



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

DETERMINACION DE COBRE Y ZINC EN SANGRE
DE PERROS CON TUMOR VENEREO
TRANSMISIBLE POR ESPECTROFOTOMETRIA DE
ABSORCION ATOMICA

T E S I S

PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A ;

ARACELI HERNANDEZ GARCIA



MEXICO, D.F.

EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA

AÑO 2005

m. 346267



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE PROF: NÚÑEZ MERCADO BLANCA M.

VOCAL PROF: SALDÍVAR OSORIO LILIANA

SECRETARIO PROF: CASTILLA MADRIGAL MARÍA ELENA

1er. SUPLENTE PROF: UGALDE SALDÍVAR VICTOR MANUEL

2do. SUPLENTE PROF: CAMPOS ECHEVERRÍA MA. DE LOS DOLORES

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

DEPg ABSORCIÓN ATÓMICA LAB. 103 DEPTO. QUÍMICA ANALÍTICA

ASESOR DEL TEMA:

DRA. LILIANA SALDÍVAR OSORIO



SUPERVISOR TÉCNICO:

Q.F.B. MA. GUADALUPE ESPEJEL MAYA



SUSTENTANTE:

ARACELI HERNÁNDEZ GARCÍA



A mis padres:

Con todo mi amor para Irma y Manuel

Por su decidido apoyo, cariño y comprensión, que es una deuda que tendré con ellos toda la vida

A mi hija:

Mariana

Por ser mi motivación para seguir adelante

A mis hermanos y cuñados:

Oscar, David, Lety, Nora, Lilia y Jesús

Por su solidaridad, sus incentivos y su constante ayuda en todo momento

A mis amigos:

Maru, Mónica, Laura, Viky, Roxana y Evelyn.

A la Dra. Liliana Saldívar y Osorio:

Que con sus consejos, paciencia, sabiduría y apoyo hizo posible la realización de este trabajo.

A la Química Ma. Guadalupe Espejel Maya:

Especialmente con cariño por ser mi supervisor técnico, con sus atinadas observaciones y su constante estímulo.

JULIO 2005.

ÍNDICE

ÍNDICE	1
1.0 ANTECEDENTES	2
2.0 OBJETIVOS	4
3.0 HIPÓTESIS	5
4.0 GENERALIDADES.....	6
4.1 CÁNCER O NEOPLASIA MALIGNA	6
4.2 TUMOR VENÉREO TRANSMISIBLE.....	8
4.3 CASIOPEÍNA II	11
4.3.1 ESTRATEGIA DE MEDIR COBRE Y ZINC RELACIONADO CON EL USO DE CASIOPEÍNA II	13
4.3.1.1 FUNCIONES DEL COBRE.....	15
4.3.1.2 FUNCIONES DEL ZINC	16
4.3.1.3 TOXICIDAD DE COBRE, ZINC Y CASIOPEÍNA II	18
4.4 ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA.....	20
4.5 HORNO DE MICROONDAS MDS 2000	23
5.0 DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	24
5.1 DETERMINACIÓN DEL LÍMITE DE DETECCIÓN Y DEL LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN PARA COBRE Y ZINC.....	25
5.2 DETERMINACIÓN DE LA LINEALIDAD DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN PARA COBRE Y ZINC	25
5.3 DETERMINACIÓN DEL INTERVALO DE CONFIANZA PARA COBRE Y ZINC	25
5.4 CONDICIONES ESTÁNDAR DE LA ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA PARA COBRE Y ZINC.....	27
5.5 MATERIAL DE VIDRIO	28
5.6 REACTIVOS.....	29
5.7 EQUIPOS	29
5.8 MUESTREO	29
5.9 TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS PARA SU ANÁLISIS.....	30
5.10 PREPARACIÓN DE LAS CURVAS DE CALIBRACIÓN PARA COBRE Y ZINC.....	31
6.0 RESULTADOS.....	32
6.1 DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS ANALÍTICOS	32
6.2 ANÁLISIS DEL COMPORTAMIENTO DE COBRE Y ZINC	48
6.3 DISCUSIÓN DE RESULTADOS	66
7.0 RESUMEN Y CONCLUSIONES.....	72
8.0 BIBLIOGRAFÍA.....	77

1.0 ANTECEDENTES

El cáncer es una enfermedad con un incremento mundial en los últimos años. Siendo una enfermedad considerada terminal, se ha buscado por diferentes medios su curación.

Es por ello la importancia de elegir un tratamiento adecuado para cada tipo de cáncer. Los tratamientos más comunes para el cáncer son: la cirugía, la radiación y la quimioterapia. Los nuevos tratamientos son: inmunoterapia, hormonoterapia e hipertermia, se encuentra en fase experimental la terapia génica.

Los investigadores estudiaron con especial interés la quimioterapia, debido a que es un tratamiento de elección basado en fármacos que atacan al tumor metastático. Así, la mayoría de los fármacos actúan cuando el tumor está creciendo y multiplicándose; sin embargo tienen la desventaja de que no discriminan entre células neoplásicas y células normales con alto índice reproductivo, por lo que esta toxicidad limita la utilidad de los mismos. (1)

Actualmente se realizan estudios para encontrar fármacos antineoplásicos con un amplio espectro terapéutico y menor toxicidad. En general los medicamentos que se utilizan en quimioterapia son muy caros y de uso constante, además es necesario importarlos. Un ejemplo es el Cisplatino con el que se han observado buenos resultados pero tiene un costo extremadamente alto.

Esto ha motivado a investigadores como la Dra. Lena Ruíz a estudiar compuestos químicos que tengan características antineoplásicas, citostáticas con menor toxicidad a un menor costo, sintetizando un grupo de compuestos de coordinación de cobre (II) con el nombre de Casiopeínas.

Las casiopeínas contienen cobre II como centro metálico, en la esfera de coordinación, presentan un ligante bidentado del tipo diimina (N,N) y otro que puede ser aminoacidato (N,O) o donador (O,O). (2)

Las casiopeínas han sido estudiadas y sometidas a una gran variedad de pruebas certificando su actividad antitumoral, de acuerdo a las normas internacionales de cáncer y los resultados han sido satisfactorios, actualmente se encuentran patentadas.

En este estudio se utilizó la casiopeína II para el tratamiento de tumor venéreo transmisible en perros. Se determinó la concentración de cobre en sangre, relacionando implícitamente a la casiopeína II y la concentración de zinc ya que es otro elemento que participa en el desarrollo de tumores, actuando en las enzimas que coordinan la replica y transcripción del DNA.

2.0 OBJETIVOS

- Utilizar la Espectrofotometría de Absorción Atómica estableciendo una metodología confiable para la determinación de cobre y zinc en sangre de perros.
- Verificar el método para lograr resultados confiables.
- Evaluar el efecto de la Casiopeína II en la enfermedad neoplásica tumor venéreo transmisible.
- Analizar la relación de cobre y zinc al aplicar casiopeína II en perros con tumor venéreo transmisible.

3.0 HIPÓTESIS

- La técnica de espectroscopia de absorción atómica son confiables para la determinación de cobre y zinc.
- El cobre aumenta y el zinc disminuye al administrar casiopeína II a los perros con tumor venéreo transmisible.

4.0 GENERALIDADES

4.1 CÁNCER O NEOPLASIA MALIGNA

El cáncer o neoplasia maligna se caracteriza por la presencia de tumores con un crecimiento anormal e incontrolado, ya que las células cancerosas no son receptivas a las señales de control de las células normales del organismo.

Las células cancerosas se originan de células normales que sufren repetidas e incontrolables divisiones. La capacidad de las células cancerosas para multiplicarse libremente está acompañada de cierta pérdida de caracteres específicos.

“Toda célula maligna tiene un nuevo grupo de atributos que hacen su malignidad y dan su forma peligrosa. Consecuentemente todas las células malignas agrupadas son menos diversificadas en tamaño y forma que las células normales y ellas carecen de relaciones cooperativas” (3), por lo que las células cancerosas sufren alteraciones en la superficie celular.

Algunas de las modificaciones de las células cancerosas son:

- Modificación de la adhesión y de la inhibición por contacto del movimiento.
- Alteración del transporte.
- Alteración de la permeabilidad.
- Alteración de la endocitosis.
- Alteración de las enzimas de superficie.
- Pérdida o modificación de glicoproteínas.
- Pérdida o modificación de glicolípidos.
- Pérdida de antígenos.
- Antígenos nuevos.
- Secreción o desprendimiento.
- Deterioro de la comunicación intercelular y de la inhibición del crecimiento dependiente de la densidad.
- Densidad de carga de la superficie.
- Densidad iónica de la superficie.
- Aumento de la aglutinabilidad.

- Modificaciones nucleares.
- Integración viral.
- Alteraciones del control citoesquelético. (4)

Todas estas modificaciones en la superficie celular contribuyen a la pérdida de las señales para actuar como células normales. El aumento en la permeabilidad facilita la entrada del virus, estos virus se invaginan en la membrana celular de las células afectadas.

Existen más cromosomas en las células cancerosas que en las normales y en algunas aparece la fragmentación de cromosomas, las células malignas están también interconectadas por muy finos cordones de protoplasma. Otro fenómeno que presentan es que son más peligrosas cuando se están desintegrando, ya que liberan sustancias tóxicas.

Otra de las características de las células cancerosas es la capacidad de desplazarse en los vasos linfáticos los cuales las transportan a los ganglios linfáticos, esparciéndose por todo el cuerpo y estableciendo nuevos tumores, proceso conocido como Metástasis.

Los cánceres se clasifican según el tejido donde se originan, así un cáncer crece a expensas de los tejidos que lo rodean y es debido a la metástasis que la muerte se acelera. (5)

Se ha determinado que ciertos factores pueden afectar la estructura del DNA celular, produciendo una mutación y transformándose a célula cancerosa.

"Muchos agentes interactúan con el DNA, los agentes químicos tienen un extenso intervalo de efectos. Ellos pueden remover varios grupos de bases (el ácido nitroso remueve el grupo amino de la citosina), añadir nuevos grupos químicos a las bases del DNA (etilmetanosulfato puede agregar grupos metilo sobre la guanina) y unirse a la molécula del DNA (benzopirina se adhiere a la guanina del DNA)" (6)

Estas son algunas de las alteraciones observadas en el DNA y cuando se afecta en la línea germinal es mayor el nivel de mutaciones hasta futuras generaciones.

La progresión de un tumor es debida a una inestabilidad genética, consecuentemente con la activación de oncogenes. Un oncogén es una expresión anormal o alterada de un gene, un oncogén celular es derivado de una célula normal con un fenotipo maligno. Así los oncogenes celulares son derivados de genes celulares normales, los proto-oncogenes. Por lo que el mecanismo de activación de oncogenes, convierte a los proto-oncogenes en oncogenes promotores concluyendo en una transformación neoplásica.(7)

Recientes estudios clasifican los oncogenes en dos tipos, los oncogenes promotores los cuales desencadenan la proliferación descontrolada originando una neoplasia estos son: **myc, jun, fos y ras**. Los oncogenes supresores bloquean o dañan la activación de los genes inhibidores de la proliferación celular éstos son: **p53 y Rb** que actúan como reguladores del ciclo en los puntos de restricción (8).

En pocas palabras, los tumores son el resultado de múltiples eventos, con una transformación en un estado de malignidad integrado a un oncogén. Ya que mediante un estímulo se pierden los mecanismos de regulación del crecimiento celular, proliferando en forma incontrolable.

4.2 TUMOR VENÉREO TRANSMISIBLE

Uno de los tumores más frecuentes en perros es el Tumor Venéreo Transmisible (TVT), el TVT también llamado tumor de Sticker o Sarcoma de Sticker es una enfermedad neoplásica, el origen del TVT es desconocido, recientes estudios atribuyen el origen del TVT a un agente viral aunque no se ha comprobado. Se eligió el Tumor Venéreo Transmisible para este estudio, ya que con un adecuado tratamiento los perros se curan.

La citología característica del TVT, es una célula redonda u ovoide formada en masas compactas interlazadas por un estroma vascular. Tiene un núcleo grande con amontonamiento de cromatina y con gran cantidad de vacuolas intercitoplásmicas,

así como numerosas figuras mitóticas. Por lo que se caracteriza por masas tumorales de crecimiento rápido en los genitales externos, el tumor es transmitido por medio de implantación de células durante el coito de un perro infectado en contacto con mucosas de un perro sano. Es transmitido más fácilmente si hay cortaduras en la superficie de la mucosa.

El tumor puede ser transmitido por oler y lamer, debido a ello se reportan tumores en piel, labios, mucosa nasal y bucal así como en ojos, menos frecuentemente en las anginas, hígado, páncreas, pulmón, riñón, nudos linfáticos mesentéricos y cerebro. El tumor ocurre en perros sexualmente maduros la edad promedio es de 4 a 5 años, no existe una predisposición de raza ni de sexo, con mayor frecuencia en áreas con altas concentraciones de perros libres o callejeros. El TVT puede ser transportado a los caninos relacionados como coyotes, chacales y zorras rojas.

Los síntomas de la enfermedad incluyen:

Hemorragias persistentes, hinchazón genital, lameteo excesivo en el área genital, olor anormal y en ocasiones secreción de moco.

El tumor es de color rojo brillante a pálido con extensa vascularización, es común la ulceración. Las masas tumorales se parecen a una coliflor, de tamaño variado de unos cuantos mm hasta 10 ó 15 cm. En los machos se encuentra en la base del pene o sobre el prepucio. En las hembras se encuentra en la vagina cerca de los labios de la vulva.

La metástasis es poco usual, presentándose metástasis de TVT en los nódulos linfocitarios regionales así como en la piel, labios, membranas de mucosas orales, anginas, hígado, ojos, riñones, peritoneo, pulmón, cerebro y el sistema nervioso central. En perras la metástasis se expande en la tráquea general interna, incluyendo cerviz (parte dorsal del cuello, que consta de siete vértebras, de varios músculos y de la piel), útero y los oviductos.

La quimioterapia es el tratamiento de elección, aunque también se ha utilizado la Vincristina, sustancia que se obtiene de una planta alcaloide. La vincristina actúa inhibiendo la mitosis en la metafase, ha sido usada en combinación con ciclofosfamida y metotrexato con excelentes resultados; si alguno de éstos se aplica

sin combinarse no hay buena respuesta, provocando efectos colaterales. La efectividad del tratamiento se observa de los catorce a veintiún días con disminución del tamaño del tumor. La regresión espontánea del tumor raramente ocurre, la regresión normalmente ocurre seis meses después de que el primer tumor fue notado sobre los genitales. El tratamiento es un transplante de inmunidad con anticuerpos antitumorales específicos de la clase IgG (9,10,11,12).

4.3 CASIOPEÍNA II

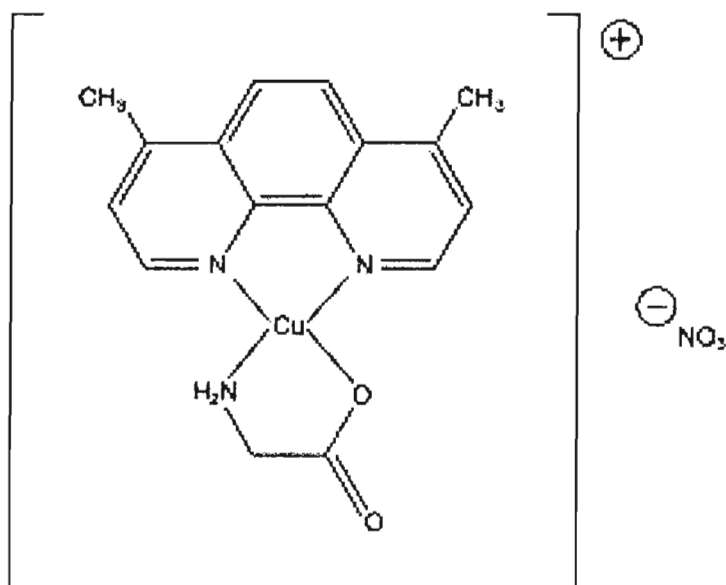
La Dra. Lena Ruíz y un grupo de investigadores de la Facultad de Química han diseñado la síntesis de los compuestos de casiopeínas.

Las casiopeínas han sido estudiadas y sometidas a una gran variedad de pruebas certificando su actividad antitumoral, de acuerdo con las normas internacionales de Cancer Chemotherapy National Service Center y los resultados demuestran que las casiopeínas tienen actividad citostática, citotóxica y antineoplásica.

Las casiopeínas contienen Cu (II) y quelatos diimina con quelatos aminoacidatos o donadores (OO), como se muestra en la fórmula (13).

FÓRMULA DE CASIOPEÍNA II

Casiopeína II (Cu (4,7- dimetil- 1, 10 -fenantrolina) (glicina) NO₃)



La casiopeína II es un fármaco antineoplásico, cuya efectividad se probó en HeLa, CaLo, líneas celulares de carcinoma cérvico-uterino humano. En transplantes de tumor de humano a ratón, en Leucemia murina L-1210, Melanoma murino B16, Sarcoma murino S180 y Carcinoma de pulmón de Lewis murino, los resultados fueron satisfactorios (14).

De los resultados que se obtuvieron en los experimentos, se concluyó que la casiopeína II fragmenta al DNA de las células tumorales a través de la inducción por apoptosis, desintegra la célula en pequeños fragmentos unidos a la membrana ocasionando la muerte celular. (15) Además de una oxidación, que se demostró con la disminución de superóxido dismutasa (SOD), ya que esta enzima es la que regula la concentración intracelular de oxígeno, confirmándolo con un incremento en la oxidación de lipoproteínas de baja densidad. Por último el efecto tóxico induce la hemólisis. (16,17) El rango de parámetros hematológicos fue examinado en ratas después de la administración intravenosa de casiopeína II a una dosis de 5mg/kg, las muestras de sangre se tomaron a las 12 horas y 5 días después, con un 20% de reducción de hematocrito y hemoglobina comparada con el grupo control. (18)

En los estudios farmacocinéticos, la casiopeína II se une a las proteínas plasmáticas y posteriormente es transportada hacia los órganos: hígado y riñón.

4.3.1 ESTRATEGIA DE MEDIR COBRE Y ZINC RELACIONADO CON EL USO DE CASIOPEÍNA II

En el experimento se analizó la concentración de cobre y zinc en sangre después de administrar casiopeína II, un anticanceroso que es probado en perros con tumor venéreo transmisible, determinando su efectividad en este tipo de tumores. Las casiopeínas son compuestos de coordinación con cobre como centro metálico por lo que al cuantificar el cobre se determina la concentración de la casiopeína II.

Es importante enfatizar que el cobre y el zinc participan en una variedad de funciones como el crecimiento, la respuesta inmune y son antioxidantes, entre otras. Una enzima fundamental en la oxidación es la superóxido dismutasa (SOD), cuya función es catalizar la dismutación del anión del superóxido, por lo que evita la toxicidad del oxígeno. La función del cobre en esta enzima involucra el traslado del electrón al oxígeno molecular. Por otra parte, el zinc juega un papel estructural en la enzima ya que participa en sitios específicos como antioxidante y se liga a los grupos sulfhidrilo en las proteínas protegiéndolos de la oxidación, actuando como un cofactor.(18,19,20) Además en procesos oxidativos se relacionó cierto comportamiento en ambos metales, su desequilibrio se debe a un estado de tensión oxidante, por lo que hay una relación estricta entre la proporción del cobre / zinc y la carga del oxidante sistémica favoreciendo a enfermedades como la arteriosclerosis, infarto al miocardio y estrés, entre otras.

Ejemplos de cambios en la relación de cobre/zinc son:

- Un decremento de zinc y un incremento de cobre en los niveles de suero, lo cual tiene lugar dentro de las primeras horas de un agudo infarto al miocardio.(21)
- Elevada concentración de cobre en suero y depresión de zinc en plasma, colectadas de individuos propensos a la violencia. (22) Se calcula el cociente cobre/zinc obteniendo en individuos sanos 1.02 y en individuos propensos a la violencia 1.52.

Las enfermedades degenerativas crónicas relacionadas con la edad avanzada fueron asociadas con un aumento significativo en la proporción del cobre/zinc y la tensión oxidante sistémica. (23,24)

Mucha atención fue enfocada sobre la relación de estos metales, sin embargo en condiciones de salud estos metales tienen concentraciones semejantes, difiere cuando existe una enfermedad. En este experimento se comparó la relación de cobre y zinc en perros sanos y en perros enfermos con tumor venéreo transmisible.

Los valores reportados en perros sanos (25).

Cobre..... 0.70 – 1.40 mg/L

Zinc..... 0.75 – 1.20 mg/L

Cociente Cobre /Zinc:

Límite inferior:

$$\frac{[\text{Cu}]}{[\text{Zn}]} \frac{0.70}{0.75} = 0.933 \text{ mg/L}$$

Límite superior:

$$\frac{[\text{Cu}]}{[\text{Zn}]} \frac{1.40}{1.20} = 1.16 \text{ mg/L}$$

El promedio de ambos límites

$$\frac{[\text{Cu}]}{[\text{Zn}]} = 1.046 \text{ mg/L}$$

Por lo que también se calculó el cociente en los perros enfermos, al empezar el tratamiento y al finalizarlo.

4.3.1.1 FUNCIONES DEL COBRE

Los estados de oxidación del cobre son Cu (I) y Cu (II), el Cu (I) se oxida a Cu (II), es un elemento vital ya que participa en muchas funciones en el organismo como:

- El cobre actúa para mantener la integridad de la vaina de mielina que rodea a las fibras nerviosas.
- Interviene en la formación del hueso y tejido conectivo.
- En la formación de la melanina de la piel y del pelo.
- Formación de hemoglobina, es esencial para la utilización del hierro.
- Participa en la función cardíaca.
- Favorece la función trombótica, ayudando a la coagulación.
- Participa en la presión arterial.
- Esencial como catalizador para las uniones cruzadas de colágeno.
- Formación de elastina.

El cobre puede ser caracterizado como un nutriente antioxidante, ya que actúa en las enzimas oxidativas. Así el cobre se oxida de Cu (I) a Cu (II) y el oxígeno se reduce de O₂ a H₂O, en enzimas como: Superóxido dismutasa, Catalasa, Peroxidasa, Citocromo oxidasa, Ceruloplasmina, Fenol oxidasa, Lisina oxidasa, Galactosa oxidasa y Amino oxidasa, entre otras.

Los eritrocitos están en un continuo estrés oxidativo y requieren de un mecanismo de defensa, reduciendo el oxígeno y esto se da gracias a las oxidasas dependientes del cobre. Algunos estrógenos alteran la distribución subcelular de cobre en el hígado, incrementando los niveles de cobre en el plasma para inducir la síntesis de ceruloplasmina.

El cobre se absorbe en el intestino delgado, es transportado en el suero inicialmente a la albúmina y más tarde a ceruloplasmina. En la sangre se encuentra en la misma proporción en el plasma y en los glóbulos rojos. El 80% del cobre del plasma se encuentra en la ceruloplasmina y α -2 globulina, el resto débilmente ligado a seroalbúmina. El cobre es almacenado de preferencia en el hígado, en menor

cantidad se almacena en el cerebro, médula ósea, bazo, corazón y riñón. La bilis es el camino normal de excreción del cobre; las heces contienen cobre, el que se ha vertido al intestino a través de la secreción biliar y solamente un 4% del cobre ingerido abandona el organismo en la orina. (26,27,28,29)

4.3.1.2 FUNCIONES DEL ZINC

El Zn (II) actúa como un ácido de Lewis; un ácido de Lewis es una sustancia que puede aceptar un par de electrones para formar un enlace covalente.

El zinc es un elemento esencial y algunas de sus funciones en el organismo son:

- Favorece la capacidad de aprendizaje
- Ejerce una acción favorable en la cicatrización de heridas.
- Favorece el crecimiento.
- Aumenta el sentido del gusto (incrementando el apetito)
- Actúa en los cambios de piel.
- Existe una relación entre el zinc y la acción de hormonas como: Insulina, Glucagon, FSH, LH y Corticotropina.
- Ayuda a la espermatogenesis, alargando la vida del espermatozoide en la eyaculación.
- Interactúa con los receptores de esteroides: andrógenos, estrógenos.
- El zinc está relacionado a la integridad estructural del DNA, intervienen enzimas en la replicación, reparación y transcripción del DNA.
- Protege la capacidad de descondensación en la etapa de transferencia del genoma masculino.
- Interviene ayudando al desarrollo normal de ovarios, embarazo, parto y lactancia.

El zinc es componente de varias enzimas, algunas de ellas son:

- Anhidrasa carbónica, enzima que se encuentra principalmente en los glóbulos rojos y en las células parietales del estómago, cuya función es el transporte de CO₂ en la sangre.
- Carboxipeptidasa A y B, cataliza la hidrólisis de los restos C-terminales de aminoácidos, péptidos y proteínas.
- Fosfatasa alcalina, cataliza la hidrólisis de los ésteres fosfóricos de alcoholes primarios, secundarios, fenoles y mononucleótidos.
- Peptidasas, hidrolizan los péptidos disociando un resto terminal con un grupo amino libre.
- Deshidrogenasas (alcohol, lactato, malato, glutamato), catalizan la deshidrogenación, requiere NAD como coenzima.
- DNA y RNA polimerasas, cataliza la síntesis de los polinucleótidos a partir de mononucleótidos.

El zinc se absorbe sobre todo en el duodeno y se excreta con las heces; la absorción del zinc decrece con una deficiencia de piridoxina o triptofano.

La mayor parte del zinc se encuentra en el hígado, músculo, órganos sexuales masculinos, huesos, tejido epidérmico y sangre; encontrándose en menor cantidad en páncreas, riñón e hipófisis.

En la sangre el 75% del zinc se encuentra en los eritrocitos, el 22% en suero y 3% en leucocitos. (30,31,32)

4.3.1.3 TOXICIDAD DE COBRE, ZINC Y CASIOPEÍNA II

La toxicidad de cobre y zinc es poco usual, los órganos más afectados son: gastrointestinales, hígado y riñón.

TOXICIDAD DE COBRE.

La ingestión de sulfato de cobre provoca los siguientes síntomas : vómito de color azul-verdoso, diarrea acuosa o hemorragia, lesión hepática con ictericia, hemólisis, hipotensión, colapso y convulsiones.

TOXICIDAD DE ZINC.

La toxicidad de zinc es baja en los seres humanos, se producen síntomas de: irritación gastrointestinal aguda, vómito, dolor urente en la boca y faringe, diarrea acuosa, arqueo y lesión hepática con ictericia. Hiperglucemia después de una dosis alta de zinc. La absorción de zinc se inhibe cuando la dieta contiene un exceso de calcio, cobre o ácido fítico. (33,34)

TOXICIDAD DE CASIOPEÍNA II.

La DL50 en ratones por vía intravenosa es de 15.85 mg/Kg.

Las lesiones que se presentan en los órganos como: pulmón, bazo, riñón, cerebro e hígado, presentan las siguientes características:

- Engrosamiento vascular en el pulmón, esto se debe a los cambios de presión intra y extravasculares.
- Congestión de bazo, aumenta megacariocitos.
- Congestión renal, principalmente en glomérulos.
- Congestión cerebral.
- Congestión hepática. (35)

La dosis que se utilizó en este experimento fue de 4mg/kg. Busch señala que se debe utilizar $\frac{1}{4}$ de la DL50 en ratones para comenzar la búsqueda de dosis terapéutica en perros. (36)

4.4 ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA

Si a un átomo se le aplica energía de una magnitud adecuada ésta será absorbida por él provocando que los electrones exteriores de los niveles energéticos se muevan a un estado excitado. Para ello se utiliza energía de longitud de onda específica ya que es una propiedad característica de cada elemento; la absorción atómica utiliza la región del espectro visible y ultravioleta. (37)

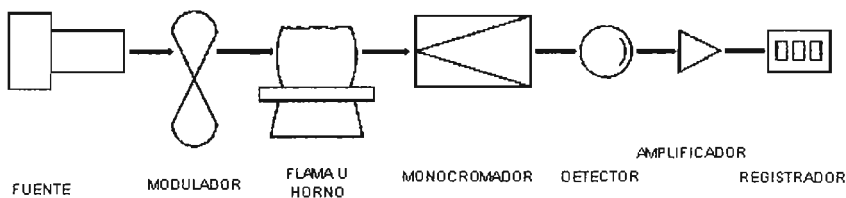
La absorbancia es el término que caracteriza la absorción de la luz, por lo que es fundamental determinar la longitud de onda y la cantidad de luz absorbida. La concentración de los elementos absorbentes es directamente proporcional a la absorbancia.

En absorción atómica se utiliza esta proporcionalidad directa entre absorbancia y concentración. Se emplean soluciones estándar, es decir concentraciones conocidas del elemento de interés, se mide su absorbancia. Se grafican los resultados de la absorbancia con respecto a la concentración, obteniéndose una línea recta establecida por la ley de Lambert-Beer.

Es importante fijar el intervalo de concentración lineal. Así, al medir la absorbancia de muestras de concentración desconocida del elemento de interés, interpolando en la línea recta se consigue la concentración de la muestra.

Se requiere de un aparato llamado Espectrofotómetro de Absorción Atómica, integrado de la siguiente manera. (38)

Espectrofotómetro de absorción atómica de un solo haz.



FUENTE DE RADIACIÓN

Su función es proporcionar una línea de emisión angosta característica del elemento específico.

Se utilizan de dos tipos, la lámpara de cátodo hueco y la lámpara de descarga sin electrodo. La lámpara de cátodo hueco, consiste de un ánodo y un cátodo, que se encuentran en un cilindro de vidrio sellado y lleno de Neón o Argón. Al extremo del cilindro tiene una ventana transparente que permite la salida de la radiación emitida.

La lámpara de descarga sin electrodo contiene un bulbo de cuarzo lleno con el elemento; el bulbo está envuelto por un soporte cerámico, sobre el cual se enrolla la antena de un generador de radio frecuencia.

Las dos lámparas son precisas, sin embargo la lámpara de descarga sin electrodo se usa para elementos volátiles y ofrece mejores límites de detección.

MODULADOR

La radiación emitida por la lámpara es modulada, con la finalidad de efectuar una amplificación selectiva de la señal de emisión. Se utilizan dos tipos de moduladores, el modulador mecánico y el modulador eléctrico, la diferencia radica en las corrientes medidas; el modulador mecánico trabaja con una corriente directa y el modulador eléctrico con una corriente alterna.

FLAMA U HORNO

En la celda de muestreo que puede ser un quemador (flama) o un tubo de grafito (horno) se producen átomos del elemento de interés y éstos absorben energía la cual es cuantificada.

La función del quemador es producir la flama con la mezcla del oxidante (aire) y el combustible (acetileno), la temperatura de la flama es de aproximadamente 2125°C a 2400°C; la cual se utiliza para disociar las moléculas de sus uniones químicas produciendo átomos libres.

El proceso es el siguiente:

En la flama se utiliza un nebulizador regulable cuya función es introducir la muestra hacia el quemador y generar un aerosol muy fino, la muestra emerge en el

nebulizador debido a la capilaridad facilitada por el oxidante (aire), creando un vacío lo cual favorece la entrada de la muestra a una alta velocidad. Para mejorar el tamaño de las gotas y su distribución se utiliza una esfera de impacto ó un spoiler, colocada cerca del orificio del nebulizador. Las gotas golpean el aparato de impacto casi a una velocidad sónica, dando por resultado una fragmentación que aumenta la masa del material vaporizado de un 50 a un 100 %.(39)

En la cámara de premezcla, la muestra se mezcla con los gases combustible y oxidante, siendo llevada a la cabeza del quemador en donde se efectúa la evaporación del disolvente, y la licuefacción de la muestra, es decir la transición de sólido a vapor y finalmente las moléculas se disocian en átomos individuales y éstos absorben la energía originada de la fuente de radiación.

MONOCROMADOR.

El monocromador separa, aísla y controla la intensidad de la energía radiante que llega al detector. Trabaja como un filtro el cual selecciona una región específica del espectro y rechaza los haces de luz de longitud de onda fuera de esta región.

DETECTOR.

Convierte la señal de luz en señal eléctrica. El detector puede ser un fotomultiplicador, contiene un cátodo foto emisor y varios ánodos (dinodos). El cátodo está cubierto con mezclas de metales alcalinos fácilmente ionizados con Antimonio, Bismuto y Plata.

AMPLIFICADOR Y REGISTRADOR

El amplificador aumenta la señal eléctrica y el registrador, como su nombre lo indica, sirve para observar y anotar la señal correspondiente transforma la señal eléctrica en absorbancia. (40)

4.5 HORNO DE MICROONDAS MDS 2000

El horno de microondas está diseñado para efectuar, en el laboratorio, digestiones, disoluciones, hidrólisis o secado de una gran variedad de materiales, así las muestras quedan preparadas para analizarse por absorción atómica, cromatografía de gases, cromatografía de líquidos u otra técnica analítica.

Las ventajas de usar este equipo son:

- El equipo es automático, se programan las corridas de cada digestión.
- El programa puede ser almacenado para utilizarse después.
- Es rápido, confiable y preciso por lo que se reducen costos.
- Trabaja en condiciones altas de presión y temperatura, debido a ello se efectúan reacciones imposibles de realizar en recipientes abiertos.
- El MDS- 2000 está equipado con un sistema sensor para detectar problemas, mostrando una señal de alarma en la pantalla del horno.
- No hay pérdida de los elementos volátiles.
- Reduce el consumo de reactivos.
- No existe contaminación de muestras.

Los reactivos para la digestión son ácidos minerales concentrados como: ácido nítrico y ácido clorhídrico solos o mezclados.

El horno de microondas consta de un carrusel con 12 vasos ACV de un material resistente y transparente a la energía de microondas. Al centro del carrusel se encuentra el vaso de desechos que se conecta a cada vaso. De las 12 muestras que se colocan en el carrusel una de ellas monitorea la presión, determinando el progreso en la digestión. (41)

Las especificaciones de los vasos ACV son las siguientes:

Presión máxima de trabajo permitida -----	200 Psig / 13.8 bar
Temperatura máxima de operación -----	200°C

Peso máximo de una muestra orgánica -----	0.5 gramos
Volumen del vaso -----	100 ml
Elementos de seguridad -----	Membrana de ruptura

Materiales de construcción:

Anillo -----	Teflón ^R PFA
Interior -----	Teflón ^R PFA
Cuerpo -----	Ultem ^R polieterimida
Membrana de ruptura -----	Teflón ^R PFA

5.0 DESARROLLO EXPERIMENTAL

Al realizar un experimento es importante verificar el procedimiento, el objetivo de verificar un procedimiento de análisis es demostrar que es útil para las muestras que se están trabajando. Se requieren estudios de laboratorio para evaluar la capacidad del método para determinar concentraciones pequeñas; utilizando los siguientes parámetros estadísticos.

- Límite de detección y el límite de cuantificación para cobre y zinc.
- Linealidad.
- Intervalo de confianza para cobre y zinc.

Al hacer estas pruebas estadísticas se descartan los errores determinados por el método. (42)

5.1 DETERMINACIÓN DEL LÍMITE DE DETECCIÓN Y DEL LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN PARA COBRE Y ZINC.

El límite de detección es la concentración mínima que puede ser detectada con seguridad estadística razonable, es decir la señal más baja que no es afectada por el ruido del aparato. El límite de cuantificación es la concentración mínima determinada cuantitativamente en un nivel aceptable de precisión y repetibilidad. Como medida para la precisión se emplea la desviación estándar, al efectuar varias mediciones. Y la repetibilidad como la concordancia obtenida en los resultados independientes. Ambos términos son de gran importancia analítica. (43)

5.2 DETERMINACIÓN DE LA LINEALIDAD DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN PARA COBRE Y ZINC

La curva de calibración es lineal en un intervalo de concentraciones, en una región en la cual se observa que la absorbancia es directamente proporcional a la concentración, establecida por la ley de Beer. Al continuar aumentando la concentración, la absorbancia presenta una desviación en el desarrollo de la línea recta, por tal motivo es necesario efectuar un estudio para determinar la linealidad.(44)

5.3 DETERMINACIÓN DEL INTERVALO DE CONFIANZA PARA COBRE Y ZINC

El intervalo de confianza es el intervalo en el cual podemos afirmar con cierta probabilidad de que los resultados están incluidos en dicho intervalo.

El intervalo de confianza se representa con la siguiente fórmula:

$$IC = \bar{X} \pm t \cdot \frac{S}{\sqrt{n}}$$

Donde: IC = Intervalo de confianza

\bar{X} = Media muestral

t = Distribución t student

S = Desviación estándar

n = Número de eventos

El error máximo de estimación E para muestras pequeñas ($n \leq 30$) extraída de una población normal con varianza desconocida. Mientras más cercanos sean los valores el error es menor.

$$E = t \cdot \frac{S}{\sqrt{n}}$$

Así E = Error máximo de estimación

t = Distribución t student

S = Desviación estándar

n = Número de eventos

Los límites para un intervalo de confianza quedan establecidos así:

$$IC = \bar{X} \pm E$$

El límite inferior de confianza $\bar{X} - E$ se determina por L 1.

El límite superior de confianza $\bar{X} + E$ se denota por L 2.

El error máximo E representa la precisión, es decir la reproducibilidad de las medidas. (45,46)

5.4 CONDICIONES ESTÁNDAR DE LA ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA PARA COBRE Y ZINC

Las condiciones instrumentales que se deben tomar en cuenta para la metodología son:

- Tipo de lámpara.
- Corriente aplicada.
- Ancho de banda.
- Longitud de onda.
- Tipo de gases a utilizar

CONDICIONES PARA COBRE:

Aparato: Atomic Absorption Spectrophotomer. Perkin-Elmer 2380	E.A.A. con flama. Esfera de impacto.
Lámpara	Cobre (Cátodo Hueco) Perkin-Elmer
Corriente	15- 25 mA
Longitud de onda	324.8 nm
Ancho de banda	0.7 nm
Gases	Aire – Acetileno

CONDICIONES PARA ZINC:

Aparato: Atomic Absorption Spectrophotomer. Perkin-Elmer 2380	E.A.A con flama. Deflector de flujo
Lámpara	Zinc (Cátodo Hueco) Perkin-Elmer
Corriente	15- 20 mA
Longitud de onda	213.9 nm
Ancho de banda	0.7 nm
Gases	Aire – Acetileno

Para el desarrollo experimental es necesario contar con equipo, reactivos y material de laboratorio en general, los cuales se mencionan a continuación.

5.5 MATERIAL DE VIDRIO

Para la administración de la Casiopeína II y toma de muestras de sangre.

- Matraz volumétrico de 250 mL
- Vaso de precipitado de 250 mL
- Probeta graduada de 250 mL
- Pipeta graduada de 10 mL
- Jeringas de 1 mL y 3mL
- Espátula cromo-níquel
- Algodón.
- Cronómetro.
- Balanza analítica.
- Tubos de ensaye.

Tratamiento de la muestra.

- Viales de plástico de 10 mL
- Agitador de vidrio.
- Pipeta graduada de 5 mL
- Pipetas volumétricas de 1 mL
- Perilla.
- Vasos de precipitados de 10 mL
- Vasos de precipitados de 50 mL
- Matraces volumétricos de 10 mL
- Micropipetas de 100 μ L y 1000 μ L.
- Piseta.

5.6 REACTIVOS

- Casiopeína II.
- Solución salina fisiológica.
- Ácido nítrico suprapuro, grado espectro Merck.
- Agua desionizada.
- Solución estándar de cobre (1000 mg/L) Perkin - Elmer.
- Solución estándar de zinc (1000 mg/L) Perkin - Elmer.
- Ácido nítrico 10%.

5.7 EQUIPOS

- Espectrofotómetro de Absorción Atómica. Perkin-Elmer 2380.
- Horno de Microondas MDS 2000

5.8 MUESTREO

Para la realización de este experimento se utilizaron 5 perros criollos con Tumor Venéreo Transmisible en fase activa, como se muestra en la siguiente tabla.

Perro	Edad	Sexo	Peso	Clasificación del tumor según Amber et al (47)
1	3 años	Macho	30 Kg	Tumor de 1-3 cm. Invasión mínima
2	3 años	Hembra	21 Kg	Tumor de más de 3 cm. Tumor que afecta estructuras aledañas. Invasivo
3	2 años	Hembra	10 K g	Tumor de más de 3 cm. Invasión profunda
4	6 años	Hembra	19 Kg	Tumor que afecta estructuras aledañas. Invasivo.
5	3 años	Hembra	25 Kg	Tumor de más de 3 cm. Invasión profunda.

El experimento se inició con un tratamiento constante de casiopeína II a los perros enfermos, se administró una dosis de 4 mg/Kg por vía endovenosa a goteo lento por un lapso de 1 a 2 horas, cada 4 días. Se les administró, los días: 1, 5, 9, 13, 17 y 21. El muestreo consistió en sacar sangre de los animales, aproximadamente 2 ml por vena cefálica con un catéter del número 20, en los siguientes tiempos postinyección: 0.0, 0.33, 0.66, 1, 2, 4, 8, 12 y 24 horas, en la primera y última administración de casiopeína II se tomó la muestra para cuantificar la concentración de cobre y zinc en sangre.

5.9 TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS PARA SU ANÁLISIS

El material de vidrio que se utilizó se lavó con agua y jabón libre de iones, posteriormente se colocó en un recipiente con ácido nítrico al 10% por 24 horas, finalmente se lavó con agua desionizada y se dejó secar a temperatura ambiente, con la finalidad de evitar impurezas. Se trabajó en la campana de extracción de gases.

Se midió el volumen total de la sangre en la jeringa utilizada a diferentes tiempos: 0.0, 0.33, 0.66, 1, 2, 4, 8, 12 y 24 horas, se depositaron las muestras en los vasos de teflón del horno de microondas y se añadieron 3 ml de ácido nítrico suprapuro y se dejó reaccionar. Se colocaron los vasos en el carrusel, al vaso que se utilizó de blanco se le agregó ácido nítrico suprapuro. El carrusel fue introducido en el horno de microondas y se programó una corrida de digestión. Al finalizar el programa de digestión, se dejó bajar la presión para poder abrir los vasos. Las muestras digeridas se transfirieron en matraces volumétricos de 10 ml y se aforaron a la marca con agua desionizada. Las muestras fueron leídas en el espectrofotómetro de absorción atómica.

5.10 PREPARACIÓN DE LAS CURVAS DE CALIBRACIÓN PARA COBRE Y ZINC

ESTÁNDARES DE COBRE

A partir de una solución estándar de cobre (1000 mg/L) se tomó una alícuota de 1 mL con una pipeta volumétrica y se vació en un matraz aforado de 10 mL completando el volumen con agua desionizada, esta solución tuvo una concentración de cobre de 100 mg/L. De la solución de cobre (100 mg/L) se tomaron 20 μ L y se depositaron en un matraz aforado de 10 mL, llevando al volumen con agua desionizada, así mismo se realizó con 50 μ L y 100 μ L efectuando por triplicado cada concentración. Las concentraciones de las soluciones de cobre son: 0.2 mg/L, 0.5 mg/L y 1.0 mg/L.

ESTÁNDARES DE ZINC

Se inició con una solución estándar de zinc (1000 mg/L) utilizando una pipeta volumétrica de 1 mL se tomó el volumen indicado y se transfirió a un matraz aforado de 10 mL, aforando con agua desionizada hasta la marca. Finalmente la solución tuvo una concentración de zinc de 100 mg/L. De la solución de zinc (100 mg/L) se tomaron alícuotas de 20 μ L, 50 μ L y 100 μ L y se transfirieron cada una por separado a matraces volumétricos de 10 mL, cada matraz se aforó con agua desionizada, haciéndolo por triplicado para cada concentración: 0.2 mg/L, 0.5 mg/L y 1.0 mg/L.

6.0 RESULTADOS

6.1 DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS ANALÍTICOS

LÍMITE DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN PARA COBRE

Límite de detección para cobre:

Se prepararon 30 soluciones de cobre de concentración 0.05 mg/L y se determinó la absorbancia de cada una de ellas, se calculó la absorbancia promedio y la desviación estándar para sustituirla en la fórmula de límite de detección.

$$LD = \frac{3SC}{\bar{X}}$$

LD = Límite de detección

C = Concentración

C = 0.05 mg/L

S = Desviación estándar

S = 0.000287

\bar{X} = Media de las absorbancias

\bar{X} = 0.006

Substituyendo, el límite de detección para cobre es LD = 0.006 mg/L

Límite de cuantificación para cobre:

Se prepararon 30 soluciones de cobre de concentración 0.05 mg/L, determinando la absorbancia media, así como su desviación estándar para representarla en la fórmula.

$$LQ = \frac{10SC}{\bar{X}}$$

LQ = Límite de cuantificación

C = Concentración

C = 0.05 mg/L

S = Desviación estándar

S = 0.000287

\bar{X} = Media de las absorbancias

\bar{X} = 0.006

El límite de cuantificación para cobre es LQ = 0.020 mg/L

LÍMITE DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN PARA ZINC

Límite de detección para zinc:

Se prepararon 30 soluciones de 0.05 mg/L de zinc y se procedió de la misma manera que para el cobre.

$$C = 0.05 \text{ mg/L}$$

$$S = 0.000393$$

$$\bar{X} = 0.0126$$

El límite de detección para el zinc es $LD = 0.004 \text{ mg/L}$

Límite de cuantificación para zinc:

Efectuando el mismo seguimiento empleado para el cobre

$$C = 0.05 \text{ mg/L}$$

$$S = 0.000393$$

$$X = 0.0126$$

El límite de cuantificación para zinc es $LQ = 0.015 \text{ mg/L}$

Es importante conocer los límites de detección y de cuantificación, ya que arriba de estos valores existe menor incertidumbre en los resultados.

INTERVALO LÍNEAL PARA COBRE

Se prepararon 10 soluciones patrón de cobre de diferentes concentraciones por triplicado, se calculó la media de cada absorbancia y se graficó la absorbancia vs la concentración para decidir el intervalo lineal que cumple con la ley de Lambert-Beer.

Tabla No. 1

CONCENTRACIÓN (mg/L)	ABSORBANCIA
0.05	0.008
0.1	0.016
0.2	0.033
0.3	0.049
0.5	0.082
1.0	0.161
2.0	0.328
3.0	0.445
4.0	0.514
5.0	0.544

REGRESIÓN LÍNEAL DE LA GRÁFICA

Curva de calibración hasta 2 mg/L.

$$b = -0.0003$$

$$m = 0.164$$

$$r = 0.9999$$

Curva de calibración hasta 3 mg/L.

$$b = -0.0046$$

$$m = 0.151$$

$$r = 0.9981$$

Curva de calibración hasta 4 mg/L

$$b = 0.0140$$

$$m = 0.135$$

$$r = 0.9921$$

Curva de calibración hasta 5 mg/L

$$b = 0.0268$$

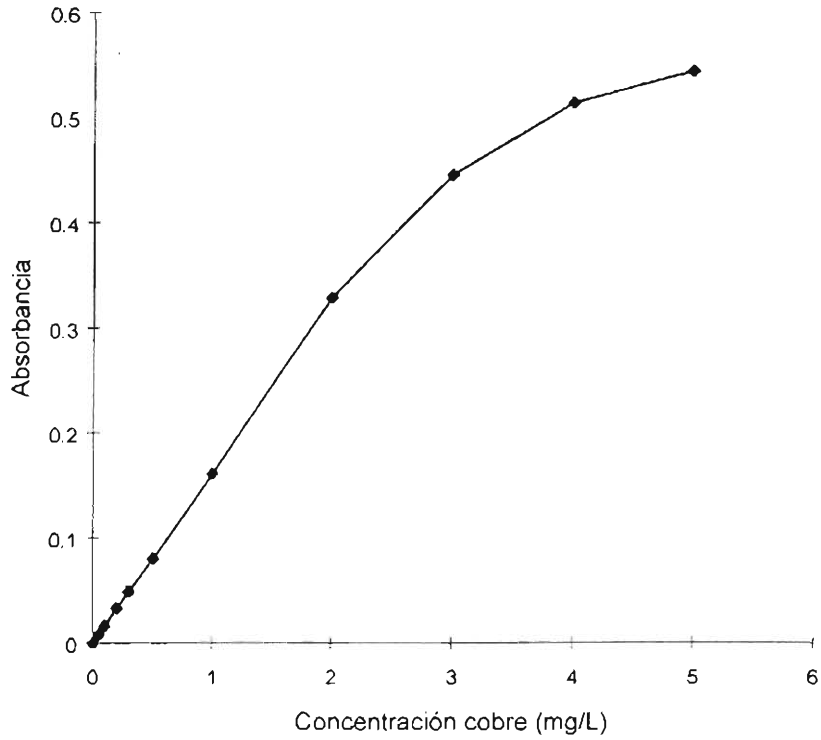
$$m = 0.118$$

$$r = 0.9811$$

El intervalo lineal que se observó en la curva de calibración de cobre fue hasta 2 mg/L, confirmándolo con la regresión lineal, ya que tuvo el valor más alto del coeficiente de correlación, cercano a 1.

Gráfica No.1

Intervalo lineal para cobre



En la gráfica se observa la línea recta hasta 2mg/L, es decir si cumple con la ley de Lambert-Beer hasta esta concentración.

INTERVALO LÍNEAL PARA ZINC.

Se prepararon 10 soluciones de zinc de concentraciones diferentes, cada concentración por triplicado, determinando la media de cada absorbancia. Se graficó absorbancia vs concentración para obtener el intervalo lineal.

Tabla No.2

CONCENTRACIÓN (mg/L)	ABSORBANCIA
0.05	0.012
0.1	0.024
0.2	0.047
0.3	0.076
0.5	0.123
1.0	0.246
2.0	0.493
3.0	0.696
4.0	0.794
5.0	0.934

REGRESIÓN LÍNEAL DE LA GRÁFICA

Curva de calibración hasta 2 mg/L

$$b = -0.0004$$

$$m = 0.246$$

$$r = 0.9999$$

Curva de calibración hasta 3 mg/L

$$b = 0.0044$$

$$m = 0.235$$

$$r = 0.9992$$

Curva de calibración hasta 4 mg/L

$$b = 0.0188$$

$$m = 0.210$$

$$r = 0.9929$$

Curva de calibración hasta 5 mg/L

$$b = 0.0305$$

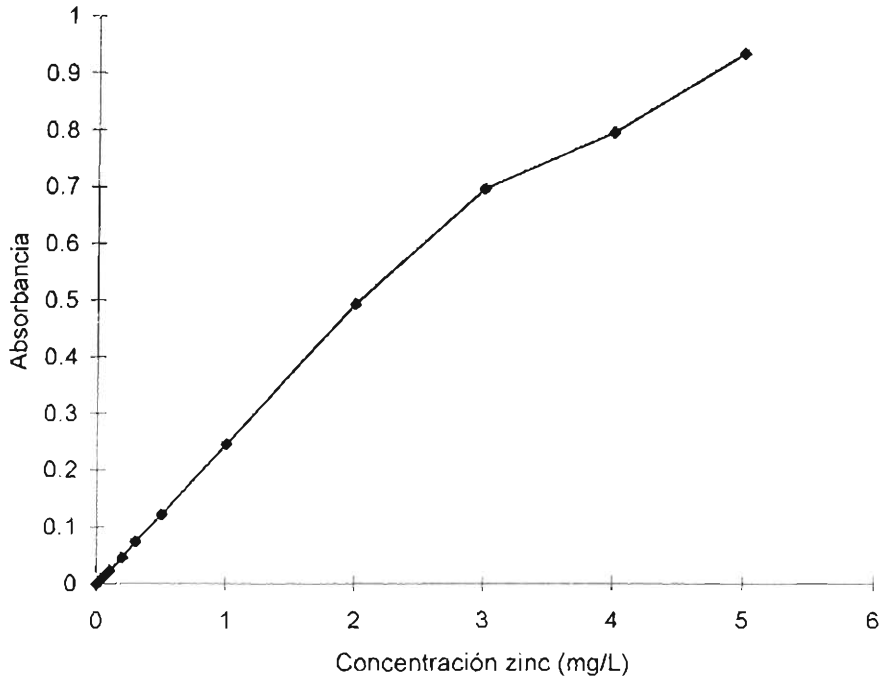
$$m = 0.194$$

$$r = 0.9912$$

En la curva de calibración el intervalo lineal del zinc fue hasta 2 mg/L, el valor más alto del coeficiente de correlación es en esta concentración.

Gráfica No.2

Intervalo lineal para zinc



En la gráfica se observa el intervalo lineal hasta 2 mg/L.

INTERVALO DE CONFIANZA PARA LAS CURVAS DE CALIBRACIÓN DE COBRE

Esta prueba se realizó examinando las curvas de calibración para cobre, después de haber establecido el intervalo lineal. Se prepararon 9 curvas de calibración de 0.2 mg/L, 0.5 mg/L y 1.0 mg/L, como se especifica a continuación:

Tabla No. 3

PRIMERA DOSIS DE CASIOPEÍNA II. CURVAS DE CALIBRACIÓN DE COBRE

	Curva de Calibración 1	Curva de Calibración 2	Curva de Calibración 3	Curva de Calibración 4	Curva de Calibración 5
Concentración Cobre (mg/L)	Absorbancia	Absorbancia	Absorbancia	Absorbancia	Absorbancia
0.2	0.018	0.017	0.018	0.018	0.018
0.5	0.043	0.042	0.043	0.043	0.043
1.0	0.085	0.085	0.085	0.084	0.085

Tabla No. 4

ÚLTIMA DOSIS DE CASIOPEÍNA II. CURVAS DE CALIBRACIÓN DE COBRE

	Curva de Calibración 2	Curva de Calibración 3	Curva de Calibración 4	Curva de Calibración 5
Concentración Cobre (mg/L)	Absorbancia	Absorbancia	Absorbancia	Absorbancia
0.2	0.017	0.018	0.018	0.018
0.5	0.042	0.043	0.042	0.042
1.0	0.085	0.084	0.085	0.084

Se analizaron las absorbancias de las 9 curvas de calibración de cobre, calculando la absorbancia media \bar{X} , la desviación estándar S y el error máximo E . Dando los siguientes resultados:

Tabla No. 5

Concentración de cobre (mg/L)	Absorbancia media \bar{X}	Desviación estándar S	Error máximo E
0.2	0.0178	0.0004	0.0003
0.5	0.0426	0.0005	0.0004
1.0	0.0847	0.0005	0.0004

En la tabla el valor de $t = 2.306$ los grados de libertad = $n-1$.

$9 - 1 = 8$, intervalo de confianza del 97.5 %

Intervalo de Confianza

$$IC = \bar{X} \pm E$$

$$\text{Así } E = t \cdot \frac{S}{\sqrt{n}}$$

Intervalo de confianza para la concentración de cobre 0.2 mg/L

$$E = 2.306 \cdot \frac{0.000440}{\sqrt{9}} = 0.0003$$

$$L1 = 0.0178 - 0.000338 = 0.017$$

$$L2 = 0.0178 + 0.000338 = 0.018$$

$$IC = 0.0178 \pm 0.0003$$

Intervalo de Confianza para la concentración de cobre 0.5 mg/L

$$E = 2.306 \cdot \frac{0.0005}{\sqrt{9}} = 0.0004$$

$$L1 = 0.0426 - 0.0004 = 0.042$$

$$L2 = 0.0426 + 0.0004 = 0.043$$

$$IC = 0.0426 \pm 0.0004$$

Intervalo de confianza para la concentración de cobre 1.0 mg/L

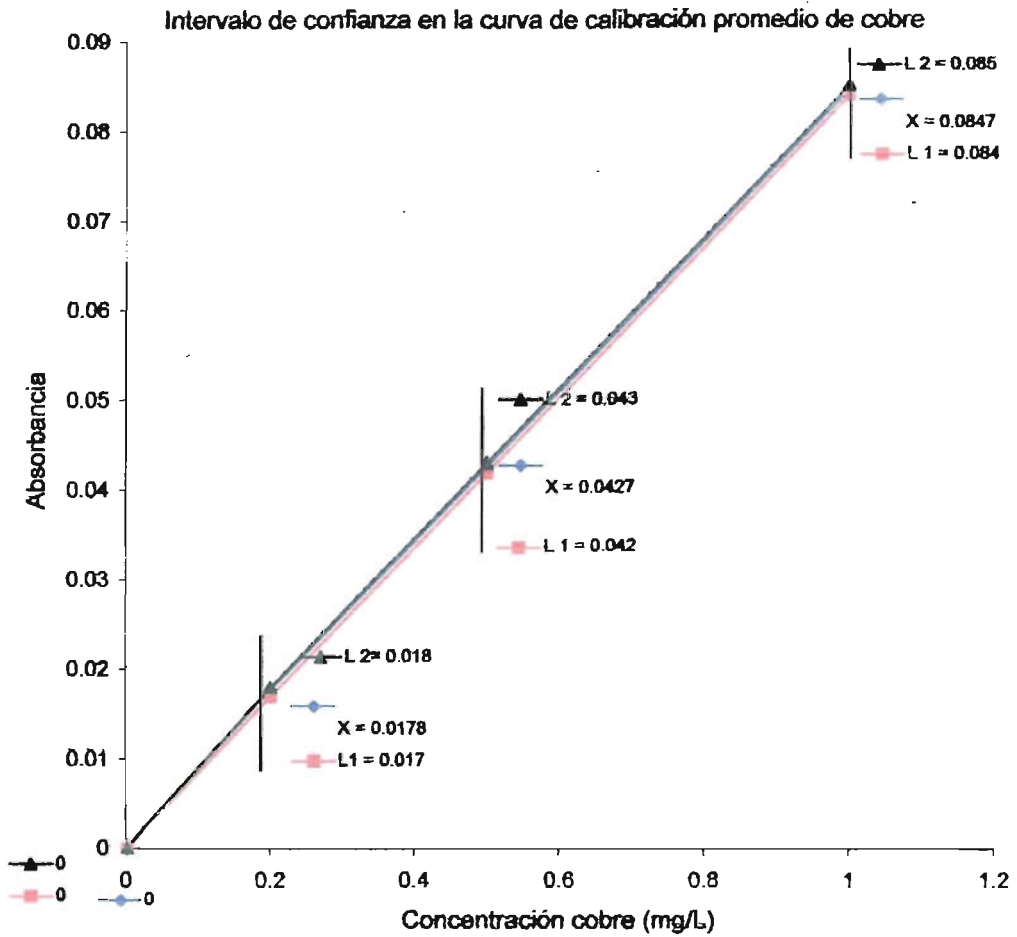
$$E = 2.306 \cdot \frac{0.0005}{\sqrt{9}} = 0.0004$$

$$L1 = 0.0846 - 0.000384 = 0.084$$

$$L2 = 0.0846 + 0.000384 = 0.085$$

$$IC = 0.0847 \pm 0.0004$$

Gráfica No.3



La gráfica presenta el promedio de las 9 curvas patrón de cobre y los intervalos de confianza con los límites L1 inferior y L2 superior

INTERVALO DE CONFIANZA PARA LAS CURVAS DE CALIBRACIÓN DE ZINC

Las curvas de calibración de zinc se analizaron de la misma manera que las de cobre. Se revisaron las concentraciones y las absorbancias de las 9 curvas de calibración de zinc para realizar este estudio.

PRIMERA DOSIS DE CASIOPEÍNA II. CURVAS DE CALIBRACIÓN DE ZINC

Tabla No.6

	Curva de Calibración 1	Curva de Calibración 2	Curva de Calibración 3	Curva de Calibración 4	Curva de Calibración 5
Concentración Zinc (mg/L)	Absorbancia	Absorbancia	Absorbancia	Absorbancia	Absorbancia
0.2	0.035	0.035	0.036	0.035	0.036
0.5	0.088	0.087	0.088	0.088	0.088
1.0	0.175	0.175	0.175	0.175	0.175

ÚLTIMA DOSIS DE CASIOPEÍNA II. CURVAS DE CALIBRACIÓN DE ZINC

Tabla No.7

	Curva de Calibración 2	Curva de Calibración 3	Curva de Calibración 4	Curva de Calibración 5
Concentración Zinc (mg/L)	Absorbancia	Absorbancia	Absorbancia	Absorbancia
0.2	0.036	0.036	0.036	0.036
0.5	0.088	0.087	0.088	0.087
1.0	0.174	0.174	0.174	0.175

Aplicando los parámetros estadísticos en los resultados de las gráficas, obtuve lo siguiente:

Tabla No.8

Concentración Zinc (mg/L)	Absorbancia media \bar{X}	Desviación estándar S	Error máximo E
0.2	0.0357	0.0005	0.0004
0.5	0.0877	0.0005	0.0004
1.0	0.1747	0.0005	0.0004

Intervalo de Confianza para la concentración de zinc 0.2 mg/L

$$E = 2.306 \cdot \frac{0.0005}{\sqrt{9}} = 0.0004$$

$$L1 = 0.0356 - 0.0004 = 0.035$$

$$L2 = 0.0356 + 0.0004 = 0.036$$

$$IC = 0.0356 \pm 0.0004$$

Intervalo de Confianza para la concentración de zinc 0.5 mg/L

$$E = 2.306 \cdot \frac{0.0005}{\sqrt{9}} = 0.0004$$

$$L1 = 0.0876 - 0.0004 = 0.087$$

$$L2 = 0.0876 + 0.0004 = 0.088$$

$$IC = 0.0876 \pm 0.0004$$

Intervalo de Confianza para la concentración de zinc 1.0 mg/L

$$E = 2.306 \cdot \frac{0.0005}{\sqrt{9}} = 0.0004$$

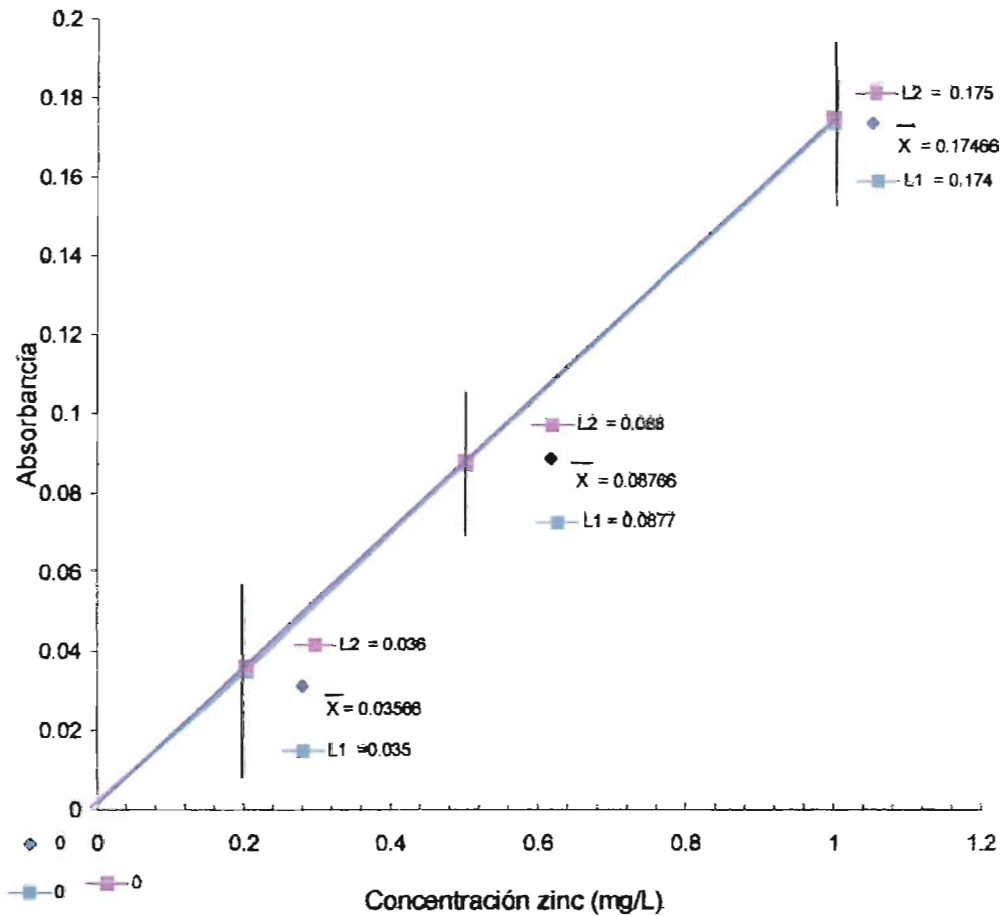
$$L1 = 0.1746 - 0.0004 = 0.174$$

$$L2 = 0.1746 + 0.0004 = 0.175$$

$$IC = 0.1746 \pm 0.0004$$

Gráfica No.4

Intervalo de confianza en la curva de calibración promedio de zinc



Esta gráfica muestra la línea recta promedio de las 9 curvas de calibración de zinc y los límites inferior y superior del intervalo de confianza.

6.2 ANÁLISIS DEL COMPORTAMIENTO DE COBRE Y ZINC

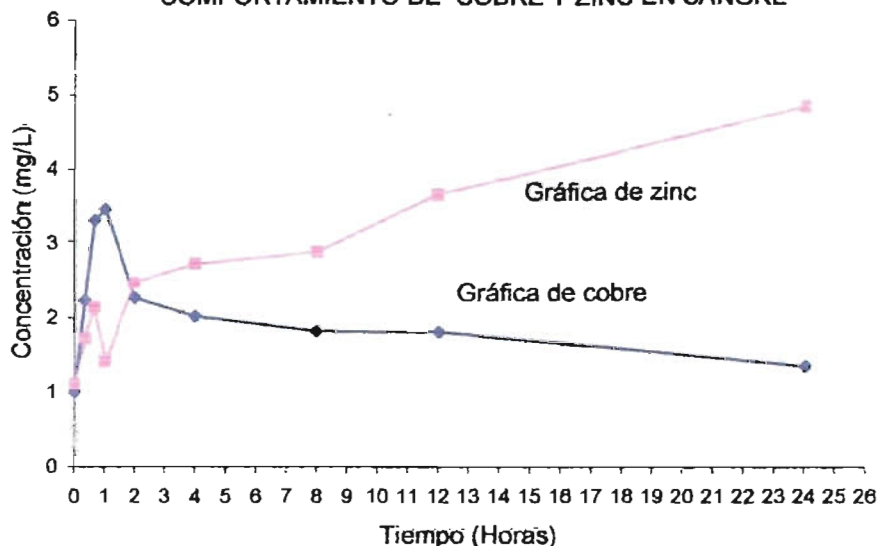
PERRO 1. PRIMERA DOSIS DE CASIOPEÍNA II. COMPORTAMIENTO DE COBRE Y ZINC EN SANGRE.

Tabla No. 9

Toma de muestras	Concentración de cobre en la muestra	Concentración de zinc en la muestra	Cociente cobre / zinc
Tiempo (Horas)	Cobre (mg/L)	Zinc (mg/L)	$\frac{[Cu]}{[Zn]}$
0.0	1.012	1.113	0.909
0.33	2.240	1.725	1.298
0.66	3.314	2.146	1.544
1.0	3.457	1.422	2.430
2.0	2.271	2.474	0.917
4.0	2.026	2.719	0.745
8.0	1.825	2.883	0.633
12.0	1.805	3.665	0.492
24.0	1.362	4.835	0.281

Gráfica No.5

PERRO 1. PRIMERA DOSIS DE CASIOPEÍNA II.
COMPORTAMIENTO DE COBRE Y ZINC EN SANGRE



En el tiempo inicial la concentración de cobre y zinc fueron casi iguales con un valor de 1 mg/L, en la 1ª hora la concentración de cobre asciende hasta 3.457 mg/L, en ese mismo tiempo la concentración de zinc desciende a 1.422 mg/L. Después la concentración de cobre disminuye y la concentración de zinc aumenta. El perro fallece a las 24 horas. Se anexa una tabla con esta información.

Tabla No. 10

Tiempo (Horas)	Concentración cobre(mg/L)	Concentración zinc (mg/L)
0	1.012	1.113
1	3.457	1.422
24	1.362	4.835

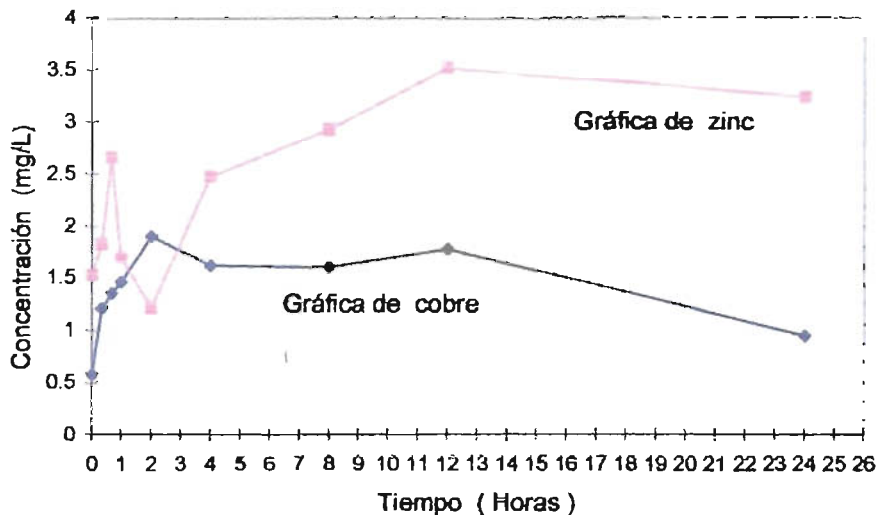
PERRO 2. PRIMERA DOSIS DE CASIOPEÍNA II. COMPORTAMIENTO DE COBRE Y ZINC EN SANGRE.

Tabla No. 11

Toma de muestras	Concentración de cobre en la muestra	Concentración de zinc en la muestra	Cociente cobre / zinc
Tiempo (Horas)	Cobre (mg/L)	Zinc (mg/L)	$\frac{[Cu]}{[Zn]}$
0.0	0.583	1.527	0.381
0.33	1.216	1.831	0.664
0.66	1.353	2.655	0.509
1.0	1.462	1.697	0.861
2.0	1.900	1.215	1.563
4.0	1.621	2.472	0.655
8.0	1.600	2.929	0.546
12.0	1.775	3.523	0.503
24.0	0.953	3.240	0.294

Gráfica No.6

PERRO 2. PRIMERA DOSIS DE CASIOPEINA II.
COMPORTAMIENTO DE COBRE Y ZINC EN SANGRE



En todas las gráficas se distinguen tres puntos importantes: el tiempo inicial, a la 2ª hora y finalmente a las 24 horas, por lo que se anexa una tabla en cada gráfica con esta información

Tabla No. 12

Tiempo (Horas)	Concentración cobre (mg/L)	Concentración zinc (mg/L)
0.0	0.583	1.527
2.0	1.900	1.215
24.0	0.953	3.240

En la gráfica se observa que en el tiempo de inicio la concentración de cobre es menor que la de zinc. A la 2ª hora se presentó un incremento en la concentración de cobre y en este mismo punto un decremento en la concentración de zinc. Posteriormente la concentración de cobre se redujo y la concentración de zinc aumentó.

PERRO 2. ÚLTIMA DOSIS DE CASIOPEÍNA II. COMPORTAMIENTO DE COBRE Y ZINC EN SANGRE.

Tabla No.13

Toma de muestras	Concentración de cobre en la muestra	Concentración de zinc en la muestra	Cociente cobre / zinc
Tiempo (Horas)	Cobre (mg/L)	Zinc (mg/L)	$\frac{[Cu]}{[Zn]}$
0.0	1.464	2.492	0.587
0.33	2.185	3.719	0.587
0.66	1.904	4.090	0.465
1.0	2.432	3.706	0.656
2.0	2.565	2.770	0.925
4.0	1.517	3.670	0.413
8.0	1.268	4.174	0.303
12.0	1.037	5.088	0.203
24.0	0.806	5.406	0.149

Gráfica No.7

PERRO 2. ÚLTIMA DOSIS DE CASIOPEÍNA II.
COMPORTAMIENTO DE COBRE Y ZINC EN SANGRE

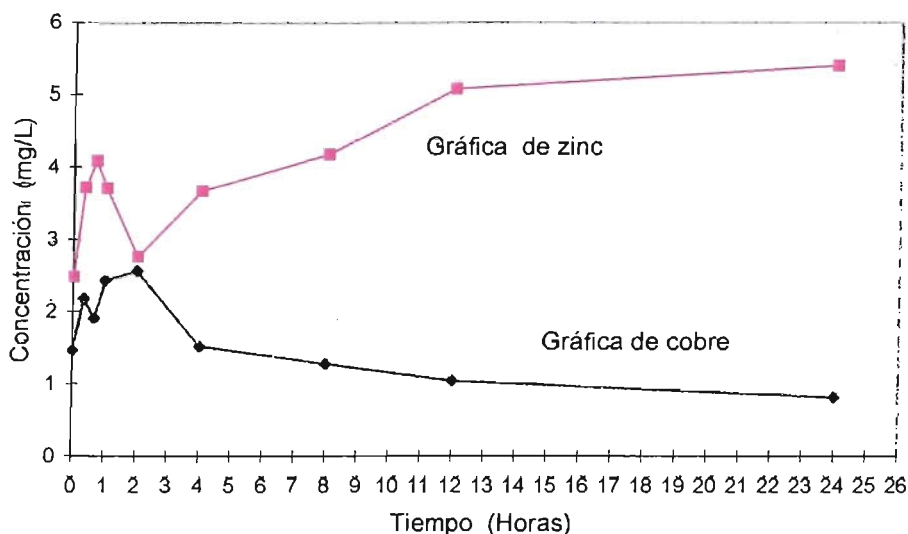


Tabla No. 14

Tiempo (Horas)	Concentración cobre (mg/L)	Concentración zinc (mg/L)
0.0	1.464	2.492
2.0	2.565	2.770
24.0	0.806	5.406

En la última dosis de casiopeína II se observa que la concentración inicial de cobre y de zinc aumentó con respecto a la primera dosis, a la 2ª hora la concentración máxima de cobre y la disminución en la concentración de zinc. Después una disminución en la concentración de cobre y un aumento en la concentración de zinc hasta las 24 horas.

PERRO 3. PRIMERA DOSIS DE CASIOPEÍNA II. COMPORTAMIENTO DE COBRE Y ZINC EN SANGRE.

Tabla No.15

Toma de muestras	Concentración de cobre en la muestra	Concentración de zinc en la muestra	Cociente cobre / zinc
Tiempo (Horas)	Cobre (mg/L)	Zinc (mg/L)	$\frac{[Cu]}{[Zn]}$
0.0	0.530	1.199	0.442
0.33	0.645	1.438	0.449
0.66	0.812	1.921	0.423
1.0	1.280	2.785	0.459
2.0	1.896	1.558	1.216
4.0	1.717	2.372	0.723
8.0	1.072	2.983	0.359
12.0	0.992	3.293	0.301
24.0	0.913	3.958	0.230

Gráfica No.8

PERRO 3. PRIMERA DOSIS DE CASIOPEÍNA II.
COMPORTAMIENTO DE COBRE Y ZINC EN SANGRE.

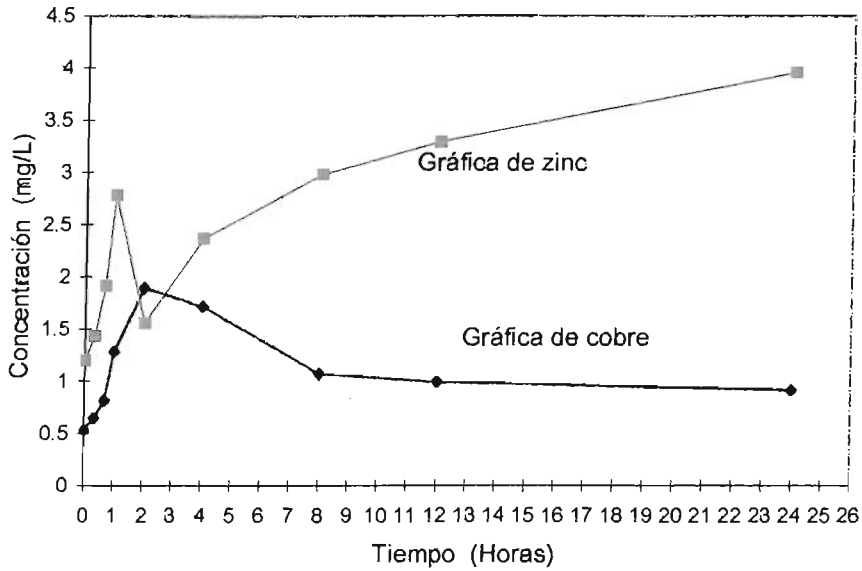


Tabla No. 16

Tiempo (Horas)	Concentración cobre (mg/L)	Concentración zinc (mg/L)
0.0	0.530	1.199
2.0	1.896	1.558
24.0	0.913	3.958

El comportamiento de cobre y zinc en sangre del perro 3 fue parecido al perro 2 en la primera dosis.

PERRO 3. ÚLTIMA DOSIS DE CASIOPEÍNA II. COMPORTAMIENTO DE COBRE Y ZINC EN SANGRE.

Tabla No. 17

Toma de muestras	Concentración de cobre en la muestra	Concentración de zinc en la muestra	Cociente cobre / zinc
Tiempo (Horas)	Cobre (mg/L)	Zinc (mg/L)	$\frac{[Cu]}{[Zn]}$
0.0	0.665	3.903	0.170
0.33	0.869	4.464	0.194
0.66	0.962	4.962	0.193
1.0	1.054	3.573	0.295
2.0	1.160	3.332	0.348
4.0	0.916	3.870	0.236
8.0	0.910	3.917	0.232
12.0	0.884	4.588	0.192
24.0	0.742	4.672	0.158

Grafica No.9

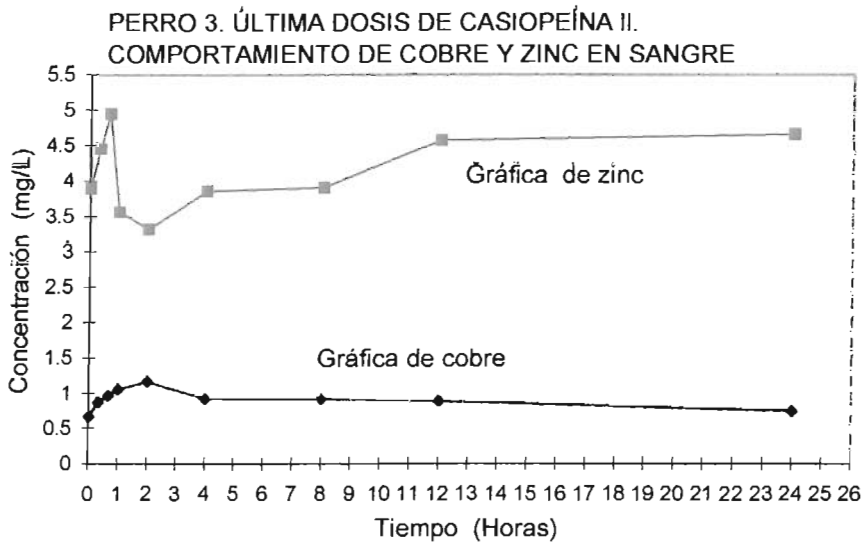


Tabla No. 18

Tiempo (Horas)	Concentración cobre (mg/L)	Concentración zinc (mg/L)
0.0	0.665	3.903
2.0	1.160	3.332
24.0	0.742	4.672

La concentración de zinc fue mayor y la concentración de cobre casi no presentó aumento. Este último con un incremento a la 2ª hora y una reducción en la concentración de zinc.

PERRO 4. PRIMERA DOSIS DE CASIOPEÍNA II. COMPORTAMIENTO DE COBRE Y ZINC EN SANGRE.

Tabla No. 19

Toma de muestras	Concentración de cobre en la muestra	Concentración de zinc en la muestra	Cociente cobre / zinc
Tiempo (Horas)	Cobre (mg/L)	Zinc (mg/L)	$\frac{[Cu]}{[Zn]}$
0.0	0.645	2.361	0.273
0.33	0.964	3.394	0.284
0.66	1.465	3.681	0.397
1.0	1.784	3.186	0.560
2.0	2.267	2.164	1.047
4.0	1.634	2.868	0.569
8.0	1.164	3.143	0.370
12.0	1.030	3.276	0.314
24.0	0.863	3.960	0.218

Gráfica No.10

PERRO 4. PRIMERA DOSIS DE CASIOPEÍNA II.
COMPORTAMIENTO DE COBRE Y ZINC EN SANGRE.

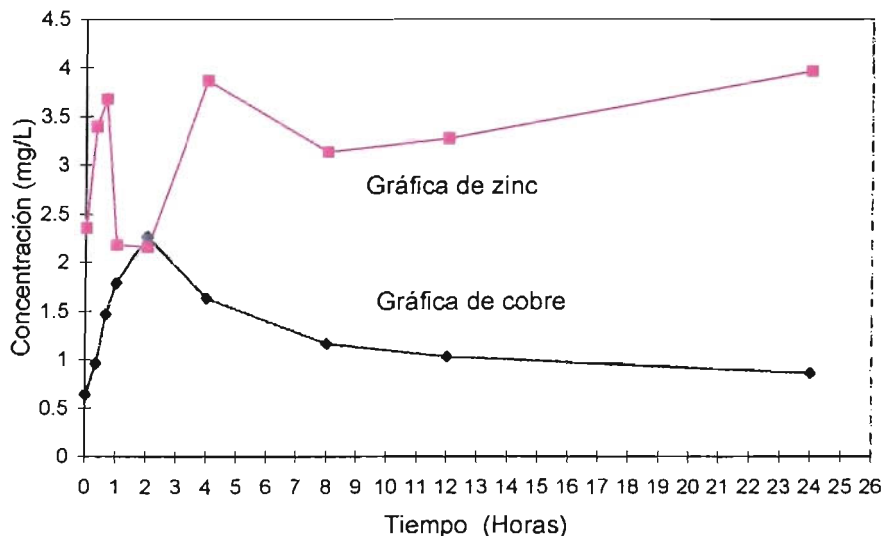


Tabla No. 20

Tiempo (Horas)	Concentración cobre (mg/L)	Concentración zinc (mg/L)
0.0	0.645	2.361
2.0	2.267	2.164
24.0	0.863	3.960

En el tiempo de inicio la concentración de zinc en sangre tuvo un valor de 2.361 mg/L y la concentración de cobre fue 0.645 mg/L. A la 2ª hora se presenta la máxima concentración de cobre 2.267 mg/L y la menor concentración de zinc 2.164 mg/L muy cercanas ambas. Con el transcurso del tiempo hubo una reducción en la concentración de cobre con una elevación en la concentración de zinc.

PERRO 4. ÚLTIMA DOSIS DE CASIOPEÍNA II. COMPORTAMIENTO DE COBRE Y ZINC EN SANGRE.

Tabla No. 21

Toma de muestras	Concentración de cobre en la muestra	Concentración de zinc en la muestra	Cociente cobre / zinc
Tiempo (Horas)	Cobre (mg/L)	Zinc (mg/L)	$\frac{[Cu]}{[Zn]}$
0.0	0.783	1.208	0.648
0.33	1.276	2.468	0.516
0.66	1.650	3.224	0.511
1.0	1.842	3.283	0.561
2.0	2.290	1.963	1.166
4.0	1.548	2.788	0.555
8.0	1.273	3.042	0.418
12.0	1.190	3.558	0.334
24.0	1.111	3.653	0.304

Gráfica No.11

PERRO 4. ÚLTIMA DOSIS DE CASIOPEÍNA II.
COMPORTAMIENTO DE COBRE Y ZINC EN SANGRE.

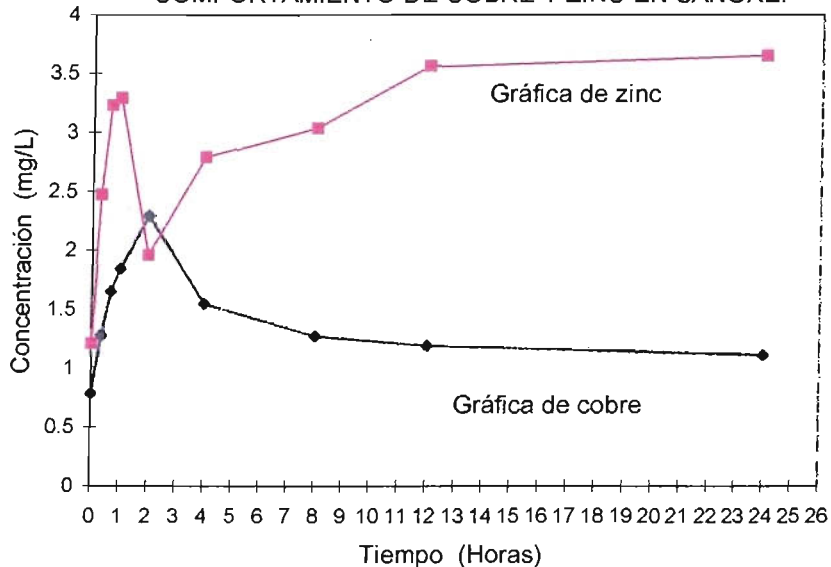


Tabla No. 22

Tiempo (Horas)	Concentración cobre (mg/L)	Concentración zinc (mg/L)
0.0	0.783	1.208
2.0	2.290	1.963
24.0	1.111	3.653

Después de administrar la última dosis de casiopeína II y tomar la muestra de sangre, la concentración de zinc fue menor que al inicio del tratamiento, a la 2ª hora se observó un decremento en la concentración de zinc y la máxima concentración de cobre.

PERRO 5. PRIMERA DOSIS DE CASIOPEÍNA II. COMPORTAMIENTO DE COBRE Y ZINC EN SANGRE.

Tabla No.23

Toma de muestras	Concentración de cobre en la muestra	Concentración de zinc en la muestra	Cociente cobre / zinc
Tiempo (Horas)	Cobre (mg/L)	Zinc (mg/L)	$\frac{[Cu]}{[Zn]}$
0.0	1.203	3.195	0.376
0.33	2.786	4.291	0.649
0.66	3.978	5.553	0.716
1.0	3.933	6.734	0.584
2.0	4.292	3.364	1.275
4.0	3.010	4.084	0.737
8.0	2.567	5.088	0.504
12.0	2.176	5.346	0.407
24.0	2.113	6.460	0.327

Gráfica No.12

PERRO 5. PRIMERA DOSIS DE CASIOPEÍNA II.
COMPORTAMIENTO DE COBRE Y ZINC EN SANGRE

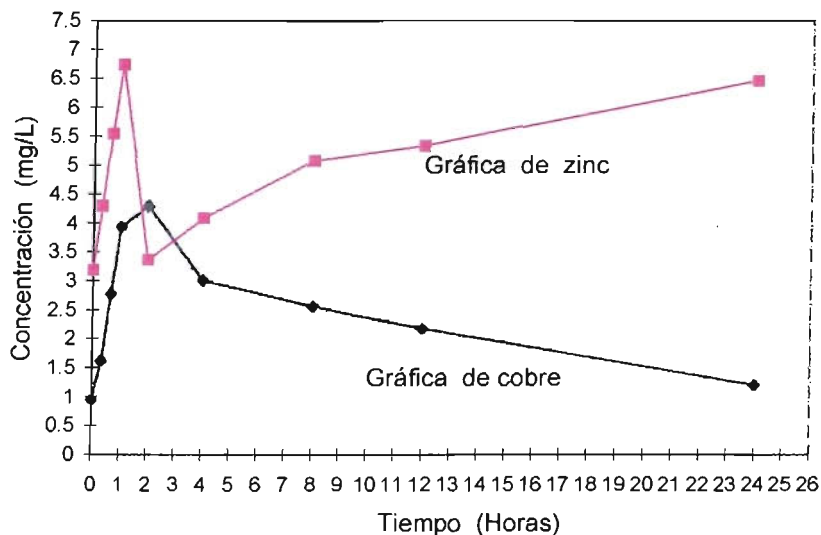


Tabla No.24

Tiempo (Horas)	Concentración cobre (mg/L)	Concentración zinc (mg/L)
0.0	1.203	3.195
2.0	4.292	3.364
24.0	2.113	6.460

El perro 5 presentó concentraciones altas de cobre y zinc comparados con los anteriores, a la 2ª hora la concentración de cobre fue muy alta de 4.292 mg/L y la concentración de zinc fue 3.364 mg/L. Transcurriendo el tiempo se observa un aumento en la concentración de zinc notoria de 6.46 mg/L y una disminución en la concentración de cobre de 2.113 mg/L.

PERRO 5. ÚLTIMA DOSIS DE CASIOPEÍNA II. COMPORTAMIENTO DE COBRE Y ZINC EN SANGRE.

Tabla No. 25

Toma de muestras	Concentración de cobre en la muestra	Concentración de zinc en la muestra	Cociente cobre / zinc
Tiempo (Horas)	Cobre (mg/L)	Zinc (mg/L)	$\frac{[Cu]}{[Zn]}$
0.0	0.914	2.716	0.336
0.33	1.808	3.596	0.502
0.66	2.448	4.327	0.565
1.0	2.265	4.917	0.460
2.0	3.320	4.065	0.816
4.0	2.925	5.603	0.522
8.0	2.057	6.136	0.335
12.0	1.309	6.523	0.200
24.0	0.885	6.880	0.128

Grafica No.13

PERRO 5. ÚLTIMA DOSIS DE CASIOPEÍNA II.
COMPORTAMIENTO DE COBRE Y ZINC EN SANGRE

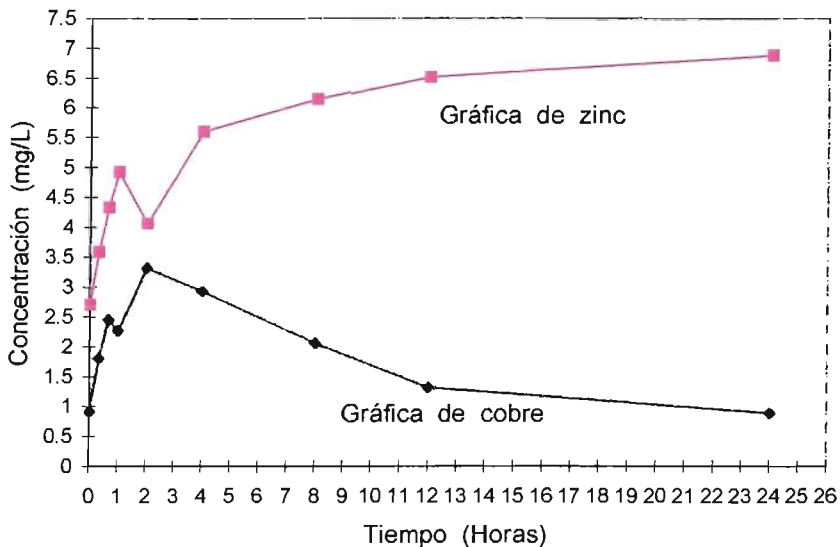


Tabla No. 26

Tiempo (Horas)	Concentración cobre (mg/L)	Concentración zinc (mg/L)
0.0	0.914	2.716
2.0	3.320	4.065
24.0	0.885	6.880

A la 2ª hora el comportamiento de cobre y zinc es semejante, a un aumento en la concentración de cobre en el organismo corresponde una disminución en la concentración de zinc. En las horas siguientes baja la concentración de cobre y se incrementa el nivel de zinc.

6.3 DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Después de un tratamiento continuo de casiopeína II en perros enfermos y de observar los resultados en las muestras de sangre al inicio y al término del mismo, se nota que: la concentración de zinc es mayor que la de cobre a diferencia de lo que sucede a la 2ª hora, en donde la concentración de cobre es mayor que la de zinc. Ésto se visualiza en las gráficas, a excepción del perro 1, en el que el aumento se presentó en la 1ª hora. Cabe mencionar que este perro murió a las 24 horas, después de la administración de casiopeína II.

Se calculó el cociente de la concentración de cobre y zinc en la primera y última dosificación del tratamiento, comparando los resultados encontrados con los de perros sanos. De los valores reportados en la literatura (26) se tiene que los perros sanos presentan un límite inferior y un límite superior. Se calculó el promedio de ambos, con los siguientes resultados:

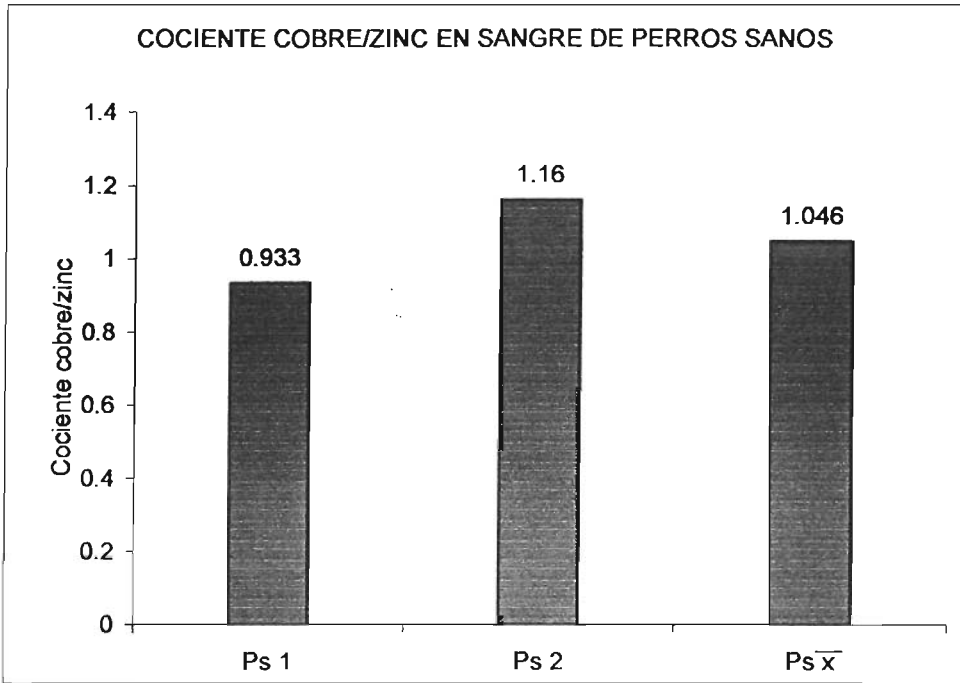
Cociente cobre/zinc obtenido en perros sanos

Tabla No. 27

Perro sano Límite inferior = Ps1	Cociente de cobre / zinc	$\frac{0.70}{0.75} = 0.933$
Perro sano Límite superior = Ps2	Cociente de cobre / zinc	$\frac{1.40}{1.20} = 1.16$
Perro sano Promedio de ambos límites = Ps x	Cociente de cobre / zinc	= 1.046

La gráfica correspondiente a los resultados es la siguiente:

Gráfica No. 14



Primera dosificación de casiopeína II con el consecutivo cociente de cobre/zinc:

Cociente cobre/zinc obtenido con la 1ª dosis de casiopeína II en cada uno de los perros estudiados

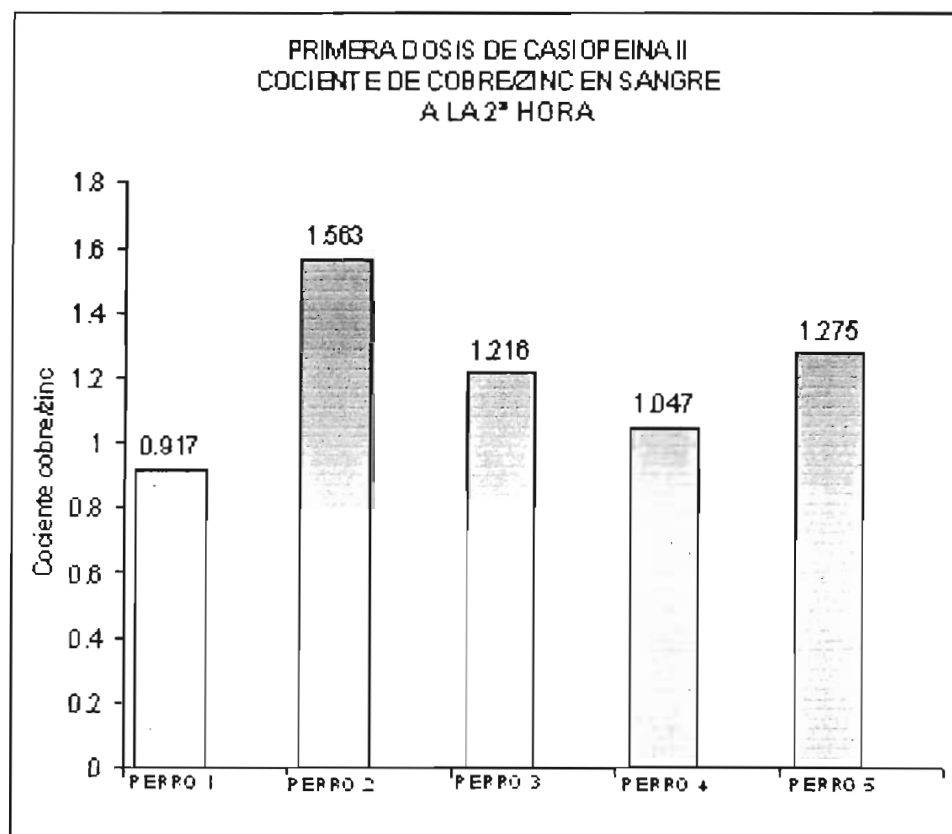
Tabla No. 28

Perro 1	Cociente de cobre/zinc $\frac{2.271}{2.474} = 0.917$ a la 2ª hora
Perro 2	Cociente de cobre/zinc $\frac{1.900}{1.215} = 1.563$ a la 2ª hora
Perro 3	Cociente de cobre/zinc $\frac{1.896}{1.558} = 1.216$ a la 2ª hora
Perro 4	Cociente de cobre/zinc $\frac{2.267}{2.164} = 1.047$ a la 2ª hora
Perro 5	Cociente de cobre/zinc $\frac{4.292}{3.364} = 1.275$ a la 2ª hora

Se observan en la página 48 los resultados obtenidos del perro 1, el valor del cociente cobre/zinc = 2.430 es alto a la 1ª hora, sin embargo, comparando todos los cocientes cobre/zinc a la 2ª hora se encuentra que el valor más bajo lo presenta el perro 1 además de un estado de estrés, posteriormente se encontró deprimido y cansado, causándole la muerte una insuficiencia respiratoria. Además los cocientes de los perros 2,3 y 5 fueron mayores que los cocientes de perros normales, excepto el perro 4 que fue parecido al valor promedio de perros normales.

La gráfica correspondiente a los resultados es la siguiente:

Gráfica No.15



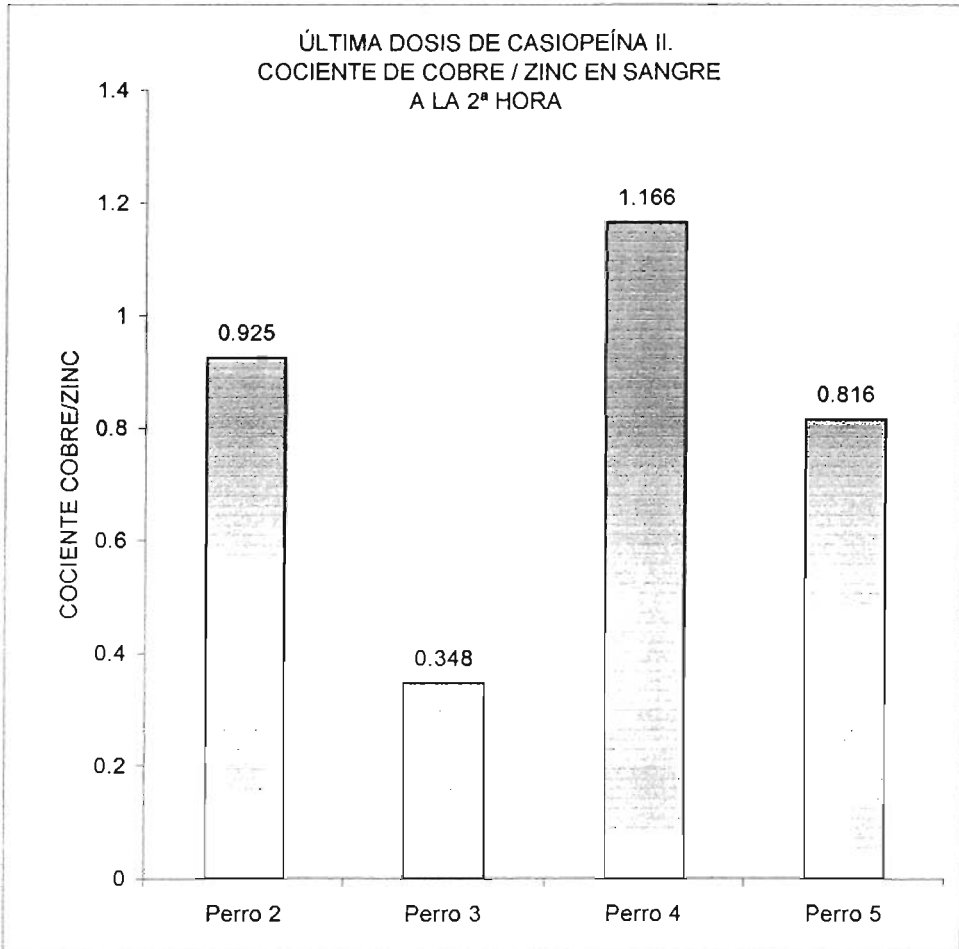
Cociente cobre/zinc obtenido en la última dosis de casiopeína II en cada uno de los perros estudiados

Tabla No.29

Perro 1	Murió después de la 1ª dosificación
Perro 2	Cociente de cobre/zinc $\frac{2.565}{2.770} = 0.925$ a la 2ª hora
Perro 3	Cociente de cobre/zinc $\frac{1.160}{3.332} = 0.348$ a la 2ª hora
Perro 4	Cociente de cobre/zinc $\frac{2.290}{1.963} = 1.166$ a la 2ª hora
Perro 5	Cociente de cobre/zinc $\frac{3.320}{4.065} = 0.816$ a la 2ª hora

En la última dosis de casiopeína II, los perros: 2, 3 y 5 presentaron una disminución en el cociente de cobre/zinc. Este comportamiento se observa en una gráfica de bloques.

Gráfica No.16



Debido a la enfermedad neoplásica tumor venéreo transmisible ocurren desórdenes en la química sanguínea, como los valores tan altos en la concentración de zinc, el cual participa en la síntesis de ADN, y un alterado crecimiento característica principal de los tumores. Éste se ve reflejado en el cálculo de los cocientes cobre/zinc, al inicio del tratamiento se observa la relación inversamente proporcional a la 2ª hora, este comportamiento se ve disminuido en la última dosis de casiopeína, ya que la baja en la concentración de zinc no es tan significativa igualando a la concentración de cobre

e incluso sobrepasándola, debido a ello los cocientes presentan valores cercanos a 1, excepto para el perro 3.

7.0 RESUMEN Y CONCLUSIONES

La Espectrofotometría de Absorción Atómica es una técnica aplicable en la cuantificación de metales. Es confiable, rápida y fácil de manejar; la sensibilidad de la técnica es significativa ya que se miden concentraciones muy pequeñas de mg/L. Es una técnica selectiva con pocas interferencias, se aseguró que la técnica y el método fueran apropiados ya que se determinó la linealidad de la curva de calibración fijando un intervalo lineal y se cuantificaron los parámetros analíticos. Se comprobó la confiabilidad y precisión de las curvas de calibración de cobre y zinc con una confianza del 97.5%.

Las muestras examinadas siempre estuvieron arriba del límite de detección y el límite de cuantificación, teniendo la seguridad de que los valores medidos no están afectados por el ruido del aparato. Trabajando en condiciones experimentales apropiadas los errores son mínimos, al desarrollar el método de análisis se evitan posibles errores.

En la enfermedad neoplásica tumor venéreo transmisible existe un proceso inflamatorio en los genitales con sangrado y ulceración de los tumores, recientes estudios sobre casiopeína II indican que el fármaco se une a la albúmina y es transportado hacia el hígado y riñón. Además el cobre ligado a la casiopeína II es disociado in vivo y almacenado. La formación del complejo casiopeína II - albúmina afecta la farmacocinética de la casiopeína II ya que únicamente el fármaco no unido a proteínas puede atravesar las membranas celulares del órgano afectado y ejercer su acción. Por lo que en este tipo de casos se debe dar mayor cantidad de medicamento para que ejerza su acción.

Con el esquema de tratamiento utilizado los perros no presentaron ninguna mejoría, la casiopeína II no mostró efecto sobre la enfermedad tumor venéreo transmisible a una dosis de 4 mg / Kg, ya que el tamaño de los tumores permaneció igual.

En la enfermedad neoplásica Tumor Venéreo Transmisible ocurren desórdenes, procesos inflamatorios en los tumores y situaciones de estrés, todo ello provoca una oxidación. Últimamente la tensión oxidante está surgiendo como la causa común de muchos cánceres humanos, particularmente cuando la inflamación crónica es inducida por un agente infeccioso. Nair J y Bartsch H investigan enfermedades con estrés oxidativo aumentado y entre ellas se encuentran enfermedades que almacenan metales (como el mal de Wilson), el intestino inflamado y la pancreatitis crónica, la tensión oxidante favorece la generación del compuesto 4-hidroxinonenal que se liga al ADN. (48) El proceso oxidativo favorece el comportamiento de incremento en la concentración de cobre y decremento en la concentración de zinc. La concentración plasmática máxima de cobre se presentó a la 2ª hora, en ese mismo tiempo también hubo un descenso en la concentración de zinc. Se graficó el cociente Cu / Zn de cada perro, en una gráfica de barras exhibiendo el valor más alto a la 2ª hora. Se confirmó que los niveles de cobre y zinc fueron inversamente proporcionales a la 2ª hora después de la administración de la casiopeína II.

Al aplicar la droga al perro 1 presentó un grave estado de estrés y posteriormente mostró signos de intoxicación, con vómito, a la 1ª hora post-inyección se presentó un aumento en la concentración de cobre en este tiempo la concentración de zinc disminuyó. Después la concentración de cobre decrece hasta las 24 horas, llegando casi a la concentración basal. Mientras la concentración de zinc va aumentando gradualmente hasta que el perro muere por una insuficiencia respiratoria.

La casiopeína II se administró a los perros por vía endovenosa con goteo lento con una duración de 1 a 2 horas, terminado el fármaco se tomó la muestra. Se consideran 3 tiempos significativos en el comportamiento de cobre y zinc: el tiempo 0.0, a la 2ª hora y 24 horas, se determinó el promedio de los 5 perros como se muestran en las siguientes tablas:

Tiempo	Primera dosis de Casiopeína II, al iniciar tratamiento	Última dosis de Casiopeína II, al finalizar tratamiento	Primera dosis de Casiopeína II, al iniciar tratamiento	Última dosis de Casiopeína II, al finalizar tratamiento
0 Hrs	Concentración cobre (mg/L)	Concentración cobre (mg/L)	Concentración zinc (mg/L)	Concentración zinc (mg/L)
Perro 1	1.012	Falleció	1.113	Falleció
Perro 2	0.583	1.464	1.527	2.492
Perro 3	0.530	0.665	1.199	3.903
Perro 4	0.645	0.783	2.361	1.208
Perro 5	1.203	0.914	3.195	2.716
	$\bar{x} = 0.794$	$\bar{x} = 0.956$	$\bar{x} = 1.879$	$\bar{x} = 2.579$

Tiempo	Primera dosis de Casiopeína II, al iniciar tratamiento	Última dosis de Casiopeína II, al finalizar tratamiento	Primera dosis de Casiopeína II, al iniciar tratamiento	Última dosis de Casiopeína II, al finalizar tratamiento
2 Hrs	Concentración cobre (mg/L)	Concentración cobre (mg/L)	Concentración zinc (mg/L)	Concentración zinc (mg/L)
Perro 1	2.271	Falleció	2.474	Falleció
Perro 2	1.900	2.565	1.215	2.770
Perro 3	1.896	1.160	1.558	3.332
Perro 4	2.267	2.290	2.164	1.963
Perro 5	4.292	3.320	3.364	4.065
	$\bar{x} = 2.525$	$\bar{x} = 2.333$	$\bar{x} = 2.155$	$\bar{x} = 3.032$

Tiempo 24 Hrs	Primera dosis de Casiopéina II, al iniciar tratamiento	Última dosis de Casiopéina II, al finalizar tratamiento	Primera dosis de Casiopéina II, al iniciar tratamiento	Última dosis de Casiopéina II, al finalizar tratamiento
Perro	Concentración cobre (mg/L)	Concentración cobre (mg/L)	Concentración zinc (mg/L)	Concentración zinc (mg/L)
Perro 1	1.362	Falleció	4.835	Falleció
Perro 2	0.953	0.806	3.240	5.406
Perro 3	0.913	0.742	3.958	4.672
Perro 4	0.863	1.111	3.960	3.653
Perro 5	2.113	0.885	6.460	6.880
	$\bar{x} = 1.240$	$\bar{x} = 0.886$	$\bar{x} = 4.490$	$\bar{x} = 5.152$

La concentración media de cobre varía entre la 1ª y última dosis de la siguiente manera: tiempo 0.0 sube de 0.79 a 0.95 mg/L, en la 2ª hora baja de 2.52 a 2.33 mg/L y a las 24 horas baja de 1.24 a 0.88 mg/L.

Confrontando la concentración de cobre al inicio y al término de la dosis de casiopéina II existe poca variación en los tiempos analizados, además que se encuentran dentro del intervalo de los perros sanos, excepto a la 2ª hora con un marcado aumento.

El zinc presentó un aumento constante entre la 1ª y última dosis como se muestra: tiempo 0.0 sube de 1.87 mg/L a 2.57 mg/L, en la 2ª hora sube de 2.15 mg/L a 3.03 mg/L y a las 24 horas sube de 4.49 a 5.15 mg/L.

Con respecto a la concentración de zinc, está fue superior a los valores normales de perros sanos referido en la página 14, (ya que el zinc está involucrado en la división celular al intervenir en la replicación y transcripción del DNA.)

Reciente estudio farmacocinético in vitro explica que la casiopeína II es rápidamente tomada hacia dentro de los eritrocitos, inmediatamente después a los tejidos vasculares como son el hígado y el riñón, pero es redistribuida en otros tejidos. Posteriormente la casiopeína se disocia in vivo, con la liberación de cobre al hígado y la ceruloplasmina en plasma aumenta (49). Este comportamiento se confirma con los resultados del experimento, ya que en el tiempo 0.0 la concentración de cobre en sangre fue baja con un ligero aumento hasta llegar a la concentración máxima a la 2ª hora, tiempo en el cual el cobre fue liberado del hígado con un descenso posterior. La selectividad de los fármacos antineoplásicos a ciertos tumores, tal vez sea el caso de la casiopeína II.

Se comprobaron las hipótesis planteadas al inicio del experimento. El método de espectrofotometría de absorción atómica es confiable y repetible ya que existe concordancia en las determinaciones, es decir, las muestras se trabajan por triplicado con desviación estándar $s = 0.0005$. Para el cobre con un límite de detección = 0.006 mg/L y para el zinc $LD = 0.004$ mg/L, además que se establece un intervalo lineal de absorbancia. Todos estos parámetros garantizan que el método satisface el análisis efectuado.

Por último se observa que existe una relación inversamente proporcional de cobre y zinc al administrar casiopeína II.

8.0 BIBLIOGRAFÍA

1. Mendelson, Howley. The molecular basis of cancer. Philadelphia W.B Sounders. 1994.
2. Dirección General de Invenciones, Marcas y Desarrollo Tecnológico (SECOFI). Registros Número 18801-120579 y 18802-120580 USA. Patent Number 5-107, 005 (1992) C.E.E (En trámite); Japón (en trámite).
3. Cowdry Edmund V. Cancer Cells. Philadelphia W. B. Sounders 1955.
4. Nicolson. G.L. The cancer cell: Dynamic aspects and modifications in cell - surface organization. *New Eng J. Med* 295:197, 253. 1976.
5. Nicolson G. L. Cancer Metástasis. *Sci. Amer.* 240: 66 (Mar 1979).
6. Airns John. Cancer Science and Society. W.H. Freeman and Company 1979.
7. Glover, Hamer. Oncogenesis. Irlpress. Oxford University Press 1989.
8. Albert . A. Lilia. Toxicología ambiental. Universidad Autonoma de Cd. Juárez 1995
9. Choi Y; Ishiguro N; Shinagawa M; Kim C / J ; Okamoto Y; Minami S;Ogihara. Moleculae estructura of canine LINE -1 elements in canine transmissible venereal tumor. *Animal Genetics.* 30: 1 51-53 1999.
10. Mozos E; Méndez A; Gómez- Villamandos: Martín de las Mulas J: Pérez J. Immunohistochemical Characterization of Canine Transmissible Venereal Tumor. *Veterinary Pathology* 33:3 257-263 1996.
- 11.Booth M.J. Canine Transmissible Venereal Tumor and Ovarian Papillary Cystadenocarcinoma in a Bitch. *Journal of Small Animal Practice.* 35:1 39-42 (1994).
- 12.Cohen D. The canine transmissible venereal tumor: A unique result of tumor progression. *Adv Cancer Res.* 43: 75-112. 1985.
- 13.Das. A.K, Das U, Das D, Sengupta J. Histopathological study of canine transmissible venereal tumor. *Indian Veterinary Journal.* 68: 575-576. 1991
14. Ruíz, A. Lena; Moreno, E. Rafael; Ferrer, S. Gerardo; Gasque, S. Laura.

- Diseño, Síntesis y caracterización de las Casiopeínas. Res. 1, Jornada de Trabajo en Casiopeínas. Fac. de Química, UNAM. (1994)
15. Rivero- Muller A, Plant N, Ruiz Ramirez L, De Vizcaya- Ruiz A. School of Biological Sciences. University of Surrey. Degradation of DNA by the Copper-Based anticancer agent casiopeína II. 3ª. Jornada de trabajo en Casiopeínas. Facultad de Química. UNAM (1998)
 16. De Vizcaya- Ruiz AMG, Ruiz Ramírez L, Kelland LR, Orr RM, and Dobrota M. School of Biological Sciences, University of Surrey. Casiopeína II Kills Cancer Cells by Apoptosis. 3ª. Jornada de trabajo en Casiopeínas. Facultad de Química. UNAM (1998)
 17. De Vizcaya Ruiz A, Rivero Muller M, Dobrota M. School of Biological Sciences. Univ. Surrey, Guilford, Surrey. Distribution and Toxicity of Casiopeína II. 4ª. Facultad de Química. UNAM (2000)
 18. De Vizcaya-Ruiz A, Muller Rivero A, Howarth J.A, Dobrota M, Ruíz-Ramirez Hematological Response after administration of the novel copper- based anticancer agent Casiopeína II. 3ª. Jornada de trabajo en Casiopeínas. Facultad de Química. UNAM (1998)
 19. Camakaris J, Voskoboinik I, and J. F Mercer. BREAKTHROUGHS AND VIEWS. Molecular Mechanisms of Copper Homeostasis. Biochemical and Biophysical Research Communications . Vol 261(1999)
 20. Bettger J. William. Zinc and selenium, site-specific versus general antioxidant. Can. J. Physiol. Pharmacol. Vol. 71, 1993
 21. Cousins J. Robert. Absorption, Transport, and Hepatic Metabolism of Copper and Zinc: Special Reference to Metallothionein and Ceruloplasmin. Physiological Reviews. Vol 65, No.2, April 1985.
 22. Vilanova A, Gutierrez C, Serrat N, Raga X, Paternain J.L.. Metallothionein, Inorganic and Copper Levels: Relationship with Acute Myocardial Infarction. Clinical Biochemistry, Volume 30. April 1997.
 23. Walsh W. J, Isaacson H.R, Rehman F, and Hall A. Elevated Blood Copper / Zinc Ratios in Assaultive Young Males. Physiology Behavior. Vol 62: 2 327-329 1997.

24. Mezzeti Andrea, Pierdomenico D. Sante, Costantini Fabricio, Romano Ferdinando, De Cesare Dominico, Cuccurrullo Franco, Imbastro Tiziana, Riario-Sforza Guiseppe, Di Giacomo Franco, Zuliani Giovanni, Fellin Renato. Copper/Zinc Ratio and Systemic Oxidant Load: Effect of Aging and Aging-Related Degenerative Diseases. *Free Radical Biology & Medicine* Vol. 25, No. 6, 1998.
25. Kok J. Frans , Van Dujin M. Cornelia, Hofman Abert, Van Der Voet B. Gijbert, De Wolf A. Fred, CH. Paays H. Clay, Valkenburg A. Hans. Serum Copper and Zinc and The Risk of Death from Cancer and Cardiovascular Disease. *American Journal of Epidemiology* Vol. 128, No. 2, 1988.
26. Kirk Terapéutica Veterinaria de Pequeños Animales McGraw-Hill Interamericana Editores S.A. de C.V. 1997
27. Sulkalski K.A, Laberge T.P, Johnson W.T. In Vivo Oxidative Modification of Erythrocyte Membrana Proteins in Copper Deficiency. *Free Radical Biology Medicine*. Vol 22 : 5 835-642 1997.
28. Schuschke D.A. Dietary copper in the physiology of the microcirculation. *Journal Nutr.* 127 : 2274- 2281 1997.
29. E - Ichiro Ochiai. *Química Bioinorganica*. Editorial Reverte S.A. México 1991.
30. Orten M.J, Neultaus W.O. *Bioquímica Humana*. Editorial Panamericana México 1986.
31. Lloyd Mc., Donald W, Champton. *Fundamentos de Nutrición*. Editorial Acribia. México 1999.
32. Bedwal R.S and Bahuguna A. Zinc, Copper and Selenium in reproduction *Experientia* 50.
33. Tenorio M.E, Rendon G.E.E. Estudio de la distribución de Casiopeínas II y III en organos de ratón (NIH) para la determinación de Cobre. Tesis Licenciatura Q.F.B. Facultad de Química. UNAM
34. Amdur Ph. D, Doull Ph. D, Klaassen Ph. D. Caserett an Doulls *Toxicology. The Basic Science of Poisons*. Mc. Graw Hill Inc. Cuarta Edición. 1991
35. Dreisbach R.H, Robertson W.O. *Toxicología Clínica*. Editorial El Manual Moderno S.A. de C.V. Sexta Edición. México 1988.

36. Gómez Duque E. Determinación de Toxicidad Aguda de la Casiopeína en perros. Tesis Licenciatura M.V.Z. Facultad de Veterinaria. UNAM 1992.
37. Bush, H. Methods in Cancer Research. Vol.1 Academic Press, 1967.
38. Haswell S.J. Atomic Absorption Spectrometry. Theory, Design and Applications. Analytical Spectroscopy Library. Volume 5. Elsevier Science Publishers. B.V. Amsterdam. The Netherlands 1991.
39. Beaty D. R. Conceptos, instrumentación y técnicas de Espectrofotometría por Absorción Atómica. Perkin Elmer Corporation. México 1979.
40. Lajunen, Lauri H.J. Spectrochemical Analysis by Atomic Absorption and Emission. Royal Society of Chemistry. Cambridge 1992.
41. R.A. Day Jr, Underwood A.L. Química Analítica Cuantitativa. Prentice- Hall Hispanoamericana. S.A. Quinta Edición. México 1989.
42. Jassie. Digestion de muestras por tecnologías de microondas. CEM. Corporation II. 1995
43. Larry Paul. USP Perspectives on Analytical Methods Validation. Pharmaceutical Technology. Pag. 130-141 March 1991
44. Guerra J, Finkelson J. M. Validation of analytical methods by FDA Laboratories. Pharmaceutical Technology. 74- 80 March 1986.
45. Métodos Analíticos. Validación. Comité de Elaboración de Guías Oficiales de Validación de la Dirección General de Control de Insumos para la Salud, SSA México 1990.
46. Bauer E. L. Manual de Estadística para Químicos. Editorial Alhambra. España 1974.
47. Weimer C. R. Estadística. Editorial CECSA. Tercera impresión. México 2000
48. Amber. E. I, Henderson. R.A, Adeyanju. J.B and Gyang E.O Single- drug chemotherapy of canine transmissible venereal tumor with cyclophosphamide, metotrexato or vincristine. Journal of Veterinary Internal Medicine 4 : 144-147 1990.
49. J. Nair and H Bartsch. Oxidative stress-induced DNA damage a cause of human chronic degenerative diseases. Congreso Internacional 10th of Toxicology 32-15/07/04. Tampere, Finlandia.

50. De Vizcaya- Ruiz AMG, Rivero Muller A, Ruiz Ramírez L and Dobrota M.
University of Surrey. Guildford. Casiopeína II- Pharmacokinetics, Toxicology and
in vitro biological efectos. 3ª. Jornada de trabajo en Casiopeínas. Facultad de
Química. UNAM (1998)