

71
Ref



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

FALLA DE ORIGEN

"ESTUDIOS DE UNION A PROTEINAS PLASMATICAS
DEL ALBENDAZOL Y SU PRINCIPAL METABOLITO,
SULFOXIDO DE ALBENDAZOL."

TESIS MANCOMUNADA

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A N :
LIZ JANNET MEDINA REYES
LUIS JESUS GARCIA AGUIRRE



MEXICO, D. F.,

1995



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

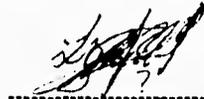
JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE : M. en C. INES FUENTES NORIEGA.
VOCAL : M. en C. HELGI HELEN JUNG COOK.
SECRETARIO : DRA. ELIA BROSLA NARANJO RODRIGUEZ.
1er. SUPLENTE : M. en C. SOFIA MARGARITA RODRIGUEZ ALVARADO.
2do. SUPLENTE : M. en C. BENJAMIN EFREN SANDOVAL GUZMAN.

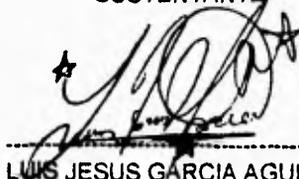
SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA :

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO. DEPARTAMENTO DE FARMACIA. DIVISION DE BIOQUIMICA Y FARMACIA. LABORATORIO DE BIOFARMACIA.

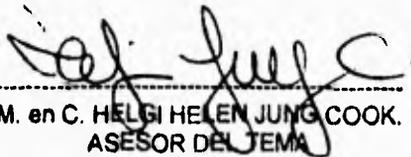
**FACULTAD DE QUIMICA.
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO.**



LIZ JANNET MEDINA REYES
SUSTENTANTE



LUIS JESUS GARCIA AGUIRRE
SUSTENTANTE



M. en C. HELGI HELEN JUNG COOK.
ASESOR DEL TEMA

Parábola de la educación.

Iba un hombre caminando por el desierto cuando oyó una voz que le dijo:

--Levanta unos guijarros, metelos a tus bolsillos y mañana te sentirás a la vez triste y contento.

Aquel hombre obedeció. Se inclinó, recogió un puñado de guijarros y se los metió en el bolsillo.

A la mañana siguiente, vio que los guijarros se habían convertido en diamantes, rubíes y esmeraldas.

Y se sintió feliz y triste.

Feliz, por haber recogido los guijarros; triste, por no haber recogido más.

lo mismo ocurre con la educación.

William Cunninham.

A la **M. en C. Helgi Jung C.** por ser nuestra guía en este estudio y una excelente profesora. Por sus consejos, su ayuda, comprensión y por ser una gran amiga en todo momento.
Mil gracias.

A las **M. en C. Inés Fuentes N. y Margarita Rodríguez A.**
por habernos brindado su ayuda desinteresada y sobre todo su amistad.

Al **Q.F.B. Eduardo Ramírez** por su apoyo en la realización del estudio.

Al **Hospital de Neurología** por la donación del plasma utilizado en ésta investigación.

A los **Laboratorios SmithKline Beecham Pharmaceutical** por la donación del metabolito sulfóxido de albendazol.

Amistad.

--Mi amigo no ha regresado del campo de batalla, señor. Solicito permiso para ir a buscarlo--, dijo un soldado a su teniente.

--¡Permiso denegado!--, replicó el oficial.--No quiero que arriesgue usted su vida por un hombre que probablemente ha muerto.

El soldado, haciendo caso omiso de la prohibición, salió, y una hora más tarde regresó mortalmente herido, transportando el cadáver de su amigo.

El oficial estaba furioso:

--¡Ya le dije yo que había muerto! ¡Ahora he perdido a dos hombres! Dígame, ¿merecía la pena ir allá para traer un cadáver?

Y el soldado moribundo respondió:

--¡Claro que sí, señor!, cuando lo encontré, todavía estaba vivo y pudo decirme:

--Juan... *¡estaba seguro de que vendrías!*

Anthony de Mello

Para todos aquellos que ocupan un lugar en nuestro corazón y que llegaron con una mano amiga cuando todo el mundo se había ido.

A Agustín, Claudia, Dea, Euclides, Lupita, Paty, Pili,
Verónica A. y Verónica R. por los momentos tan fuera de
serie que hemos pasado y por los que vendrán.

A el equipo de fut bol Q.F.B.'s 89 por la alegría de habernos
conocido y por aquéllos partidos inolvidables.

A manuel y Lalo porque sabemos que contamos con
ustedes. Gracias por su amistad.

A todos los compañeros de los laboratorios 112
y 113 por haber hecho nuestra estancia más
divertida.

A los maravillosos seres que nos dieron la vida.

Cómo podría agradecer
el que seas parte de mi ser,
y más todavía, que con tu cariño
me hayas hecho crecer.

Cómo podría agradecer
la ternura de tus regaños, y la serenidad de
tus ojos cansados por tantas noches de desvelo
esperando la llegada de tus hijos.

Madre mía,
eres mi más grande tesoro,
no hay nada en éste mundo
que se compare con lo mucho que te adoro.

Tu sonrisa fue el viento
para levantar mi vuelo
y tu regazo,
el calor en el que hallé consuelo.

Tu te quitas el pan de la boca
sin que te importe el quedarte con las migajas.
Aprendiste a caminar sobre pies semidescalzos
y a mitigar el frío con la risa de tus hijos.

Madre mía, no sé si me alcance la vida
para pagarte todo lo que has hecho por mí,
más que una simple presea
tú lo eres todo para mí.

**Gracias por todo. Te amo.
Liz y Luis.**

A mi padre.

Padre, ahora que te veo
tomando un descanso para continuar tu camino,
vienen a mi mente los recuerdos de aquéllos días
cuando frotabas tu barba en mi mejilla
o aquéllos anécdotas como mis "mojadas"
sobre tu espalda.

Supiste, como pocos, ganarte el cariño de un hijo.
Me llevaste de la mano hasta donde fue preciso,
y luego me enseñaste que la vida no es tan mala como la pintan,
a confiar en mí y en los demás, que el dinero viene y va,
que el luchar es caer y volverse a levantar
y muchas otras cosas más.

Gracias por no dejarme dormir en la espera de un consejo.
Me diste la libertad cuando viste que estaba listo para volar.
Me enseñaste que con harina, sal y unas manos con ganas de
trabajar, se puede hacer un buen pan.

No me enseñaste la cima. pero sí a escalar.
Que lloramos juntos cuando la vida nos tendió una trampa, es verdad,
que reímos cuando nuestra fuerza nos hizo salir de ella, también es verdad.
Además de ser mi padre y maestro, eres un amigo incondicional
y esa es mi mayor felicidad.

A mi abuelita.

Por ser mi segunda madre. Por tus consejos, regaños y preocupaciones.
Por tu infinito amor. Mil gracias.

A mi hermano Adrián, mi tía Lucha y mis primos Luis A., Mauricio y Víctor.

Por los momentos tan alegres y peculiares que me han hecho
pasar. Por las peleas de hermanos y por demostrarme
siempre su cariño. Gracias.

A mis hermanos Mauricio, Ivonne, Marco y Miguel.

Por hacerme la vida insoportablemente divertida
y porque sé que en las buenas y en las
malas siempre estaremos juntos.

Al gran amor de mi vida.

Por ser quien ahora ilumina mi vida. Por ser mi amigo y ayudarme en todo momento.

Por desear mi superación en todos los aspectos. Por ser un hombre intachable, sin vicios y con muchas virtudes. Por no ser perfecto. Por considerar a la amistad como un tesoro invaluable. Por ser trabajador, estudioso y perseverante.

Por permitirme compartir tu vida. Porque me respetas y respetas mis ideas y por todo lo que para mí significas y que no puedo expresar con palabras. Y sobre todo porque te amo. Gracias amor.

Para esa pequeña que con una sonrisa me da la vida.

No encuentro las palabras para poder expresar lo que tú significas para mi, bastaría con decir que lo yo soy es gracias a ti, que mi mundo gira alrededor de ti, que si mi vida hoy tiene color es porque tu lo pintas con tu amor. Gracias pequeña por ayudarme a crecer, por tener fe en que todo saldra bien, solo queria decirte que te amo porque eres toda una mujer, que te amo como nunca imagine.

INDICE

	Página
Lista de figuras.	iv
Lista de cuadros.	vi
	Página
I.INTRODUCCION.	1
II.GENERALIDADES.	4
2.1.Albendazol.	5
2.1.1.Propiedades Físicoquímicas.	5
2.1.2.Usos.	6
2.1.3.Farmacocinética.	6
2.2.Unión a proteínas.	8
2.2.1.Generalidades.	8
2.2.2.Cinética de la unión a proteínas.	10
2.2.3.Influencia del grado de unión a proteínas en la farmacocinética de un fármaco.	11
2.2.4.Factores que influyen en la unión a proteínas.	13
2.2.5.Implicaciones en la terapia farmacológica.	17
2.3.Método de diálisis al equilibrio para la determinación del grado de unión a proteínas.	18
2.3.1.Principios.	18
2.3.2.Características de la diálisis.	19
2.3.3.Equipo.	20
2.3.4.Factores que afectan la velocidad a la cual se alcanza el equilibrio.	22
2.3.5.Problemas encontrados en los estudios de diálisis al equilibrio.	23
2.3.6.Cálculos.	25
2.3.7.Ventajas y desventajas.	25

III. SECCION EXPERIMENTAL.	27
3.1. Método analítico para la cuantificación de albendazol y sulfóxido de albendazol.	28
3.1.1. Material y equipo.	28
3.1.2. Reactivos.	28
3.1.3. Soluciones.	28
3.1.4. Curva patrón de albendazol o sulfóxido de albendazol.	29
3.1.5. Preparación de las muestras.	30
3.1.6. Condiciones cromatográficas.	30
3.2. Validación del método analítico.	31
3.2.1. Selectividad.	31
3.2.2. Linearidad.	31
3.2.3. Exactitud.	32
3.2.4. Repetibilidad.	32
3.2.5. Reproducibilidad.	32
3.3. Estudios de unión de albendazol y/o sulfóxido de albendazol a proteínas plasmáticas.	32
3.3.1. Método de cuantificación de proteínas plasmáticas.	32
3.3.2. Curva patrón para cuantificación de proteínas plasmáticas.	34
3.3.3. Linearidad y repetibilidad del método analítico para cuantificar proteínas plasmáticas.	36
3.3.4. Estudios de unión a proteínas "in vitro".	36
IV. RESULTADOS.	39
4.1. Validación del método analítico para la cuantificación de albendazol y su principal metabolito , sulfóxido de albendazol en plasma y albúmina bovina.	40

4.1.1.Selectividad.	40
4.1.2.Linearidad.	40
4.1.3.Exactitud.	45
4.1.4.Repetibilidad.	47
4.1.5.Reproducibilidad.	48
4.2.Estudios de unión a proteínas plasmáticas.	51
4.2.1.Método analítico para cuantificar proteínas plasmáticas.	51
4.2.2.Estudios de unión a proteínas "in vitro".	52
V.DISCUSION DE RESULTADOS.	59
5.1.Validación del método analítico para la cuantificación de albendazol y su principal metabolito , sulfóxido de albendazol en plasma y albúmina bovina.	60
5.1.1.Selectividad.	60
5.1.2.Linearidad.	60
5.1.3.Exactitud.	60
5.1.4.Repetibilidad.	60
5.1.5.Reproducibilidad.	60
5.2.Estudios de unión a proteínas plasmáticas.	61
5.2.1.Método analítico para cuantificar proteínas plasmáticas.	61
5.2.2.Estudios de unión a proteínas "in vitro".	61
VI.CONCLUSIONES.	64
VII.BIBLIOGRAFIA.	67

Lista de figuras.

		Página
Figura 1.	Fórmula estructural del albendazol.	5
Figura 2.	Perfil metabólico del albendazol en el hombre.	7
Figura 3.	Diagrama de diálisis al equilibrio.	18
Figura 4.	Equipo de diálisis al equilibrio de 5 celdas	21
Figura 5.	Diagrama de flujo para la preparación de las muestras.	31
Figura 6.	Diagrama de flujo de la preparación de las muestras para la cuantificación de proteínas plasmáticas.	35
Figura 7.	Selectividad del método analítico para la cuantificación de albendazol y sulfóxido de albendazol en albúmina.	41
Figura 8.	Selectividad del método analítico para la cuantificación de albendazol y sulfóxido de albendazol en plasma.	42
Figura 9.	Linearidad del método analítico para cuantificar albendazol en plasma.	43
Figura 10.	Linearidad del método analítico para cuantificar albendazol en plasma.	43
Figura 11.	Linearidad del método analítico para cuantificar sulfóxido de albendazol en albúmina.	44
Figura 12.	Linearidad del método analítico para cuantificar sulfóxido de albendazol en plasma.	44
Figura 13.	Linearidad para el método de Biuret.	51

Figura 14.	Tiempo de equilibrio para el albendazol utilizando el método de diálisis.	53
Figura 15.	Tiempo de equilibrio para el sulfóxido de albendazol.	53

Lista de cuadros.

		Página
Cuadro 1.	Sitios potenciales de unión para moléculas cargadas o iones en albúmina sérica bovina.	9
Cuadro 2.	Factores que disminuyen la concentración de proteínas plasmáticas.	16
Cuadro 3.	Ventajas y desventajas del método de diálisis al equilibrio.	26
Cuadro 4.	Preparación de la curva patrón para la cuantificación de proteínas plasmáticas.	35
Cuadro 5.	Exactitud del método analítico para la cuantificación de albendazol en albúmina bovina.	45
Cuadro 6.	Exactitud del método analítico para la cuantificación de albendazol en plasma.	45
Cuadro 7.	Exactitud del método analítico para la cuantificación de sulfóxido de albendazol en albúmina bovina.	46
Cuadro 8.	Exactitud del método analítico para la cuantificación de sulfóxido de albendazol en plasma.	46
Cuadro 9.	Repetibilidad del método analítico para la cuantificación de albendazol en albúmina bovina.	47
Cuadro 10.	Repetibilidad del método analítico para la cuantificación de albendazol en plasma.	47
Cuadro 11.	Repetibilidad del método analítico para la cuantificación de sulfóxido de albendazol en albúmina bovina.	48

Cuadro 12.	Repetibilidad del método analítico para la cuantificación de sulfóxido de albendazol en plasma.	48
Cuadro 13.	Reproducibilidad del método analítico para la cuantificación de albendazol en albúmina bovina.	49
Cuadro 14.	Reproducibilidad del método analítico para la cuantificación de albendazol en plasma.	49
Cuadro 15.	Reproducibilidad del método analítico para la cuantificación de sulfóxido de albendazol en albúmina bovina.	50
Cuadro 16.	Reproducibilidad del método analítico para la cuantificación de sulfóxido de albendazol en plasma.	50
Cuadro 17.	Repetibilidad del método para la cuantificación de proteínas plasmáticas.	52
Cuadro 18.	Determinación de la unión del albendazol a la membrana de diálisis a concentración de 2.0 µg/ml , 3.0 hrs. , 37°C y 30 rpm.	54
Cuadro 19.	Determinación de la unión del sulfóxido de albendazol a la membrana de diálisis a concentración de 2.0 µg/ml , 3.0 hrs. , 37°C y 30 rpm.	54
Cuadro 20.	Determinación del grado de unión a proteínas plasmáticas del albendazol a concentraciones de 0.5 , 1.0 , 2.0 , 3.0 y 4.0 µg/ml , 3.0 hrs. , 37°C y 30 rpm.	56

Cuadro 21	Determinación del grado de unión a proteínas plasmáticas del sulfóxido de albendazol a concentraciones de 0.5 , 1.0 , 2.0 , 3.0 y 4.0 $\mu\text{g/ml}$, 3.0 hrs. , 37°C y 30 rpm.	57
Cuadro 22	Determinación del grado de unión a albúmina del albendazol a concentraciones de 1.0 y 2.0 $\mu\text{g/ml}$, 3.0 hrs. , 37°C y 30 rpm.	58
Cuadro 23	Determinación del grado de unión a albúmina del sulfóxido de albendazol a concentraciones de 0.5 y 2.0 $\mu\text{g/ml}$, 3.0 hrs. , 37°C y 30 rpm.	58

I. Introducción.

Los fármacos se unen a proteínas plasmáticas en mayor o menor grado. La unión de fármacos a proteínas es un factor importante en la farmacocinética y en la farmacodinamia del fármaco ya que únicamente el fármaco libre puede pasar a través de las membranas celulares y alcanzar los receptores, ejerciendo su actividad terapéutica.

La formación del complejo fármaco-proteína es un proceso saturable, de manera que si las dosis son muy altas o existe alguna enfermedad en la que la concentración de proteínas plasmáticas, principalmente albúmina, se vea disminuída, puede llegarse a una saturación que trae como consecuencia una mayor concentración de fármaco libre pudiendose presentar un aumento imprevisto en la respuesta farmacológica y por lo tanto toxicidad. Este mismo efecto se presenta si el fármaco se administra conjuntamente con otro que pueda provocar un desplazamiento competitivo de los sitios de unión a proteínas plasmáticas.

El albendazol es un bencimidazol carbamato, que sufre un extenso efecto del primer paso, metabolizándose principalmente a sulfóxido de albendazol, que es el responsable del efecto farmacológico.

Para optimizar una dosis, así como el esquema terapéutico, es de gran utilidad conocer el grado de unión a proteínas del fármaco en cuestión.

En la actualidad no existen reportes acerca del grado de unión del albendazol o de su principal metabolito, sulfóxido de albendazol a proteínas plasmáticas y dado que es el fármaco de primera elección en el tratamiento de la neurocisticercosis, se consideró de gran importancia realizar un estudio con los siguientes objetivos:

Objetivo general :

-Determinar el grado de unión tanto a proteínas plasmáticas totales como a albúmina, del Albendazol y su principal metabolito, Sulfóxido de albendazol.

Objetivos específicos :

-Validar el método analítico por HPLC para cuantificar albendazol y sulfóxido de albendazol en albúmina bovina y plasma.

-Utilizar el método de Biuret para la cuantificación de proteínas plasmáticas totales y albúmina bovina.

-Determinar el tiempo de equilibrio del albendazol y de su metabolito, sulfóxido de albendazol en albúmina bovina y plasma utilizando el método de diálisis al equilibrio.

-Especificar si las membranas de diálisis utilizadas son las correctas, cuantificando el grado de unión del albendazol y sulfóxido de albendazol a ésta membrana, así como verificar la integridad de ésta a través de todo el estudio.

-Estimar si el volumen de Shift es un factor que afecte en este estudio.

II. Generalidades.

2.1. ALBENDAZOL.

Nombre químico: metil(5-(propiltio)-1H-benzimidazol-2-il)carbamato.

Fórmula molecular: $C_{12}H_{15}N_3O_2S$

Fórmula estructural (fig. 1.)

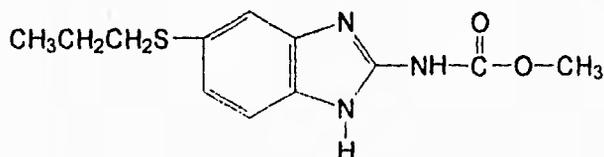


Fig. No. 1. Fórmula estructural.

2.1.1. Propiedades fisicoquímicas. (6, 25, 27, 28, 30, 52)

Peso molecular: 265.342.

Forma física: Polvo blanco , amorfo.

Punto de fusión : 208-210^oC.

Solubilidad :

Insoluble en agua. Parcialmente soluble en metanol.

Soluble en : dimetil sulfóxido, ácido acético, cloroformo, acetato de etilo y acetonitrilo, así como en soluciones acuosas fuertemente ácidas o básicas.

Puede precipitar al enfriar o neutralizar.

La adición de cosolventes incrementa su solubilidad.

Estabilidad :El albendazol es estable a temperatura ambiente.

2.1.2. Usos.

El albendazol se emplea como antihelmíntico de amplio espectro a dosis que van desde 1 mg/Kg/día hasta 30 mg/Kg/día, con una duración del tratamiento también muy variable, ya sea a una dosis única o hasta 14 días (6). Por ejemplo, en ascariasis, tricurias ligeras o infestaciones por oxiuros el tratamiento para adultos o niños mayores de 2 años de edad, es una sola dosis de 400 mg por vía oral. En estrogiloidiasis se administran los mismos 400 mg/día durante 3 días y en quiste hidatídico un tratamiento de 800 mg al día durante 30 días con 2 repeticiones, dejando dos semanas entre un tratamiento y otro, ha dado buenos resultados (23).

Recientemente el albendazol fue considerado como fármaco de elección en el tratamiento de la neurocisticercosis a dosis de 15 mg/Kg/día repartidas en 2 tomas durante 15-30 días dependiendo de la severidad, mostrando ser muy efectivo y teniendo además la ventaja de su bajo costo y menos efectos secundarios en comparación con otros fármacos tradicionales para el tratamiento de la neurocisticercosis como el praziquantel (6 , 23).

2.1.3. Farmacocinética.

El albendazol sufre un extenso efecto de primer paso, por lo que no se detecta en plasma u orina. Se ha propuesto como responsable de su efecto farmacológico a su principal metabolito, el sulfóxido de albendazol. En la figura 2 se muestran algunos metabolitos del albendazol encontrados en orina (6 , 52).

El sulfóxido de albendazol alcanza su concentración plasmática máxima entre las 2.0 y 4.3 hrs. pero presenta una gran variabilidad interindividual que va desde 0.04 - 2.967 µg/ml, con un tiempo de vida media que oscila entre 8 y 11 hrs. Es probable que ésta variabilidad en la concentración plasmática máxima por parte del sulfóxido de albendazol se deba a la escasa solubilidad del albendazol en agua, lo cual puede producir diferencias en la absorción o bien, que la disolución "in vivo" del albendazol a partir de la forma farmacéutica sea lenta y errática, incluso, cabe mencionar que se encuentran concentraciones plasmáticas más altas para el sulfóxido de albendazol cuando es administrado junto con alimentos ricos en

Generalidades.

grasa, probablemente por una mejor disolución del fármaco en el contenido gástrico e intestinal debido a un retardo del vaciamiento gástrico (6).

El albendazol también se ha usado en combinación con esteroides, por ejemplo 15 mg/Kg/día + 8mg de dexametasona cada 8 hrs., en donde los niveles de sulfóxido de albendazol se incrementan en aproximadamente un 50%.

A pesar de que se han realizado estudios farmacocinéticos sobre el albendazol para establecer los regímenes de dosificación sobre bases científicas, aún no hay estudios sobre unión a proteínas del albendazol y su metabolito, sulfóxido de albendazol que puedan contribuir a la optimización de dichos regímenes.

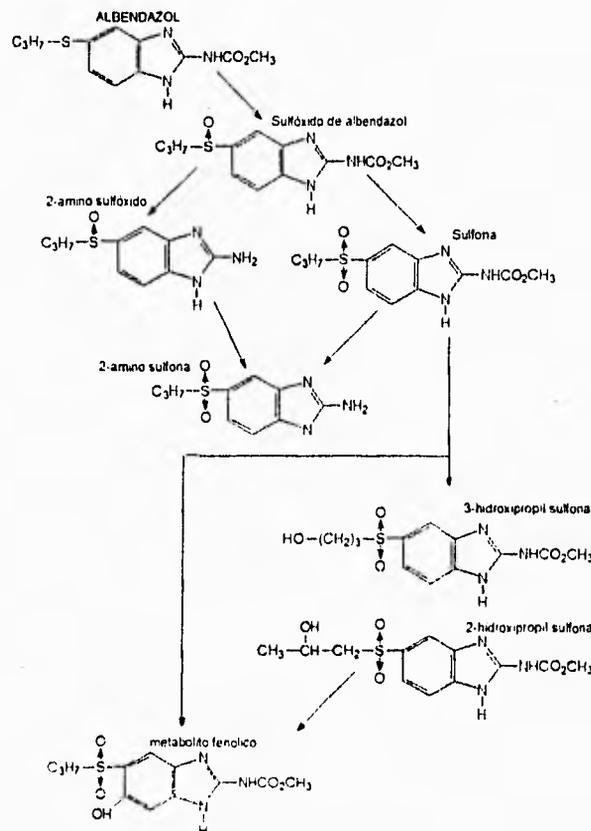


Fig. 2. Perfil metabólico del albendazol en el hombre (6).

2.2.Unión a proteínas.

2.2.1.Generalidades.

Muchos fármacos, ya sean ácidos o bases débiles, interactúan con proteínas plasmáticas o tejidos para formar un complejo fármaco-proteína y por lo tanto se puede hablar de una fracción de fármaco libre y/o unido (2).

Los estudios de unión a proteínas son muy importantes en farmacología ya que los efectos terapéuticos y tóxicos de un fármaco están directamente relacionados con el nivel de fármaco libre en el torrente sanguíneo que es el único que puede pasar a través de las membranas celulares y alcanzar su sitio de acción, o bien ser eliminado (2, 15, 16).

Usualmente se determinan las concentraciones de fármaco total en sangre y/o plasma, las cuales son utilizadas para la evaluación de los esquemas de dosificación del fármaco; sin embargo, existen marcadas diferencias intra e interindividuales en la unión de fármacos a proteínas, lo que podría conducir ya sea a una falta o a un exceso de respuesta de un fármaco, aún cuando la concentración de fármaco total esté dentro del intervalo terapéutico, de ahí que la determinación de las concentraciones de fármaco libre puede ser de gran valor para fundamentar la dosificación adecuada (2, 15, 16).

En plasma humano se encuentran proteínas tales como globulinas (2.5% p/v) y fibrinógeno (0.3% p/v) pero la proteína más importante para la unión es la albúmina, una molécula con peso molecular de 69000, sintetizada por el hígado, con una vida media de 17 a 18 días y punto isoeléctrico a pH 5, llevando cerca de 100 cargas, tanto negativas como positivas. En el organismo, la albúmina está distribuida vascularmente en el plasma y extravascularmente en piel, músculo y otros tejidos. Normalmente, la concentración de albúmina en plasma se mantiene relativamente constante entre 3.5 a 4.5% (p/v) (1, 2, 11).

A pH plasmático de 7.4 la albúmina presenta una carga neta negativa; sin embargo, puede interactuar tanto con aniones como con cationes. Cada grupo cargado positiva o negativamente se puede considerar como sitio de unión para los iones de carga contraria predominantes, pudiendo así el Na⁺ interactuar con grupos

Generalidades.

aniónicos y al Cl^- con grupos catiónicos produciendo uniones iónicas débiles no reforzadas (1, 2, 11).

La albúmina ha sido cristalizada y bien caracterizada y debido a que reacciona con una amplia variedad de fármacos, con mucha frecuencia se utiliza como modelo en las investigaciones de unión a fármacos (1, 2, 11).

El número de sitios de unión para las moléculas de fármacos por molécula de albúmina es por lo general mucho más pequeño que el número total de sitios cargados (algunas veces solo uno o dos) (11).

Existen diferencias en la capacidad de unión de los fármacos a las proteínas plasmáticas en las diferentes especies animales. Los fármacos ácidos a temperatura corporal normal y a dosis terapéuticas, parecen unirse a albúmina en un sitio de unión específico, posiblemente en el grupo N- terminal del aminoácido, el cual es ácido aspártico, tanto para albúmina bovina como para humana. Se ha demostrado que en la rata existen dos sitios diferentes de unión para algunos fármacos que solo se unen a un sitio en albúmina humana (1, 11).

En el cuadro 1 se presentan algunos sitios potenciales de unión en la albúmina sérica bovina (11).

Tabla 1. Sitios potenciales de unión para moléculas cargadas o iones en la albúmina sérica bovina

Aminoácido	Grupo	Número de residuos por molécula
Aspártico y glutámico	$-\text{COO}^-$	101
Tirosina	$-\text{O}^-$	18
Cisteína	$-\text{S}^-$	0.7
Terminal	$-\text{COO}^-$	1
Histidina	$-\text{NH}^+$	17
Lisina	$-\text{NH}_3^+$	57
Arginina	$-\text{NH}_2^+$	22
Terminal	$-\text{NH}_3^+$	1

La concentración de las proteínas plasmáticas se controla por muchas variables incluyendo :

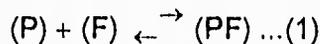
- a) Síntesis de proteínas.
- b) Catabolismo de las proteínas.
- c) Distribución de la albúmina entre los espacios intravascular y extravascular.
- d) Eliminación excesiva de proteínas del plasma, particularmente albúmina (2).

2.2.2. Cinética de la unión a proteínas.

Los fármacos se pueden unir a proteínas por procesos reversibles o irreversibles. Para el caso de una unión irreversible, el fármaco se une permanentemente a las proteínas, generalmente por uniones covalentes y no estará disponible para uso terapéutico (2).

La unión reversible de fármacos a las proteínas requiere a menudo que la conformación original de la proteína esté intacta. Cuando la unión a proteínas es reversible, la cantidad de fármaco unido actúa como un depósito del cual se va liberando lentamente el fármaco activo y reemplazando el que es eliminado (2, 11).

La cinética de la unión reversible de fármacos a proteínas puede describirse como sigue :



De la ecuación 1 se deriva la siguiente constante de asociación ,
Ka.

$$K_a = \frac{(PF)}{(P)(F)}$$

La cantidad de complejo fármaco-proteína formado es dependiente de la constante de asociación, K_a , y la magnitud de ésta constante proporciona información acerca del grado de unión. Los fármacos que están fuertemente unidos a proteínas tienen una K_a grande y están en su mayor parte en forma de complejos. Con este tipo de fármacos es necesaria una dosis mayor para obtener una concentración terapéutica del fármaco libre (2, 8, 10, 11).

Experimentalmente se puede determinar tanto la forma libre del fármaco (F), como el fármaco unido a proteína (PF) y la concentración total de proteína (P) + (F), con el fin de calcular la K_a (2, 10, 11).

Todos los fármacos saturan los sitios de unión a una concentración suficientemente alta. A concentraciones todavía más altas todo el fármaco adicional sigue libre, así que la fracción unida disminuye. Por el contrario, conforme el fármaco es eliminado del cuerpo, la fracción unida tiende a incrementarse y el grado en el que lo haga, dependerá de la afinidad del fármaco a la proteína alcanzándose así la fracción unida máxima (11).

2.2.3. Influencia del grado de unión a proteínas en la farmacocinética de un fármaco.

El complejo fármaco-proteína influye en la farmacocinética de un fármaco ya que, como se mencionó anteriormente, el fármaco libre puede pasar a través de las membranas celulares y alcanzar los receptores o bien ser eliminado (1, 2, 4, 5, 7, 9, 13, 29, 31).

De manera que solo el fármaco libre está disponible para la filtración glomerular por lo que, la excreción por esta vía se ve afectada por el grado de unión. La velocidad de desaparición del organismo tiende a ser autolimitada, por lo menos en el rango en el que la fracción unida aumenta con la disminución de la concentración del fármaco. Entre más baja sea la concentración, menor será la fracción susceptible de filtración por el glomérulo (11, 48, 51).

Los procesos activos tales como la secreción en los túbulos renales o el transporte por acarreador a través de membranas celulares no están restringidos al fármaco libre. La reversibilidad de la interacción fármaco-proteína es tan rápida que las moléculas de fármaco libre retiradas de la fase acuosa mediante el flujo sanguíneo renal y por estos procesos activos, se reemplazan instantáneamente

Generalidades.

por más fármaco libre derivado de la disociación del complejo de unión provocando que el tiempo de vida media de eliminación sea corta (2, 7, 11, 48, 51).

Es importante considerar el efecto de la unión a proteínas y tejidos en la vida media biológica de los fármacos, ya que, si la eliminación de un fármaco está limitada por el flujo sanguíneo a través del cuerpo, entonces el tiempo de vida media aumenta conforme aumenta el grado de unión a proteínas. Terapéuticamente la prolongación de la vida media solamente llega a ser importante cuando el porcentaje unido a proteínas plasmáticas es del 90% o más (1, 9, 10, 32, 48, 51).

Por otro lado, una disminución en el grado de unión puede producir un aumento relevante en el volumen de distribución de fármacos que están altamente unidos a proteínas plasmáticas y tienen un volumen de distribución limitado (1, 9).

El incremento en el volumen de distribución puede aumentar la concentración del fármaco en el sitio receptor. El aumento en las concentraciones de fármaco en tejido y la consecuente disminución de la constante de eliminación puede ser riesgoso para aquellos fármacos con un estrecho índice terapéutico (3).

Con base a lo anterior, se observa que las variaciones en el volumen de distribución o en el tiempo de vida media (si el proceso sigue una cinética de primer orden) pueden influir en el aclaramiento de un fármaco y por lo tanto la unión a proteínas puede influir también en el aclaramiento bajo ciertas circunstancias, de ahí la importancia de estudiar el grado de unión de los fármacos a proteínas plasmáticas (3, 48, 51).

La ecuación que nos permite visualizar mejor éstos aspectos es la siguiente :

$$Cl = Ke * Vd \quad \text{ó} \quad Cl = (0.693 * Vd) / t_{1/2}$$

en donde:

Cl = aclaramiento.

Ke = constante de eliminación.

Vd = volumen de distribución.

t_{1/2} = tiempo de vida media.

En el caso de fármacos que se eliminan principalmente por biotransformación hepática con cinéticas lineales, no limitadas por la velocidad de perfusión del órgano, se ha mostrado que el aclaramiento total (Cl) es directamente proporcional a la fracción libre de fármaco en el plasma (Fp) (10, 48, 51) :

$$Cl = Fp * Cl'$$

donde Cl' es el aclaramiento intrínseco que refleja la actividad del sistema enzimático envuelto en la biotransformación del fármaco.(10)

2.2.4. Factores que influyen en la unión a proteínas.

2.2.4.1. Estados fisiológicos.

Las unión de fármacos a proteínas plasmáticas puede verse modificada por diferencias en edad, genética, sexo y embarazo. Las variaciones observadas en la unión son debidas principalmente a diferencias en las concentraciones plasmáticas de proteínas (albúmina sérica y ácido α -1-glicoproteína) y bilirrubina. Se ha reportado que una diferencia cualitativa en la estructura de la albúmina causa una unión más pequeña de fármacos ácidos en el recién nacido comparado con los adultos (5, 26, 49).

2.2.4.2. Interacciones farmacológicas.

La naturaleza de las interacciones fármaco-fármaco y fármaco metabolito también es importante en la unión a proteínas, en éste caso un fármaco puede desplazar a otro de la proteína.

Generalmente el desplazamiento de una unión a proteínas en plasma conduce a una potenciación en los efectos terapéuticos del fármaco desplazado. Esto se puede explicar por el gran volumen de distribución del fármaco libre comparado al del fármaco unido. La concentración total en plasma disminuye tan pronto como desaparece el fármaco libre de la sangre y se distribuye a los tejidos (1, 2, 12).

Bajo circunstancias normales, para los fármacos altamente unidos a proteínas plasmáticas, una porción pequeña del fármaco total se considera activa, consecuentemente, un desplazamiento pequeño causa un aumento desproporcionado en la concentración del fármaco libre, lo cual puede causar una intoxicación (1, 2, 5, 11). Así, un desplazamiento del 1% de la albúmina de un fármaco que se une en un 99%, doblaría el porcentaje de fármaco libre. Con fármacos que no se unen a proteínas en una gran proporción, un desplazamiento pequeño causa un aumento también muy pequeño en la concentración de fármaco libre, en base a lo cual se puede predecir cuáles fármacos unidos a albúmina podrían estar envueltos en interacciones clínicamente importantes. Tales fármacos serían los que están altamente unidos a albúmina a concentraciones terapéuticas (mayor al 90%), con un volumen de distribución aparente pequeño, y estrecho índice terapéutico (1, 2, 5, 11, 12).

El antagonismo de unión puede resultar de una interacción competitiva o no competitiva. En el primer caso, un fármaco puede desplazar a otro principio activo de la proteína causando un aumento imprevisto en la respuesta farmacológica debido a un aumento en la concentración de fármaco libre y esto se observa entre fármacos que comparten el mismo sitio de unión. La interacción depende principalmente de la concentración relativa de la proteína y la del fármaco, además de que ambos fármacos se deben unir a un número limitado de sitios, implicando una unión saturable a niveles terapéuticos (1, 2, 5, 12).

En la interacción no competitiva , los fármacos desplazantes pueden unirse a albúmina en sitios en donde el fármaco desplazado

Generalidades.

no se une, introduciendo cambios estructurales en la conformación terciaria de la albúmina, que es muy flexible. Tales cambios alostéricos, pueden alterar el número o la afinidad (o ambos) de los sitios de unión haciendo el proceso más complicado (5, 12).

2.2.4.3.Estados patológicos.

-Enfermedades renales.

La vía renal es una de las principales vías de eliminación. Una función renal disminuída puede alterar la unión de fármacos a proteínas por la acumulación de metabolitos del fármaco y compuestos de desecho endógeno los cuales pueden competir por los mismos sitios de unión o alterar la afinidad del fármaco a la proteína (12, 13).

La unión de muchos fármacos a albúmina plasmática está disminuída en pacientes con falla renal crónica o aguda o en nefrosis. Otros factores que podrían explicar la disminución de la unión en falla renal incluyen cambios conformacionales en la molécula de albúmina, que disminuyen su capacidad de unión a fármacos (12, 13).

Las enfermedades renales afectan principalmente la unión a proteínas de fármacos ácidos (13).

-Enfermedades hepáticas.

En enfermedades hepáticas se puede presentar hipoalbuminemia. Así mismo se puede incrementar la concentración de compuestos endógenos tales como la bilirrubina, la cual puede actuar como un inhibidor de la unión para algunos fármacos (12, 13).

Las implicaciones clínicas de los cambios en la unión a proteínas en enfermedad hepática, son impredecibles, debido a la compleja naturaleza de la función hepática sobre la disposición del fármaco (12, 13).

-Otras enfermedades.

Los pacientes con diabetes mellitus tienen niveles altos de glucosa circulante en sangre la cual puede conducir a glicosilación no enzimática de varias proteínas incluyendo albúmina, produciendo así disminución en la unión de fármacos ácidos (12, 13, 50).

Los desordenes respiratorios como en enfermedades pulmonares obstructivas crónicas pueden alterar la unión a proteínas de algunos fármacos (13).

Se han asociado varios estados de enfermedad con el incremento en las concentraciones de ácido- α -1-glicoproteína en plasma. Estos incluyen cáncer, infección aguda e inflamación (13).

Algunos factores que disminuyen la concentración de proteínas plasmáticas se encuentran descritos en el cuadro no. 2 (2).

Cuadro No. 2. Factores que disminuyen la concentración de proteínas plasmáticas.

ENFERMEDAD	MECANISMO
Lesión hepática.	Disminución en la síntesis de proteínas.
Traumatismo por cirugía.	Aumento en el catabolismo de proteínas.
Lesión renal.	Eliminación excesiva de proteínas.
Quemaduras	Distribución de albúmina a espacios extravasculares.

2.2.5. Implicaciones en la terapia farmacológica.

Los esquemas de dosificación que han sido diseñados empíricamente para fármacos altamente unidos a albúmina están basados en las concentraciones normales y en el grado de unión de los fármacos a la albúmina. Esto no siempre es apropiado cuando la unión a albúmina es anormal, ya que en éstos casos las dosis deberán ser más pequeñas que la usual para alcanzar el mismo efecto terapéutico y evitar toxicidad (12).

La determinación del grado de unión a proteínas puede ser de gran utilidad para seleccionar los regímenes de dosificación óptimos, para monitorear el fármaco utilizando las concentraciones de fármaco libre o para ajustar las dosis de acuerdo a la capacidad de unión a proteínas plasmáticas y así, evitar efectos secundarios.

2.3. Método de diálisis al equilibrio para la determinación del grado de unión a proteínas.

2.3.1. Principios.

Los estudios para determinar el grado de unión a proteínas se realizan por lo general "in vitro" (3).

La diálisis al equilibrio es la técnica más empleada para el estudio de la unión de fármacos y otros ligandos a proteínas. En éste método la proteína está contenida en un compartimiento, el cual está separado de un segundo compartimiento por una membrana que es permeable a todos los otros componentes del sistema excepto a la proteína misma (fig. 3). Al equilibrio, la actividad del ligando libre es la misma en ambos lados de la membrana. Si se conoce la cantidad total de fármaco en el sistema, la cantidad de fármaco unido a la proteína puede ser calculada fácilmente (14, 26, 29, 37, 40). En la figura 3 se presenta el diagrama de la diálisis al equilibrio.

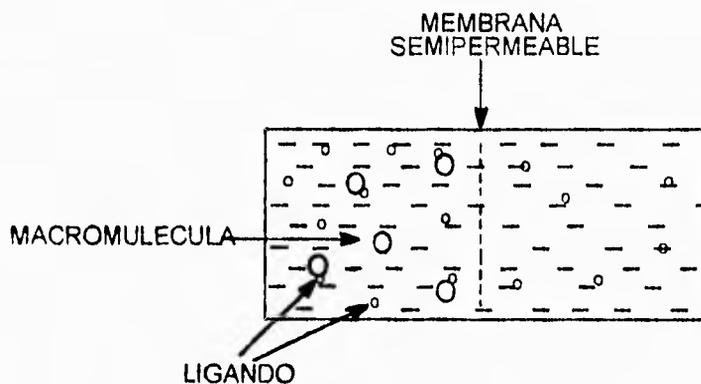


Fig. 3. Principio de diálisis al equilibrio.

2.3.2. Características de la diálisis.

2.3.2.1. Agua.

El agua usada para la preparación de las soluciones buffer y la membrana de diálisis debe ser destilada en vidrio y desionizada (14, 37, 40).

2.3.2.2. Soluciones amortiguadoras.

La elección del amortiguador está gobernada principalmente por el pH del experimento.

Si la concentración de la solución amortiguadora es alta, existe la posibilidad de que pueda competir con los ligandos que por sí mismos están cargados ionicamente. Si por el contrario, se emplea una concentración relativamente baja puede ser necesario adicionar sales neutras para suprimir el efecto de Donnan (sección 2.3.5.3) (14, 37, 39). Para atenuar ambas situaciones por lo general se utiliza una solución amortiguadora de fosfatos a una concentración 0.064M y pH 7.4.

2.3.2.3. Proteínas.

Los estudios de unión pueden ser llevados a cabo con albúmina plasmática comercial o con albúmina aislada de muestras plasmáticas (14, 37).

La albúmina comercial contiene 95% de albúmina con α globulinas como su principal contaminante. También pueden estar presentes cantidades pequeñas de α -1 glicoproteínas. Muchos fabricantes ofrecen albúmina cristalizada, la cual es más adecuada para los estudios de unión; sin embargo, tales preparaciones pueden contener todavía cantidades significativas de ácidos grasos. Para los casos en los que la presencia de ácidos grasos influya en la determinación de la unión a proteínas, existe en el mercado albúmina sérica humana cristalizada libre de ácidos grasos (14, 37).

De igual forma, si la cuestión económica es un factor determinante se dispone de albúmina sérica bovina comercializada con características similares, en cuanto a sitios de unión, con albúmina humana (14).

2.3.2.4. Membranas.

Las membranas de acetato de celulosa regeneradas son las más ampliamente usadas para las mediciones de la diálisis al equilibrio. Estas membranas están disponibles bajo una gran variedad de nombres y en un número de tamaños y espesor diferentes. Las membranas generalmente contienen trazas de agua, glicerol y sulfuros (14).

2.3.3. Equipos.

Actualmente, los equipos utilizados para diálisis al equilibrio combinan velocidad, precisión, baja adsorción, eficiencia, conveniencia y reproducibilidad (15).

El aparato utilizado para éste trabajo (disponible comercialmente) es el que consta de un número de celdas dializantes de teflón. Estas celdas dializantes están diseñadas de tal manera que al unirse sellan la membrana y por lo tanto dividen el interior en dos compartimientos, uno a cada lado de la membrana. Cada celda de teflón se separa de la otra por espaciadores de acero inoxidable. Las muestras se introducen y se retiran a través de orificios localizados en los bordes de la celda (15).

En éste tipo de estudios se introduce una solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4 en uno de los compartimientos de la celda y la solución del fármaco unido a proteína en el otro compartimiento. La membrana es seleccionada para permitir solamente la difusión del fármaco libre (15, 34).

Las celdas ensambladas en el soporte se montan en la unidad de rotación. Las celdas de teflón se rotan alrededor de un eje perpendicular a la membrana a velocidades variables que se ajustan entre 5 y 30 rpm (15).

El instrumento también está diseñado para ser sumergido en un baño de agua. Solamente se sumergen el soporte de las celdas y las celdas de teflón. Las partes del instrumento que están expuestas al agua están hechas de acero inoxidable para resistir la corrosión (15).

En la figura 4 se muestra éste aparato (15).

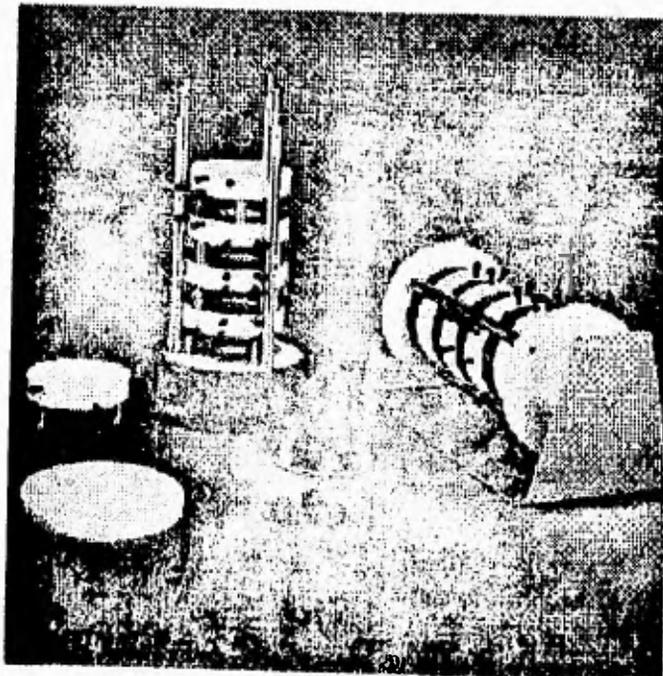
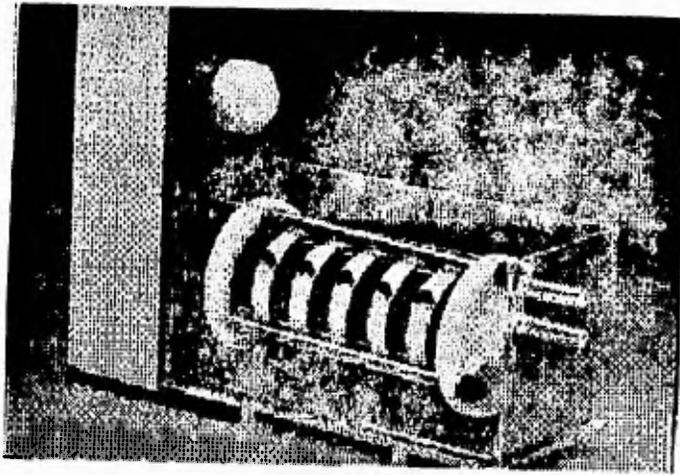


Fig.4. Equipo de diálisis al equilibrio de 5 celdas.

2.3.4. Factores que afectan la velocidad a la cual se alcanza el equilibrio.

La velocidad a la cual se alcanza el equilibrio está gobernado por la ley de Fick , que se resume en la siguiente ecuación (14):

$$\frac{dQ}{dt} = \frac{DAR (C_1 - C_2)}{X}$$

donde :

Q = cantidad de fármaco transferido a través de la membrana.

D = coeficiente de difusión del fármaco.

A = área de la membrana.

R = coeficiente de partición del fármaco entre la membrana y la solución en cada compartimiento.

C₁ = concentración del fármaco libre del lado en el cual el ligando fue inicialmente adicionado.

C₂ = concentración del fármaco libre al otro lado de la membrana.

X = espesor de la membrana.

En base a ésta ecuación se observa que los principales factores que afectan el proceso de diálisis son :

1.-Velocidad de rotación. La rotación de las celdas maximiza el gradiente de concentración alrededor de la membrana en todos los tiempos y minimiza el efecto de la polarización de la concentración en la membrana. Se ha encontrado que a mayores velocidades, menor es el tiempo al cual se alcanza el equilibrio; sin embargo, velocidades demasiado altas pueden desnaturalizar a la proteína (14, 15, 40).

2.-Temperatura. Como se puede observar en la ecuación anterior, la velocidad de difusión es directamente proporcional al coeficiente de difusión y, por lo tanto, es directamente proporcional a la temperatura.

Así, es de esperarse que un incremento en la temperatura resultaría en un equilibrio más rápido (14, 40).

3.-Área de la membrana, espesor y tamaño de poro. La velocidad de diálisis depende del área de la membrana o más específicamente de la relación área de la membrana / volumen de la celda. Si ésta relación es alta, el equilibrio se puede alcanzar más rápidamente. Un método para reducir el tiempo es mezclar la proteína con el ligando al inicio del experimento. Por otro lado, en la misma ecuación se puede ver que la reducción en el tamaño de poro de una membrana o el incremento en su espesor retarda la velocidad a la cual un sistema dado alcanza el equilibrio (14, 40).

2.3.5. Problemas encontrados en los estudios de diálisis al equilibrio.

2.3.5.1. Adsorción del ligando a la membrana.

En los estudios de unión la baja adsorción es absolutamente necesaria ya que, las especies no unidas deben ser permeables libremente a través de la membrana para obtener el equilibrio. La cantidad de fármaco que se une a la membrana puede variar enormemente dependiendo de la naturaleza química de la membrana. El no considerar la unión a membrana causa errores en la estimación de la cantidad de ligando unido a la proteína. En cada estudio de diálisis al equilibrio se debe incluir la diálisis de por lo menos una muestra de fármaco sin proteína contra buffer para compararla con su blanco respectivo (14, 15).

2.3.5.2. Errores en el blanco.

Aún las membranas más cuidadosamente preparadas desprenden materiales en la solución de diálisis, las cuales absorben luz. Usualmente no es un problema cuando las mediciones espectrofotométricas se hacen a longitudes de onda del visible; sin embargo, abajo de 300 nm estos materiales pueden conducir a valores erróneos del blanco. Los materiales que absorben en el UV también pueden ser liberados por la albúmina plasmática o la proteína misma, lo cual puede traer problemas en mediciones espectrofotométricas (14).

2.3.5.3. Efecto de Donnan.

Si la proteína tiene una carga neta y el ligando está cargado, la concentración de ligando libre en cada lado de la membrana de diálisis podría no ser igual debido al efecto de Donnan. Esta diferencia puede ser despreciable cuando se utiliza una concentración de buffer suficientemente alta y/o sales neutras (14).

2.3.5.4. Volumen de Shift o de desplazamiento.

El agua fluye desde el lado del buffer hacia el lado de plasma durante la diálisis, provocando una dilución de la proteína así como una sobreestimación de la fracción libre. La sobreestimación depende del volumen desplazado (volumen de Shift) y de la fracción de fármaco libre. El volumen de Shift es probablemente una consecuencia de diferencias osmóticas en los fluidos a ambos lados de la membrana, disminuyendo la unión "in vitro" de algunos fármacos.

El volumen desplazado depende del tiempo usado para la diálisis. Se ha visto que en diálisis de 16 hrs., el volumen de Shift promedio fue del 31 %, mientras que, usando la misma membrana en diálisis de 6 hrs., el volumen de Shift promedio fue del 10 %.

El volumen de Shift se determina usualmente midiendo el volumen de muestra antes y después del equilibrio de diálisis. Practicamente no es fácil determinar el volumen de muestra exacto después de la diálisis por lo que es más adecuado medir la concentración de proteína antes y después de la diálisis y aplicar los cálculos para su corrección. Esta corrección es importante cuando el volumen de Shift es sustancial y cuando la fracción del fármaco libre es pequeña.

Para atenuar el volumen de Shift se recomienda utilizar membranas con un cutoff de bajo peso molecular, bajo espesor e incluir dextran en el buffer (alrededor de la mitad de la concentración del buffer) para disminuir el gradiente de presión osmótica que existe a ambos lados de la membrana (33, 35, 36).

2.3.6. Cálculos.

Después de un determinado tiempo se alcanza el equilibrio y la concentración de fármaco libre F_L es igual en ambos lados de la membrana (15, 16).

De la media celda que contiene el fármaco en solución, se puede determinar la concentración de fármaco libre (F_L) por una gran variedad de técnicas analíticas específicas (15).

La otra media celda contiene el complejo fármaco-proteína y fármaco libre, $F_L + F_U$. Puesto que se conoce la concentración inicial de fármaco $F_{L(0)}$, se determina por diferencia la cantidad unida (15).

Para obtener la fracción de fármaco libre, en la práctica se divide la concentración obtenida del lado del buffer al equilibrio entre la concentración obtenida del lado del plasma al equilibrio (14), es decir :

$$F_L = \frac{Cl}{Cl + Cu}$$

en donde :

Cl = concentración de fármaco libre.

Cu = concentración de fármaco unido.

2.3.7. Ventajas y desventajas.

En el cuadro no. 3 se presentan las ventajas y desventajas de el método de diálisis al equilibrio (14, 15, 16).

Cuadro No. 3. Ventajas y desventajas del método de diálisis al equilibrio.

Ventajas	Desventajas
-Temperatura controlada.	-Se requiere mucho tiempo para alcanzar el equilibrio en algunos casos.
-Aparatos de diálisis comercialmente disponibles.	-Degradación de proteínas o fármacos inestables.
-Ampliamente usado.	-Posible unión de fármacos a los componentes de la celda.
-Técnica simple y no muy costosa.	-Dilución de proteínas plasmáticas.
-Muestras pequeñas de proteína.	-Tedioso.

III.
Sección
experimental.

3.1. Método analítico para la cuantificación de albendazol y sulfóxido de albendazol

El método analítico utilizado para la cuantificación de albendazol y/o sulfóxido de albendazol en plasma fue un método por cromatografía de líquidos de alta resolución, reportado por Hurtado y cols. (53).

3.1.1. Material y equipo.

Balanza analítica Sartorius, modelo A210P.

Centrífuga Dynac, modelo 0101.

Agitador Vortex Thermolyne, modelo M37615.

Cartuchos Sep-Pak C₁₈, Waters.

Cromatógrafo de líquidos Beckman System Gold, equipado con :

Detector uv-vis, modelo 166.

Inyector automático, modelo 507.

Bomba, modelo 116.

3.1.2. Reactivos.

Estándar secundario de albendazol, SKF (México).

Estándar secundario de sulfóxido de albendazol, SKF (Filadelfia).

Estándar secundario de mebendazol, Columbia (México).

Albúmina bovina (Sigma, lote 79F9303).

Fosfato de potasio monobásico, R.A. (Mallinckrodt, lote 7100 KJBR).

Fosfato de amonio monobásico, R.A. (Mallinckrodt, lote 3476 KCPM).

Hidróxido de sodio, R.A. (Mallinckrodt, lote 7708 KCCK).

Metanol R.A. y HPLC (Mallinckrodt).

Dimetilsulfóxido (DMSO), R.A. (Mallinckrodt, lote 4948 KHTK).

Agua destilada, desionizada y filtrada.

3.1.3. Soluciones.

-Solución amortiguadora de fosfatos 0.05 M , pH 5.7.

Pesar 6.87 g de fosfato de potasio, disolver y aforar a 1000 ml con agua grado HPLC. Ajustar el pH a 5.7 con NaOH 0.8 M.

-Plasma humano aportado por el Instituto Nacional de Neurología.

Sección experimental.

-Solución amortiguadora de fosfatos 0.01 M, pH 7.4.

Pesar 1.37 g de fosfato de potasio, disolver y aforar a 1000 ml con agua grado HPLC. Ajustar el pH a 7.4 con NaOH 0.8 M.

-Solución de albúmina bovina al 0.01%.

Pesar 0.01 g de albúmina bovina, disolver y aforar a 100 ml con agua grado HPLC.

-Solución estándar de mebendazol (estándar interno) en MeOH.

Pesar 5.0 mg de mebendazol, añadir 1 ml de DMSO y 1 ml de metanol R.A., disolver y aforar a 50 ml con metanol (conc.=100 mcg/ml). De la solución anterior tomar 5 ml y aforar con metanol R.A. a 10 ml para obtener una concentración final de 50 mcg/ml.

-Solución estándar de albendazol o sulfóxido de albendazol en plasma o albúmina bovina.

Pesar por separado 10.0 mg de albendazol y sulfóxido de albendazol, añadir a cada uno 1 ml de DMSO y 1.5 ml de metanol R.A., disolver y aforar a 10 ml con metanol R.A. (conc. = 1000 µg/ml). De cada una de las soluciones anteriores, transferir 1 ml a matraces volumétricos de 10 ml y aforar al volumen con metanol R.A. (conc. = 100 µg/ml). Tomar una alícuota de 400 µL de las soluciones anteriores de 100 µg/ml y aforar cada una a 10 ml con plasma o albúmina bovina al 0.01% (conc. = 4.0 µg/ml).

3.1.4. Curva patrón de albendazol o sulfóxido de albendazol.

Preparación de la curva patrón: De la solución de 4.0 µg/ml tomar 5 ml y aforar a 10 ml con metanol R.A., plasma o albúmina (conc.=2.0 µg/ml), de la solución anterior tomar 5 ml y aforar a 10 ml con metanol R.A., plasma o albúmina (conc.=1.0 µg/ml), de ésta solución tomar 5 ml y aforar a 10 ml con metanol R.A., plasma o albúmina (conc.=0.5 µg/ml), de la solución anterior tomar 5 ml y aforar a 10 ml con metanol R.A., plasma o albúmina (conc.=0.250 µg/ml), de ésta solución tomar 5 ml y aforar a 10 ml con metanol R.A., plasma o albúmina (conc.=0.125 µg/ml), de ésta última solución, tomar 5 ml y aforar a 10 ml con metanol R.A., plasma o albúmina para obtener una concentración final de 0.0625 µg/ml. De las soluciones de metanol y albúmina bovina, tomar 0.5 ml de cada una y

Sección experimental.

agregar 20 μL de estándar interno (S.I.) de mebendazol (50 $\mu\text{g/ml}$) preparado anteriormente.

3.1.5.-Preparación de las muestras.

Las muestras biológicas de plasma se prepararon como a continuación se especifica: A 0.5 ml de plasma se le añadieron 20 μL de estándar interno (S.I.) de mebendazol (50 $\mu\text{g/ml}$) y 2 ml de solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4 y se agitó en vortex durante 30 seg. La muestra se pasó a través de un cartucho Sep-Pak C_{18} , previamente activado *. Se lavó el cartucho con 20 ml de solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4 y 1 ml de una mezcla metanol-agua (20:80 v/v) desechando la solución eluída. Posteriormente se pasaron por el cartucho 3 ml de metanol R.A., se colectaron en un tubo cónico y se evaporaron a sequedad en un baño de agua a 40°C y bajo corriente de nitrógeno. La muestra se reconstituyó con 500 μL de metanol R.A. y se pasó al vial del inyector del cromatógrafo automático. En la figura 5 se presenta el diagrama correspondiente a la preparación de las muestras.

3.1.6. Condiciones cromatográficas.

Las condiciones cromatográficas utilizadas fueron :

- Columna de octadecil silano (C_{18}) de 250 X 4.6 mm, con tamaño de partícula de 5 μ .

- Fase móvil: metanol-solución amortiguadora de fosfatos pH 5.7 (63:37 v/v).

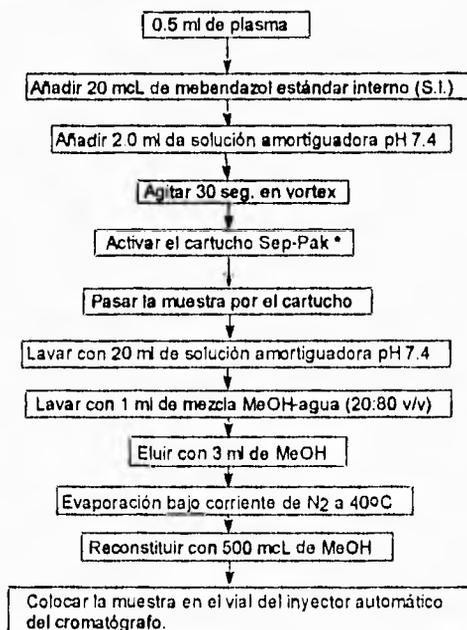
- Flujo: 0.8 ml/min.

- Longitud de onda: 295 nm.

- Sensibilidad del detector: 1.0 auf.

Una vez inyectadas las muestras se determina la relación de alturas sulfóxido de albendazol/estándar interno (S.I.) y Albendazol/estándar interno (S.I.).

Fig. 5 . Diagrama de flujo para la preparación de las muestras.



*Activación del cartucho Sep-Pak: se pasan a través del cartucho 5 ml de metanol R.A. y después 5 ml de solución amortiguadora de fosfatos pH 5.5.

3.2. Validación del método analítico.

3.2.1 Selectividad.

Este parámetro se evaluó preparando blancos de plasma y albúmina bovina, así como muestras de ambos, añadidos de sulfóxido de albendazol, albendazol y mebendazol, las cuales se analizaron de acuerdo a lo especificado en la sección 3.1.4.2.

3.2.2 Linealidad.

Para determinar si la relación de alturas albendazol/S.I. y Sulfóxido de albendazol/S.I. era lineal, se prepararon 3 curvas patrón en plasma y 3

Sección experimental.

en albúmina bovina, en el intervalo de concentraciones de 0.062-4.0 µg/ml de acuerdo a lo especificado en la sección 3.1.4.

3.2.3 Exactitud.

Se prepararon por duplicado curvas de albendazol y sulfóxido de albendazol en plasma y en albúmina bovina en el intervalo de concentraciones de 0.0625 a 4.0 µg/ml de acuerdo a la sección 3.1.4. Al mismo tiempo se prepararon curvas estándar en metanol a las mismas concentraciones y se determinó el rendimiento en la extracción a cada concentración.

3.2.4 Repetibilidad.

El parámetro se evaluó en un mismo día de trabajo, bajo condiciones idénticas de analista, equipo y laboratorio. Se prepararon 3 curvas patrón de albendazol y sulfóxido de albendazol, tanto en plasma como en albúmina bovina, siguiendo el procedimiento descrito en 3.1.5., y se determinó el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación por ciento de los resultados obtenidos.

3.2.5. Reproducibilidad.

Este parámetro se evalúa en dos días de trabajo continuos, variando solo analista y conservando condiciones de equipo y laboratorio. Se prepararon 3 curvas patrón de albendazol y sulfóxido de albendazol por cada analista, tanto en plasma como en albúmina bovina, siguiendo el procedimiento descrito en 3.1.5. Se determinó la media, desviación estándar y coeficiente de variación por ciento, así como un análisis de varianza de dos factores (ANADEVA) con una $p = 0.05$, para los resultados obtenidos por cada analista.

3.3. Estudios de unión de albendazol y/o sulfóxido de albendazol a proteínas plasmáticas.

3.3.1. Método de cuantificación de proteínas plasmáticas.

El método analítico utilizado para la cuantificación de proteínas plasmáticas fue el reportado por Gonall, Bardawill y Davild (17). Este procedimiento se utilizó para determinar la cantidad de proteínas totales presentes en el plasma utilizado.

3.3.1.1. Material y Equipo.

Agitador Vortex Thermolyne Modelo M37615.
Espectrofotómetro Beckman Modelo DU-68.

3.3.1.2. Reactivos.

Albúmina bovina (Sigma, lote 79F9303).
Sulfato de cobre R.A. (J.B.Baker, lote E16348).
Tartrato de sodio y potasio R.A. (J.B. Baker, lote M36186).
Cloruro de sodio R.A. (Mallinckrodt, lote 7581 KEAK).
Yoduro de potasio R.A. (Mallinckrodt, lote 7536 KEBK).
Hidróxido de sodio R.A. (Mallinckrodt, lote 7708 KEVC).
Acido clorhídrico R.A. (J.B.Backer, lote F31454).
Fenoltaleína.

3.3.1.3. Soluciones.

-Solución patrón de proteína.

Pesar 0.07 g de albúmina bovina y colocarlos en un matraz volumétrico de 10 ml, agregar 5 ml de agua destilada hasta disolver y llevar al aforo.

-Reactivo de Biuret.

Sulfato de cobre	1.5 g
Tartrato de sodio y potasio	6.0 g
Yoduro de potasio	1.0 g
Hidróxido de sodio 2.5 N.	

En un matraz volumétrico de 1000 ml colocar el sulfato de cobre y el tartrato de sodio y potasio, agregar 500 ml de agua destilada y agitar a disolución. Agregar, bajo agitación constante, 300 ml de hidróxido de sodio 2.5N previamente titulado y mezclar. Agregar yoduro de potasio y agitar hasta disolución. Aforar y conservar en frasco obscuro.

-Solución de cloruro de sodio al 0.9% (solución salina isotónica).

Pesar 8.5 g de cloruro de sodio, colocarlo en un matraz de 1000 ml, agregar 500 ml de agua destilada, disolver y llevar al aforo.

3.3.2. Curva patrón para cuantificar proteínas plasmáticas.

3.3.2.1. Preparación de la curva patrón.

Se etiquetaron 8 tubos y se procedió de la siguiente manera: El tubo no. 1 sirvió como blanco y se le agregaron 2.0 ml de solución salina isotónica (S.S.I.) al 0.9%. Al tubo no.2 se le añadieron 1.7 ml de S.S.I. al 0.9% y 0.3 ml de solución patrón de proteína (conc.=2.1 g/100 ml). En el tubo no.3 se agregaron 1.5 ml de S.S.I. y 0.5 ml de solución patrón de proteína (conc.=3.5 g/100 ml). Al tubo no.4 se le añadieron 1.2 ml de S.S.I. y 0.8 ml de solución patrón de proteína. En el tubo no. 5 se agregaron 1.0 ml de S.S.I. y 1.0 ml de solución patrón de proteína (conc.=7.0 g/100 ml). Al tubo no.6 se le añadieron 0.7 ml de S.S.I. y 1.3 ml de solución patrón de proteína (conc.=9.1 g/100ml). En el tubo no. 7 se agregaron 0.5 ml de S.S.I. y 1.5 ml de solución patrón de proteína (conc.=10.5 g/100 ml). Al último tubo se le añadieron solo 2.0 ml de solución patrón de proteína (conc.=14.0 g/100 ml). A cada tubo se agregaron 8 ml de reactivo de Biuret y se mezcló en vortex 30 seg. Se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 30 min. Se analizó espectrofotométricamente en la región del visible a 540 nm.

La preparación de la curva se resume en el cuadro no. 4 .

3.3.2.2. Preparación de las muestras biológicas.

Se tomaron 0.5 ml de plasma, se colocaron en un tubo y se llevó a 10 ml con S.S.I. al 0.9%. De la solución anterior se tomaron 2 ml, se pasaron a un tubo y se le agregaron 8 ml de reactivo de biuret, se agitaron en vortex 30 seg. y se dejaron reposar 30 min. a temperatura ambiente. Las muestras se leyeron en la región del visible a una longitud de onda de 540 nm y los resultados se interpolaron en la curva patrón de la sección 3.3.2.1. En la figura 6 se presenta el diagrama correspondiente a la preparación de las muestras.

Cuadro no. 4. Preparación de la curva patrón para la cuantificación de proteínas plasmáticas

Tubo No.	Sol.salina isotónica al 0.9%(ml)	ml de sol. patrón de proteína.	Reactivo de Biuret (ml).	Concentración de proteínas g/100 ml
1	2.0	0	8	0 (bco)
2	1.7	0.3	8	2.1
3	1.5	0.5	8	3.5
4	1.2	0.8	8	5.6
5	1.0	1.0	8	7.0
6	0.7	1.3	8	9.1
7	0.5	1.5	8	10.5
8	0.0	2.0	8	14.0

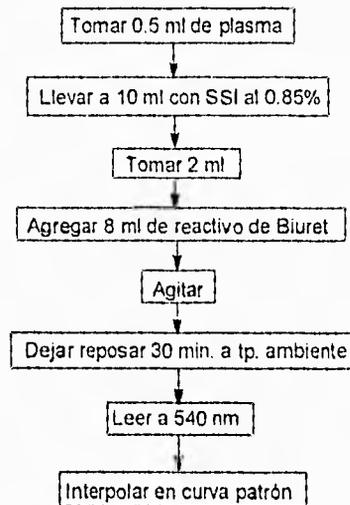


Fig. 6 . Diagrama de flujo de la preparación de muestras para la cuantificación de proteínas plasmáticas.

3.3.3. Linealidad y repetibilidad del método analítico para cuantificar proteínas plasmáticas.

Para determinar la linealidad se prepararon 3 curvas patrón por el método descrito en la sección 3.3.4.1 y se determinó coeficiente de correlación, pendiente e intercepto.

La repetibilidad se evaluó preparando 10 muestras de concentración 7 g/100 ml conforme a la técnica mencionada en la sección 3.3.1.4.1. Se calculó el promedio, desviación estándar y el porcentaje del coeficiente de variación.

3.3.4. Estudios de unión a proteínas "in vitro".

3.3.4.1. Material y equipo.

Aparato dializador Spectrum 5-Cell Equilibrium Dialyzers, modelo 132360, que consta de:

5 celdas de teflón.

6 separadores metálicos.

Motor de rotación.

Base de dializador.

15 tapones para las celdas.

Agujas sin punta.

Jeringas de 1 ml.

Membranas Spectra/Por Dialysis No. 2, MWCO:12-14,000, 200 X 200 mm, lote 132686.

Baño de agua Imperial IV.

Termómetro.

Pinzas sin punta.

3.3.4.2. Reactivos.

Fosfato de potasio monobásico, R.A.(Mallincrodt, lote 7100 KJBR).

Etanol R.A. (Merck).

Hidróxido de sodio R.A.(Mallincrodt, lote 7708 KCCK).

Agua destilada, desionizada y filtrada.

3.3.4.3. Soluciones.

-Solución amortiguadora de fosfatos 0.064 M , pH 7.4.

Pesar 1.74 g de fosfato de potasio , disolver y aforar a 1000 ml con agua desionizada. Ajustar el pH a 7.4 con NaOH 0.8 M.

3.3.5. Estudios "in vitro".

3.3.5.1. Tiempo de equilibrio.

Para encontrar el tiempo de equilibrio óptimo se inyectó, del lado de la celda con menor grosor, 1 ml de solución amortiguadora de fosfatos 0.064M, pH 7.4 añadido de albendazol o sulfóxido de albendazol a una concentración 2.0 µg/ml; del lado de la celda con mayor grosor se inyectó 1 ml de plasma y se dejó dializar en baño de agua a 37°C y 30 rpm siguiendo los pasos mencionados dentro de las generalidades. Se tomaron muestras a los 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 90, 120, 180, 240, 300 y 480 min.

Las muestras se analizaron de acuerdo a lo descrito en la sección 3.1.5.

3.3.5.2. Determinación de la unión del albendazol o sulfóxido de albendazol a la membrana de diálisis.

Para determinar si el albendazol y el sulfóxido de albendazol se unían en cierto grado a la membrana, se inyectaron al dializador muestras de 1 ml de solución amortiguadora de fosfatos añadido de albendazol o sulfóxido de albendazol de concentración 2.0 µg/ml (sección 3.1.4.1) y se pusieron a dializar frente a 1 ml de solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4, blanco, por el tiempo de equilibrio determinado en la sección 3.3.3.4.1., 37°C y 30 rpm. Las muestras se analizaron según lo descrito en la sección 3.1.5.

3.3.5.3. Integridad de la membrana.

La integridad de la membrana se determinó tanto para plasma como para albúmina bovina dializando muestras de 1 ml contra 1 ml de solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4 durante 3 hrs. Al final de la diálisis se determinó si existía proteína del lado del buffer por el método de Biuret.

3.3.5.4. Determinación del volumen de Shift o volumen desplazado.

Para determinar el volumen de Shift se dializaron muestras de 1 ml tanto para albúmina bovina como para plasma con 1 ml de solución

Sección experimental.

amortiguadora de fosfatos pH 7.4, respectivamente, durante 3.0 hrs. Al final de la diálisis se cuantificó la cantidad de proteína del lado del plasma por el método de Biuret y se comparó con la concentración del plasma antes de la diálisis (blanco) haciéndose lo mismo en el caso de albúmina.

3.3.5.5. Grado de unión del albendazol y sulfóxido de albendazol a proteínas plasmáticas.

El grado de unión a proteínas plasmáticas se determinó dializando 5 muestras de 1 ml de plasma añadido de albendazol o sulfóxido de albendazol de concentraciones 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 y 4.0 $\mu\text{g/ml}$, con 1 ml de solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4 durante 3 hrs. El aparato se mantuvo a 37°C y 30 rpm. Una vez dializadas las muestras se analizaron ambos compartimientos (tanto la solución como el plasma), utilizando el método descrito en la sección 3.1.5.

3.3.5.6. Grado de unión de albendazol y sulfóxido de albendazol a albúmina.

Para obtener el grado de unión a albúmina se prepararon 5 muestras de albúmina cargada de albendazol a concentraciones de 1.0 y 2.0 $\mu\text{g/ml}$ y 5 muestras de albúmina cargada de sulfóxido de albendazol a concentraciones de 0.5 y 2.0 $\mu\text{g/ml}$ (sección 3.1.5.). Un ml de cada una de las muestras se dejaron dializar frente a 1 ml de buffer de fosfatos pH 7.4 durante 3 hrs., 37°C y 30 rpm.

IV.

Resultados.

A continuación se presentan los resultados obtenidos siguiendo los lineamientos descritos en el capítulo III.

4.1. Validación del método analítico para la cuantificación de albendazol y su principal metabolito, sulfóxido de albendazol en plasma y albúmina bovina.

4.1.1. Selectividad.

En las figuras 7 y 8 se presentan los cromatogramas obtenidos al analizar muestras blanco de plasma y albúmina bovina, así como las añadidas con albendazol, sulfóxido de albendazol y estándar interno (S.I). En albúmina, los tiempos de retención para albendazol, sulfóxido de albendazol y estándar interno fueron: 11.55 min., 5.75 min. y 7.88 min. respectivamente mientras que en plasma se encontraron los siguientes tiempos de retención: 13.55 min., 4.66 min. y 8.45 min.

4.1.2. Linealidad.

Los valores promedio de linealidad obtenidos al analizar 3 curvas patrón fueron :

-Albendazol en albúmina bovina :

$r= 0.9999$; $m= 0.4492$; $b= -0.0050$

(rango de concentración 0.062 - 4.0 mcg/ml) (figura 9)

-Albendazol en plasma :

$r= 0.9999$; $m= 0.4490$; $b= -0.0114$

(rango de concentración 0.062 - 4.0 mcg/ml) (figura 10)

-Sulfóxido de albendazol en albúmina bovina :

$r= 0.9999$; $m= 1.0268$; $b= 0.0093$

(rango de concentración 0.062 - 4.0 mcg/ml) (figura 11).

-Sulfóxido de albendazol en plasma :

$r= 0.9999$; $m= 1.0282$; $b= 0.0066$

(rango de concentración 0.062 - 4.0 mcg/ml) (figura 12).

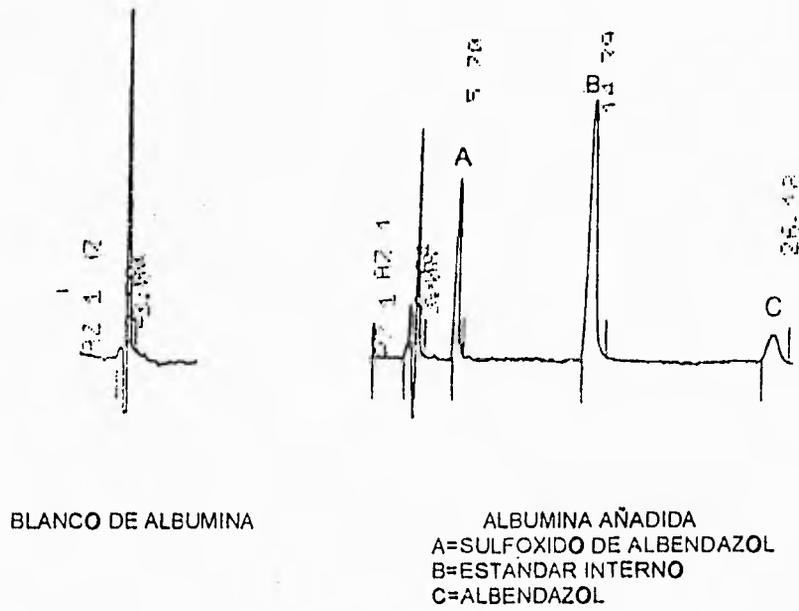


Fig. No.7. Selectividad del método analítico para la cuantificación de albendazol y sulfóxido de albendazol en albúmina.

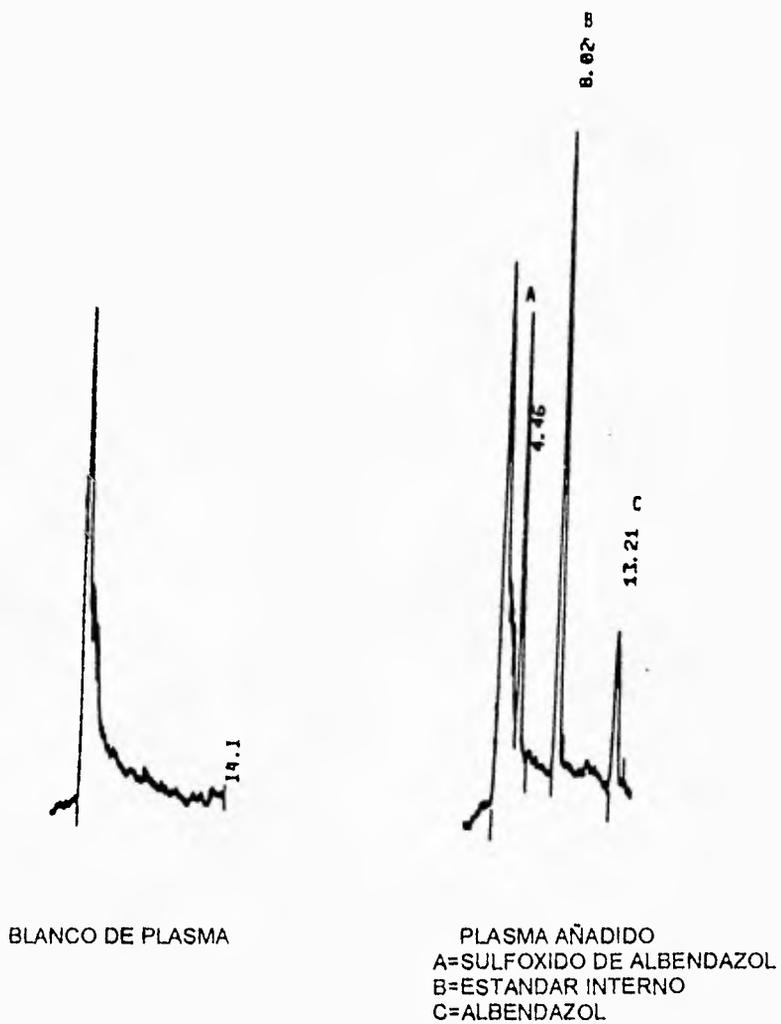


Fig. No.8. Selectividad del método analítico para la cuantificación de albendazol y sulfóxido de albendazol en plasma.

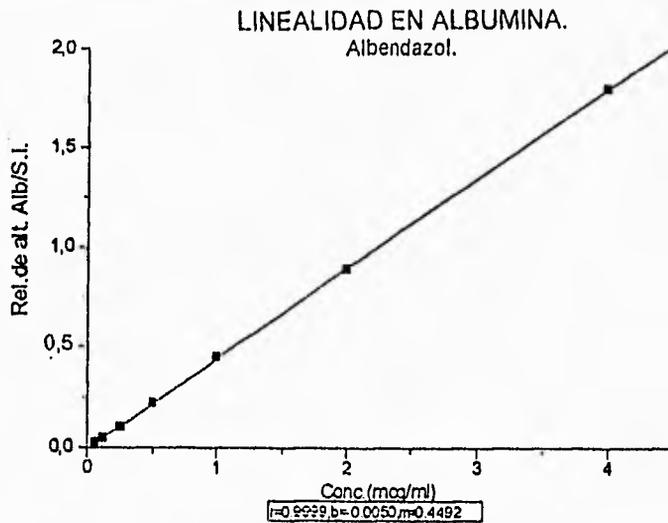


Fig. No.9. Linealidad del método analítico para cuantificar albendazol en albúmina.

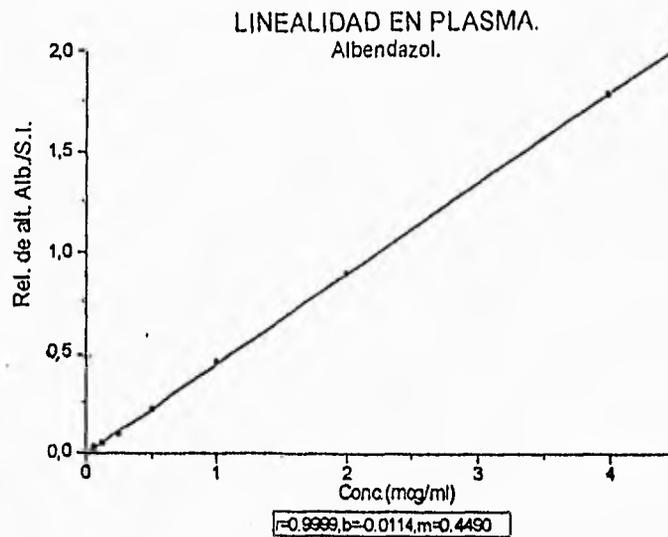


Fig. No.10. Linealidad del método analítico para cuantificar albendazol en plasma.

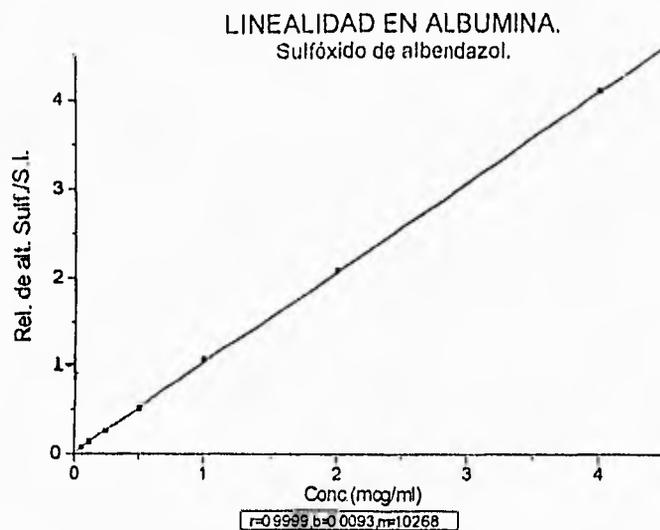


Fig. No.11. Linealidad del método analítico para cuantificar sulfóxido de albendazol en albúmina.

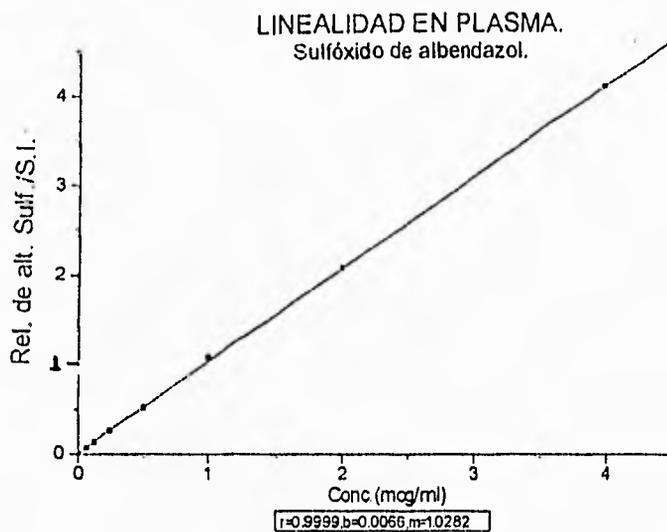


Fig. No.12. Linealidad del método analítico para cuantificar sulfóxido de albendazol en plasma.

4.1.3.Exactitud.

La exactitud se evaluó de acuerdo a lo especificado en la sección 3.2.4. y los resultados se presentan en los cuadros 5 a 8.

Cuadro No.5.Exactitud del método analítico para cuantificar albendazol en albúmina bovina.

Conc.($\mu\text{g/ml}$)	Relación de alturas en MeOH	Relación de alturas en albúmina	% de extracción
4.0	1.7514	1.7479	99.8
2.0	0.8613	0.8606	99.9
1.0	0.4466	0.4455	99.8
0.5	0.2262	0.2232	98.7
0.25	0.1175	0.1145	97.4
0.125	0.0551	0.0544	98.7
0.0625	0.0276	0.0269	97.5

% de extracción promedio = 98.8%

Cuadro No. 6.Exactitud del método analítico para cuantificar albendazol en plasma.

Conc.($\mu\text{g/ml}$)	Relación de alturas en MeOH.	Relación de alturas en plasma.	% de extracción
4.0	1.7514	1.7482	99.8
2.0	0.8613	0.8537	99.1
1.0	0.4466	0.4396	98.4
0.5	0.2262	0.2211	97.7
0.25	0.1175	0.1122	95.5
0.125	0.0551	0.0520	94.4
0.0625	0.0276	0.0253	91.7

% de extracción promedio = 96.7%

Resultados.

Cuadro No.7.Exactitud del método analítico para cuantificar sulfóxido de albendazol en albúmina bovina.

Conc.(µg/ml)	Relación de alturas en MeOH.	Relación de alturas en albúmina.	% de extracción
4.0	4.1304	4.1226	99.8
2.0	2.1010	2.1111	100.5
1.0	1.0626	1.0580	99.6
0.5	0.5360	0.5220	97.4
0.25	0.2670	0.2650	99.3
0.125	0.1288	0.1290	100.2
0.0625	0.0763	0.0740	97.0

% de extracción promedio = 99.1%

Cuadro No.8.Exactitud del método analítico para cuantificar sulfóxido de albendazol en plasma.

Conc (µg/ml)	Relación de alturas en MeOH.	Relación de alturas en plasma.	% de extracción
4.0	4.1304	4.1189	99.7
2.0	2.1010	2.0890	99.4
1.0	1.0626	1.0430	98.2
0.5	0.5360	0.5200	97.0
0.25	0.2670	0.2560	95.9
0.125	0.1288	0.1233	95.7
0.0625	0.0763	0.0722	94.6

% de extracción promedio = 97.2%.

Resultados.

4.1.4.Repetibilidad.

La repetibilidad se evaluó de acuerdo a lo especificado en la seccion 3.2.4. y los resultados se presentan en los cuadros 9 a 12.

Cuadro No.9.Repetibilidad del método analítico para cuantificar albendazol en albúmina bovina.

Conc (µg/ml)	Rel. de alturas 1.	Rel. de alturas 2	Rel. de alturas 3.	Rel. de alturas x	D.S.	C.V.%
4.0	1.7921	1.7896	1.7919	1.7912	0.0014	0.0782
2.0	0.8894	0.8884	0.8880	0.8886	0.0007	0.0788
1.0	0.4494	0.4451	0.4430	0.4458	0.0033	0.7402
0.5	0.2241	0.2178	0.2198	0.2206	0.0032	1.4506
0.25	0.1030	0.1023	0.1009	0.1021	0.0011	1.0774
0.125	0.0454	0.0446	0.0456	0.0452	0.0005	1.1062
0.0625	0.0249	0.0263	0.0255	0.0256	0.0007	2.7344

Rel. = Relación.

C.V.% = coeficiente de variación por ciento.

Cuadro No.10.Repetibilidad del método analítico para cuantificar albendazol en plasma.

Conc. (mcg/ml)	Rel. de alturas 1.	Rel. de alturas 2	Rel. de alturas 3.	Rel. de alturas x.	D.S.	C.V.%
4.0	1.7716	1.7749	1.7810	1.7758	0.0048	0.2703
2.0	0.8851	0.8892	0.8827	0.8857	0.0033	0.3726
1.0	0.4466	0.4439	0.4375	0.4427	0.0047	1.0617
0.5	0.2140	0.2188	0.2201	0.2176	0.0038	1.4706
0.25	0.0855	0.0888	0.0892	0.0878	0.0020	2.3128
0.125	0.0449	0.0435	0.0425	0.0436	0.0012	2.7523
0.0625	0.0238	0.0250	0.0247	0.0245	0.0006	2.4291

Resultados.

Cuadro No.11.Repetibilidad del método analítico para cuantificar sulfóxido de albendazol en albúmina bovina.

Conc. (mcg/ml)	Rel. de alturas 1	Rel. de alturas 2.	Rel. de alturas 3.	Rel. de alturas x.	D.S.	C.V.%
4.0	4.1032	4.1078	4.1101	4.1070	0.0035	0.0852
2.0	2.0712	2.0696	2.0723	2.0710	0.0014	0.0676
1.0	1.0610	1.0532	1.0557	1.0566	0.0040	0.3786
0.5	0.5125	0.5086	0.5106	0.5106	0.0020	0.3917
0.25	0.2607	0.2599	0.2661	0.2622	0.0034	1.2967
0.125	0.1311	0.1295	0.1281	0.1296	0.0015	1.1574
0.0625	0.0713	0.0695	0.0706	0.0705	0.0008	1.1348

Cuadro No.12.Repetibilidad del método analítico para cuantificar sulfóxido de albendazol en plasma.

Conc. (mcg/ml)	Rel. de alturas 1	Rel. de alturas 2	Rel. de alturas 3	Rel. de alturas x	D.S.	C.V.%
4.0	4.1106	4.0975	4.1093	4.1058	0.0072	0.1752
2.0	2.0694	2.0703	2.0675	2.0691	0.0014	0.0677
1.0	1.0610	1.0481	1.0577	1.0566	0.0067	0.6347
0.5	0.5130	0.5061	0.4984	0.5058	0.0073	1.4433
0.25	0.2612	0.2706	0.2615	0.2644	0.0053	2.0045
0.125	0.1319	0.1280	0.1327	0.1309	0.0025	1.9099
0.0625	0.0681	0.0710	0.0712	0.0701	0.0017	2.4251

4.1.5.Reproducibilidad.

La reproducibilidad se evaluó de acuerdo a lo especificado en la sección 3.2.5. y los resultados se presentan en los cuadros 13 a 16.

Resultados.

Cuadro No.13.Reproducibilidad del método analítico para cuantificar albendazol en albúmina bovina.

	Conc. ($\mu\text{g} / \text{ml}$)	Relación de alturas Analista 1		Relación de alturas Analista 2		C.V. %
	4.0	1.7921	1.7896	1.7579	1.7604	1.0343
D	2.0	0.8894	0.8884	0.8667	0.8790	1.1974
I	1.0	0.4494	0.4451	0.4397	0.4413	0.9741
A	0.5	0.2241	0.2178	0.2185	0.2202	1.2808
	0.25	0.1030	0.1023	0.1087	0.1069	2.9234
1	0.125	0.0474	0.0486	0.0501	0.0497	2.4769
	0.0625	0.0249	0.0263	0.0245	0.0251	3.0738
	4.0	1.7912	1.8011	1.7651	1.7595	1.1290
D	2.0	0.8813	0.8923	0.8755	0.8689	1.1283
I	1.0	0.4472	0.4407	0.4408	0.4336	1.2611
A	0.5	0.2262	0.2215	0.2217	0.2193	1.3031
	0.25	0.1007	0.1038	0.1014	0.0982	2.2808
2	0.125	0.0491	0.0460	0.0479	0.0471	2.7509
	0.0625	0.0266	0.0255	0.0248	0.0262	3.0774

Cuadro No.14.Reproducibilidad del método analítico para cuantificar albendazol en plasma.

	Conc. ($\mu\text{g} / \text{ml}$)	Relación de alturas Analista 1		Relación de alturas Analista 2		C.V. %
	4.0	1.7816	1.7918	1.7610	1.7558	0.9588
D	2.0	0.8892	0.8827	0.8719	0.8697	1.0456
I	1.0	0.4466	0.4339	0.4378	0.4405	1.2141
A	0.5	0.2118	0.2201	0.2140	0.2154	1.3134
	0.25	0.0855	0.0892	0.0917	0.0865	3.1675
1	0.125	0.0449	0.0425	0.0411	0.0430	3.6650
	0.0625	0.0238	0.0250	0.0231	0.0228	4.1295
	4.0	1.7893	1.7809	1.7488	1.7501	1.1811
D	2.0	0.8816	0.8865	0.8665	0.8742	0.9967
I	1.0	0.4363	0.4412	0.4471	0.4500	1.3788
A	0.5	0.2174	0.2194	0.2093	0.2222	2.5542
	0.25	0.0916	0.0890	0.0859	0.0938	3.7805
2	0.125	0.0428	0.0465	0.0441	0.0447	3.4521
	0.0625	0.0260	0.0249	0.0229	0.0231	6.1355

Resultados.

Cuadro No.15.Reproducibilidad del método analítico para cuantificar sulfóxido de albendazol en albúmina bovina.

	Conc. ($\mu\text{g} / \text{ml}$)	Relación de alturas Analista 1		Relación de alturas Analista 2		C.V. %
	4.0	4.1078	4.1201	4.1124	4.0851	0.3665
D	2.0	2.0712	2.0696	2.0583	2.0418	0.6581
I	1.0	1.0610	1.0532	1.0501	1.0433	0.6979
A	0.5	0.5125	0.5086	0.5042	0.5105	0.6964
	0.25	0.2599	0.2661	0.2546	0.2614	1.8187
1	0.125	0.1311	0.1295	0.1283	0.1289	0.8612
	0.0625	0.0713	0.0695	0.0724	0.0720	1.7998
	4.0	4.1121	4.1248	4.0964	4.1028	0.3002
D	2.0	2.0650	2.0830	2.0659	2.0481	0.6900
I	1.0	1.0505	1.0614	1.0465	1.0389	0.8937
A	0.5	0.5076	0.5140	0.5034	0.4978	1.3518
	0.25	0.2635	0.2568	0.2576	0.2603	1.1671
2	0.125	0.1278	0.1309	0.1285	0.1316	1.4147
	0.0625	0.0722	0.0710	0.0692	0.0725	2.1025

Cuadro No.16.Reproducibilidad del método analítico para cuantificar sulfóxido de albendazol en plasma.

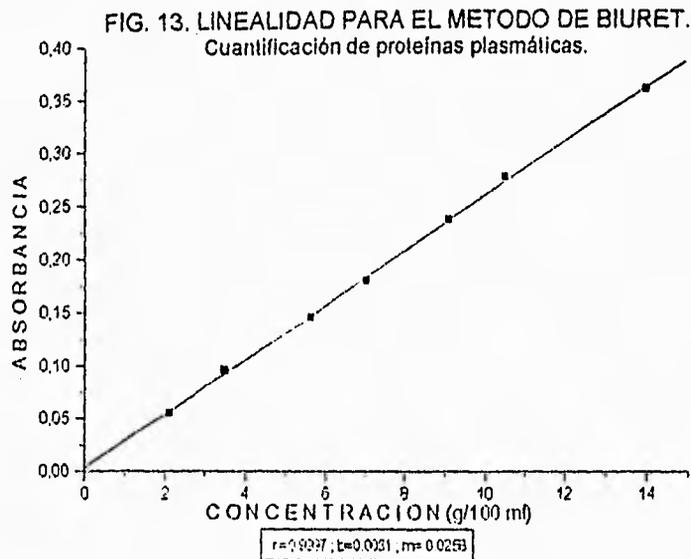
	Conc. ($\mu\text{g} / \text{ml}$)	Relación de alturas Analista 1		Relación de alturas Analista 2		C.V. %
	4.0	4.1106	4.0875	4.1312	4.0948	0.4714
D	2.0	2.0703	2.0675	2.0473	2.0590	0.5014
I	1.0	1.0610	1.0481	1.0334	1.0220	1.6348
A	0.5	0.5120	0.4861	0.4868	0.4972	2.4417
	0.25	0.2602	0.2615	0.2567	0.2490	2.1850
1	0.125	0.1249	0.1296	0.1264	0.1315	2.3393
	0.0625	0.0681	0.0712	0.0724	0.0628	6.2443
	4.0	4.0942	4.1131	4.0775	4.0906	0.3645
D	2.0	2.0548	2.0736	2.0612	2.0328	0.8312
I	1.0	1.0380	1.0529	1.0427	1.0367	0.7050
A	0.5	0.5034	0.4836	0.4785	0.5023	2.5948
	0.25	0.2572	0.2502	0.2470	0.2618	2.6357
2	0.125	0.1273	0.1234	0.1307	0.1259	2.4014
	0.0625	0.0709	0.0677	0.0724	0.0646	5.0403

4.2. Estudios de unión a proteínas plasmáticas.

4.2.1. Método analítico para cuantificar proteínas plasmáticas.

4.2.1.1. Linealidad.

Los valores promedio después de analizar las 3 curvas patrón fueron: $r=0.9997$, $b=0.0031$, $m=0.0258$ (figura 13).



4.2.1.2. Repetibilidad.

El coeficiente de variación promedio que se obtuvo al analizar 10 muestras de concentración 7 g/100 ml de proteína fue de: 0.49% y los resultados se resumen en el cuadro 17.

Cuadro No.17.Repetibilidad del método para cuantificar proteínas plasmáticas.

Muestra No.	Absorbancia
1	0.1820
2	0.1813
3	0.1799
4	0.1807
5	0.1822
6	0.1810
7	0.1809
8	0.1819
9	0.1805
10	0.1795

$X=0.1810$; $S=0.0009$; $C.V.\% = 0.4924$

4.2.2. Estudios de unión a proteínas "in vitro".

4.2.2.1.Tiempo de equilibrio.

El tiempo de equilibrio se obtuvo siguiendo los lineamientos descritos en la sección 3.3.5.1. Posteriormente se elaboraron gráficas de % de concentración con respecto al tiempo, las cuales se presenta en las figuras 14 y 15.

A partir de los resultados obtenidos y analizados en gráficas, se determinó que el tiempo de equilibrio óptimo tanto para el albendazol y el sulfóxido de albendazol es de 3.0 hrs.

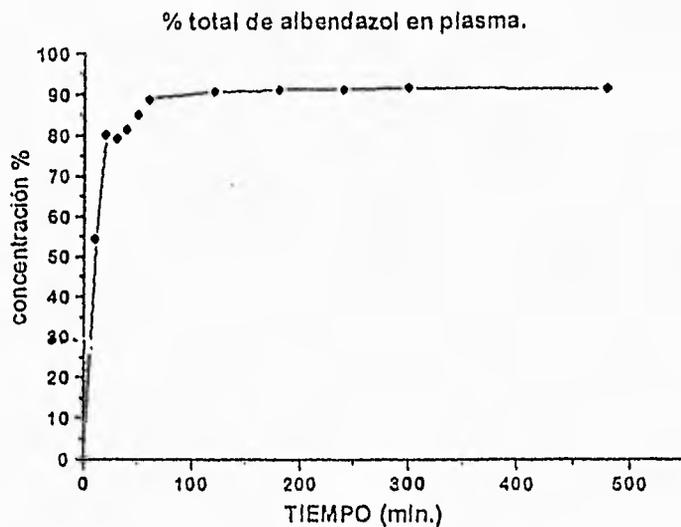


Fig. No. 14. Tiempo de equilibrio para albendazol utilizando el método de diálisis.

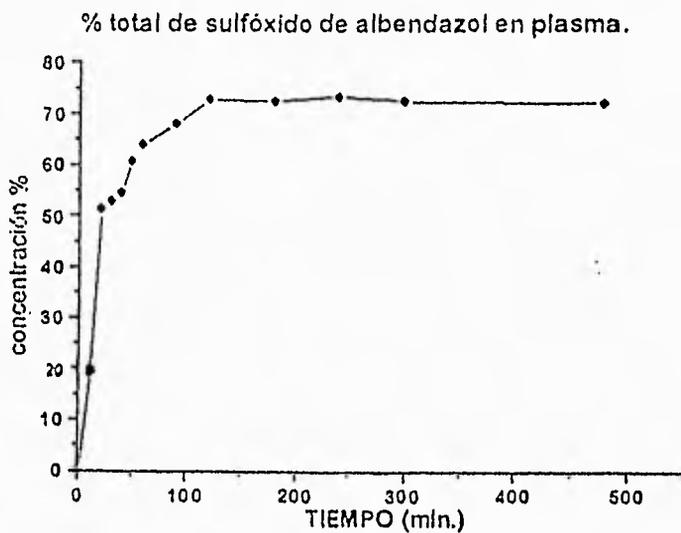


Fig. No.15. Tiempo de equilibrio para sulfóxido de albendazol utilizando el método de diálisis.

Resultados

4.2.2.2. Determinación de la unión del albendazol y sulfóxido de albendazol a la membrana de diálisis.

El grado de unión a membrana del albendazol y sulfóxido de albendazol se obtuvo siguiendo los lineamientos especificados en la sección 3.3.5.3. y los resultados se presentan en los cuadros 18 y 19.

Cuadro No.18. Determinación de la unión del albendazol a la membrana de diálisis a concentración de 2.0 $\mu\text{g/ml}$, 3.0 hrs., 37°C y 30 rpm.

Conc. inicial ($\mu\text{g/ml}$)	Conc. celda 1 buffer ($\mu\text{g/ml}$)	Conc. celda 2 buffer ($\mu\text{g/ml}$)	Conc. final celda 1 + celda 2 ($\mu\text{g/ml}$)	% de albendazol unido a la membrana
2.040	1.008	1.010	2.018	1.07
2.040	1.022	0.991	2.013	1.33
2.040	1.010	1.007	2.017	1.13
2.040	0.993	1.026	2.019	1.02
2.040	1.005	1.015	2.020	0.98

% de albendazol unido a membrana = 1.11%.

Cuadro No.19. Determinación de unión a la membrana del sulfóxido de albendazol a concentración de 2.0 $\mu\text{g/ml}$, 3.0 hrs., 37°C y 30 rpm.

Conc. inicial ($\mu\text{g/ml}$)	Conc. celda 1 buffer ($\mu\text{g/ml}$)	Conc. celda 2 buffer ($\mu\text{g/ml}$)	Conc. final celda 1 + celda 2 ($\mu\text{g/ml}$)	% de sulfóxido de albendazol unido a la membrana
2.010	1.014	0.990	2.004	0.299
2.010	1.006	0.998	2.003	0.348
2.010	1.001	1.002	2.003	0.333
2.010	0.995	1.012	2.006	0.183
2.010	0.993	1.011	2.005	0.269

% de sulfóxido de albendazol unido a la membrana = 0.29 %.

4.2.2.3. Integridad de la membrana.

Para ninguno de los casos se encontró proteína del lado del buffer hasta las tres horas de diálisis, al analizarlo por el método de Biuret como se describe en la sección 3.3.5.3.

4.2.2.4. Determinación del volumen de Shift.

Al comparar la concentración de albúmina bovina o plasma antes y después de la diálisis de 3.0 hrs., no se encontró diferencia entre las mismas al analizarlas como se describe en la sección 3.3.5.4.

4.2.2.5. Determinación del grado de unión del albendazol y sulfóxido de albendazol a proteínas plasmáticas.

El grado de unión a proteínas plasmáticas del albendazol y sulfóxido de albendazol se determinó siguiendo los lineamientos especificados en la sección 3.3.5.4. y los resultados se muestran en los cuadros 20 y 21.

4.2.2.6. Determinación del grado de unión a albúmina bovina del albendazol y sulfóxido de albendazol.

El grado de unión a albúmina del albendazol y sulfóxido de albendazol se obtuvo siguiendo los lineamientos especificados en la sección 3.3.5.5. y los resultados se muestran en los cuadros 22 y 23.

Resultados

Cuadro No.20. Determinación del grado de unión a proteínas plasmáticas del albendazol a concentraciones de 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 y 4.0 $\mu\text{g/ml}$, 3.0 hrs., 37°C y 30 rpm.

Celda no.	Conc. inicial ($\mu\text{g/ml}$)	Conc. de fármaco en buffer al equilibrio ($\mu\text{g/ml}$)	Conc. de fármaco en plasma al equilibrio ($\mu\text{g/ml}$)	Unión a proteínas %.
1	0.500	0.038	0.478	92.05
2	0.500	0.041	0.465	91.18
3	0.500	0.037	0.469	92.11
4	0.500	0.040	0.473	91.54
5	0.500	0.039	0.480	91.88
Promedio	0.500	0.039	0.473	91.75
D.S./C.V.%	-	0.0016 / 4.0542	0.0062 / 1.3118	0.3891 / 0.4240
1	1.000	0.086	0.969	91.12
2	1.000	0.090	0.961	90.63
3	1.000	0.0930	0.949	90.20
4	1.000	0.088	0.959	90.82
5	1.000	0.089	0.942	90.55
Promedio	1.000	0.089	0.956	90.66
D.S./C.V.%	-	0.0026 / 2.9018	0.0106 / 1.1070	0.3397 / 0.3747
1	2.000	0.172	1.784	90.36
2	2.000	0.176	1.818	90.32
3	2.000	0.167	1.842	90.93
4	2.000	0.178	1.793	90.07
5	2.000	0.169	1.830	90.77
Promedio	2.000	0.172	1.813	90.49
D.S./C.V.%	-	0.0046 / 2.6770	0.0245 / 1.3494	0.3515 / 0.3884
1	3.000	0.273	2.668	89.77
2	3.000	0.268	2.691	90.04
3	3.000	0.270	2.657	89.84
4	3.000	0.282	2.598	89.15
5	3.000	0.274	2.648	89.65
Promedio	3.000	0.273	2.652	89.69
D.S./C.V.%	-	0.0054 / 1.9629	0.0344 / 1.2969	0.3334 / 0.3717
1	4.000	0.369	3.573	89.67
2	4.000	0.367	3.550	89.66
3	4.000	0.353	3.622	90.25
4	4.000	0.351	3.614	90.29
5	4.000	0.361	3.599	89.97
Promedio	4.000	0.360	3.592	89.97
D.S./C.V.%	-	0.0081 / 2.2417	0.0298 / 0.8303	0.3029 / 0.3366

Resultados

Cuadro No.21. Determinación del grado de unión a proteínas plasmáticas del sulfóxido de albendazol a concentraciones de 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 y 4.0 µg/ml , 3.0 hrs. , 37°C y 30 rpm.

Celda no.	Conc. inicial (µg/ml)	Conc. de fármaco en buffer al equilibrio (µg/ml)	Conc. de fármaco en plasma al equilibrio (µg/ml)	Unión a proteínas %.
1	0.500	0.128	0.383	66.58
2	0.500	0.133	0.378	64.81
3	0.500	0.136	0.372	63.44
4	0.500	0.130	0.380	65.79
5	0.500	0.137	0.369	62.87
Promedio	0.500	0.133	0.376	64.70
D.S./C.V.%	-	0.0038 / 2.8871	0.0058 / 1.5331	1.5549 / 2.4033
1	1.000	0.262	0.755	65.30
2	1.000	0.272	0.746	63.54
3	1.000	0.259	0.757	65.79
4	1.000	0.270	0.739	63.46
5	1.000	0.279	0.730	61.78
Promedio	1.000	0.268	0.745	63.97
D.S./C.V.%	-	0.0080 / 2.9876	0.0112 / 1.5077	1.6064 / 2.5110
1	2.000	0.532	1.459	63.54
2	2.000	0.509	1.476	65.51
3	2.000	0.548	1.438	61.89
4	2.000	0.527	1.467	64.08
5	2.000	0.544	1.449	62.46
Promedio	2.000	0.532	1.458	63.50
D.S./C.V.%	-	0.0154 / 2.9029	0.0149 / 1.0214	1.4188 / 2.2344
1	3.000	0.777	2.214	64.91
2	3.000	0.794	2.192	63.78
3	3.000	0.785	2.188	64.12
4	3.000	0.837	2.156	61.18
5	3.000	0.809	2.176	62.82
Promedio	3.000	0.800	2.185	63.36
D.S./C.V.%	-	0.0237 / 2.9560	0.0213 / 0.9764	1.4318 / 2.2598
1	4.000	1.054	2.955	64.33
2	4.000	1.104	2.897	61.89
3	4.000	1.043	2.966	64.83
4	4.000	1.083	2.915	62.85
5	4.000	1.112	2.880	61.39
Promedio	4.000	1.079	2.923	63.06
D.S./C.V.%	-	0.0302 / 2.7994	0.0369 / 1.2643	1.4956 / 2.3718

Resultados

Cuadro No.22. Determinación del grado de unión a albúmina bovina del albendazol a concentraciones de 1.0 y 2.0 µg/ml, 3.0 hrs., 37°C y 30 rpm.

Celda no.	Cantidad inicial (µg/ml)	Conc. de fármaco en buffer al equilibrio (µg/ml)	Conc. de fármaco en plasma al equilibrio (µg/ml)	Unión a albúmina %.
1	1.000	0.144	0.840	82.86
2	1.000	0.156	0.809	80.72
3	1.000	0.153	0.821	81.36
4	1.000	0.151	0.828	81.76
5	1.000	0.149	0.831	82.07
Promedio	1.000	0.151	0.826	81.75
D.S./C.V %	-	0.0045 / 2.9917	0.0116 / 1.4054	0.7980 / 0.9762
1	2.000	0.303	1.665	81.80
2	2.000	0.310	1.647	81.18
3	2.000	0.315	1.659	81.01
4	2.000	0.298	1.674	82.20
5	2.000	0.318	1.648	80.70
Promedio	2.000	0.309	1.659	81.38
D.S./C.V%	-	0.0083 / 2.6841	0.0115 / 0.6909	0.6099 / 0.7495

Cuadro No.23. Determinación del grado de unión a albúmina bovina del sulfóxido de albendazol a concentraciones de 0.5 y 2.0 µg/ml, 3.0 hrs., 37°C y 30 rpm.

Celda no.	Cantidad inicial (µg/ml)	Conc. de fármaco en buffer al equilibrio (µg/ml)	Conc. de fármaco en plasma al equilibrio (µg/ml)	Unión a albúmina %
1	0.500	0.199	0.300	33.67
2	0.500	0.185	0.289	35.99
3	0.500	0.195	0.301	35.22
4	0.500	0.200	0.301	33.55
5	0.500	0.191	0.294	35.03
Promedio	0.500	0.194	0.297	34.69
D.S./C.V%	-	0.0062 / 3.1775	0.0053 / 1.7975	1.0520 / 3.0323
1	2.000	0.780	1.186	34.23
2	2.000	0.797	1.195	33.30
3	2.000	0.791	1.190	33.53
4	2.000	0.785	1.200	34.58
5	2.000	0.788	1.181	33.28
Promedio	2.000	0.788	1.190	33.78
D.S./C.V%	-	0.0064 / 0.8094	0.0074 / 0.6247	0.5885 / 1.7419

Y. Discusión de resultados.

5.1. Validación del método analítico para la cuantificación de albendazol y su principal metabolito, sulfóxido de albendazol en plasma y albúmina bovina.

5.1.1. Selectividad.

De acuerdo a los cromatogramas presentados en las figuras 7 y 8, se puede observar que la albúmina bovina comercial no presenta ninguna impureza, así como el plasma tampoco presenta componentes endógenos que puedan interferir en la determinación del albendazol, sulfóxido de albendazol o mebendazol. También se observa una buena resolución de los picos, por lo que el método se considera selectivo.

5.1.2. Linealidad.

Puesto que el coeficiente de correlación fue de 0.9999 en las tres curvas preparadas para cada uno de los casos (figuras 9 a 12), el método analítico se considera lineal en albúmina bovina y en plasma en el rango de concentraciones de 0.0625 a 4.0 $\mu\text{g} / \text{ml}$.

5.1.3. Exactitud.

Dado que el rendimiento promedio de extracción en albúmina bovina fué del 98.8 % para albendazol (cuadro 5) y del 99.1 % para sulfóxido de albendazol (cuadro 7), y en plasma del 96.7 % (cuadro 6) y 97.2 % (cuadro 8) respectivamente, el método se considera exacto.

5.1.4. Repetibilidad.

El método analítico se considera preciso, dado que ninguno de los coeficientes de variación fué mayor del 10% para ambos compuestos en albúmina bovina y plasma respectivamente, en el rango de concentraciones estudiado (cuadros 9 a 12).

5.1.5. Reproducibilidad.

El método analítico se considera reproducible, dado que ninguno de los coeficientes de variación fue mayor del 10% al comparar los resultados (relación de alturas) entre dos analistas en dos días diferentes en el rango de concentraciones estudiado, tanto para albendazol como para sulfóxido de albendazol en albúmina bovina y plasma respectivamente. De igual forma, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre analistas y entre días

5.1. Validación del método analítico para la cuantificación de albendazol y su principal metabolito, sulfóxido de albendazol en plasma y albúmina bovina.

5.1.1. Selectividad.

De acuerdo a los cromatogramas presentados en las figuras 7 y 8, se puede observar que la albúmina bovina comercial no presenta ninguna impureza, así como el plasma tampoco presenta componentes endógenos que puedan interferir en la determinación del albendazol, sulfóxido de albendazol o mebendazol. También se observa una buena resolución de los picos, por lo que el método se considera selectivo.

5.1.2. Linealidad.

Puesto que el coeficiente de correlación fue de 0.9999 en las tres curvas preparadas para cada uno de los casos (figuras 9 a 12), el método analítico se considera lineal en albúmina bovina y en plasma en el rango de concentraciones de 0.0625 a 4.0 $\mu\text{g} / \text{ml}$.

5.1.3. Exactitud.

Dado que el rendimiento promedio de extracción en albúmina bovina fué del 98.8 % para albendazol (cuadro 5) y del 99.1 % para sulfóxido de albendazol (cuadro 7), y en plasma del 96.7 % (cuadro 6) y 97.2 % (cuadro 8) respectivamente, el método se considera exacto.

5.1.4. Repetibilidad.

El método analítico se considera preciso, dado que ninguno de los coeficientes de variación fué mayor del 10% para ambos compuestos en albúmina bovina y plasma respectivamente, en el rango de concentraciones estudiado (cuadros 9 a 12).

5.1.5. Reproducibilidad.

El método analítico se considera reproducible, dado que ninguno de los coeficientes de variación fue mayor del 10% al comparar los resultados (relación de alturas) entre dos analistas en dos días diferentes en el rango de concentraciones estudiado, tanto para albendazol como para sulfóxido de albendazol en albúmina bovina y plasma respectivamente. De igual forma, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre analistas y entre días

al aplicar un ANADEVIA con una $p = 0.05$ (cuadros 13-16) (6, 41, 42, 43, 52, 53).

5.2. Estudios de unión a proteínas plasmáticas.

5.2.1. Método analítico para cuantificar proteínas plasmáticas.

Existen muchos métodos para la cuantificación de proteínas plasmáticas (inmunoquímicos, electroforéticos, refractométricos, etc.), de los cuales el que más se ajustó a nuestras necesidades fue el método de Biuret, el cual es un método espectrofotométrico, que tiene una variante para cuantificar solamente albúmina, es rápido, barato y ha sido validado en numerosas ocasiones por lo que se consideró que para nuestro caso solo se debía probar linealidad y repetibilidad.

5.2.1.1. Linearidad y repetibilidad.

Puesto que el valor promedio después de analizar 3 curvas patrón por el método de Biuret fué de 0.9997 (fig.13), el método analítico se considera lineal para el rango de concentraciones estudiado. Así mismo se demostró la precisión ya que el coeficiente de variación después de analizar 10 muestras de la misma concentración fue de 0.5% (cuadro 17) (17, 18, 19, 20).

5.2.2. Estudios de unión a proteínas "in vitro".

5.2.2.1. Tiempo de equilibrio.

El tiempo al cual se alcanzó el equilibrio fue de 1.30 hrs. para el albendazol y de 2.0 hrs. para el sulfóxido de albendazol. Se decidió prolongar el tiempo a 3.0 hrs para asegurar la máxima unión a proteínas para ambos (fig.14 y 15). En la técnica de diálisis, el fármaco libre atravieza la membrana desde el plasma hacia el buffer hasta alcanzar el equilibrio en donde la actividad del fármaco libre es la misma en ambos lados de la membrana (1-5).

Por otro lado, cabe señalar que se controlaron 2 factores importantes en la técnica de diálisis. Primero, el tiempo para alcanzar el equilibrio se acortó añadiendo el fármaco del lado del plasma logrando con ello que el fármaco entre en contacto con la proteína más rápidamente y como consecuencia la unión del fármaco a la proteína también sea más rápida ya que, generalmente, se añade del lado del buffer haciendose mas largo el tiempo de equilibrio. El

segundo factor, el llamado efecto de Donnan, que no es más que un desequilibrio iónico que provoca que la cantidad de fármaco libre no sea la misma en ambos lados de la membrana de diálisis, fue atenuado utilizando una concentración de solución amortiguadora lo suficientemente alta, (0.0625 M), para evitar éste desequilibrio (15, 16, 33, 34, 39).

5.2.2.2. Integridad de la membrana.

Al tiempo de equilibrio óptimo (3 hrs) no se cuantificó proteína alguna por el método de Biuret del lado de la solución amortiguadora, asumiéndose con ello que la membrana se mantuvo intacta a través de todo el estudio y para todos los casos y además que la albúmina comercial no se encontraba fraccionada (40, 45).

5.2.2.3. Determinación del volumen de Shift.

No se encontraron diferencias significativas entre la concentración tanto de proteínas plasmáticas totales como de albúmina bovina antes y después de la diálisis, lo cual quiere decir que no hubo un desplazamiento de volumen desde el buffer hacia la proteína, que resultaría en una dilución de la misma, que es lo que se conoce como volumen de Shift.

Una forma de atenuar el volumen de Shift es utilizando una membrana de bajo espesor con cutoff de bajo peso molecular y tiempos de equilibrio cortos (menor a 6 hrs) como sucedió en éste caso, por lo tanto, tomando en cuenta lo anterior así como los resultados obtenidos, no hubo necesidad de realizar corrección alguna al respecto (33, 35, 36).

5.2.2.4. Determinación de la unión del albendazol y sulfóxido de albendazol a la membrana de diálisis.

El porcentaje de unión a la membrana para albendazol y sulfóxido de albendazol fue de 1.11 y 0.29 % respectivamente a las 3.0 hrs. de diálisis. Esta unión, al ser tan baja, no influye en la estimación de la cantidad de fármaco unido y por lo tanto el error inherente es despreciable (12, 14, 15, 45).

5.2.2.5. Determinación del grado de unión del albendazol y sulfóxido de albendazol a proteínas plasmáticas.

En el cuadro 20 podemos observar un alto porcentaje de unión a proteínas totales para el albendazol (89 al 92%) en el rango de concentraciones estudiado.

En éste caso el problema de un alto grado de unión a proteínas por parte del albendazol no resulta tan grave debido a que el albendazol presenta un extenso efecto del primer paso, metabolizándose en su mayor parte a sulfóxido de albendazol que es el que presenta la actividad farmacológica. En el cuadro 21 se observa que dicho metabolito no presenta un alto grado de unión a proteínas (62-67%) y por consiguiente el efecto arriba mencionado no es tan marcado, ya que por ejemplo, un desplazamiento del 10% del fármaco unido a proteínas implicaría tan solo un aumento del 15% del fármaco libre (1, 2, 5, 8, 10, 12, 29, 31).

Los resultados de unión para cada concentración estudiada también presentaron un coeficiente de variación menor al 3.0% por lo que el método de diálisis al equilibrio en celdas de teflón utilizado es reproducible.

5.2.2.6. Determinación del grado de unión a albúmina bovina del albendazol y sulfóxido de albendazol.

Como se observa en los cuadros 22 y 23, los porcentajes de unión de albendazol y sulfóxido de albendazol a albúmina bovina (80-82% y 33-36%) fueron menores al mostrado con proteínas plasmáticas totales. Lo anterior quiere decir que ambos se unen en su mayor parte a albúmina bovina pero también presentan unión a otro tipo de proteína plasmáticas (12, 46, 47).

VI. Conclusiones.

Conclusiones.

-El método analítico utilizado para cuantificar el albendazol y el sulfóxido de albendazol fue selectivo, lineal, exacto, reproducible y repetible en el intervalo de 0.0625 a 4.0 µg/ml, tanto en albúmina bovina como en plasma.

-El método de Biuret para cuantificar proteínas plasmáticas fue lineal y reproducible en el intervalo de 2.1 a 14 g/dl.

-El método de diálisis al equilibrio en celdas de teflón fue reproducible en el intervalo de concentraciones estudiado.

-El tiempo de equilibrio óptimo para el albendazol y el sulfóxido de albendazol fué de 3.0 hrs. tomando en cuenta los factores antes mencionados.

-El tipo de membrana utilizada fue la óptima para éste estudio ya que, en ningún caso hubo paso de proteína hacia la solución amortiguadora ni se presentó unión significativa del albendazol y sulfóxido de albendazol a la membrana de diálisis.

-El albendazol presenta un alto grado de unión a proteínas totales (89-92%) y un 80-82% de unión a albúmina bovina a las concentraciones estudiadas.

-El sulfóxido de albendazol no presenta alto grado de unión a proteínas totales (62-67%) y mucho menos a albúmina bovina (33-36%).

-Tanto el albendazol como su metabolito, sulfóxido de albendazol además de unirse a albúmina también presentan unión a alguna otra proteína plasmática.

-Dado que el albendazol sufre un extenso efecto del primer paso, produciendo el metabolito sulfóxido de albendazol, responsable de la actividad farmacológica, el alto grado de unión a proteínas que presentó el primero no se considera de importancia farmacológica.

Sugerencia.

-Se sugiere continuar el estudio utilizando γ -globulina para ver si ésta es la otra proteína de unión , así como trabajar en un rango amplio de concentraciones más altas para poder obtener los posibles sitios de unión.

VII. Bibliografía.

Bibliografía.

- 1.-Wagner J.: Fundamentals of Clinical Pharmacokinetics. *Drug Intelligence Pub, Inc.* **1979**, pp.21-34.
- 2.-Shargel L, Yu A.: Applied Biopharmaceutics and Pharmacokinetics. *USA: Appleton-Century-Crafts.* **1980**, pp.128-37.
- 3.-Pacifci M, Viani A.: Methods of determining Plasma and Tissue Binding of Drugs. *Clin. Pharmacokinet.* **1992**, 23, 449-468.
- 4.-Buchanan N, Eyberg C.: Equilibrium Dialysis. *S.Afr.Med.J.* **1974**, 48, 1867-1869.
- 5.-Tillement j, Houin G, Zini R, Urien S, Albengres E.: The Binding of Drugs to Blood Plasma Macromolecules: Recent Advances and Therapeutic Significance. *Adv. Drug Res.* **1984**, 13, 60-93.
- 6.-Sánchez M.: Tesis de maestría: Evaluación de regímenes de dosificación para el albendazol. *UNAM.* **1993**.
- 7.-Tellarida R., Jacob L.: The Dose Response: Rel. Pharmacol. **1985**, 111-35.
- 8.-Sebille B, Thuaud N, Tillement JP.: Study of Binding of Low-Molecular-Weight Ligand to Biological Macromolecules by High-Performance Liquid Chromatography. Evaluation of Binding Parameters for Two Drugs Bound to Human Serum Albumin. *J.Chrom.* **1978**, 167, 159-170.
- 9.-Scheife R.: Protein Binding: What Does it Mean?. *DICP, Ann. Pharmacother.* **1989**, 23, S27-S31.
- 10.-Gibaldi M, Gerhard L, Pharm D, McNamara P.: Effect of Plasma Protein and Tissue Binding on the Biologic half-Life of Drugs. *Clin. Pharm. Ther.* **1978**, 24, 1-4.
- 11.-Goldstein A, Aronow L, Kalman S.: Farmacología. *Limusa.* **1978**, pp. 185-192.

- 12.-Koch-Weser J, Sellers E.: Drug Therapy: Binding of Drugs to Serum Albumin (First and second of parts). *New Eng. J. Med.* **1976**, 294, 311-316; 526-530.
- 13.-Grainger-Rousseau TJ, McElnay JC, Collier PS.: The influence of disease on plasma protein binding of drugs. *Int. J. Pharm.* **1989**, 54, 1-13.
- 14.-Chignell C.: Protein Binding. Capítulo 5. **1991**, pp. 187-225.
- 15.-Spectra/Por Equilibrium Dialyzer-20029. Manual de uso proporcionado directamente por el fabricante.
- 16.-Melten J, Witterood J, Willems H.: Comparison of Equilibrium Dialysis, Ultrafiltration, and Gel Permeation Chromatography for the determination of Free Fractions of Phentobarbital and Phenytoin. *J. Pharm. Sci.* **1985**, 74, 692-694.
- 17.-Sonnenwirth A, Jarett L.: Métodos y Diagnosticos del Laboratorio Clínico. *Médica Panamericana.* **1983**, 231-240.
- 18.-Guerci A.: Laboratorio. Métodos de Análisis Clínicos y su Interpretación. *El Ateneo.* **1988**, 222-225.
- 19.-Bauer J. : Análisis Clínicos. Métodos e Interpretación. *Reverté.* **1986**; pp.541-546.
- 20.-Manual del IMSS. **1988**, pp.678-83.
- 21.-Goodman L, Gilman A.: Las bases Farmacológicas de la Terapéutica. *Médica Panamericana.* **1991**, pp.939-40.
- 22.-Litter M. : Farmacología Experimental y Clínica. *El Ateneo.* **1988**, pp. 1719-24.
- 23.-Katzung B.: Farmacología. Básica y Clínica. *El Manual Moderno.* **1991**, pp.670-677.

Bibliografía.

- 24.-Smith C., Reynard A.:Textbook of Pharmacology. *Saunders Company*. **1992**, pp.916-919.
- 25.-Florey K.: Analytical Profiles of Drug Substances. *Academic Press Inc*. **1987**, pp.16, 307-326.
- 26.-La Du B, Mandel G.: Fundamentals of Drug Metabolism and Drug Disposition. *Williams and Wilkins Co*. **1972**, pp.63-75.
- 27.-Martindale. The Extra Pharmacopoeia 28th. ed. *The Pharmaceutical Press*. **1989**, pp.47-59.
- 28.-FEUM. 5a. ed., pp.116-120; 972-974; 1301-1304.
- 29.-Chang R. : Físicoquímica con Aplicaciones a Sistemas Biológicos. *Continental*. **1987** , pp.302-309.
- 30.-Merck Index. 11a. ed. , pp.4048 ; 5647.
- 31.-Shah V , Wallace S , Riegelman S.: Microultrafiltration Technique for Drug-Protein Binding Determination in Plasma. *J. Pharm. Sci.* **1985**, 74, 1364-1367.
- 32.-Tse F.: Effect of Changes in Plasma Protein Binding on Half-Life of Drugs. *J. Pharm. Sci.* **1980**, 69 , 751-752.
- 33.-Lockwood F , Wagner G. : Plasma Volume Changes as a Result of Equilibrium Dialysis. *J. Pharm. Pharmacol.* **1983**, 35, 387-388.
- 34.-Guenter T.: Comparison of Equilibrium Times in Dialysis Experiments Using Spiked Plasma or Spiked Buffer. *J.Pharm.Sci.* **1982**, 71 , 127-128.
- 35.-Huang J.: Errors in Estimating the Unbound Fraction of Drugs Due to the Volume Shift in Equilibrium Dialysis. *J.Pharm.Sci.* **1983**, 72, 1368-1369.

- 36.-Lima J, MacKichan J, Libertin N.: Influence of Volume Shifts on Drug Binding During Equilibrium Dialysis: Correction and Attenuation. *J.Pharmacokinet.Biopharm.* **1983**, 11 , 483-497.
- 37.-Hwang S, Bayne W.: Dynamic Method for Estimating the Extent of Plasma Protein Binding in a Dialysis Experiment. *J.Pharm.Sci.* **1984**, 73 , 708-10.
- 38.-Jacobsen S, Brors O.: pH lability in serum during equilibrium dialysis. *Br. J. Clin. Pharmac.* **1985**, 20, 85-88.
- 39.-Mapleson W. : Computation of Effect of Donnan Equilibrium on pH in Equilibrium Dialysis. *J.Pharm.Methods.* **1987**, 17, 231-242.
- 40.-Fois R , Ashley J.: Drug Binding to Apparatus: A Factor Controlling Time to Equilibrium in Equilibrium Dialysis Studies. *J.Pharm.Sci.* **1991**, 80, 300-2.
- 41.-Alton K, Patrick J, McGuire J.: High Performance Liquid Chromatographic Assay for the Antihelmintic Agent Mebendazole in Human Plasma. *J.Pharm.Sci.* **1979**, 68 , 880-882.
- 42.-Bogan J, Marriner S.: Analysis of Benzimidazoles in Body Fluids by High Performance Liquid Chromatography. *J.Pharm.Sci.* **1980**, 69, 422-423.
- 43.- Betto P, Gianbenedetti M, Ponti F.: Application of a high-performance liquid chromatography coulometric method for the estimation of mebendazole and its metabolites in human sera. *J.Chrom.* **1991**, 563, 115-123.
- 44.-Jung H, Juárez H. Unión de Imipramina a Proteínas Plasmáticas. Parte I : Estudios "in vitro". *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas.* **1986**, 17 , 13-16.

- 45.-Meyer M, Guttman D.: Dinamic Dialysis as a Method for Studying Protein Binding I.: Factors Affecting the Kinetics of Dialysis Through a Cellophane Membrane. *J.Pharm.Sci.* **1970**, 59, 33-38.
- 46.-Chignell C.: Physical Methods for Studying Drug-Protein Binding. Concepts in Biochemical Pharmacology Part I. *Ed.Brodie and Gillette.* **1971**, 187-212.
- 47.-Taburete A, Van Der Kleijn E.: Plasma Protein Binding of 2-n-propyl pentanoate. *J.Pharm.Sci.* **1970**, 59, 77-81.
- 48.-Borga O, Odar-Cederlöf I, Ringberger V.: Protein Binding of Salicylate in Uremic and Normal Plasma. *Clin.Pharm.Therap.* **1976**, 464-475.
- 49.- Pacifici G, Viani A.: Serum Protein Binding of Furosemide in Newborn Infants and Childrens. *Dev.Pharmacol.Ther.* **1987**, 10, 413-421.
- 50.-O'Byrne S, Barry M, Collins W.: Plasma Protein Binding of Lidocaine and Warfarin in Insulin-Dependent and Non-Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. *Clin. Pharmacokinet.* **1993**, 24, 183-186.
- 51.-Bowdle A, Indravadan B.: Valproic acid dosage and plasma protein binding and clearance. *Clin.Pharmacol.Ther.* **1980**, 28, 486-492.
- 52.-Hurtado M.: Farmacocinética clínica del albendazol. Tesis de maestría. *UNAM.* **1991**.
- 53.-Hurtado M, Medina M, Sotelo J, Jung H. Sensitive High Performance Liquid Chromatographic assay for albendazole and its main metabolite albendazole sulphoxide in plasma and cerebrospinal fluid. *J.Chrom.* **1989**; 494, 403-407.