



**FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

TRABAJO FIN DE GRADO

**Estudio Cromatográfico de los equilibrios
que afectan a la estabilidad de los fármacos
antitumorales.**

Autor: **Miguel Largo Almoguera.**

D.N.I.: 03929389- T

Tutor: María Antonia Martín Carmona

Convocatoria: Febrero 2015

I. RESUMEN

La camptotecina es el cabeza de serie de un grupo de fármacos antitumorales con actividad inhibidora de topoisomerasas. Esta molécula posee singulares características por lo que ha sido seleccionada como un ejemplo en el que recopilar la mayoría de las competencias adquiridas en las distintas materias que componen el *Grado en Farmacia*. Al tratarse de un producto natural aislado de la *Camptotheca acuminata*, pone de manifiesto la importancia del conocimiento de la Botánica y la Farmacognosia (véase Esquema 1).

Su actividad biológica, desde sus características antiinflamatorias hasta su actividad antitumoral, han motivado una revisión bibliográfica de los distintos grupos de fármacos antitumorales que se plasma en la introducción de esta memoria y que recoge aspectos tratados en Farmacología o en Química Farmacéutica.

Su mecanismo de acción, ligado a la inhibición de las enzimas “topoisomerasas”, revela la importancia de conocer la Bioquímica y Biología Molecular para poder comprender los mecanismos específicos que impiden la replicación celular. La utilización de sus análogos topotecán e irinotecán en procesos neoplásicos de colon y de mama, permite la aproximación a la Fisiopatología en una enfermedad tan compleja como es el cáncer.

Estos fármacos pueden vehiculizarse como formas farmacéuticas mediante el empleo de nanopartículas o unidos covalentemente a ciclodextrinas para mejorar su biodisponibilidad, lo cual me ha permitido revisar algunos conceptos de Biofarmacia y de Tecnología Farmacéutica con una perspectiva diferente al momento en el que cursaba estas materias.

Los aspectos relativos a las características químicas de la camptotecina, como molécula portadora de un anillo de lactona la hacen sensible a la influencia de parámetros físico-químicos como el pH o la temperatura. La revisión bibliográfica sobre el equilibrio lactona/carboxilato de la camptotecina ha facilitado la comprensión de diversas competencias adquiridas en Física Aplicada y Fisicoquímica, Química Orgánica y Química Analítica.

El presente *Trabajo Fin de Grado* se ha realizado bajo la tutorización desde la Sección Departamental de Química Analítica, por ello, se ha puesto especial atención en la revisión de las técnicas analíticas empleadas en la determinación de fármacos antitumorales en muestras de interés farmacéutico.



Esquema 1: Relevancia de la camptotecina en conexión con las distintas materias del Grado en Farmacia.

II. INTRODUCCIÓN

II.1.- Fármacos antitumorales

En los países desarrollados los procesos neoplásicos constituyen uno de los problemas de salud que afectan con mayor incidencia a los ciudadanos, junto con las enfermedades cardiovasculares y las patologías propias de la tercera edad, especialmente las neurodegenerativas entre las que destacan las enfermedades de Parkinson y Alzheimer. Se estima que para el conjunto de la población mundial las muertes por cáncer suponen en torno a un 15 %, mientras que en los países desarrollados las muertes por cáncer se elevan hasta rozar el 25%. Los datos del informe GLOBOCAN 2012 ponen de manifiesto una clara tendencia al alza en todo el planeta; sin embargo, contrariamente a lo que podría pensarse, los porcentajes de nuevos casos diagnosticados en las regiones más desarrolladas del mundo son inferiores a los que aparecen en las zonas con menor índice de desarrollo(1).

La complejidad de esta enfermedad es tal que puede requerir muy distintos tratamientos (cirugía, radioterapia y quimioterapia) dependiendo del estadio y evolución de la misma. En el caso de la quimioterapia pueden emplearse fármacos citotóxicos –capaces de causar la muerte celular–, o bien, citostáticos –encaminados a detener la proliferación celular– para reducir el tumor y las células malignizadas. Aunque hoy en día se dispone de un rico arsenal terapéutico para la lucha contra los procesos neoplásicos, sin embargo

la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas y nuevas estrategias farmacológicas es uno de los retos a los que se enfrentan numerosos grupos de investigación.

Tabla 1: Grupos de fármacos anti-tumorales incluyendo una breve descripción de su mecanismo de acción.

| DENOMINACIÓN | MODO DE ACCIÓN | EJEMPLOS REPRESENTATIVOS |
|---|---|--|
| Agentes formadores de aductos con el ADN | Formación de enlaces covalentes con el ADN. La unión al ADN impide la replicación del mismo conduciendo a la apoptosis celular. | - Agentes alquilantes (ciclofosfamida, nitrosoureas) - Derivados del platino (cisplatino, carboplatino) - Agentes que interaccionan con el “surco menor” del ADN (Saframincinas A y S, Ecteinascidina) |
| Antimetabolitos | Imprescindibles para la síntesis de las biomoléculas se incorporan “fraudentemente” a las mismas y producen apoptosis celular. | Metotrexato, tioguanina, mercaptopurina. |
| Antibióticos | Mecanismos múltiples, intercalación con el ADN, generación de radicales libres tóxicos e inhibición de topoisomerasas | Doxorubicina y epirubicina. |
| Inhibidores de la funcionalidad del huso mitótico | Impiden la polimerización de las tubulinas que forman el huso mitótico en el proceso de división celular | - Alcaloides (vinblastina y vincristina) - Taxanos (paclitaxel, docetaxel) |
| Inhibidores de topoisomerasas | Impiden la acción de las enzimas encargadas de facilitar el desenrollamiento del ADN como paso previo a la replicación y transcripción. | - Derivados de camptotecina: topotecán e irinotecán. - Epipodofilotoxinas: etopósido |
| Terapia hormonal | Agentes que actúan bloqueando la síntesis de las hormona esteroideas o bloqueando sus receptores en las células tumorales | - Inhibidores de aromatasas como formestano o anastrozol. - Agonistas de los receptores como tamoxifeno o flutamida. |
| Terapia inmunológica | Administración de vacunas elaboradas con fragmentos de células tumorales | - Terapia activa: vacunas - Terapia pasiva: anticuerpos (rituximab) o reticulocitos. - Mediadores del sistema inmunológico (interferones, interleucinas) |
| Terapia fotodinámica | Compuestos que al ser iluminados generan sustancias muy tóxicas (oxígeno superóxido) pero con una semivida muy corta | Porfirinas |
| Otras terapias | Inhibidores de tirosin-quinasa Inhibidores de la angiogénesis Silenciadores de genes | - Imatinib - Neovastat - Oblimersen |

En la Tabla 1 se recogen algunos ejemplos relevantes de las distintas terapias antitumorales, teniendo en cuenta para su clasificación el mecanismo químico/bioquímico/farmacológico de su modo de acción.(2)

II.2.- Camptotecina y otros inhibidores de topoisomerasas

Entre los distintos compuestos con actividad antitumoral, los inhibidores de topoisomerasas son un grupo prometedor por sus buenas cualidades y relativa especificidad sobre células tumorales. El compuesto cabeza de este grupo es la camptotecina (CPT)(3). Este alcaloide fue aislado en 1958 por M. E. Wall y M. C. Wani de los extractos de la *Camptotheca acuminata* en 1958. Este arbusto es originario de China y del Tíbet y sus extractos se han utilizado en medicina tradicional china. Debido a la limitada hidrosolubilidad de la camptotecina, los ensayos biológicos se iniciaron con su sal sódica, pero se observó una considerable pérdida de actividad a la vez que la aparición de efectos secundarios como cistitis hemorrágica, lo que hizo que se suspendieran los ensayos clínicos. Sin embargo, al descubrirse más tarde que las topoisomerasas son las dianas celulares de la camptotecina surgió un renovado interés en ésta, lo que hizo que dos de sus análogos topotecán, e irinotecán (Figura 1) fueran comercializados bajo los nombres de hycamtin y camptostar respectivamente. Estos dos compuestos se utilizan con éxito en el tratamiento del cáncer de ovario y de colon. Además algunos de los análogos de camptotecina de más reciente introducción se están estudiando por sus prometedoras propiedades antitumorales en asociación con algunos de los fármacos empleados en terapia fotodinámica del cáncer.

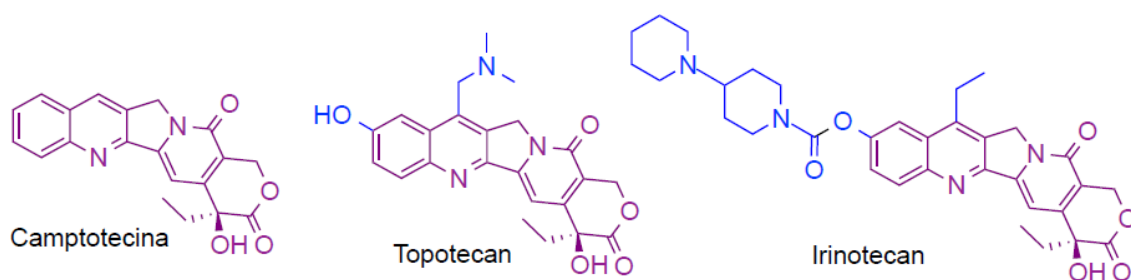


Figura 1: Estructuras químicas de la camptotecina y dos de sus análogos de uso clínico

Tanto la camptotecina como sus análogos impiden el crecimiento de las células tumorales porque dificultan la síntesis del ADN así como la escisión de las hebras del mismo. De esta manera la muerte celular se produce durante la fase S del ciclo celular.

Así, la réplica de la hebra del ADN se ve impedida por la formación de un complejo ternario ADN-camptotecina-topoisomerasa, hallándose estabilizado este complejo por enlaces covalentes. Las topoisomerasas I y II catalizan la relajación del ADN superenrollado en el interior del cromosoma (Figura 2). Aunque el mecanismo exacto por el que la camptotecina estabiliza el complejo ADN-topoisomerasa no está completamente comprendido, sin embargo, se sabe que es un requisito imprescindible que estas "pequeñas moléculas" se dispongan en la interfaz de las dos macromoléculas, contribuyendo al eficaz reconocimiento y acoplamiento de ambas, mediante el mecanismo que Pommier(4) ha denominado "concepto de inhibición interfacial". Los estudios de inhibición de la actividad de topoisomerasas son claves para el desarrollo de nuevos antitumorales y ponen de manifiesto que la "acomodación" del fármaco(5) entre la superficie del ADN y la enzima es crítica para la actividad antitumoral.

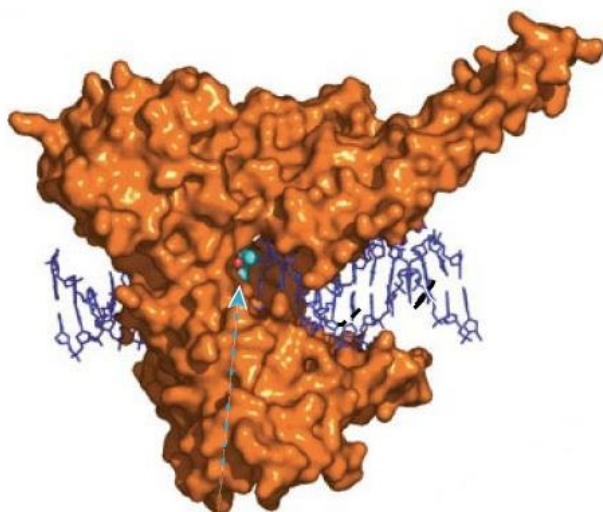


Figura 2: Papel de las topoisomerasa /o complejo ternario ADN-topoisomerasa-CPT Elegir una de las disponibles

II.3.- Estabilidad química de la camptotecina y sus análogos.

La presencia del anillo de lactona en la estructura de la camptotecina y de sus análogos de uso clínico hace a estas moléculas extremadamente sensibles a factores externos. De este modo, es posible la apertura del anillo de lactona y la transformación en la correspondiente forma carboxilato (Figura 3), teniendo la peculiaridad de que esta reacción es reversible por lo que la forma lactona puede obtenerse a partir del carboxilato modulando las condiciones que afectan al equilibrio. Así, esta reacción es sensible al pH, la fuerza iónica y concentración de proteínas(6). La hidrólisis de la camptotecina(7) es significativamente más rápida en suero fisiológico a pH 7,4 y 37 °C. Una de las razones es que lo justifican es que la seroalbumina (humana) tiene una

afinidad 150 veces superior por la forma carboxilato que por la forma lactona(8). Sin embargo, la presencia del anillo de lactona contribuye a la estabilización del complejo ternario y por tanto a la actividad antitumoral. Se sabe que la apertura del anillo de lactona es dificultada a medida que desciende el valor del pH, por ello a pH inferior no debe apreciarse forma carboxilato. Así mismo, un elevado porcentaje de camptotecina es hidrolizada a la forma carboxilato en el torrente circulatorio como consecuencia de la influencia de dos factores favorables a la misma (pH 7,02 y la presencia de seroalbúmina). Hoy sabemos que la cistitis hemorrágica observada en los primeros ensayos experimentales fueron consecuencia de que las dosis administradas para lograr que la camptotecina lactona llegara al tumor eran elevadas, ya que una parte (inactiva) se transformaba en la forma lactona pero al ser eliminada por el riñón y como consecuencia del pH de la orina (inferior a 7,0) una gran parte de la forma carboxilato revertía a la forma lactona apareciendo estos efectos secundarios.

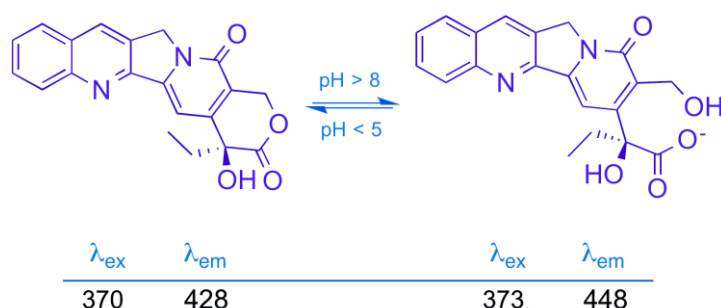


Figura 3: Reacción de equilibrio de apertura del anillo de lactona en la camptotecina y sus análogos.

II.4.- Métodos de análisis de camptotecina y sus análogos.

La búsqueda de nuevas metodologías analíticas que permitan ajustar las concentraciones de los fármacos antitumorales en el intervalo terapéutico apropiado, entre el umbral de efectividad y el de toxicidad, es uno de los requerimientos que deben satisfacer las técnicas analíticas que se empleen en el análisis de antitumorales, especialmente debido al incremento en la demanda de estos fármacos y a la relevancia social de esta enfermedad.

Debido a las características químicas de la camptotecina y sus análogos, la cromatografía de líquidos es una de las técnicas de elección para la determinación de estos compuestos en matrices biológicas. Su baja o nula volatilidad dificulta su análisis por cromatografía de gases y su lipofilia no es lo suficientemente alta como para su determinación por cromatografía de fluidos supercríticos. La cromatografía de líquidos

asociada a espectrometría de masas (HPLC-MS) es una de las metodologías más ampliamente empleadas en bioanálisis, por su elevada eficacia, resolución, sensibilidad y alto rendimiento. Sin embargo, la notable fluorescencia del anillo pentacíclico de la camptotecina hace de la detección fluorimétrica una técnica ideal para el análisis de este compuesto antitumoral así como de sus análogos y también de sus metabolitos. La determinación de camptotecina por cromatografía ha sido objeto de exhaustivas revisiones(6,9). Considerando la particularidad y reactividad que el anillo de lactona confiere a la camptotecina, se han concentrado los esfuerzos en la búsqueda de metodologías que posibiliten la separación de las formas lactona y carboxilato de tal manera que la concentración que se determina se corresponda con los niveles de ambas formas en el plasma o en sangre(10). Las separaciones de ambas formas en fases estacionarias de sílice totalmente porosa requieren un tiempo entre 7 y 12 minutos para la elución del compuesto menos polar, la lactona, mientras que la forma carboxilato, más polar eluye a menor tiempo de retención, entre 3 y 5 minutos dependiendo de la naturaleza química de la fase estacionaria, de la fase móvil y del modo de elución.

En la Figura 4 se muestra un cromatograma correspondiente a la separación de ambas formas de la camptotecina y en la Tabla 2 se recogen a modo de resumen algunos de los métodos empleados en la separación de las formas lactona y carboxilato.

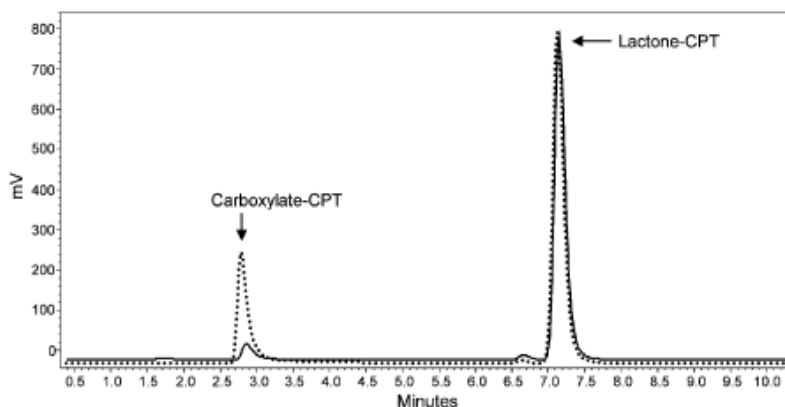


Figura 4: Separación de las formas lactona y carboxilato de la camptotecina en fase estacionaria C-18. Elución en gradiente, fase móvil acetonitrilo y disolución tampón de trietilamina a pH 5,5. La proporción de ACN varía linealmente de 25 a 35 % a lo largo de los 10 min empleados en la separación.(11)

Tabla 2: Algunos ejemplos de separación de las formas lactona y carboxilato de la camptotecina y sus análogos inhibidores de topoisomerasas.

| COMPUESTO | SEPARACIÓN CROMAGRÁFICA | OBSERVACIONES |
|------------------------------------|---|--|
| Camptotecina(12) | Fase inversa. Elución en gradiente. Detección fluorimétrica | Estudio de la cinética de apertura del anillo de lactona |
| Camptotecina(13) | Fase inversa. Elución en gradiente. Detección fluorimétrica | Liberación de la CPT de nanopartículas de sílice |
| Irinotecán(14) | Fase inversa. Elución en gradiente. Detección fluorimétrica | Tejidos y cultivos celulares |
| Irinotecán(15) | Fase inversa. Elución en gradiente. Detección Espectrometría de masas | |
| Amino-camptotecina(16) | Fase inversa. Elución isocrática. Detección fluorimétrica | |
| Camptotecina y Tiocamptotecina(17) | Fase inversa. Elución isocrática. Detección fluorimétrica y UV-vis | Estudio del equilibrio de hidrólisis |

II.5.- Separaciones cromatográficas que emplean partículas de sílice tipo "core-shell".

La cromatografía(18,19) de líquidos es una de las técnicas más profusamente utilizadas en la industria farmacéutica, en el desarrollo de nuevos fármacos, así como en los estudios farmacocinéticos y de biodisponibilidad de los mismos. Ello es debido a la capacidad resolutive de problemas de estas técnicas, tanto en la separación y cuantificación de mezclas complejas como a escala preparativa enfocada a la separación y purificación de biomoléculas, entre otras, proteínas (insulinas) o polisacáridos de alto peso molecular (heparinas) utilizadas con finalidad terapéutica. Además, las distintas modalidades de cromatografía: cromatografía de gases, cromatografía de líquidos y cromatografía de fluidos supercríticos, son capaces de resolver cualquier problema atendiendo a la volatilidad o no de los analitos, su solubilidad, su polaridad, su peso molecular y por otra parte también teniendo en cuenta la complejidad de la matriz en la que se encuentren los compuestos a eluir.

Si nos centramos en la cromatografía de líquidos, una constante a lo largo de los últimos 30 años ha sido la progresiva disminución del tamaño de partícula (desde 5 μm hasta 1,7 μm). Como es bien sabido al reducir el diámetro del tamaño de partícula se incrementa exponencialmente la eficacia de las separaciones con una buena resolución de los

analitos y en tiempos de análisis cortos comparados con los obtenidos en las separaciones convencionales de HPLC (partículas de 5 µm). Como contrapartida a la disminución en el tamaño de partícula nos encontramos con el incremento en la presión en el interior de la columna lo que hace que se requieran bombas capaces de soportar mayor presión y enviar la fase móvil hacia las columnas empaquetadas con partículas de sílice totalmente porosas de 1,7 µm. En consecuencia, a esta técnica cromatográfica se le denomina UHPLC (Ultra High Pressure Liquid Chromatography).

En 2006, se comercializaron las primeras partículas de sílice superficialmente porosa, también denominadas "core-shell" producidas de manera reproducible y a gran escala por la firma Halo. Como se puede apreciar en la Figura 5 estas partículas constan de un núcleo de sílice fundida sobre la que se van depositando sucesivas capas de sílice porosa funcionalizada químicamente y con capacidad para retener selectivamente los compuestos. Este tipo de partículas poseen excepcionales características desde el punto de vista cromatográfico, ya que como se puede apreciar, la distancia requerida para difundir un compuesto en la fase estacionaria se ve notablemente reducida en el caso de las partículas superficialmente porosas. En consecuencia disminuyen los términos A, B y C de la ecuación de van Deemter (Ecuación 1) contribuyendo así a aumentar la eficacia de la separación (menor valor de altura equivalente de plato teórico, H).

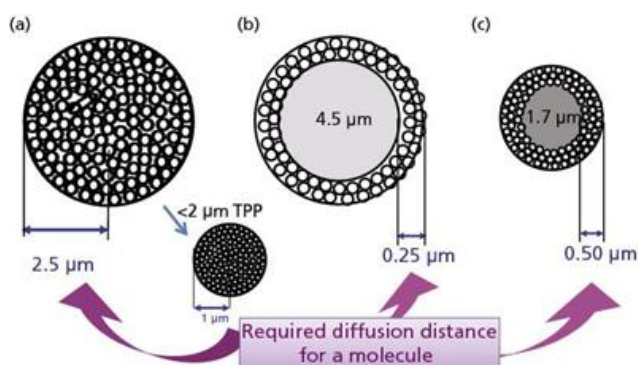


Figura 5: Comparación esquemática de una partícula de sílice totalmente porosa y dos partículas de sílice superficialmente porosas con distinto diámetro de partícula.

$$H = A + \frac{B}{u} + (C_s + C_M)u \quad \text{Ecuación 1}$$

La homogeneidad del empaquetado de las partículas core-shell y la menor distancia para difundir contribuyen a disminuir los términos del camino múltiple, también denominado término de la difusión en remolino (A), así como el término de la difusión longitudinal (B). Por otra parte, el núcleo de sílice fundida, mejora los equilibrios de

transferencia de masa (C) y proporciona a una mejor conductividad térmica. Todo ello conlleva un aumento de la eficacia en tiempos de análisis extraordinariamente cortos, tal y como se puede apreciar en la Figura 6 al comparar la separación de un grupo de compuestos de interés farmacéutico en columnas convencionales y en columnas superficialmente porosas. Este tipo de fases estacionarias proporciona separaciones eficaces en tiempos de análisis cortos(20,21) semejantes a los obtenidos en UHPLC pero sin la necesidad de trabajar a elevadas presiones y pudiendo utilizar las bombas de los cromatógrafos convencionales.

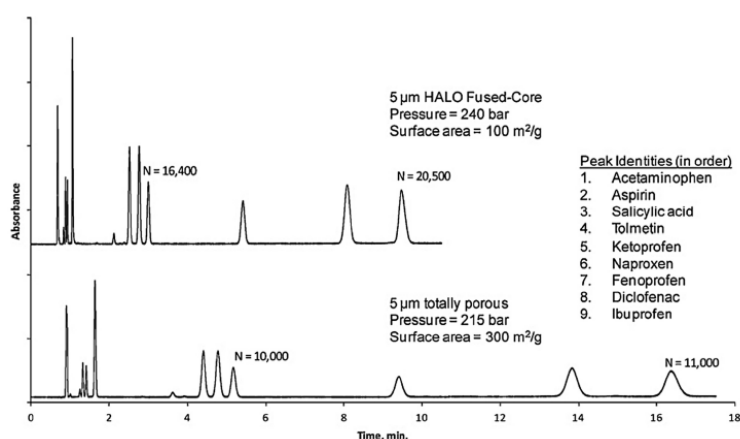


Figura 6: Comparación de los cromatogramas obtenidos en fases estacionarias totalmente porosas (abajo) y superficialmente porosas (arriba).(22)

III. OBJETIVOS

Teniendo en cuenta la significación biológica y actividad antitumoral de los inhibidores de topoisomerasas así como la versatilidad de la cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC) y la sensibilidad de la detección fluorimétrica acoplada a la cromatografía de líquidos, nos planteamos los siguientes objetivos:

- 1.- Puesta a punto de un método cromatográfico (HPLC-FD) que permita la detección sensible de la camptotecina empleando fases estacionarias “core-shell”.
- 2.- Separación por HPLC-FD de las formas lactona y carboxilato de la camptotecina y estudio de las variables que afectan al equilibrio lactona/carboxilato.

IV. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

El cromatógrafo (Merk-Hitachi) consiste en una bomba cuaternaria, la columna y un detector de fluorescencia (CPT λ_{exc} 370 nm y λ_{em} 440nm)(23). Las muestras se introdujeron a través de un inyector Rheodyne con un bucle de carga de 5 µL. La columna se encuentra en el interior de un sistema termostático para columnas (Horno por efecto Peltier). El cromatógrafo posee el software para el control y adquisición de datos. Las medidas de pH se llevaron a cabo con un pH-metro Crison. Para la

calibración y verificación de la concentración de las disoluciones de albúmina y de camptotecina se utilizó un espectrofotómetro UV-Vis de la firma Kontron.

Las separaciones se realizaron con una columna Kinetex core-shell C-18 (Phenomenex) de tamaño 50x3mm, con un tamaño de partícula de sílice porosa de 2.6 μm y un diámetro de poro de 100Å. Además, la columna se encuentra unida a una pre-columna, que permite aumentar la vida media de la columna.

La camptotecina al igual que el resto de disolventes y reactivos utilizados fueron de la máxima garantía y calidad para análisis. El agua miliQ proviene de un sistema Mili-Q Direct 8 system del laboratorio.

Las fases móviles (seleccionada: tampón acuoso de acetato de trietilamina: acetonitrilo, 65:35, v:v) fueron filtradas en vacío y desgasificadas por sonicación en ultrasonidos. Se usaron filtros de membrana con un tamaño de poro de 0,22 μm (Phenomenex).

Al analizar cómo afectan distintos factores al equilibrio entre las dos formas de la CPT, se empezó el estudio con el análisis del efecto del pH sobre el equilibrio. Se examinó el equilibrio de la CPT preparada a pH 3 y a pH 10, pH límites, y de igual forma se estudió a pH 8 ya que es un pH en el que el equilibrio está ya desplazado hacia el carboxilato y además es cercano al pH fisiológico. Las muestras a distintos pH son inyectadas en la fase móvil con pH 5.5, pero la rapidez de elución de las core-shell permite que apenas haya efecto del pH en el corto tiempo de contacto con la fase móvil.

Los ensayos con HSA se realizaron comparando el equilibrio de ambas formas, sin HSA y en presencia de HSA, a concentración constante de CPT.

También se estudió la influencia del tiempo de incubación de la muestra a 37°C sobre el equilibrio de la CPT en presencia de HSA.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

V.1.- Sistemática de lavado y regeneración de columnas tipo “core-shell”:

Una de las dificultades a las que un cromatografista se enfrenta habitualmente es la sobrecarga en el lecho cromatográfico como consecuencia de los diferentes “restos” (analitos componentes inorgánicos de los tampones, algunos compuestos presentes en la matriz que son capaces de superar los procedimientos de pre-tratamiento...) que residen y se depositan sobre la fase estacionaria. Normalmente este efecto se manifiesta en un valor muy elevado de presión en la bomba del cromatógrafo, lo que obliga al lavado de

la bomba y también lavado y regeneración de la columna de HPLC, para que así, nos permita un funcionamiento correcto y la obtención de resultados fiables.

Inicialmente, se comenzó por la limpieza de la bomba cuaternaria. El uso de tampones para regular el pH de la fase móvil puede provocar que precipiten sales de ese tampón que se depositan en los pistones de la bomba e impiden un cierre correcto de los pistones de la bomba, originando el aumento y caída de presión. Esta precipitación ocurre debido a que la mayoría de las fases móviles se componen de un disolvente orgánico que favorece la precipitación de los componentes inorgánicos. Se desconectó la columna de los tubos Vipper para así poder trabajar a caudales altos que consigan arrastrar las sales del tampón, sin dañar la columna. Se procedió a un lavado secuencial con disolventes de mayor a menor polaridad, lo que permite el arrastre y lavado de sustancias retenidas con distintas polaridades. Se pasaron 25 mL de acetonitrilo, seguidos de 25 mL de metanol, 25 mL de 2-propanol, 25 mL de diclorometano, 25 mL de acetonitrilo y 50 mL de agua. Todo ello a un caudal de 1 mL/min.

Asimismo, se procedió a la regeneración de la columna. Para ello se siguieron las indicaciones del fabricante. Se dio la vuelta a la columna y se pasaron los siguientes disolventes a un flujo de 0.3 mL/min: 25 mL de acetonitrilo, 25 mL de tetrahidrofurano, 25 mL de acetonitrilo y 50 mL de agua.

Tras el lavado de la bomba y la regeneración de la columna, se volvió a pasar fase móvil al flujo de trabajo y con todos los componentes conectados, comprobándose que la presión ya estaba normalizada (inferior a 120 bares).

V.2.- Selección de las condiciones de separación:

Las separaciones de CPT lactona y carboxilato descritas hasta el momento emplean fases estacionarias C-18 de partículas de sílice totalmente porosas (5 μm). Para aumentar la eficacia de la separación elegimos una columna C18 de tipo “core-shell” (2,6 μm).

Para la selección de las fases móviles consideramos que la mayoría de los métodos describen la separación de las formas lactona y carboxilato de la CPT empleando como fase móvil mezcla acetonitrilo: tampón acetato de trietilamina o bien metanol: tampón acetato de amonio. Finalmente, decidimos usar una fase móvil compuesta por tampón de acetato de trietilamina: acetonitrilo. La inclusión del ácido acético tiene una doble función, al ser un ácido débil se utiliza para que ejerza de tampón y además se ha

descrito que la presencia de ácidos, como el fórmico o el acético, estrechan el ancho de los picos, obteniéndose una mejor eficacia y resolución.

La elección de la trietilamina como contraión del acético frente a otros cationes, se explica debido a que la trietilamina es capaz de formar par iónico con la forma carboxilato de la CPT lo cual hace que la molécula disminuya su polaridad y eluya en tiempo de retención más largo(24). De esta manera se consigue un índice de retención adecuado al eluir en un tiempo de retención distante al correspondiente al tiempo muerto. Cationes de menor tamaño como el sodio o el amonio no son capaces de unirse al carboxilato.

En la elección del método de elución, se tuvo en cuenta que usando un gradiente, como en la Figura 7, se obtienen cromatogramas en el que la forma carboxilato aparece lejos del tiempo muerto por lo que se conseguían dos formas diferenciadas y bien definidas. Sin embargo, usando un método de separación isocrático los tiempos a los que aparecen ambas formas son mucho más cortas, con lo que el tiempo de carrera es menor, aunque el carboxilato eluye en un tiempo próximo al correspondiente al volumen muerto, como se aprecia en la Figura 8. En nuestro trabajo al requerir sólo la separación de dos compuestos, no era crítica una óptima resolución de múltiples picos, por ello se eligió una elución isocrática. Entre las ventajas de la elución isocrática se encuentra el hecho de que se consigue una mayor reproducibilidad de las distintas carreras al no variar las condiciones de la fase móvil, y un menor tiempo de re-equilibrado de la columna tras el paso de una muestra, ya que en la elución por gradiente al acabar con una proporción de componentes en fase móvil distinta a la que comenzamos es preciso re-equilibrar la columna para volver a la situación inicial de la composición de fase móvil.

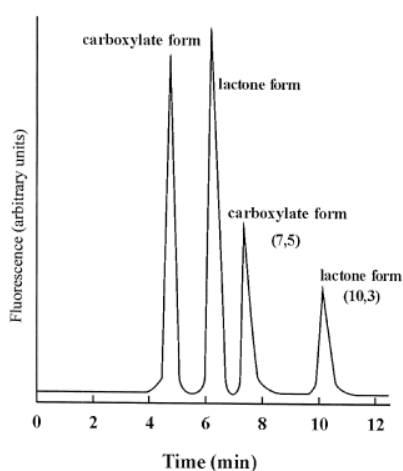


Figura 7: Separación de las formas carboxilato y lactona de la 10-hidroxicamptotecina (4-6 min) y de la camptotecina (7-10 min) mediante HPLC-FD. Columna C-18. Partículas totalmente porosas de 5 μ m. Elución isocrática, fase móvil acetato amónico (pH 6,4): acetonitrilo, 70:30, v:v.(25)

Para la determinación de las proporciones adecuadas de cada componente en la fase móvil, se tuvo en cuenta que las fases estacionarias totalmente porosas emplean proporciones de disolvente orgánico que varían entre el 50% y el 80%, (14,25) como ejemplo se muestra la Figura 7. Teniendo en cuenta estos antecedentes se comenzó por una fase móvil tampón acuoso acetato de trietilamina: acetonitrilo, con una proporción 90:10. El cromatograma obtenido se muestra en la Figura 8. Como se puede apreciar tanto la fase móvil de 90:10 como la de 85:15 no se obtiene un buen tiempo de separación para la forma lactona, ya que los tiempos de retención obtenidos son demasiado largos, por ello se planteó incrementar la proporción de ACN en la fase móvil para reducir el tiempo de retención. En la Figura 8 se muestra los cromatogramas cuyas condiciones experimentales se han descrito anteriormente. La composición de la fase móvil elegida fue tampón acetato de trietilamina: acetonitrilo, 65:35, v:v por la eficacia obtenida y el reducido tiempo de análisis.

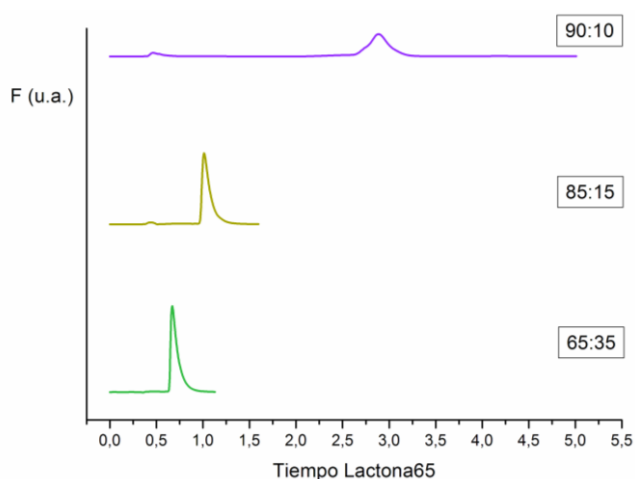


Figura 8: Cromatogramas de la separación de las formas lactona y carboxilato de la CPT a distintas proporciones de tampón acetato de trietilamina: acetonitrilo en elución isocrática. Fase estacionaria: columna core-shell C-18.

V.3.-Factores que afectan al equilibrio de apertura del anillo de la CPT

V.3.1.- Influencia del pH

El pH de la disolución en el que se encuentra la CPT va a afectar al equilibrio de la CPT y por tanto determinará la proporción de cada forma en la disolución. Como se puede apreciar en la Figura 9, las disoluciones de CPT a pH 3 eluidas con fase móvil de pH 5,5 muestran un único pico cromatográfico que aparece a 0,7 min atribuible a la forma lactona de la CPT. Cuando la CPT se disuelve en una disolución acuosa de pH 8 o superior aparece la forma carboxilato en el equilibrio de apertura de la CPT. A pH 10 este equilibrio se haya desplazado completamente hacia la forma carboxilato. Por ello

para comprobar el tiempo de retención de la forma carboxilato se inyectó una disolución de CPT llevada a pH 10 en la fase móvil seleccionada para la separación. Como se puede apreciar en la Figura 9 el tiempo de retención de la forma carboxilato de la CPT es de 0,4 min. Las diferencias en el tiempo de retención entre las formas carboxilato y lactona de la CPT permiten suponer que es posible la separación de ambas cuando estén presentes en una mezcla. Por ello se procedió a inyectar una disolución de CPT tamponada a pH 7,02 ya que en estas condiciones deben aparecer los dos picos que corresponden a las dos formas que coexisten en el equilibrio. Como se puede apreciar en la Figura 10 se aprecia la separación de las dos formas predominando la forma lactona.

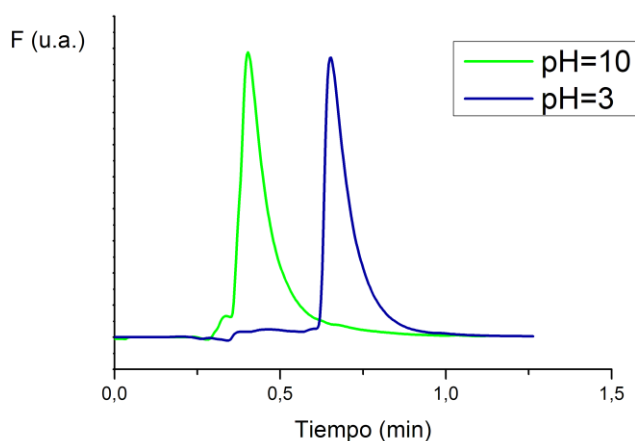


Figura 9: Cromatogramas que muestran la separación de las formas carboxilato y lactona de la CPT en disoluciones de distinto valor de pH.

V.3.2.- Influencia de la seroalbúmina

Como se ha comentado en la introducción del presente trabajo la forma carboxilato de la CPT tiene una afinidad muy superior por la HSA y por tanto en el torrente circulatorio esta proteína transporta la forma carboxilato preferentemente con respecto a la forma lactona. Con la finalidad de verificar que el método cromatográfico propuesto en esta memoria es adecuado para la cuantificación de la fracción de CPT unida a HSA se prepararon disoluciones de CPT que contenían HSA a concentración constante en disolución tamponada a pH 7,02. Paralelamente se prepararon disoluciones de CPT en disolución tamponada a pH 7,02. Estas disoluciones se mantuvieron a temperatura ambiente y se inyectaron en el cromatógrafo después de transcurridas 2 h. En la Figura 10 se muestra el cromatograma obtenido para la disolución de CPT patrón tamponada a pH 5,5 como cabe esperar se observa únicamente de la forma lactona de la CPT. Una disolución de CPT patrón tamponada a pH 7,02 e inyectada después de dos horas a este valor de pH muestra las dos formas carboxilato y lactona de la CPT, siendo mayoritaria

la forma lactona de la CPT. En presencia de HSA y análogas condiciones a las descritas anteriormente se puede apreciar que la forma carboxilato se ha incrementado notablemente por efecto de la HSA presente en la disolución.

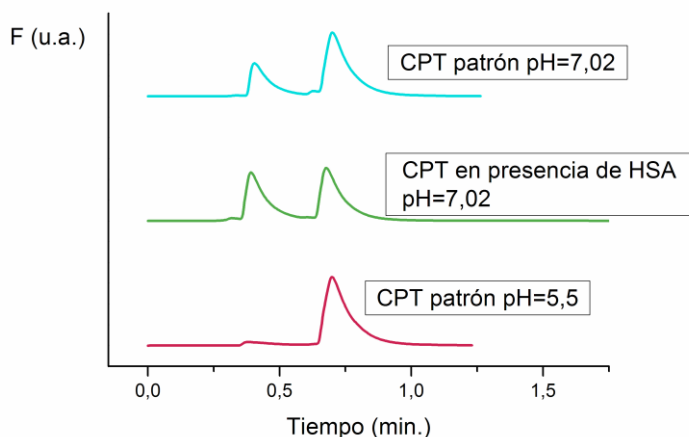


Figura 10: Cromatogramas mostrando la influencia de la HSA sobre el equilibrio de apertura del anillo de CPT.

V.3.3.- Influencia del tiempo de incubación

Con la finalidad de estudiar el efecto de la HSA sobre el equilibrio de la CPT en condiciones experimentales próximas a las fisiológicas se incubaron las disoluciones de CPT en presencia de HSA a 37 °C en disolución tamponada a pH fisiológico. Al igual que en muchos equilibrios químicos el incremento de la temperatura favorece la apertura del anillo de lactona al ser esta una forma menos estable que la forma carboxilato. En la Figura 11 se muestran los cromatogramas que ilustran el efecto conjunto de estas variables.

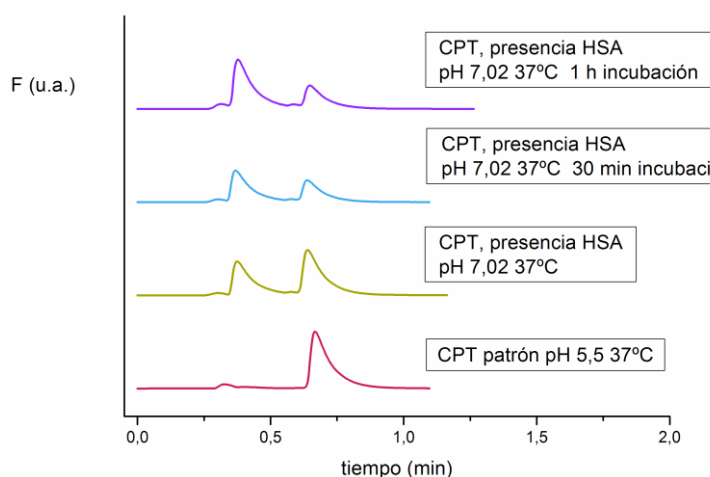


Figura 11: Estudio del efecto de la temperatura en presencia de HSA a diferentes tiempos de incubación sobre el equilibrio de apertura del anillo de CPT.

Así se puede apreciar que la disolución patrón de CPT a pH 5,5 muestra únicamente el pico correspondiente a la forma lactona de la CPT. Sin embargo, cuando se incubaba la disolución de CPT a pH 7,02 en presencia de HSA y a 37 °C se observa que están presentes en el equilibrio las formas abierta y cerrada de la CPT. La disolución de CPT incubada, a 37 °C y en presencia de HSA a pH 7,02 demuestra que el equilibrio va desplazando paulatinamente hacia la forma carboxilato de la CPT incrementándose el área de pico de esta a medida que aumenta el tiempo de incubación, de 30 min a 1h.

V. CONCLUSIONES

1. Se ha llevado a cabo una revisión bibliográfica del mecanismo de acción de los antitumorales, de los aspectos fisiopatológicos de los procesos tumorales y de la vehiculización de estos fármacos. Además, se han revisado los métodos de análisis de antitumorales con especial atención en las formas coexistentes en el equilibrio del antitumoral inhibidor de la topoisomerasa, camptotecina.
2. Del estudio de las fuentes bibliográficas se deduce la importancia de la camptotecina como compuesto modelo en el que interconectar las distintas capacidades, competencias y conocimientos adquiridos en diversas materias que componen el Grado en Farmacia.
3. Durante la realización del presente trabajo se han adquirido las habilidades y la destreza para la puesta a punto y el trabajo de rutina en cromatografía y otras técnicas básicas de laboratorio (potenciometría, espectrofotometría).
- 4.- Se ha logrado reproducir un método que permite la separación de las formas activa (lactona) y farmacológicamente inactiva (carboxilato) de la camptotecina. Teniendo en cuenta las nuevas tendencias en HPLC se han empleado columnas tipo “core-shell”.
- 5.- Las variables fisicoquímicas (pH, temperatura, HSA y tiempo de incubación) que afectan al equilibrio de la camptotecina han sido estudiadas mediante cromatografía de líquidos. Ello ha permitido adquirir el conocimiento de la importancia de las mismas sobre la estabilidad de este antitumoral.

VI. BIBLIOGRAFÍA

1. Ferlay J. Soerjomataram I., Ervik M., Dikshit R., Eser S. and MWWIC. Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Globocan 2012 v1.0. 2012. Available from: <http://globocan.iarc.fr>

2. Avendaño C, Menéndez JC. Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs [Internet]. Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs. 2008. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780444528247000081>
3. Thomas CJ, Rahier NJ, Hecht SM. Camptothecin: Current perspectives. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 2004. p. 1585–604.
4. Pommier Y, Marchand C. Interfacial inhibitors: targeting macromolecular complexes. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2012. p. 250–250.
5. González-Ruiz V, Pascua I, Fernández-Marcelo T, Ribelles P, Bianchini G, Sridharan V, et al. B-ring-aryl substituted luotonin A analogues with a new binding mode to the topoisomerase 1-DNA complex show enhanced cytotoxic activity. *PLoS One*. 2014 Jan;9(5):e95998.
6. Mullangi R, Ahlawat P, Srinivas NR. Irinotecan and its active metabolite, SN-38: Review of bioanalytical methods and recent update from clinical pharmacology perspectives. *Biomedical Chromatography*. 2010. p. 104–23.
7. Li WY, Koda RT, Pugari MP. Stability of irinotecan hydrochloride in aqueous solutions. *Am J Heal Pharm*. 2002;59:539–44.
8. Mi Z, Malak H, Burke TG. Reduced albumin binding promotes the stability and activity of topotecan in human blood. *Biochemistry*. 1995;34:13722–8.
9. Oguma T. Antitumor drugs possessing topoisomerase I inhibition: Applicable separation methods. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 2001. p. 49–58.
10. Tsakalozou E, Horn J, Leggas M. An HPLC assay for the lipophilic camptothecin analog AR-67 carboxylate and lactone in human whole blood. *Biomed Chromatogr*. 2010;24:1045–51.
11. Sætern AM, Nguyen NB, Bauer-Brandl A, Brandl M. Effect of hydroxypropyl- β -cyclodextrin-complexation and pH on solubility of camptothecin. *Int J Pharm*. 2004;284:61–8.
12. Ma J, Liu CL, Zhu PL, Jia ZP, Xu LT, Wang R. Simultaneous determination of the carboxylate and lactone forms of 10-hydroxycamptothecin in human serum by restricted-access media high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci*. 2002;772:197–204.
13. Botella P, Abasolo I, Fernández Y, Muniesa C, Miranda S, Quesada M, et al. Surface-modified silica nanoparticles for tumor-targeted delivery of camptothecin and its biological evaluation. *J Control Release*. 2011;156:246–57.
14. Boyd G, Smyth JF, Jodrell DI, Cummings J. High-performance liquid chromatographic technique for the simultaneous determination of lactone and hydroxy acid forms of camptothecin and SN-38 in tissue culture media and cancer cells. *Anal Biochem*. 2001;297:15–24.

15. Ragot S, Marquet P, Lachâtre F, Rousseau A, Lacassie E, Gaulier JM, et al. Sensitive determination of irinotecan (CPT-11) and its active metabolite SN-38 in human serum using liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 1999;736:175–84.
16. Loos WJ, Sparreboom A, Verweij J, Nooter K, Stoter G, Schellens JHM. Determination of the lactone and lactone plus carboxylate forms of 9-aminocamptothecin in human plasma by sensitive high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr B Biomed Appl.* 1997;694:435–41.
17. Pistolozzi M, Varchi G, Degli Esposti A, Guerrini A, Sotgiu G, Ballestri M, et al. Camptothecin and thiocamptothecin: The role of sulfur in shifting the hydrolysis equilibrium towards the closed lactone form. *ChemMedChem.* 2011;6:1706–14.
18. Kazakevich Y, LoBrutto R. *HPLC for Pharmaceutical Scientists.* HPLC for Pharmaceutical Scientists. 2006.
19. Poole CF. *The essence of chromatography.*
20. González-Ruiz V, Olives AI, Martín MA. Core-shell particles lead the way to renewing high-performance liquid chromatography. *TrAC Trends Anal Chem [Internet]. Elsevier B.V.;* 2015 Jan [cited 2015 Jan 1];64:17–28. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165993614002143>
21. González-Ruiz V, Olives AI, Martín MA. Challenging core-shell stationary phases with the separation of closely related anti-cancer compounds: performance studies and application to drug quantitation in cell cultures with multi-well plate clean-up. *J Chromatogr A [Internet]. Elsevier B.V.;* 2014 Oct 17 [cited 2015 Jan 1];1364:83–95. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25189334>
22. DeStefano JJ, Schuster SA, Lawhorn JM, Kirkland JJ. Performance characteristics of new superficially porous particles. *J Chromatogr A.* 2012;1258:76–83.
23. Di Nunzio MR, Cohen B, Douhal A. Structural photodynamics of camptothecin, an anticancer drug in aqueous solutions. *J Phys Chem A.* 2011;115:5094–104.
24. Warner DL, Burke TG. Simple and versatile high-performance liquid chromatographic method for the simultaneous quantitation of the lactone and carboxylate forms of camptothecin anticancer drugs. 1997;4347(96).
25. Zufía L, Aldaz A, Castellanos C, Giráldez J. Simple and rapid determination of carboplatin in plasma by high-performance liquid chromatography. Error pattern and application to clinical pharmacokinetic studies. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications.* 2001. p. 457–64.