

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE MEDICINA**



**ESTUDIO DE LA UNION *IN VITRO* DE LA  
PEROXISOMICINA A1-ALBUMINA. COMPETENCIA  
CON OTROS FARMACOS ACIDICOS**

Por

**L.C.Q. Magdalena Martínez Martínez**

Como requisito parcial para obtener el Grado de  
**MAESTRIA EN CIENCIAS** con Especialidad  
en Química Analítica Biomédica

**Enero, 1998**



TM

QP981

.K37

M3

c.1



1080080894

11140

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE MEDICINA

MT  
SEMA  
F.  
EM



ESTUDIO DE LA UNION IN VITRO DE LA  
PEROXISOMICINA A1-ALBUMINA. COMPETENCIA  
CON OTROS FARMACOS ACIDICOS.

Por

L.C.Q. Magdalena Martínez Martínez

L.C.Q. Magdalena Martínez Martínez

Como requisito parcial para obtener el Grado de  
MAESTRIA EN CIENCIAS con Especialidad  
en Química Analítica Biomédica

Enero, 1998  
Enero, 1998

TM  
RM172  
.7  
M3

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA



ESTUDIO DE LA UNION *IN VITRO* DE LA PEROXISOMICINA A1 -  
ALBUMINA. COMPETENCIA CON OTROS FARMACOS ACIDICOS.

Por

L.C.Q. Magdalena Martínez Martínez

Como requisito parcial para obtener el Grado de  
MAESTRIA EN CIENCIAS con Especialidad  
en Química Analítica Biomédica

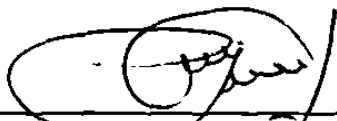
Enero, 1998



(80894)

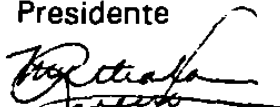
ESTUDIO DE LA UNION *IN VITRO* PEROXISOMICINA A<sub>1</sub> -ALBUMINA.  
COMPETENCIA CON OTROS FARMACOS ACIDICOS

Aprobación de la Tesis:



Dr. med. ALFREDO PIÑEYRO LOPEZ

Presidente



DRA. MYRTHALA MORENO SEPULVEDA

Secretario



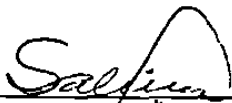
DRA. NOEMI WAKSMAN DE TORRES

1er. Vocal



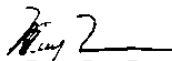
M.C. MA. DE LA LUZ SALAZAR CAVAZOS

2do. Vocal



DR. MARIO CESAR SALINAS CARMONA

3er. Vocal



Dr. med. MA. ESTHELA MORALES PEREZ

Secretario Académico del Area Básica  
Subdirección de Investigación y Estudios de Posgrado

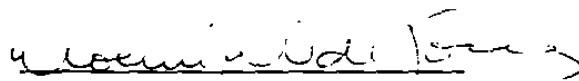


**ESTUDIO DE LA UNION IN VITRO DE LA PEROXISOMICINA A1 - ALBUMINA.  
COMPETENCIA CON OTROS FARMACOS ACIDICOS.**

**Presentado por: L.C.Q. Magdalena Martínez Martínez**

**Este trabajo se realizó en el Departamento de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la asesoría de la Dra. Noemi Waksman de Torres.**

**Asesora**

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Noemi Waksman de Torres', written over a horizontal line.

**Dra. Noemi Waksman de Torres**

## **AGRADECIMIENTOS**

### **A Dios**

Por brindarme, valor, coraje y el amor necesario para salir siempre adelante.

### **A mi esposo**

Por su apoyo, comprensión, cariño pero sobre todo por su paciencia.

### **A mis padres**

Por su ayuda, apoyo, cariño y estímulo en todo momento.

### **A mis hermanos**

Que sin ellos no me hubiera animado a seguir estudiando.

### **A la Dra. Noemi Waksman de Torres**

Por haberme dado la oportunidad de hacer una Maestría. Por haberme brindado apoyo, amistad, tiempo y sobre todo por haberme aportado sus conocimientos.

### **Al Dr. Alfredo Piñeyro López**

Con admiración y respeto por su disponibilidad e invaluable consejos que me ayudaron a la realización de mi tesis en el Depto. de Farmacología y Toxicología.

### **A la Maestra Ma. de la Luz Salazar**

Por su tiempo, consejos, buen oído y sobre todo por su sonrisa.

### **A la Dra. Myrthala Moreno y al Dr. Mario Cesar Salinas**

Por su colaboración y sugerencias en la realización de este trabajo.

**A mis Maestros**

Por sus conocimientos aportados durante la realización de esta Maestría.

**A Gloria Molina y Paula Cordero**

Por escucharme, aguantarme y brindarme siempre su mejor sonrisa.

**A mis compañeros**

Por su apoyo incondicional.

**Al Lic. José Cabriales**

Por su apoyo y amistad desinteresada.





Capítulo	Página
1.3.2.2 Resonancia Magnética Nuclear . . . . .	14
1.4 Peroxisomicina A1 o T514: Potencial Fármaco . . . . .	15
1.5 Competencia Fármaco-Proteína . . . . .	17
 HIPOTESIS . . . . .	 19
OBJETIVO GENERAL . . . . .	19
OBJETIVOS ESPECIFICOS . . . . .	19
 2. MATERIAL Y METODOS . . . . .	 20
2.1 Equipo . . . . .	20
2.2 Preparación de soluciones . . . . .	21
2.2.1 Solución Amortiguadora de Fosfato pH 7.2 . . . . .	21
2.2.2 Solución Patrón de Albúmina . . . . .	21
2.2.2.1 Solución de Trabajo de Albúmina . . . . .	21
2.2.3 Solución Patrón de Peroxisomicina A1 . . . . .	22
2.2.3.1 Solución de Trabajo de Peroxisomicina A1 . . . . .	23
2.2.4 Solución Patrón de Medicamento . . . . .	23
2.2.4.1 Solución de Trabajo de Medicamento . . . . .	24
2.3 Estudio <i>in vitro</i> de las Interacciones de la Peroxisomicina A1 con la Albúmina a pH 7.2 y 25 °C . . . . .	 25
2.3.1 Interacciones entre la Peroxisomicina A1 y los Medicamentos . . . . .	 25
2.3.2 Estudio del Equilibrio de la Unión de la Peroxisomicina A1 con la Albúmina en Ausencia de los Medicamentos . . . . .	 25
2.3.2.1 Determinación de $\Delta Abs_{max}$ a 25 °C y a pH 7.2 de la Peroxisomicina A1 . . . . .	 26

2.3.2.2 Titulación de la Albúmina con Peroxisomicina A1 a 25 °C y a pH 7.2 en Presencia y Ausencia de Medicamento . . . . .	27
2.3.2.3 Determinación de la Concentración de Peroxisomicina A1 <sub>unida</sub> y Peroxisomicina A1 <sub>libre</sub> en Presencia y Ausencia de Medicamento . . . . .	28
2.3.2.4 Determinación del Número Promedio de Moléculas de Peroxisomicina A1 unida a la Albúmina (r) en Presencia y Ausencia de Medicamento . . . . .	28
2.4 Estudio <i>in vitro</i> de las Interacciones de la Warfarina con la Albúmina Libre de Acidos Grasos a pH 7.2 y 25 °C . . . . .	29
2.4.1 Interacciones entre la Warfarina y la Albúmina Libre de Acidos Grasos en Presencia de Peroxisomicina A1 . . . . .	29
2.4.2 Estudios del Equilibrio de la Unión de la Warfarina con la Albúmina Libre de Acidos Grasos . . . . .	30
2.4.2.1 Determinación de $\Delta Abs_{max}$ a 25 °C y a pH 7.2 de la Warfarina . . . . .	30
2.4.2.2 Titulación de la Albúmina Libre de Acidos Grasos con Warfarina a 25 °C y a pH 7.2 en Presencia y Ausencia de Peroxisomicina A1 . . . . .	31
2.4.2.3 Determinación de la Concentración de Warfarina <sub>unida</sub> y Warfarina <sub>libre</sub> . . . . .	32
2.4.2.4 Determinación del Número Promedio de Moléculas de Warfarina unida a la Albúmina Libre de Acidos Grasos (r) . . . . .	32



Capítulo	Página
2.5 Estudio <i>in vitro</i> de las Interacciones de la Indometacina con la Albúmina a pH 7.2 y 25 °C . . . . .	33
2.5.1 Interacciones entre la Indometacina y la Albúmina en Presencia de Peroxisomicina A1 . . . . .	33
2.5.2 Estudios del Equilibrio de la Unión de la Indometacina con la Albúmina . . . . .	33
2.5.2.1 Determinación de $\Delta Abs_{max}$ a 25 °C y a pH 7.2 de la Indometacina . . . . .	34
2.5.2.2 Titulación de la Albúmina con Indometacina a 25 °C y a pH 7.2 en Presencia y Ausencia de Peroxisomicina A1 . . . . .	35
2.5.2.3 Determinación de la Concentración de Indometacina <sub>unida</sub> e Indometacina <sub>libre</sub> . . . . .	36
2.5.2.4 Determinación del Número Promedio de Moléculas de Indometacina unida a la Albúmina ( $r$ ) . . . . .	36
2.6 Estudio <i>in vitro</i> de las Interacciones de la Fenitoína con la Albúmina Libre de Acidos Grasos a pH 7.2 y 25 °C . . . . .	37
2.6.1 Interacciones entre la Fenitoína y la Albúmina Libre de Acidos Grasos en Presencia de Peroxisomicina A1 . . . . .	37
2.6.2 Estudios del Equilibrio de la Unión de la Fenitoína con la Albúmina Libre de Acidos Grasos . . . . .	38
2.6.2.1 Titulación de la Albúmina Libre de Acidos Grasos con Fenitoína a 25 °C y a pH 7.2 en Presencia y Ausencia de Peroxisomicina A1 . . . . .	38

Capítulo	Página
2.6.2.2 Determinación de la Concentración de Fenitoína <sub>unida</sub> y Fenitoína <sub>libre</sub> . . . . .	39
2.6.2.3 Determinación del Número Promedio de Moléculas de Fenitoína unida a la Albúmina Libre de Acidos Grasos (r) . . . . .	40
2.7 Métodos Estadísticos . . . . .	40
3. RESULTADOS . . . . .	41
3.1 Estudio <i>in vitro</i> de las Interacciones de la Peroxisomicina A1 con la Albúmina a pH 7.2 y 25 °C . . . . .	41
3.1.1 Interacciones entre la Peroxisomicina A1 y los Medicamentos . . . . .	41
3.1.2 Estudio del Equilibrio de la Unión de la Peroxisomicina A1 con la Albúmina en Ausencia de los Medicamentos . . . . .	41
3.1.2.1 Determinación de $\Delta Abs_{max}$ a 25 °C y a pH 7.2 de la Peroxisomicina A1 . . . . .	41
3.1.2.2 Determinación de la Concentración de Peroxisomicina A1 <sub>unida</sub> y Peroxisomicina A1 <sub>libre</sub> en Presencia y Ausencia de Medicamento . . . . .	44
3.1.2.3 Determinación del Número Promedio de Moléculas de Peroxisomicina A1 unida a la Albúmina (r) en Presencia y Ausencia de Medicamento . . . . .	44
3.2 Estudio <i>in vitro</i> de las Interacciones de la Warfarina con la Albúmina Libre de Acidos Grasos a pH 7.2 y 25 °C . . . . .	61

Capítulo	Página
3.2.1 Interacciones entre la Warfarina y la Albúmina Libre de Acidos Grasos en Presencia de Peroxisomicina A1 . . . . .	61
3.2.2 Estudios del Equilibrio de la Unión de la Warfarina con la Albúmina Libre de Acidos Grasos . . . . .	61
3.2.2.1 Determinación de $\Delta$ Absmax a 25 °C y a pH 7.2 de la Warfarina . . . . .	61
3.2.2.2 Determinación de la Concentración de Warfarina <sub>unida</sub> y Warfarina <sub>libre</sub> en Presencia y Ausencia de Peroxisomicina A1. . . . .	64
3.2.2.3 Determinación del Número Promedio de Moléculas de Warfarina unida a la Albúmina Libre de Acidos Grasos ( $r$ ) en Presencia y Ausencia de Peroxisomicina A1 . . . . .	64
3.3 Estudio <i>in vitro</i> de las Interacciones de la Indometacina con la Albúmina a pH 7.2 y 25 °C . . . . .	70
3.3.1 Interacciones entre la Indometacina y la Albúmina en Presencia de Peroxisomicina A1 . . . . .	70
3.3.2 Estudios del Equilibrio de la Unión de la Indometacina con la Albúmina . . . . .	71
3.3.2.1 Determinación de $\Delta$ Absmax a 25 °C y a pH 7.2 de la Indometacina . . . . .	71
3.3.2.2 Determinación de la Concentración de Indometacina <sub>unida</sub> e Indometacina <sub>libre</sub> en Presencia y Ausencia de Peroxisomicina A1 . . . . .	73
3.3.2.3 Determinación del Número Promedio de Moléculas de Indometacina unida a la Albúmina ( $r$ ) en Presencia y Ausencia de Peroxisomicina A1 . . . . .	74



Capítulo	Página
3.4 Estudio <i>in vitro</i> de las Interacciones de la Fenitoína con la Albúmina Libre de Acidos Grasos a pH 7.2 y 25 °C . . . . .	78
3.4.1 Interacciones entre la Fenitoína y la Albúmina Libre de Acidos Grasos en Presencia de Peroxisomicina A1 . . . . .	78
3.4.2 Estudios del Equilibrio de la Unión de la Fenitoína con la Albúmina Libre de Acidos Grasos . . . . .	80
3.4.2.1 Determinación de la Concentración de Fenitoína <sub>unida</sub> y Fenitoína <sub>libre</sub> en Presencia y Ausencia de Peroxisomicina A1 . . . . .	80
3.4.2.2 Determinación del Número Promedio de Moléculas de Fenitoína unida a la Albúmina Libre de Acidos Grasos ( $\bar{r}$ ) en Presencia y Ausencia de Peroxisomicina A1 . . . . .	82
4. DISCUSION . . . . .	87
5. CONCLUSIONES . . . . .	92
BIBLIOGRAFIA . . . . .	93

## LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1.	Composición Aminoacídica de la Albúmina . . . . .	2
2.	Parámetros de Unión de T514 a ASB: pH 7.2 . . . . .	17
3.	Clasificación de los Tipos de Unión de los Medicamentos acídicos a la Albúmina . . . . .	18
4.	Soluciones Estándares de Albúmina . . . . .	22
5.	Soluciones Estándares de Peroxisomicina A1 . . . . .	23
6.	Soluciones Estándares de Medicamento . . . . .	24
7.	$\Delta$ Abs para Sistema Peroxisomicina A1 - Albúmina: pH 7.2 y 25 °C . . . . .	43
8.	Titulación de Albúmina (10 $\mu$ M) con Peroxisomicina A1 en Ausencia de Medicamento . . . . .	45
9.	Titulación de Albúmina (10 $\mu$ M) con Peroxisomicina A1 en Presencia de Warfarina 20 $\mu$ M . . . . .	45
10.	Titulación de Albúmina (10 $\mu$ M) con Peroxisomicina A1 en Presencia de Warfarina 35 $\mu$ M . . . . .	46
11.	Titulación de Albúmina (10 $\mu$ M) con Peroxisomicina A1 en Presencia de Warfarina 50 $\mu$ M . . . . .	46
12.	Titulación de Albúmina (10 $\mu$ M) con Peroxisomicina A1 en Presencia de Warfarina 60 $\mu$ M . . . . .	47

Tabla	Página
13. Titulación de Albúmina (10 $\mu\text{M}$ ) con Peroxisomicina A1 en Presencia de Fenitoína 20 $\mu\text{M}$ . . . . .	47
14. Titulación de Albúmina (10 $\mu\text{M}$ ) con Peroxisomicina A1 en Presencia de Fenitoína 50 $\mu\text{M}$ . . . . .	48
15. Titulación de Albúmina (10 $\mu\text{M}$ ) con Peroxisomicina A1 en Presencia de Indometacina 20 $\mu\text{M}$ . . . . .	48
16. Titulación de Albúmina (10 $\mu\text{M}$ ) con Peroxisomicina A1 en Presencia de Indometacina 50 $\mu\text{M}$ . . . . .	49
17. Titulación de Albúmina Libre de Acidos Grasos (10 $\mu\text{M}$ ) con Peroxisomicina A1 en Presencia de Warfarina 20 $\mu\text{M}$ . . . . .	49
18. Parámetros de Unión de Peroxisomicina A1 - Albúmina en Presencia y Ausencia de Medicamento: pH 7.2 y 25 °C . . . . .	60
19. $\Delta\text{Abs}$ para Sistema Warfarina - Albúmina Libre de Acidos Grasos: pH 7.2 y 25 °C . . . . .	63
20. Titulación de Albúmina Libre de Acidos Grasos (10 $\mu\text{M}$ ) con Warfarina en Ausencia de Peroxisomicina A1 . . . . .	65
21. Titulación de Albúmina Libre de Acidos Grasos (10 $\mu\text{M}$ ) con Warfarina en Presencia de Peroxisomicina A1 20 $\mu\text{M}$ . . . . .	65
22. Titulación de Albúmina Libre de Acidos Grasos (10 $\mu\text{M}$ ) con Warfarina en Presencia de Peroxisomicina A1 40 $\mu\text{M}$ . . . . .	66
23. Parámetros de Unión de Warfarina - Albúmina libre de ácidos grasos en Presencia y Ausencia de Peroxisomicina A1: pH 7.2 y 25 °C . . . . .	70
24. $\Delta\text{Abs}$ para Sistema Indometacina - Albúmina: pH 7.2 y 25 °C . . . . .	71

Tabla	Página
25. Titulación de Albúmina (10 $\mu$ M) con Indometacina en Ausencia de Peroxisomicina A1 . . . . .	74
26. Titulación de Albúmina (10 $\mu$ M) con Indometacina en Presencia de Peroxisomicina A1 40 $\mu$ M . . . . .	75
27. Parámetros de Unión de Indometacina - Albúmina en Presencia y Ausencia de Peroxisomicina A1: pH 7.2 y 25 °C . . . . .	78
28. Longitudes de onda de excitación y emisión para Fenitoína y Albúmina Libre de Acidos Grasos . . . . .	80
29. Titulación de Albúmina Libre de Acidos Grasos (10 $\mu$ M) con Fenitoína en Ausencia de Peroxisomicina A1 . . . . .	83
30. Titulación de Albúmina Libre de Acidos Grasos (10 $\mu$ M) con Fenitoína en Presencia de Peroxisomicina A1 40 $\mu$ M . . . . .	83
31. Parámetros de Unión de Fenitoína - Albúmina libre de ácidos grasos en Presencia y Ausencia de Peroxisomicina A1: pH 7.2 y 25 °C . . . . .	86

## LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Gráfica de Scatchard . . . . .	5
2. Espectros de Absorción de Orden Cero y Derivados de Primero y Segundo Orden . . . . .	11
3. Aplicación de la Técnica del Cruce al Cero . . . . .	12
4. Espectro de Absorción de Peroxisomicina A1 en Presencia y Ausencia de Warfarina . . . . .	42
5. Espectro de Absorción de Peroxisomicina A1 en Presencia y Ausencia de Fenitoína . . . . .	42
6. Espectro de Absorción de Peroxisomicina A1 en Presencia y Ausencia de Indometacina . . . . .	42
7. Estimación del $\Delta$ Absmax Peroxisomicina A1 - Albúmina : pH 7.2 y 25 °C . . . . .	43
8a. Gráfica de Scatchard de la Unión Peroxisomicina A1 - Albúmina en Ausencia de Medicamento . . . . .	50
8b. Gráfica de Scatchard de la Unión Peroxisomicina A1 - Albúmina en Ausencia de Medicamento en N1 . . . . .	50
8c. Gráfica de Scatchard de la Unión Peroxisomicina A1 - Albúmina en Ausencia de Medicamento en N2 . . . . .	50

Figura	Página
9a. Gráfica de Scatchard de la Unión Peroxisomicina A1 - Albúmina en Presencia de Warfarina 20 $\mu\text{M}$ . . . . .	51
9b. Gráfica de Scatchard de la Unión Peroxisomicina A1 - Albúmina en Presencia de Warfarina 20 $\mu\text{M}$ en N1 . . . . .	51
9c. Gráfica de Scatchard de la Unión Peroxisomicina A1 - Albúmina en Presencia de Warfarina 20 $\mu\text{M}$ en N2 . . . . .	51
10a. Gráfica de Scatchard de la Unión Peroxisomicina A1 - Albúmina en Presencia de Warfarina 35 $\mu\text{M}$ . . . . .	52
10b. Gráfica de Scatchard de la Unión Peroxisomicina A1 - Albúmina en Presencia de Warfarina 35 $\mu\text{M}$ en N1 . . . . .	52
10c. Gráfica de Scatchard de la Unión Peroxisomicina A1 - Albúmina en Presencia de Warfarina 35 $\mu\text{M}$ en N2 . . . . .	52
11a. Gráfica de Scatchard de la Unión Peroxisomicina A1 - Albúmina en Presencia de Warfarina 50 $\mu\text{M}$ . . . . .	53
11b. Gráfica de Scatchard de la Unión Peroxisomicina A1 - Albúmina en Presencia de Warfarina 50 $\mu\text{M}$ en N1 . . . . .	53
11c. Gráfica de Scatchard de la Unión Peroxisomicina A1 - Albúmina en Presencia de Warfarina 50 $\mu\text{M}$ en N2 . . . . .	53
12a. Gráfica de Scatchard de la Unión Peroxisomicina A1 - Albúmina en Presencia de Warfarina 60 $\mu\text{M}$ . . . . .	54
12b. Gráfica de Scatchard de la Unión Peroxisomicina A1 - Albúmina en Presencia de Warfarina 60 $\mu\text{M}$ en N1 . . . . .	54
12c. Gráfica de Scatchard de la Unión Peroxisomicina A1 - Albúmina en Presencia de Warfarina 60 $\mu\text{M}$ en N2 . . . . .	54

Figura	Página
13a. Gráfica de Scatchard de la Unión Peroxisomicina A1 - Albúmina en Presencia de Fenitoína 20 $\mu\text{M}$ . . . . .	55
13b. Gráfica de Scatchard de la Unión Peroxisomicina A1 - Albúmina en Presencia de Fenitoína 20 $\mu\text{M}$ en N1 . . . . .	55
13c. Gráfica de Scatchard de la Unión Peroxisomicina A1 - Albúmina en Presencia de Fenitoína 20 $\mu\text{M}$ en N2 . . . . .	55
14a. Gráfica de Scatchard de la Unión Peroxisomicina A1 - Albúmina en Presencia de Fenitoína 50 $\mu\text{M}$ . . . . .	56
14b. Gráfica de Scatchard de la Unión Peroxisomicina A1 - Albúmina en Presencia de Fenitoína 50 $\mu\text{M}$ en N1 . . . . .	56
14c. Gráfica de Scatchard de la Unión Peroxisomicina A1 - Albúmina en Presencia de Fenitoína 50 $\mu\text{M}$ en N2 . . . . .	56
15a. Gráfica de Scatchard de la Unión Peroxisomicina A1 - Albúmina en Presencia de Indometacina 20 $\mu\text{M}$ . . . . .	57
15b. Gráfica de Scatchard de la Unión Peroxisomicina A1 - Albúmina en Presencia de Indometacina 20 $\mu\text{M}$ en N1 . . . . .	57
15c. Gráfica de Scatchard de la Unión Peroxisomicina A1 - Albúmina en Presencia de Indometacina 20 $\mu\text{M}$ en N2 . . . . .	57
16a. Gráfica de Scatchard de la Unión Peroxisomicina A1 - Albúmina en Presencia de Indometacina 50 $\mu\text{M}$ . . . . .	58
16b. Gráfica de Scatchard de la Unión Peroxisomicina A1 - Albúmina en Presencia de Indometacina 50 $\mu\text{M}$ en N1 . . . . .	58
16c. Gráfica de Scatchard de la Unión Peroxisomicina A1 - Albúmina en Presencia de Indometacina 50 $\mu\text{M}$ en N2 . . . . .	58



Figura	Página
17a. Gráfica de Scatchard de la Unión Peroxisomicina A1 - Albúmina libre de ácidos grasos en Presencia de Warfarina 20 $\mu$ M . . . . .	59
17b. Gráfica de Scatchard de la Unión Peroxisomicina A1 - Albúmina libre de ácidos grasos en Presencia de Warfarina 20 $\mu$ M en N1 . . . . .	59
17c. Gráfica de Scatchard de la Unión Peroxisomicina A1 - Albúmina libre de ácidos grasos en Presencia de Warfarina 20 $\mu$ M en N2 . . . . .	59
18. Espectro de Absorbancia de Warfarina, Albúmina Libre de Acidos Grasos y Peroxisomicina A1 . . . . .	62
19. Espectro Derivado de Warfarina, Albúmina Libre de Acidos Grasos y Peroxisomicina A1 . . . . .	62
20. Estimación del $\Delta$ Absmax Warfarina - Albúmina Libre de Acidos Grasos: pH 7.2 y 25 °C . . . . .	63
21a. Gráfica de Scatchard de la Unión Warfarina - Albúmina Libre de Acidos Grasos en Ausencia de Peroxisomicina A1 . . . . .	67
21b. Gráfica de Scatchard de la Unión Warfarina - Albúmina en Ausencia de Peroxisomicina A1 en N1 . . . . .	67
21c. Gráfica de Scatchard de la Unión Warfarina - Albúmina en Ausencia de Peroxisomicina A1 en N2 . . . . .	67
22a. Gráfica de Scatchard de la Unión Warfarina - Albúmina libre de ácidos grasos en Presencia de Peroxisomicina A1 20 $\mu$ M . . . . .	68
22b. Gráfica de Scatchard de la Unión Warfarina - Albúmina en Presencia de Peroxisomicina A1 20 $\mu$ M en N1 . . . . .	68
22c. Gráfica de Scatchard de la Unión Warfarina - Albúmina en Presencia de Peroxisomicina A1 20 $\mu$ M en N2 . . . . .	68

Figura	Página
23a. Gráfica de Scatchard de la Unión Warfarina - Albúmina Libre de Acidos Grasos en Presencia de Peroxisomicina A1 40 $\mu$ M . . .	69
23b. Gráfica de Scatchard de la Unión Warfarina - Albúmina en Presencia de Peroxisomicina A1 40 $\mu$ M en N1 . . . .	69
23c. Gráfica de Scatchard de la Unión Warfarina - Albúmina en Presencia de Peroxisomicina A1 40 $\mu$ M en N2 . . . .	69
24. Espectro de Absorbanci3n de Indometacina, Albúmina y Peroxisomicina A1 . . . . .	72
25. Espectro Derivado de Indometacina, Albúmina y Peroxisomicina A1 . . . . .	72
26. Estimaci3n del $\Delta$ Absmax Indometacina - Albúmina: pH 7.2 y 25 $^{\circ}$ C . . . . .	73
27a. Gráfica de Scatchard de la Uni3n Indometacina - Albúmina en Ausencia de Peroxisomicina A1 . . . . .	76
27b. Gráfica de Scatchard de la Uni3n Indometacina - Albúmina en Ausencia de Peroxisomcina A1 en N1 . . . . .	76
27c. Gráfica de Scatchard de la Uni3n Indometacina - Albúmina en Ausencia de Peroxisomcina A1 en N2 . . . . .	76
28a. Gráfica de Scatchard de la Uni3n Indometacina - Albúmina en Presencia de Peroxisomicina A1 40 $\mu$ M . . . . .	77
28b. Gráfica de Scatchard de la Uni3n Indometacina - Albúmina en Presencia de Peroxisomcina A1 40 $\mu$ M en N1 . . . . .	77
28c. Gráfica de Scatchard de la Uni3n Indometacina - Albúmina en Presencia de Peroxisomcina A1 40 $\mu$ m en N2 . . . . .	77

Figura	Página
29. Espectro de Absorbación de Fenitoína, Albúmina Libre de Acidos Grasos y Peroxisomicina A1 . . . . .	79
30. Espectro Derivado de Fenitoína, Albúmina Libre de Acidos Grasos y Peroxisomicina A1 . . . . .	79
31. Cromatograma de Fenitoína. Columna: ODS hypersil 100 x 2.1 con Diámetro de Partícula de 5 micras. Eluente: Amortiguador de fosfato : Acetonitrilo 70:30 Isocrático . . . . .	81
32. Curva de Calibración de Fenitoína por CLAR Fase Reversa. Eluente Amortiguador de Fosfato : Acetonitrilo 70:30, Isocrático . . . . .	81
33a. Gráfica de Scatchard de la Unión Fenitoína - Albúmina Libre de Acidos Grasos en Ausencia de Peroxisomicina A1 . . . . .	84
33b. Gráfica de Scatchard de la Unión Fenitoína - Albúmina en Ausencia de Peroxisomicina A1 en N1 . . . . .	84
33c. Gráfica de Scatchard de la Unión Fenitoína - Albúmina en Ausencia de Peroxisomicina A1 en N2 . . . . .	84
34a. Gráfica de Scatchard de la Unión Fenitoína - Albúmina Libre de Acidos Grasos en Presencia de Peroxisomicina A1 40 $\mu$ M . . . . .	85
34b. Gráfica de Scatchard de la Unión Fenitoína - Albúmina en Presencia de Peroxisomicina A1 40 $\mu$ M en N1 . . . . .	85
34c. Gráfica de Scatchard de la Unión Fenitoína - Albúmina en Presencia de Peroxisomicina A1 40 $\mu$ M en N2 . . . . .	85

## NOMENCLATURA

$\alpha$	Absorbancia producida por la unión de 1 $\mu\text{M}$ de Peroxisomicina A1
A	Absorbancia
Abs	Absorbancia
Abs <sub>0</sub>	Lectura de absorbancia al tiempo cero
Abs <sub>20</sub>	Lectura de absorbancia a los veinte minutos después de la primera lectura
Abs <sub>50</sub>	Lectura de absorbancia a los cincuenta segundos después de la primera lectura
$\Delta\text{Abs}$	Cambio de absorbancia
$\Delta\text{Abs}_{\text{max}}$	Cambio de absorbancia máximo
$1/\Delta\text{Abs}$	Valor inverso de cambio de absorbancia
albúmina*	Albúmina libre de ácidos grasos
Ap1	Absorbancia de disolución patrón 1
Ap2	Absorbancia de disolución patrón 2
ASB	Albúmina Sérica Bovina
ASH	Albúmina Sérica Humana
$A_{1\lambda}$	Absorbancia de la mezcla a la longitud de onda 1
[A]	Concentración de ligando libre
b	Trayecto óptico
b <sub>o</sub>	Correlación de absorbancia
b <sub>k</sub>	Valor de concentración de cada uno de los componentes

[ ]	Concentración
C1	Concentración de analito 1
C2	Concentración de analito 2
CLAR	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución
cols	Colaboradores
Cp	Concentración del patrón
°C	Centígrados
(+)	Cargado positivamente
(-)	Cargado negativamente
$dA / d\lambda$	Primera derivada de la longitud de onda en función de la absorbancia
$dA^2 / d\lambda^2$	Segunda derivada de la longitud de onda en función de la absorbancia
D	Amplitud
$e_j$	Error de ajuste
$\epsilon_1$	Absortividad molar componente 1
$\epsilon_2$	Absortividad molar componente 2
$\epsilon_{1\lambda}$	Absortividad molar a la longitud de onda 1
$\epsilon_{2\lambda}$	Absortividad molar a la longitud de onda 2
[Fen]	Concentración de Fenitoína
$\theta$	Fracción de sitios ligados
[Ind]	Concentración de Indometacina
ISRP	Internal surface reverse phase
$\lambda$	Longitud de onda
k1	Constante de velocidad 1

RMN	Resonancia Magnética Nuclear
T514	Peroxisomicina A1
u.a.	Unidades arbitrarias
UV-VIS	Ultravioleta - Visible
[Warf]	Concentración de Warfarina
$x_{ij}$	Valores de absorptividad de los diferentes componentes a las diferentes longitudes de onda
$y_j$	Absorbancia de la mezcla a distintas longitudes de onda

Universidad Autónoma de Nuevo León  
Facultad de Medicina

Título del Estudio:

ESTUDIO DE LA UNION *IN VITRO* DE LA  
PEROXISOMICINA A1 - ALBUMINA.  
COMPETENCIA CON OTROS  
FARMACOS ACIDICOS.

Número de páginas: 95

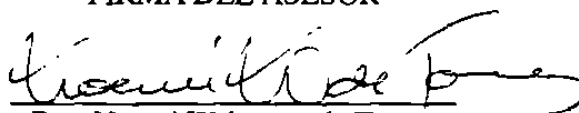
Candidato para el Grado de Maestría  
en Ciencias con Especialidad en  
Química Analítica Biomédica.

Area de Estudio: Química Analítica

**Propósito y Método del Estudio:** Estudios recientes han demostrado que la Peroxisomicina A1, ácido débil ( $pK$  7.27), extraído de plantas del género *Karwiskia*, interacciona fuertemente con la ASB y ASH tanto a un pH de 7.2 como a un pH de 7.4. Debido a esto se pensó que la Peroxisomicina A1 compite con otros fármacos ácidos por los mismos sitios de unión en la Albúmina. Por lo que el objetivo de este trabajo fue establecer si hay competencia entre la Peroxisomicina A1 por los sitios de unión en la Albúmina a pH 7.2 con tres fármacos ácidos que se usan como modelos según Scheler, como lo son la Warfarina que pertenece al modelo tipo I, la Indometacina que pertenece al modelo tipo II y la Fenitoína que pertenece al modelo tipo III. Se tituló la Albúmina con Peroxisomicina A1, después se tituló la Peroxisomicina A1 con Albúmina en presencia y ausencia de medicamento (Warfarina, Indometacina y Fenitoína), siguiendo la señal analítica de la Peroxisomicina A1. Se tituló la Albúmina con medicamento (Warfarina e Indometacina), después se tituló el medicamento con Albúmina en presencia y ausencia de Peroxisomicina A1 y se siguió la señal analítica de cada medicamento utilizando la Espectroscopía de Derivadas. Para el caso de la Fenitoína se tituló ésta con Albúmina en presencia y ausencia de Peroxisomicina A1 y se analizaron las muestras por CLAR. Se utilizaron gráficas de Scatchard para cada experimento (Peroxisomicina A1, Warfarina, Indometacina y Fenitoína), las cuales se obtuvieron al graficar  $r$  en función de  $r/[medicamento]_{libre}$ , lo que da una curva con dos tendencias lineales, de las cuales podemos obtener de la pendiente de cada recta  $K$  (constante de afinidad) y del intercepto en  $x$ ,  $N$  (número de sitios de unión), para cada una de las curvas.

**Contribuciones y Conclusiones:** En base a los resultados obtenidos se concluyó que no hay competencia entre la Warfarina, Indometacia y Fenitoína con la Peroxisomicina A1 por los sitios de unión en la Albúmina, además que en el caso de la Warfarina se observó un aumento en el grado de interacción con la Albúmina en presencia de Peroxisomicina A1. Tal y como se reporta en la literatura la Warfarina y Fenitoína no se unen a la Albúmina en presencia de ácidos grasos, sin embargo la Peroxisomicina A1 no compite con los ácidos grasos por los sitios de unión en la Albúmina.

FIRMA DEL ASESOR



Dra. Noemi Waksman de Torres



## CAPITULO 1

### INTRODUCCION

Los medicamentos son transportados por el torrente sanguíneo desde su sitio de absorción a su sitio de acción. La mayoría de los medicamentos son solubles en el plasma; muchos otros se asocian parcialmente a componentes de la sangre tales como: albúmina, globulinas, lipoproteínas y eritrocitos. De esta manera los medicamentos tienen acceso a los mismos sitios a los que tiene el componente sanguíneo. Sólo la fracción libre de medicamento difunde a través de la pared capilar y la membrana celular, alcanzando así su sitio de acción. La unión de medicamento a proteína puede aumentar la solubilidad en el plasma <sup>(1)</sup>.

La albúmina es la macromolécula cuantitativamente más importante de las proteínas plasmáticas, y frecuentemente es a la que se le une la mayor parte del medicamento. Como la unión de medicamento a la albúmina es fácilmente reversible obedeciendo la Ley de Acción de Masas, los complejos medicamento - proteína sirven como reservorio circulante de medicamento libre, para así ser biotransformado o excretados; de este modo, la unión de albúmina decrece la máxima intensidad, pero incrementa la duración de acción de muchos medicamentos <sup>(1)</sup>.

#### 1.1 Unión Fármaco - Proteína

La albúmina tiene una carga neta negativa al pH del suero, sin embargo, puede interactuar tanto con las cargas positivas como negativas de los medicamentos. Teóricamente, todos los sitios cargados en la albúmina pueden funcionar como sitios de unión para medicamentos con la carga apropiada; muchas cargas están escondidas dentro

de la estructura tridimensional de la albúmina. La composición aminoacídica de la albúmina se muestra en la tabla 1.

Tabla 1  
Composición Aminoacídica de la Albúmina <sup>(2)</sup>.

(+)	(-)	neutro polar	neutro no polar
His (230)	Asp (780)	Ser (350)	Gly (210)
Lis (840)	Glu (118)	Thr (420)	Met ( 86)
Arg (350)		Tyr (260)	Ile (130)
			Leu (910)
			Ala (920)
			Val (660)
			Cys (520)
			Phe (470)
			Trp ( 40)

El lado amino y básico de estos aminoácidos ofrecen la posibilidad de formar enlaces iónicos con moléculas de medicamento. Por ejemplo: los grupos  $\epsilon$ -amino de los residuos de lisina se encuentran ionizados al pH del plasma y por lo tanto pueden involucrar la unión de medicamentos ácidos, los cuales se unen fuertemente a la albúmina y con alta afinidad, a través de enlaces salinos (con grupos  $-\text{COO}^-$  y  $\text{NH}_2$  libres), puentes de hidrógeno, fenómenos de adsorción, uniones hidrofóbicas, uniones de Van der Waal. De éstas, las uniones hidrofóbicas a la albúmina son las más importantes porque los complejos albúmina - fármaco son pocos solubles en agua <sup>(3, 4)</sup>.

La presencia de un grupo ionizable eleva aparentemente la afinidad del medicamento por la proteína, por lo tanto la naturaleza de esos como la posición de los sustituyentes pueden influir sobre las características de dicha asociación. La presencia de cadenas alquílicas no polares y sustituyentes como alcoholes, ácidos o sulfatos de cadena

lineal, pueden incrementar dicha interacción. Este tipo de incremento parece deberse a una interacción entre porciones lipofílicas de la proteína y del medicamento. De modo similar, los electrones del anillo aromático pueden contribuir a esta clase de asociación lipofílica<sup>(5)</sup>.

## 1.2 Afinidad del Complejo Fármaco - Proteína.

La afinidad entre un medicamento y sus sitios de unión en una macromolécula son expresados como una constante de equilibrio que establece la relación de concentración de medicamento en forma unida entre el producto de las concentraciones de medicamento no unido y proteína.

$$K_a = \frac{k_1}{k_2} = \frac{[\text{complejo medicamento-proteína}]}{[\text{medicamento no unido}] [\text{proteína}]} \quad (1)$$

A su vez  $k_1$  y  $k_2$  son las constantes de velocidad de reacción de asociación y disociación respectivamente.  $K_a$  nos da el grado de afinidad del medicamento. La afinidad es frecuentemente expresada en términos de constantes de disociación  $K_d$ , la cual es dada por la relación  $k_2/k_1$ , es decir, es inversamente proporcional a la afinidad. La constante de disociación iguala el valor de la concentración del medicamento libre, cuando el 50% de los sitios de unión correspondientes en la proteína están saturados.

A altas concentraciones de medicamento, la mayoría de los sitios de unión en la molécula de proteína están saturados. Cuando un medicamento se une con distinta afinidad en los diferentes sitios de la molécula de proteína, se involucran varios equilibrios. Cada uno de estos se caracteriza por una constante de disociación. La capacidad máxima de la unión de la proteína para un medicamento dado es igual a la concentración molar de la proteína multiplicada por el número de sitios de unión para el medicamento.

Para la mayoría de los medicamentos sólo hay uno o dos sitios de unión primarios en la molécula de albúmina; existen sitios secundarios pero son menos específicos.

El número promedio de moléculas de medicamento ligadas a proteína (  $r$  ) está dado por la relación de la concentración de medicamento unido entre la concentración de proteína <sup>(11)</sup>.

$$r = \frac{[\text{medicamento}]_{\text{unido}}}{[\text{proteína}]} \quad (2)$$

El número de moléculas de medicamento ligadas depende de la constante de equilibrio de la unión, del número de sitios de unión, de la concentración de macromolécula y de la concentración del medicamento. Además la temperatura, pH y fuerza iónica pueden afectar el número de sitios de unión y su constante de afinidad *in vitro*. Cuando hay un sólo tipo de sitio de unión,  $r$  varía desde 0 hasta 1 y es igual a  $\theta$  (fracción de sitios ligados). Si hay  $N$  sitios de unión, la fracción de sitios ligados está dado por la siguiente ecuación:

$$\theta = \frac{r}{N} \quad (3)$$

Si los sitios de unión de la proteína son idénticos e independientes, la expresión para  $\theta$  en el equilibrio no depende de los sitios por macromolécula.

El enlace reversible de un ligando a una macromolécula ha sido analizado por varios autores de acuerdo a la "Teoría de Equilibrio Múltiple", que da la siguiente ecuación:

$$R = \sum_{i=0}^m \frac{n_i K_i [A]}{1 + K_i [A]} \quad (4)$$

donde  $R$  representa el número de moles de ligando enlazado por mol de macromolécula,  $m$  representa el número de clase de sitios de unión independientes de tal manera que cada clase  $i$  tiene  $n_i$  sitios de unión con afinidad de unión  $K_i$ , y  $[A]$  es la concentración de ligando libre. Esta expresión muestra que  $R$  es independiente de la concentración de la macromolécula. Los parámetros  $n_i$  y  $K_i$  se obtienen graficando  $R/[A]$  vs  $R$  según Scatchard (ver Figura 1). Este gráfico debería dar una línea recta con pendiente  $-K_i$ , el intercepto en el eje de las  $y$  es  $n_i K_i$  y el intercepto en el eje de las  $x$  es  $n_i$  (ver Figura 1).

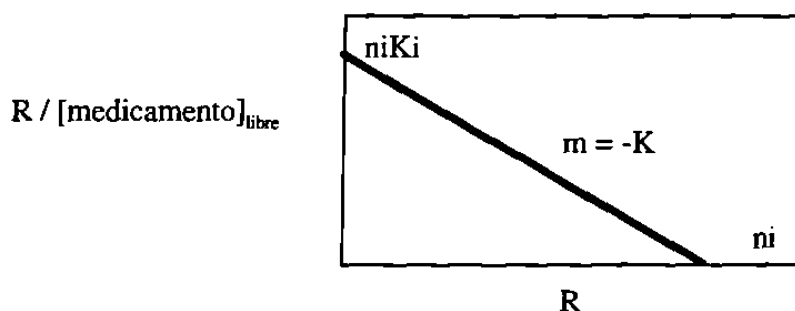


Figura1. Gráfica de Scatchard

Si el gráfico no diera una línea recta indica que los sitios de unión no son idénticos o no son independientes <sup>(7)</sup>.

### 1.3 Técnicas de Determinación Unión Fármaco - Proteína

Con pocas excepciones, la interacción específica de macromoléculas con ligando involucra un paso de unión como parte del primer evento. La primera etapa en la caracterización de tales interacciones requieren la cuantificación de:

- a) la estequiometría de la unión
- b) la estequiometría de la afinidad por el ligando.

La unión de medicamento a la albúmina se ha estudiado *in vitro* por las técnicas de diálisis, ultrafiltración, cromatografía o por métodos espectroscópicos. Estas técnicas han dado resultados similares pero no siempre idénticos. Estos estudios deben establecer no sólo la extensión de la unión sino además el número de sitios de unión y sus afinidades por él <sup>(3)</sup>.

### 1.3.1 Análisis Indirecto (Separación Previa al Análisis)

#### 1.3.1.1 Diálisis

La técnica de diálisis consiste en colocar el medicamento y la macromolécula en una cámara de diálisis con membranas semipermeables que lo separa de otra cámara sin proteína. Sólo el medicamento libre atraviesa la membrana y luego de establecerse el equilibrio, se determina la concentración del medicamento en la cámara libre de proteína. Las desventajas de esta técnica son que se lleva mucho tiempo alcanzar las condiciones de equilibrio, lo cual puede resultar en la denaturalización de la proteína y el equilibrio se alcanza en condiciones estáticas, las cuales son distintas a las condiciones naturales encontradas en el organismo <sup>(6)</sup>.

#### 1.3.1.2 Ultrafiltración

La técnica consiste en colocar una mezcla de titulación de proteína con el medicamento en una cámara de ultrafiltración con una membrana adecuada, a la cual se le

aplica presión alta y obliga a las moléculas de medicamento libre a difundir a través de la membrana; después de establecerse el equilibrio se determina la concentración de medicamento libre.

Las desventajas de esta técnica son el efecto osmótico y la posible unión a la membrana utilizada <sup>(6)</sup>.

### 1.3.1.3 Cromatografía

Esta técnica utiliza la Cromatografía de Líquidos en sus diferentes modalidades, se reportan en la bibliografía para este fin el uso de:

#### 1.3.1.3.1 Columna de Exclusión Molecular (Análisis Frontal)

Se agrega una mezcla ligando - proteína continuamente a una columna de exclusión molecular para alcanzar un estado de equilibrio y luego se hace una elución con buffer. Se obtiene un cromatograma con 3 zonas: la primera corresponde a la proteína libre, la segunda a ligando - proteína y la tercera al ligando libre <sup>(7)</sup>.

#### 1.3.1.3.2 Columna de Exclusion Molecular (Hummel y Dreyer)

Se basa en el equilibrio de una columna de exclusión molecular con una solución del ligando. Se le inyecta la proteína en pequeñas proporciones y se hace una elución con la solución del ligando usada para equilibrar la columna. En el tiempo de retención de la proteína se observa un pico que pertenece al complejo ligando - proteína, seguido de un



pico negativo en el tiempo de retención del ligando que representa la cantidad de ligando unido a la proteína <sup>(7)</sup>.

#### 1.3.1.3.3 Columna de Fase Reversa

Se mezcla una solución de ligando con una solución de buffer conteniendo la proteína, se incuba la muestra, se filtra a través de una membrana de ultrafiltración y la concentración de fármaco libre se determina por CLAR fase reversa <sup>(21)</sup>.

#### 1.3.1.3.4 Columna de Fase Reversa con Superficie Interna

Involucra un método de inyección directa para el análisis de drogas en fluidos biológicos. El diámetro del soporte de sílica ISRP (Internal surface reverse phase) es lo suficientemente pequeña para excluir macromoléculas de sus poros <sup>(22)</sup>.

#### 1.3.1.3.5 Columna de Fase Quiral Derivada de ASH

Método implementado por Noctor T, es la correlación entre el grado de unión del medicamento a la proteína con su tiempo de retención en esta columna. Se encontró que las cumarinas y benzodiazepinas dan una buena correlación, por lo tanto se podría utilizar con otros medicamentos <sup>(8)</sup>.

### 1.3.2 Análisis Directo

Técnicas analíticas en donde no se requiere una separación previa al análisis, sino que las propiedades ópticas del complejo proteína - medicamento difieran del medicamento libre y de la proteína libre <sup>(9)</sup>.

#### 1.3.2.1 Espectroscopía Ultravioleta-Visible y Fluorescencia

La espectroscopía de absorción es útil para el análisis cuantitativo, tiene alta sensibilidad, selectividad moderada a alta, buena precisión.

Los métodos fluorométricos se aplican para concentraciones más bajas y son más sensibles y específicos que los espectrofotométricos.

Cuando se determina la absorción (o fluorescencia) de la proteína, se observa el efecto de agregar varias concentraciones del medicamento y se debe observar una respuesta lineal al graficar el logaritmo de la absorbancia (o fluorescencia) contra el logaritmo de la concentración. Cualquier desviación indica que hay reacciones laterales como descomposición, autodegradación, etc.

Estos métodos proveen información útil para el estudio de complejo proteína - medicamento como:

- a.- cantidad de medicamento unido y libre en un sistema determinado.
- b.- información limitada de la naturaleza de los sitios de unión, polaridad, pK de los grupos ionizables, residuos vecinos, etc.
- c.- cinética de formación o ruptura de complejos
- d.- cambios estructurales en la proteína seguidos de la unión.

Otra ventaja es que los resultados son instantáneos a diferencia de la diálisis y ultrafiltración.

#### 1.3.2.1.1 Espectroscopía de Derivadas

Dentro de los métodos espectroscópicos si el espectro de orden cero no da una buena respuesta se puede recurrir a la Espectroscopía de Derivadas. Esta técnica es de gran utilidad para extraer información cualitativa y cuantitativa de un espectro compuesto de bandas no resueltas; se emplea para aumentar la estructura fina de las curvas espectrales. Consiste en calcular la primera, segunda o derivadas de orden superior, de la intensidad o absorbancia respecto a la longitud de onda. Se utiliza en aquellos casos en que el tratamiento cuantitativo de los espectros de orden cero son difíciles e incluso imposibles, así como para la detección y localización de características espectrales de componentes mal resueltos de espectros complejos y para la reducción de interferencias debidas a la absorción de fondo.

Se ha utilizado no solamente en espectros UV-VIS sino en espectrofotometría IR, absorción atómica y fotometría de llama, y en espectrofluorimetría convencional y sincrónica, y permite incrementar sensibilidad y selectividad; en algunos casos permite la resolución directa de los analitos sin tener que efectuar separaciones.

Se entiende por espectro derivado una representación gráfica en un intervalo determinado de longitudes de onda, del cociente diferencial  $dA/d\lambda$  para la primera derivada,  $d^2A/d\lambda^2$  para la segunda derivada y así sucesivamente.

Una banda de absorción simple posee dos puntos de inflexión y un máximo de absorción a longitudes de onda características que son independientes de la concentración. La función  $dA/d\lambda$  pasa por un máximo y un mínimo en los puntos de inflexión del

espectro de orden cero y vale cero en el máximo. La distancia vertical entre el máximo y el mínimo de la derivada se denomina amplitud la cual es proporcional a la concentración (ver Figura 2).

La segunda derivada del espectro simple presenta dos máximos correspondientes a los puntos de inflexión del espectro de primera derivada mientras que el máximo de absorción del espectro de orden cero aparece como un mínimo (ver Figura 2).

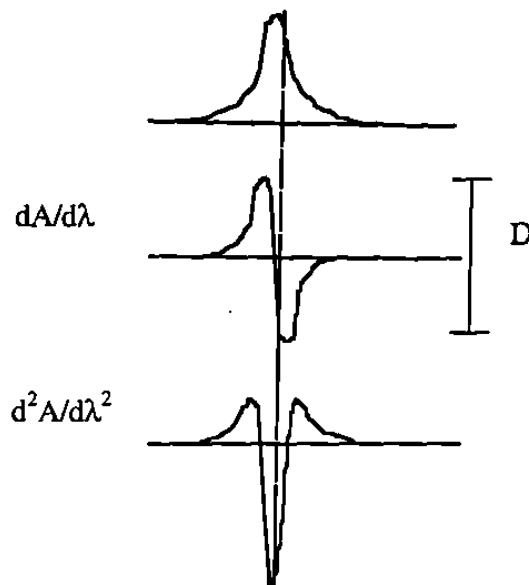


Figura 2. Espectros de Absorción de Orden Cero y Derivados de Primero y Segundo Orden.

La espectroscopía de derivadas permite analizar máximos solapados pequeños en relación al espectro total; además permite determinar sustancias con bandas relativamente estrechas que están solapadas con una banda ancha de un segundo componente.

La desventaja que presenta esta técnica es que la diferenciación disminuye la relación señal / ruido, por lo que es necesario un filtrado de la señal resultante <sup>(23)</sup>. Este proceso de filtrado involucra una serie de datos con una función que consiste en un juego de coeficientes de evaluación. El efecto del filtrado es reducir el ruido y la señal. Lo

óptimo para el filtrado es  $n + 1$  en donde  $n$  es el orden de la derivada. El efecto del filtrado depende de dos variables:

- a) la relación del filtrado, la cual es la relación del ancho del pico filtrado a un número  $M$  de datos correspondientes al ancho a la mitad del máximo.
- b) el número de veces que se realiza el filtrado.

La selección de la relación del filtrado depende del propósito de la derivada. Para aplicaciones cuantitativas en donde la técnica derivada se usa para reducir la banda ancha de fondo, se usa una relación de filtrado mayor. Pero si la técnica es para mejorar la resolución, se usa una relación de filtrado menor <sup>(24)</sup>.

Se han empleado diversos métodos con objeto de resolver mezclas:

- a) La técnica de medida del cruce al cero, la cual utiliza el valor absoluto del espectro derivado para el componente a analizar medido a un valor de abscisa correspondiente a una longitud de onda a la que presente valor cero el espectro derivado del componente cuya interferencia se desee evitar. Esto hace que el error sistemático sea casi nulo <sup>(23)</sup> (ver Figura 3).

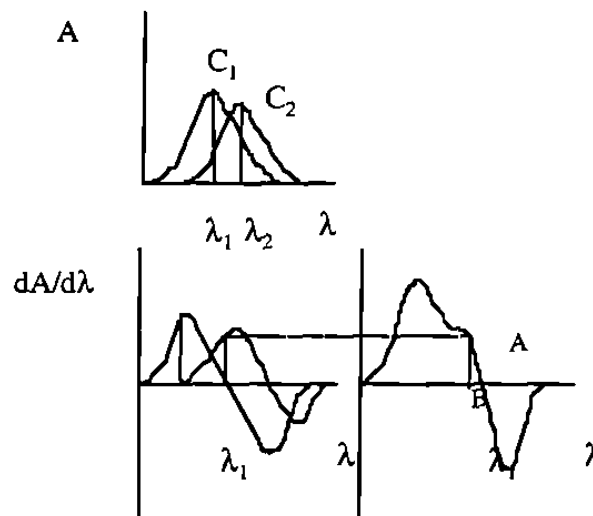


Figura 3. Aplicación de la técnica del cruce al cero.

b) El método de regresión lineal a múltiples longitudes de onda se basa en que la absorbancia de una mezcla de dos componentes a diferentes longitudes de onda se expresa así:

$$A = \epsilon_1 \cdot b \cdot C_1 + \epsilon_2 \cdot b \cdot C_2 \quad (5)$$

y utilizando una solución patrón

$$A_p = \epsilon_1 \cdot b \cdot C_p \quad (6)$$

asumiendo que  $C_{p1} = C_{p2} = 1$

tenemos que:

$$\frac{A_1}{A_{p1}} = C_1 + \frac{A_{p2}}{A_{p1}} \cdot C_2 \quad (7)$$

Si se representa  $A_1/A_{p1}$  frente  $A_{p2}/A_{p1}$ , para cada longitud de onda, se obtiene una línea recta cuya ecuación se ajusta por mínimos cuadrados y en la que las concentraciones de los analitos se deducen de los valores de la ordenada en el origen y de la pendiente. Sólo se obtienen líneas rectas para las longitudes de onda donde se cumpla la aditividad de las absorbancias <sup>(23)</sup>.

c) Método de derivadas de espectros divididos, se aplica cuando se cumple la Ley de Lambert-Beer, el espectro de absorción se define como:

$$A_{1\lambda} = \epsilon_{1\lambda} \cdot C_1 + \epsilon_{2\lambda} \cdot C_2 \quad (8)$$

donde  $A_{1\lambda}$  es la absorbancia de la mezcla a la longitud de onda  $\lambda$ ,  $\epsilon_{1\lambda}$  y  $\epsilon_{2\lambda}$  son las absorptividades molares a esa misma longitud de onda.

Si la ecuación se divide por la ecuación del espectro de una disolución patrón de 1

$$\frac{A_{1\lambda}}{\epsilon_{1\lambda}} = C_1 + C_2 \cdot \frac{\epsilon_{2\lambda}}{\epsilon_{1\lambda}} \quad (9)$$

Se representa la relación  $A_{1\lambda} / \epsilon_{1\lambda}$  en función  $\epsilon_{2\lambda} / \epsilon_{1\lambda}$ . se obtiene una línea recta. La ordenada en el origen da el valor de  $C_1$  y la pendiente  $C_2$  <sup>(23)</sup>.

d) Análisis de multicomponentes, se aplica mezclas de más de dos componentes, para esta técnica se calcula la concentración de cada uno de los componentes de la mezcla conociendo el espectro de la misma y de cada uno de los componentes. Se aplica la aditividad de la Ley de Lambert-Beer a la mezcla:

$$y_j = b_0 + b_1 x_{1j} + b_2 x_{2j} + b_k x_{kj} + e_j \quad (10)$$

donde  $y_j$  representa la absorbancia de la mezcla a las distintas longitudes de onda  $j$  ( $j = 1, 2, 3 \dots n$ ),  $b_0$  es un término de correlación de absorbancia,  $b_1$  representa los valores de concentración de cada uno de los  $k$  componentes de la mezcla  $I$  ( $I = 1, 2, 3 \dots k$ )  $x_{ij}$  representa los valores de absorptividad de los diferentes componentes  $I$  a las  $j$  longitudes de onda y  $e_j$  es el error del ajuste, es decir, la diferencia entre las absorbancias experimentales y las calculadas a cada longitud de onda  $j$ .

Para la resolución de este sistema se utiliza el método de mínimos cuadrados, de donde se hace una derivada y por medio de vectores se encuentran los siguientes parámetros:

- valor de término independiente
- desviación estándar
- coeficiente de correlación.

### 1.3.2.2 Resonancia Magnética Nuclear

La técnica de RMN proporciona un recurso eficaz para estudiar directamente ciertas interacciones fármaco - proteína, en vez de depender de interferencias basadas en los



efectos de los sustituyentes en la molécula de fármaco. La unión se puede estudiar ya sea por los cambios que se observan en los desplazamientos químicos o por el principio de ensanchamiento de la línea <sup>(10)</sup>.

#### 1.4 Peroxisomicina A1 o T514: Potencial Fármaco

En el Departamento de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, la principal línea de investigación se basa en el estudio de la actividad biológica de la Peroxisomicina A1 o T514, y sustancias afines extraídas de plantas del género *Karwinskia*.

La planta de la *Karwinskia humboldtiana* ha sido descrita como un arbusto liso pequeño, de ramas cilíndricas y largas. El fruto se torna violeta obscuro cuando está maduro y tiene un diámetro de 0.5 a 1 cm.

Los efectos tóxicos de la planta fueron descritos por primera vez por el historiador jesuita Don Francisco Xavier Clavijero en 1789, en su libro de Historia de la Antigua o Baja California <sup>(12)</sup>.

Dreyer y cols. <sup>(13)</sup> en 1975 aislaron del fruto de esta planta cuatro toxinas clasificadas como antracenonas, a las que denominaron de acuerdo a su peso molecular: T514, T544, T496 y T516.

Bermudez y cols. <sup>(14)</sup> realizaron estudios toxicológicos *in vivo* en distintas especies animales, tanto con fruto molido de *K. humboldtiana* como con las toxinas puras y encontraron que la sustancia responsable de la neurotoxicidad era la T544 y que la T514 presentaba una selectividad por hígado y pulmón sin presentar daño neurológico en las dosis ensayadas.

Posteriormente Piñeyro López y cols. realizaron estudios *in vitro* con la T514 en líneas celulares continuas de origen benigno y neoplásico de hígado, pulmón y colón, y demostraron que la T514 posee toxicidad selectiva hacia las células neoplásicas, lo cual sugirió en su potencial uso como agente antineoplásico <sup>(15)</sup>. En base a eso se obtuvo la patente de uso <sup>(25)</sup> y actualmente se está investigando la Fase Clínica I.

La Peroxisomicina A1 es una antracenona dimérica, cuyos monómeros están formados por dos anillos fenólicos y una cetona cíclica de seis miembros la cual se encuentra sustituida en la posición 3 y 3' por un hidroxilo y un radical metilo. Dicha molécula es un ácido débil de pKa igual a  $7.27 \pm 0.09$  <sup>(16)</sup>.

En la literatura se han encontrado compuestos estructuralmente similares (hidroxiquinonas) a la Peroxisomicina A1, que interactúan fuertemente con la albúmina <sup>(17)</sup>.

Caballero en su tesis de Maestría en Ciencias demostró que la T514 interactúa *in vitro* con la albúmina sérica bovina y humana, encontró y caracterizó dos clases de sitios de unión tanto a un pH de 7.2 como a un pH de 7.4, y estableció los correspondientes datos termodinámicos de la unión de T514 a la albúmina a diferentes temperaturas <sup>(18)</sup>.

Aquí se presentan algunos resultados de su tesis en base a la interacción T514 - Albúmina Sérica Bovina a un pH 7.2 (ver Tabla 2).

Como se observa en la tabla 2 a las tres temperaturas existen dos tipos de sitios de unión, 3 sitios de unión con mayor afinidad K1 y 5 sitios de unión con menor afinidad K2.

**Tabla 2**  
**Parámetros de Unión Albúmina**  
**Sérica Bovina - T514 a pH 7.2 <sup>(18)</sup>**

Temperatura	N1	K1 x 10 <sup>6</sup> L Mol <sup>-1</sup>	N2	K2 x 10 <sup>6</sup> L Mol <sup>-1</sup>
20	3	0,079	5	0,032
25	3	0,068	5	0,024
30	3	0,045	5	0,020

Con esto concluyó que la T514 (Peroxisomicina A1) interacciona fuertemente con la ASB y la ASH, y que al aumentar la temperatura en el sistema de estudio, la fuerza de la interacción disminuye.

### 1.5 Competencia Fármaco - Proteína

La posibilidad de que se establezca una competencia por los sitios de unión en la molécula de proteína cuando están presentes dos o más fármacos es un aspecto que se debe tomar en consideración. Cuando existen varios fármacos en la sangre, compiten entre sí por el compartimiento proteico, y pueden desplazarse mutuamente. Así resulta que cada nuevo fármaco que pasa por la sangre plantea las siguientes posibilidades:

- desplazamiento de una cierta parte del medicamento o sustancias fisiológicas que estuviesen ya en el compartimiento proteico.
- imposibilidad de pasar al compartimiento proteico, por estar ocupado por otro fármaco <sup>(4)</sup>.

Estudios *in vitro* han revelado que un sitio en el que se une un fármaco puede ser diferente de aquellos al que se unen los otros. Un fármaco puede unirse a varios sitios de unión en la molécula de albúmina; puede ser probable que una sustancia pueda desplazar a otra de algunos de sus sitios de unión en la albúmina pero no de otros, o que dos sustancias puedan desplazar al medicamento unido a la albúmina, aunque cada sustancia por separado no pueda desplazar a ese medicamento de los sitios de unión <sup>(19)</sup>.

Cuando un medicamento desplaza a otro, se produce una redistribución del medicamento desplazado en cuerpo y por lo mismo la concentración de medicamento libre aumenta.

La competitividad entre fármacos por la unión en la proteína no se puede estudiar para cada fármaco, por lo que se estudia con modelos establecidos. Según Scheler se identifican 6 modelos diferentes para los sitios de unión en la albúmina. De estos, 3 pertenecen a sustancias acídicas <sup>(20)</sup> (ver Tabla 3).

Tabla 3  
Clasificación de los Tipos de Unión de los  
Medicamentos Acídicos a la Albúmina <sup>(20)</sup>

Tipo	I	II	III
Modelo	Warfarina	Indometacina	Fenitoína
pKa	5.05	4.5	8.33
N	< 2	> 2	> 30
Kaffin	> 10 <sup>5</sup>	10 <sup>4</sup> -10 <sup>5</sup>	< 10 <sup>4</sup>
Ejemplo	Sulfonamidas	Diclofenaco	Tetraciclinas

Comparando estos datos con los resultados experimentales, se observo que el pK de la T514 está más cercano a la fenitoína, sin embargo los valores de la constante de

afinidad calculados por el MC Adolfo Caballero, están más cerca de los de la warfarina e indometacina.

En base a lo anteriormente citado y escogiendo estos tres medicamentos como modelo, se planteó la siguiente hipótesis de trabajo:

## **HIPOTESIS**

Algunos fármacos como la warfarina, fenitoína e indometacina compiten con la Peroxisomicina A1 por el mismo sitio de unión en la albúmina.

## **OBJETIVO GENERAL**

Determinar *in vitro* si la warfarina, fenitoína e indometacina compiten por el mismo sitio de unión en la albúmina con la Peroxisomicina A1.

## **OBJETIVOS ESPECIFICOS**

1. Establecer si hay competitividad de la warfarina, fenitoína y/o indometacina por la albúmina con respecto a la Peroxisomicina A1.
2. Establecer si hay competitividad de la Peroxisomicina A1 por la albúmina con respecto a la warfarina, fenitoína y/o indometacina.
3. En base a los resultados obtenidos, establecer si la Peroxisomicina A1 y algunos fármacos mencionados tienen el mismo tipo de unión con la albúmina.

## CAPITULO 2

### MATERIAL Y METODOS

#### 2.1 Equipo.

Las mediciones de absorbancia se realizaron en un espectrofotómetro UV-VIS Beckman modelo DU7500 con arreglo de diodos y con controlador de temperatura Peltier. Se utilizaron cubetas de cuarzo y de vidrio de trayecto óptico de 1 cm.

Las mediciones de pH se realizaron con un potenciómetro Beckman modelo 3500 y un electrodo combinado de vidrio Ag/AgCl. El electrodo fue calibrado con amortiguadores estándares de pH conocido (Beckman).

Las mediciones de intensidad de fluorescencia se realizaron en un Espectrofluorómetro Perkin Elmer modelo LS50B.

Los cromatogramas fueron obtenidos en un Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución modelo HP 1090. Se utilizó una columna ODS hypersil 100 x 2.1 con diámetro de partícula de 5 micrómetros.

Las sustancias fueron pesadas en una balanza analítica marca Sartorius modelo Ba 1105.

## 2.2 Preparación de Soluciones.

### 2.2.1 Solución Amortiguadora de Fosfatos pH 7.2.

Se utilizó la sal de fosfato diácido de sodio para preparar solución amortiguadora y agua bidestilada, se ajustó a pH de 7.2 con soluciones de hidróxido de sodio 0.1 N y ácido clorhídrico 0.1 N. La solución amortiguadora se filtró utilizando membrana de diámetro de poro de 0.45 micrómetros.

### 2.2.2 Solución Patrón de Albúmina.

La albúmina no exenta de ácidos grasos se obtuvo de la Compañía Sigma Chemical de la fracción V y la albúmina libre de ácidos grasos se obtuvo de la Compañía Sigma Chemical No. A-7030. Se prepararon soluciones de albúmina a concentraciones de 1.55; 1 y 0.31 mM utilizando el amortiguador de fosfato 0.018 M como solvente. La fuerza iónica de esta solución fue de 0.054 M.

#### 2.2.2.1 Solución de Trabajo de Albúmina.

A partir de la solución patrón de concentración 1.55 mM se prepararon soluciones estándares en volúmenes de 500  $\mu$ L (ver Tabla 4).

Tabla 4  
Soluciones Estándares de Albúmina

Concentración $\mu\text{M} / \text{L}$	Volumen de solución patrón $\mu\text{L}$
20,0	200
22,5	225
25,0	250
27,5	275
30,0	300
32,5	325
35,0	350
37,5	375
40,0	400
42,5	425
45,0	450
47,5	475
50,0	500

### 2.2.3 Solución Patrón de Peroxisomicina A1.

La Peroxisomicina A1 se obtuvo del laboratorio de extracción del Departamento de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, se trabajó con el lote etiquetado con el número 75, y se mantuvo en refrigeración a 5 °C en la oscuridad en un desecador. La Peroxisomicina A1 se disolvió en etanol. Se prepararon soluciones de 2.626 mM y 21.01, 240 y 480  $\mu\text{M}$ .



### 2.2.3.1 Solución de Trabajo de Peroxisomicina A1.

A partir de la solución 2.626 mM se prepararon soluciones en matraces volumétricos de 25 mL (ver Tabla 5). La disolución se aforó con la solución amortiguadora de fosfato pH 7.2.

Tabla 5

Soluciones Estándares de Peroxisomicina A1

Concentración $\mu\text{M/L}$	Volumen de solución patrón $\mu\text{L}$
30,0	300
32,5	325
35,0	350
37,5	375
40,0	400
42,5	425
45,0	450
47,5	475
50,0	500

### 2.2.4 Solución Patrón de Medicamento.

La warfarina, fenitoína e indometacina se obtuvieron de la Compañía Sigma Chemical. Se prepararon soluciones de concentración 1 mM de cada uno de ellos. La warfarina se disolvió en amortiguador de fosfato pH 7.2, la fenitoína y la indometacina se disolvieron en etanol.

### 2.2.4.1 Solución de Trabajo de Medicamentos.

A partir de la solución 1 mM, se prepararon soluciones en matraces volumétricos de 5 mL (ver Tabla 6). La disolución se aforó con solución amortiguadora de fosfatos pH 7.2.

Tabla 6  
Soluciones Estándares de Medicamento

Concentración $\mu\text{M/L}$	Volumen de solución patrón $\mu\text{L}$
10	50
15	75
20	100
25	125
30	150
35	175
40	200
45	225
50	250
55	275

\* Se siguió la misma estrategia para preparar las soluciones de cada uno de los medicamentos en estudio.

### **2.3 Estudio *in vitro* de las Interacciones de la Peroxisomicina A1 con la Albúmina a pH 7.2 y 25 °C.**

#### **2.3.1 Interacciones entre la Peroxisomicina A1 y los Medicamentos.**

Para establecer si existen interacciones entre la Peroxisomicina A1 y los medicamentos se siguió la siguiente estrategia:

A 1 mL de solución de T514 21.01  $\mu\text{M}$ , se le adicionó 33  $\mu\text{L}$  de solución de medicamento (concentración final 20  $\mu\text{M}$ ), se agitó y se tomó el espectro de absorbancia en el intervalo de 200 a 800 nm usando la solución amortiguadora de fosfato como blanco espectral. Esto se hizo con el propósito de observar un posible cambio en los máximos de absorbancia de la Peroxisomicina A1 por las posibles interacciones que pudieran existir entre la Peroxisomicina A1 y los medicamentos estudiados.

#### **2.3.2 Estudio del Equilibrio de la Unión de la Peroxisomicina A1 con la Albúmina en Ausencia de los Medicamentos.**

Para precisar el equilibrio de la unión de la Peroxisomicina A1 con la albúmina se requería conocer los valores de  $r$  (número promedio de sitios ocupados) y la concentración de Peroxisomicina A1 libre necesarios para obtener la gráfica de Scatchard; para ello se siguió la siguiente estrategia:

### 2.3.2.1 Determinación de $\Delta\text{Abs}_{\text{max}}$ a 25 °C y a pH de 7.2 de la Peroxisomicina A1.

Con la finalidad de determinar el  $\Delta\text{Abs}_{\text{max}}$  a 25 °C se utilizó el procedimiento de titular las soluciones de Peroxisomicina A1 de pH 7.2 con alícuotas de albúmina de concentración creciente.

Se vertió 1 mL de solución de 21.01  $\mu\text{M}$  de Peroxisomicina A1 (concentración final 20  $\mu\text{M}$ ) en una cubeta de cuarzo. Se utilizó el amortiguador de fosfato como blanco espectral. Se tomó el valor de absorbancia de la Peroxisomicina A1 ( $\text{Abs}_0$ ) a 422 nm.

Se le adicionó una alícuota de 33  $\mu\text{L}$  de una solución 1.55 mM de albúmina a la cubeta (la concentración final de albúmina varió de 20 a 60  $\mu\text{M}$ ), se agitó por inversión y se tomó la lectura de absorbancia a los 50 segundos después de la primera lectura ( $\text{Abs}_{50}$ ).

Posteriormente se calcularon los cambios de absorbancia utilizando los valores de absorbancia al tiempo 0 y a los 50 segundos.

Se construyeron gráficas relacionando los valores inversos de los cambios de absorbancia en función de los valores inversos de las concentraciones finales de albúmina. En el cruce de la ordenada se calcula  $1 / \Delta\text{Abs}_{\text{max}}$ .

Conociendo el  $\Delta\text{Abs}_{\text{max}}$  se calculó el valor de absorbancia producido por la unión de 1  $\mu\text{M}$  de Peroxisomicina A1 ( $\alpha$ ).

$$\alpha = \Delta\text{Abs}_{\text{max}} / [\text{Peroxisomicina A1}]_{\text{Total}} \quad (11)$$

### 2.3.2.2 Titulación de la Albúmina con Peroxisomicina A1 a 25 °C y a pH de 7.2 en Presencia y Ausencia de Medicamento.

Se vertió 1 mL de solución de Peroxisomicina A1 (concentración final varió de 28.14 a 46.0  $\mu\text{M}$ ) en una cubeta de cuarzo, se le adicionó 33  $\mu\text{L}$  de amortiguador de fosfato para alcanzar un volumen final de 1.066 mL, se agitó y se tomó la lectura de absorbancia a una longitud de onda de 422 nm ( $\text{Abs}_0$ ).

Se le adicionaron 33  $\mu\text{L}$  de solución de albúmina de concentración 0.31 mM (concentración final 10  $\mu\text{M}$ ), se agitó por inversión y se tomó la lectura de absorbancia a los 50 segundos después de la primera lectura ( $\text{Abs}_{50}$ ).

Simultáneamente a 1 mL de solución de Peroxisomicina A1 (concentración final 28.14 a 46.9  $\mu\text{M}$ ), se le adicionaron 33  $\mu\text{L}$  de solución de medicamento (concentración final 20  $\mu\text{M}$ ), se agitó y se tomó la lectura a 422 nm ( $\text{Abs}_0$ ).

Se le adicionaron 33  $\mu\text{L}$  de solución de albúmina de concentración 0.31 mM (concentración final 10  $\mu\text{M}$ ), se agitó por inversión y se tomó la lectura de absorbancia a los 50 segundos después de la primera lectura ( $\text{Abs}_{50}$ ).

Esta estrategia se siguió para cada uno de los medicamentos en estudio (warfarina, fenitoína e indometacina). Las concentraciones finales de los medicamentos utilizadas fueron: 20, 35, 50 y 60  $\mu\text{M}$ .

Posteriormente se calculó el cambio de absorbancia utilizando la lectura al tiempo 0 y a los 50 segundos:

$$\Delta\text{Abs} = \text{Abs}_{50} - \text{Abs}_0 \quad (12)$$

Cada punto de la curva se realizó por triplicado.

Se graficaron los valores de  $\Delta\text{Abs}$  en función de las concentraciones de Peroxisomicina A1.

### 2.3.2.3 Determinación de la Concentración de Peroxisomicina A1 <sub>unida</sub> y Peroxisomicina A1 <sub>libre</sub> en Presencia y Ausencia de Medicamento.

Las concentraciones de Peroxisomicina A1 unida y libre en cada uno de los puntos de la curva de titulación se calcularon utilizando las siguientes ecuaciones:

$$[\text{Peroxisomicina A1}]_{\text{unida}} = \Delta\text{Abs} / \alpha \quad (13)$$

$$[\text{Peroxisomicina A1}]_{\text{libre}} = [\text{Peroxisomicina A1}]_{\text{Total}} - [\text{Peroxisomicina A1}]_{\text{unida}} \quad (14)$$

### 2.3.2.4 Determinación del Número Promedio de Moléculas de Peroxisomicina A1 unida a la Albúmina ( $r$ ) en Presencia y Ausencia de Medicamento.

Después de obtener la concentración de Peroxisomicina A1 ligada a la albúmina en cada punto de la curva de titulación, se calculó el valor promedio del número de moléculas de Peroxisomicina A1 unidas a la albúmina ( $r$ ), mediante la siguiente ecuación <sup>(11)</sup>:

$$r = \frac{[\text{Peroxisomicina A1}]_{\text{unida}}}{[\text{albúmina}]_{\text{Total}}} \quad (15)$$

Con los datos de  $r$  y de  $r / [\text{Peroxisomicina A1}]_{\text{libre}}$  y utilizando la ecuación de Scatchard se graficaron los valores de  $r / [\text{Peroxisomicina A1}]_{\text{libre}}$  en función de  $r$ . Se obtuvieron así

los valores de la constante de afinidad ( $K_a$ ) y de  $N$  para cada curva con y sin medicamento.

## **2.4 Estudio *in vitro* de las Interacciones de la Warfarina con la Albúmina Libre de Ácidos Grasos a pH 7.2 y 25 °C.**

### **2.4.1 Interacciones entre la Warfarina y la Albúmina Libre de Ácidos Grasos en Presencia de Peroxisomicina A1.**

Para establecer la señal analítica de la warfarina se siguió la siguiente estrategia:

Se vertió una alícuota de la solución amortiguadora de fosfato a pH 7.2 en una cubeta de cuarzo y se obtuvo el espectro de absorbancia en un intervalo de 200 hasta 800 nm, usando agua bidestilada como blanco espectral.

En una cubeta de cuarzo se vertió 1 mL de solución 21.01  $\mu\text{M}$  de warfarina y se le agregaron 33  $\mu\text{L}$  de solución amortiguadora para obtener así la concentración final de 20  $\mu\text{M}$ , se agitó por inversión para posteriormente tomarle el espectro de absorbancia en el intervalo de 200 hasta 800 nm. Esta misma estrategia se siguió para conocer el espectro de absorbancia de la albúmina libre de ácidos grasos a las concentraciones estudiadas y de la Peroxisomicina A1 (concentración final 20 y 40  $\mu\text{M}$ ).

Se le aplicó la primera derivada a los espectros de orden cero ya obtenidos de la warfarina, Peroxisomicina A1 y albúmina libre de ácidos grasos y mediante la técnica del cruce al cero se escogió la longitud de onda de trabajo.

## 2.4.2 Estudio del Equilibrio de la Unión de la Warfarina con la Albúmina Libre de Ácidos Grasos.

Para precisar el equilibrio de la unión de la warfarina con la albúmina libre de ácidos grasos se requería conocer los valores de  $r$  (número promedio de sitios ocupados) y de la concentración de warfarina libre necesarios para obtener la gráfica de Scatchard y para ello se siguió la siguiente estrategia:

### 2.4.2.1 Determinación de $\Delta Abs_{max}$ a 25 °C y a pH 7.2 de la Warfarina.

Con la finalidad de determinar el  $\Delta Abs_{max}$  a 25 °C se utilizó el procedimiento de titular las soluciones de warfarina de pH 7.2 con alícuotas de albúmina libre de ácidos grasos de concentración creciente.

Se vertió 1 mL de una solución de 31.01  $\mu\text{M}$  de warfarina (concentración final 30  $\mu\text{M}$ ) en una cubeta de cuarzo. Se utilizó el amortiguador de fosfato como blanco espectral. Se tomó la lectura a 329 nm en el espectro de primera derivada de la warfarina ( $Abs_0$ ).

Se le adicionó una alícuota de 33  $\mu\text{L}$  de una solución 1.55 mM de albúmina libre de ácidos grasos a la cubeta (concentración final varió de 20 a 60  $\mu\text{M}$ ), se agitó por inversión y se tomó la lectura en el espectro de primera derivada a 329 nm 20 minutos después de la primera lectura ( $Abs_{20}$ ).

Posteriormente se calcularon los cambios de absorbancia utilizando los valores de absorbancia al tiempo 0 y a los 20 minutos.



Se construyeron gráficas relacionando los valores inversos de los cambios de absorbancia en función de los valores inversos de las concentraciones finales de albúmina. En el cruce de la ordenada se calcula  $1 / \Delta\text{Absmax}$ .

Conociendo el  $\Delta\text{Absmax}$  se calculó el valor de absorbancia producido por la unión de  $1 \mu\text{M}$  de warfarina ( $\alpha$ ).

$$\alpha = \Delta\text{Absmax} / [\text{warfarina}]_{\text{Total}} \quad (16)$$

#### 2.4.2.2 Titulación de la Albúmina Libre de Acidos Grasos con Warfarina a $25^\circ\text{C}$ y a pH de 7.2 en Presencia y Ausencia de Peroxisomicina A1.

En un tubo de ensayo se vertió 1 mL de solución de warfarina (concentración final varió de  $8.33$  a  $37.5 \mu\text{M}$ ), se le adicionó  $66 \mu\text{L}$  de amortiguador de fosfato para alcanzar un volumen final de  $1.066 \text{ mL}$ , se agitó y esta solución se vertió en una cubeta de cuarzo, se tomó la lectura a  $329 \text{ nm}$  en el espectro de primera derivada ( $\text{Abs}_0$ ).

Simultáneamente en otro tubo de ensayo se vertió 1 mL de solución de warfarina (concentración final varió de  $8.33$  a  $37.5 \mu\text{M}$ ), se le adicionaron  $33 \mu\text{L}$  de amortiguador de fosfato, y  $33 \mu\text{L}$  de albúmina libre de ácidos grasos (concentración final  $10 \mu\text{M}$ ), se agitó y se tomó la lectura a  $329 \text{ nm}$  en el espectro de primera derivada después de 20 minutos ( $\text{Abs}_{20}$ ).

Al mismo tiempo en otro tubo de ensayo se vertió 1 mL de solución de warfarina (concentración final varió de  $8.33$  a  $37.5 \mu\text{M}$ ), se le adicionaron  $33 \mu\text{L}$  de albúmina libre de ácidos grasos (concentración final  $10 \mu\text{M}$ ), se agitó y después de 20 minutos se le agregaron  $33 \mu\text{L}$  de solución de Peroxisomicina A1 (concentración final  $20$  y  $40 \mu\text{M}$ ) se agitó, se dejó 5 minutos y se tomó la lectura de la primera derivada a  $329 \text{ nm}$  ( $\text{Abs}_{20}$ ).

Posteriormente se calculó el cambio de absorbancia utilizando la lectura al tiempo 0 y a los 20 minutos:

$$\Delta\text{Abs} = \text{Abs}_{20} - \text{Abs}_0 \quad (17)$$

Cada punto de la curva se realizó por triplicado.

Se graficaron los valores de  $\Delta\text{Abs}$  en función de las concentraciones de warfarina.

#### 2.4.2.3 Determinación de la Concentración de Warfarina unida y Warfarina libre.

Las concentraciones de warfarina unida y libre en cada uno de los puntos de la curva de titulación se calcularon utilizando las siguientes ecuaciones:

$$[\text{warfarina}]_{\text{unida}} = \Delta\text{Abs} / \alpha \quad (18)$$

$$[\text{warfarina}]_{\text{libre}} = [\text{warfarina}]_{\text{Total}} - [\text{warfarina}]_{\text{unida}} \quad (19)$$

#### 2.4.2.4 Determinación del Número Promedio de Moléculas de Warfarina unida a la Albúmina Libre de Ácidos Grasos (r).

Después de obtener la concentración de warfarina ligada a la albúmina en cada punto de la curva de titulación, se calculó el valor promedio del número de moléculas de warfarina unidas a la albúmina libre de ácidos grasos (r), mediante la ecuación <sup>(11)</sup>:

$$r = \frac{[\text{warfarina}]_{\text{unida}}}{[\text{albúmina libre de ácidos grasos}]_{\text{Total}}} \quad (20)$$

Con los datos de r y de r / [warfarina] libre y utilizando la ecuación de Scatchard se graficaron los valores de r / [warfarina] libre en función de r. Se obtuvieron así los valores de la constante de afinidad (K<sub>a</sub>) y de N.

## **2.5 Estudio *in vitro* de las Interacciones de la Indometacina con la Albúmina a pH 7.2 y 25 °C.**

### **2.5.1 Interacciones entre la Indometacina y la Albúmina en Presencia de Peroxisomicina A1.**

Para establecer la señal analítica de la indometacina se siguió la siguiente estrategia:

Se vertió una alícuota de la solución amortiguadora de fosfato a pH 7.2 en una cubeta de cuarzo y se obtuvo el espectro de absorbancia en un intervalo de 200 hasta 800 nm, usando agua bidestilada como blanco espectral.

En una cubeta de cuarzo se vertió 1 mL de solución 21.01  $\mu\text{M}$  de indometacina y se le agregaron 33  $\mu\text{L}$  de solución amortiguadora para obtener así la concentración final de 20  $\mu\text{M}$ , se agitó por inversión para posteriormente tomarle el espectro de absorbancia en el intervalo de 200 hasta 800 nm. Esta misma estrategia se siguió para conocer el espectro de absorbancia de la albúmina a las concentraciones estudiadas y de la Peroxisomicina A1 (concentración final 40  $\mu\text{M}$ ).

Se le aplicó la primera derivada a los espectros de orden cero ya obtenidos de la indometacina, Peroxisomicina A1 y albúmina y se utilizó la técnica del cruce al cero para escoger una longitud de onda para la indometacina en la que Peroxisomicina A1 y la albúmina tuvieran valores de absorbancia nulos.

### **2.5.2 Estudio del Equilibrio de la Unión de la Indometacina con la Albúmina.**

Para precisar el equilibrio de la unión de la indometacina con la albúmina se requería conocer los valores de  $r$  (número promedio de sitios ocupados) y de la

concentración de indometacina libre necesarios para obtener la gráfica de Scatchard y para ello se siguió la siguiente estrategia:

#### 2.5.2.1 Determinación de $\Delta Abs_{max}$ a 25 °C y a pH 7.2 de la Indometacina.

Con la finalidad de determinar el  $\Delta Abs_{max}$  a 25 °C se utilizó el procedimiento de titular las soluciones de indometacina de pH 7.2 con alícuotas de albúmina de concentración creciente.

Se vertió 1 mL de una solución de 31.01 mM de indometacina (concentración final 30  $\mu$ M) en una cubeta de cuarzo. Se utilizó el amortiguador de fosfato como blanco espectral. Se tomó la lectura a 314 nm en el espectro de primera derivada de la indometacina ( $Abs_0$ ).

Se le adicionó una alícuota de 33  $\mu$ L de una solución 1.55 mM de albúmina a la cubeta (concentración final varió de 20 a 60  $\mu$ M), se agitó por inversión y se tomó la lectura a 314 nm en el espectro de primera derivada 20 minutos después de la primera lectura ( $Abs_{20}$ ).

Posteriormente se calcularon los cambios de absorbancia utilizando los valores de absorbancia al tiempo 0 y a los 20 minutos.

Se construyeron gráficas relacionando los valores inversos de los cambios de absorbancia en función de los valores inversos de las concentraciones finales de albúmina. En el cruce de la ordenada se calcula  $1 / \Delta Abs_{max}$ .

Conociendo el  $\Delta\text{Abs}_{\text{max}}$  se calculó el valor de absorbancia producido por la unión de 1  $\mu\text{M}$  de indometacina ( $\alpha$ ).

$$\alpha = \Delta\text{Abs}_{\text{max}} / [\text{indometacina}]_{\text{Total}} \quad (21)$$

#### 2.5.2.2 Titulación de la Albúmina con Indometacina a 25 °C y a pH de 7.2 en Presencia y Ausencia de Peroxisomicina A1.

En un tubo de ensayo se vertió 1 mL de solución de indometacina (concentración final varió de 8.33 a 37.5  $\mu\text{M}$ ), se le adicionó 66  $\mu\text{L}$  de amortiguador de fosfato para alcanzar un volumen final de 1.066 mL, se agitó y esta solución se vertió en una cubeta de cuarzo, se tomó el valor de absorbancia a 314 nm del espectro de primera derivada ( $\text{Abs}_0$ ).

Simultáneamente en otro tubo de ensayo se vertió 1 mL de solución de indometacina (concentración final varió de 8.33 a 37.5  $\mu\text{M}$ ), se le adicionaron 33  $\mu\text{L}$  de amortiguador de fosfato y 33  $\mu\text{L}$  de albúmina (concentración final 10  $\mu\text{M}$ ), se agitó y se tomó la lectura a 314 nm en el espectro de primera derivada después de 20 minutos ( $\text{Abs}_{20}$ ).

Al mismo tiempo en otro tubo de ensayo se vertió 1 mL de solución de indometacina (concentración final varió de 8.33 a 37.5  $\mu\text{M}$ ), se le adicionaron 33  $\mu\text{L}$  de albúmina (concentración final 10  $\mu\text{M}$ ), se agitó y después de 20 minutos se le agregaron 33  $\mu\text{L}$  de solución de Peroxisomicina A1 (concentración final 20 y 40  $\mu\text{M}$ ) se agitó, se dejó 5 minutos y se tomó la lectura de primera derivada a 314 nm ( $\text{Abs}_{20}$ ).

Posteriormente se calculó el cambio de absorbancia utilizando la lectura al tiempo 0 y a los 20 minutos:

$$\Delta\text{Abs} = \text{Abs}_{20} - \text{Abs}_0 \quad (22)$$

Cada punto de la curva se realizó por triplicado.

Se graficaron los valores de  $\Delta\text{Abs}$  en función de las concentraciones de indometacina.

### 2.5.2.3 Determinación de la Concentración de Indometacina unida e

Indometacina libre.

Las concentraciones de indometacina unida y libre en cada uno de los puntos de la curva de titulación se calcularon utilizando las siguientes ecuaciones:

$$[\text{indometacina}]_{\text{unida}} = \Delta\text{Abs} / \alpha \quad (23)$$

$$[\text{indometacina}]_{\text{libre}} = [\text{indometacina}]_{\text{Total}} - [\text{indometacina}]_{\text{unida}} \quad (24)$$

### 2.5.2.4 Determinación del Número Promedio de Moléculas de Indometacina unida a la Albúmina (r).

Después de obtener la concentración de indometacina ligada a la albúmina en cada punto de la curva de titulación, se calculó el valor promedio del número de moléculas de indometacina unidas a la albúmina (r), mediante la ecuación <sup>(11)</sup>:

$$r = \frac{[\text{indometacina}]_{\text{unida}}}{[\text{albúmina}]_{\text{Total}}} \quad (25)$$

Con los datos de r y de r /  $[\text{indometacina}]_{\text{libre}}$  y utilizando la ecuación de Scatchard se graficaron los valores de r /  $[\text{indometacina}]_{\text{libre}}$  en función de r. Se obtuvieron así los valores de la constante de afinidad (Ka) y de N para la indometacina.

## **2.6 Estudio *in vitro* de las Interacciones de la Fenitoína con la Albúmina Libre de Acidos Grasos a pH 7.2 y 25 °C.**

### **2.6.1 Interacciones entre la Fenitoína y la Albúmina Libre de Acidos Grasos en Presencia de Peroxisomicina A1.**

Para establecer la señal analítica de la fenitoína se siguió la siguiente estrategia:

Se vertió una alícuota de la solución amortiguadora de fosfato a pH 7.2 en una cubeta de cuarzo y se obtuvo el espectro de absorbancia en un intervalo de 200 hasta 800 nm, usando agua bidestilada como blanco espectral.

En una cubeta de cuarzo se vertió 1 mL de solución 21.01  $\mu\text{M}$  de fenitoína y se le agregaron 33  $\mu\text{L}$  de solución amortiguadora para obtener así la concentración final de 20  $\mu\text{M}$ , se agitó por inversión para posteriormente tomarle el espectro de absorbancia en el intervalo de 200 hasta 800 nm. Esta misma estrategia se siguió para conocer el espectro de absorbancia de la albúmina libre de ácidos grasos a las concentraciones estudiadas y de la Peroxisomicina A1 (concentración final 40  $\mu\text{M}$ ).

Se le aplicó la primera derivada a los espectros de orden cero ya obtenidos de la fenitoína, Peroxisomicina A1 y albúmina libre de ácidos grasos.

Se utilizó la técnica de Fluorescencia para buscar las longitudes de onda de emisión y excitación para la Peroxisomicina A1, la albúmina libre de ácidos grasos y la fenitoína.

Se utilizó la Cromatografía en su modalidad de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución con columna de Fase Reversa.

## 2.6.2 Estudio del Equilibrio de la Unión de la Fenitoína con la Albúmina Libre de Ácidos Grasos.

Para precisar el equilibrio de la unión de la fenitoína con la albúmina libre de ácidos grasos se requería conocer los valores de  $r$  (número promedio de sitios ocupados) y de la concentración de fenitoína libre necesarios para obtener la gráfica de Scatchard y para ello se siguió la siguiente estrategia:

### 2.6.2.1 Titulación de la Albúmina Libre de Ácidos Grasos con Fenitoína a 25 °C y a pH de 7.2 en Presencia y Ausencia de Peroxisomicina A1.

Se prepararon muestras en tubos de ensayo para poder encontrar las condiciones adecuadas de elución .

#### Condiciones Cromatográficas:

- Flujo: 0,4 mL/minuto.
- Longitud de onda de detección: 210 nm
- Longitudes de onda secundarias: 220, 410 nm.
- Fase estacionaria: columna ODS-hypersil 100mm x 2.1 mm con diámetro de partícula de 5 micrómetros.
- Fase móvil : Solvente A: amortiguador de fosfato pH 7.2  
Solvente B: Acetonitrilo
- Gradiente de elución : isocrático 70:30

#### Curva de calibración:

En uno de los tubos se agregó 1 mL de solución de fenitoína (concentración final varió de 8.33 a 37.5  $\mu$ M), se le adicionó 66  $\mu$ L de amortiguador de fosfato para alcanzar



un volumen final de 1.066 mL, se agitó y la muestra se filtró a través de una jeringa con membrana de filtración de 0.45 micrómetros y se colocó en un vial.

Con ello se obtuvo una curva de calibración en donde la altura del pico se relaciona directamente con la concentración de fenitoína

En un tubo de ensayo se vertió 1 mL de solución de fenitoína (concentración final varió de 8.33 a 37.5  $\mu\text{M}$ ), se le adicionaron 33  $\mu\text{L}$  de amortiguador de fosfato y 33  $\mu\text{L}$  de albúmina (concentración final 10  $\mu\text{M}$ ), se agitó y se dejó reposar 20 minutos, después de los cuales, la muestra se filtró a través de una jeringa con membrana de filtración de 0.45 micrómetros y se colocó en un vial.

Al mismo tiempo en otro tubo de ensayo se vertió 1 mL de solución de fenitoína (concentración final varió de 8.33 a 37.5  $\mu\text{M}$ ), se le adicionaron 33  $\mu\text{L}$  de albúmina (concentración final 10  $\mu\text{M}$ ), se agitó y después de 20 minutos se le agregaron 33  $\mu\text{L}$  de solución de Peroxisomicina A1 (concentración final 40  $\mu\text{M}$ ) se agitó, se dejó 5 minutos más reposando, después de los cuales la muestra se filtró a través de una jeringa con membrana de filtración de 0.45 micrómetros y se colocó en un vial.

Estos viales fueron colocados en el Cromatógrafo de Líquidos para poder ser inyectados bajo las condiciones cromatográficas ya establecidas.

#### 2.6.2.2 Determinación de la Concentración de Fenitoína <sub>unida</sub> y Fenitoína <sub>libre</sub>

Con los cromatogramas resultantes se mide la altura del pico y ésta se relaciona con la concentración de fenitoína libre, interpolando los resultados en la curva de calibración antes obtenida. Las concentraciones de fenitoína unida se calcula por diferencia entre la fenitoína libre y la total.

### 2.6.2.3 Determinación del Número Promedio de Moléculas de Fenitoína unida a la Albúmina Libre de Ácidos Grasos (r).

Después de obtener la concentración de fenitoína ligada a la albúmina libre de ácidos grasos para cada cromatograma, se calculó el valor de r (número promedio de moléculas de fenitoína unidas a la albúmina libre de ácidos grasos), mediante la ecuación <sup>(11)</sup>:

$$r = \frac{[\text{fenitoína}]_{\text{unida}}}{[\text{albúmina}]_{\text{Total}}} \quad (26)$$

Con los datos de r y de r / [fenitoína]<sub>libre</sub> y utilizando la ecuación de Scatchard se graficaron los valores de r / [fenitoína]<sub>libre</sub> en función de r. Se obtienen así los valores de la constante de afinidad (K<sub>a</sub>) y de N para la fenitoína.

## 2.7 Análisis estadísticos

Se utilizó la prueba de t de student para establecer si existía diferencia significativa entre las curvas realizadas por triplicado para cada uno de los experimentos y también para comparar los valores de la constante de afinidad (K<sub>a</sub>) obtenidas en cada experimento.

Se utilizó un programa computacional de Beckman para filtrar, y derivar los espectros obtenidos, para así encontrar una mejor longitud de onda de estudio.

## CAPITULO 3

### RESULTADOS

#### **3.1 Estudio *in vitro* de las Interacciones de la Peroxisomicina A1 con la Albúmina a pH 7.2 y 25 °C.**

##### **3.1.1 Interacciones entre la Peroxisomicina A1 y los Medicamentos.**

La solución de Peroxisomicina A1 21.01  $\mu\text{M}$ , con solución de warfarina (concentración final 20  $\mu\text{M}$ ), presentó el espectro de absorbancia que se muestra en la figura 4 en el intervalo de 200 a 800 nm, en donde el cambio de absorbancia respecto del observado para la Peroxisomicina A1 sola a 422 nm, no era significativo.

En el caso de la fenitoína (ver Figura 5) y la indometacina (ver Figura 6) no se encontró ningún cambio a el 422 nm respecto del valor observado para la Peroxisomicina A1.

##### **3.1.2 Estudio del Equilibrio de la Unión de la Peroxisomicina A1 con la Albúmina en Ausencia de los Medicamentos.**

###### **3.1.2.1 Determinación de $\Delta\text{Absmax}$ a 25 °C y a pH de 7.2 de la Peroxisomicina A1.**

Para determinar el  $\Delta\text{Absmax}$ , se fijó la concentración de Peroxisomicina A1 en 20  $\mu\text{M}$  final y la concentración de albúmina varió desde 20 hasta 60  $\mu\text{M}$  (ver Tabla 7).

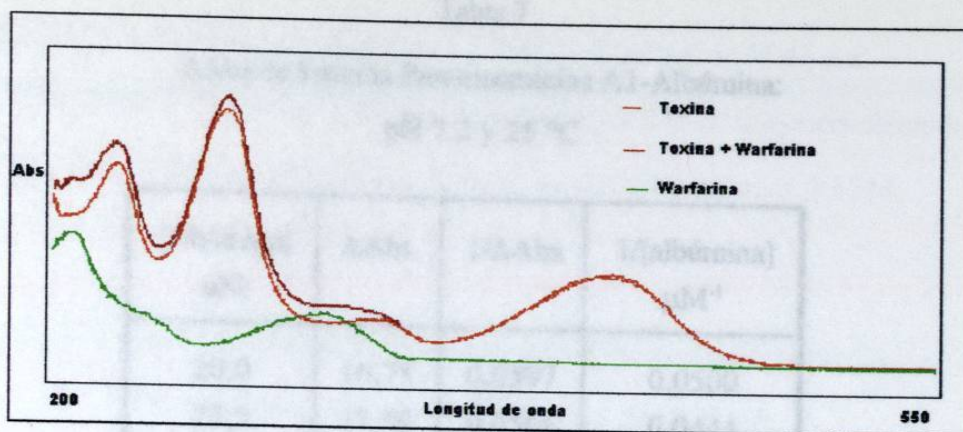


Figura 4. Espectro de Absorción de Peroxisomicina A1 en Presencia y Ausencia de Warfarina.

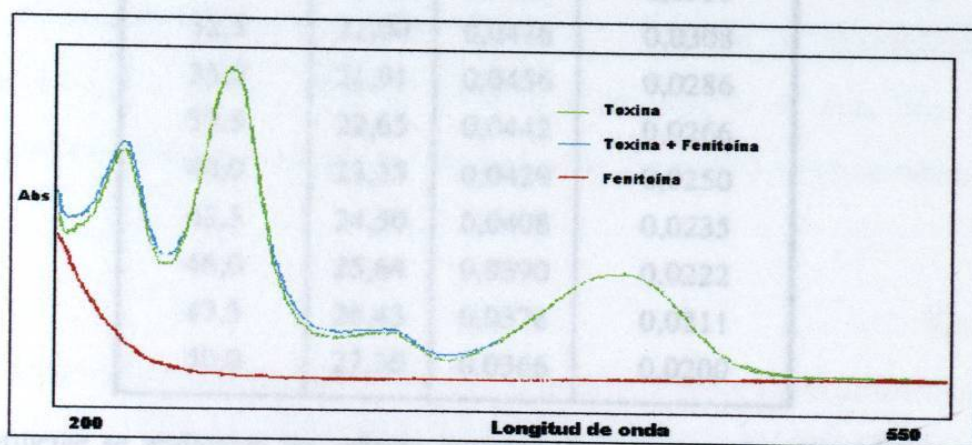


Figura 5. Espectro de Absorción de Peroxisomicina A1 en Presencia y Ausencia de Fenitoína.

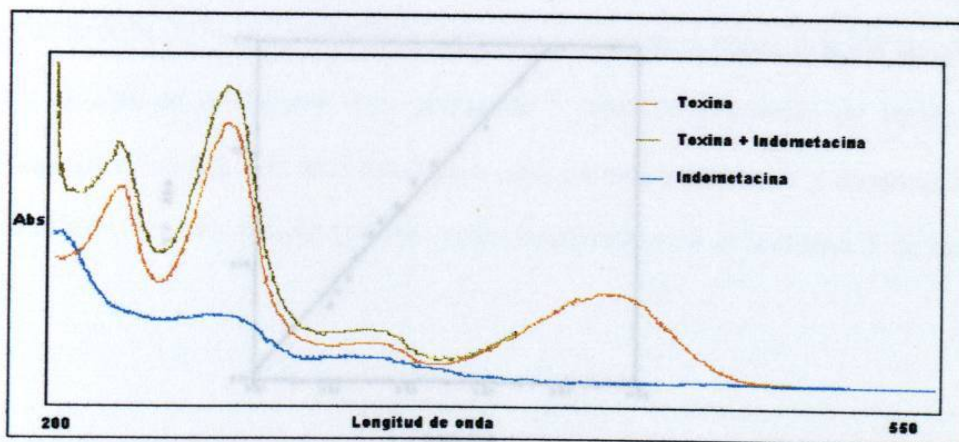


Figura 6. Espectro de Absorción de Peroxisomicina A1 en Presencia y Ausencia de Indometacina.

Tabla 7

$\Delta$ Abs de Sistema Peroxisomicina A1-Albúmina:  
pH 7.2 y 25 °C

[albúmina] $\mu\text{M}$	$\Delta$ Abs	$1/\Delta$ Abs	$1/[\text{albúmina}]$ $\mu\text{M}^{-1}$
20,0	16,75	0,0597	0,0500
22,5	17,59	0,0568	0,0444
25,0	19,00	0,0526	0,0400
27,5	19,78	0,0506	0,0364
30,0	20,32	0,0492	0,0333
32,5	21,00	0,0476	0,0308
35,0	21,91	0,0456	0,0286
37,5	22,65	0,0442	0,0266
40,0	23,33	0,0429	0,0250
42,5	24,50	0,0408	0,0235
45,0	25,64	0,0390	0,0222
47,5	26,43	0,0378	0,0211
50,0	27,30	0,0366	0,0200

Posteriormente se graficaron los valores inversos de  $\Delta$ Abs en función de los valores inversos de concentración de albúmina, esta gráfica cruza la ordenada en  $1 / \Delta$ Absmax.

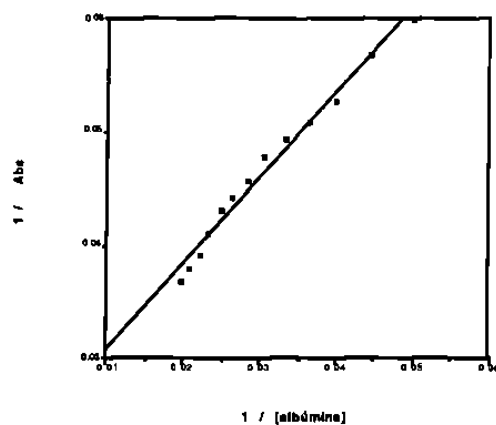


Figura 7. Estimación del  $\Delta$ Absmax Peroxisomicina A1 - Albúmina: pH 7.2 y 25 °C.

La recta cruza la ordenada en  $1/\Delta\text{Absmax} = 0,023$ ,  $\Delta\text{Absmax} = 43,43$  u.a.

Conociendo el valor de  $\text{Absmax}$  se calculó el valor de absorbancia obtenido por la unión de  $1\ \mu\text{M}$  de Peroxisomicina A1, dado por  $\alpha$  dando un valor de 2.1714.

### 3.1.2.2 Determinación de la Concentración de Peroxisomicina A1 unida y Peroxisomicina A1 libre en Presencia y Ausencia de Medicamento.

Conociendo el valor de  $\alpha$  se determinaron los valores de las concentraciones de Peroxisomicina A1 unida y libre en presencia y en ausencia de cada uno de los medicamentos estudiados, los cuales se muestran en las columnas 3 y 4 de las tablas 8 a la 17.

### 3.1.2.3 Determinación del Número Promedio de Moléculas de Peroxisomicina A1 unidas a la Albúmina ( $r$ ) en Presencia y Ausencia de Medicamento.

Con los valores de las concentraciones de Peroxisomicina A1 unida a la albúmina en cada punto de la curva de titulación y tomando en cuenta la concentración de albúmina utilizada ( $10\ \mu\text{M}$ ) se obtuvieron los valores de  $r$  (número promedio de moléculas de Peroxisomicina A1 unida a la albúmina) para cada curva en presencia y ausencia de cada uno de los medicamentos estudiados, los cuales se muestran en la columna 5 de las tablas 8 a la 17.

Tabla 8

Titulación de Albúmina (10  $\mu\text{M}$ ) con Peroxisomicina A1  
en Ausencia de Medicamento.

[PA1] total	$\Delta\text{Abs}$	[PA1]unida	[PA1]libre	r	r/[PA1]libre
28,14	30,197	13,89	14,246	1,389	0,0975
30,48	31,718	14,59	15,893	1,459	0,0918
32,83	33,501	15,41	17,422	1,541	0,0885
35,18	35,349	16,26	18,929	1,626	0,0859
37,52	36,893	16,97	20,542	1,697	0,0826
39,86	38,632	17,77	22,042	1,777	0,0806
42,21	40,393	18,58	23,623	1,858	0,0787
44,50	42,002	19,32	25,242	1,932	0,0765
46,90	43,893	20,19	26,702	2,019	0,0756

Tabla 9

Titulación de Albúmina (10  $\mu\text{M}$ ) con Peroxisomicina A1  
en Presencia de Warfarina 20  $\mu\text{M}$ .

[PA1]total	$\Delta\text{Abs}$	[PA1]unida	[PA1]libre	r	r/[PA1]libre
28,14	30,545	14,05	14,092	1,405	0,0997
30,48	32,306	14,86	15,625	1,486	0,0951
32,83	33,936	15,61	17,216	1,561	0,0907
35,18	35,610	16,38	18,806	1,638	0,0871
37,52	37,132	17,08	20,455	1,708	0,0835
39,86	39,099	17,99	21,834	1,799	0,0824
42,21	40,784	18,76	23,456	1,876	0,0799
44,50	42,545	19,57	24,985	1,957	0,0783
46,90	44,110	20,29	26,606	2,029	0,0763

Tabla 10

Titulación de Albúmina (10  $\mu\text{M}$ ) con Peroxisomcina A1  
en Presencia de Warfarina 35  $\mu\text{M}$ .

[PA1]total	$\Delta\text{Abs}$	[PA1]unida	[PA1]libre	r	r/[PA1]libre
28,14	31,001	14,26	13,885	1,426	0,1027
30,48	32,050	14,95	15,524	1,495	0,0963
32,83	34,610	15,92	16,918	1,592	0,0941
35,18	36,197	16,65	18,566	1,665	0,0897
37,52	38,306	17,62	19,909	1,762	0,0885
39,86	39,893	18,35	21,462	1,835	0,0855
42,21	41,284	18,99	23,215	1,899	0,0818
44,50	42,393	19,50	25,064	1,950	0,0778
46,90	43,893	20,19	26,706	2,019	0,0756

Tabla 11

Titulación de Albúmina (10  $\mu\text{M}$ ) con Peroxisomcina A1  
en Presencia de Warfarina 50  $\mu\text{M}$ .

[PA1]total	$\Delta\text{Abs}$	[PA1]unida	[PA1]libre	r	r/[PA1]libre
28,14	30,806	14,17	13,974	1,417	0,1014
30,48	32,219	14,82	15,666	1,482	0,0946
32,83	33,893	15,59	17,227	1,559	0,0905
35,18	35,784	16,46	18,722	1,646	0,0879
37,52	37,599	17,29	20,228	1,729	0,0855
39,86	39,199	18,03	21,789	1,803	0,0827
42,21	41,002	18,86	23,352	1,886	0,0807
44,50	42,599	19,59	24,962	1,959	0,0785
46,90	43,880	20,18	26,717	2,018	0,0755



Tabla 12

Titulación de Albúmina (10  $\mu$ M) con Peroxisomcina A1  
en Presencia de Warfarina 60  $\mu$ M.

[PA1]total	$\Delta$ Abs	[PA1]unida	[PA1]libre	r	r/[PA1]libre
28,14	30,85	14,19	13,949	1,419	0,1017
30,48	32,40	14,90	15,576	1,490	0,0957
32,83	34,3	15,78	17,053	1,578	0,0925
35,18	35,55	16,35	18,827	1,635	0,0868
37,52	36,80	16,93	20,593	1,693	0,0822
39,86	38,50	17,71	22,151	1,771	0,0799
42,21	40,90	18,81	23,397	1,881	0,0787
44,50	42,50	19,55	24,951	1,955	0,0784
46,90	43,53	20,02	26,877	2,002	0,0745

Tabla 13

Titulación de Albúmina (10  $\mu$ M) con Peroxisomcina A1  
en Presencia de Fenitoína 20  $\mu$ M.

[PA1]total	$\Delta$ Abs	[PA1]unida	[PA1]libre	r	r/[PA1]libre
28,14	31,10	14,31	13,835	1,431	0,1034
30,48	33,00	15,18	15,301	1,518	0,0992
32,83	34,56	15,89	16,933	1,589	0,0939
35,18	35,30	16,24	18,943	1,624	0,0857
37,52	37,15	17,09	20,432	1,709	0,0836
39,86	39,30	18,08	21,783	1,808	0,0829
42,21	41,00	18,86	23,351	1,886	0,0808
44,50	42,70	19,64	24,859	1,964	0,0790
46,90	43,30	19,92	26,983	1,992	0,0738

Tabla 14

Titulación de Albúmina (10  $\mu$ M) con Peroxisomcina A1  
en Presencia de Fenitoína 50  $\mu$ M.

[PA1]total	$\Delta$ Abs	[PA1]unida	[PA1]libre	r	r/[PA1]libre
28,14	30,50	14,03	14,111	1,403	0,0994
30,48	31,20	14,35	16,128	1,435	0,0889
32,83	33,55	15,43	17,397	1,543	0,0887
35,18	35,00	16,09	19,081	1,609	0,0844
37,52	36,20	16,65	20,868	1,665	0,0798
39,86	37,00	17,02	22,841	1,702	0,0765
42,21	39,50	18,17	24,041	1,817	0,0756
44,50	41,70	19,18	25,318	1,918	0,0740
46,90	42,80	19,69	27,213	1,969	0,0723

Tabla 15

Titulación de Albúmina (10  $\mu$ M) con Peroxisomcina A1  
en Presencia de Indometacina 20  $\mu$ M.

[PA1]total	$\Delta$ Abs	[PA1]unida	[PA1]libre	r	r/[PA1]libre
28,14	29,80	13,71	14,433	1,371	0,0949
30,48	31,80	14,63	15,853	1,463	0,0923
32,83	33,00	15,18	17,651	1,518	0,0859
35,18	35,20	16,19	18,988	1,619	0,0857
37,52	37,15	17,09	20,432	1,709	0,0836
39,86	39,20	18,03	21,829	1,803	0,0826
42,21	41,00	18,86	23,351	1,886	0,0807
44,50	42,60	19,59	24,905	1,959	0,0787
46,90	43,55	20,03	26,868	2,003	0,0746

Tabla 16

Titulación de Albúmina (10  $\mu\text{M}$ ) con Peroxisomcina A1  
en Presencia de Indometacina 50  $\mu\text{M}$ .

[PA1]total	$\Delta\text{Abs}$	[PA1]unida	[PA1]libre	r	r/[PA1]libre
28,14	29,87	13,74	14,400	1,374	0,0954
30,48	31,30	14,39	16,083	1,439	0,0895
32,83	33,15	15,25	17,581	1,525	0,0867
35,18	35,40	16,28	18,897	1,628	0,0862
37,52	36,00	16,56	20,961	1,656	0,0790
39,86	38,00	17,48	22,381	1,748	0,0781
42,21	39,90	18,35	23,857	1,835	0,0769
44,50	41,80	19,23	25,273	1,923	0,0761
46,90	43,20	19,87	27,029	1,987	0,0735

Tabla 17

Titulación de Albúmina Libre de Acidos Grasos (10  $\mu\text{M}$ ) con  
Peroxisomcina A1 en Presencia de Warfarina 20  $\mu\text{M}$ .

[PA1]total	$\Delta\text{Abs}$	[PA1]unida	[PA1]libre	r	r/[PA1]libre
28,14	29,90	13,75	14,386	1,375	0,0956
30,48	31,80	14,63	15,853	1,463	0,0923
32,83	33,20	15,27	17,559	1,527	0,0869
35,18	35,20	16,19	18,988	1,619	0,0853
37,52	37,22	17,12	20,399	1,712	0,0839
39,86	39,00	17,94	21,921	1,794	0,0818
42,21	40,50	18,63	23,581	1,863	0,0790
44,50	42,30	19,46	25,043	1,946	0,0777
46,90	43,80	20,15	26,753	2,015	0,0753

Posteriormente se graficaron los valores de r/[Peroxisomicina A1]libre en función de r, con lo que resultaron curvas con dos tendencias lineales (ver Figuras 8 a 17).

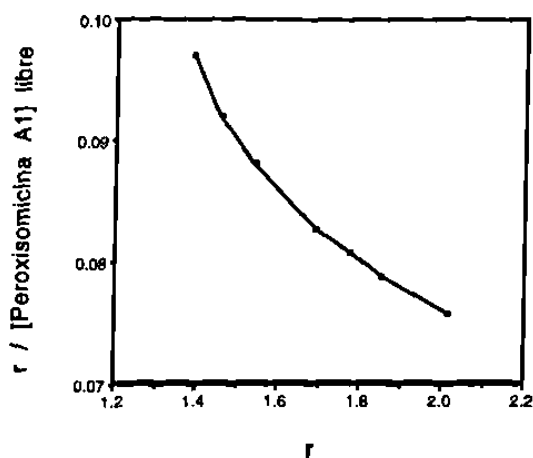


Figura 8a. Gráfica de Scatchard de la Unión Peroxisomicina A1 - Albúmina en Ausencia de Medicamento.

Cada tendencia se trató independientemente. De cada una de ellas se obtuvo una recta con pendiente negativa ( $-K_a$ ) y de intercepto en la abscisa (N). Los valores de N y  $K_a$  para cada curva se muestran en las tabla 18.

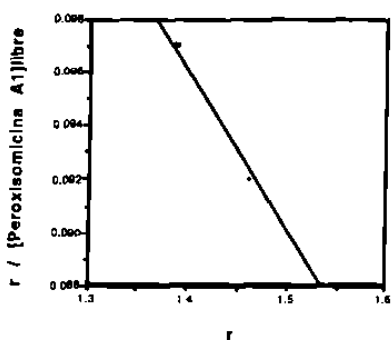


Figura 8b. Gráfica de Scatchard de la Unión Peroxisomicina A1-Albúmina en Ausencia de Medicamento en N1.

$$R^2 = 0,988$$

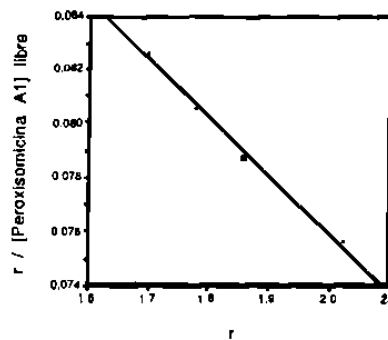


Figura 8c. Gráfica de Scatchard de la Unión Peroxisomicina A1-Albúmina en Ausencia de Medicamento en N2.

$$R^2 = 0,990$$

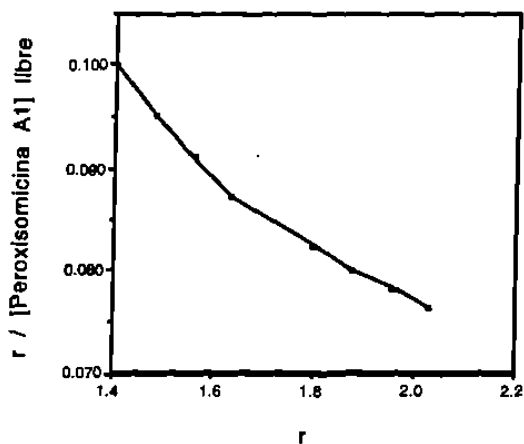


Figura 9a. Gráfica de Scatchard de la Unión Peroxisomicina A1- Albúmina en Presencia de Warfarina 20  $\mu\text{M}$ .

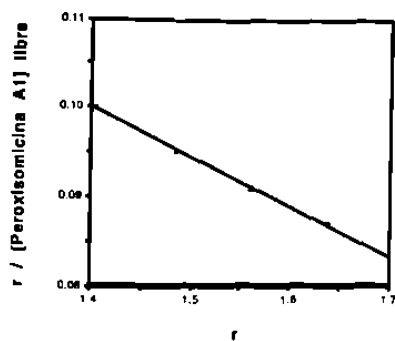


Figura 9b. Gráfica de Scatchard de la Unión Peroxisomicina A1-Albúmina en Presencia de Warfarina 20  $\mu\text{M}$  en N1.  
 $R^2 = 0,998$

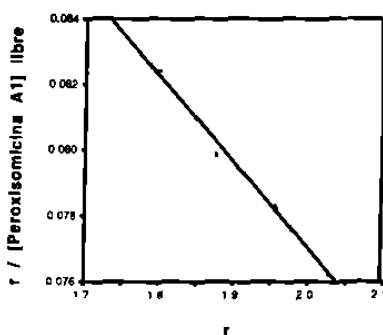


Figura 9c. Gráfica de Scatchard de la Unión Peroxisomicina A1-Albúmina en Presencia de Warfarina 20  $\mu\text{M}$  en N2.  
 $R^2 = 0,992$

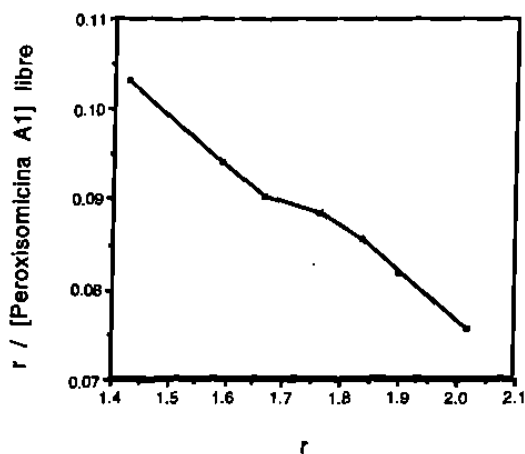


Figura 10a. Gráfica de Scatchard de la Unión Peroxisomicina A1- Albúmina en Presencia de Warfarina 35  $\mu$ M.

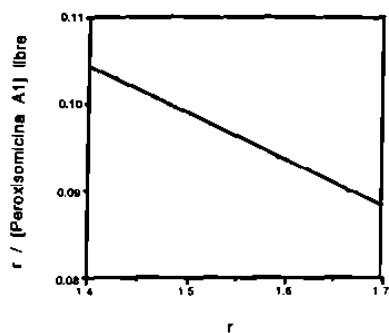


Figura 10b. Gráfica de Scatchard de la Unión Peroxisomicina A1-Albúmina en Presencia de Warfarina 35  $\mu$ M en N1.  
 $R^2 = 0,999$

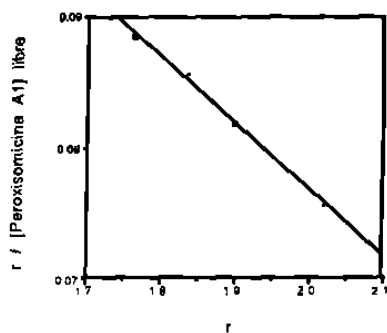


Figura 10c. Gráfica de Scatchard de la Unión Peroxisomicina A1-Albúmina en Presencia de Warfarina 35  $\mu$ M en N2.  
 $R^2 = 0,997$

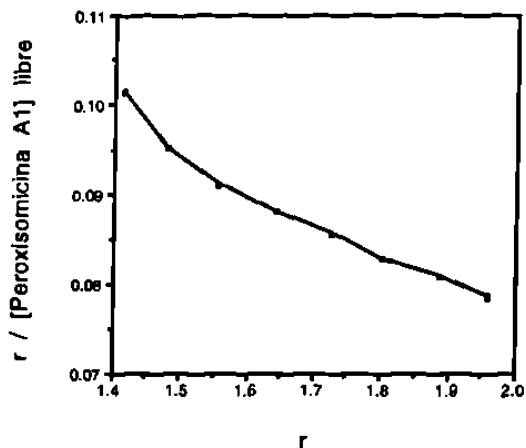


Figura 11a. Gráfica de Scatchard de la Unión Peroxisomicina A1 - Albúmina en Presencia de Warfarina 50  $\mu$ M.

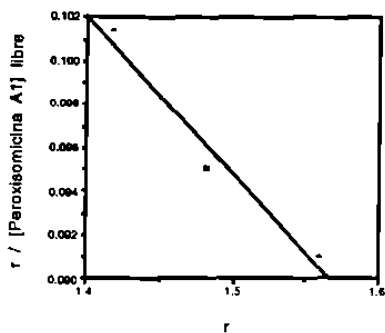


Figura 11b. Gráfica de Scatchard de la Unión Peroxisomicina A1-Albúmina en Presencia de Warfarina 50  $\mu$ M en N1.  
 $R^2 = 0,980$

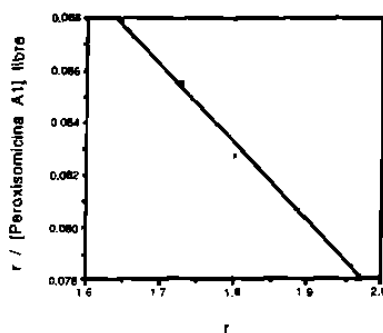


Figura 11c. Gráfica de Scatchard de la Unión Peroxisomicina A1-Albúmina en Presencia de Warfarina 50  $\mu$ M en N2.  
 $R^2 = 0,996$

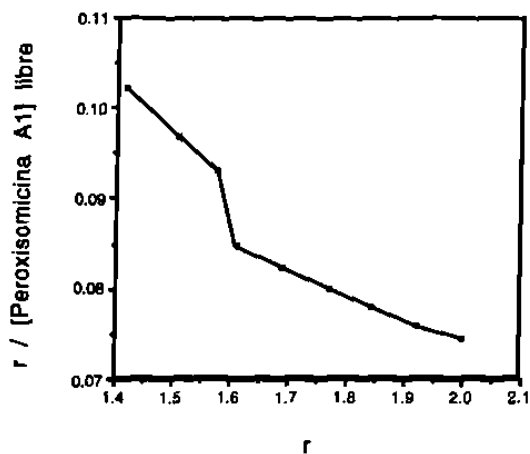


Figura 12a. Gráfica de Scatchard de la Unión Peroxisomicina A1 - Albúmina en Presencia de Warfarina 60  $\mu\text{M}$ .

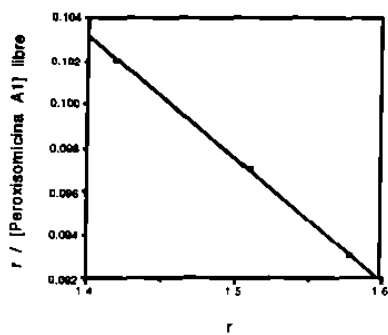


Figura 12b. Gráfica de Scatchard de la Unión Peroxisomicina A1-Albúmina en Presencia de Warfarina 60  $\mu\text{M}$  en N1.  
 $R^2 = 0,998$

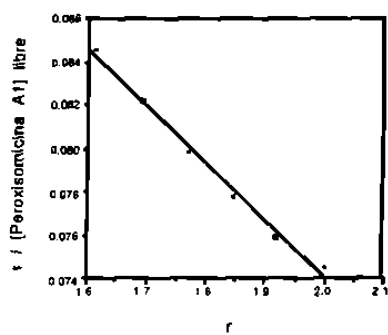


Figura 12c. Gráfica de Scatchard de la Unión Peroxisomicina A1-Albúmina en Presencia de Warfarina 60  $\mu\text{M}$  en N2.  
 $R^2 = 0,993$



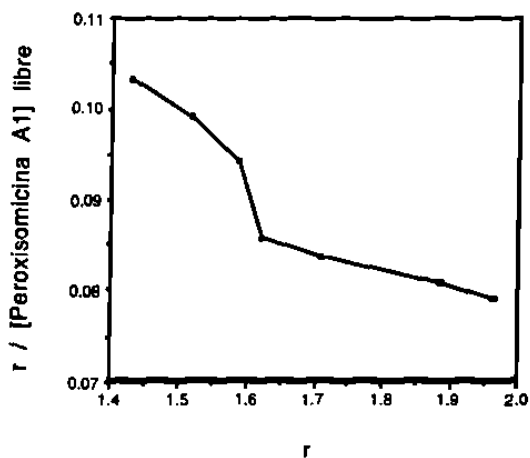


Figura 13a. Gráfica de Scatchard de la Unión Peroxisomicina A1 - Albúmina en Presencia de Fenitoína 20  $\mu$ M.

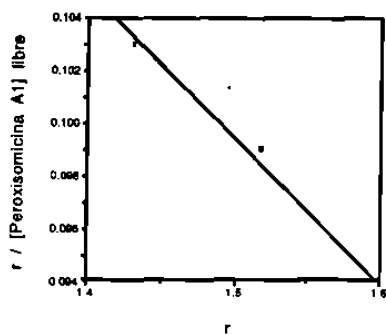


Figura 13b. Gráfica de Scatchard de la Unión Peroxisomicina A1-Albúmina en Presencia de Fenitoína 20  $\mu$ M en N1.

$$R^2 = 0,985$$

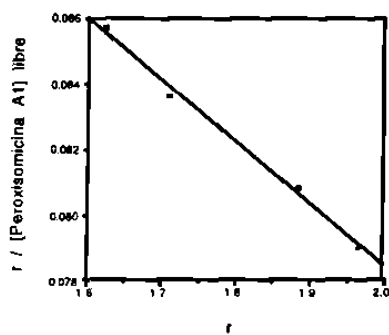


Figura 13c. Gráfica de Scatchard de la Unión Peroxisomicina A1-Albúmina en Presencia de Fenitoína 20  $\mu$ M en N2.

$$R^2 = 0,993$$

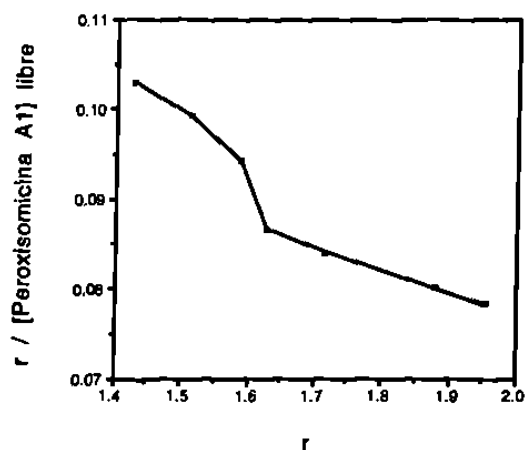


Figura 14a. Gráfica de Scatchard de la Unión Peroxisomicina A1 - Albúmina en Presencia de Fenitoína 50  $\mu$ M.

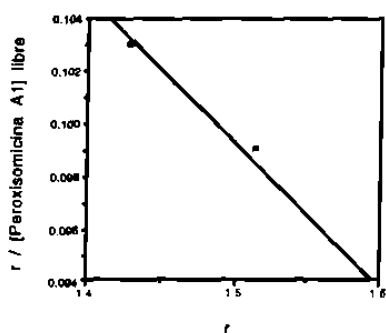


Figura 14b. Gráfica de Scatchard de la Unión Peroxisomicina A1-Albúmina en Presencia de Fenitoína 50  $\mu$ M en N1.  
 $R^2 = 0,988$

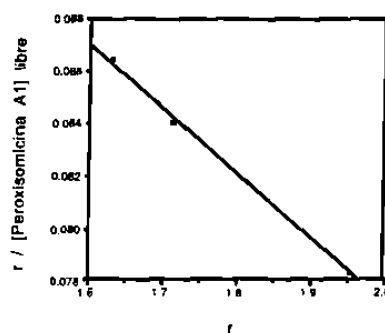


Figura 14c. Gráfica de Scatchard de la Unión Peroxisomicina A1-Albúmina en Presencia de Fenitoína 50  $\mu$ M en N2.  
 $R^2 = 0,998$

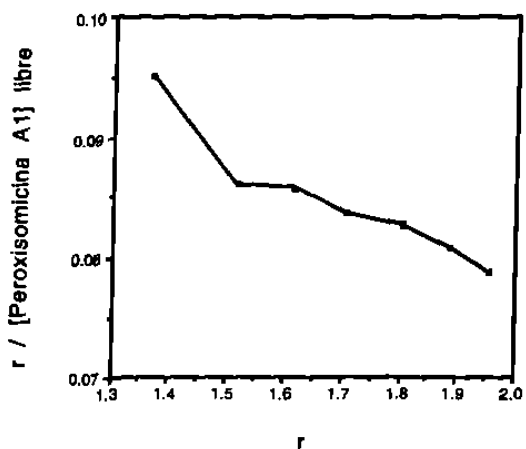


Figura 15a. Gráfica de Scatchard de la Unión Peroxisomicina A1 - Albúmina en Presencia de Indometacina 20  $\mu$ M.

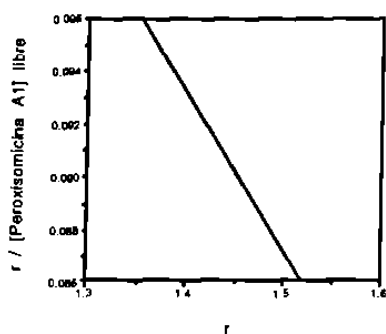


Figura 15b. Gráfica de Scatchard de la Unión Peroxisomicina A1-Albúmina en Presencia de Indometacina 20  $\mu$ M en N1.

$$R^2 = 0,999$$

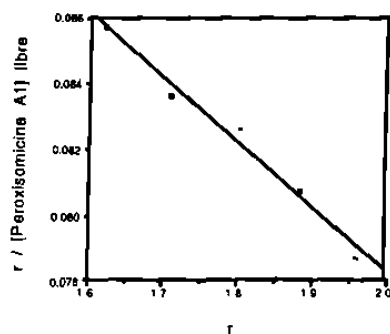


Figura 15c. Gráfica de Scatchard de la Unión Peroxisomicina A1-Albúmina en Presencia de Indometacina 20  $\mu$ M en N2.

$$R^2 = 0,980$$

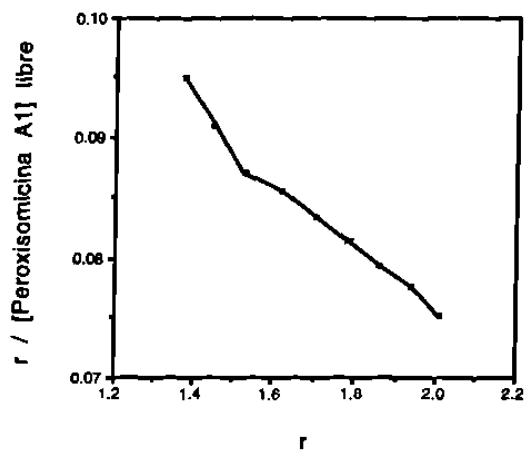


Figura 16a. Gráfica de Scatchard de la Unión Peroxisomicina A1 - Albúmina en Presencia de Indometacina 50  $\mu$ M.

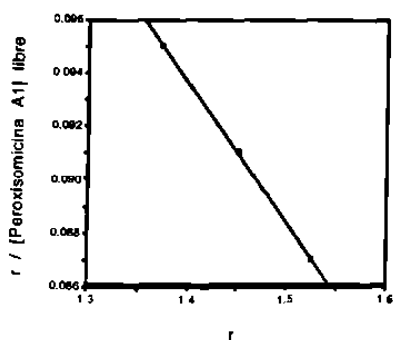


Figura 16b. Gráfica de Scatchard de la Unión Peroxisomicina A1-Albúmina en Presencia de Indometacina 50  $\mu$ M en N1.

$$R^2 = 0,999$$

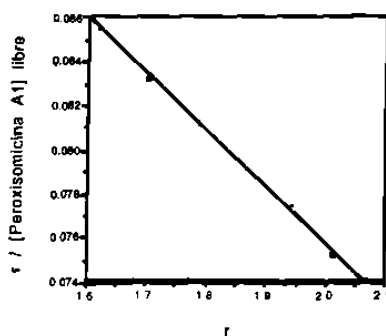


Figura 16c. Gráfica de Scatchard de la Unión Peroxisomicina A1-Albúmina en Presencia de Indometacina 50  $\mu$ M en N2.

$$R^2 = 0,998$$

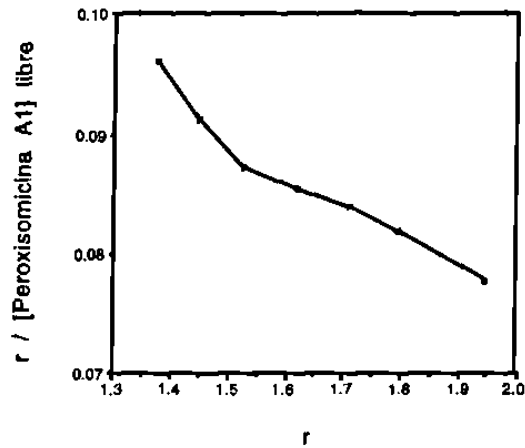


Figura 17a. Gráfica de Scatchard de la Unión Peroxisomicina A1 - Albúmina Libre de Acidos Grasos en Presencia de Warfarina 20  $\mu$ M.

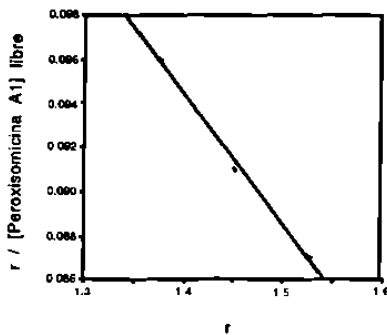


Figura 17b. Gráfica de Scatchard de la Unión Peroxisomicina A1-Albúmina en Presencia de Warfarina 20  $\mu$ M en N1.  
 $R^2 = 0,996$

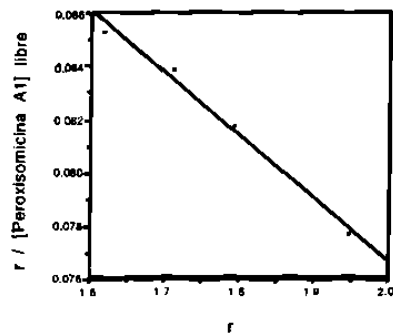


Figura 17c. Gráfica de Scatchard de la Unión Peroxisomicina A1-Albúmina en Presencia de Warfarina 20  $\mu$ M en N2.  
 $R^2 = 0,983$

Tabla 18

Parámetros de Unión de Peroxisomicina A1 - Albúmina en  
Presencia y Ausencia de Medicamentos a pH 7.2 y 25 °C.

	N1	$K_{a1} \times 10^4$ $K \text{ mol}^{-1}$	N2	$K_{a2} \times 10^4$ $K \text{ mol}^{-1}$
Peroxisomicina A1.	$3,00 \pm 0,07$	$5,70 \pm 0,07$	$5,00 \pm 0,08$	$2,50 \pm 0,09$
Peroxisomicina A1 en Presencia de Warfarina 20 $\mu\text{M}$	$3,00 \pm 0,05$	$5,90 \pm 0,13$	$5,00 \pm 0,06$	$2,50 \pm 0,02$
Peroxisomicina A1 en Presencia de Warfarina 35 $\mu\text{M}$	$3,00 \pm 0,08$	$5,80 \pm 0,09$	$5,00 \pm 0,04$	$2,50 \pm 0,02$
Peroxisomicina A1 en Presencia de Warfarina 50 $\mu\text{M}$	$3,00 \pm 0,06$	$5,80 \pm 0,03$	$5,00 \pm 0,06$	$2,60 \pm 0,08$
Peroxisomicina A1 en Presencia de Warfarina 60 $\mu\text{M}$	$3,00 \pm 0,07$	$5,70 \pm 0,03$	$5,00 \pm 0,09$	$2,70 \pm 0,02$
Peroxisomicina A1 en Presencia de Fenitoína 20 $\mu\text{M}$	$3,00 \pm 0,11$	$5,80 \pm 0,12$	$5,00 \pm 0,17$	$2,50 \pm 0,09$
Peroxisomicina A1 en Presencia de Fenitoína 50 $\mu\text{M}$	$3,00 \pm 0,09$	$5,80 \pm 0,22$	$5,00 \pm 0,15$	$2,60 \pm 0,14$
Peroxisomicina A1 en Presencia de Indometacina 20 $\mu\text{M}$	$3,00 \pm 0,03$	$5,70 \pm 0,10$	$5,00 \pm 0,05$	$2,60 \pm 0,02$
Peroxisomicina A1 en Presencia de Indometacina 50 $\mu\text{M}$	$3,00 \pm 0,04$	$5,60 \pm 0,05$	$5,00 \pm 0,05$	$2,50 \pm 0,02$
Peroxisomicina A1 con Albúmina Libre de Acidos Grasos en Presencia de Warfarina 20 $\mu\text{M}$	$3,00 \pm 0,07$	$5,70 \pm 0,06$	$5,00 \pm 0,07$	$2,60 \pm 0,10$

### **3.2 Estudio *in vitro* de las Interacciones de la Warfarina con la Albúmina Libre de Acidos Grasos a pH 7.2 y 25 °C.**

#### **3.2.1 Interacciones entre la Warfarina y la Albúmina Libre de Acidos Grasos en Presencia de Peroxisomicina A1.**

Se obtuvieron los espectros de absorbancia de la warfarina (20  $\mu\text{M}$ ), de la albúmina libre de ácidos grasos (10  $\mu\text{M}$ ) y de la Peroxisomicina A1 (20  $\mu\text{M}$ ) en el intervalo de 200 a 800 nm para poder establecer la señal analítica a usar en la determinación de la warfarina (ver Figura 18).

Se observó que al seguir la señal analítica de la warfarina, la Peroxisomicina A1 tiene una absorbancia residual en el máximo de la warfarina y a otra longitud de onda absorbe la albúmina libre de ácidos grasos.

Por ellos se recurrió a la Espectroscopía de Derivadas; aplicando la técnica del cruce al cero se encontró que a 329 nm la Peroxisomicina A1 y la albúmina libre de ácidos grasos tenían lectura de cero en la primera derivada, por lo que se siguió la señal analítica de la warfarina a esa longitud de onda (ver Figura 19).

#### **3.2.2 Estudio del Equilibrio de la Unión de la Warfarina con la Albúmina Libre de Acidos Grasos en Ausencia de Peroxisomicina A1.**

##### **3.2.2.1 Determinación de $\Delta\text{Abs}_{\text{max}}$ a 25 °C y a pH de 7.2 de la Warfarina.**

Para determinar el  $\Delta\text{Abs}_{\text{max}}$ . se fijó la concentración de warfarina en 30  $\mu\text{M}$  final y la concentración de albúmina varió desde 10 hasta 45  $\mu\text{M}$  (ver Tabla 19).

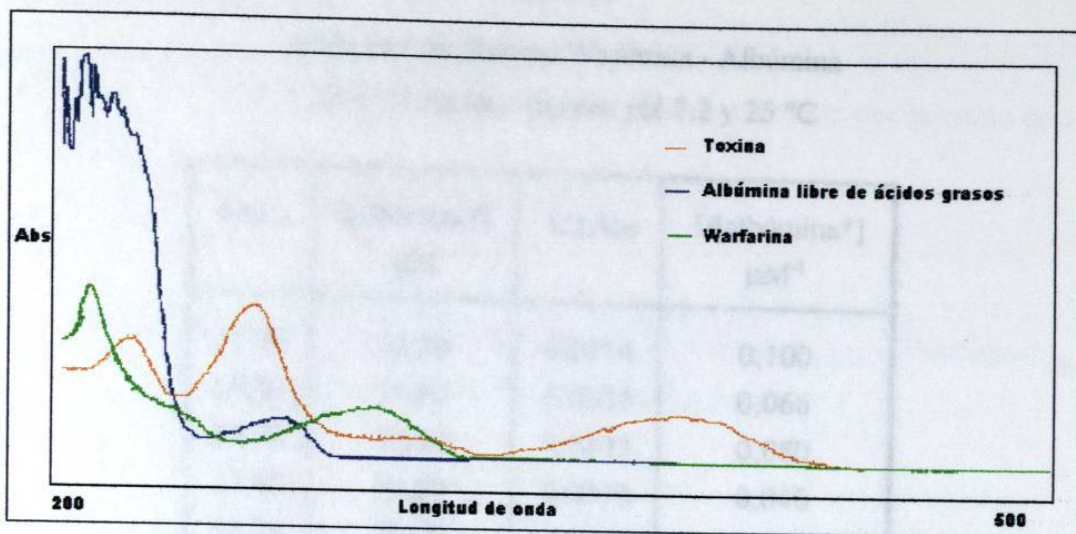


Figura 18. Espectro de Absorción de la Warfarina, Albúmina Libre de Ácidos Grasos y Peroxisomicina A1.

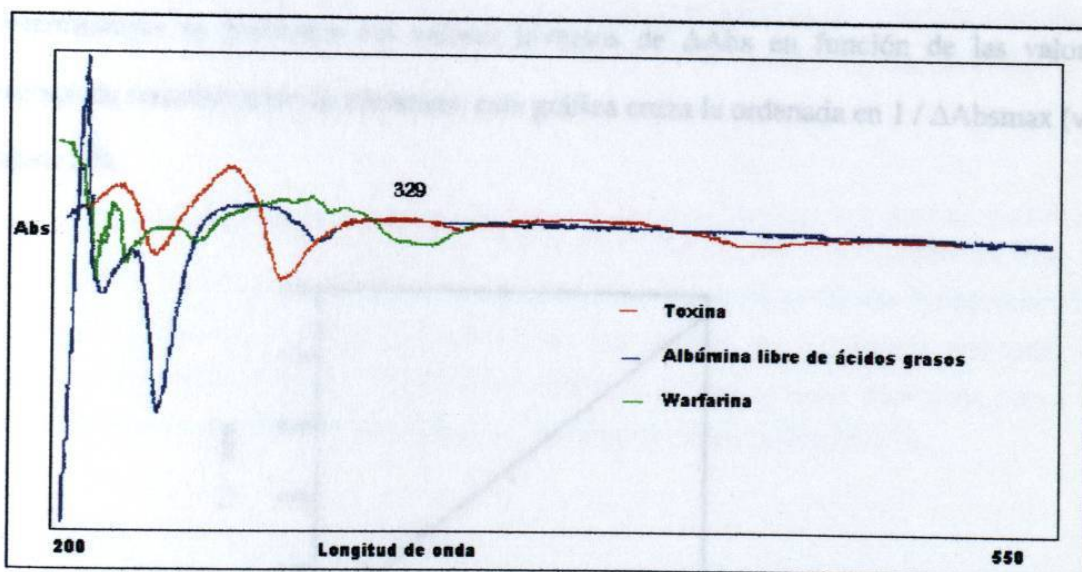


Figura 19. Espectro Derivado de Warfarina, Albúmina Libre de Ácidos Grasos y Peroxisomicina A1

Figura 20. Estimación del  $\Delta\text{Abs}_{\text{max}}$  Warfarina - Albúmina Libre de Ácidos Grasos: pH 7.2 y 25 °C.



Tabla 19

$\Delta$ Absmax del Sistema Warfarina - Albúmina  
Libre de Acidos Grasos: pH 7.2 y 25 °C

$\Delta$ Abs	[albúmina*] $\mu$ M	1/ $\Delta$ Abs	1/[albúmina*] $\mu$ M <sup>-1</sup>
14,00	10,00	0,0714	0,100
18,00	15,00	0,0555	0,066
23,00	20,00	0,0435	0,050
27,00	25,00	0,0370	0,040
29,00	30,00	0,0345	0,033
30,00	35,00	0,0333	0,029
31,00	40,00	0,0323	0,025
32,00	45,00	0,0312	0,022

albúmina\* : albúmina libre de ácidos grasos

Posteriormente se graficaron los valores inversos de  $\Delta$ Abs en función de los valores inversos de concentración de albúmina, esta gráfica cruza la ordenada en  $1 / \Delta$ Absmax (ver Figura 20).

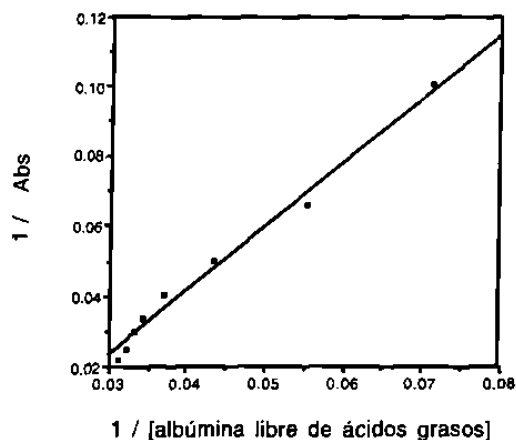


Figura 20. Estimación del  $\Delta$ Absmax Warfarina - Albúmina Libre de Acidos Grasos: pH 7.2 y 25 °C.

La recta cruza la ordenada en  $1/\Delta\text{Absmax} = 0,0178$  ,  $\Delta\text{Absmax} = 56,18$  u.a.

Conociendo el Absmax se calculó el valor de absorbancia obtenido por la unión de  $1\ \mu\text{M}$  de warfarina, dado por  $\alpha$ , dando un valor de 1,8716.

### 3.2.2.2 Determinación de la Concentración de Warfarina <sub>unida</sub> y Warfarina <sub>libre</sub> en Presencia y Ausencia de Peroxisomicina A1.

Conociendo el valor de  $\alpha$  se determinaron los valores de las concentraciones de warfarina unida y libre en presencia y en ausencia Peroxisomicina A1, los cuales se muestran en las columnas 3 y 4 de las tabla 19 a 21.

### 3.2.2.3 Determinación del Número Promedio de Moléculas de Warfarina unidas a la Albúmina Libre de Acidos Grasos ( $r$ ) en Presencia y Ausencia de Peroxisomicina A1.

Con los valores de las concentraciones de warfarina unida a la albúmina libre de ácidos grasos en cada punto de la curva de titulación y tomando en cuenta la concentración de albúmina utilizada ( $10\ \mu\text{M}$ ) se obtuvieron los valores de  $r$  (número promedio de moléculas de warfarina unida a la albúmina libre de ácidos grasos) para cada curva en presencia y ausencia de Peroxisomicina A1, columna 5 de las tablas 20 a 22.

Tabla 20

Titulación de Albúmina Libre de Acidos Grasos (10  $\mu\text{M}$ )  
con Warfarina en Ausencia de Peroxisomicina A1.

[Warf]total	Abs	[Warf] unida	[Warf] libre	r	r/[Warf] libre
8,33	8,0	4,2744	4,0556	0,4274	0,1054
12,50	11,0	5,8773	6,6227	0,5877	0,0887
16,66	13,0	6,9459	9,7141	0,6946	0,0715
20,83	16,0	8,5488	12,2811	0,8549	0,0696
25,00	18,2	9,7243	15,2757	0,9724	0,0637
29,16	20,0	10,6860	18,4739	1,0686	0,0578
33,33	22,0	11,7360	21,5754	1,1755	0,0545
37,50	23,5	12,5561	24,9439	1,2556	0,0503

Tabla 21

Titulación de Albúmina Libre de Acidos Grasos(10  $\mu\text{M}$ )  
con Warfarina en Presencia de Peroxisomicina A1 20  $\mu\text{M}$ .

[Warf]total	Abs	[Warf] unida	[Warf] libre	r	r/[Warf] libre
12,50	21,0	11,2203	1,2797	1,1220	0,8768
16,66	24,0	12,8233	3,8367	1,2823	0,3342
20,83	26,0	13,8918	6,9381	1,3892	0,2002
25,00	28,0	14,9604	10,0395	1,4960	0,1490
29,16	29,0	15,4948	13,6652	1,5495	0,1134
33,33	30,0	16,0291	17,3009	1,6029	0,0926
37,50	31,0	16,5633	20,9366	1,6563	0,0791

Tabla 22

Titulación de Albúmina Libre de Ácidos Grasos (10  $\mu\text{M}$ )  
con Warfarina en Presencia de Peroxisomicina A1 40  $\mu\text{M}$ .

[Warf]total	Abs	[Warf] unida	[Warf] libre	r	r/[Warf] libre
12,50	20,5	10,9532	1,5468	1,0953	0,7081
16,66	23,0	12,2889	4,3710	1,2289	0,2811
20,83	25,0	13,3576	7,4724	1,3358	0,1788
25,00	27,0	14,4262	10,5738	1,4426	0,1364
29,16	28,0	14,9605	14,1995	1,4960	0,1054
33,33	29,0	15,4948	17,8352	1,5495	0,0869
37,50	30,0	16,0290	21,4709	1,6029	0,0747

Posteriormente se graficaron los valores de  $r/[\text{warfarina}]_{\text{libre}}$  en función de r, con lo que resultaron curvas con dos tendencias lineales (ver Figuras 21 a 23).

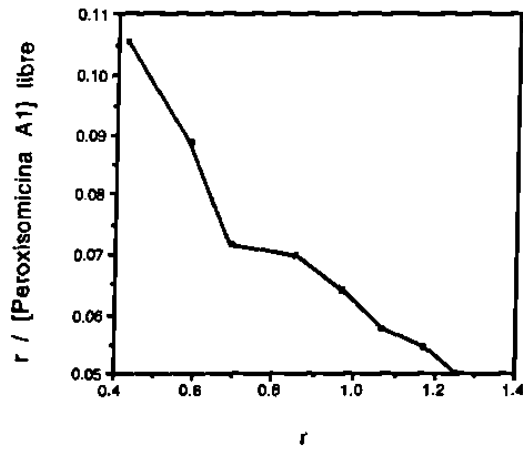


Figura 21a. Gráfica de Scatchard de la Unión Warfarina - Albúmina Libre de Acidos Grasos en Ausencia de Peroxisomicina A1.

Cada tendencia se trató independientemente. De cada una de ellas se obtuvo una recta con pendiente negativa ( $-K_a$ ) y de intercepto en la abscisa ( $N$ ). Los valores de  $N$  y  $K_a$  para cada curva se muestran en la tabla 23.

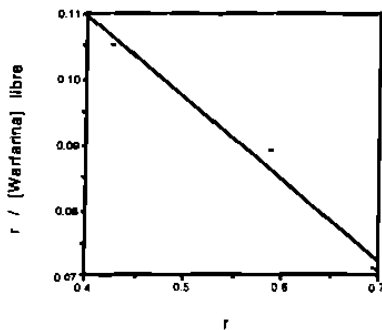


Figura 21b. Gráfica de Scatchard de la Unión Warfarina - Albúmina en Ausencia de Peroxisomicina A1 en N1.

$$R^2 = 0,980$$

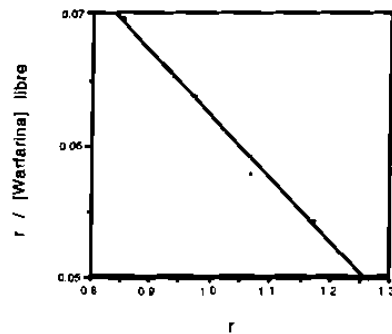


Figura 21c. Gráfica de Scatchard de la Unión Warfarina - Albúmina en Ausencia de Peroxisomicina A1 en N2.

$$R^2 = 0,992$$

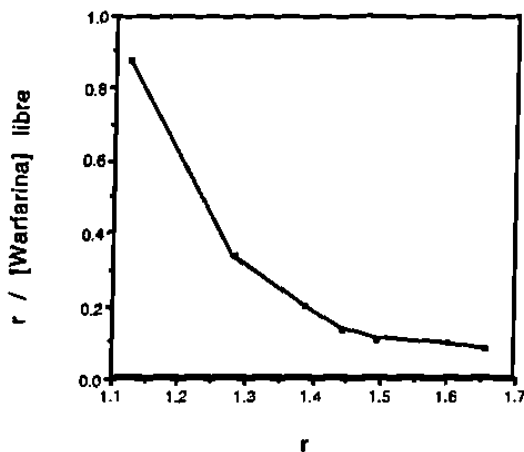


Figura 22a. Gráfica de Scatchard de la Unión Warfarina - Albúmina Libre de Acidos Grasos en Presencia de Peroxisomicina A1 20  $\mu$ M.

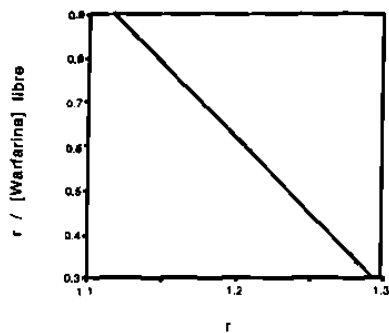


Figura 22b. Gráfica de Scatchard de la Unión Warfarina - Albúmina en Presencia de Peroxisomicina A1 20  $\mu$ M en N1.

$$R^2 = 0,999$$

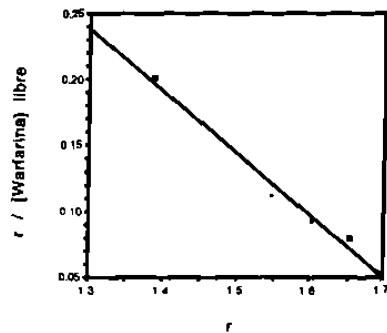


Figura 22c. Gráfica de Scatchard de la Unión Warfarina - Albúmina en Presencia de Peroxisomicina A1 20  $\mu$ M en N2.

$$R^2 = 0,983$$

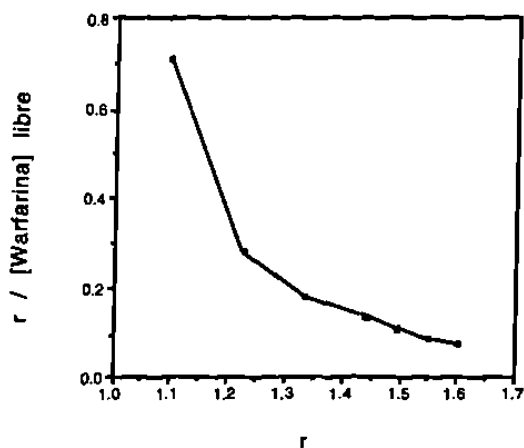


Figura 23a. Gráfica de Scatchard de la Unión Warfarina - Albúmina Libre de Acidos Grasos en Presencia de Peroxisomicina A1 40  $\mu$ M.

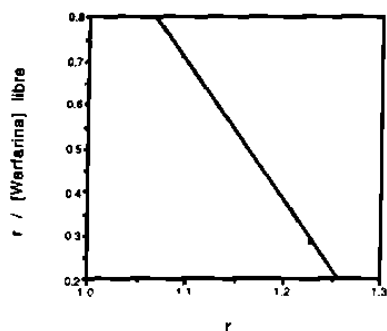


Figura 22b. Gráfica de Scatchard de la Unión Warfarina - Albúmina en Presencia de Peroxisomicina A1 40  $\mu$ M en N1.

$$R^2 = 0,999$$

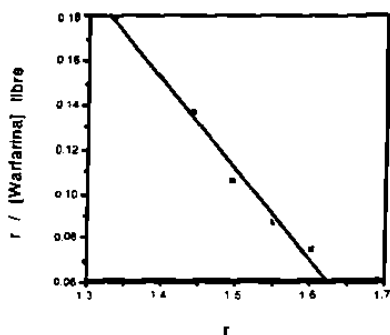


Figura 22c. Gráfica de Scatchard de la Unión Warfarina - Albúmina en Presencia de Peroxisomicina A1 40  $\mu$ M en N2.

$$R^2 = 0,985$$

Tabla 23

Parámetros de Unión de Warfarina - Albúmina Libre de Acidos Grasos  
en Presencia y Ausencia de Peroxisomicina A1 a pH 7.2 y 25 °C.

	N1	$Ka1 \times 10^6$ K mol <sup>-1</sup>	N2	$Ka2 \times 10^5$ K mol <sup>-1</sup>
Warfarina en Ausencia de PA1	1,27 ± 0,16	0,125 ± 0,055	2,31 ± 0,16	0,475 ± 0,049
Warfarina en Presencia de PA1 20 µM	1,38 ± 0,01	3,394 ± 0,250	1,80 ± 0,06	4,703 ± 0,640
Warfarina en Presencia de PA1 40 µM	1,31 ± 0,06	3,187 ± 0,104	1,77 ± 0,08	4,049 ± 0,177

### 3.3 Estudio *in vitro* de las Interacciones de la Indometacina con la Albúmina a pH 7.2 y 25 °C.

#### 3.3.1 Interacciones entre la Indometacina y la Albúmina en Presencia de Peroxisomicina A1.

Se obtuvieron los espectros de absorbancia de la indometacina (20 µM), de la albúmina (10 µM) y de la Peroxisomicina A1 (20 µM) en el intervalo de 200 a 800 nm para poder establecer la señal analítica de la indometacina (ver Figura 24).

Se observó que al seguir la señal analítica de la indometacina, la Peroxisomicina A1 y la albúmina a las concentraciones utilizadas tenían valores de absorbancia mayores que los de la indometacina.



Por ello se recurrió a la Espectroscopía de Derivadas; aplicando la técnica del cruce al cero se encontró que a 314 nm la Peroxisomicina A1 y la albúmina tenían una lectura de cero en la primera derivada (ver Figura 25), por lo que se siguió la señal analítica de la indometacina a esa longitud de onda.

### 3.3.2 Estudio del Equilibrio de la Unión de la Indometacina con la Albúmina en Ausencia de Peroxisomicina A1.

#### 3.3.2.1 Determinación de $\Delta\text{Abs}_{\text{max}}$ a 25 °C y a pH de 7.2 de la Indometacina.

Para determinar el  $\Delta\text{Abs}_{\text{max}}$ , se fijó la concentración de indometacina en 50  $\mu\text{M}$  final y la concentración de albúmina varió desde 10 hasta 45  $\mu\text{M}$  (ver Tabla 24).

Tabla 24

$\Delta\text{Abs}_{\text{max}}$  del Sistema Indometacina - Albúmina:  
pH 7.2 y 25 °C

$\Delta\text{Abs}$	[albúmina] $\mu\text{M}$	$1/\Delta\text{Abs}$	$1/[\text{albúmina}]$ $\mu\text{M}^{-1}$
14,7	10,00	0,06803	0,1000
24,4	15,00	0,04098	0,0666
28,4	20,00	0,03521	0,0500
31,5	25,00	0,02755	0,0400
36,3	30,00	0,02564	0,0333
39,0	35,00	0,02294	0,0286
43,6	40,00	0,02208	0,0250

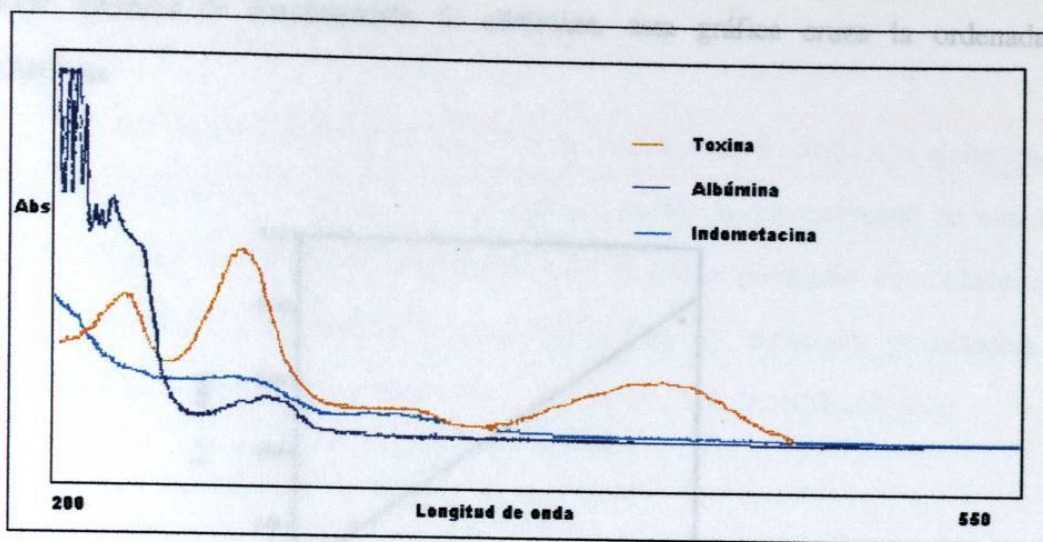


Figura 24. Espectro de Absorción de Indometacina, Albúmina y Peroxisomicina A1

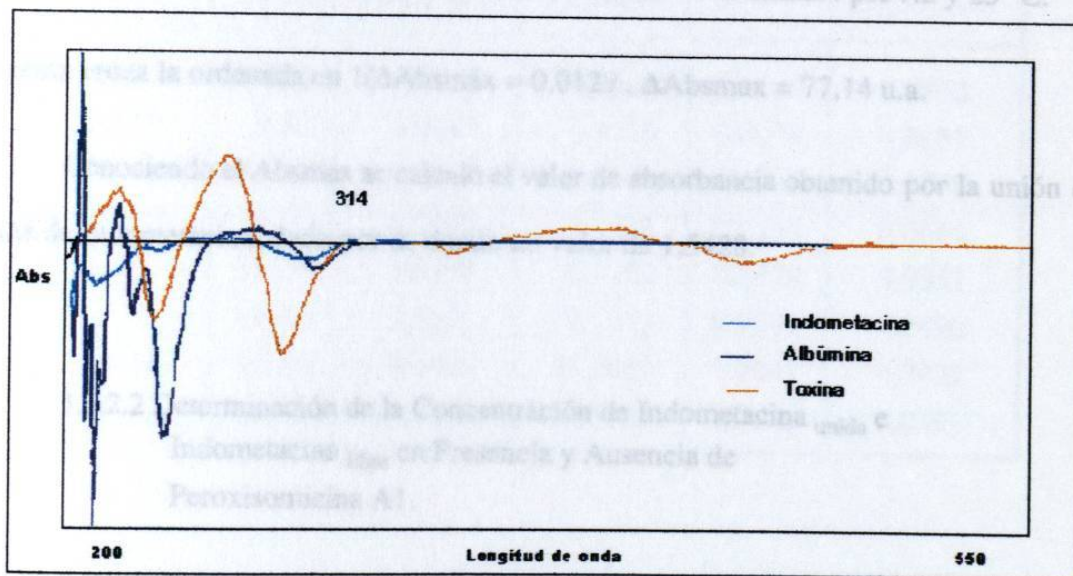


Figura 25. Espectro Derivado de Indometacina, Albúmina y Peroxisomicina A1

Posteriormente se graficaron los valores inversos de  $\Delta\text{Abs}$  en función de los valores inversos de concentración de albúmina, esta gráfica cruza la ordenada en  $1/\Delta\text{Abs}_{\text{max}}$

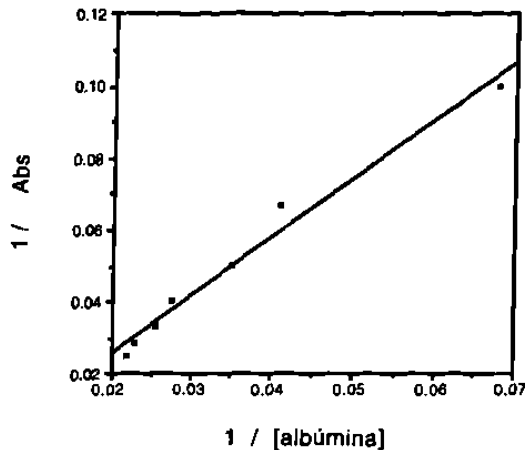


Figura 26. Estimación del  $\Delta\text{Abs}_{\text{max}}$  Indometacina - Albúmina : pH 7.2 y 25 °C.

La recta cruza la ordenada en  $1/\Delta\text{Abs}_{\text{max}} = 0,0129$  ,  $\Delta\text{Abs}_{\text{max}} = 77,14$  u.a.

Conociendo el  $\text{Abs}_{\text{max}}$  se calculó el valor de absorbancia obtenido por la unión de  $1 \mu\text{M}$  de indometacina, dado por  $\alpha$ , dando un valor de 1,5428.

### 3.3.2.2 Determinación de la Concentración de Indometacina <sub>unida</sub> <sup>e</sup> Indometacina <sub>libre</sub> en Presencia y Ausencia de Peroxisomicina A1.

Conociendo el valor de  $\alpha$  se determinaron los valores de las concentraciones de indometacina unida y libre en presencia y en ausencia Peroxisomicina A1, los cuales se muestran en las columnas 3 y 4 de las tablas 25 a 26.

3.3.2.3 Determinación del Número Promedio de Moléculas de Indometacina unidas a la Albúmina (r) en Presencia y Ausencia de Peroxisomicina A1.

Con los valores de las concentraciones de indometacina unida a la albúmina en cada punto de la curva de titulación y tomando en cuenta la concentración de albúmina utilizada (10  $\mu\text{M}$ ) se obtuvieron los valores de r (número promedio de moléculas de indometacina unida a la albúmina) para cada curva en presencia y ausencia de Peroxisomicina A1, los cuales se muestran en la columna 5 de las tablas 25 a 26.

Tabla 25

Titulación de Albúmina Libre de Acidos Grasos(10  $\mu\text{M}$ ) con Indometacina en Ausencia de Peroxisomicina A1

[Ind]total	$\Delta\text{Abs}$	[Ind]unida	[Ind]libre	r	r/[Ind]libre
8,33	6,30	4,0835	4,2465	0,4083	0,0962
12,50	9,30	6,0280	6,4719	0,6028	0,0931
16,66	11,10	7,1947	9,4653	0,7195	0,0760
20,833	12,80	8,2966	12,5334	0,8297	0,0662
25,00	13,70	8,8799	16,1200	0,8879	0,0551
29,16	14,80	9,5929	19,5671	0,9593	0,0490
33,33	15,50	10,0466	23,2833	1,0047	0,0432
37,5	16,30	10,5652	26,9348	1,0565	0,0392

Tabla 26

Titulación de Albúmina Libre de Acidos Grasos(10  $\mu$ M) con  
Indometacina en Presencia de Peroxisomicina A1 40  $\mu$ M

[Ind]total	$\Delta$ Abs	[Ind]unida	[Ind]libre	r	r/[Ind]libre
8,33	6,35	4,1159	4,2141	0,4116	0,0977
12,50	9,38	6,0798	6,4201	0,6079	0,0947
16,66	11,00	7,1299	9,5301	0,7129	0,0748
20,83	12,40	8,0373	12,7927	0,8037	0,0628
25,00	13,60	8,8151	16,1849	0,8815	0,0545
29,16	14,50	9,3985	19,7615	0,9398	0,0476
33,33	15,20	9,8522	23,4778	0,9852	0,0419
37,5	15,90	10,3059	27,1941	1,0306	0,0379

Posteriormente se graficaron los valores de r/[indometacina]libre en función de r, con lo que resultaron curvas con dos tendencias lineales (ver Figuras 27 y 28).

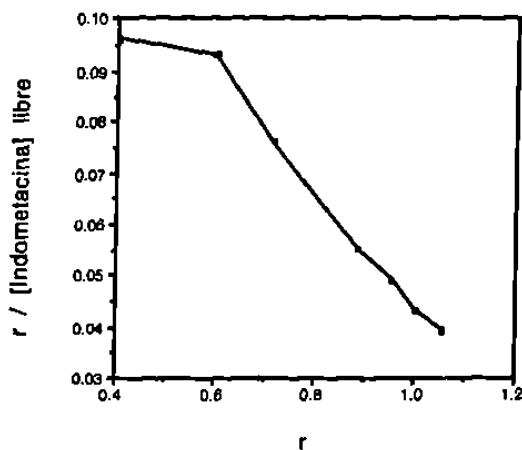


Figura 27a. Gráfica de Scatchard de la Unión Indometacina - Albúmina en Ausencia de Peroxisomicina A1.

Cada tendencia se trató independientemente. De cada una de ellas se obtuvo una recta con pendiente negativa ( $-K_a$ ) y de intercepto en la abscisa ( $N$ ). Los valores de  $N$  y  $K_a$  para cada curva se muestran en las tabla 27.

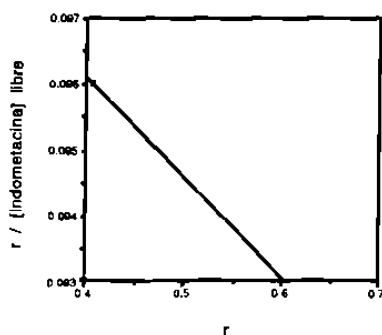


Figura 27b. Gráfica de Scatchard de la Unión Indometacina - Albúmina en Ausencia de Peroxisomicina A1

20  $\mu$ M en N1.

$$R^2 = 0,999$$

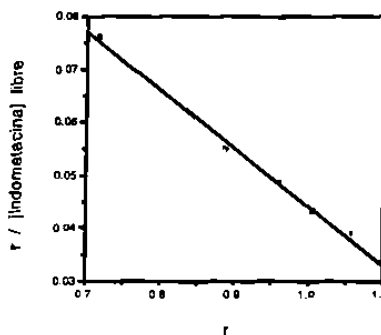


Figura 27c. Gráfica de Scatchard de la Unión Indometacina - Albúmina en Ausencia de Peroxisomicina A1

20  $\mu$ M en N2.

$$R^2 = 0,994$$

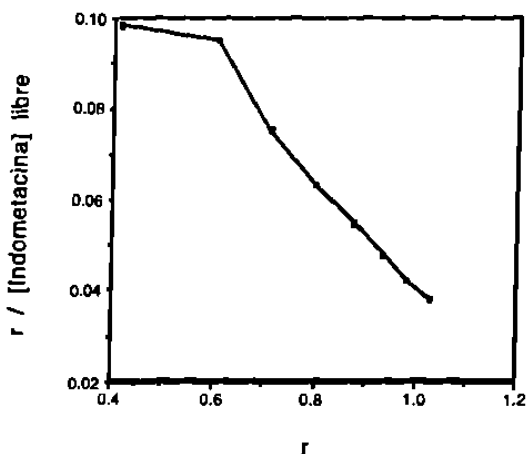


Figura 28a. Gráfica de Scatchard de la Unión Indometacina - Albúmina en Presencia de Peroxisomicina A1 40  $\mu\text{M}$ .

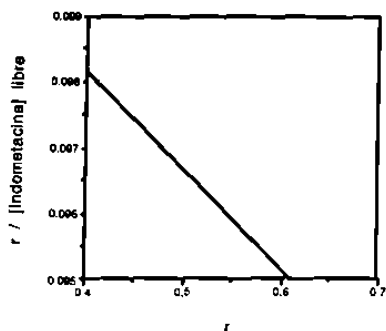


Figura 28b. Gráfica de Scatchard de la Unión Indometacina - Albúmina en Presencia de Peroxisomicina A1 20  $\mu\text{M}$  en N1.  
 $R^2 = 0,999$

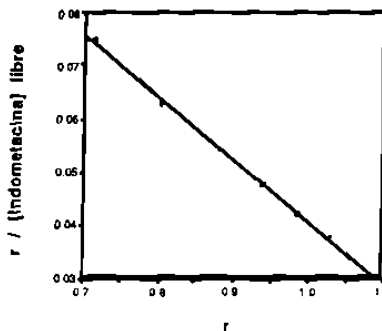


Figura 28c. Gráfica de Scatchard de la Unión Indometacina - Albúmina en Presencia de Peroxisomicina A1 20  $\mu\text{M}$  en N2.  
 $R^2 = 0,998$

Tabla 27

Parámetros de Unión de Indometacina - Albúmina en Presencia  
y Ausencia de Peroxisomicina A1 a pH 7.2 y 25 °C.

	N1	$K_{a1} \times 10^4$ K mol <sup>-1</sup>	N2	$K_{a2} \times 10^5$ K mol <sup>-1</sup>
Indometacina en Ausencia de PA1	6,65 ± 0,12	1,540 ± 0,026	1,40 ± 0,02	1,101 ± 0,058
Indometacina en Presencia de PA1 40 μM	6,81 ± 0,08	1,530 ± 0,019	1,35 ± 0,01	1,165 ± 0,013

### 3.4 Estudio *in vitro* de las interacciones de la Fenitoína con la Albúmina Libre de Acidos Grasos a pH 7.2 y 25 °C.

#### 3.4.1 Interacciones entre la Fenitoína y la Albúmina Libre de Acidos Grasos en Presencia de Peroxisomicina A1.

Se obtuvieron los espectros de absorbancia de la fenitoína (20 μM), de la albúmina libre de ácidos grasos (10 μM) y de la Peroxisomicina A1 (20 μM) en el intervalo de 200 a 800 nm para poder establecer la señal analítica de la fenitoína (ver Figura 29).

Como se observa en la figura 29 la fenitoína casi no absorbe al UV-VIS. Tampoco se encontró una señal analítica útil en los espectros derivados (ver Figura 30).

Por medio de Espectroscopía de Fluorescencia se determinaron las longitudes de onda de emisión y excitación para la Peroxisomicina A1, la albúmina libre de ácidos grasos y la fenitoína.



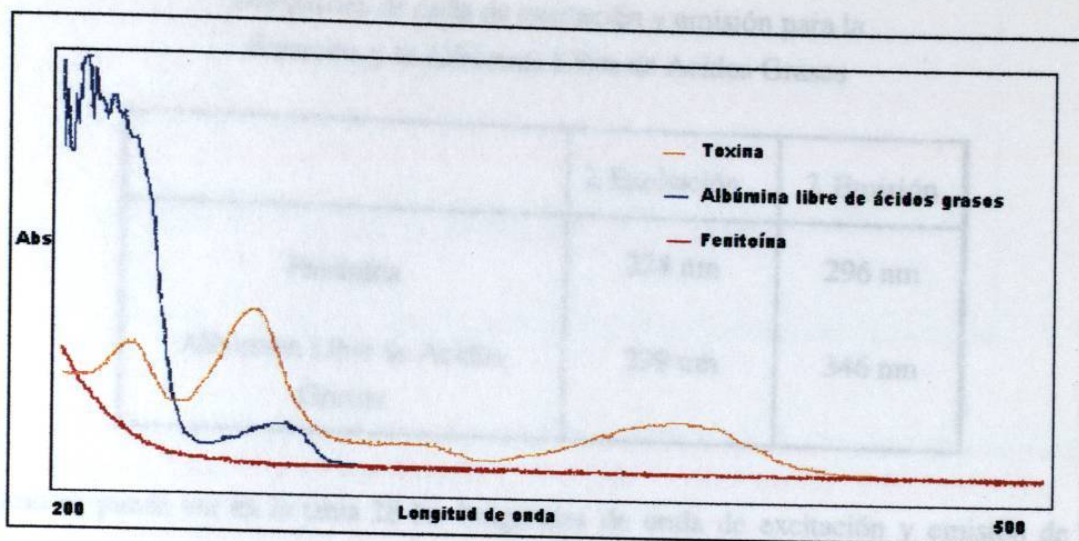


Figura 29. Espectro de Absorción de Fenitoína, Albúmina Libre de Ácidos Grasos y Peroxisomicina A1

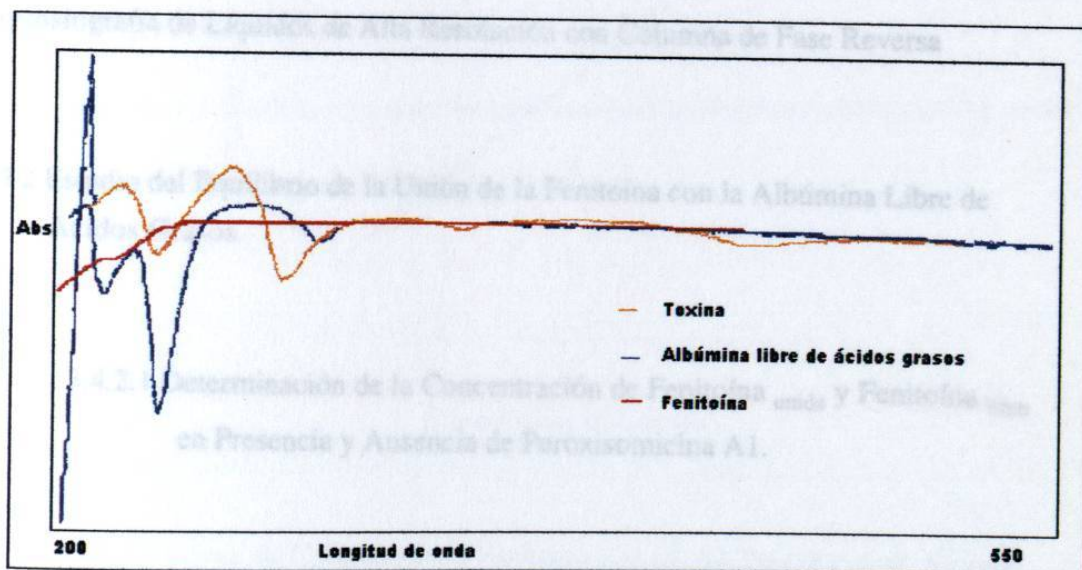


Figura 30. Espectro Derivado de Fenitoína, Albúmina Libre de Ácidos Grasos y Peroxisomicina A1

Las longitudes de onda encontradas fueron las siguientes (ver Tabla 28):

Tabla 28

Longitudes de onda de excitación y emisión para la Fenitoína y la Albúmina Libre de Acidos Grasos

	$\lambda$ Excitación	$\lambda$ Emisión
Fenitoína	224 nm	296 nm
Albúmina Libre de Acidos Grasos	239 nm	346 nm

Como se puede ver en la tabla 28 las longitudes de onda de excitación y emisión de la albúmina y la fenitoína están muy cercanos por lo que fue difícil escoger una longitud de onda en la que no emitiera la molécula de albúmina; la Peroxisomicina A1 no interfería en este estudio.

Por ello se recurrió a la técnica con separación previa de Cromatografía en su modalidad de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución con Columna de Fase Reversa

### 3.4.2 Estudio del Equilibrio de la Unión de la Fenitoína con la Albúmina Libre de Acidos Grasos.

#### 3.4.2.1 Determinación de la Concentración de Fenitoína <sub>unida</sub> y Fenitoína <sub>libre</sub> en Presencia y Ausencia de Peroxisomicina A1.

Conociendo la altura del pico de la fenitoína en el Cromatograma (ver Figura 31) para cada experimento, ésta se relaciona con la concentración de fenitoína libre, interpolando los resultados en la curva de calibración antes obtenida (ver Figura 32).

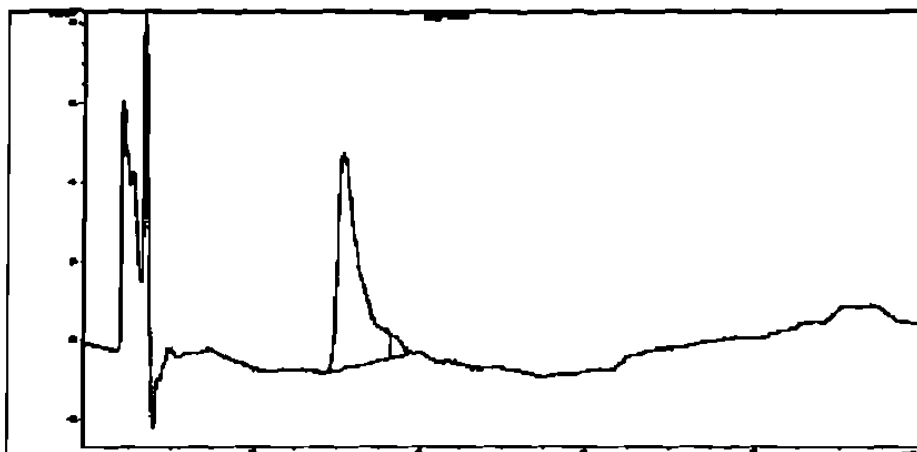


Figura 31. Cromatograma de la Fenitoína. Columna ODS hypersil 100 x 2.1, Diámetro de Partícula 5 micras, Eluente Amortiguador de Fosfato : Acetonitrilo 70:30, Isocrático.

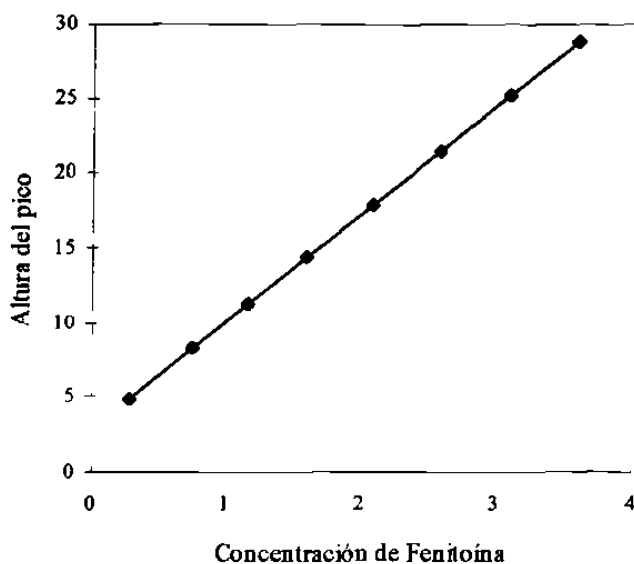


Figura 32. Curva de Calibración de Fenitoína por CLAR Fase Reversa. Eluente Amortiguador de Fosfato : Acetonitrilo 70:30, Isocrático.

$$R^2 = 0.999$$

Se trabajó en el rango de 8.33 a 37.5  $\mu\text{M}$  de fenitoína, en el cual se demostró la linealidad en la curva de calibración, de acuerdo a la ecuación de la recta obtenida:

$y = -0.41242 + 0.13915 x$ . El límite de cuantificación es de  $7.72 \pm 0.05$ .

Las concentraciones de fenitoína unida se calcularon por la diferencia entre la fenitoína libre y la total (ver Tabla 29).

#### 3.4.2.2 Determinación del Número Promedio de Moléculas de Fenitoína unida a la Albúmina Libre de Ácidos Grasos ( $r$ ) en Presencia y Ausencia de Peroxisomicina A1.

Con los valores de las concentraciones de fenitoína unida a la albúmina libre de ácidos grasos en cada punto de la curva de titulación y tomando en cuenta la concentración de albúmina utilizada (10  $\mu\text{M}$ ) se obtuvieron los valores de  $r$  (número promedio de moléculas de fenitoína unida a la albúmina) para cada curva en presencia y ausencia de Peroxisomicina A1, los cuales se muestran en las columnas 4 y 5 de las tablas 29 y 30.

Tabla 29

Titulación de Albúmina Libre de Acidos Grasos (10  $\mu$ M) con Fenitoína en Ausencia de Peroxisomicina A1 40  $\mu$ M.

[Fen] libre	[Fen] total	[Fen] unida	r	r / [Fen]libre
7,7227	12,500	4,7773	0,4773	0,0619
10,6281	16,666	6,0379	0,6037	0,0568
13,6216	20,833	7,2114	0,7211	0,0529
16,4389	25,000	8,5610	0,8561	0,0521
19,4325	29,166	9,7335	0,9733	0,0501
22,4259	33,333	10,9070	1,0907	0,0487
25,4194	37,500	12,0806	1,2081	0,0475

Tabla 30

Titulación de Albúmina Libre de Acidos Grasos (10  $\mu$ M) con Fenitoína en Presencia de Peroxisomicina A1 40  $\mu$ M.

[Fen] libre	[Fen] total	[Fen] unida	r	r / [Fen]libre
8,1629	12,500	4,3371	0,4337	0,0531
11,2444	16,666	5,4216	0,5422	0,0482
14,3259	20,833	6,5070	0,6507	0,0454
17,3134	25,000	7,6806	0,7681	0,0443
20,4889	29,166	8,6770	0,8677	0,0423
23,5705	33,333	9,7625	0,9762	0,0414
26,6521	37,500	10,8479	1,0848	0,0407

Posteriormente se graficaron los valores de  $r/[\text{indometacina}]_{\text{libre}}$  en función de r, con lo que resultaron curvas con dos tendencias lineales (ver Figuras 33 y 34).

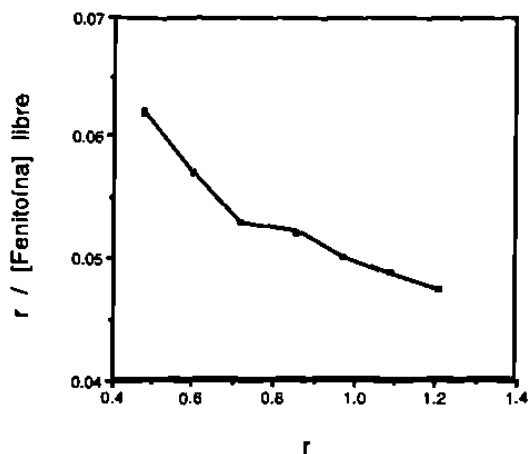


Figura 33a. Gráfica de Scatchard de la Unión Fenitoína - Albúmina Libre de Acidos Grasos en Ausencia de Peroxisomicina A1.

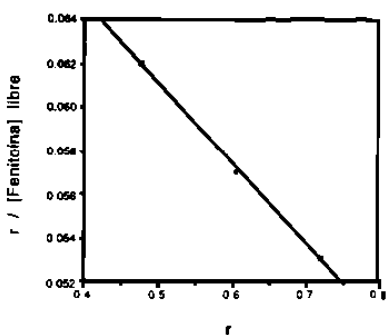


Figura 33b. Gráfica de Scatchard de la Unión Fenitoína - Albúmina en Ausencia de Peroxisomicina A1 en N1.

$$R^2 = 0,998$$

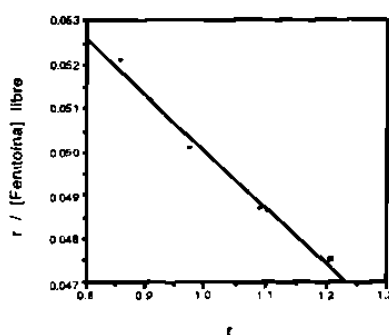


Figura 33c. Gráfica de Scatchard de la Unión Fenitoína - Albúmina en Ausencia de Peroxisomicina A1 en N2.

$$R^2 = 0,986$$

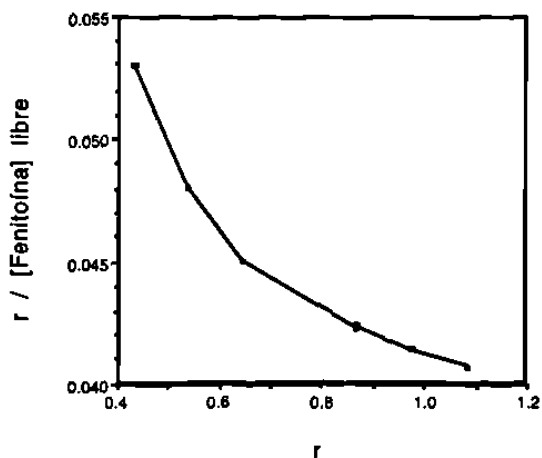


Figura 34a. Gráfica de Scatchard de la Unión Fenitoína - Albúmina Libre de Acidos Grasos en Presencia de Peroxisomicina A1 40  $\mu$ M.

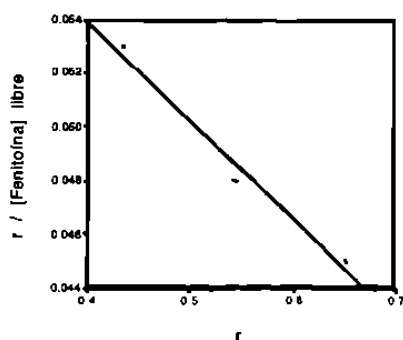


Figura 34b. Gráfica de Scatchard de la Unión Fenitoína - Albúmina en Presencia de Peroxisomicina A1 40  $\mu$ M en N1.

$$R^2 = 0,980$$

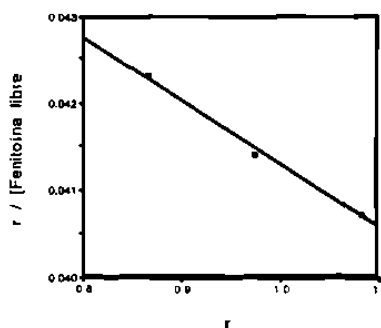


Figura 34c. Gráfica de Scatchard de la Unión Fenitoína - Albúmina en Presencia de Peroxisomicina A1 40  $\mu$ M en N2.

$$R^2 = 0,990$$

Tabla 31

Parámetros de Unión de Fenitoína - Albúmina Libre de Acidos Grasos en  
Presencia y Ausencia de Peroxisomicina A1 a pH 7.2 y 25 °C.

	N1	$K_{a1} \times 10^4$ $K \text{ mol}^{-1}$	N2	$K_{a2} \times 10^4$ $K \text{ mol}^{-1}$
Fenitoína en Ausencia de PA1	$2,15 \pm 0,08$	$3,69 \pm 0,05$	$5,34 \pm 0,40$	$1,29 \pm 0,06$
Fenitoína en Presencia de PA1 40 $\mu\text{M}$	$1,86 \pm 0,12$	$3,68 \pm 0,04$	$4,76 \pm 0,01$	$1,09 \pm 0,08$



## CAPITULO 4

### DISCUSION

Para realizar el estudio de la competencia entre la Peroxisomicina A1 con la warfarina, fenitoína y/o indometacina por los sitios de unión en la albúmina, se utilizó la técnica de Espectroscopía UV-VIS por ser una técnica sencilla, rápida y útil para el análisis cuantitativo. Así mismo, esta técnica fue empleada por Caballero <sup>(18)</sup> durante su trabajo de investigación siguiendo la señal analítica de la Peroxisomicina A1 a 422 nm con resultados favorables. La albúmina es la proteína que se une con mayor afinidad a los medicamentos ácidos. Se trabajó con albúmina sérica bovina ya que se obtuvieron resultados similares a los obtenidos con la albúmina sérica humana ; además es más fácil de conseguir y más económica .

Se escogieron la warfarina, fenitoína e indometacina debido a que estos medicamentos se usan como modelos de fármacos que pertenecen a sustancias ácidas según Scheler <sup>(20)</sup>. Como se observa en la tabla 3 es interesante notar que el pK de la Peroxisomicina A1 está muy cercano al de la fenitoína, mas no los valores de la constante de afinidad, los cuales están más cercanos a los valores de la warfarina e indometacina .

Se siguió en este caso la misma estrategia que utilizó Caballero en su tesis de Maestría <sup>(18)</sup>, con la diferencia que se tuvieron que hacer experimentos simultáneos en presencia y ausencia de medicamento haciendo una corrección por el volumen de medicamento adicionado; esto se realizó con amortiguador de fosfato pH 7.2 cuando el experimento se realizaba en ausencia de medicamento.

A simple vista se puede observar que las curvas ( ver Figuras 8 a 17) obtenidas en presencia y ausencia de medicamento no mostraban diferencia entre sí; se compararon los

valores de N (sitios de unión) y K (constante de afinidad) obtenidos en cada caso (ver Tabla 18). Los valores encontrados para la Peroxisomicina A1 en ausencia de medicamento son similares a los reportados por Caballero <sup>(18)</sup>. No se encontró diferencia significativa entre los resultados arrojados por la Peroxisomicina A1 en presencia y en ausencia de medicamento a las concentraciones de estudio. Con ello podemos suponer que la warfarina, fenitoína y/o indometacina no compiten por los sitios de unión en la albúmina con la Peroxisomicina A1 .

Para estudiar el posible desplazamiento de la warfarina, fenitoína e indometacina de sus sitios de unión en la albúmina cuando se le adicionaba Peroxisomicina A1, había que realizar simultáneamente experimentos para cada uno de los medicamentos en presencia y ausencia de Peroxisomicina A1. En este caso se debía seguir la señal analítica para cada uno de los medicamentos en estudio.

Estudiando la interacción entre la warfarina y la albúmina no exenta de ácidos grasos, no se observaba un cambio espectrofotométrico que indicara que la warfarina se unía a la albúmina. Se encontró en la literatura <sup>(20)</sup> que la warfarina no se une a la albúmina en presencia de ácidos grasos; por ello se pensó en utilizar albúmina libre de ácidos grasos para estudiar la interacción warfarina - albúmina.

Se obtuvieron los espectros UV-VIS de la warfarina, albúmina libre de ácidos grasos y de la Peroxisomicina A1 para tratar de encontrar una buena señal analítica para la warfarina. Como se observa en la figura 18, en uno de los máximos de la warfarina la Peroxisomicina A1 tiene una absorbancia residual, y al observar el otro máximo, la Peroxisomicina A1 y la albúmina tienen mayor absorbancia que la warfarina. Por ello se recurrió a la Espectroscopía de Derivadas. Se aplicó la primera derivada a los espectros de orden cero ya obtenidos de la warfarina, Peroxisomicina A1 y albúmina. Después de hacer un filtrado a los espectros obtenidos (ver Figura 19), se aplicó la técnica del cruce al cero,

encontrándose que a 329 nm la Peroxisomicina A1 y la albúmina no tenían absorbancia, por lo que se siguió esta señal analítica para la warfarina .

Los valores de N1 y N2 (ver Tabla 23) para la warfarina en presencia y en ausencia de Peroxisomicina A1 (20 y 40  $\mu\text{M}$ ), no muestran diferencia significativa. En cambio las constantes de afinidad aumentan en presencia de Peroxisomicina A1 (20 y 40  $\mu\text{M}$ ). De lo anterior se pueden suponer dos cosas: 1) que la Peroxisomicina A1 induce un cambio conformacional en la albúmina; 2) la Peroxisomicina A1 induce una modificación en la estructura de los sitios de unión de la warfarina. En la literatura <sup>(26)</sup> se encontró un caso en donde dos compuestos se comportan de manera similar frente a la albúmina; cuando la warfarina se encuentra en presencia de indometacina se observa un cambio en la constante de afinidad de la warfarina, mas sin embargo los sitios de unión casi no varían, por lo que se considera a la indometacina como un inductor del cambio estructural en la albúmina, mas no un inhibidor no competitivo.

La indometacina tampoco ofreció una señal analítica adecuada en los espectros de orden cero (ver Figura 24), por lo que se aplicó la primera derivada a espectros tanto de la indometacina, Peroxisomicina A1 como de la albúmina. Después de hacer un filtrado a los espectros derivados obtenidos (ver Figura 25) se aplicó la técnica del cruce al cero encontrándose a 314 nm una buena señal analítica para la indometacina. A esa longitud de onda la Peroxisomicina A1 y la albúmina muestran lectura cero.

Los resultados de N y K obtenidos (ver Tabla 27) para la indometacina en presencia y ausencia de Peroxisomicina A1 40  $\mu\text{M}$  no muestran diferencia significativa. Con ello podemos suponer que la indometacina y la Peroxisomicina A1 no tienen los mismos sitios de unión en la albúmina.

Para el estudio de la fenitoína se usó también albúmina libre de ácidos grasos debido a que se ha demostrado que la fenitoína no se une a la albúmina en presencia de

ácidos grasos<sup>(20)</sup>. La fenitoína absorbe muy poco en el rango de 200 a 550 nm (ver Figura 29). Se consideró utilizar la técnica de Fluorescencia, donde la fenitoína y la albúmina libre de ácidos grasos fluorescen. Las longitudes de onda de emisión y excitación de estas moléculas están muy cercanas por lo que fue difícil encontrar una longitud de onda en la que la albúmina no interfiriera con la emisión de la fenitoína; la Peroxisomicina A1 no interfería en el estudio. Por esta razón se decidió utilizar la técnica de Cromatografía en su modalidad de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución con columna de Fase Reversa.

Para poder establecer las condiciones de elución, primero se tuvo que encontrar un solvente adecuado de elución en el que fuera soluble la fenitoína pero que a su vez tuviera suficiente proporción de amortiguador de fosfato para que no precipitara la albúmina. Por otro lado la proporción de solventes debía de ser la adecuada para lograr una buena separación entre la fenitoína y la Peroxisomicina A1. Cuando se usó la mezcla amortiguador de fosfato pH 7.2 : acetonitrilo 50:50, la Peroxisomicina A1 y la fenitoína no lograron separarse. En la proporción 60:40 la fenitoína tiene un tiempo de retención muy corto. Con ello se decidió utilizar la proporción 70:30 de la mezcla amortiguador de fosfato pH 7.2 : acetonitrilo donde la fenitoína tiene un tiempo de retención de 2.55 y la Peroxisomicina A1 queda retenida en la columna; ésta es eluída con metanol, utilizado en el lavado de la columna.

Una vez encontradas las condiciones cromatográficas mencionadas, con estándares de fenitoína se estableció una relación entre la altura o el área del pico cromatográfico con la concentración. Para ellos se realizó una curva de calibración; se trabajó en un rango de concentraciones entre 8.33 y 37.5  $\mu\text{M}$ . Se escogió este rango por que a concentraciones menores de 8.33  $\mu\text{M}$ , el pico cromatográfico era muy pequeño, y se confundía con el ruido. Comparando los resultados de las áreas y las alturas, se prefirió utilizar la altura por que daba resultados más reproducibles. Posteriormente se

pasó a la titulación. En este caso no se tuvo que encontrar el valor de  $\alpha$ , ya que no se trata de una medición indirecta como en los casos anteriores; se puede obtener la concentración de fenitoína libre directamente del cromatograma interpolando la altura del pico cromatográfico en la curva de calibración previamente obtenida.

La fenitoína unida se obtiene por diferencia entre la fenitoína libre y la total. Con ello se pueden hacer los cálculos para obtener el valor de  $r$  de la ecuación de Scatchard.

Tampoco se encontró diferencia significativa entre los valores de  $N$  y  $K$  obtenidos (ver Tabla 33) para la fenitoína en presencia y ausencia de Peroxisomicina A1 a 40  $\mu\text{M}$ . Esto sugiere que la fenitoína y la Peroxisomicina A1 no tienen el mismo sitio de unión en la albúmina.

Cabe mencionar que los valores de  $N$  (sitios de unión) y  $K$  (constante de afinidad) para la unión a albúmina de la warfarina <sup>(27)</sup>, la indometacina <sup>(26)</sup> y la fenitoína <sup>(28)</sup> encontrados durante este estudio, son muy similares a los reportados en la literatura; esto valida nuestros resultados experimentales.

Debido a que ni la warfarina ni la fenitoína interaccionan con la albúmina en presencia de ácidos grasos, se pensó en la posibilidad de que la warfarina podía desplazar a la Peroxisomicina A1 de sus sitios de unión si se utilizaba albúmina libre de ácidos grasos. Por ello se repitieron los estudios de interacción entre la Peroxisomicina A1 y albúmina en presencia de warfarina utilizando albúmina libre de ácidos grasos. Los valores de  $N$  y  $K$  (ver Tabla 18) no mostraron ninguna diferencia significativa con respecto a los otros valores de la tabla. Por medio de estos resultados se pudo demostrar en forma paralela que los ácidos grasos no compiten con la Peroxisomicina A1 por los mismos sitios de unión en la albúmina debido a que las constantes de afinidad y los números de sitios de unión no cambiaron en ninguno de los dos casos.

## CAPITULO 5

### CONCLUSIONES

1. No hay competencia entre la warfarina, fenitoína e indometacina con la Peroxisomicina A1 por los sitios de unión en la albúmina.
2. La warfarina muestra un aumento en el grado de interacción con la albúmina en presencia de Peroxisomicina A1.
3. La warfarina y la fenitoína no se unieron a la albúmina en presencia de ácidos grasos tal y como se reporta en la literatura.
4. Los ácidos grasos no compiten con la Peroxisomicina A1 por los sitios de unión en la albúmina.

**BIBLIOGRAFIA**

1. Kalant, H and Roslau, W. Principles of Medical Pharmacology. Fifth edition. B.C. Decker, Inc. Toronto. p. 17-31 (1989).
2. Bowman, W. and Rand, M. Textbook of Pharmacology. Second edition. Blackwell Scientific Publications. London. p. 1.25, 40.19-40.23 (1980)
3. Kock-Weser, J. and Seller, E. Binding of Drugs to Serum Albumin. *The New England Journal of Medicine*. **294**. p. 311-316 (1976).
4. Garcia-Valdecasa, F. Farmacología. Séptima edición. Ed. Espaxs, España. p. 41-43 (1978).
5. Bevan, J. and Thompson, J. Essential Pharmacology. Third edition. Ed. Harper & Row Publishers Inc. Philadelphia. p. 2-4 (1983).
6. Bush, M. and Alvin, J. Characterization of Drug-Protein Interaction by Classic Methods. *Annals New York Academy Sciencies*. **226**, 36-43 (1973).
7. Seville, B. and Thuaud, N. Study of Binding of Low Molecular- Weight Ligand to Biological Macromolecules by High Performance Liquid Chromatography. *J. of Chromatography*, **167**, p. 159-70. (1978).
8. Noctor, T. and Diaz-Perez, M. Use of Human Serum Albumin. Based Stationary Phase for High Performance Liquid Chromatography as a Tool for fine Rapid Determination of Drug-Plasma Protein Binding. *Journal of Pharmaceutical Science*. **82**, No. 6, (1993).
9. Harris, C.R. and Bashford, C.L. Spectrophotometry and Spectrofluorimetry. IRL Press. Oxford: Washington, D.C. p. 91-113 (1988).
10. Goldstein, A., Aronow, L. and Kalman, S. Farmacología. Segunda edición. Editorial Limusa. p. 57-61 (1979).

11. Tinoco, J., Saver, K. and Wang, J.C. Fisicoquímica: Principios y Aplicaciones en las ciencias biológicas. Prentice Hall International. Englewood. p. 160-162 (1980).
12. Clavijero, F.X. Historia de la Antigua o Baja California. Tercera edición. Ed. Porrúa, S.A. México, D.F. p. 31-32 (1982).
13. Dreyer, D., Aria, I. and Bachman, C. Toxins Causing Noninflammatory, Paralytic Neuropathy. Isomer Structure Elucidation. *J. of American Chemical Society* 4985-4990. (1975).
14. Bermudez, M., Gonzalez, D., Guerrero, M., Waksman, N. and Piñeyro, A. Experimental acute intoxication with fruit of *K. humboldtiana*. (Tullidora) in rat, guinea pig, hamster. *Toxicon*, 30, 1493-1496. (1992).
15. Piñeyro, A., Martínez, L. and Gonzalez, R. In vitro selective toxin T514 from *K. humboldtiana* (buck thorn) plant and human tumor cell lines. *Toxicology* 92, 217-227 (1994).
16. Martínez, L. Estudio de las Propiedades Fisicoquímicas de la T514 aislada de *K. humboldtiana*. Tesis de Maestría, Mty, N.L. (1990).
17. Jusko, W. and Gretch, M. Plasma and Tissue Protein Binding of Drugs in Pharmacokinetics. *Drug Metabolism Reviews*, 5 (1), 43-140 (1976).
18. Caballero, A. Estudio *in vitro* de las Interacciones Peroxisomicina A1 con la Albúmina Sérica Bovina y la Albúmina Sérica Humana. Tesis de Maestría, Mty, N.L, (1995).
19. Anton, A. and Salomon, H. Drug Protein Binding. *ANYAS Annals of New York Academy of Science* 226. p. 6-17 (1973)
20. Scheler, W. Grundlagen der Allgemeinen Pharmakologie. VEB Gustav Fischer Verlag Jena. p. 215-225 (1989).



21. Kaibara, A., Hirose, M. and Nakagawa, T. Evaluation of Hydrophobic Interaction between Acidic Drugs and Bovine Serum Albumin by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography. *Chem. Pharm. Bull.* **39**, 720 (1991).
22. Haginaka, J., Yasuda, N., Wakai, J., Matsunaga, H., Yasuda, H. and Kimura, Y. Internal-Surface Reversed-Phase Silica Support for Direct Injection Determination of Drugs in Biological Fluids by Liquid Chromatography. *Anal. Chem.* **61**, 2445-2448 (1989).
23. López de Alba, P.L. y López Mtz, L. Una Introducción a la Espectrometría de Derivadas. *Educación Química* **4**, (3), 160-170 (1993).
24. Sanchez Roja, F., Bosch Ojeda, C. and Cano Pavon, J. Derivative Ultraviolet-Visible Region Absorption Spectrophotometry and its Analytical Applications. *Talanta*, **35**. No. 10. pp. 753-761 (1988).
25. Piñeyro-Lopez, A. Pharmazeutisch brauchbare Naphtalin und Anthracenderivate pharmaceutically applicable naphtalina and anthracene derivatives Derivés de naphtaline et d' anthracene utiles comme medicamenta. Europisches Patenblatt, 48/1995,29.11.1995.
26. Zini, R. , Athis, P., Barre, J. and Tillement, J. Binding of Indomethacin to Human Serum Albumin. Its non displayment by various agents, influence of Free Fatty Acids and the unexpected effect of Indomethacin on Warfarin binding. *Biochemical Pharmacology*. **28**. pp. 2661-2665 (1979).
27. Sun, S., Kuo, S. and Nash, R. Study of Binding of Warfarin to Serum Albumins by High Performance Liquid Chromatography. *Journal of Chromatography*, **288**, 377-388 (1984).
28. Pinkerton, T., Miller, T. and Janis, L. Effect of Protein Binding on High-Performance Liquid Chromatography of Phenytoin and Imirestat in Human Serum by Direct Injection onto Internal Surface Reversed-Phase Columns. *Anal. Chem.*, **61**, 1171-1174 (1989).



