



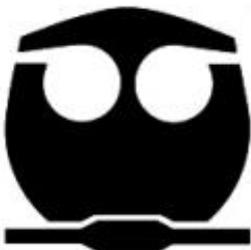
**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA**

**Desarrollo y Validación de Método Bioanalítico
para la Cuantificación de Casiopeína III-ia® en
plasma humano por HPLC-MS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A :
PAULINA OSNAYA ROSAS



México D. F. 2015



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: Inés Fuentes Noriega

VOCAL: Ricardo Rodríguez Sáenz

SECRETARIO: Liz Jannet Medina Reyes

1er. Suplente: María de Lourdes Beatriz Mayet Cruz

2do. Suplente: Kenneth Rubio Carrasco

Sitio donde se desarrolló el proyecto:

Laboratorios 112 y 113. Edificio E,
Laboratorio 104. USIP. Edificio F.
Facultad de Química, UNAM
Ciudad Universitaria

Asesor

Supervisor Técnico

Dra. Inés Fuentes Noriega

M. en C. Kenneth Rubio Carrasco

Sustentante

Paulina Osnaya Rosas

iGracias!

A la máxima casa de estudios, nuestra Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Química.

A la Dra. Lena Ruíz Ramírez por facilitar el estándar necesario para la realización de este proyecto.

Al Dr. José Fernando Barragán Aroche y a todo el equipo de la USIP especialmente al laboratorio 104 de Cromatografía por permitirme trabajar en sus instalaciones.

A la Dra. Inés Fuentes Noriega por todo el apoyo, la confianza y la gran oportunidad para mi formación no sólo académica sino personal.

A la M. en C. Kenneth Rubio Carrasco por todos los consejos y conocimiento compartido pero sobre todo por el interés en la formación de profesionales de la Química.

Al Dr. Roberto Carlos Cañas Alonso por compartir su experiencia y conocimiento que no solo permitió la realización de proyecto sino alienta a la búsqueda de nuevas oportunidades.

A los proyectos CONACYT REDES-194130; PAPIIT IT-201714; Facultad de Química PAIP 5000-9134 por el apoyo económico para el desarrollo de este proyecto.

A los maestros Liz Janet Medina Reyes y Ricardo Rodríguez Sáenz por sus valiosas aportaciones en la revisión de este documento.

Agradezco a mi familia y amigos, ustedes que han formado parte de mi vida, decisiones, aciertos y errores. Es imposible mencionarlos a todos, corro el riesgo de cometer una omisión grave, hay demasiado que agradecer, esto habría sido muy difícil de alcanzar sin ustedes. Perdonarán, espero, que haga hincapié en algunas personas.

Agradezco a Rodolfo y Lourdes, mis padres, a Eréndira y Pedro, mis hermanos, la comprensión, la confianza y toda la luz en los momentos de oscuridad.

Agradezco a mis abuelos Concha y Rico, a mis tíos Octavio, Luz, Sergio, Sofía y Juan Carlos, el inmenso regalo, su apoyo incondicional, que nos permitió vivir diferente.

Agradezco a mis primos Mishel y David la complicidad de los amigos y a la pequeña Lupita la inspiración para hacer posibles los sueños.

Agradezco a Abiud y a la vida por las coincidencias, que nos sorprendieron para continuar juntos por este camino.

Agradezco el amor que cada uno de ustedes me brinda, la palabra de aliento, la carcajada sonora, el cable a tierra, el puerto seguro.

Mil gracias.
¡Lo logramos!

A PEDRO, ERÉNDIRA y ÁNGELA, mis hermanos.

Y A MI QUERIDO ABUELITO PEDRO.

"La gloria no consiste en no caer nunca, sino más bien en levantarse las veces que sea necesario."

Mario Benedetti.

Contenido

a. Lista de Abreviaturas	X
b. Lista de Cuadros	XII
c. Lista de Figuras	XV
1. Introducción	1
2. Antecedentes	2
2.1 Cáncer: generalidades y estadísticas.....	2
2.2 Tratamientos contra el cáncer.....	3
2.2.1 Agentes quimioterapéuticos contra el cáncer.....	3
2.3 Desarrollo de Fármacos Nuevos.....	4
2.3.1 Fase pre-clínica.....	5
2.3.2 Fase clínica.....	6
2.4 Casiopeínas [®]	7
2.4.1 Casiopeína III-ia [®]	8
2.4.1.1 Actividad biológica de la Casiopeína III-ia [®]	10
2.4.1.2 Métodos de cuantificación de Casiopeína III-ia [®]	11
2.5 Desarrollo de Métodos Bioanalíticos.....	11
2.6 Validación de Métodos Bioanalíticos.....	12
2.6.1 Especificidad.....	13
2.6.2 Efecto matriz.....	14
2.6.3 Efecto de acarreamiento (<i>carry-over</i>).....	15
2.6.4 Límite de Cuantificación.....	16
2.6.5 Linealidad.....	16
2.6.6 Precisión.....	17
2.6.6.1 Repetibilidad.....	17
2.6.6.2 Reproducibilidad.....	17
2.6.7 Exactitud.....	17
2.6.8 Recuperación absoluta.....	18
2.6.9 Estabilidad.....	18

3. Objetivos	20
3.1 Objetivo General.....	20
3.2 Objetivos Particulares.....	20
4. Metodología	21
4.1 Reactivos.....	21
4.2 Materiales, Equipos e Instrumentos.....	21
4.3 Soluciones.....	23
4.3.1 Preparación de Soluciones.....	23
4.3.1.1 Solución de HFBA 40 mM acuoso.....	23
4.3.1.2 Solución estándar A de Casiopeína III-ia [®] en agua, 1000 µg/mL.....	23
4.3.1.3 Fase móvil: metanol grado cromatográfico, HFBA 40 mM en agua (7:3).....	24
4.3.1.4 Solución HFBA al 5% acuoso.....	24
4.3.1.5 Soluciones de trabajo y preparación de muestras en matriz biológica, cargadas con el analito.....	24
4.4 Material biológico.....	25
4.5 Software.....	26
4.6 Desarrollo de Método Bioanalítico.....	26
4.6.1 Condiciones instrumentales.....	26
4.6.1.1 Infusiones de Casiopeína III-ia [®] con pares iónicos.....	26
4.6.1.2 Parámetros cromatográficos y espectrométricos del ion 460.0145 m/z.....	28
4.6.1.3 Identificación y Control del efecto de acarreamiento.....	29
4.6.1.4 Evaluación Instrumental.....	29
4.6.2 Extracción de Casiopeína III-ia [®] de matriz biológica.....	29
4.6.2.1 Inyección directa: Precipitación de proteínas.....	29
4.6.2.2 Extracción en fase sólida.....	30
4.6.2.3 Supresión iónica.....	34
4.6.2.4 Estándar interno.....	35

4.7 Validación de Método.....	36
4.7.1 Adecuabilidad del sistema.....	38
4.7.2 Especificidad.....	38
4.7.3 Efecto matriz.....	38
4.7.4 Efecto de acarreamiento (<i>carry-over</i>).....	39
4.7.5 Linealidad.....	40
4.7.6 Precisión.....	40
4.7.6.1 Repetibilidad.....	40
4.7.6.2 Reproducibilidad.....	41
4.7.7 Exactitud.....	41
4.7.8 Recuperación absoluta.....	42
4.7.9 Estabilidad.....	42
4.7.9.1 Condiciones de almacenamiento.....	42
4.7.9.2 Ciclos de congelación-descongelación.....	43
4.7.9.3 Estabilidad de la muestra procesada.....	43
4.7.9.4 Estabilidad en automuestreador.....	44
5. Resultados y Discusión.....	45
5.1 Desarrollo de Método Bioanalítico.....	45
5.1.1 Condiciones instrumentales.....	45
5.1.1.1 Infusiones de Casiopeína III-ia [®] con pares iónicos.....	50
5.1.1.2 Parámetros cromatográficos y espectrométricos del ion de cuantificación 460.0145 m/z.....	53
5.1.1.3 Identificación y Control del efecto de acarreamiento.....	55
5.1.1.4 Condiciones instrumentales óptimas.....	55
5.1.1.5 Evaluación instrumental.....	57
5.1.2 Extracción de Casiopeína III-ia [®] de matriz biológica.....	58
5.1.2.1 Inyección directa: Precipitación de proteínas.....	58
5.1.2.2 Extracción en fase sólida.....	59
5.1.2.3 Supresión iónica.....	62
5.1.2.4 Estándar interno.....	63
5.1.2.5 Metodología optimizada de extracción.....	69

5.2 Validación de Método.....	70
5.2.1 Adecuabilidad del sistema.....	70
5.2.2 Especificidad.....	71
5.2.3 Efecto matriz.....	74
5.2.4 Efecto de acarreamiento (<i>carry-over</i>).....	74
5.2.5 Límite de detección.....	76
5.2.6 Linealidad.....	76
5.2.7 Precisión.....	78
5.2.7.1 Repetibilidad.....	78
5.2.7.2 Reproducibilidad.....	79
5.2.8 Exactitud.....	80
5.2.9 Recuperación absoluta.....	81
5.2.10 Estabilidad.....	82
6. Conclusiones y perspectivas.....	85
7. Referencias.....	86

a. Lista de Abreviaturas

Abreviatura	Significado
%CV	Porcentaje de coeficiente de variación
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AINES	Antiinflamatorio no esteroideo
AOAC	<i>Association of Oficial Analytical Chemist</i>
CasII-gly	Casiopeína II-gly [®]
CasIII-ia [®]	Casiopeína III-ia [®]
CH ₃ COONH ₄	Acetato de amonio
Cmax	Concentración máxima
COFEPRIS	Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios
Cu	Cobre
%DEA	Porcentaje de Desviación estándar absoluta
EMA	<i>European Medicinal Association</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FEUM	Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos
FMN	Factor de Matriz Normalizado
h	Horas
H ₂ O	Agua
HFBA	Ácido Heptafluorobutírico
HPLC-MS	<i>High Performance Liquid Chromatography- Mass Spectropy</i>
HPLC-UV	<i>High Performance Liquid Chromatography- Ultraviolet</i>
ICH	International Conference Harmonization
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
ISO	<i>International Organization for Standardization</i>
IUPAC	<i>International Union of Pure Applied Chemistry</i>
L	Litro
LDD	Límite de detección
LIC	Límite inferior de cuantificación
LSC	Límite superior de cuantificación
MCA	Muestra control alta
MCB	Muestra control baja
MCD	Muestra control diluida

Abreviatura	Significado
MCM	Muestra control media
mg	Miligramo
min	Minuto
mL/min	Mililitro por minuto
mL/h	Mililitro por hora
mm	Milímetros
mM	milimolar
MΩ	Mega Ohm
ng/mL	Nanogramo por mililitro
NO ₃	Ion Nitrato
NOM	Norma Oficial Mexicana
°C	Grados Celcius
OMS	Organización Mundial de la Salud
PNO	Procedimiento Normalizado de Operación
Q-SAR	<i>Quantitative structure-activity relationship</i>
TOF	<i>Time of fly</i>
r	Coefficiente de determinación
r ²	Coefficiente de determinación
SPE	<i>Solid Phase Extraction</i>
SPPS	Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud
SSA	Secretaría de Salud
TFA	Ácido Trifluoracético
UICC	Unión Internacional Contra el Cáncer
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México
USIP	Unidad de Servicios a la Industria Petrolera
USP	<i>United States Pharmacopea</i>
µg/mL	Microgramo por mililitro
µL	Microlitro
µm	Micrometro

b. Índice de Cuadros

Cuadro 1. Fórmula General de sub Familias de Casiopeínas®	8
Cuadro 2. Características Fisicoquímicas de la Casiopeína III-ia®	9
Cuadro 3. Esquema de preparación de soluciones de trabajo en agua.....	25
Cuadro 4. Esquema de preparación de muestras en matriz biológica cargadas con el analito.....	25
Cuadro 5. Columnas y fases móviles utilizadas en pruebas de retención de ion de cuantificación 346.07 m/z.....	27
Cuadro 6. Serie de experimentos para establecer los parámetros espectrométricos óptimos de detección.....	28
Cuadro 7. Serie de experimentos para evaluar la precipitación de proteínas.....	30
Cuadro 8. Metodología de pruebas de retención en tres sistemas de extracción en fase sólida.....	31
Cuadro 9. Metodologías de prueba para el mejoramiento del porcentaje de recobro de CasIII-ia®.....	32
Cuadro 10. Resultados de optimización de parámetros espectrométricos.....	54
Cuadro 11. Condiciones cromatográficas óptimas.....	56
Cuadro 12. Condiciones espectrométricas óptimos. Detector TOF.....	56
Cuadro 13. Evaluación de reproducibilidad de la evaluación instrumental.....	58

Cuadro 14. Resultados de pruebas de precipitación.....	59
Cuadro 15. Porcentaje de recobro para sistemas de Extracción en Fase Sólida.....	60
Cuadro 16. Optimización de metodología de extracción en fase sólida, analito en solución.....	61
Cuadro 17. Porcentaje de recobro del procedimiento combinado, con diversos agentes precipitantes.....	61
Cuadro 18. Ejemplo de Adecuabilidad del sistema.....	71
Cuadro 19. Resultados experimentales de evaluación de efecto matriz.....	74
Cuadro 20. Evaluación de Exactitud para las curvas de calibración.....	77
Cuadro 21. Evaluación de porcentaje de coeficiente de variación para las curvas de calibración.....	77
Cuadro 22. Repetibilidad al límite inferior de cuantificación.....	78
Cuadro 23. Evaluación de repetibilidad de muestras control.....	78
Cuadro 24. Datos de repetibilidad de muestra diluida.....	79
Cuadro 25. Datos de reproducibilidad en tres días diferentes de análisis.....	80
Cuadro 26. Desviación estándar absoluta para evaluación de exactitud del método.....	81
Cuadro 27. Resultados de evaluación de porcentaje de recobro.....	82

Cuadro 28. Resultados de evaluación de estabilidad de CasII-ia [®] en matriz biológica a diversas condiciones.....	83
Cuadro 29. Resumen de resultados de validación de método.....	84

c. Índice de Figuras

Figura 1. Etapas del desarrollo de un medicamento.....5

Figura 2. Estructura de la Casiopeína III-ia®9

Figura 3. Procedimiento de tratamiento previo a la extracción por fase sólida. Precipitación de proteínas.....33

Figura 4. Procedimiento en sistema de extracción en fase sólida.....34

Figura 5. Esquema de doble infusión para la evaluación del efecto matriz, por medio de supresión iónica.....35

Figura 6. Metodología optimizada de extracción a validar según la NOM-177-SSA1-2013.....37

Figura 7. Ecuación de FMN para la evaluación de efecto matriz.....39

Figura 8. Ecuación %DEA para la evaluación de exactitud de método.....41

Figura 9. Ecuación para cálculo de porcentaje de recuperación.....42

Figura 10. A Espectro de Casiopeína III-ia® en metanol
B Espectro de fragmentación del ion 346.07141 m/z.....46

Figura 11. Espectro de masas de la muestra inyectada en columna Eclipse C8, metanol/agua (8:2) y flujo de 0.8 mL/min.....48

Figura 12. Espectro de masas de la muestra inyectada en columna Eclipse C8, metanol/agua (8:2) y flujo de 0.8 mL/min. Acercamiento 210 a 440 m/z.....49

Figura 13. Espectro de masas de CasIII-ia® en solución de metanol/TFA 1% (8:2).....51

Figura 14. Espectro de masas de CasIII-ia® en solución de metanol/HFBA 40mM (8:2).....52

Figura 15. Gráfico correspondiente a evaluación concentración-respuesta de la CasIII-ia. Evaluación instrumental.....	57
Figura 16. Cromatograma de evaluación de supresión iónica. A Señal de iones totales. B Señal de infusión de CasIII-ia [®] . C Señal de CasIII-ia en plasma.....	62
Figura 17. Espectro de masas correspondiente a Prednisona 10 µg/mL en fase móvil.....	64
Figura 18. Espectro de masas de Olanzapina 10 µg/mL en fase móvil.....	65
Figura 19. Cromatograma correspondiente a una muestra en sometida a procedimiento de extracción. A Señal Ranitidina 2 µg/mL. B señal CasIII-ia [®] a 1000 ng/mL.....	66
Figura 20. Cromatogramas prueba de estándares internos. 1 Señal A Olanzapina 500 ng/mL; Señal B CasIII-ia [®] 1000 ng/mL. 2 Señal C CasII-gly [®] 500 ng/mL; señal D CasIII-ia [®] 500 ng/mL.....	67
Figura 21. Cromatograma muestra de Casiopeína III-ia [®] en plasma 500 ng/mL (A) con adición de estándar externo Prednisona 2 µg/mL (B).....	68
Figura 22. Gráfico correspondiente a curva de calibración de CasIII-ia [®] en solución, posterior a una extracción.....	70
Figura 23. Cromatograma correspondiente a la fase móvil.....	71
Figura 24. Cromatograma correspondiente a plasma normal. La señal A. CasIII-ia [®] en LIC (25 ng/mL).....	72
Figura 25. Cromatograma correspondiente a plasma hemolizado. Señal A. CasIII-ia en LIC (25 ng/mL).....	72
Figura 26. Cromatograma correspondiente a plasma lipémico. Señal A. CasIII-ia en LIC (25 ng/mL).....	73
Figura 27. Cromatograma correspondiente a heparina. Señal A. CasIII-ia en LIC (25 ng/mL).....	73

Figura 28. Cromatograma correspondiente a un blanco procesado. Inyección realizada anteriormente a una muestra de LSC.....	75
Figura 29. Cromatograma correspondiente a un blanco procesado. Inyección realizada posterior a una muestra en LSC.....	75
Figura 30. Ecuación para cálculo de límite de detección. Donde σ es la desviación estándar de la respuesta y S la pendiente de la curva de calibración.....	76
Figura 31. Curva de calibración promedio, evaluación de respuesta lineal. Se muestra ecuación de la recta correspondiente a una ponderación $1/x^2$	77

1. Introducción

En México, el cáncer es la tercera causa de muerte, con 73 millones de muertes registradas en 2013, se estima que cada año se detectan 128 mil casos nuevos de este padecimiento [Secretaría de Salud (SSA), Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud (SPPS), 2013].

En todo el mundo existen grupos de investigación dedicados a la búsqueda, diseño y establecimiento de nuevos tratamientos resulten efectivos y seguros [SSA, 2013]. Dentro de esta línea de investigación se encuentra un grupo en la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), que ha desarrollado una serie de fármacos patentados con el nombre de CASIOPEÍNAS®.

La Casiopeína III-ia® como el resto de los compuestos que pertenecen a esta familia, posee actividad antitumoral y los estudios pre-clínicos han permitido que esta molécula sea sujeta a un estudio en el ámbito clínico [Martínez, 2008]. Los estudios farmacocinéticos en humanos son imprescindibles para establecer un régimen de dosificación, la realización de estos estudios exige contar con métodos bioanalíticos validados sensibles y específicos, por ello en el presente trabajo se propone un método analítico para la cuantificación de Casiopeína III-ia® en Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS, por su siglas en inglés). Dicho método, demostró ser específico, sensible y confiable; con una $r = 0.99$ y una exactitud no mayor al 14 % en el intervalo de trabajo de de 25 a 1000 ng/mL.

2. Antecedentes

2.1 Cáncer: generalidades y estadísticas

La palabra cáncer se utiliza para denominar un conjunto de padecimientos que comprenden una alteración en el crecimiento normal de las células de cualquier tejido del organismo, produciendo un aumento de volumen, este crecimiento se conoce como Neoplasia. [National Cancer Institute (NCI), 2014]

Las neoplasias se dividen en dos grupos: neoplasias benignas y neoplasias malignas. Las neoplasias malignas son sinónimas de cáncer ya que además del crecimiento descontrolado pueden invadir tejidos cercanos a través del torrente sanguíneo o el sistema linfático [SSA, 2011]. Los diversos tipos de cáncer se clasifican según el lugar de aparición.

Actualmente, el cáncer, es una de las principales causas de mortalidad a nivel mundial, en 2012 se reportaron 8.2 millones de defunciones, equivalente al 13% de las defunciones mundiales. Siendo los de mayor incidencia el cáncer de pulmón seguido por el de estómago, hígado, colon y mama [OMS, 2014].

En México respecto a morbilidad en el año 2011 se reportó que del total de egresos hospitalarios por tumores, el 55.6% se deben a tumores malignos; en la población joven (menores de 20 años), del total de egresos, el 70.6% se debe a un tumor maligno, siendo esta cifra mayor a la presentada en el población adulta (53.2%) [Instituto Nacional de Geografía y Estadística (INEGI), 2014].

2.2 Tratamientos contra el cáncer

En la actualidad recibir un diagnóstico de cáncer no significa sinónimo de muerte ya que las probabilidades de supervivencia son altas con un diagnóstico oportuno y un tratamiento adecuado [SSA, 2011]. Debido a la diversidad de padecimientos que comprenden el cáncer, existen un sin número de tratamientos, estos pueden dividirse en cuatro tipos:

- **Cirugía.** Consiste en extirpar el tejido maligno (tumor) con la finalidad de curar la enfermedad. Este tipo de tratamiento resulta efectivo para tipos de cáncer que son localizados es decir que no se han diseminado [NCI, 2014].
- **Terapia biológica.** Estos tratamientos utilizan sustancias que son de origen biológico, que inhiben o estimulan al sistema inmunológico con la finalidad de que este ayude a combatir las células dañadas [NCI, 2014].
- **Radioterapia.** Uso de radiación de alta energía proveniente de rayos X, rayos gamma, neutrones y protones para destruir células cancerosas y reducir el tamaño de los tumores. [NCI, 2014].
- **Quimioterapia.** Es la administración sistémica de un fármaco o la combinación de ellos, con la finalidad de frenar, disminuir y/o destruir las células cancerígenas [NCI, 2014].

2.2.1 Agentes quimioterapéuticos contra el cáncer

Cuando un paciente es candidato a este tipo de tratamiento, en la mayoría de los casos se recurre a una poliquimioterapia [Albanel, J. Mestres J. Torres, B., 2000]. Los fármacos quimioterapéuticos anticancerosos se clasifican según el mecanismo de acción. A continuación se explican brevemente los principales.

- **Agentes alquilantes:** Esta familia es de las más utilizadas. Su blanco de acción es la cadena de Ácido Desoxirribonucleico (ADN), pues se une a las bases nitrogenadas por medio de la alquilación de un átomo de hidrógeno dando lugar a la formación de un enlace covalente bloqueando así la replicación de la cadena llevando a la muerte celular [Lanore, et al., 2004].
- **Agentes Antimetabolitos:** La estructura química de estos agentes es similar a las moléculas que participan en la síntesis de ácidos nucleicos, por lo que interfieren en dicho proceso deteniendo el metabolismo de la célula [Albanel, et al., 2000].

La mayoría de los agentes quimioterapéuticos independientemente de su mecanismo de acción específico actúan induciendo la apoptosis [Lanore, et al. 2004].

2.3 Desarrollo de Fármacos Nuevos

Durante el siglo XIX los fármacos y medicamentos disponibles tenían como origen preparaciones crudas de plantas, animales o minerales, debido a la experimentación fisiológica y al desarrollo de la química medicinal, el aislamiento, purificación e identificación de principios activos hizo posible la síntesis de nuevos fármacos, con ello el crecimiento, durante el siglo XX, de la industria farmacéutica y la venta de nuevos productos que prometían el mejoramiento de la salud; sin embargo, el desastre de la talidomida en 1962 obligó a las autoridades sanitarias a emitir normatividades para la protección del paciente dando como resultado la creación de Comités de Ética y de investigación en seres humanos [Magos-Guerrero y Lorenzana-Jiménez, 2009].

Los medicamentos antes de ser distribuidos al público pasan por diversas etapas: el descubrimiento, optimización y desarrollo así como etapas pre-clínicas y clínicas [Magos, 2009], tal como muestra la figura 1.

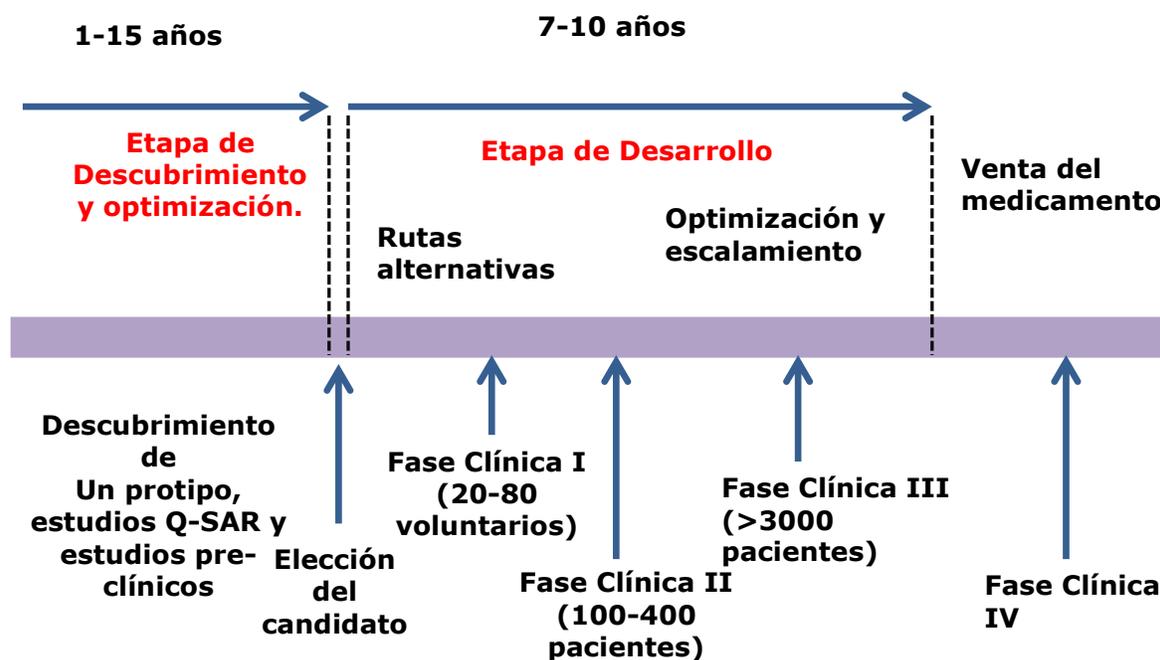


Figura 1. Etapas del desarrollo de un medicamento. King F.D. (2002). Medicinal Chemistry. RSC. Great Britain. pp. 182.

2.3.1 Fase pre-clínica

Esta etapa puede sub-dividirse en tres fases:

- a) Evaluación general del potencial farmacológico de las moléculas, en el caso de no conocer su efecto o de ser diseñado para una acción en específico. Estas evaluaciones pueden realizarse *in vitro*: en tejidos, órganos aislados o líneas celulares e *in vivo* en diversas especies animales con dosis estándar estableciendo además posibles efectos secundarios [Pérez-Sánchez, P. y Sobredo-Galanes A., 2010].

- b)** Estudios de toxicidad aguda y crónica, afectación en fertilidad, mutagenicidad y teratogenicidad [Pérez, 2010].
- c)** Estudios farmacocinéticos y estudios farmacodinámicos en diversas especies animales [Magos, 2009].

2.3.2 Fase Clínica

Para que un nuevo fármaco sea probado en humanos primeramente debe de contar con autorización gubernamental y registro del mismo, en nuestro país es otorgada por la Secretaría de Salud por medio de la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS). La fase clínica se divide en cuatro fases:

- **Fase I.** Se realizan en pequeños grupos de voluntarios sanos con la finalidad de evaluar la seguridad y establecer las dosis seguras así como evaluar datos farmacocinéticos. En fármacos con toxicidad esperada como antineoplásicos o inmunosupresores se realizan pruebas en voluntarios enfermos [Pérez, 2010].
- **Fase II.** Cuando en la fase anterior los resultados son satisfactorios y confiables el fármaco es administrado a un grupo de pacientes con la enfermedad determinada a tratar. Estos estudios son aleatorizados y tienen como propósito valorar la eficacia del fármaco nuevo [Magos, 2009].
- **Fase III.** En esta fase se procede a organizar un ensayo clínico con un mayor número de pacientes, es decir pasar de 80 pacientes hasta 3,000 esperando disminuir los errores ocasionados por el sesgo de las etapas anteriores y así comprobar con datos confiables que el fármaco es seguro y eficaz [Magos, 2009].

- **Fase IV.** Después de cubrir requisitos de registro y siendo aprobadas ante las instancias regulatorias correspondientes el medicamento es finalmente puesto a la venta; sin embargo, al exponer al medicamento a una gran cantidad de pacientes es necesario mantener la vigilancia al reportar efectos secundarios o tóxicos en la población abierta este proceso es conocido como Farmacovigilancia [Pérez, 2010].

El proceso para que un medicamento se encuentre disponible al público es producto de un largo trabajo de investigación multidisciplinaria, el cual está en caminado a garantizar la calidad y seguridad del medicamento [Magos, 2009].

2.4 Casiopeínas®

Las Casiopeínas® son una familia de más de 100 compuestos de coordinación de Cobre (II), de formula general: $[\text{Cu}(\text{N-N})(\text{O-O})]\text{NO}_3$ o $[\text{Cu}(\text{N-N})(\text{O-N})]\text{NO}_3$ los cuales han sido caracterizadas y reorganizadas en subfamilias de acuerdo a las variaciones en la formula general tal como se muestra en el Cuadro 1 estos compuestos fueron creados como análogos del Cis-platino, fármaco utilizado en el tratamiento de diversos tipos de cáncer [Gracia, et al., 2001].

Durante el diseño y desarrollo de estas moléculas se establecieron tres aspectos fundamentales: 1) la inclusión de un metal esencial en vez del platino, lo que disminuye su toxicidad, su estado de oxidación y su número de coordinación; 2) la formación de quelatos que favorecen la orientación *cis* alrededor del ión metálico preservando la capacidad de intercalamiento en la cadena de ADN y 3) la asociación de moléculas con capacidad quelante que le confiere diversos niveles de hidrofobicidad, y

sustituyentes periféricos que pueden modificar las propiedades de los compuestos. [Fuentes, 2005].

Cuadro 1. Fórmula General de sub Familias de Casiopeínas®

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

Martínez Chapa, K.A. (2008). *Compilación de los Estudios Químicos y Farmacológicos de las Casiopeínas® III-ia y IIgly*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM. México. P.25

2.4.1 Casiopeína III-ia®

La Casiopeína III-ia® (CasIII-ia®) [(Cu(4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina)(acetilacetato)] NO₃, mostrada en la figura 2, es un compuesto de coordinación constituido por dos ligantes bidentados, uno de ellos donador de oxígenos y el otro donador de nitrógenos, con un centro metálico de cobre II y una geometría cuadrado plano [Tovar, et al., 2004]. Esta molécula se ha sometido a estudios químicos en los que son definidos características y propiedades estructurales de la molécula [Martínez, 2008]. En el Cuadro 2 se muestran algunos datos de la caracterización fisicoquímica obtenidos por medio de diversos métodos espectroscópicos: ultravioleta-visible, infrarrojo, resonancia paramagnética electrónica, análisis térmico diferencial [Tovar, et al., 2004] y cromatografía líquida de alta resolución [Fuentes, 2002].

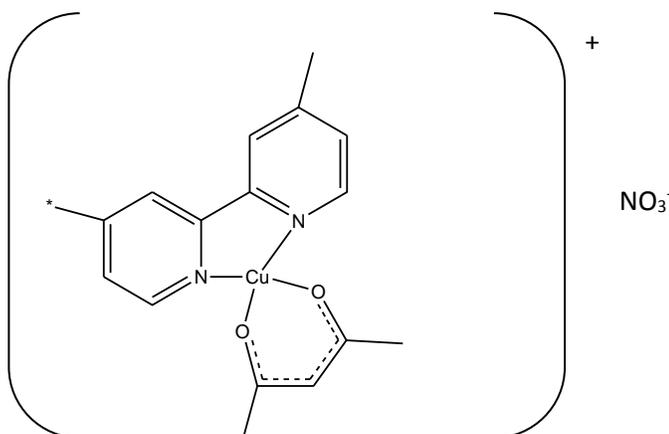


Figura 2. Estructura de la Casiopeína III-ia[®].

También se han realizado estudios de estabilidad en condiciones de almacenamiento a 40°C y 75% de humedad relativa, según establece la Norma Oficial Mexicana NOM-073-SSA1-1993. Los resultados de estos arrojaron que la pureza del compuesto disminuye 30 días después de iniciado el análisis. [Estudios no publicados realizados en la Facultad de Química UNAM, 2008].

Cuadro 2. Características fisicoquímicas de la Casiopeína III-ia[®]

Característica	Descripción
Peso Molecular	426.92 g/mol
No. CAS	223930-33-4
Análisis Elemental	H 4.96, C 47.83, N 9.84, O 22.49, Cu 14.88
Descripción del compuesto	Polvo fino, libre de partículas extrañas, homogéneo, color azul claro.
Solubilidad	A temperatura ambiente es soluble en agua, metanol, etanol y solución glucosada al 5% a pH 7.4
Log P (o/w)	-0.95
Estabilidad en pH	3-8

Martínez Chapa, K.A. (2008). *Compilación de los Estudios Químicos y Farmacológicos de las Casiopeínas[®] III-ia y IIgly*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM. México.

2.4.1.1 Actividad Biológica de la Casiopeína III-ia®

Para la CasIII-ia® diseñada para ejercer actividad anticancerígena, los experimentos fueron guiados a la comprobación de dicho efecto terapéutico. Para demostrar la actividad biológica en modelos *in vitro* se evaluó la inhibición del crecimiento de células humanas y murinas. Los resultados arrojaron que las concentraciones a utilizar de CasIII-ia® para inhibir el 50% del crecimiento de líneas humanas de carcinoma cérvico-uterino son de 10 a 100 veces menores a las utilizadas para el cisplatino. En cambio para líneas murinas de carcinoma de pulmón de Lewis, línea celular altamente metastásica, no se encontró ninguna actividad, ni del cisplatino. [Gracia, et al., 2001].

Los estudios *in vivo* se han realizado con líneas celulares murinas isotransplantadas mostrando una actividad antiancerígena sobre melanoma B16, leucemia linfoide L1210, sarcoma S180 y carcinoma de pulmón de Lewis LL. Los resultados han mostrados que la remisión del tumor y el aumento de sobre vida hasta en un 98% es dependiente de la vía de administración y esquema de tratamiento [Gracia, et al 2004]. Por otro lado, en líneas celulares humanas que fueron xenotrasplantadas los ensayos arrojaron que en ratas tratadas con CasIII-ia® en dosis de 6 mg/Kg por vía intravenosa presentaron una remisión total del tumor en el transcurso de un mes. [Carvallo-Cheigneau, et al., 2008].

Los estudios también han vislumbrado el posible mecanismo de acción de la CasIII-ia® que consiste en inhibir la proliferación celular produciendo la muerte por apoptosis o actividad autofágica, de forma independiente de la dosis. [Carvallo, et al 2008].

2.4.1.2 Métodos de cuantificación de Casiopeína III-ia®

Existen métodos desarrollados utilizando Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución con detector ultravioleta (HPLC-UV, por su siglas en inglés) para la cuantificación de este compuesto en plasma de rata en un intervalo de concentraciones de 2.5-50 $\mu\text{g/mL}$. Sin embargo los nuevos datos sugieren que la sensibilidad de los métodos debe ser mayor, es decir, en el orden de nanogramos (ng), debido a sus características farmacocinéticas. En pruebas realizadas a concentraciones de CasIII-ia® entre 20 y 50 $\mu\text{g/mL}$ el porcentaje de unión es menor al 90%, por lo que no resulta trascendental; sin embargo, el porcentaje aumenta a concentraciones menores a 12 $\mu\text{g/mL}$ [Fuentes, 2005].

Por otro lado también existen metodologías por HPLC-MS desarrollados para cuantificar otro fármaco de la familia de las Casiopeínas®; la Casiopeína II-gly®, en el cual se logró disminuir el límite de cuantificación hasta 0.1 $\mu\text{g/mL}$, además de establecer los precedentes del comportamiento cromatográfico y espectrométrico de esta familia de fármacos [Cañas, 2013].

2.5 Desarrollo de Métodos Bioanalíticos

Esta etapa también conocida como pre-validación es realizada cuando el fármaco en cuestión carece de un método oficial (publicado o aprobado por una farmacopea), o cuando un fármaco es nuevo y por lo tanto no existen metodologías reportadas para su cuantificación en el producto a la venta o en fluidos biológicos. Un método desarrollado adecuadamente debe facilitar su validación, además ser de sencillo al procesar múltiples muestras [Breux, et al., 2003].

Un procedimiento analítico se desarrolla con la finalidad de probar una característica definida de un fármaco o producto farmacéutico frente a los criterios de aceptación establecidos. La primera etapa consiste en la elección de la instrumentación adecuada en base al propósito y al alcance esperado para el método. Los parámetros a evaluar para conocer si el método es idóneo son: especificidad, linealidad, límite de cuantificación, precisión y exactitud [FDA, 2014].

Los métodos pueden ser desarrollados de diversas formas, la más aceptada consiste en seguir un diseño experimental basado en comprensión de fenómenos químicos relacionados con la metodología instrumental; sin embargo, la experiencia previa, aunada a datos bibliográficos reportados y resultados experimentales sirven como guía para dirigir el desarrollo y llegar así al mejor método para ser validado y aplicado [FDA, 2014].

2.6 Validación de Métodos Bioanalíticos

Según la FDA, la validación de un método bioanalítico consiste en demostrar mediante procedimientos experimentales que este es fiable y reproducible para su aplicación en la cuantificación de analitos en una matriz biológica (sangre, plasma, suero u orina).

Los parámetros fundamentales para validar un método incluyen: precisión, exactitud, selectividad, sensibilidad, reproducibilidad y estabilidad. Por ello la validación implica documentar todo procedimiento experimental que compruebe el buen funcionamiento del método bioanalítico para las aplicaciones de análisis previstos [FDA, 2014].

Los parámetros de evaluación de métodos bioanalíticos, así como los criterios de aceptación, rechazo y ejecución dependen de las instancias evaluadoras de cada país o región. En México la estancia reguladora es la SSA, por medio de la COFEPRIS, que ha publicado una Norma de observancia obligatoria, la NOM-177-SSA1-2013, la cual establece los procedimientos a seguir para la evaluación de intercambiabilidad de medicamentos y estudios de biodisponibilidad, entre otros parámetros. La Norma Oficial Mexicana (NOM), indica que para validar un método es necesario contar con un mínimo de parámetros comprobados.

Existen otros órganos regulatorios con autoridad internacional para la evaluación de métodos analíticos. Cada uno de ellos ha publicado guías de validación, que tal como el nombre indica tienen el objetivo de encaminar al analista a realizar las evaluaciones necesarias. Las principales guías son editadas por la FDA y *European Medicines Agency* (EMA), aunque existen otros órganos regulatorios como la *International Union of Pure Applied Chemistry* (IUPAC), la *Association of Official Analytical Chemist* (AOAC *International*) e *International Organization for Standardization* (ISO) que han editado otra guía importante que pretende unificar los procedimientos de validación y criterios de aceptación para las metodologías bioanalíticas, este acuerdo es conocido como *International Conference on Harmonisation* (ICH).

2.6.1 Especificidad

Es la capacidad de un método para diferenciar y cuantificar el analito en presencia de otros componentes en la muestra [FDA, 2001], por medio de la demostración de la no interferencia de compuestos endógenos de

la matriz biológica: normal, lipémica y hemolizada, así como las interferencias de fármacos de uso común, metabolitos, anticoagulantes u otras sustancias que puedan encontrarse en la matriz [NOM-177-2013].

2.6.2 Efecto Matriz

En la actualidad la aplicación de espectrofotometría de masas en el análisis de muestras biológicas se ha extendido considerablemente ya que cada vez más métodos de cuantificación se desarrollan utilizando este tipo de detectores. Sin embargo, también se hace patente un problema muy común al trabajar con la técnica: el efecto matriz. Este problema se define como la alteración de la eficiencia de la ionización del analito (en la interfase) por la presencia de sustancias coeluyentes en la muestra, el mecanismo de este fenómeno aún no es conocido, sin embargo, en estudios realizados a compuestos de diversas polaridades se observó que entre mayor sea la polaridad del compuesto a cuantificar el efecto matriz se incrementa [Taylor, P., 2005].

Por ello los métodos que implican la detección del fármaco de interés por medio de espectrofotometría de masas deben considerar la evaluación del efecto matriz lipémica y hemolizada [FDA, 2013].

Para la evaluación experimental existen dos métodos: adición post-extracción o método cuantitativo e infusión post-columna o método cualitativo. El primero requiere realizar el proceso de extracción en una muestra de matriz blanco, posterior a esto se adiciona una concentración conocida del analito y se inyecta al sistema cromatográfico, de la misma forma se inyecta el analito en solución sistema y se comparan las respuestas [Taylor, P., 2005].

La infusión post-columna se realiza con la ayuda de una bomba de infusión que introducirá el analito en solución directamente al detector, al mismo tiempo se inyecta en el sistema cromatográfico el blanco de matriz previamente procesado, según la extracción a utilizar, de este modo se evalúa el efecto de los componentes de la matriz sobre el analito durante toda la corrida. Si alguno de los componentes afecta la ionización del analito se observa un descenso en la respuesta de la línea base, esto tiene relevancia analítica si dicho descenso se produce en el tiempo de retención del analito. Por otro lado este método es funcional para comparar diversas técnicas de extracción [Taylor, P., 2005].

2.6.3 Efecto de Acarreamiento (*carry-over*)

Los equipos de HPLC-MS actualmente cuentan con sistemas automatizados de inyección, lo cual permite el análisis masivo de muestras, sin embargo es común el efecto de acarreamiento o *carry-over*, el cual consiste en que una cantidad del analito a cuantificar es retenido en alguna parte del sistema cromatográfico: inyector, bomba, tuberías, columna y/o asiento de aguja, esto representa un problema cuando esta pequeña cantidad de analito es liberada y detectada sumándose a la señal obtenida por la muestra, afectando seriamente parámetros como la precisión y exactitud [Vallano, 2005].

Si los resultados experimentales indican la presencia de dicho fenómeno es necesario implementar sistemas de lavado inter-corrida, a modo que la precisión y exactitud del método no se vean afectados. En los equipos recientes pueden programarse lavados automatizados de los puntos críticos del sistema, ya mencionados, con los disolventes usuales en cromatografía: acetonitrilo, metanol, agua, isopropanol o la combinación

de ellos, así como la fase móvil utilizada en el método, de este modo la fracción de analito rezagada en algún punto del sistema cromatográfico será removida antes de la inyección de una nueva muestra y el problema de acarreamiento será controlado y no afectará el análisis bioanalítico [Vallano, et al., 2005].

2.6.4 Límite de Cuantificación

La Guía de Validación ICH define este parámetro como la cantidad más baja de analito en una muestra que es posible determinar cuantitativamente con precisión y exactitud adecuadas. El límite inferior de cuantificación (LIC) usualmente es considerado el punto más bajo de una curva de calibración; sin embargo, para estudios de bioequivalencia la NOM-177-2013 hace referencia que este se determina con base al 5% de la Concentración máxima (C_{max}) reportado para el analito de interés.

2.6.5 Linealidad

Para la cuantificación de un analito es necesario conocer la respuesta del instrumento frente a la molécula en un rango de concentraciones conocidos, para ello se utilizan parámetros de referencia como una curva de calibración, que guarda una relación entre concentración-respuesta permitiendo la cuantificación del analito [ICH, 2002].

Las relaciones concentración-respuesta pueden ser de diversas naturalezas, generalmente se trabaja con expresiones matemáticas sencillas del tipo de ecuación de una recta ($y=mx+b$), la calidad y confiabilidad de estas son evaluadas por medio del coeficiente de correlación (r) el cual debe tener un valor mayor o igual 0.98, entre más

cercano sea este valor a uno el ajuste de los datos al modelo matemático será mayor [Sierra, et al., 2010].

2.6.6 Precisión

Es el grado de concordancia o dispersión entre una serie de medidas obtenidas del muestreo múltiple de la misma muestra en condiciones dadas. La precisión puede ser considerada en dos niveles: repetibilidad, y reproducibilidad [EMEA, 2006].

2.6.6.1 Repetibilidad

Se define como la expresión de la precisión a corto plazo, denominándose también precisión intra-ensayo, habitualmente se realiza en un sólo día de análisis en las condiciones establecidas [EMEA, 2006].

2.6.6.2 Reproducibilidad

Este nivel de precisión se puede definir como la variación intra-laboratorio en diferentes días, analistas, equipos etc. y se realiza con la finalidad de asegurar que en cada día de análisis las muestras evaluadas serán confiables aún cuando una variable como el analista sea modificada [EMEA, 2006].

2.6.7 Exactitud

Esta se define como la capacidad de un método para arrojar resultados experimentales que sean cercanos al los valores esperados o nominales [EMEA, 2006].

2.6.8 Recuperación absoluta

La recuperación de un analito en un ensayo es la respuesta obtenida del detector a partir de una cantidad de analito añadido y extraído de la matriz biológica, en comparación con la respuesta del detector obtenidos de la misma concentración en solución y que no ha sido sometida al procedimiento de extracción [FDA, 2001].

2.6.9 Estabilidad

Esta es definida como la capacidad de una sustancia para conservar sus propiedades químicas, físicas, microbiológicas y biofarmacéuticas dentro de los límites especificados a lo largo de su periodo de almacenamiento o manipulación [Fonseca-González, L. y Berrocal-Barrantes, L., 2004], de este modo las pruebas de estabilidad se realizan con la finalidad de evaluar las propiedades químicas del fármaco en condiciones de almacenamiento, en solución y en la matriz antes, durante y después del tratamiento de la muestra [FDA, 2001].

La NOM-177-2013 hace hincapié en siete evaluaciones de estabilidad:

- **Estabilidad de la muestra.** Este parámetro es utilizado para determinar las condiciones de temperatura y tiempo en las que el fármaco permanecerá estable en la matriz biológica durante su manejo, toma de muestra, almacenamiento y procesamiento analítico.
- **Estabilidad en ciclos de congelación/descongelación.** Se realiza con el fin de determinar las condiciones de almacenamiento a largo plazo y en situaciones de re-análisis de las muestras.

- **Estabilidad a corto plazo.** Se almacenan las muestras a temperatura ambiente durante el tiempo necesario para el procesamiento y análisis de muestras, posteriormente se procesan y analizan las muestras.
- **Estabilidad a largo plazo.** Se evalúan las condiciones de almacenamiento durante el tiempo equivalente al periodo desde la toma de muestra hasta su análisis.
- **Estabilidad de muestra procesada.** La evaluación la estabilidad del analito en la muestra procesada a temperatura ambiente o bajo condiciones de almacenamiento utilizadas durante el estudio.
- **Estabilidad del automuestreador.** Se evalúa la estabilidad del analito en la muestra procesada a la temperatura del inyector o automuestreador.
- **Estabilidad en solución.** Se realiza en caso de que la solución de referencia no sea utilizada inmediatamente, tanto para el analito como para el estándar interno.

3. Objetivos

3.1 Objetivo General

Desarrollar y Validar un método bioanalítico sensible para la cuantificación de Casiopeína III-ia[®] en plasma humano, utilizando la técnica instrumental HPLC-MS.

3.2 Objetivos Particulares

- Establecer las condiciones instrumentales óptimas para la cuantificación de Casiopeína III-ia[®].
- Disminuir el límite de cuantificación, tomando como referencia los métodos de cuantificación por HPLC-UV reportados previamente.
- Validar la metodología de acuerdo con la normatividad mexicana en apoyo con guías internacionales con la finalidad de cubrir los parámetros necesarios para la aplicación en un estudio clínico Fase I.

4. Metodología

4.1 Reactivos

- Estándar de Casiopeína III-ia[®] MEB199, sintetizada por el Departamento de Química Inorgánica y Nuclear de la Facultad de Química de la UNAM según la patente correspondiente.
- Prednisona NOE330, United States Pharmacopea (USP).
- Ranitidina 60821SRP12B-005, Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM).
- Casiopeína II-gly[®] 181MBG160106, sintetizada por el Departamento de Química Inorgánica y Nuclear de la Facultad de Química de la UNAM.
- Olanzapina GOL368, USP.
- Heparina 5000 UI/mL C063840, Laboratorios PiSA.
- Metanol grado cromatográfico, JT Baker.
- Ácido Heptafluorobutírico (HFBA) Fluka-Sigma Aldrich 99%
- Agua desionizada, procesada en el laboratorio de trabajo con el sistema Millipore con resistencia de 18 M Ω

4.2 Materiales, Equipos e Instrumentos

- Cromatógrafo de líquidos modelo 1290 infinity marca Agilent Technologies compuesto de un desgasificador y bomba binaria (G4220B); Termostato (G1330B); inyector (G4226A); y detector UV (G1314E).
- Detector espectrómetro de masas del tipo tiempo de vuelo (Q-TOF) equipado con un sistema de ionización tipo electrospray Dual AJS ESI, Agilent Technologies 6530.
- Balanza analítica BEL Engineering, MARK205A
- Centrífuga Micromase Rf

- Desionizador de Agua Milli-Q, Millipore, Integral 5
- Filtrador de disolventes Millipore
- Infusionador Cole Parmer, 60061
- Manifold Thermo Scientific, 16 port, 60104-232
- Vortex3, IKA, V35001
- Sonicador Auto science, AS3120B
- Concentrador Vaccfuge plus, Eppendorf
- Cartuchos de extracción en fase sólida (SPE) Plexa PCX, Agilent Technologies
- Cartuchos SPE Nexus WCX, Agilent Technologies
- Cartuchos SPE Strata-X, Phenomenex, 33 μm , 60 mg, 1cc.
- Viales ámbar, 1.5 mL
- Insertos de plástico, 200 μL
- Columna Cromatográfica Zorbax Eclipse Plus C18; 4.5x150 mm; 5 μm , **Agilent Technologies.**
- Columna Cromatográfica Eclipse Plus C8; **4.6x150 mm; 3.5 μm ,** Agilent Technologies.
- Columna Cromatográfica Eclipse Plus Phenyl-Hexyl; 2.1x100 **mm; 3.5 μm .**
- Columna Cromatográfica Sinergy MAX-RP 8A; 4.6x150 mm; 4 μm ; Phenomenex.
- Columna Cromatográfica Eclipse Plus C18; 2.1x50 mm; 1.8 μm ; Agilent Technologies.
- Columna Cromatográfica Eclipse Plus Phenyl; 2.1x100 mm; 3.5 μm ; Agilent Technologies.
- Pre-columna Eclipse Plus C8 4.6 x 12.5 mm; 5 μm ; Agilent Technologies.
- **Save-guard**, Agilent Technologies

- Micropipeta BRAND 100-1000 μL , Transferpette
- Micropipeta Rainin 20-200 μL XLS
- Micropipeta Ranin 2- 20 μL XLS
- Micropipeta Science MED 1000- 5000 μL

4.3 Soluciones

- Solución estándar de ranitidina en agua, 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$
- Solución estándar de casiopeína II-gly[®] en agua, 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$
- Solución estándar de gibenclamida en agua, 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$
- Solución estándar de olanzapina en agua, 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$
- Solución estándar de prednisona en metanol, 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$

4.3.1 Preparación de Soluciones

4.3.1.1 Solución de HFBA 40 μM acuoso

En un matraz volumétrico de un 1.0 L, se agregaron aproximadamente 200 mL de agua desionizada, posteriormente se midieron 5.1 mL de HFBA concentrado y se traspasó al matraz volumétrico, una vez disuelto se llevó al aforo con agua desionizada. La solución se almacena en un frasco reservorio ámbar.

4.3.1.2 Solución estándar A de Casiopeína III-ia[®] en agua, 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$

Se pesaron 10.0 mg de CasIII-ia[®] y se traspasaron a un matraz volumétrico de 10.0 mL, el polvo se disolvió en aproximadamente en 5 mL de agua desionizada y posteriormente se llevó al aforo con agua desionizada. La solución es de coloración azul claro y traslúcida, es almacenada en refrigeración protegido de la luz.

4.3.1.3 Fase móvil: metanol grado cromatográfico, HFBA 40mM en agua (7:3)

Para preparar 1 L se midieron 700 mL de metanol grado cromatográfico y se trasvasaron a un frasco reservorio ámbar de capacidad adecuada, posteriormente se midieron 300 mL de la solución de HFBA 40mM en agua y se agrega al frasco reservorio, se mezcla adecuadamente y se almacena en refrigeración y protegido de la luz.

4.3.1.4 Solución HFBA 5% acuoso

Para preparar 100 mL se agregó a un matraz volumétrico de 100.0 mL aproximadamente 25 mL de agua desionizada, posteriormente se midió 5,0 mL de HFBA concentrado y se agregó al matraz volumétrico. Se llevó al aforo con agua desionizada.

4.3.1.5 Soluciones de trabajo y preparación de muestras en matriz biológica, cargadas con el analito.

Se prepararon soluciones de trabajo de CasIII-ia[®] en agua a partir de la solución estándar A, tal como se muestra en la Cuadro 3. Para la preparación de las muestras en matriz biológica se tomaron 50 μ L de cada una de las soluciones de trabajo según muestra el esquema de la Cuadro 4 y se completo el volumen con 950 μ L de plasma, para posteriormente agitarse por 10 s en el Vórtex y aplicar la metodología correspondiente.

Cuadro 3. Esquema de preparación de soluciones de trabajo en agua.

Solución	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Alícuota de Solución estándar A (μL)	Volumen Final (mL)
1	0.5	5	10.0
2	2	20	10.0
3	3	30	10.0
4	7	70	10.0
5	10	100	10.0
6	16	160	10.0
7	20	200	10.0
8	4	400	10.0
9	12	120	10.0
10	18	180	10.0

Cuadro 4. Esquema de preparación de muestras en matriz biológica cargadas con el analito.

	Muestra	Solución de trabajo	μL de solución de trabajo	μL de Plasma	Volumen Final (mL)	Concentración final (ng/mL)
Puntos de curva de calibración	1	1	50	950	1.0	25
	2	2	50	950	1.0	100
	3	3	50	950	1.0	150
	4	4	50	950	1.0	350
	5	5	50	950	1.0	500
	6	6	50	950	1.0	800
	7	7	50	950	1.0	1000
	MCB	8	50	950	1.0	200
	MCM	9	50	950	1.0	600
	MCA	10	50	950	1.0	900

4.4 Material Biológico

- *Pool* de Plasma Humano filtrado, obtenido de pacientes varones, sanos y donado por el banco de sangre del hospital Médica Sur.

4.5 Software

- Mass Hunter Work Station Software. Agilent Technologies. Service Pack, conformado por: LC/MS Data Acquisition Versión B.05.01, 2012; Quantitative analysis Versión B.05.02, 2012 y Qualitative Analysis Versión B.06.00, 2008.

4.6 Desarrollo de Método Bioanalítico

4.6.1 Condiciones instrumentales

Se utilizó una solución de CasIII-ia[®] en metanol a una concentración de 10 µg/mL, esta solución fue preparada a partir de la solución estándar A, posteriormente con ayuda del infusor se inyectó directamente al detector a una velocidad de 2 mL/h en condiciones *default* del sistema espectrométrico.

Las pruebas de retención se llevaron a cabo para cada una de las fases estacionarias, mostradas en el Cuadro 5, inyectando una muestra de Casiopeína III-ia[®] en agua a una concentración de 5 µg/mL, variando el volumen, flujo y proporciones de las diversas fases móviles.

4.6.1.1 Infusiones de Casiopeína III-ia[®] con pares iónicos

Se realizaron infusiones de CasIII-ia[®], a una velocidad de 2 mL/h, con soluciones a concentración de 10 µg/mL, preparadas en TFA/Metanol (2:8) en concentraciones del ácido al 0.1%, 1%, 20 y 40 mM.

Adicionalmente se prepararon soluciones de CasIII-ia[®] a 10 µg/mL, preparadas en HFBA/Metanol (2:8) en concentraciones del ácido al 0.1%, 1%, 20 y 40 mM, cada una de estas soluciones fue infundida a una velocidad de 2 mL/h.

Cuadro 5. Columnas y fases móviles utilizadas para el desarrollo la metodología de cuantificación. Retención de ion de cuantificación 346.07 m/z.

Columna	Empaque	Tamaño Partícula (µm)	Longitud (mm)	Fase Móvil
Zorbax Eclipse Plus C18	Octadecilsilano enlazado químicamente a macropartículas cerámicas o de sílice porosas	5	4.5x150	MeOH/H2O
				MEOH/A. Fórmico 0.01%
				MEOH/TFA 0.1%
Eclipse Plus C8	Octasilano enlazado químicamente a partículas de sílice totalmente porosa	3,5	4.6x150	MeOH/H2O
				MEOH/A. Fórmico 0.01%
				MEOH/Buffer Acetatos 0.01M pH4
Eclipse Plus Phenyl-Hexyl	Grupos fenilo y hexilo enlazados químicamente con partículas de sílice totalmente porosa.	3,5	2.1x100	MeOH/H2O
				MEOH/Buffer Acetatos 0.01M pH4
				MEOH/TFA 0.1%
Sinergy MAX-RP 8A	Fase C12 unido a sílice hidrofoba.	4	4.6x150	MeOH/H2O
Eclipse XDB-C8	Octasilano enlazado químicamente a partículas de sílice totalmente porosa	5	4.5x150	MeOH/H2O
				MEOH/Buffer Acetatos 0.01M pH4
Eclipse Plus C18	Octadecilsilano enlazado químicamente a macropartículas cerámicas o de sílice porosas	1,8	2.1x50	MeOH/H2O
				MEOH/Buffer Acetatos 0.01M pH4
				MEOH/TFA 0.1%
Eclipse Plus Phenyl	Grupos fenilo enlazados químicamente con partículas de sílice totalmente porosa	3,5	2.1x100	MEOH/TFA 0.1%
				MEOH/Buffer Acetatos 0.01M pH6.4
				MEOH/Buffer Acetatos 0.01M pH4

4.6.1.2 Parámetros cromatográficos y espectrométricos del ion 460.0145 m/z

Se probaron como fases estacionarias: Eclipse Plus C8 y Eclipse Phenyl-Hexyl, para cada una de ellas se inyectó el compuesto a una concentración de 1000 ng/mL en metanol, modificando la proporción y flujo de fase móvil. Para establecer el volumen de inyección se inyectó el compuesto a una concentración de 1000 ng/mL en las condiciones de fase móvil y columnas establecidas, a los siguientes volúmenes: 5, 10, 15 y 20 μ L.

Una vez establecidos los parámetros cromatográficos y la señal producida mostró ser repetible y reproducible se realizaron modificaciones a los parámetros de inter-fase: nebulizador, voltaje de capilar, temperatura del gas de asiento, temperatura de gas de lavado y presión de fragmentor, como se muestra en el Cuadro 6, posteriormente se evaluó el área obtenida de cada respuesta.

Cuadro 6. Serie de experimentos para establecer los parámetros espectrométricos óptimos de detección.

Experimento	Fragmentor (V)	Temperatura de gas secado (°C)	Voltaje de Capilar (V)	Temperatura de gas de lavado (°C)	Nebulizador (psi)
1	175	350	2500	350	40
2	100	350	2500	350	40
3	300	350	2500	350	40
4	175	350	3500	350	40
5	175	200	3500	350	40
6	175	100	3500	350	40
7	175	350	2500	200	40
8	175	350	2500	100	40
9	175	350	2500	350	50

4.6.1.3 Identificación y Control del efecto de acarreamiento

Se inyectó una muestra de CasIII-ia[®] en fase móvil a una concentración de 1000 ng/mL por quintuplicado y se evaluó el área y altura de la respuesta por medio del coeficiente de variación.

Posteriormente se inyectó nuevamente la muestra de CasIII-ia[®], al término de la corrida se inyectó un blanco de fase móvil de esta última muestra se extrajo el cromatograma correspondiente al ion 460.0049 m/z.

4.6.1.4 Evaluación Instrumental

A fin de evaluar la precisión, exactitud y linealidad de la respuesta analítica de la CasIII-ia[®] se realizaron en dos días diferentes de análisis las curvas de calibración en fase móvil con los siguientes puntos: 100, 300, 500, 800 y 1000 ng/mL. Para la evaluación de la precisión intra-día se evaluaron por triplicado PCB (200 ng/mL), PCM (600 ng/mL) y PCA (900 ng/mL) preparados en fase móvil.

4.6.2 Extracción de Casiopeína III-ia[®] de matriz biológica

4.6.2.1 Inyección directa: Precipitación de proteínas

Se prepararon muestras en plasma de Casiopeína III-ia[®] a una concentración de 1000 ng/mL. A 1 mL de muestra se agregó, un agente precipitante a diversos volúmenes como lo muestra el Cuadro 7. Posteriormente se agitaron durante un minuto en el vórtex y se centrifugaron a 12000 rpm durante 10 min, el sobrenadante fue inyectado al sistema cromatográfico.

Para cada tratamiento se procesaron muestras blancos de plasma y muestras de CasIII-ia[®] en agua a la misma concentración de trabajo. Para finalizar se analizaron los cromatogramas correspondientes, y se calculó el porcentaje de recobro con respecto a las muestras preparadas en agua y procesadas de la misma forma.

Cuadro 7. Serie de experimentos para evaluar la precipitación de proteínas.

Experimento	Agente Precipitante	Volumen adicionado (mL)
1	Acetonitrilo	1
2	Metanol	1
3	ZnSO ₄ al 10%	0.030
4	NH ₄ SO ₄ al 10%	0.030
5	ZnSO ₄ al 10%	0.2
6	NH ₄ SO ₄ al 10%	0.2
7	NH ₄ SO ₄ al 10% Acetonitrilo	0.2 0.8
8	ZnSO ₄ al 10% Acetonitrilo	0.2 0.8

4.6.2.2 Extracción en fase sólida

Se probaron tres sistemas de extracción en fase sólida: Strata-X (phenomenex), Plexa PCX y Nexus WCX (Agilent) el método se realizó siguiendo el procedimiento recomendado por el fabricante, descrito en el Cuadro 8. Se prepararon muestras de CasIII-ia[®] en agua a una concentración de 1000 ng/mL, por duplicado y se calculó el porcentaje de recobro. Dicho procedimiento se realizó con la finalidad de evaluar la retención de los sistemas sin el efecto matriz.

Cuadro 8. Metodología de pruebas de retención en tres sistemas de extracción en fase sólida.

	Strata-X	Nexus	Plexa
Acondicionamiento	2mL Metanol 2mL HFBA 5%	3 mL Metanol 3 mL H ₃ PO ₄ al 2%	500 µL metanol 500 µL Agua
Muestra	1mL	1mL	1mL
Lavado	2mL Metanol al 5% acuoso	3 mL H ₂ O 1mL ácido Acético acuso 1M 1mL Ciclohexano	500 µL de ácido fórmico 2%
Elución	1 mL Metanol	1 mL Metanol	1 mL Metanol

Al obtener los resultados correspondientes se procedió a optimizar la metodología de extracción en el mejor sistema, para ello se prepararon muestras de CasIII-ia[®] en agua a una concentración de 1000 ng/mL. A 1 mL de muestra se agregó 500 µL de HFBA acuoso al 5%, posteriormente se agitó en el vortex y se procedió a tratarla por medio del sistema de extracción strata-X, modificando las condiciones de lavado y elución, como se muestra en el Cuadro 9. Para finalizar se analizaron los cromatogramas correspondientes y se calculó el porcentaje de recobro con respecto a la muestra que no fue sometida al procedimiento de extracción.

Cuadro 9. Metodologías de prueba para el mejoramiento del porcentaje de recobro de CasIII-ia®.

Procedimiento	Muestra	Lavado de sistema	Elusión
1	1mL muestra en agua	1 mL HFBA al 5%	1 mL Metanol
2	1mL muestra en agua	1mL HFBA al 5%	1 mL Fase Móvil
3	1mL muestra + 500 μ L en HFBA	1 mL HFBA al 5%	1 mL Metanol
4	1mL muestra + 500 μ L en HFBA	1 mL HFBA al 5%	1 mL Fase Móvil
5	1mL muestra en agua	1 mL H ₂ O	1 mL Metanol

Al determinar el mejor procedimiento, comparando el porcentaje de recobro, se procedió a evaluar la repetibilidad del método.

Fueron preparadas por quintuplicado muestras de CasIII-ia® en agua a una concentración de 1000 ng/mL, posteriormente se sometieron al procedimiento 1 mostrado en el Cuadro 9, cada una de ellas en diferentes sistemas de extracción. Las muestras fueron inyectadas al sistema cromatográfico y se calculó el porcentaje de coeficiente de variación del área obtenida.

Una vez valorado el procedimiento de extracción fue necesario aplicarlo en muestras preparadas en la matriz biológica por lo que se prepararon muestras de CasIII-ia® en plasma humano a una concentración de 1000 ng/mL. Adicionalmente se prepararon muestras en agua a la misma concentración. Estas muestras fueron procesadas con tres agentes precipitantes diferentes: 1 mL de Acetonitrilo, 500 μ L de HFBA al 5% y 200 μ L de ZnSO₄ al 10% cada una de estas muestras fueron tratadas según indica la figura 3.

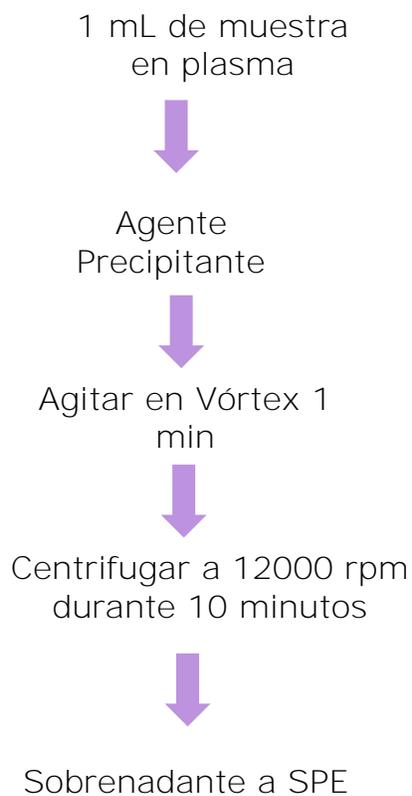


Figura 3. Procedimiento de tratamiento previo a la extracción por fase sólida. Precipitación de proteínas.

El analito fue extraído de la muestra por medio del sistema de extracción en fase sólida como muestra la figura 4. El producto de la elusión fue evaporado hasta sequedad en el sistema de concentración por burbujeo de nitrógeno, el botón resultante se reconstituyó en 100 μ L de fase móvil y fue inyectado en el sistema cromatográfico.

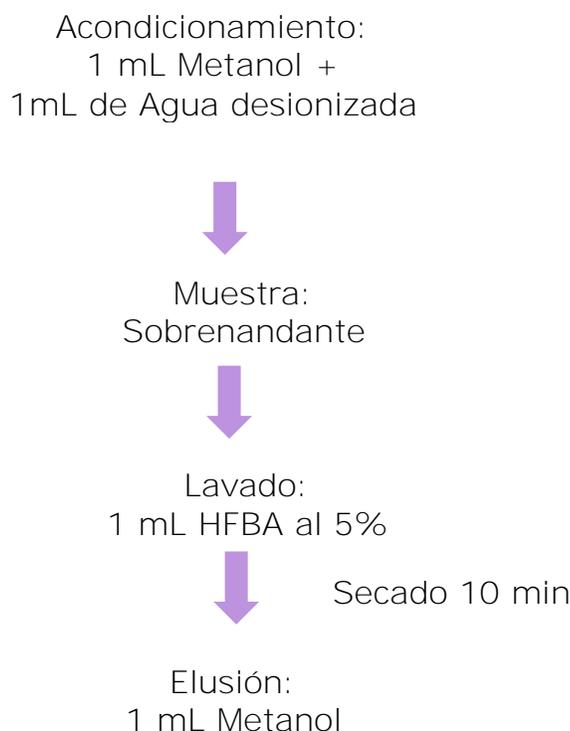


Figura 4. Procedimiento en sistema de extracción en fase sólida.

Los cromatogramas obtenidos fueron analizados y el recobro se calculó con respecto a la señal obtenida de una muestra preparada en agua.

4.6.2.3 Supresión iónica

Se preparó una solución de 10 µg/mL de CasIII-ia[®] en fase móvil, conjuntamente a un blanco de plasma procesado según la metodología de extracción optimizada. La solución del analito fue infundida directamente al espectro y el blanco de plasma fue inyectado simultáneamente por medio del sistema cromatográfico, tal como se muestra en la figura 5. Se obtuvo el espectro correspondiente.

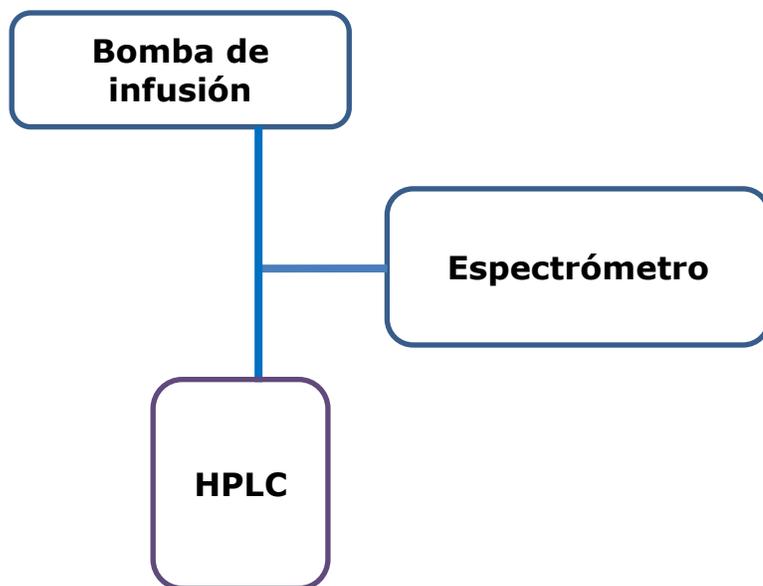


Figura 5. Esquema de doble infusión para la evaluación del efecto matriz, por medio de supresión iónica.

4.6.2.4 Estándar interno

Se realizó el espectro de masas de las siguientes soluciones de candidatos a estándares internos, a una concentración de 10 µg/mL preparadas en fase móvil: prednisona, ranitidina, naproxeno, diclofenaco, pioglitazona, gibenclamida, cafeína, casiopeína II-gly[®] y olanzapina. Se infundieron dichas soluciones a una velocidad de 2 mL/h.

Posteriormente después de analizar el espectro correspondiente los candidatos que cumplieron con las características de ionización se sometieron a pruebas de retención del ion elegido en las condiciones de cuantificación de la CasIII-ia[®].

Los candidatos que mostraron retención se inyectaron de forma directa en conjunto con el analito, determinando cuáles de ellos serían sometidos al procedimiento de extracción.

Finalmente, al determinar la concentración de trabajo de cada candidato, se prepararon muestras de CasIII-ia[®] en solución (agua) y en plasma a una concentración de 1000 ng/mL y fueron tratadas de acuerdo al procedimiento de extracción.

4.7 Validación de Método

La metodología optimizada a validar se describe brevemente en la figura 6. Tomando como referencia las características de desempeño y criterios dictados por la NOM-177-SSA1-2013: Especificidad, efecto matriz, efecto de acarreamiento, linealidad, precisión por medio de la repetibilidad y reproducibilidad; exactitud; estabilidad en condiciones de almacenamiento de la muestra procesada y no procesada; estabilidad en ciclos de congelación-descongelación y estabilidad en automuestreador. Adicionalmente se incluyeron los parámetros porcentaje de recuperación y límite de detección dictados por la guía de validación de la FDA emitida en 2013, con la finalidad de registrar la información complementaria del método y de las características de la molécula.

Las condiciones instrumentales óptimas para la cuantificación de CasIII-ia[®] se describen en el numeral 5.1.1.4 de este documento.

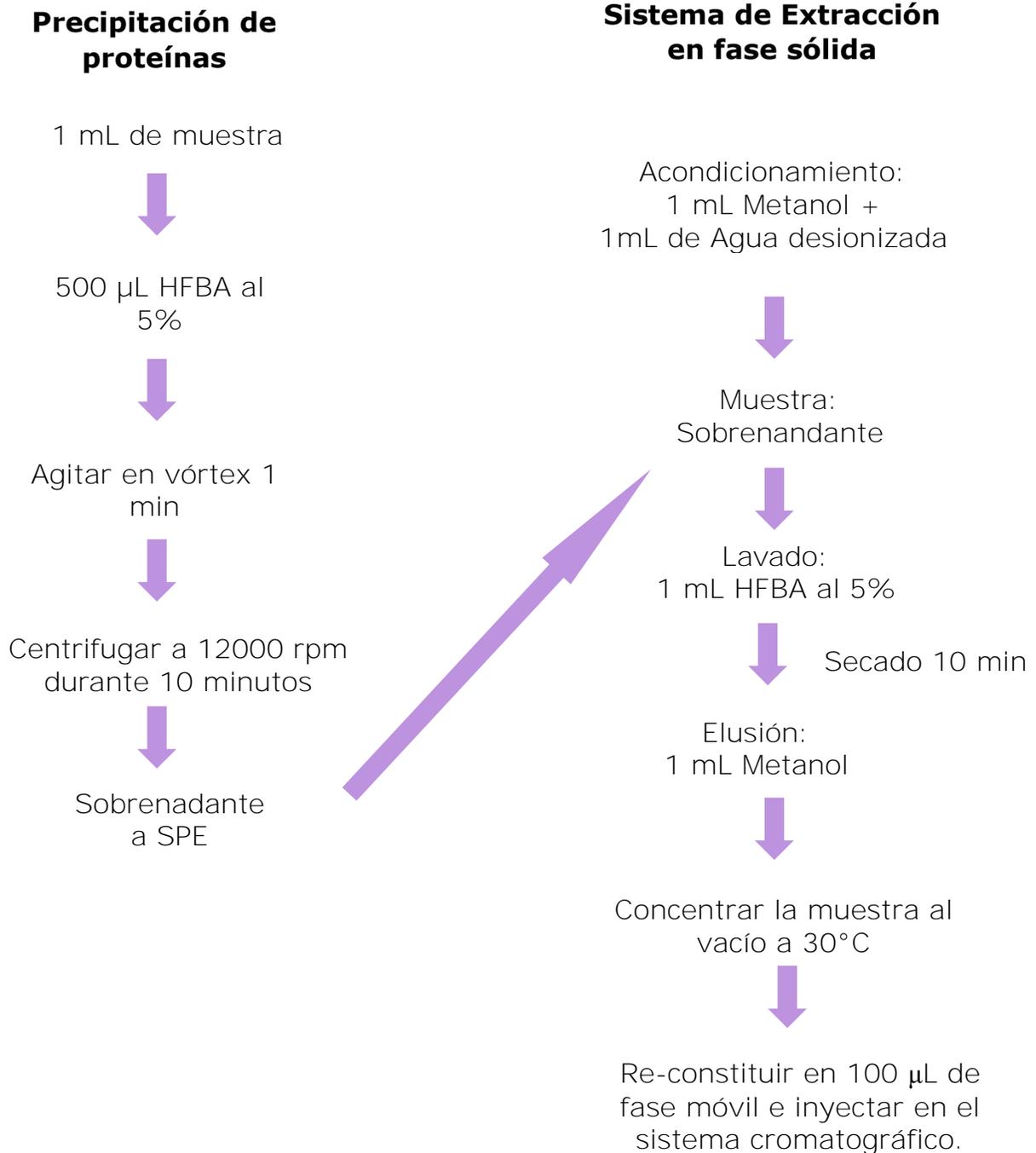


Figura 6. Metodología optimizada de extracción a validar según la NOM-177-SSA1-2013.

4.7.1 Adecuabilidad del sistema

Para evaluar la calidad de la respuesta, antes de cada corrida analítica se inyectaron por sextuplicado una muestra de CasIII-ia[®] a una concentración de 1000 ng/mL preparada en fase móvil, se evaluó el %C.V. de las respuestas obtenidas, este no debe sobrepasar el 2% [FDA,2013].

4.7.2 Especificidad

Se prepararon e inyectaron las siguientes muestras:

- Blanco de reactivos
- Muestra de CasIII-ia[®] a una concentración de 25 ng/mL, en solución.
- Muestra de plasma adicionada con CasIII-ia[®] a una concentración de 25 ng /mL
- Muestra blanco de un plasma lipémico
- Muestra blanco de un plasma hemolizado
- Muestra con heparina sin el analito

El método es específico si no existen interferencias en el tiempo de retención del analito, de existir estas no deberán ser mayores al 20% de la respuesta del LIC [NOM-177-SSA1-2013].

4.8.3 Efecto matriz

Se procesaron seis blancos de plasma según la metodología descrita para la extracción, posteriormente se adicionó CasIII-ia[®] en concentraciones de MCB (200 ng/mL) y MCA (900 ng/mL), finalmente se inyectaron en el sistema cromatográfico en conjunto con soluciones de

CasIII-ia[®] a las concentraciones correspondientes. Se evaluó el Factor de Matriz Normalizado (FMN), según indica la figura 7.

$$FMN = \frac{(\text{Respuesta del analito})_{\text{matriz}}}{(\text{Respuesta del analito})_{\text{solución}}}$$

Figura 7. Ecuación de FMN para la evaluación de efecto matriz.

Para considerar que el efecto matriz no es significativo el %C.V. del FMN de las unidades de matriz probadas no deberá sobrepasar el 15% [NOM-177-SSA1-2013].

4.8.4 Efecto de acarreamiento (*carry-over*)

Se prepararon dos muestras de CasIII-ia[®] en plasma en LIC (25 ng/mL) y LSC (1000 ng/mL) adicionalmente se procesa un blanco de plasma. Estas muestras fueron inyectadas en el siguiente orden:

- Blanco de plasma
- Muestra de CasIII-ia[®] en LSC
- Blanco de plasma
- Blanco de plasma

Los cromatogramas resultantes fueron comparados con la respuesta obtenida de la muestra en el LIC (25 ng/mL). La respuesta analítica de las interferencias próximas al tiempo de retención debe ser menor al 20% del LIC para considerarse que el efecto de acarreamiento no es significativo.

4.8.5 Linealidad

Se prepararon un total de tres curvas de calibración en plasma con los siguientes puntos: 25, 100, 150, 350, 500, 800, 1000 ng/mL, estas muestras fueron procesadas según la metodología de extracción correspondiente e inyectadas en el sistema cromatográfico. Se evaluó el ajuste de los datos a un modelo matemático, así como la precisión y exactitud para cada uno de los puntos.

Los datos de concentración recuperada de las curvas de calibración analizadas deberán estar dentro del 15% de la concentración nominal en

cada nivel de concentración excepto en el LIC en el cual deberá ser menor al 20%. Al menos 75% de las concentraciones de la curva de calibración con un mínimo de seis puntos deben cumplir con el criterio. Del total de curvas evaluadas al menos el 50% de cada nivel de concentración debe cumplir con dicho criterio, [NOM-177-SSA1-2013].

4.8.6 Precisión

4.8.6.1 Repetibilidad

Se prepararon por quintuplicado las muestras control LIC (25 ng/mL), MCB (200 ng/mL), MCM (600 ng/mL), MCA (900 ng/mL) y MCD (500 ng/mL) y se procesaron según la metodología de extracción. Estos puntos se inyectaron en conjunto con una curva de calibración. Fue calculado el %C.V. de las concentraciones interpoladas en la curva de calibración, el cual no deberá sobrepasar el 15% para las muestras control y 20% para el LIC [NOM-177-SSA1-2013].

4.8.6.2 Reproducibilidad

Fueron preparadas por quintuplicado las muestras control MCB (200 ng/mL), MCM (600 ng/mL), MCA (900 ng/mL) durante tres días de análisis, estas muestras se procesaron según la metodología de extracción establecida en conjunto con una curva de calibración. Se calculó la concentración recuperada de cada conjunto de muestras control interpolando la respuesta en la curva de calibración, también fue calculado el %C.V. el cual no deberá sobrepasar el 15% para las muestras control y 20% para el LIC [NOM-177-SSA1-2013].

4.8.7 Exactitud

Para los datos obtenidos de las muestras correspondientes a la repetibilidad y reproducibilidad fue calculado el %DEA, según indica la figura 8, esto fue realizado para nivel de concentración evaluado.

$$\%DEA = \frac{\text{Concentración calculada} - \text{Concentración nominal}}{\text{Concentración nominal}} \times 100$$

Figura 8. Ecuación %DEA para la evaluación de exactitud de método.

Para que el método se considere exacto el %DEA de cada nivel de concentración probado no deberá sobrepasar el 15%; para el LIC no deberá ser mayor al 20% el cual no deberá sobrepasar el 15% para las muestras control y 20% para el LIC [NOM-177-SSA1-2013].

4.8.8 Recuperación absoluta

Fueron preparadas por triplicado las muestras control: MCB (200 ng/mL), MCM (600 ng/mL) y MCA (900 ng/mL) en plasma y solución, las cuales recibieron el tratamiento de extracción correspondiente y posteriormente fueron inyectadas al sistema cromatográfico.

Se calculó el porcentaje de recuperación de acuerdo a la ecuación mostrada en la figura 9.

$$\% \text{Recuperación} = \frac{\text{Respuesta en matriz biológica} \times 100}{\text{Respuesta en solución}}$$

Figura 9. Ecuación para cálculo de porcentaje de recuperación.

La recuperación absoluta no debe ser necesariamente del 100%, pero para cada nivel de concentración probado debe ser preciso y exacto.

4.8.9 Estabilidad

Para cada evaluación fue calculada la concentración recuperada y se obtuvo el %DEA con respecto al valor nominal de cada nivel de concentración, tal como muestra la figura 8 el cual no deberá ser mayor al 15% para que la muestra se considere estable a las condiciones probadas [NOM-177-SSA1-2013].

4.8.9.1 Condiciones de almacenamiento

Se prepararon por triplicado tres series de MCB (200 ng/mL), MCM (600 ng/mL) y MCA (900 ng/mL) en plasma, la primer serie fue almacenada a temperatura de refrigeración, 2°C, durante 24 h. La segunda serie fue almacenada a temperatura de congelación, -20°C, durante 24 h, la

tercera fue almacenada a temperatura ambiente por 24 h. Al término de dicho plazo las muestras fueron procesadas según la metodología de extracción en conjunto con una curva de calibración recién preparada.

4.8.9.2 Ciclos de congelación-descongelación

Se prepararon por triplicado MCB (200 ng/mL), MCM (600 ng/mL) y MCA (900 ng/mL) en plasma, posteriormente se almacenaron a temperatura de congelación, -20 °C durante 24 h, al término de dicho plazo las muestras se descongelaron a temperatura ambiente. Una vez descongeladas se re-congelaron durante 48 h bajo las mismas condiciones, esto fue considerado un ciclo de congelación-descongelación este proceso fue repetido hasta completar tres ciclos, al

cumplir el tercer ciclo las muestras fueron procesadas según la metodología de extracción establecida, se analizaron en conjunto con una curva de calibración recién preparada.

4.8.9.3 Estabilidad de la muestra procesada

Se prepararon por triplicado MCB (200 ng/mL), MCM (600 ng/mL) y MCA (900 ng/mL) en plasma y estos se procesaron según la metodología establecida para la extracción. Después de reconstituir las muestras fueron almacenadas durante 8 h a temperatura ambiente. Al término de este periodo fueron inyectadas al sistema cromatográfico en conjunto con una curva de calibración recién preparada.

4.8.9.4 Estabilidad en automuestreador

Se prepararon por triplicado MCB (200 ng/mL), MCM (600 ng/mL) y MCA (900 ng/mL) en plasma, estas muestras fueron procesadas hasta su reconstitución en fase móvil y posteriormente se mantuvieron en el automuestreador durante 24 horas a 15°C y se inyectaron en el sistema cromatográfico, en conjunto con una curva patrón recién preparada.

5. Resultados y Discusión

5.1 Desarrollo de Método Bioanalítico

5.1.1 Condiciones instrumentales

Los iones formados por la CasIII-ia[®] en metanol se muestran en la Figura 10 en las cuales se puede observar que la señal del ion 346.07141 m/z es correspondiente al peso de la estructura completa del analito. Por otro lado aplicando una fragmentación a estos iones la molécula es modificada, apareciendo una señal 247.02723 m/z que corresponde a bupiridina unida al cobre, fragmento del analito.

Los resultados obtenidos permitieron la elección del ion de cuantificación, de acuerdo con la NOM-177-2013 el fármaco deberá ser cuantificado de forma inalterada en la matriz biológica, por ello se eligió realizar pruebas de retención con el ion 346.07141 m/z.

Las condiciones para las pruebas de retención fueron establecidas con el fin de emular las condiciones reportadas por Fuentes en 2005: Columna C18, fase móvil metanol/fosfatos pH 6.1, 0.01M (4:6 v/v); sin embargo, para cuantificación en plasma, los fosfatos utilizados no son compatibles con el sistema de detección por acoplamiento de masas así que se optó por un sistema de amortiguador de acetatos.

Aún cuando los experimentos realizados para conocer la retención del ion de cuantificación elegido fueron extensos y variados (tal como se muestra en el Cuadro 4) sólo en tres de ellos fue posible obtener una señal cromatográfica. En Columna Hexyl-Phenyl, Fase móvil metanol/agua (9:1 v/v) y flujo de 0.8 mL/min, el ion tuvo un tiempo de retención de 2.1 min y la señal mostró un comportamiento gaussiano.

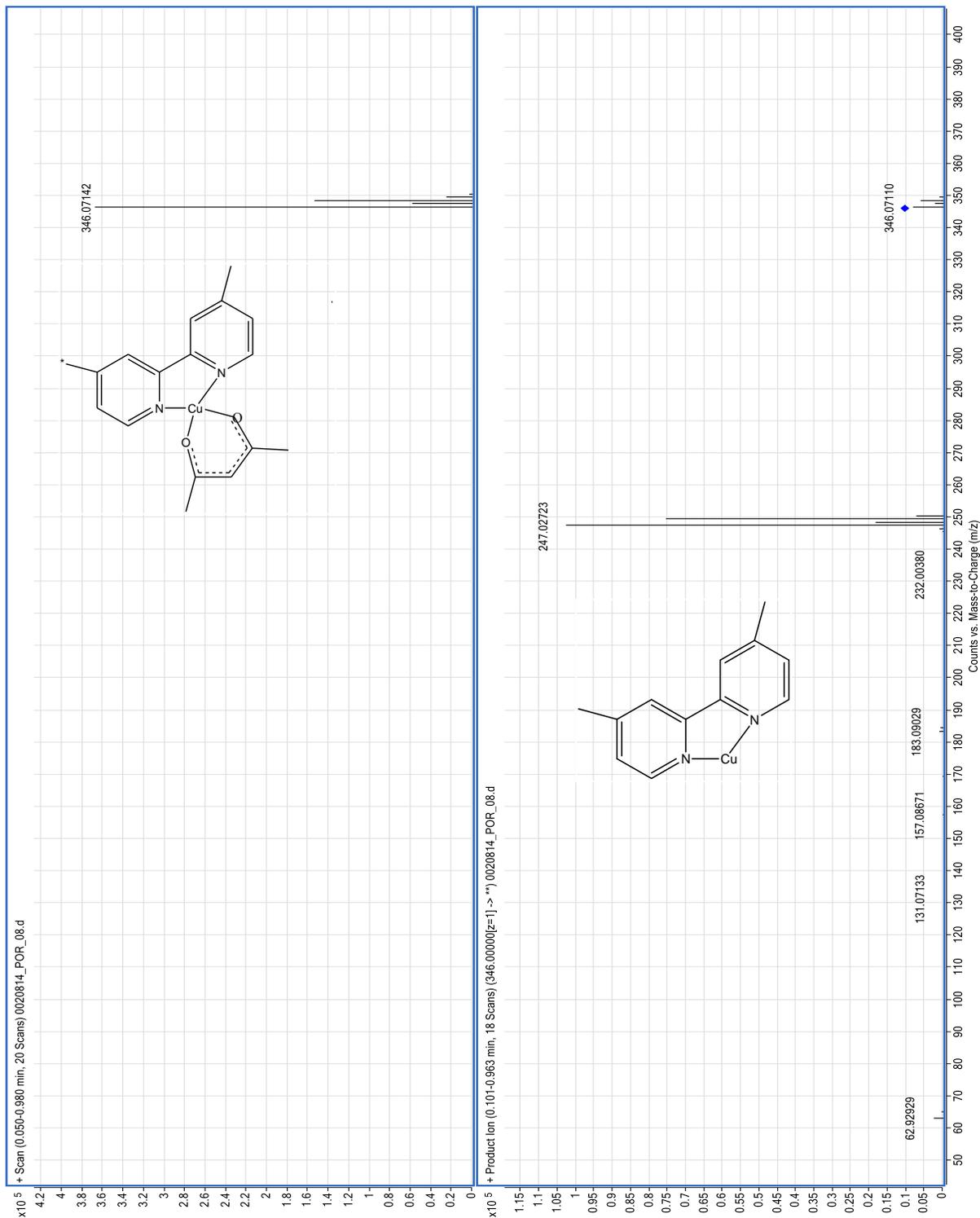


Figura 10. A Espectro de Casiopeína III-ia[®] en metanol. B Espectro de fragmentación del ion 346.07141 m/z.

Después de 200 inyecciones consecutivas durante las evaluaciones de repetibilidad, reproducibilidad y exactitud las señales sufrieron cambios sustanciales en el área obtenida y eventualmente la desaparición de la misma, mostrando escasa reproducibilidad y como consecuencia la búsqueda de nuevas condiciones instrumentales. Se obtuvo una señal en la columna Eclipse Phenyl con fase móvil metanol/amortiguador de acetatos pH 4.7 0.01M (8:2 v/v) a un flujo de 0.6 mL/min con un tiempo de retención de 2.38 min, dicha señal mostró asimetría y ensanchamiento de la base del pico, así como efecto de coleo, no ocasionada por un efecto de masa y que repercutió en la retención a largo plazo pues las señales, después de 50 inyecciones comenzaron por mostrar deterioro en la forma, simetría y área del pico cromatográfico.

Finalmente en una columna Eclipse C8, fase móvil metanol/agua (8:2 v/v) a un flujo de 0.8 mL/min se obtuvo una señal la cual tuvo un tiempo de retención de 2.7 min que al igual que el resto, mostró un deterioro en la simetría y área después de 10 inyecciones por lo que fue imposible iniciar la optimización del ión.

Analizando los espectros de masas de las muestras en estas condiciones se encontró que existe un efecto descoordinante por parte de la fase móvil (metanol/agua), pues aunque se aprecia la presencia del ion 346.07 m/z, también es posible observar iones como 247.02 m/z o 185.10 m/z, este último en mayor abundancia, cuyas masas corresponden a estructuras contenidas en el analito, tal como se muestra en las figuras 11 y 12.

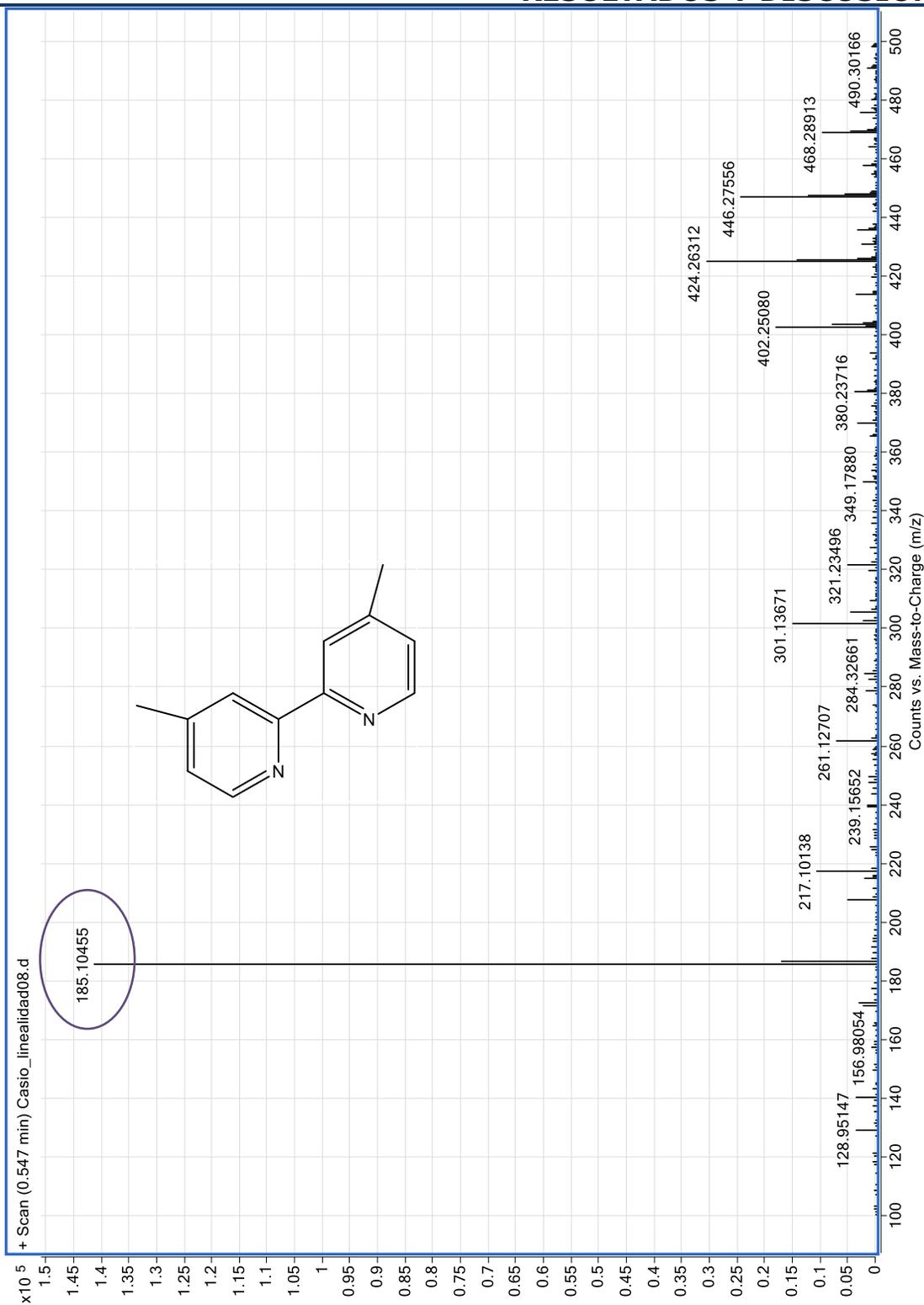


Figura 11. Espectro de masas de la muestra inyectada en columna Eclipse C8, metanol/agua (8:2) y flujo de 0.8 mL/min.

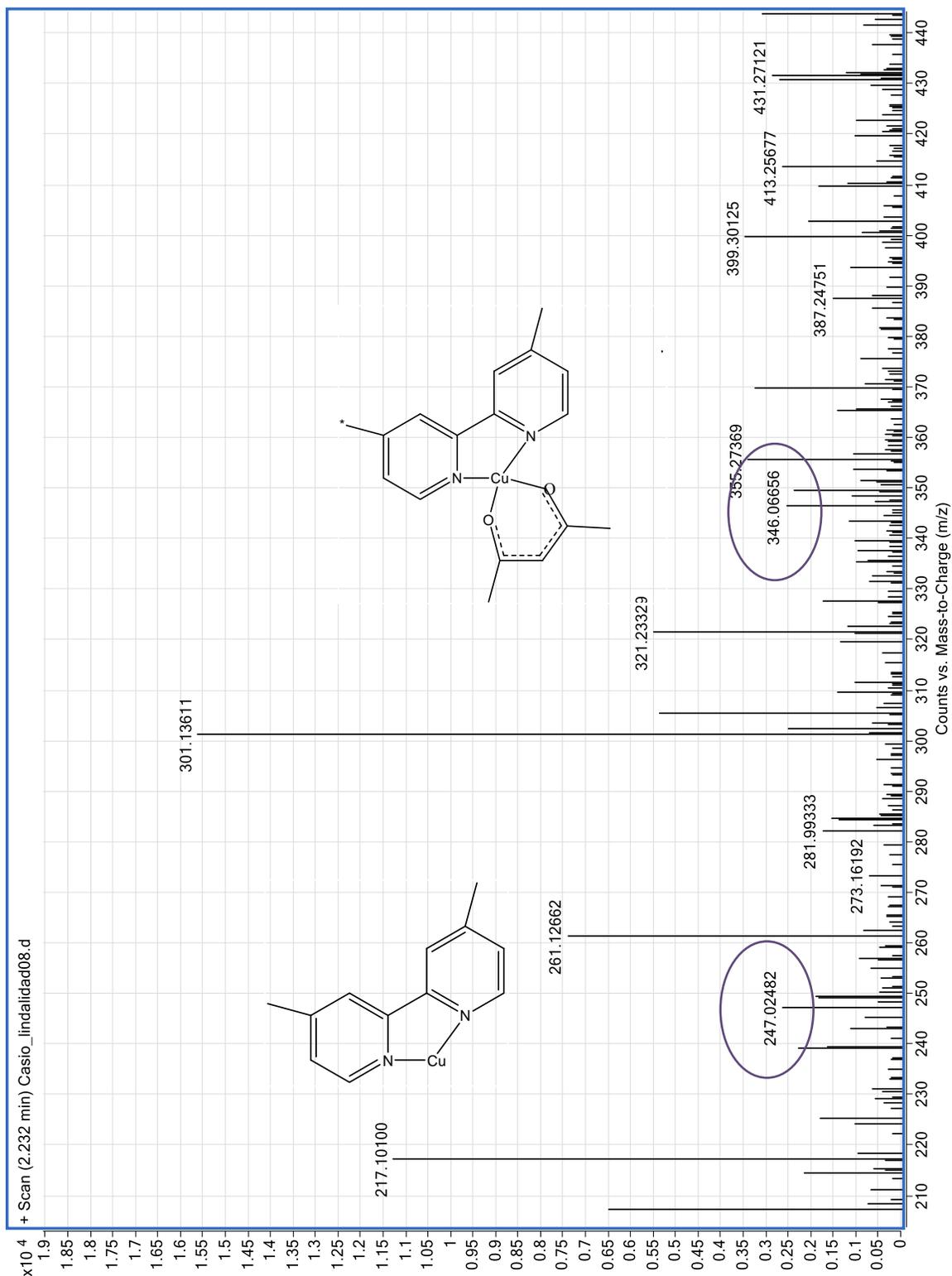


Figura 12. Espectro de masas de la muestra inyectada en columna Eclipse C8, metanol/agua (8:2) y flujo de 0.8 mL/min. Acercamiento 210 a 440 m/z.

Debido a las evidencias experimentales fue necesario optar por la modificación de la molécula para mejorar su retención y estabilidad en las condiciones de trabajo.

5.1.1.1 Infusiones de Casiopeína III-ia[®] con pares iónicos

En la selección de un nuevo ion de cuantificación fue necesario realizar reacciones pre-columna para mejorar la detección y retención del compuesto por medio de la utilización de dos pares iónicos: HFBA y TFA. Como puede observarse en la figura 13, la reacción interfase efectuada con TFA da como resultado un ion de peso molecular 360.01323 m/z correspondiente a la interacción entre una molécula de CasIII-ia[®] y una molécula de TFA.

En la figura 14 se observa el espectro de la reacción interfase efectuada entre el analito y HFBA, el ion formado tiene un peso molecular de 460.00689 m/z y corresponde a la estructura mostrada. Aún cuando en ambos espectros se observa la presencia del ion 346.07 m/z correspondiente al analito inalterado esto puede deberse a la reacción incompleta consecuencia de la inyección directa.

Por otro lado existe evidencia con la presencia del ión 247.02 m/z (masa correspondiente a la fracción de bipyridina unida al cobre) de la ruptura del compuesto al estar en contacto con este tipo de moléculas y que es favorecida según la concentración del par iónico y tiempo de reacción. El ion obtenido de la reacción efectuada con TFA mostró una abundancia menor al obtenido por la reacción con HFBA a la misma concentración del par iónico mostrando una mayor afinidad de la CasIII-ia[®] por el HFBA.

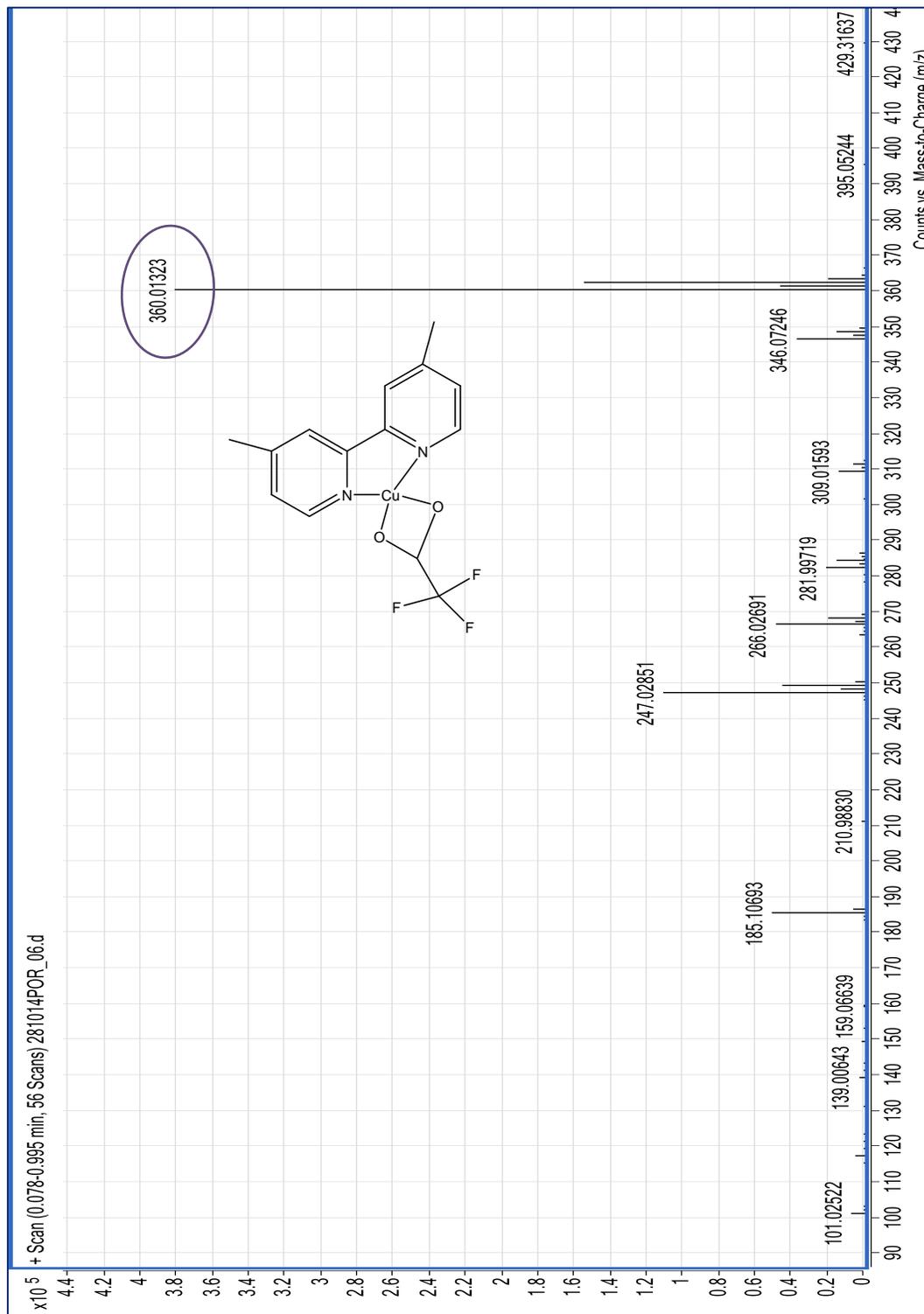


Figura 13. Espectro de masas de CasIII-ia[®] en solución de metanol/TFA 40mM (8:2).

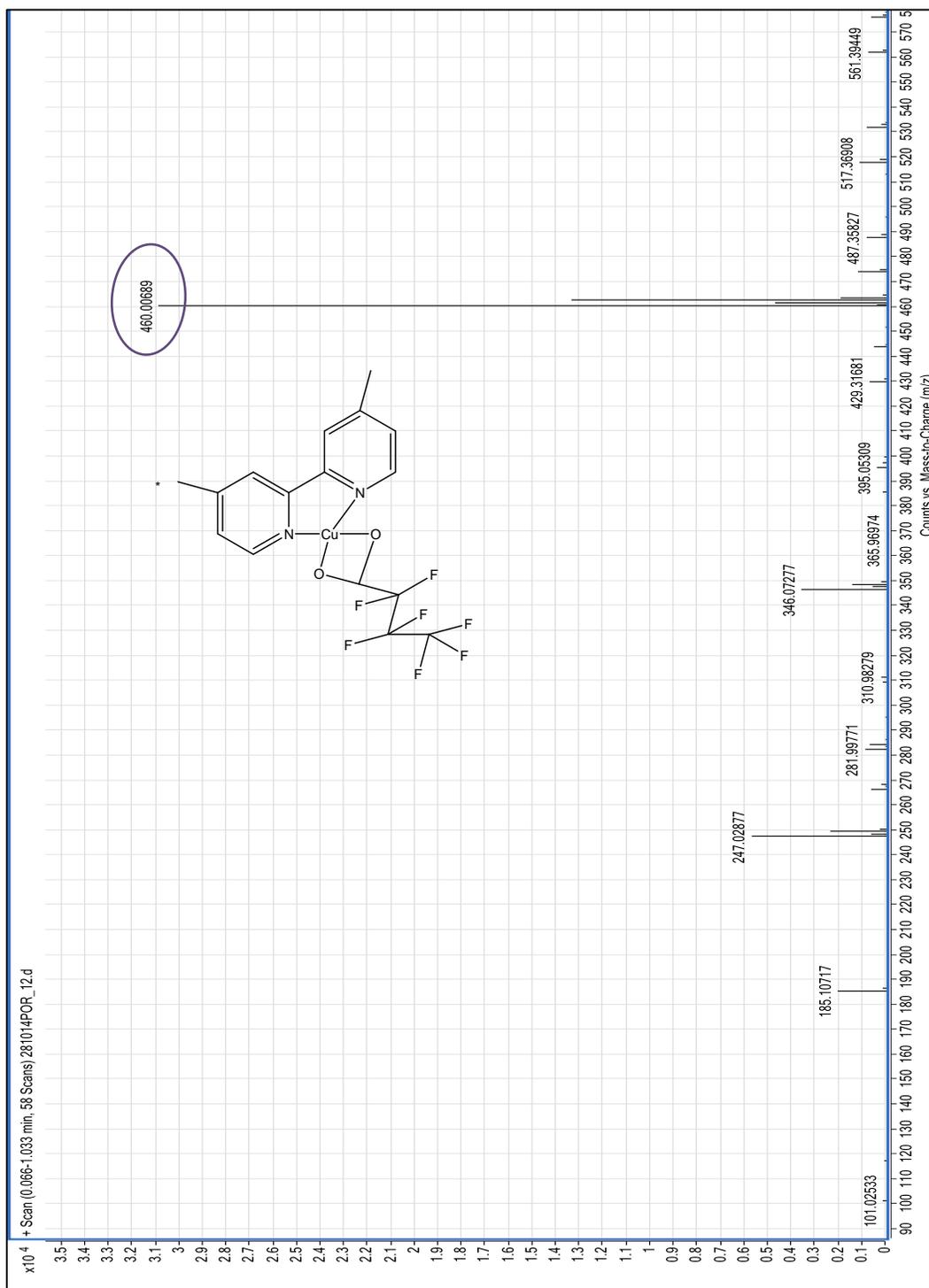


Figura 14. Espectro de masas de CasIII-ia[®] en solución de metanol/HFBA 40mM (8:2).

En métodos de cuantificación previos desarrollados para una molécula de la misma familia, la Casiopeína II-gly[®], reportado por Cañas en 2013, se utilizó como par iónico el HFBA para su cuantificación en plasma, arrojando buenos resultados en cuanto a retención y reproducibilidad, por lo que se procedió a realizar las pruebas de retención correspondientes.

5.1.1.2 Parámetros cromatográficos y espectrométricos del ion de cuantificación 460.0145 m/z

Para asegurar la reacción de formación del nuevo ion de cuantificación se estableció como fase móvil metanol/HFBA 40 mM. Los resultados obtenidos en la retención del ion 346.07 m/z fueron indicativos para determinar que las columnas a utilizar para las pruebas de retención para el nuevo ion con las columnas de polaridad media: C8 y phenyl-hexyl.

En la columna phenyl-hexyl se obtuvieron señales del ion en el intervalo correspondiente al tiempo muerto de la columna, este tiempo no fue posible modificarlo por medio de las proporciones de fase móvil, indicando la nula retención por lo que se descartó la utilización de dicha columna.

Las pruebas de retención en la columna Eclipse Plus C8 para mejorar la calidad de la señal obtenida por medio de la modificación de la proporción de fase móvil arrojaron que la mejor proporción es 70% metanol y 30% HFBA 40 mM. Como se esperaba la señal disminuye hasta desaparecer conforme la cantidad de la fase acuosa es aumentada y al aumentar la fase metanólica el compuesto es retenido por más tiempo lo que origina la división de la señal.

En cuanto al flujo de fase móvil se determinó que el mejor fue de 0.8 mL/min partiendo de la presión de la columna óptima para su funcionamiento y mantenimiento adecuados, por otro lado al disminuir el flujo la señal se deteriora debido a las interacciones más prolongadas con la fase estacionaria. El volumen de inyección idóneo, es 20 μL pues la señal aumenta su intensidad sin mostrar deformaciones por efecto de masa y permitiendo disminuir el límite de cuantificación.

Las modificaciones de condiciones además de establecer las óptimas para la cuantificación del compuesto, también permitieron conocer el efecto de cada uno de ellas en la señal para la detección e identificación de problemas relacionados con el detector. Como se muestra en el Cuadro 10 las mejores condiciones en el detector fueron las obtenidas el experimento 1. Se observó que a valores mayores en el voltaje del fragmentor, capilar y presión de nebulizador disminuye el área de la señal producida. En cambio si las temperaturas de gas de lavado o secado son disminuidas el área de la señal también es modificada drásticamente.

Cuadro 10. Resultados de optimización de parámetros espectrométricos.

Experimento	Fragmentor (V)	Temperatura de gas secado ($^{\circ}\text{C}$)	Voltaje de Capilar (V)	Temperatura de gas de lavado ($^{\circ}\text{C}$)	Nebulizador (psi)	Respuesta
1	175	350	2500	350	40	16643700.7
2	100	350	2500	350	40	198706.4
3	300	350	2500	350	40	386241.4
4	175	350	3500	350	40	352530.4
5	175	200	3500	350	40	232116.35
6	175	100	3500	350	40	154333.4
7	175	350	2500	200	40	201524.52
8	175	350	2500	100	40	175647.5
9	175	350	2500	350	50	361193.7

5.1.1.3 Identificación y Control del efecto de acarreamiento

Los resultados de las inyecciones consecutivas con un %CV de 19.02 son indicativas de un efecto de acarreamiento debido al incremento de la señal generada con cada inyección. Por otro lado en una muestra de fase móvil sin el analito, inyectada inmediatamente después de una muestra de 1000 ng/mL, puede observarse el ion 460.00 m/z se encuentra presente.

Al identificar esta problemática fue indispensable conocer los puntos críticos en los cuales el analito es acumulado en el cromatógrafo. Con la implementación de lavados programados inter-corrída la señal sufre un cambio en el área y altura siendo tres veces menor en comparación con la señal obtenida realizada con inyecciones de fase móvil entre cada corrida. Esto puede deberse a que el *carry-over* tiene como principal punto crítico la columna y no sólo el inyector, bombas y tuberías, por lo cual es indispensable el lavado prolongado al menos durante el tiempo de una corrida.

5.1.1.4 Condiciones instrumentales óptimas

Finalmente las condiciones cromatográficas y espectrométricas óptimas para la cuantificación de la Casiopeína III-ia[®] se muestran en los Cuadros 11 y 12. Dichas condiciones fueron las utilizadas durante el desarrollo del método de extracción y la validación del mismo.

Cuadro 11. Condiciones cromatográficas óptimas.

Parámetro	Condición
Fase móvil	Metanol/ HFBA 40mM (7:3 v/v)
Columna cromatográfica	Eclipse Plus C8 4.6x150mm 3.5µm PN 959963-906
Pre-columna	Eclipse Plus C8
Temperatura de columna	25 °C
Velocidad de flujo	0.8 mL/min
Volumen de inyección	20 µL
Tiempo de retención	2.7 min
Tiempo de corrida	4 min
Detector	TOF
Temperatura de inyector	15°C

Cuadro 12. Condiciones espectrométricas óptimas. Detector TOF.

Parámetro	Condición
Modo de ionización	Dual AJS ESI
Polaridad	Positiva
Energía de Colisión	0V
Temperatura de gas	350°C
Flujo de gas de lavado	12 L/min
Temperatura de asiento	350°C
Flujo de gas de asiento	11 L/min
Fragmentor	175 V
Nebulizador	40 psi
Voltaje capilar	2500 V
Nozzle	1000 V
Skimmer	65 V
Rango de masa	100 -500 m/z
Ion de cuantificación	460.0145 m/z

Es importante resaltar que los lavados inter-corrida se realizan en las mismas condiciones de análisis, inyectando fase móvil entre cada muestra.

5.1.1.5 Evaluación instrumental

La evaluación concentración-respuesta de la CasIII-ia® en solución y con inyección directa, en el intervalo 100 a 1000 ng/mL arrojó un comportamiento lineal, como se muestra en la figura 15 con un valor de $r = 0.9936$ y $r^2 = 0.9873$.

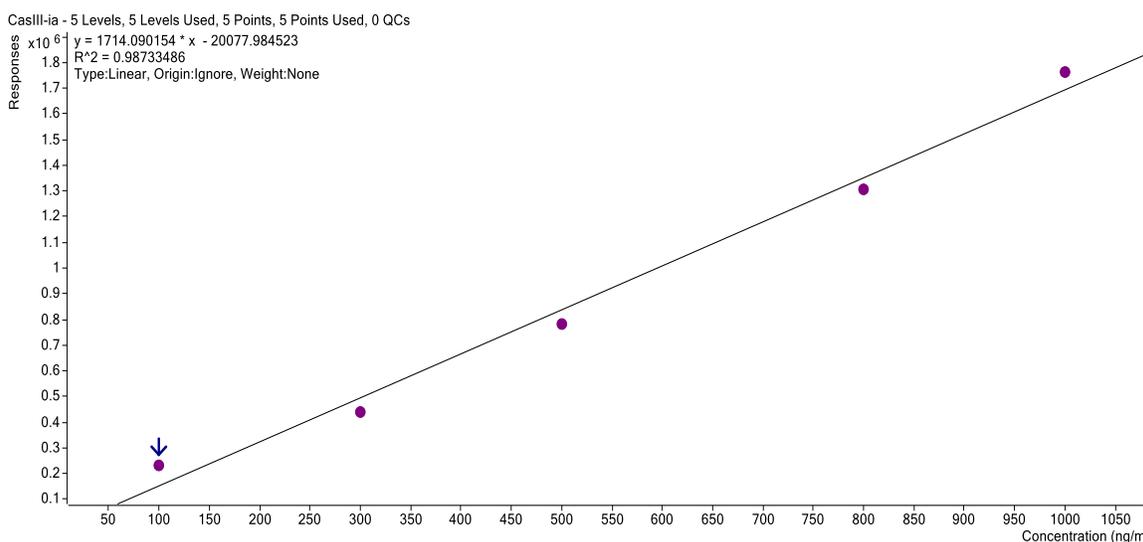


Figura 15. Gráfico correspondiente a evaluación concentración-respuesta de la CasIII-ia. Evaluación instrumental.

Aún cuando el coeficiente de determinación es bajo, la correlación gráfica muestra una tendencia en la relación concentración-respuesta por lo que se optó en continuar con el modelo a fin de mejorarlo.

La evaluación de repetibilidad en las muestras control tuvo valores de %C.V. entre 4.4 y 6.7. La reproducibilidad mostró una variación entre 3.9 y 10.1%. En cuanto a la exactitud el %DEA alcanzó valores de 0.9 a 8.4. Los resultados se muestran en el Cuadro 13.

Cuadro 13. Resultados de reproducibilidad para la evaluación instrumental.

REPRODUCIBILIDAD						
Muestra	MCB (200 ng/mL)		MCM (600 ng/mL)		MCA (900 ng/mL)	
	Conc. Calc.	%DEA	Conc. Cal.	%DEA	Con. Calc.	%DEA
1	217.71	8.9	609.03	1.5	954.96	6.1
2	213.01	6.5	577.04	3.8	850.60	5.4
3	201.71	0.9	613.84	2.3	976.41	8.4
4	194.79	2.6	629.58	4.9	841.29	6.5
Promedio	211.81		607.38		905.82	
SD	17.09		22.04		60.44	
%CV	8.06		3.9		6.67	

5.1.2 Extracción de Casiopeína III-ia® de matriz biológica.

5.1.2.1 Inyección directa: Precipitación de proteínas.

Para anteriores metodologías de cuantificación desarrolladas para detectores de UV se reporta la utilización de precipitación de proteínas como método de extracción de la matriz biológica. En el procedimiento reportado por Fuentes en 2005, el agente precipitante utilizado fue el ZnSO₄ al 10%, debido a las limitaciones técnicas del detector se optó por utilizar agentes orgánicos: acetonitrilo y metanol.

El recobro utilizando agentes precipitantes del tipo orgánico fue mayor con acetonitrilo (20.6%) seguido por ZnSO₄ (15.0 %), la combinación de agentes precipitantes con la finalidad de aumentar la precipitación no tuvo los resultados esperados pues el recobro no fue mejor que el obtenido para acetonitrilo, tal como se muestra en el Cuadro 14.

Cuadro 14. Resultados de pruebas de precipitación.

Experimento	Agente Precipitante	Volumen adicionado (mL)	% Recobro
1	Acetonitrilo	1	20.6
2	Metanol	1	8.4
3	ZnSO ₄ al 10%	0.030	12.3
4	NH ₄ SO ₄ al 10%	0.030	-
5	ZnSO ₄ al 10%	0.2	15.0
6	NH ₄ SO ₄ al 10%	0.2	-
7	NH ₄ SO ₄ al 10% Acetonitrilo	0.2 0.8	-
8	ZnSO ₄ al 10% Acetonitrilo	0.2 0.8	10.2

Estos resultados se deben a que las proteínas precipitadas para la limpieza de la muestra no son suficientes para evitar el efecto de supresión iónica, además de la interferencia del agente precipitante con la ionización del compuesto.

5.1.2.2 Extracción en fase sólida

El sistema elegido es el del fabricante Phenomenex, Strata-X, ya que el recobro obtenido con los procedimientos indicados por el mismo fue el mejor, tal como se muestra en el Cuadro 15. Otros métodos reportados para Casiopeína II-gly[®], de la misma familia de moléculas, hace uso de dichos cartuchos con buenos resultados.

El sistema Plexa PCX es un sistema polimérico de intercambio catiónico que permite la extracción de compuestos con propiedades básicas [Agilent technologies, 2011] por ello el analito al ser un compuesto de coordinación muestra un comportamiento ácido, lo cual dificulta su retención en este tipo de resinas.

Cuadro 15. Porcentaje de recobro para sistemas de Extracción en Fase Sólida

Sistema	%Recobro
Strata-X	15.1
Plexa PCX	3.27
Nexus WCX	11.0

El sistema Nexus WCX es una resina polimérica de intercambio catiónico, la cuál es selectiva para fármacos del tipo aminas cuaternarias y esteroides, en caso de la CasIII-ia[®] no cumple con estos requerimientos pero sus sitios de interacción son muy similares a los posibles sitios de una estructura de amina cuaternaria, lo cual explica la retención. El sistema strata-X posee una resina del tipo polimérica ideal para la extracción de una gran variedad de compuestos, existiendo interacciones del tipo hidrofílico y dipolo-dipolo, esto aumenta la probabilidad de retención así como una elusión sencilla. En métodos anteriores, desarrollados para la CasII-gly[®] se observó que estos sistemas tienen un mayor recobro, de hasta un 60% [Riva Palacio-Montes, D.M., 2011] en condiciones similares de análisis lo cual sumado a los resultados experimentales obtenidos, mostrados en el Cuadro 15, permitió elegir el sistema Strata-X para su optimización. Durante el proceso de optimizar la metodología para la extracción en el sistema Strata-X se observa que el mejor método es el descrito en el Cuadro 16, como experimento 1, que al ser valorada su repetibilidad mostró un %C.V. de 5.1.

Cuadro 16. Optimización de metodología de extracción en fase sólida, analito en solución.

Experimento	Muestra	Lavado de sistema	Elusión	%Recobro
1	1mL En agua	1 mL HFBA al 5%	1 mL Metanol	72.3
2	1mL En agua	1mL HFBA al 5%	1 mL Fase Móvil	70.1
3	1mL muestra + 500 µL en HFBA	1 mL HFBA al 5%	1 mL Metanol	26.2
4	1mL muestra + 500 µL en HFBA	1 mL HFBA al 5%	1 mL Fase Móvil	28.9
5	1mL en agua	1 mL H ₂ O	1 mL Metanol	-

Aún cuando en solución el mejor recobro fue obtenido con el analito en agua sin adición de HFBA previo, fue necesario contemplar el tratamiento de la muestra combinando dos técnicas de extracción a fin de garantizar la limpieza de la muestra y con ello la disminución del efecto matriz, para mejorar la calidad de la señal y disminuir el límite de cuantificación se concentró la muestra. Como puede observarse en el Cuadro 17 el mejor recobro fue el obtenido con la precipitación de proteínas realizada con HFBA al 5%. Dando como resultado una señal tipo gaussiana, repetible y reproducible. El resto de las señales mostraron divisiones y recobros menores.

Cuadro 17. Porcentaje de recobro del procedimiento combinado, con diversos agentes precipitantes.

Agente precipitante	%Recobro
Acetonitrilo	25.6
ZnSO ₄ al 10%	32.8
HFBA al 5%	75.6

5.1.2.3 Supresión iónica

De forma cualitativa se puede observar en la figura 16 que durante la corrida cromatográfica del blanco (4 min), la señal del ion de cuantificación disminuye considerablemente a los 2.3 min iniciando su recuperación alrededor de los 2.7 min, justo antes del tiempo de retención del analito. Sin duda componentes del plasma afectan la ionización del compuesto, sin embargo estos poseen un tiempo de retención diferentes a la CasIII-ia[®] lo cual propicia la recuperación de la señal. Aún cuando esta prueba es un procedimiento rápido para constatar el efecto matriz, fue necesario efectuar las pruebas cuantitativas según marca la normatividad.

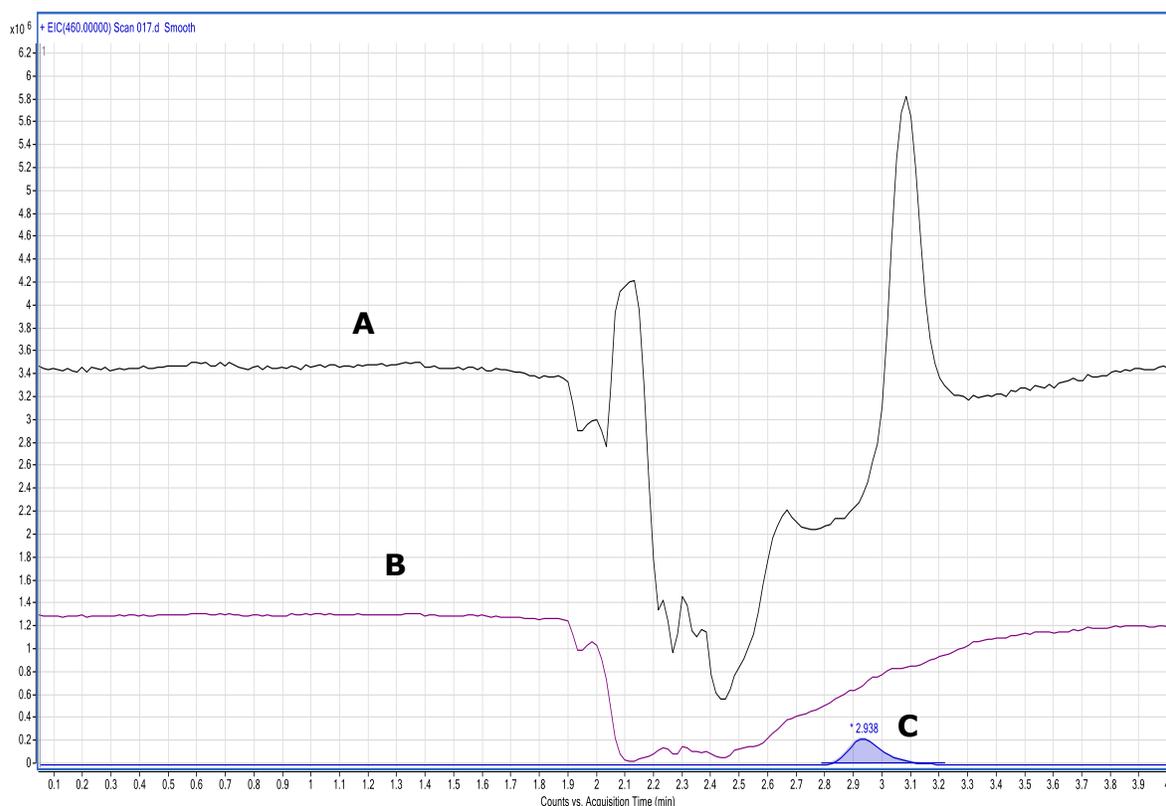


Figura 16. Cromatograma de evaluación de supresión iónica. A iones totales. B infusión de CasIII-ia[®]. C Señal de CasIII-ia[®] en plasma.

5.1.2.4 Estándar interno

Para cada sustancia candidata a estándar interno se obtuvo el correspondiente espectro, analizando los posibles iones de cuantificación de cada uno de ellos se eligieron: prednisona, ranitidina, casiopeína II-gly[®], olanzapina y gibenclamida para realizar pruebas de retención en las condiciones de cuantificación de la CasIII-ia[®], de estas sustancias sólo gibenclamida no presentó retención en el sistema. En las figuras 17 y 18 se observan los espectros correspondientes a algunos de los candidatos a estándares internos.

Una vez sometidos a pruebas de retención en las condiciones de cuantificación de la Casiopeína III-ia[®] sólo los candidatos: prednisona, olanzapina, ranitidina y CasII-gly[®] se sometieron al procedimiento de extracción.

La prednisona no muestra señal del ion de cuantificación elegido (381.116 m/z) lo cual indica una descomposición durante el procedimiento de extracción en plasma; sin embargo, la extracción realizada en solución muestra resultados favorables, lo cual es indicativo de una fuerte interacción de dicha sustancia con el plasma, pues se reporta una unión reversible a las proteínas plasmáticas en un 90% dificultando su extracción.

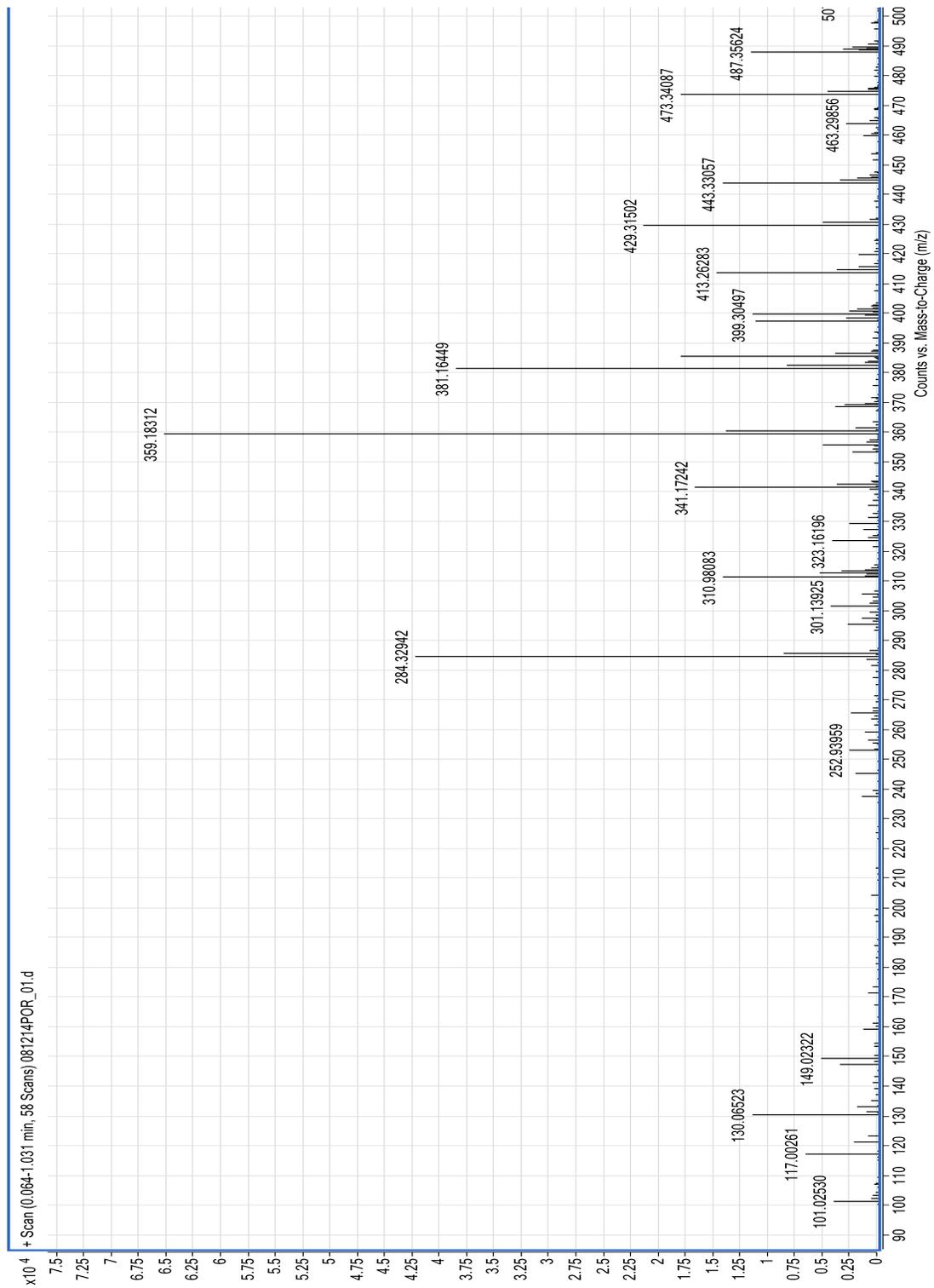


Figura 17. Espectro de masas correspondiente a Prednisona 10 µg/mL en fase móvil.

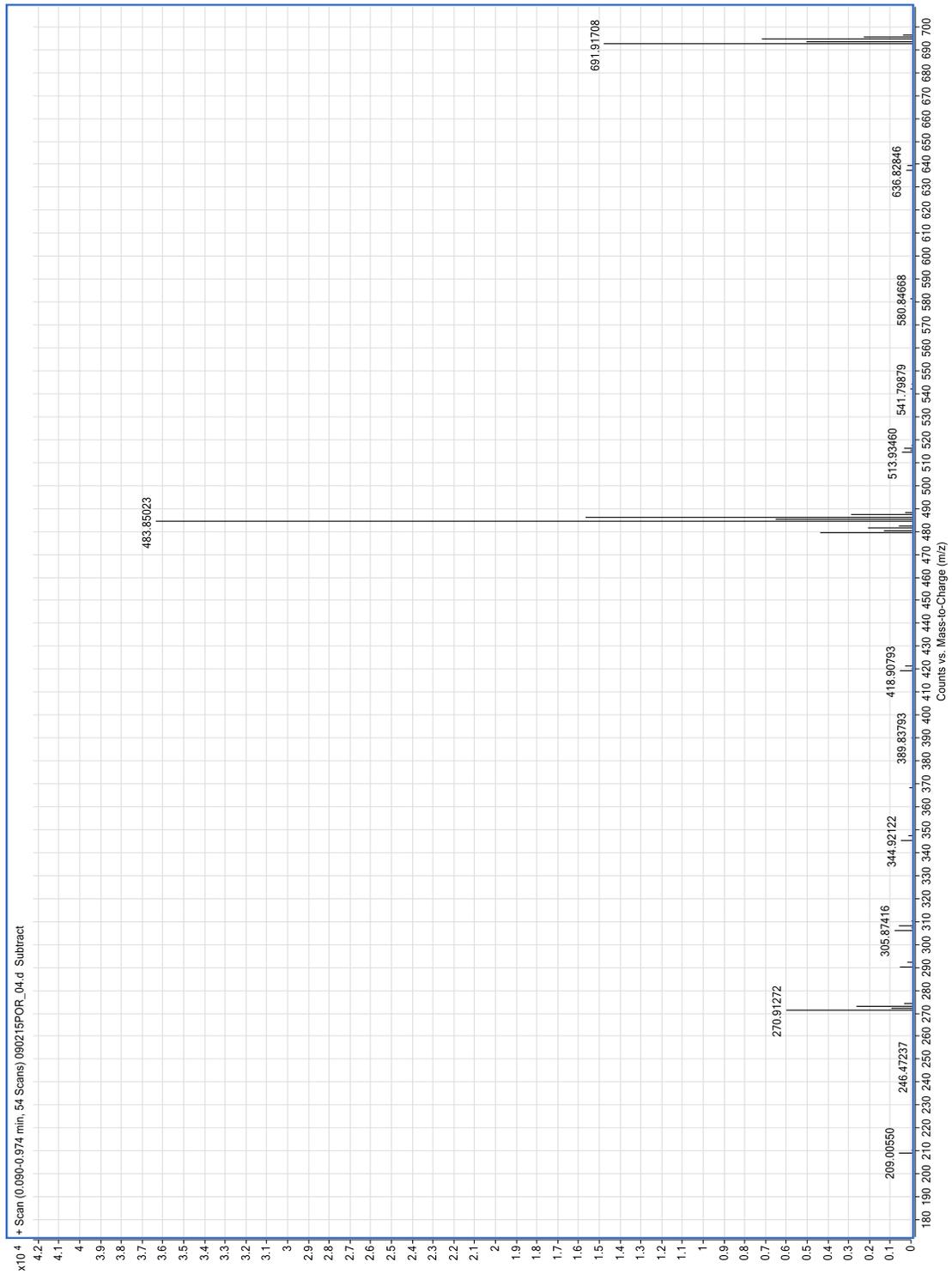


Figura 18. Espectro de masas de Olanzapina 10 µg/mL en fase móvil.

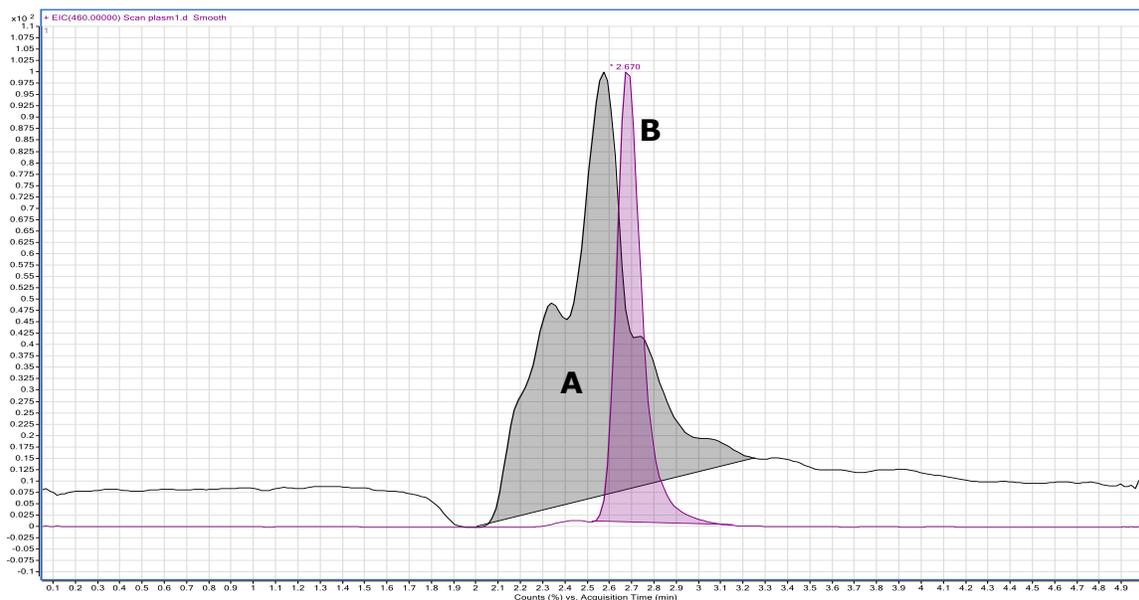


Figura 19. Cromatograma correspondiente a una muestra en plasma sometida a procedimiento de extracción. A Señal Ranitidina 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$. B señal CasIII-ia[®] a 1000 ng/mL.

La ranitidina, figura 19, muestra una señal sin forma gaussiana y no repetible por ello se descartó como candidato. La olanzapina, figura 20, muestra un buen comportamiento siendo esta un candidato a estándar interno, por otro lado la CasII-gly[®], figura 20, aunque muestra una señal del tipo gaussiana, esta es mucho mayor a la obtenida para la CasIII-ia[®] observándose también una disminución en el área de un 50% en comparación con una muestra de CasIII-ia[®] procesada sin el estándar interno, debido a que el tiempo de retención de esta es igual al de analito ocurre una reacción de competencia durante la ionización en la demostrando que la CasII-gly[®] es más afín al HFBA.

En vista de los resultados obtenidos con prednisona se realizaron pruebas de esta sustancia como estándar externo, tal como se muestra en la figura 21 la señal emitida por la prednisona como estándar externo no es competitivo con la reacción de ionización del analito, aún cuando el tiempo de retención es cercano.

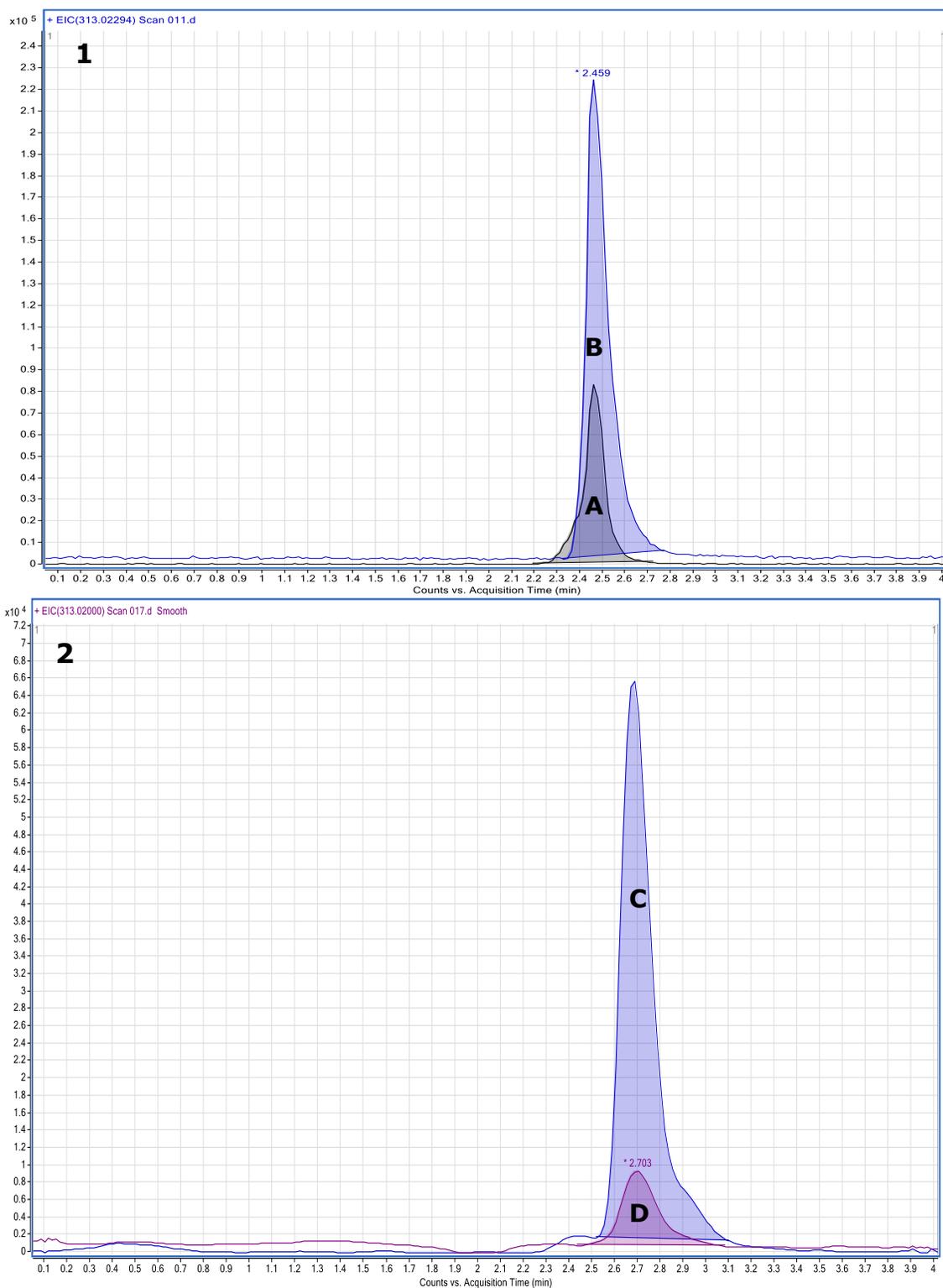


Figura 20. Cromatogramas prueba de estándares internos. 1 Señal A Olanzapina 500 ng/mL; Señal B CasIII-ia[®] 1000 ng/mL. 2 Señal C CasII-gly[®] 500 ng/mL; señal D CasIII-ia[®] 500 ng/mL.

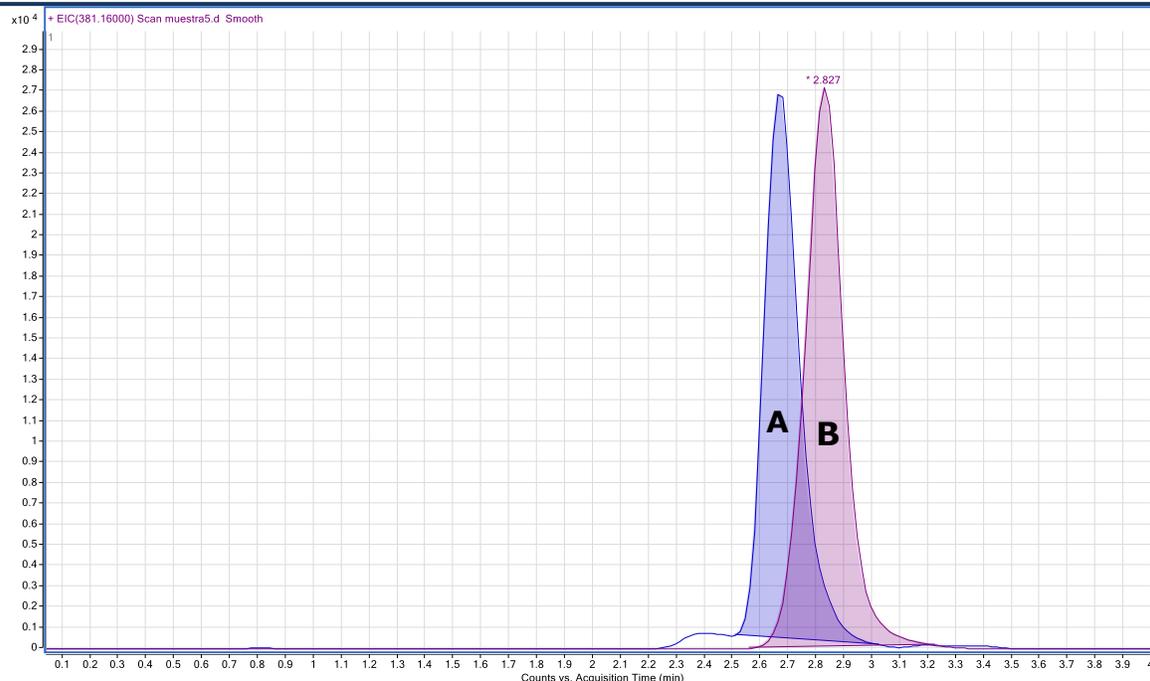


Figura 21. Cromatograma muestra de Casiopeína III-ia® en plasma 500 ng/mL (A) con adición de estándar externo Prednisona 2 µg/mL (B).

La utilización de prednisona como estándar externo mostró problemas durante la preparación de numerosas muestras, es decir el coeficiente de variación de las respuestas obtenidas del ión de prednisona (381.16 m/z) rebasa el 15%, esto puede deberse a las interacciones ya mencionadas con algunos componentes del plasma que no fueron removidos durante la extracción. Otro de los fármacos probados con anterioridad fue la olanzapina, utilizada en pruebas de factor-respuesta se obtuvo que su variabilidad es del 10% lo que afecta drásticamente la calidad de la respuesta del analito principal.

Con la finalidad de elegir otro estándar que mostrara un comportamiento constante se propuso la utilización de un fármaco que tuviese como parte de su estructura una amina cuaternaria, debido a las características de la fase móvil y el sistema de extracción por fase sólida, sin embargo no fue posible la adquisición del mismo durante el desarrollo de este proyecto, por lo que se procedió a hacer uso de una

molécula desarrollada en la USIP por el departamento de Orgánica, la cual actualmente se encuentra en proceso de patente. Dicha molécula tuvo un coeficiente de variación del 5%.

La intención de la utilización de un estándar interno es disminuir el error del analito principal, al no cumplir con esta función ninguno de los fármacos probados se procedió a validar el método sin la utilización de un estándar interno. En cuanto al compuesto probado se descarta su utilización debido a las circunstancias de patente y la falta de trazabilidad en su síntesis. Sin embargo se recomienda la utilización de un fármaco de esta naturaleza para fungir como estándar interno.

5.1.2.5 Metodología optimizada de extracción

El procedimiento optimizado de extracción consta de dos partes, la primera, precipitación de proteínas: a 1 mL de muestra se agregó 500 μL de HFBA al 5%, se agitó en vórtex por diez segundos y fue centrifugada a 12000 rpm durante 10 min, el sobrenadante se introdujo en el sistema de extracción por fase sólida (Cartuchos SPE Strata-X, Phenomenex, 33 μm , 60 mg). Al cartucho de extracción por fase sólida le fue realizado un tratamiento previo a la muestra, en el cual se le adicionó 1mL de metanol y 2 mL de Agua desionizada, posteriormente fue introducida la muestra (sobrenadante), se realizó un lavado de 1 mL de HFBA al 5% y se dejó secar el cartucho durante 10 minutos. La elusión se realizó con 1 mL de Metanol.

Finalmente, la muestra fue concentrada al vacío a 30 °C durante tres horas, para ser re-constituida en 100 μL de fase móvil e inyectada en el sistema cromatográfico en las condiciones establecidas en el numeral 5.2.4.

Como parte de la evaluación de la metodología de extracción se realizaron curvas de calibración del analito en agua, como se muestra en la figura 22, el comportamiento tiene tendencia lineal, sin embargo entre todas las curvas probadas el %CV de cada punto muestra valores que sobrepasan el 2%, esta dispersión de los datos no se observa en muestras preparadas en matriz biológica esto debido a efectos de la matriz.

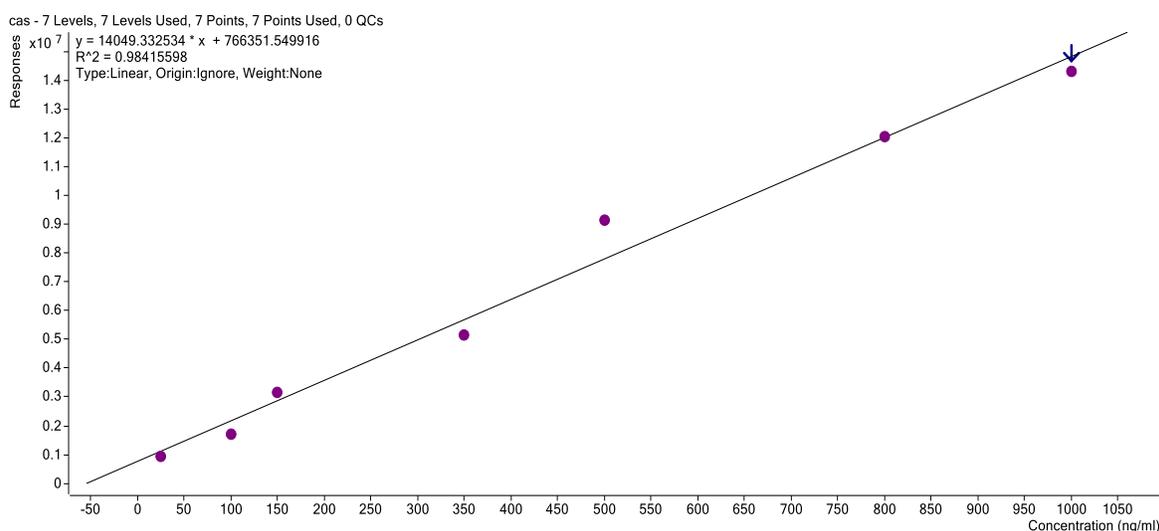


Figura 22. Gráfico correspondiente a curva de calibración de CasIII-ia[®] en solución, posterior a una extracción.

5.2 Validación de método

5.2.1 Adecuabilidad del sistema

Para cada corrida analítica se evaluó la calidad de la respuesta analítica por medio de la inyección repetida de una muestra de CasIII-ia[®] preparada en fase móvil a una concentración de 1000 ng/mL, como se puede observar en el Cuadro 18 el tiempo de retención tiene una variación de 0.1% y la respuesta varía 0.8% por lo que se encuentra dentro del rango de aceptación (no mayor al 2%).

Cuadro 18. Ejemplo de Adecuabilidad del sistema

Inyección	Tiempo de retención	de Área
1	2.715	521203.97
2	2.713	522433.02
3	2.712	523153.55
4	2.715	511052.12
5	2.714	516034.41
6	2.71	519463.11
promedio	2.71	518890.03
sd	0.0019	4604.3570
%CV	0.1	0.9

5.2.2 Especificidad

De acuerdo a la normatividad mexicana vigente ya que el método demostró ser específico para la determinación de CasIII-ia[®], tal como se muestra en las figuras 23 a 27 no existen interferencias significativas en la detección del ion 460.0145 m/z tanto en la matriz normal, lipémica y hemolizada, así como en la fase móvil y el anticoagulante a utilizar: heparina.

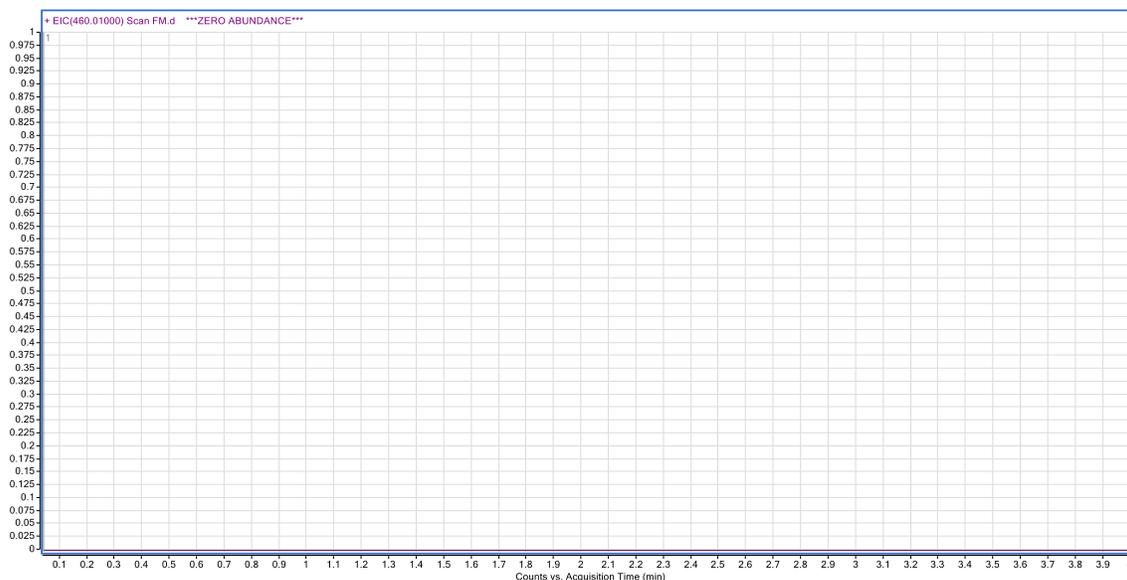


Figura 23. Cromatograma correspondiente a la fase móvil.

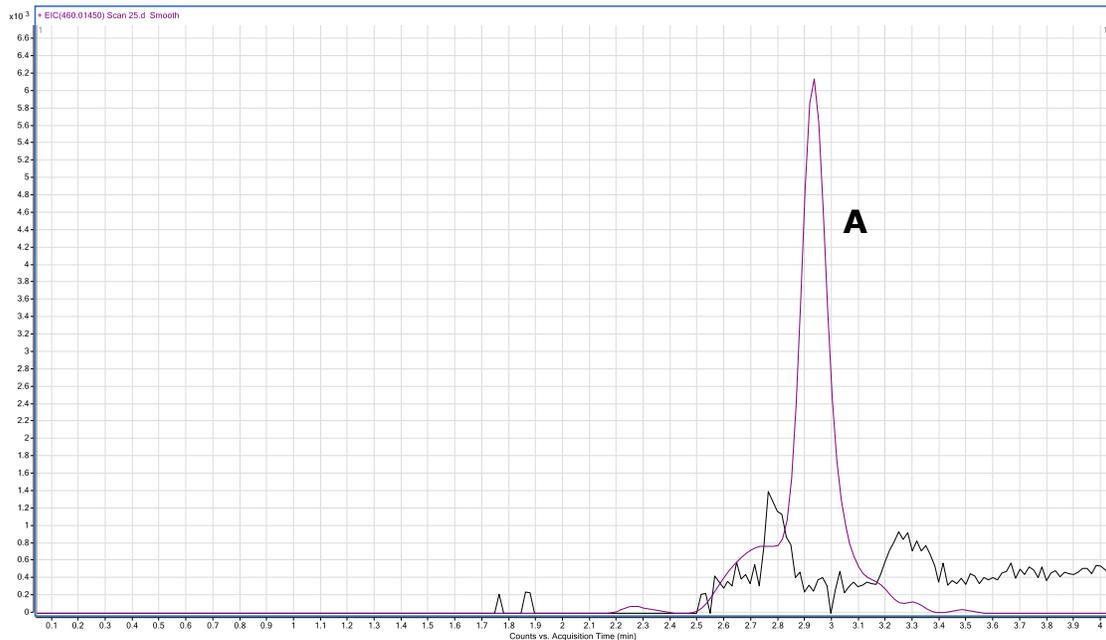


Figura 24. Cromatograma correspondiente a plasma normal. La señal A. CasIII-ia[®] en LIC (25 ng/mL).

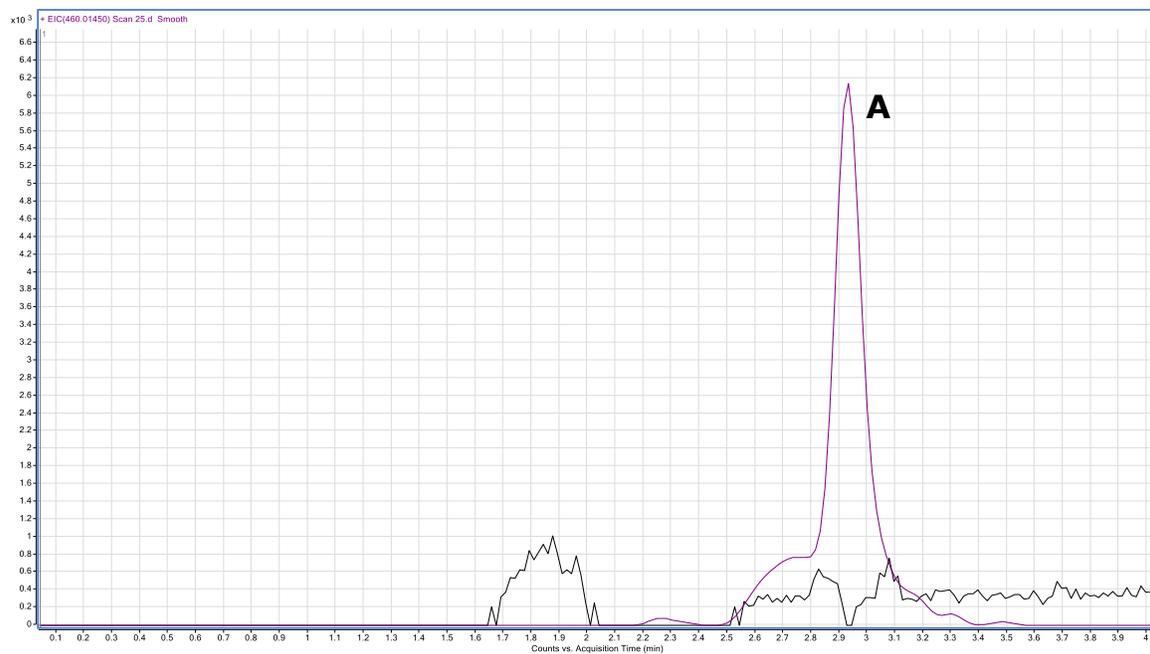


Figura 25. Cromatograma correspondiente a plasma hemolizado. Señal A. CasIII-ia en LIC (25 ng/mL).

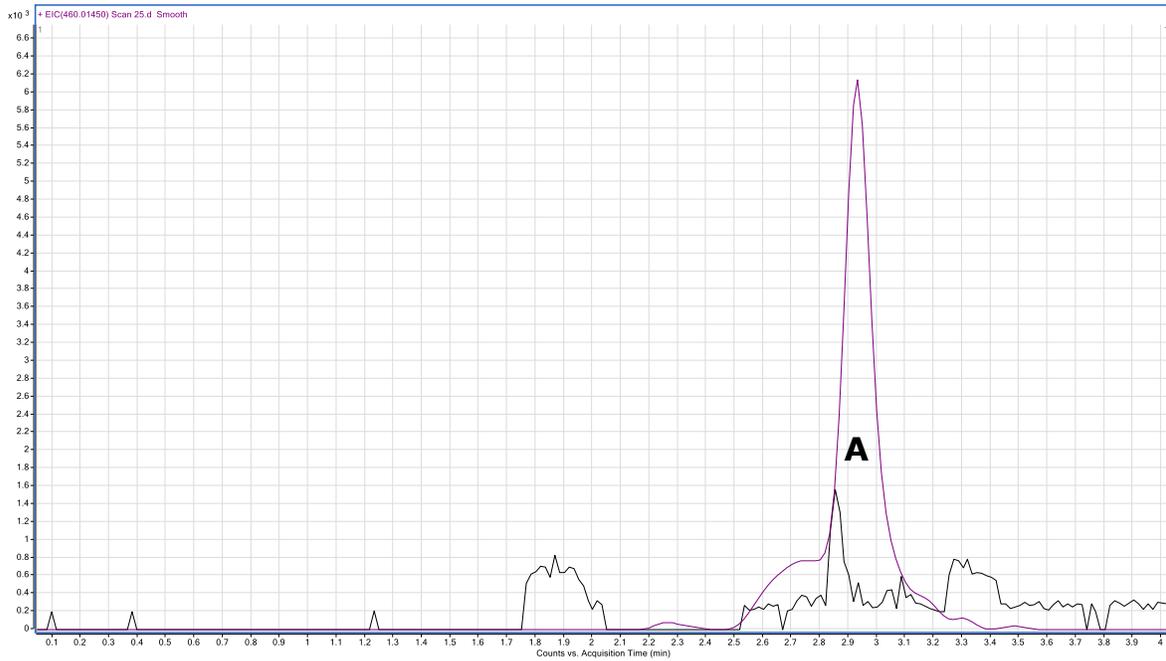


Figura 26. Cromatograma correspondiente a plasma lipémico. Señal A. CasIII-ia en LIC (25 ng/mL).

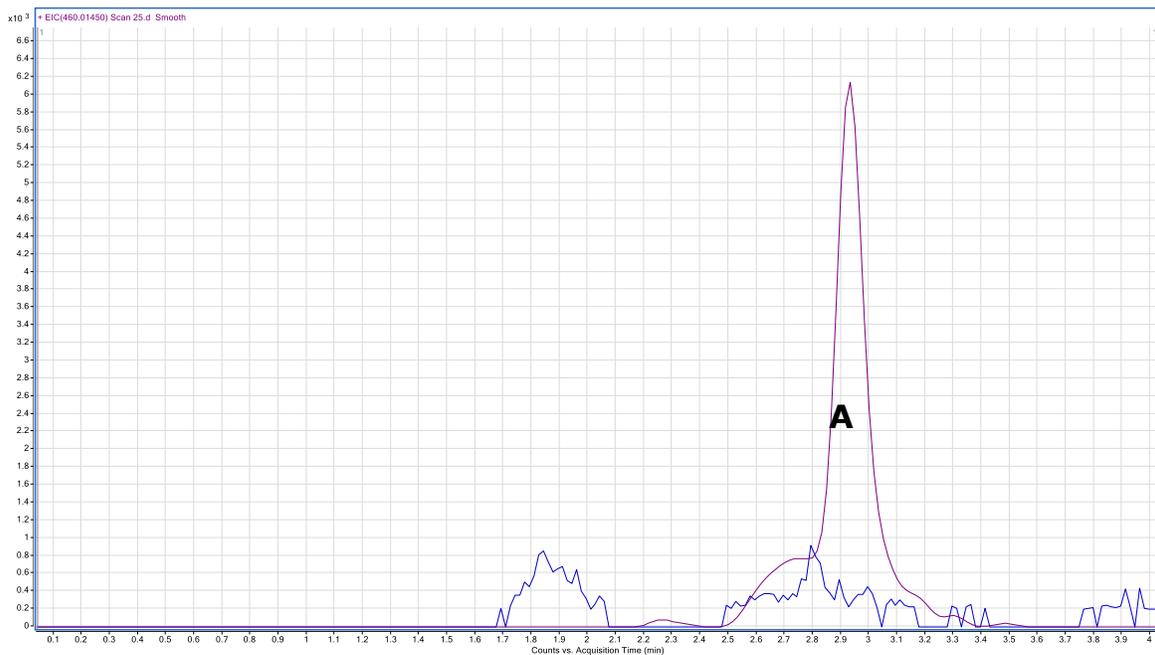


Figura 27. Cromatograma correspondiente a heparina. Señal A. CasIII-ia[®] en LIC (25 ng/mL).

5.2.3 Efecto matriz

Como se muestra en el Cuadro 19, el %CV para el FMN no es mayor a 15%, por lo que se encuentra dentro de especificación. Sin embargo el resultado cuantitativo es reforzado con lo observado durante la comprobación de este parámetro de forma cualitativa pues como se muestra en la figura 15 la señal logra recuperarse antes del tiempo de retención del analito, lo cual explica el valor al límite del FMN.

Cuadro 19. Resultados experimentales de evaluación de efecto matriz

Matriz	Concentración (ng/mL)	Respuesta CasIII-ia®	FMN	
Plasma Hemolizado	200	662874.28	0.8063	
	900	2420969.05	0.6370	
Plasma Lipémico	200	602762.87	0.7332	
	900	1961867.12	0.5162	
Plasma Normal	200	602803.93	0.7332	
	900	2792146.14	0.7347	
Solución	200	822116.68	Promedio	0.6934
	900	3800441.65	SD	0.1021
			%CV	14.7

5.2.4 Efecto de acarreamiento (*carry-over*)

Durante las pruebas efectuadas según lo requerido en la normatividad mexicana, fue posible descartar el efecto de acarreamiento, según muestran las figuras 28 y 29 no existen interferencias mayores al 20% de la respuesta en el límite inferior de cuantificación; sin embargo, durante el desarrollo del método se observó que después de numerosas inyecciones dicho efecto repercute en la precisión y exactitud de la respuesta, para controlarlo se implementaron lavados intra-corrída.

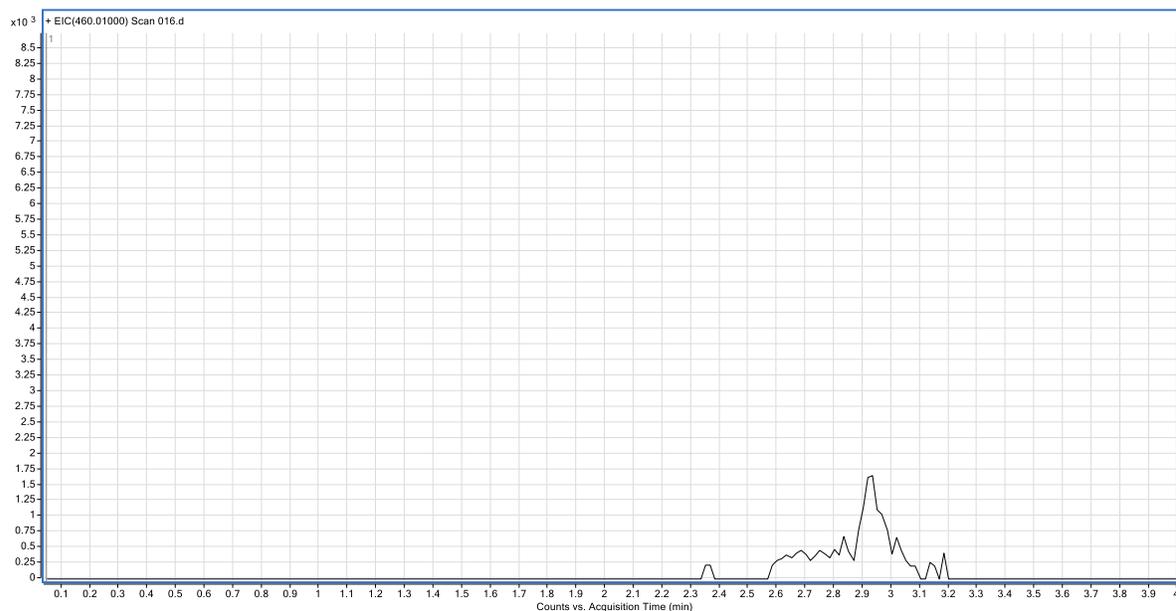


Figura 28. Cromatograma correspondiente a un blanco procesado. Inyección realizada anteriormente a una muestra de LSC.

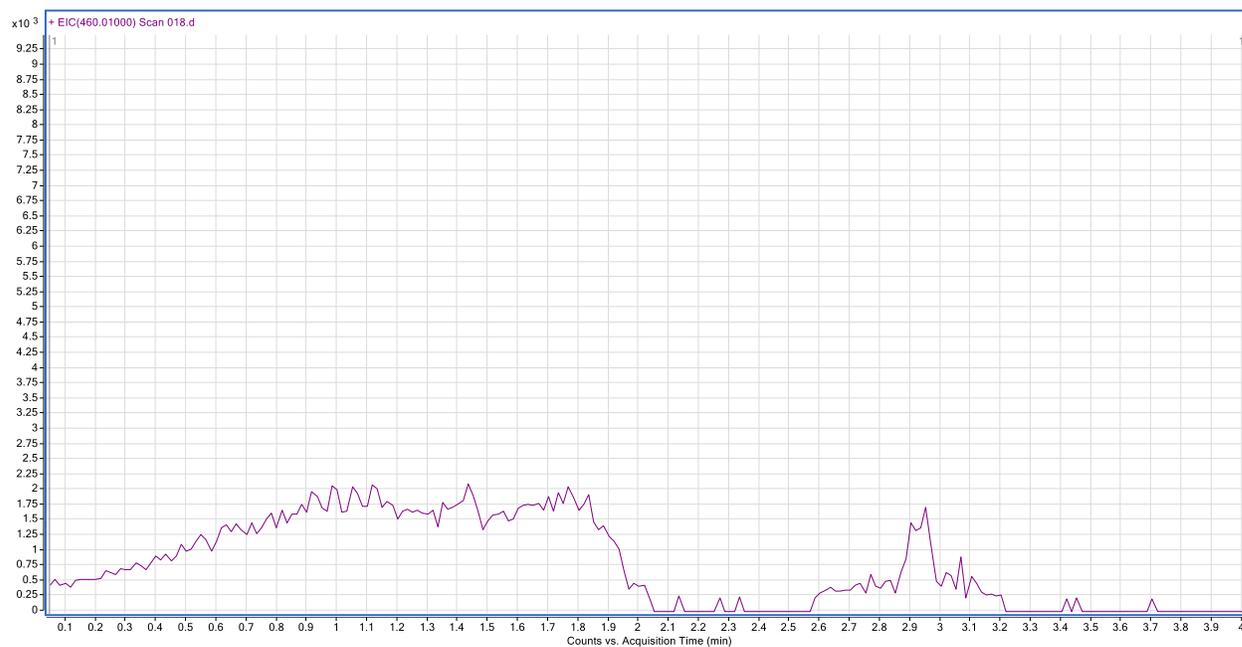


Figura 29. Cromatograma correspondiente a un blanco procesado. Inyección realizada posterior a una muestra en LSC.

5.2.5 Límite de detección

Este parámetro fue calculado según muestra la figura 30, el límite de detección es de 6.6 ng/mL.

$$LDD = \frac{3.3\sigma}{S}$$

Figura 30. Ecuación para cálculo de límite de detección. Donde σ es la desviación estándar de la respuesta y S la pendiente de la curva de calibración.

5.2.6 Linealidad

La evaluación de la relación concentración-respuesta para la CasIII-ia[®] arrojó que el mejor modelo matemático es la ponderación $1/x^2$, pues además de tener una correlación $r=0.998$, cada uno de los siete niveles de concentración son exactos y precisos. En la figura 31 se muestra la curva de calibración promedio y su respectiva ecuación de la recta.

En cuanto a la evaluación de la exactitud de los resultados cada una de las curvas evaluadas cumplen con el criterio de la NOM-177-2013, según muestra el Cuadro 20, aun cuando dos datos de la curva 2 rebasan el 15%, la normatividad indica que al menos el 75% de los niveles de concentración deben cumplir con el criterio, por lo cual dicha curva fue re-calculada sin tomar en cuenta dichos puntos. En el Cuadro 21, se muestran los resultados de la evaluación de precisión de las curvas por medio del coeficiente de variación, se observa que ninguno de ellos sobrepasa el 15% y en caso del LIC no sobrepasa el 20%, tal como especifica la Norma correspondiente. Por otro lado se anexan los datos correspondientes a las ecuaciones de la recta para cada curva de calibración incluyendo la curva promedio.

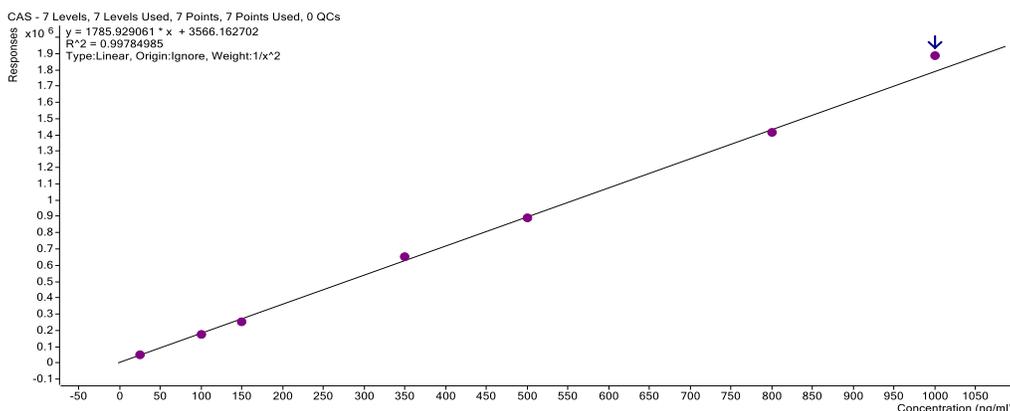


Figura 31. Curva de calibración promedio, evaluación de respuesta lineal. Se muestra ecuación de la recta correspondiente a una ponderación $1/x^2$.

Cuadro 20. Evaluación de Exactitud para las curvas de calibración.

Concentración Nominal (ng/mL)	Curva 1		Curva 2		Curva 3	
	Concentración Calculada (ng/mL)	% DEA	Concentración Calculada (ng/mL)	% DEA	Concentración calculada (ng/mL)	% DEA
25	25.30	1.3	25.9	3.9	25.7	2.7
100	97.0	2.4	92.0	7.4	93.3	6.8
150	140.0	6.6	127.0	15.1	138.3	7.8
350	364.3	4.2	338.1	3.2	340.0	2.7
500	496.0	0.7	569.0	13.9	498.4	0.2
800	789.0	1.3	936.2	17.1	831.3	3.9
1000	1055.1	5.5	1046.0	4.7	1105.2	10.5

Cuadro 21. Evaluación de porcentaje de coeficiente de variación para las curvas de calibración.

Muestra	Curva 1 (ng/mL)	Curva 2 (ng/mL)	Curva 3 (ng/mL)	Promedio (ng/mL)	Desv. Estándar	%C.V.
1	25.3	25.9	25.7	25.6	0.3	1.1
2	97.0	92.0	93.0	93.3	2.6	2.8
3	140.0	127.0	138.3	135.1	7.1	5.2
4	364.3	338.1	340.0	347.5	14.5	4.2
5	496.0	569.0	498.4	521.1	41.6	8.0
6	789.0	936.2	831.3	852.1	75.7	8.9
7	1055.1	1046.0	1105.2	1068.8	31.8	3.0
m	2361.8	2378.9	2155.4	2298.7		
b	18366.1	20559.6	34367.5	24431.1		
r	0.998	0.991	0.996	0.995		

5.2.7 Precisión

5.2.7.1 Repetibilidad

La NOM-177-2013 especifica que el promedio del límite inferior de cuantificación no debe tener un %CV mayor a 20. Las concentraciones calculadas para el LIC (25 ng/mL) de CasIII-ia® cumplen con tal criterio, los resultados son muestra en el Cuadro 22.

Cuadro 22. Repetibilidad al límite inferior de cuantificación.

Muestra	Concentración Calculada (ng/mL)
1	22.22
2	28.25
3	22.95
4	23.00
5	28.30
Promedio	24.94
SD	3.05
%CV	12.24

Como puede observarse en el Cuadro 23 cada uno de los puntos control evaluados cumple con el criterio establecido en la normatividad mexicana. Ninguno de los %CV calculados sobrepasa el 15%.

Cuadro 23. Evaluación de repetibilidad de muestras control.

Muestra	Concentraciones calculadas		
	PCB 200 ng/mL	PCM 600 ng/mL	PCA 900 ng/mL
1	180.27	531.77	793.76
2	216.04	537.67	932.00
3	227.05	595.30	807.50
4	219.82	527.21	884.36
5	224.33	547.21	1007.11
promedio	213.50	547.83	884.95
SD	19.05	27.57	88.67
%CV	8.92	5.03	10.02

En caso de la repetibilidad de muestra diluida, los resultados se muestran en el Cuadro 24, a las muestras les fue aplicado un factor de dilución de 4, como puede observarse el %C.V. no es mayor al 15%, tal como indica la normatividad, por lo que la dilución de la muestra puede efectuarse de forma confiable.

Cuadro 24. Datos de repetibilidad de muestra diluida.

Muestra	Concentración calculada (ng/mL)	MD (2000 ng/mL)
1	561.98	2247.93
2	616.17	2464.67
3	584.22	2336.88
4	659.54	2638.16
5	577.14	2308.56
Promedio	599.81	2399.20
SD	38.80	155.20
%CV	6.46	6.50

5.2.7.2 Reproducibilidad

Como se observa en el Cuadro 25, el parámetro de reproducibilidad, evaluado en tres días diferentes de análisis, para las muestras control cumple con la especificación, pues el %CV no es mayor al 15%. Para el LIC no es mayor al 20% por lo que se dice que el método es reproducible.

Con la evaluación de la reproducibilidad y repetibilidad se concluye que el método es preciso en cada nivel de concentración probado.

Cuadro 25. Datos de reproducibilidad en tres días diferentes de análisis.

Muestra	PCB (200 ng/mL)	PCM (600 ng/mL)	PCA (900 ng/mL)	LIC (25 ng/mL)	
Concentraciones calculadas (ng/mL)					
DÍA 1	1	180.27	531.77	793.76	22.22
	2	216.04	537.67	932.00	28.25
	3	227.05	595.30	807.50	22.95
	4	219.82	527.21	884.36	23.00
	5	224.33	547.21	1007.11	28.30
DÍA 2	6	216.08	559.33	869.09	23.19
	7	157.75	540.20	791.41	22.79
	8	194.90	594.65	843.55	22.38
	9	201.55	564.32	790.44	23.66
	10	179.13	569.39	677.18	24.20
DÍA 3	11	205.69	628.84	990.99	26.41
	12	183.57	637.94	768.29	21.89
	13	200.66	638.12	852.69	26.31
	14	185.42	602.34	840.05	26.59
	15	181.79	663.29	893.31	28.85
Promedio	198.27	582.51	849.45	24.73	
SD	20.13	44.13	85.92	2.45	
%CV	10.15	7.58	10.11	9.92	

5.2.8 Exactitud

Según lo establecido por la NOM-117-2013, el método es exacto cuando el promedio del %DEA de los datos de repetibilidad y reproducibilidad no sobrepasa el 15% para las muestras control; para el LIC este no debe ser mayor al 20%. Como se observa en el Cuadro 26 ninguno de los promedios de %DEA de las muestras control sobrepasa el 15%, para el LIC el %DEA no sobrepasa el 20%. Por lo tanto se concluye que el método es exacto.

Cuadro 26. Desviación estándar absoluta para evaluación de exactitud del método.

	Muestra*	PCB	PCM	PCA	LIC
DÍA 1	1	9.87	11.37	11.80	11.10
	2	8.02	10.39	3.56	12.98
	3	13.52	0.78	10.28	8.19
	4	9.91	12.13	1.74	7.99
	5	12.16	8.80	11.90	13.18
DÍA 2	6	8.04	6.78	3.43	7.24
	7	21.12	9.97	12.07	8.83
	8	2.55	0.89	6.27	10.48
	9	0.78	5.95	12.17	5.35
	10	10.44	5.10	15.87	3.20
DÍA 3	11	2.85	4.81	10.11	5.66
	12	8.22	6.32	14.63	12.44
	13	0.33	6.35	5.26	5.24
	14	7.29	0.39	6.66	6.36
	15	9.10	10.55	0.74	15.38
Promedio de %DEA		8.28	6.71	9.03	8.91

*Datos correspondientes a reproducibilidad y repetibilidad mostradas en el cuadro 25

5.2.9 Recuperación absoluta

Aun cuando la normatividad mexicana no incluye la evaluación del porcentaje de recobro del método, este parámetro es importante para conocer la eficiencia de la extracción. Según la Guía de la FDA emitida en 2013, este parámetro no debe ser necesariamente del 100% pero debe ser preciso y reproducible. En el Cuadro 27 se muestran los resultados de la evaluación del porcentaje de recobro, en promedio en los niveles de concentración probados se obtuvo un recobro de 62.9%, con un %CV de 14.5%, dichos resultados se encuentran dentro de especificación.

Cuadro 27. Resultados de evaluación de porcentaje de recobro.

	MCB		MCM		MCA	
	Área en sistema	Área en método	Área en sistema	Área en método	Área en sistema	Área en método
	3553317	2247738	1875364	1112475	11516099	9385960
	4460293	2046637	1980601	1298604	11439157	7361669
	3942636	2202005	1996589	1205862	11358078	8128869
Promedio de área	3985415	2165460	1950851	1205647	11437778	8292166
%Recobro	54.3		61.8		72.5	

5.2.10 Estabilidad

La NOM-177-2013, especifica que una muestra se considera estable a determinadas condiciones cuando al ser interpolada en una curva de calibración recién preparada, la concentración calculada comparada con la concentración nominal se encuentra dentro del 15% de esta.

Como se muestra en el Cuadro 28 las muestras procesadas y almacenadas a temperatura ambiente, 20°C, presentan una desviación mayor al 50% al no cumplir con la especificación se concluye que el analito no es estable en estas condiciones. Por otro lado las muestras procesadas almacenadas en el inyector a una temperatura de 15°C muestran una desviación no mayor al 8% con respecto al valor nominal por lo tanto las muestras se consideran estables.

Las muestras no procesadas almacenadas a temperatura ambiente, 20°C y a temperatura de refrigeración, 2°C, no son estables a estas condiciones pues no cumplen con la especificación presentando una desviación mayor al 15% con respecto a la concentración nominal.

Las muestras no procesadas almacenadas a temperatura de congelación, -20°C, muestran una desviación no mayor a 10% con

respecto al valor nominal, por lo tanto se considera que el analito es estable a estas condiciones.

En cuanto a los resultados de estabilidad en tres ciclos de congelación-descongelación, las muestras control baja y media mostraron una desviación mayor a la a la especificación (15%) la muestra control alta muestra una desviación de 9.3%, por lo que se considera que las muestras a concentraciones inferiores a 600 ng/mL no son estables a estas condiciones.

Cuadro 28. Resultados de evaluación de estabilidad de CasIII-ia® en matriz biológica a diversas condiciones.

Muestra	Condición	Promedio %DEA		
		MCB	MCM	MCA
Procesada	Temperatura de inyector (15°C)	6.78	7.53	7.97
	Temperatura ambiente (20°C)	62.93	61.68	58.34
No procesada	Temperatura ambiente (20°C)	55.24	55.71	24.13
	Temperatura de refrigeración (2°C)	7.75	60.01	39.92
	Temperatura de congelación (-20°C)	9.10	3.67	9.38
	Ciclos de congelación-descongelación	18.26	16.07	9.30

De acuerdo a los resultados obtenidos se recomienda almacenar las muestras no procesadas a -20°C, ya sea por corto, medio o largo plazo, evitando la descongelación y re-congelación de las mismas a fin de conservar el analito. Por otro lado las muestras procesadas deberán ser almacenadas a 15°C por un periodo no mayor a 24 h.

Para finalizar en el Cuadro 29, se muestra un resumen de los resultados de la validación del método analítico.

Cuadro 29. Resumen de resultados de validación de método.

Parámetro	Resultado	Especificación
Especificidad	No existen interferencias significativas en tiempo de retención.	Las interferencias próximas al tiempo de retención deben ser menores al 20% de la respuesta del LIC.
Efecto matriz	%CV de FNM= 14.7%	El %CV de FNM<15%
Carry-over	No existen interferencias significativas en tiempo de retención del analito	Las interferencias próximas al tiempo de retención deben ser menores al 20% de la respuesta de LIC
Límite de detección*	de 6.6 ng/mL	
Linealidad	r= 0.998* Ponderación 1/x ² %DEA<15% en todos los puntos. %CV< 15% en todos los puntos	Ponderación 1/x ² %DEA<15% en todos los puntos. %CV< 15% en todos los puntos Para el LIC tanto el %CV como %DEA no debe ser mayor a 20%
Repetibilidad	LIC %CV=3.08 MD %CV=6.5 MCB %CV= 13.2 MCM %CV= 6.7 MCA %CV= 10.02	El %CV no debe ser mayor al 15% para muestras control y diluida. Para LIC no debe ser mayor a 20%.
Reproducibilidad	LIC %CV=20.0 MCB %CV= 9.5 MCM %CV= 13.3 MCA %CV= 5.7	El %CV<15% para muestras control y diluida. Para LIC>20%.
Exactitud	LIC %DEA=14.6 MCB %DEA= 7.4 MCM %DEA= 11.5 MCA %DEA= 5.6	El promedio de %DEA< 15% para muestras control. Para LIC< 20%.
Recuperación absoluta*	MCB 54.3% MCM 61.8% MCA 72.5%	El recobro no debe ser necesariamente del 100% pero debe ser exacto y preciso.
Estabilidad almacenamiento (muestra no procesada)	24 h a temperatura ambiente MCB 63.0% MCM 61.7% MCA 58.3% Temperatura refrigeración (4°C) MCB 7.75% MCM 60.0% MCA 39.9% Temperatura congelación (-20°C) MCB 9.1% MCM 3.7% MCA 9.4%	La muestra se considera estable a las condiciones probadas si %DEA es menor al 15%
Ciclos de congelación-descongelación (Tres ciclos de 24 h c/u)	MCB 18.3% MCM 16.0% MCA 9.3%	
Estabilidad de muestra procesada	Temperatura Inyector 15°C MCB 6.7% MCM 7.5% MCA 7.9% Temperatura ambiente MCB 55.2% MCM 61.7% MCA 24.1%	

*Parámetros evaluados de acuerdo a Guía FDA 2013.

6. Conclusiones y perspectivas

- Se desarrolló y optimizó un método para la cuantificación de Casiopeína III-ia[®] en plasma humano por medio de extracción en fase sólida, con un intervalo de trabajo de 25 a 1000 ng/mL.
- Se logró disminuir el límite cuantificación a 25 ng/mL, con un límite de detección de 6.8 ng/mL, para la cuantificación de concentraciones menores a 25 ng/mL se recomienda el aumento del volumen de muestra.
- Se validó el método de cuantificación de Casiopeína III-ia[®] en plasma humano, el cual cumple con las especificaciones dictadas por la NOM-177-2013, dicho método se demostró es lineal, específico, preciso y exacto en el intervalo de trabajo de 25 a 1000 ng/mL.
- No fue posible la elección de un estándar interno apropiado para el método sin embargo se propone la utilización de un fármaco tipo amina cuaternaria.

7. Referencias

[1] Albanel, J. Mestres J. Torres, B. **(2000)** Capitulo 1.13 Principios de Quimioterapia: Tratamiento del cáncer con quimioterapia. Díaz-Rubio, E. García-Conde, J. *Oncología Clínica Básica*. 179-187. Madrid, España. Editorial Aran.

[2] Bravo-Gómez, M.E., García-Ramos, J.C., Gracia-Mora, I. y Ruíz-Azuara, L. **(2009)** Antiproliferative activity and QSAR study of Cooper(II) mixed chelate [Cu(N-N)(acetylacetonato)]NO₃ and [Cu(N-N)(glycinato)]NO₃ complexes (Casiopeínas). *Inorganic Biochemistry*.

[3] Bravo, M.E. Tovar, A. et al. **(2002)** *Diseño, Síntesis y Caracterización de compuestos de coordinación de cobre Casiopeínas®. Historia Química de un proyecto exitoso*. Primer Congreso de Casiopeínas®. Unidad de Seminarios Ex Hacienda El Chorrillo, Taxco, Guerrero. 2 y 3 de Diciembre 2002.

[4] Breaux, Jay. Jones, Kevin and Boulas, Pierre. **(2003)**. Understanding and Implementing Efficient. Analytical Methods Development and Validation. *Pharmaceutical Technology. Analytical Chemistry & Testing*

[5] Cañas-Alonso, R.C. **(2013)** Desarrollo y Validación de Métodos Bionalíticos para cuantificar Casiopeína II-gly en plasma y sangre de perro Beagle por HPLC-MS y su aplicación en un estudio farmacocinético. Tesis Doctoral. Facultad de Química. UNAM.

[6]Carvallo-Cheigneau, F., Trejo-Solís, C., Gómez-Ruiz, C., Rodríguez-Aguilera, E., Macías-Rosales, L., Cortes-Barberena, E., Cedillo-Pelaez, C., Gracia-Mora, I., Ruiz-Azuara, L., Madrid-Marina, V. y Constantino-

Casas, F. **(2008)** Casiopeina III-ia indices apoptosis in HTC-15 cells in vitro through caspase-dependent mechanisms and has antitumor effect in vivo. *Biometals*. **14(4)**: p 467-72.

[7] Christian, G.D. **(2009)** *Química Analítica*. Editorial Mc Graw Hill. México. Sexta Edición en español. p 588-590.

[8] Fonseca-González, L., Berrocal-Barrantes, L. **(2004)**. *Cinética Química aplicada a los procesos de descomposición de los fármacos: conceptos básicos de estabilidad de medicamentos*. Editorial Universidad Costa Rica. San José, Costa Rica.

[9] Fuentes-Noriega, I. **(2005)**. *Farmacocinética preclínica de Casiopeína IIIia y su unión a proteínas plasmáticas*. Tesis Doctoral. Facultad de Química. UNAM.

[10] Fuentes-Noriega, I. Ruiz-Ramírez, L. Tovar-Tovar, A. Rico-Morales, H. y Gracia-Mora, I. **(2002)**. Development and validation of a liquid chromatographic method for Casiopeina IIIi in rat plasma. *Journal Chromatographic B. Analyt Technol Biomed Life Sci*, 772(1), p 115-121.

[11] Guideline on bioanalytical method validation. **(2011)**. European Medicines Agency (EMA).

[12] Guidance for Industry. Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics. **(2013)**. Food Administration Drugs (FDA).

[13] Gracia, I. Bravo M.E., Ruiz-Ramírez, L., Tinoco, M., Mayet, M.L., Huerta L. **(2004)** New Antineoplastic in vivo Screening of mixed Chelate Coordination Compounds (Casiopeinas) in several murine Tumoral Model. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*.

- [14] Gracia-Mora, L. Ruiz-Ramírez. C., Gómez-Ruiz, M. et al. **(2001)** Knigh'ts Move in the Periodic Table, from Platinum to Copper. New Anticancer compounds, Casiopeinas, *in vitro* evaluation. *Metal Based Drugs*. **8, (1)** 19-28.
- [15] Harmonizes Guidelines for Single-Laboratory Validation of Methods of analysis. **(2002)**. International Conference on Harmonization (ICH).
- [16] Harris, D. C. **(2007)** *Análisis químico cuantitativo*. Editorial Reverté, S.A. Tercera Edición en español. p 517-523.
- [17] Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). **(2014)**. "Estadísticas a propósito de Día Mundial contra el Cáncer (4 de Febrero). Datos Nacionales". En: www.inegi.org.mx. Julio 2014.
- [18] King F.D. **(2002)** *Medicinal Chemistry*. Gran Bretaña. RSC. pp. 182.
- [19] Korolkovas A., Burckhalter J.H. **(1983)** *Compendio esencial de Química Farmacéutica*. [Versión electrónica] Recuperado de: <http://www.books.google.com.mx/books?id=LFwAqUISb2UC&printsec=frontcover&dq=quimica+farmaceutica&hl=e>. Revisado el día 23 de Enero de 2015 a las 14:40 h.
- [20] Lanore, D. Delprat, Christel. **(2004)** *Quimioterapia Anticancerosa*. Barcelona, España. Editorial Masson. Págs. 5-8
- [21] Magos-Guerrero, A.G. y Lorenzana-Jiménez, M. **(2009)** Monografía. Las fases en el desarrollo de nuevos medicamentos. *Revista de la Facultad de Medicina, UNAM*. **Vol. 52** No. 6 p260-264.
- [22] Mark Tittle ® Casiopeína. Reg. 407543 SECOFI **(1992)**.

- [23] Martínez-Chapa, K.A. **(2008)**. *Compilación de los Estudios Químicos y Farmacológicos de las Casiopeínas® III-ia y IIgly*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM. México.
- [24] National Institute Cancer (NCI). **(2014)**. Hojas informativas NCI. En: www.cancer.gov/espanol/hojas-informativas. Julio 2014.
- [25] Naxing, X. R., Leimin F., Rieser, M.J. Tawakol A. E.S. **(2007)** Recent advances in high-throughput quantitative bioanalysis by LC-MS/MS. *Journal of pharmaceutical and Biomedical analysis*. 44: p 342-355.
- [26] Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013, Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable y un medicamento biotecnológico es biocomparable. Requisitos a que deben sujetarse los Terceros Autorizados, Centros de Investigación o Instituciones Hospitalarias que realicen las pruebas. **(2013)**. Secretaría de Salud, México.
- [27] Pérez-Sánchez, P. y Sobredo-Galanes A. (2010) *Industria Farmacéutica y Patentes*. [Versión electrónica] Recuperado de: <http://www.books.google.com.mx/books?id=m7o0stnPtjOC&printsec=frontcover&hl=es#v=onepage&q&f=false>
- [28] Organización Mundial de la Salud. Cáncer. Nota descriptiva N° 297. (Febrero 2014). En: www.who.int/mediacentre. Fecha de Consulta: Julio 2014.
- [29] Riva Palacio-Montes, D.M. **(2011)** Desarrollo y optimización de un método analítico para la cuantificación de Casiopeína IIgly® en plasma humano por CLAR-MS. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM.

- [30] Roldan, E. Cancino, D. **(2006)** Evaluación de los efectos genotóxico y clastógeno de la Casiopeína III-ia en linfocitos humanos *in vitro*. *2º Congreso Nacional de Química Médica*. Querétaro, México.
- [31] Secretaría de Salud. Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud. Dirección General de Epidemiología. **(2011)**. Perfil Epidemiológico de tumores malignos en México. En: www.epidemiología.salud.gob.mx. Julio 2014.
- [32] Sierra-Alonso, I., Pérez-Quintanilla, D., Gómez-Ruiz, S., Morante-Zarcelero, S. **(2010)** *Análisis instrumental. Algunas herramientas de enseñanza-aprendizaje adaptadas al espacio europeo de educación superior*. Editorial Netbiblio. España.
- [33] Taylor, P.J. **(2005)** Matrix effects: The Achiler heel of quantitative hig-performance liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. *Clinical Biochemistry*. 38: p 328-334.
- [34] Tovar-Tovar, A. Ruiz-Ramírez, L. Campero, A. Romerosa, A. Moreno-Esparza, R. Rosales-Hoz, M. **(2004)** Structural and reactivity studies on 4,4'-dimetyl-2,2'-bipyridine acetylacetonate copper(II) nitrate (CASIOPEINA III-ia®) with methionine, by UV-visible and EPR techniques. *Journal of Inorganic Biochemistry*, **98**, 1045-1053.
- [35] Vallano, P.T., S.B. Shugarts, E.J. Woolf, B.K. Matuszawski. (2005) Elimination of autosampler carryover in a bioanalytical HPLC-MS/MS method: a case study. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **36**: p 1073-1078.
- [36] Wayne, M. Mullette. **(2007)** Determination of drugs in biological fluids by direct injection of samples for liquid-chromatographic analysis. *Journal of Biochemical and biophysical methods*, **70**: p 263- 273.