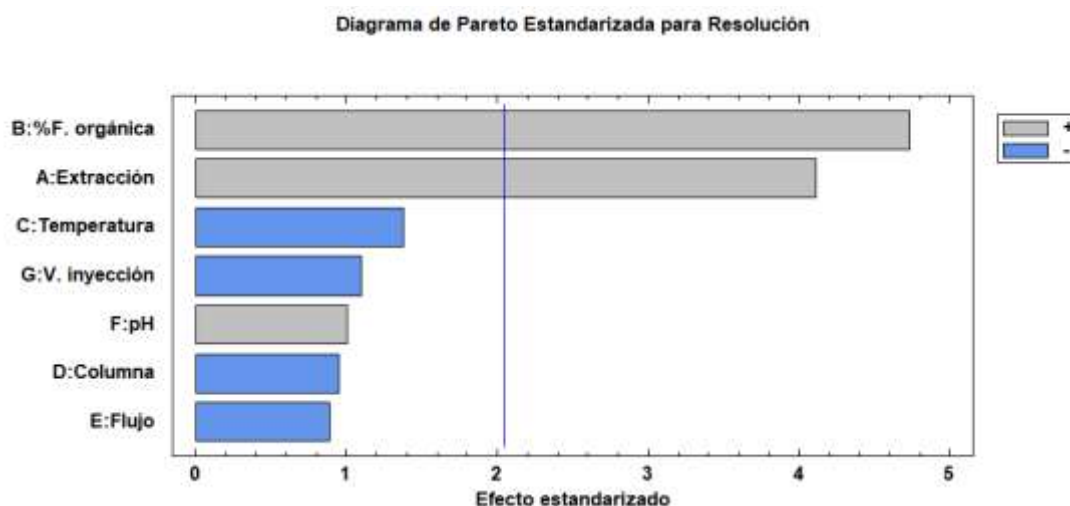


Figura XIX. Diagrama de Pareto para Resolución.

De acuerdo con los resultados obtenidos, se puede observar que solo los factores que tuvieron un valor de $p < 0.05$ tuvieron un efecto significativo sobre las respuestas con una confianza del 95%, para el caso de la simetría, observamos que esta se ve afectada por 3 factores de los 7 factores investigados, la extracción, % de metanol en la fase móvil y el tipo de columna, mientras que para la resolución, solo 2 factores tuvieron un efecto significativo, la extracción y el % de metanol dentro de la fase orgánica. Por tanto, solo hay 4 factores que tienen efecto sobre las respuestas, esto fue más claramente observado en el diagrama de Pareto. Derivado de estos resultados, lo siguiente será conseguir los niveles adecuados de estos factores que ejercen un efecto significativo sobre las respuestas. Es por ello, que se decidió realizar un segundo estudio, pero ahora aplicando otro diseño, para este caso se realizó un diseño factorial 2^{4-1} (diseño factorial fraccionado de 2 niveles con 4 factores). Los niveles de los factores que no causaron un efecto significativo se mantuvieron en ciertos niveles de acuerdo con las necesidades de la experimentación. La temperatura se mantuvo en el nivel bajo, pues la temperatura al no ser un factor que



afecta ambas respuestas, si afecta la estabilidad de la Casiopeina® III-Ea, como ya se ha comentado, debido a que la alta temperatura incrementa la degradación de la Casiopeina® III-Ea. El pH se mantuvo en 6.8 debido a que es el pH más aproximado al de la sangre, siendo más factible de amortiguar ese nivel de pH. En cuanto al volumen de inyección, se decidió trabajar con el volumen de 15 μL debido a que a menor cantidad de muestra se inyecte al equipo, la columna fuera en menor grado saturada, por lo que el tiempo de limpiarla y acondicionarla requerirá de un menor gasto de disolventes y tiempo.

11.1.2.5.2 Diseño de optimización

Posterior a la realización del diseño tipo Plackett Burman, se redujo el número de factores a estudiar, debido a que no presentaban un efecto significativo sobre la variable de respuesta, indicando que la respuesta no se verá afectada en el nivel alto o bajo de esos factores.

En este sentido, el número de factores se redujo a 4, no obstante, continúa siendo un número grande factores, por lo que el realizar un diseño factorial 2^K con 2 réplicas representa un número muy considerable de experimentos. Debido a esto, se empleó un diseño factorial fraccionado para disminuir el número de corridas y por lo tanto tiempo y costo. Este tipo de diseños sacrifica información poco útil que se obtendría en un diseño factorial completo en aras de aplicar un diseño manejable, confiable y económico.

11.1.2.5.2.1 Aplicación del diseño de optimización: Diseño factorial fraccionado 2^{4-1}

Una vez obtenidos los factores que tienen un efecto significativo sobre la simetría y resolución, lo siguiente es encontrar el nivel adecuado de estos factores que permitan cumplir con los objetivos, por ello se aplicó un nuevo diseño, ahora un diseño factorial fraccionado, debido a que esta estrategia permitirá trabajar de forma en que se optimicen los recurso, sacrificando información poco importante. Los resultados de la aplicación del diseño factorial 2^{4-1} se presentan a continuación:



Tabla XX. Resultados de la aplicación del diseño factorial fraccionado 2^{4-1} .

Extracción	% F. orgánica	Columna	Flujo	Simetría			Resolución		
Precipitación	40	C8	0.5	0.41	0.41	0.39	0.72	0.75	0.77
Precipitación	65	C8	1	0.44	0.44	0.43	1.21	1.24	1.18
Fase sólida	40	C8	1	0.71	0.71	0.75	0.92	0.89	0.93
Fase sólida	65	C8	0.5	0.65	0.65	0.61	1.38	1.41	1.45
Precipitación	40	C18	1	0.38	0.41	0.43	0.62	0.71	0.79
Precipitación	65	C18	0.5	0.24	0.22	0.19	0.75	0.74	0.72
Fase sólida	40	C18	0.5	0.77	0.62	0.61	1.24	1.24	1.31
Fase sólida	65	C18	1	0.55	0.55	0.53	1.43	1.37	1.40

11.1.2.6 Espacio de diseño (DS)/Región de diseño operable del método (MODR)

Posterior al análisis de la información, se procedió a utilizar la herramienta de optimización de múltiples respuestas, con el objetivo de encontrar los niveles óptimos que permitan caracterizar el pico correspondiente a Casiopeina® III-Ea. Este análisis se realizó mediante la gráfica de contornos, en la cual se interceptan las respuestas de simetría y resolución al emplear la columna C8 y el proceso de extracción en fase sólida, con 64% de metanol y un flujo de 0.73, como se puede observar en la siguiente gráfica.

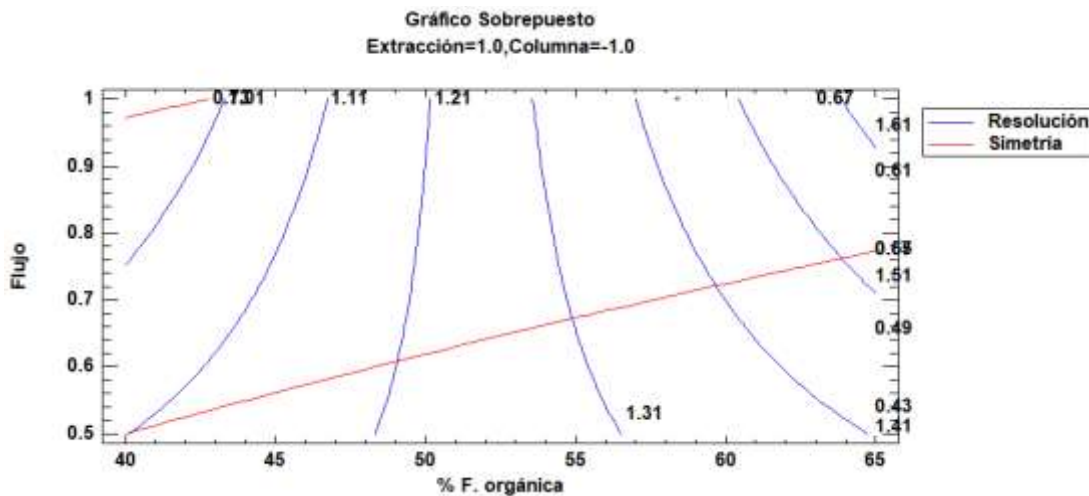


Figura XX. Gráfica de contornos de la optimización de ambas respuestas.



La siguiente tabla, fue obtenida en el programa estadístico Statgraphics, en el cual muestra la combinación de niveles de los factores que maximiza las respuestas en la región indicada. Muestra la combinación de actores a la cual se alcanza el punto óptimo, la cual se presenta a continuación:

Tabla XXI. Combinación óptima de niveles de los factores.

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
% F. orgánica	30	65	64
Extracción	Precipitación	Fase sólida	Fase sólida
Columna	C8	C18	C8
Flujo	0.5	1	0.73

Los valores de las respuestas, en esa combinación de los niveles de los factores de acuerdo con el programa estadístico es:

Tabla XXII. Valores de la respuesta en la combinación óptima de los factores.

Respuesta	Óptimo
Resolución	1.50
Simetría	0.67

11.1.2.6.1.1 Aplicación de la combinación óptima de niveles de los factores.

Posterior a la obtención de la combinación óptima de la combinación de factores que habría que controlarse, y de estos factores encontrar los niveles óptimos, se realizó la confirmación de estos supuestos. Esto se realizó con las combinaciones de la tabla XXII, el pico en color rojo representa el blanco y el color azul la muestra con Casiopeina® III-Ea® lo cual se obtuvo el siguiente cromatograma:

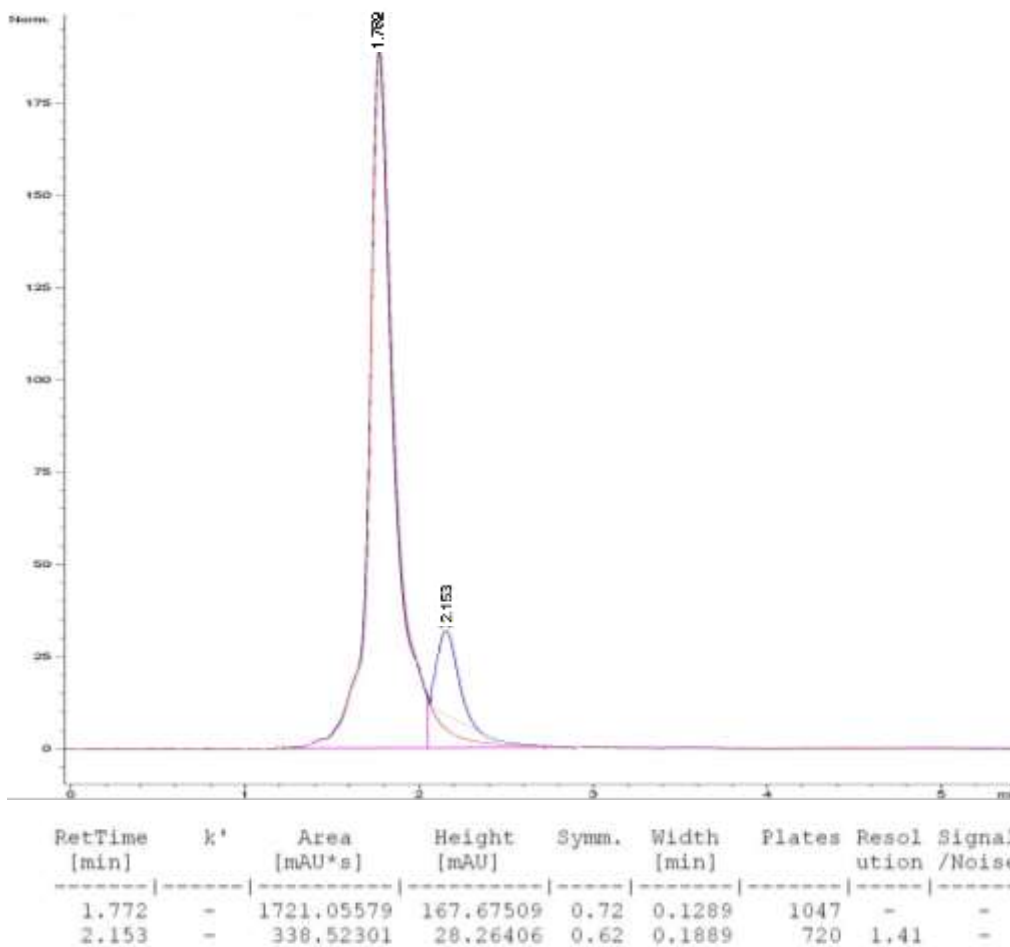


Figura XXI. Cromatograma con las condiciones optimizadas.

Los resultados obtenidos difirieron un poco a los datos teóricos, no obstante, el resultado es bastante bueno en comparación de otros tratamientos. Este resultado podría mejorar al cambiar a una columna C8 con menos uso, pues la columna empleada fue utilizada en toda esta etapa de desarrollo.

11.1.2.7 Estrategia de control y mejora continua

La estrategia de control es una medida diseñada para garantizar la reproducibilidad de los resultados en cumplimiento con los ATP. Cuando se llevó a cabo la experimentación, existieron diversos puntos críticos del proceso de cuantificación de la Casiopeina® III-Ea que, al verse afectados, tuvieron un gran impacto sobre las respuestas y otros que al variarse presentaban una gran tolerancia sobre las respuestas.

Derivado de toda la experimentación realizada con la Casiopeina III-Ea, la estrategia de control propuesta y no limitativa es la siguiente:



- Control de los atributos de calidad del principio activo.
- Control de los atributos de calidad de los reactivos y columnas utilizados.
- Calificación de equipos y calibración de instrumentos.
- Calificación del analista.
- Programas de monitoreo para el análisis de datos aberrantes.
- Validación de la metodología bioanalítica.



12.0 CONCLUSIONES Y ACCIONES

El enfoque de la calidad analítica por diseño (AQbD) es una herramienta que permitió minimizar el riesgo de fallas o malas decisiones, así como el incremento en la productividad y calidad de la metodología.

Los factores que influyen en las respuestas se determinaron mediante la realización de una variación simultánea de factores bajo el enfoque del diseño de experimentos (DoE). Esta metodología permitió detectar los factores experimentales que tenían un efecto estadísticamente significativo, y por tanto, seleccionar esos factores y estudiarlos más a fondo con un nuevo diseño experimental.

Una vez definidos estos factores, se obtuvo la región operable y con ayuda de software estadístico, se definió el espacio de diseño operable, así como las condiciones óptimas que nos ofrecían la mejor respuesta. Posterior, se comprobó todo el análisis por medio de la realización de una corrida de confirmación, en la cual se obtuvieron resultados similares a los esperados.

Los resultados demostraron que se cumplieron con la mayoría de los ATP planteados, como un tiempo menor a 10 minutos por corrida de una muestra analítica y un pico correspondiente a la Casiopeina® III-Ea que puede ser cuantificable y que presenta muy pocas interferencias. Lamentablemente no se cumplió con el ATP de una resolución mayor a 1.5, aunque la resolución fue de 1.4, no corresponde al ATP planteado, por lo que se concluye que este valor se pudo haber visto afectado por las condiciones propuestas en la estrategia de control.

**13.0 REFERENCIAS**

1. Vidal L, Pimentel E, Cruces M, Hernández S, Ruiz-Azuara L. Cytotoxic and genotoxic actions of Casiopeina III-Ea (Cas III-Ea) in somatic and germ cells of *Drosophila melanogaster*. *Journal of toxicology and environmental health Part A*. 23 de junio de 2017;80:1-9.
2. Trejo-Solís C, Palencia G, Zúñiga S, Rodríguez-Ropon A, Osorio-Rico L, Luvia ST, et al. Cas IIgly induces apoptosis in glioma C6 cells in vitro and in vivo through caspase-dependent and caspase-independent mechanisms. *Neoplasia*. junio de 2005;7(6):563-74.
3. CARACTERÍSTICAS DE LAS DEFUNCIONES REGISTRADAS EN MÉXICO DURANTE 2019. 2021;45.
4. Mattiuzzi C, Lippi G. *Current Cancer Epidemiology*. *J Epidemiol Glob Health*. diciembre de 2019;9(4):217-22.
5. Reina M, Hernández-Ayala LF, Bravo-Gómez ME, Gómez V, Ruiz-Azuara L. Second generation of Casiopeinas®: A joint experimental and theoretical study. *Inorganica Chimica Acta*. 1 de marzo de 2021;517:120201.
6. Jung Cook H. La Biofarmacia en México: Un breve análisis del pasado y presente. *Revista mexicana de ciencias farmacéuticas*. junio de 2013;44(2):5-6.
7. Bioanalytical method validation: new FDA guidance vs. EMA guideline. Better or worse? *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 20 de febrero de 2019;165:381-5.
8. Nováková L, Svoboda P, Pavlík J. Ultra-high performance liquid chromatography. En 2017.
9. Drake CG, Jaffee E, Pardoll DM. Mechanisms of immune evasion by tumors. *Adv Immunol*. 2006;90:51-81.
10. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The Three Es of Cancer Immunoediting. *Annual Review of Immunology*. 2004;22(1):329-60.
11. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 4 de marzo de 2011;144(5):646-74.
12. PAHO | Cancer [Internet]. [citado 17 de enero de 2021]. Disponible en: https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=article&id=2&Itemid=40735&lang=en



REFERENCIAS

13. Reynoso Noverón N, Torres-Domínguez JA. Epidemiología del cáncer en México: carga global y proyecciones 2000-2020. *Revista Latinoamericana de Medicina Conductual / Latin American Journal of Behavioral Medicine*. 1 de octubre de 2018;8(1):9.
14. Benedí J, Gómez Del Río MÁ. Fármacos antineoplásicos (I). *Farmacia Profesional*. 1 de febrero de 2006;20(2):60-5.
15. How does chemotherapy work? [Internet]. *informedhealth.org*. [citado 17 de enero de 2021]. Disponible en: <https://www.informedhealth.org/how-does-chemotherapy-work.html>
16. Strovel J, Sittampalam S, Coussens NP, Hughes M, Inglese J, Kurtz A, et al. Early Drug Discovery and Development Guidelines: For Academic Researchers, Collaborators, and Start-up Companies. En: Markossian S, Sittampalam GS, Grossman A, Brimacombe K, Arkin M, Auld D, et al., editores. *Assay Guidance Manual* [Internet]. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004 [citado 17 de enero de 2021]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK92015/>
17. Boletines [Internet]. [citado 17 de enero de 2021]. Disponible en: https://www.dgcs.unam.mx/boletin/bdboletin/2002/2002_0750.html
18. Chavez-Gonzalez A, Centeno-Llanos S, Moreno-Lorenzana D, Sandoval-Esquivel MA, Aviles-Vazquez S, Bravo-Gomez ME, et al. Casiopeina III-Ea, a copper-containing small molecule, inhibits the in vitro growth of primitive hematopoietic cells from chronic myeloid leukemia. *Leuk Res*. enero de 2017;52:8-19.
19. de Anda-Jáuregui G, Espinal-Enríquez J, Hur J, Alcalá-Corona SA, Ruiz-Azuara L, Hernández-Lemus E. Identification of Casiopeina II-gly secondary targets through a systems pharmacology approach. *Comput Biol Chem*. febrero de 2019;78:127-32.
20. Gutiérrez AG, Vázquez-Aguirre A, García-Ramos JC, Flores-Alamo M, Hernández-Lemus E, Ruiz-Azuara L, et al. Copper(II) mixed chelate compounds induce apoptosis through reactive oxygen species in neuroblastoma cell line CHP-212. *J Inorg Biochem*. septiembre de 2013;126:17-25.
21. Kachadourian R, Brechbuhl HM, Ruiz-Azuara L, Gracia-Mora I, Day BJ. Casiopeína II-gly-induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction in human lung cancer A549 and H157 cells. *Toxicology*. 9 de febrero de 2010;268(3):176-83.
22. Osnaya Rosas, Paulina. Desarrollo y validación de método bioanalítico para la cuantificación de casiopeína III-IA[®] en plasma humano por HPLC-MS. 2015.
23. Vértiz G, García-Ortuño LE, Bernal JP, Bravo-Gómez ME, Lounejeva E, Huerta A, et al. Pharmacokinetics and hematotoxicity of a novel copper-based anticancer agent:



REFERENCIAS

- casiopeína III-Ea, after a single intravenous dose in rats. *Fundam Clin Pharmacol*. febrero de 2014;28(1):78-87.
24. Campero-Peredo C, Bravo-Gómez ME, Hernández-Ojeda SL, Olguin-Reyes SDR, Espinosa-Aguirre JJ, Ruiz-Azuara L. Effect of [Cu(4,7-dimethyl-1,10-phenanthroline)(acetylacetonato)]NO₃, Casiopeína III-Ea, on the activity of cytochrome P450. *Toxicol In Vitro*. junio de 2016;33:16-22.
 25. Zurita Hernández, Ervin. Determinación de las propiedades fisicoquímicas de solubilidad, pH-solubilidad y coeficiente de partición del compuesto con actividad antineoplásica CasIII-Ea, mediante el desarrollo y validación de un método analítico por espectrofotometría. 2018.
 26. Yu LX, Amidon G, Khan MA, Hoag SW, Polli J, Raju GK, et al. Understanding pharmaceutical quality by design. *AAPS J*. julio de 2014;16(4):771-83.
 27. Anonymous. Quality by design [Internet]. European Medicines Agency. 2018 [citado 17 de enero de 2021]. Disponible en: <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/research-development/quality-design>
 28. Peraman R, Bhadraya K, Padmanabha Reddy Y. Analytical Quality by Design: A Tool for Regulatory Flexibility and Robust Analytics [Internet]. Vol. 2015, *International Journal of Analytical Chemistry*. Hindawi; 2015 [citado 18 de enero de 2021]. p. e868727. Disponible en: <https://www.hindawi.com/journals/ijac/2015/868727/>
 29. Raman NVVSS, Mallu UR, Bapatu HR. Analytical Quality by Design Approach to Test Method Development and Validation in Drug Substance Manufacturing [Internet]. Vol. 2015, *Journal of Chemistry*. Hindawi; 2015 [citado 18 de enero de 2021]. p. e435129. Disponible en: <https://www.hindawi.com/journals/jchem/2015/435129/>
 30. Tietje C, Brouder A, editores. *International Conference On Harmonisation Of Technical Requirements For Registration Of Pharmaceuticals For Human Use*. En: *Handbook of Transnational Economic Governance Regimes* [Internet]. Brill | Nijhoff; 2010 [citado 17 de enero de 2021]. p. 1041-53. Disponible en: https://brill.com/view/book/edcoll/9789004181564/Bej.9789004163300.i-1081_085.xml
 31. Fukuda IM, Pinto CFF, Moreira- C dos S, Saviano AM, Lourenço FR, Fukuda IM, et al. Design of Experiments (DoE) applied to Pharmaceutical and Analytical Quality by Design (QbD). *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* [Internet]. 2018 [citado 18 de enero de 2021];54(SPE). Disponible en: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1984-82502018000700405&lng=en&nrm=iso&tlng=en



REFERENCIAS

32. N Politis S, Colombo P, Colombo G, M Rekkas D. Design of experiments (DoE) in pharmaceutical development. *Drug Dev Ind Pharm.* junio de 2017;43(6):889-901.
33. Murugan R. Design Sapce for Analytical Methods- QbD Concept. *Cutting Edge Spinco Biotech.* 21 de febrero de 2014;
34. Montgomery DC. *Design and analysis of experiments.* Eighth edition. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc; 2013. 730 p.
35. Pulido HG. *Análisis y diseño de experimentos.* :564.
36. Kuehl RO, Kuehl RO. *Design of experiments: statistical principles of research design and analysis.* 2nd ed. Pacific Grove, CA: Duxbury/Thomson Learning; 2000. 666 p.
37. Pilz J. *Statistical Design of Experiments (DOE).* En: Lovric M, editor. *International Encyclopedia of Statistical Science [Internet].* Berlin, Heidelberg: Springer; 2011 [citado 17 de enero de 2021]. p. 1392-6. Disponible en: https://doi.org/10.1007/978-3-642-04898-2_538
38. *Diseño de Experimentos [Internet].* [citado 17 de enero de 2021]. Disponible en: <https://unam-bibliotecasdigitales-com.pbidi.unam.mx:2443/read/9786076227558/index>
39. Vanaja K, Rani RH. *Design of Experiments: Concept and Applications of Plackett Burman Design.* *Clin Res Regul Aff.* 10 de octubre de 2008;24:1-23.
40. *Diseños factoriales y factoriales fraccionados [Internet].* [citado 17 de enero de 2021]. Disponible en: <https://support.minitab.com/es-mx/minitab/18/help-and-how-to/modeling-statistics/doe/supporting-topics/factorial-and-screening-designs/factorial-and-fractional-factorial-designs/>
41. Pandey S, Pandey P, Tiwari G, Tiwari R. *Bioanalysis in drug discovery and development.* *Pharm Methods.* 2010;1(1):14-24.
42. Moein MM, El Beqqali A, Abdel-Rehim M. *Bioanalytical method development and validation: Critical concepts and strategies.* *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 1 de febrero de 2017;1043:3-11.
43. *Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry.* 2018;44.
44. *guideline-bioanalytical-method-validation_en.pdf [Internet].* [citado 17 de enero de 2021]. Disponible en: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation_en.pdf
45. *M10_EWG_Draft_Guideline.pdf [Internet].* [citado 17 de enero de 2021]. Disponible en: https://database.ich.org/sites/default/files/M10_EWG_Draft_Guideline.pdf



REFERENCIAS

46. Deshpande MM, Kasture VS, Chavan MM and MJ. Bioanalytical Method Development and Validation: A Review. Recent Advances in Analytical Chemistry [Internet]. 10 de abril de 2019 [citado 17 de enero de 2021]; Disponible en: <https://www.intechopen.com/books/recent-advances-in-analytical-chemistry/bioanalytical-method-development-and-validation-a-review>



14.0 ANEXOS

Anexo 1

Validación de métodos analíticos.

Condiciones espectrofotométricas:

- Longitud de onda: 273 nm.
- Medio: Solución glucosada 5%.
- Blanco: Solución glucosada 5%.
- Concentración de la muestra: 5 mg/mL.

Tabla XXIII. Reporte de validación de métodos analíticos para la cuantificación de Casiopeina III-EA en solución glucosada al 5 %.

Prueba	Criterio de aceptación	Resultado	Conclusión
Exactitud/Selectividad	La respuesta solo se deberá al analito	La respuesta solo se debe al analito a una longitud de onda de 273 nm	El método es selectivo
Linealidad del sistema	$r^2 \geq 0.98$	$r^2 = 0.9984$	El sistema es lineal
	IC(β_1) No debe incluir el cero	IC(β_1)= 0.0948 a 0.0995	
Precisión de sistema	CV < 1.5 %	CV= 1.03 %	El sistema es preciso
Exactitud del método	IC(μ) debe incluir el 100% o que el promedio aritmético del % de recobro se incluya en el intervalo: 97-103%	IC(μ)= 97.92 a 99.22	El método es exacto
	CV < 3 %	CV= 0.63 %	
Linealidad del método	$r^2 \geq 0.98$	R= 0.9903	El método es lineal
	IC(β_1) debe incluir la unidad	IC(β_1) = 0.8895 a 1.0625	
	IC(β_0) de incluir el cero	IC(β_0)= -0.3184 a 0.5577	
	CV _{x/y} < 3%	CV= 1.79 %	
	IC(μ) Debe incluir el 100 % o el promedio del % de recobro	IC(μ)= 98.69 a 101.48	
	CV < 2 %	CV= 1.81	
Precisión intermedia	CV < 3 %	CV= 1.13 %	El método es reproducible



Anexo 2

Validación de métodos analíticos.

Condiciones espectrofotométricas:

- Longitud de onda: 273 nm.
- Medio: Solución salina 0.9%.
- Blanco: Solución salina 0.9%.
- Concentración de la muestra: 5 mg/mL.

Tabla XXIV. Reporte de validación de métodos analíticos para la cuantificación de Casiopeina III-EA en solución salina al 0.9 %.

Prueba	Criterio de aceptación	Resultado	Conclusión
Exactitud/Selectividad	La respuesta solo se deberá al analito	La respuesta solo se debe al analito a una longitud de onda de 273 nm	El método es selectivo
Linealidad del sistema	r^2 debe ser ≥ 0.98	$r^2 = 0.9993$	El sistema es lineal
	IC(β_1) No debe incluir el cero	IC(β_1) = 0.0948 a 0.0978	
Precisión de sistema	CV < 1.5 %	CV = 0.45 %	El sistema es preciso
Exactitud del método	IC(μ) debe incluir el 100% o que el promedio aritmético del % de recobro se incluya en el intervalo: 97-103%	IC(μ) = 100.67 a 102.21	El método es exacto
	CV < 3 %	CV = 0.72 %	
Linealidad del método	$r^2 \geq 0.98$	R = 0.9969	El método es lineal
	IC(β_1) debe incluir la unidad	IC(β_1) = 0.9162 a 1.0118	
	IC(β_0) de incluir el cero	IC(β_0) = -0.0712 a 0.4136	
	CV _{x/y} < 3%	CV = 0.99 %	
	IC(μ) Debe incluir el 100 % o el promedio del % de recobro	IC(μ) = 99.10 a 100.71	
	CV < 2 %	CV = 1.04	
Precisión intermedia	CV < 3 %	CV = 1.28 %	El método es reproducible