

87
2eq.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**EVALUACIÓN DEL COEFICIENTE DE PARTICIÓN,
SOLUBILIDAD E HIDROLISIS ENZIMÁTICA DE
PROBENCIMIDAZOLES**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

INGRID LORENA NEYRA HERNÁNDEZ



México, D.F.

1998

258258

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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 está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

Jurado asignado:

Presidente Prof. Ofelia Espejo Gonzalez

Vocal Prof. Ines Fuentes Noriega

Secretario Prof. Francisco Hernández Luis

1er Suplente Prof. Helgi Helen Jung Cook

2do Suplente Prof. Lino Joel Reyes Trejo

Facultad de Química UNAM

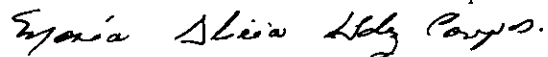
Asesor

M. en C. Francisco Hernández Luis



Supervisor técnico

M. en C. Maria Alicia Hernández Campos



Sustentante

Ingrid Lorena Neyra Hernández



Actualidades

Parece que la cantidad determina la cualidad. Esto es asombroso. Dicen los que saben, que el número de partículas (protones, electrones, etc.) en el núcleo de un átomo (¿Cúal núcleo?) define elementos distintos, con características propias e inconfundibles.

El agua, el agua oxigenada, el agua pesada, y las aguas que inventen, no son más que el agua golpeada, disminuida o aumentada al gusto. Las familias del yodo del mercurio, del bario o del estroncio, serán infinitas. Lo empezamos a ver con el uranio, lo seguiremos viendo con el elemento dos mil. Todo es cuestión de número, de más o menos equis, de más o menos.

El ajedrez es infinito. La ética se ha de resolver por las matemáticas. Hombre bueno es aquel que tiene más elemetos yod que set. Dios es equilibrio, neutro. Cero igual a cero: Dios.

Hay que aprender a sumar las grandes cantidades de materia y de antimateria, de cuerpos y anticuerpos, para entender. O para vacunarnos.

Jaime Sabines.

A mis padres

Por concebirme, no solamente como parte de ellos, sino como ser humano independiente y por todos los privilegios que con ello me conseden. Por su confianza y su entrega.

Melba Rosa Hernández de Neyra.

Por escucharme, por apoyarme, por corregirme y por cultivarme con amor.

Federico Neyra Monroy.

Porque estas siempre a mi lado, impulsandome con energia y motivandome con amor.

Gracias

Brenda Neyra Hernández.

Chiquita, aunque físicamente estas lejos, siempre estas aquí, junto a mí en cada logro.

Por tantas risas compartidas, por todos los retos superados.

Gracias

Carlos Mondragón Camarillo.

Porque eres mi complemento, por integrar nuestras vidas con ternura, por tu amor incondicional que me inspira y me alienta a cumplir los objetivos.

Gracias

Francisco Hernández Luis.

Por su dedicación, sus conocimientos y su experiencia, que en conjunto permitieron la realización de la presente tesis, y con ello mi desarrollo.

Gracias

CONTENIDO	
	paginas
1. INTRODUCCIÓN	1 - 3
2. ANTECEDENTES	
2.1 Antihelmínticos	4
2.1.1 Nematodos	4-5
2.1.2 Platelminfos	5
2.1.3 Quimioterapia de las helmintiasis	5 - 6
2.1.3.1 Albendazol	6
2.1.3.2 Mebendazol	6 - 7
2.2 Diseño de profármacos	7 - 8
2.3 Preformulación	8
2.3.1 Efectos de las propiedades fisicoquímicas en la disolución del fármaco	9
2.3.2 Análisis de la solubilidad	9 - 10
2.3.3 Coeficiente de partición	10 - 11
2.4 Aparato digestivo	11
2.4.1 Organización	11
2.4.2 Absorción	11 - 12
2.4.3 Jugo pancreático	13
2.5 Enzimas	14
2.5.1 Serinproteasas	14 - 18
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	19
4. HIPOTESIS DE TRABAJO	20
5. OBJETIVOS	20
6. MÉTODOS	
6.1 Prueba de solubilidad	21
6.2 Influencia de la fuerza iónica en la solubilidad	22
6.3 Coeficiente de partición	23

Continua en la siguiente página...

CONTENIDO (continuación)	
	paginas
6.4 Influencia del desoxicolato de sodio en la solubilidad	24
6.5 Sensibilidad de los profármacos frente a las hidrolasas digestivas de 0 a 30 min.	25
6.6 Sensibilidad de los profármacos frente a las hidrolasas digestivas a los 15, 30, 60 y 120 min	26 - 27
7. PARTE EXPERIMENTAL	28
7.1 Pruebas de solubilidad	28-31
7.2 Influencia de la fuerza iónica en la solubilidad	31-32
7.3 Coeficiente de partición	32-33
7.4 Influencia del desoxicolato de sodio en la solubilidad	33-34
7.5 Determinación de proteínas en las enzimas comerciales	34-39
7.6 Hidrólisis con N-benzoil-L-tirosina-etil ester (BTEE)	39-41
7.7 Sensibilidad de los profármacos frente a las hidrolasas digestivas	42-43
8. RESULTADOS	44
8.1 Pruebas de solubilidad	44-47
8.2 Influencia de la fuerza iónica en la solubilidad	48-49
8.3 Coeficiente de partición	50
8.4 Influencia del desoxicolato de sodio en la solubilidad	50-52
8.5 Sensibilidad frente a las hidrolasas digestivas de los profármacos	52-61
9. DISCUSION DE RESULTADOS	62-65
10. CONCLUSIONES	66
11. REFERENCIAS	67 - 69
12. APENDICE	70-71

1. INTRODUCCIÓN

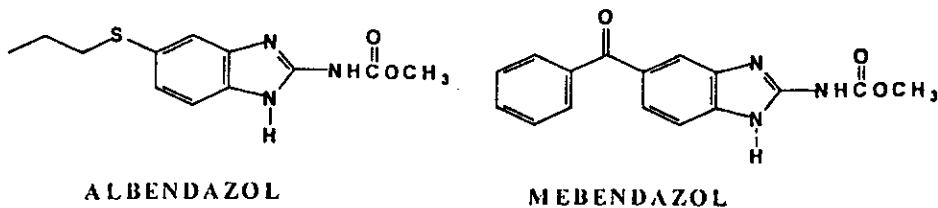
Las enfermedades parasitarias constituyen uno de los problemas de salud pública de mayor atención en nuestro país. Son padecimientos que presentan alta incidencia en poblaciones con escasos recursos económicos y deficiente educación sanitaria. Estas enfermedades pueden provocar infecciones asintomáticas o trastornos tan graves que lleguen a poner en peligro la vida del individuo. Tradicionalmente, las enfermedades parasitarias han sido ubicadas como padecimientos del tracto gastrointestinal, sin embargo, existen parasitosis que afectan otros órganos y tejidos de nuestro cuerpo. Estas últimas son consideradas como las de mayor índice de mortalidad y morbilidad por la Organización Mundial de la Salud^{1,2}. Un elemento adicional a mencionar, es la pérdida o trastornos que este tipo de afecciones provoca en la economía y productividad en las comunidades que las padecen endémicamente¹.

Dependiendo del agente causal, las parasitosis se clasifican en protozoosis y helmintosis³. El mecanismo de transmisión se da, por fecalismo, por artrópodos, por vía transplacentaria, por vía transfusional, por vía respiratoria, por el suelo, por ingestión de alimentos y por contacto directo¹.

Los helmintos son organismos pluricelulares conocidos popularmente como lombrices, se clasifican según su anatomía en gusanos planos (Platelmintos) y cilíndricos (Nematelmintos). Como parásitos del hombre hay representantes, tanto de gusanos planos, como cilíndricos.

En la actualidad la quimioterapia para combatir estas afecciones permanece como la alternativa de elección en el campo clínico ya que aún no se cuenta con vacunas eficaces para prevenir las infecciones por estos parásitos².

Uno de los grupos de compuestos utilizados para combatir a las enfermedades parasitarias en seres humanos y en animales domésticos, son los bencimidazol-2-carbamatos de metilo, los cuales se clasifican como antihelminintos de amplio espectro⁴. Como ejemplo de estos compuestos utilizados clínicamente, tenemos³:



Debido a su escasa solubilidad en agua, el uso clínico de estos compuestos se restringe al tracto gastrointestinal⁶. Sin embargo, recientemente se ha reportado que presentan actividad contra helmintos que infectan otros órganos y tejidos, tales como la taenia solium (neurocisticercosis)⁸ y triquinella spiralis (fase muscular)¹⁰, aunque su eficacia terapéutica no es del todo satisfactoria probablemente a su poca absorción y transporte a través de los tejidos⁸.

Dentro del contexto de las enfermedades parasitarias sistémicas o extraintestinales, es muy importante contar con fármacos que puedan atravesar las membranas del individuo infectado para alcanzar al parásito que lo afecta.

Ante tal situación se inició un proyecto de investigación en el cual mediante la aplicación del diseño de profármacos se logrará rebasar el problema de la insolubilidad. Producto de este esfuerzo ha sido la síntesis de un profármaco potencial del albendazol y un profármaco potencial del mebendazol, a los cuales será necesario dar la continuidad en sus evaluaciones de solubilidad y sensibilidad frente a enzimas hidrolíticas, motivos primordiales que conforman el presente trabajo de tesis.

2. ANTECEDENTES

2.1 Antihelmínticos.

Los principales parásitos del hombre son gusanos (helminths). Los gusanos parásitos pertenecen a dos filos: Nematelminthes (nematodos o gusanos redondos) y Platyhelminthes (platelmintos o gusanos planos)^{2,5}.

La boca es la principal vía de entrada para muchos helmintos parásitos del hombre, y para todos los que existen en climas templados. La diseminación de los parásitos suele favorecerse por una higiene inadecuada y algunas prácticas de agricultura; en algunos casos, se atribuye al consumo de un artículo alimenticio en particular, sobre todo si se come crudo o mal cocido⁵.

En gusanos parásitos que necesitan más de un huésped para completar su ciclo vital; el huésped en que se aloja el gusano sexualmente maduro se llama huésped primario o definitivo. Los huéspedes que alojan las etapas de larva se denominan huéspedes intermediarios primero, segundo, etc. En la mayor parte de casos el hombre es el huésped primario de los gusanos que le producen enfermedades. Suele utilizarse el término infestación para indicar las infecciones en que los parásitos no se multiplican en el organismo del huésped sino que penetran en gran número, crecen y maduran en él⁵.

2.1.1 Nematodos.

El cuerpo es alargado y cilíndrico o fusiforme; según la especie, su longitud varía de 1 mm a 50 cm aproximadamente y el diámetro de una fracción de milímetro a varios milímetros. La pared de su cuerpo está

rodeada por una cutícula externa que contiene una capa de lípidos y fibras de proteína no elástica en forma cruzada a modo de red ⁵.

En la mayor parte de especies de nematodos, el ciclo vital consta de huevo y cinco etapas de madurez sexual creciente, cada una marcada por la eliminación y nueva formación de la cutícula^{5,12}.

2.1.2 Platelminotos

Los platelmintos o gusanos planos se subdividen en trematodos y cestodos o gusanos planos. A diferencia de los redondos, los gusanos planos no poseen una cavidad corporal, sus órganos internos están rodeados por un parénquima celular⁵.

Todos los trematodos parasitarios que infectan al hombre tienen cuando menos un huésped intermedio en el que pasan parte de su ciclo vital. En la mayor parte de casos este primer huésped intermedio es un caracol acuático o anfibio. Muchas especies de trematodos necesitan un segundo huésped intermedio, como una familia particular de peces o cangrejos o, en ocasiones, plantas, los huéspedes intermedios de los gusanos planos suelen ser animales de sangre caliente como cerdos, ganado, carneros, perro o roedores. En algunos casos pueden ser las pulgas que infestan a estos animales y en ocasiones es un invertebrado de vida libre⁵.

2.1.3 Quimioterapia de las helmintiasis.

Los fármacos antihelmínticos son aquellos capaces de exterminar o eliminar los nematodos, cestodos o trematodos parásitos, ya sea intestinal o de los tejidos⁴.

Los principales fármacos con acción preponderante sobre los nematodos son:¹²

- ◆ bencimidazoles
- ◆ tetrahidropirimidinas
- ◆ piperazina y derivados
- ◆ colorantes antihelmínticos
- ◆ hidrocarburos halogenados.

Del grupo químico de los derivados de los bencimidazoles existen el albendazol y el mebendazol⁷.

2.1.3.1 Albendazol

El albendazol es considerado como un antihelmíntico de amplio espectro¹⁴ se absorbe pobremente en el tracto gastrointestinal, pero se metaboliza rápidamente por el efecto del primer paso. El principal metabolito es el sulfoxido de albendazol, tiene actividad antihelmíntica y una vida media en el plasma de 8.5 h; se excreta en la orina junto con los demás metabolitos del albendazol, incluyendo la sulfona del albendazol y el 2 aminosulfoxido y 2 aminosulfona¹⁶.

Se administra por vía oral, usualmente en dosis únicas de 400 mg al día en el tratamiento para infección por un solo nematodo o varios nematodos⁹.

2.1.3.2 Mebendazol.

El mebendazol es un antihelmíntico de amplio espectro que asegura un porcentaje elevado de curaciones en infestaciones por ascaris, enterobius, uncinarias y tricocéfalos⁶. También es activo un 40% en algunas infestaciones por gusanos planos. Se administra por vía oral, 100 mg en

adultos, 75 mg en niños, una vez a la semana durante dos semanas para erradicar enterobios, y 2 veces al día por tres días para eliminar ascaris, uncinarias y tricocéfalos. Al parecer, actúa bloqueando la captación o utilización de la glucosa por los gusanos y evitando la polimerización de la tubulina¹⁸. Los efectos secundarios son escasos pero pueden incluir dolor abdominal y diarrea leve. Se han observado efectos teratógenos en animales; por lo tanto, está contraindicado durante el embarazo⁷.

2.2 Diseño de profármacos

El objetivo fundamental del diseño de profármacos ha sido en muchos casos la optimización del comportamiento biológico de fármacos²⁰. Es importante tomar en cuenta, que dentro de una serie de compuestos, el óptimo no es necesariamente el de mayor actividad, sino el que presenta un mayor índice terapéutico¹¹.

Por ello, la optimización de una estructura prototipo se puede lograr disminuyendo la toxicidad o aumentando la eficiencia del principio activo.

En este segundo aspecto, el diseño se enfoca a tratar de incrementar el paso a través de las membranas de los principios activos así como disminuir su transformación en metabolitos tóxicos.

La estructura de un fármaco (F) puede manipularse sintetizando una nueva estructura F-G. Si esta nueva estructura es estable y tiene la misma acción biológica que la estructura del fármaco (F) es, en realidad, un análogo del fármaco F; si por el contrario, la estructura F-G carece de actividad y se transforma en el organismo originando de nuevo a (F), se

denomina profármaco. Por tanto, se puede definir un profármaco como un fármaco unido a un grupo modificador lábil, que requiere ser transformado dentro del organismo por un proceso químico o enzimático para que manifieste su efecto¹¹.

Desde el punto de vista práctico, se prefiere diseñar profármacos mediante la adición covalente de grupos modificadores fijos, que con frecuencia alteran temporalmente las propiedades fisicoquímicas del fármaco^{11,22}.

Un profármaco ideal debe presentar las siguientes características:

1. Ser totalmente inactivo
2. La unión del fármaco con el grupo modulador debe ser covalente.
3. Su bioactivación debe ser más rápida que otras posibles reacciones metabólicas, y que su eliminación.
4. Ni el profármaco ni el grupo modificador, una vez liberados, deben ser tóxicos ni conducir a metabolitos tóxicos. Por ello, es preferible que su bioactivación sea hidrolítica y no oxidativa.

2.3 Preformulación

Preformulación se describe como el proceso de optimización del fármaco, determinando sus propiedades físicas y químicas importantes que influyen en su estabilidad, efectividad y seguridad con el propósito de realizar su formulación en forma farmacéutica.

2.3.1 Efectos de las propiedades fisicoquímicas en la disolución del fármaco.

Los factores que afectan el grado de disolución de la forma farmacéutica¹⁵ pueden clasificarse en tres categorías principales:

- ◆ Factores relacionados con las propiedades fisicoquímicas del fármaco.
- ◆ Factores relacionados con la forma farmacéutica.
- ◆ Factores relacionados con los aparatos de disolución y los parámetros de la prueba.

Dentro de las propiedades fisicoquímicas del fármaco que afectan el grado de disolución se encuentra la solubilidad acuosa^{15,24}.

La solubilidad del fármaco es importante en el control de la disolución de la forma farmacéutica, en tanto que es el factor que determina el grado de disolución^{8,15}.

2.3.2 Análisis de solubilidad

Los estudios de solubilidad en la preformulación se enfocan en el sistema fármaco disolvente, que puede ocurrir durante la liberación del fármaco²⁷.

Los fármacos de administración oral pueden ser examinados por su solubilidad en soluciones con concentración isotónica de iones cloruro y valores de pH ácido¹³.

Los estudios de solubilidad, en la preformulación, incluyen la determinación del perfil de solubilidad a diferentes valores de pH.

Los métodos analíticos que son particularmente usados en la medición de la solubilidad son^{13,15}:

- ◆ Espectroscopia U.V.
- ◆ Espectroscopia fluorescente.
- ◆ Cromatografía de gases.
- ◆ HPLC

Los experimentos de solubilidad deben tener todos los factores definidos, tales como el pH, temperatura, fuerza iónica y concentración del buffer¹³.

Los fármacos que tienen una solubilidad limitada (< 1% m/v) en los fluidos del tracto gastrointestinal²⁴, frecuentemente exhiben pobre o escasa absorción, al menos que la forma farmacéutica este diseñada para favorecer la solubilidad del fármaco⁹; ejemplo, complejos de inclusión con β ciclodextrinas²⁷. El perfil de solubilidad no es una predicción del comportamiento en el medio biológico, pero sirve para probar con estudios in vitro el comportamiento del compuesto antes de la evaluación en seres humanos, a manera de predecir a grosso modo la ocurrencia de futuros problemas con la biodisponibilidad¹³.

2.3.3 Coeficiente de partición

Es la medida de la liposolubilidad del fármaco y un indicador de su habilidad para atravesar membranas celulares²⁸. Experimentalmente se

determina por la partición en el sistema aceite/agua, octanol/agua y cloroformo/agua. El coeficiente de partición se define como la relación de la distribución del fármaco no ionizado entre el equilibrio de la fase orgánica y la fase acuosa¹³. El balance de liposolubilidad/hidrosolubilidad es un factor a considerar como un modelo para entender en parte la absorción del fármaco¹³.

2.4 Aparato Digestivo

2.4.1 Organización

Los órganos de la digestión se dividen tradicionalmente en dos grupos principales. En el primer grupo, se encuentran los órganos que comprenden el tubo digestivo incluyen boca, faringe, esófago, estómago, intestino delgado y grueso. El segundo grupo de órganos del aparato digestivo son los órganos accesorios o auxiliares, a saber, dientes, lengua, glándulas salivales, hígado, vesícula biliar y páncreas. Los órganos accesorios, excepto la lengua, se sitúan por fuera del tubo digestivo y producen o almacenan secreciones que facilitan la degradación química de los alimentos. Tales secreciones llegan al tubo digestivo por medio de conductos¹⁷.

2.4.2 Absorción.

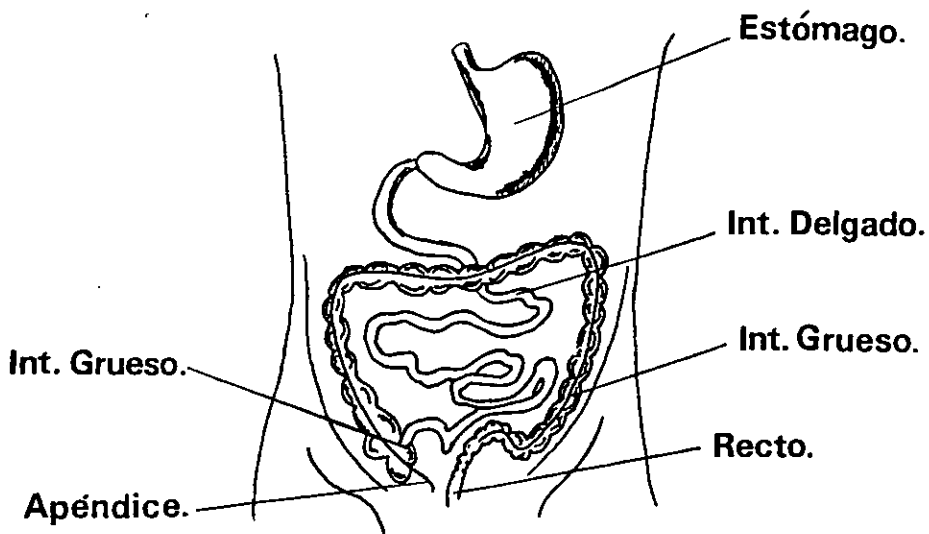
La pared estomacal es permeable al paso de muy pocas sustancias en dirección a la sangre, de modo que gran parte de la absorción ocurre sólo en

el intestino delgado. Sin embargo, el estómago participa en la absorción de agua, electrolitos, ciertos fármacos y bebidas alcohólicas¹⁷.

Todas las fases químicas y mecánicas de la digestión, desde la boca hasta el intestino delgado, tienen como finalidad transformar los alimentos en sustancias que puedan atravesar las células epiteliales que revisten a la mucosa en dirección a los vasos sanguíneos y linfáticos subyacentes a ésta¹⁷.

El paso de estos nutrimentos digeridos del tubo digestivo a la sangre o linfa recibe el nombre de absorción¹⁷.

Un 90% de la absorción de nutrimentos tiene lugar a lo largo del intestino delgado, y el 10% restante en el estomago e intestino grueso¹⁷.



2.4.3 Jugo pancreático

El páncreas produce diariamente 1200 a 1500 mL de jugo pancreático, líquido transparente e incoloro que consiste principalmente en agua, algunas sales, bicarbonato de sodio y enzimas. El bicarbonato hace que este jugo sea levemente alcalino (pH 7.1 a 8.2), con lo que inactiva a la pepsina estomacal y crea las condiciones necesarias para la acción de las enzimas del intestino delgado. Entre las enzimas del jugo pancreático, se incluyen una que digiere carbohidratos, la amilasa pancreática; varias enzimas proteolíticas, a saber, la tripsina, quimotripsina y carboxipolipeptidasa; la principal enzima lipolítica en el humano adulto, es la lipasa pancreática; y enzimas que digieren ácidos nucleicos, a saber, ribonucleasa y desoxirribonucleasa¹⁷.

Las enzimas proteolíticas del páncreas se producen en una forma inactiva, al igual que la pepsina estomacal (pepsinógeno), con lo que se evita que digieran a las células pancreáticas. La tripsina se secreta en la forma inactiva de tripsinógeno. Su activación a tripsina tiene lugar en el intestino delgado por acción de una enzima que secreta la mucosa intestinal cuando entra en contacto con el quimo, la enterocinasa. También se activa la quimotripsina en el intestino delgado a partir de su forma inactiva, el quimotripsinógeno, acción que corresponde a la tripsina¹⁷.

2.5 Enzimas

Enzimas monoméricas son aquellas constituidas por una sola cadena polipeptídica, por lo que no pueden disociarse en pequeñas unidades. Muy pocas enzimas monoméricas son conocidas y todas estas catalizan reacciones hidrolíticas. En general estas contienen entre 100 y 300 residuos de aminoácidos y tienen un peso molecular en el rango de 13000- 35000¹⁹.

Un número de enzimas monoméricas son las proteasas o enzimas proteolíticas, ellas catalizan la hidrólisis de los enlaces peptídicos en otras proteínas. Para prevenir que dañen todas las proteínas celulares, estas son sintetizadas en una forma inactiva conocida como proenzima y son activadas cuando se requiere. Dichas enzimas incluyen a las serinproteasas, llamadas así por la presencia en el sitio activo de un residuo esencial de serina¹⁹.

2.5.1 Serinproteasas.

Estas enzimas se denominan de esta manera porque tienen un mecanismo catalítico común caracterizado por la posesión de un resto de serina en su sitio reactivo y que es esencial para su actividad enzimática. Las serinproteasas son, la quimiotripsina, la tripsina y la elastasa²¹.

La quimiotripsina, tripsina y elastasa son enzimas digestivas sintetizadas por las células acinares del páncreas y secretados a través del conducto pancreático al duodeno. Todas estas enzimas catalizan la hidrólisis de

enlaces peptídicos, pero con diferentes especificidades respecto a las cadenas laterales adyacentes al enlace peptídico a romper²¹.

La quimotripsina y tripsina bovinas, y la elastasa porcina son homólogas: las estructuras primarias de estas enzimas monoméricas son semejantes en aproximadamente 40% y sus secuencias internas son parecidas, estas enzimas tienen una serina activa y una histidina esencial para la catálisis, así como mecanismos cinéticos similares²¹.

La quimiotripsina bovina se sintetiza en forma de un precursor inactivo de 245 restos llamado quimiotripsinógeno, que es convertido proteolíticamente en quimotripsina²¹.

Cada una de estas proteínas está plegada en dos dominios, ambos con extensas regiones de hojas β antiparalelas y un ordenamiento tipo barril, pero con poca hélice. Las histidina 57 y serina 195 esenciales para la catálisis están localizadas en el sitio de fijación del sustrato, junto con el ácido aspártico 102 invariable (en todas las serinoproteasas), que está enterrado en una cavidad inaccesible al disolvente. Estos tres restos forman una constelación unida por enlaces de hidrógeno, conocida como triada catalítica²¹.

En la quimotripsina, la cadena lateral aromática voluminosa de los restos preferidos de fenilalanina, triptófano, o tirosina, que aportan el grupo carbonilo del péptido a cortar, encaja cómodamente en una cavidad hidrofóbica en forma de rendija localizada cerca de los grupos catalíticos²¹.

En la tripsina, el resto correspondiente a la serina 189 de la quimotripsina, que se encuentra en la parte posterior de la cavidad de

fijación, es el resto aniónico de ácido aspártico. Las cadenas laterales catiónicas de los restos preferidos por la tripsina, arginina o lisina, pueden formar, por tanto, pares iónicos con el resto de ácido aspártico. El resto de la cavidad específica de la quimotripsina se mantiene en la tripsina, de modo que puede acomodar las cadenas laterales voluminosas de arginina y lisina²¹.

La elastasa se denomina así porque hidroliza rápidamente la proteína elastina, rica en restos de alanina, glicina y valina y que, de otro modo, es prácticamente indigerible. La cavidad de fijación de la elastasa está, en parte, ocluida por las cadenas laterales de un resto de valina y otro de treonina que reemplazan las dos glicinas que cubren la cavidad específica tanto en la quimotripsina como en la tripsina. A consecuencia de ello, la elastasa, cuya cavidad de fijación de sustrato es en realidad una depresión, corta específicamente enlaces después de restos apolares pequeños, especialmente alanina²¹.

Normalmente, las enzimas proteolíticas se biosintetizan en forma de precursores inactivos, conocidos como zimógenos, si estas enzimas se sintetizaran en su forma activa, digerirían los propios tejidos que los sintetizan²¹.

Las serinproteasas se activan autocatalíticamente.

Tripsina. La activación del tripsinógeno, el zimógeno de la tripsina, tiene lugar en un proceso de dos etapas, cuando el tripsinógeno entra en el duodeno proveniente del páncreas. La enteropeptidasa, que es una serinproteasa secretada bajo control hormonal por la mucosa duodenal,

separa específicamente el hexapéptido N-terminal del tripsinógeno, produciendo el enzima activo. La ruptura proteolítica que activa el tripsinógeno tiene lugar entre sus restos de lisina 15 e isoleucina 16, dando una enzima activa que tiene la isoleucina 16 como extremo N-terminal. Dado que el sitio de activación es sensible a la tripsina, la pequeña cantidad de tripsina producida por la enteropeptidas genera más tripsina, la activación del tripsinógeno es autocatalítica²¹.

Quimotripsina. El quimotripsinógeno es activado por la ruptura triptica específica de su enlace peptídico arginina 15 - isoleucina 16, que forma la π -quimotripsina. Ésta experimenta a continuación autólisis para eliminar específicamente dos dipéptidos, serina 14 - arginina 15 y treonina 147 - asparragina 148, produciendo de este modo el enzima igualmente activo α -quimotripsina, de aquí en adelante, denominado quimotripsina.

Elastasa. La proelastasa, zimógeno de la elastasa, se activa de forma parecida al tripsinógeno, mediante una única ruptura peptídica que elimina un polipeptido N-terminal corto.

La tripsina activa las procarboxipeptidasas A y B y la profosfolipasa A, así como las serinproteasas pancreáticas. Por consiguiente, la activación prematura de la tripsina puede disparar una serie de acontecimientos que llevan a la autodigestión del páncreas. Por este motivo la naturaleza ha desarrollado una defensa elaborada contra una posible activación inadecuada de la tripsina, la activación del tripsinógeno catalizada por la tripsina tiene lugar lentamente, probablemente debido a la carga negativa de su

hexapéptido N-terminal, conservado a lo largo de la evolución y que repele el ácido aspártico en el fondo de la cavidad específica de la tripsina²¹.

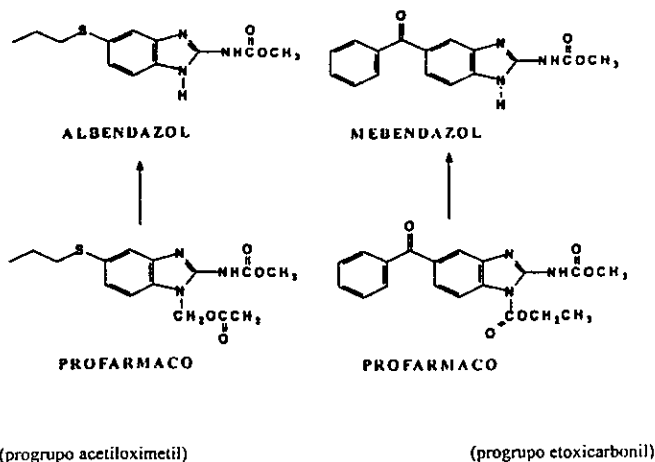
Los zimógenos se almacenan en vesículas intracelulares denominadas gránulos de zimógeno, cuyas paredes membranosas se cree que son resistentes a la degradación enzimática²¹.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Debido a su naturaleza estructural, el albendazol y el mebendazol presentan el inconveniente de ser insolubles en agua, por lo que su actividad terapéutica está restringida únicamente al tracto gastrointestinal ya que cuando se pretende utilizarlos para infecciones extraintestinales presentan severas deficiencias en su comportamiento biológico.

En la química farmacéutica una de las estrategias para incrementar la solubilidad de un principio activo es mediante el uso de los profármacos, los cuales le confieren propiedades diferentes al fármaco en cuestión.

Después de sintetizar un profármaco de albendazol y uno de mebendazol se plantea la necesidad de conocer si la solubilidad y el coeficiente de partición de estos nuevos compuestos son diferentes a los de los principios activos que les dieron origen así como si existe la posibilidad de biorreversibilidad en el tracto gastrointestinal o en tejido extraintestinal, de dichos profármacos.



4. HIPOTESIS DE TRABAJO

Al modificar la estructura del albendazol y el mebendazol mediante la preparación de profármacos, la solubilidad acuosa y la liposolubilidad de estos principios activos se incrementará y la biorreversibilidad se hará manifiesta en presencia de enzimas hidrolasas.

5. OBJETIVOS

Objetivo general.

Evaluar la solubilidad acuosa y la liposolubilidad de un profármaco del albendazol y un profármaco del mebendazol así como su sensibilidad frente a enzimas hidrolasas del tracto gastrointestinal.

Objetivos específicos:

1. Evaluar la solubilidad a diferentes pH.
2. Evaluar la influencia de la fuerza iónica en la solubilidad.
3. Evaluar la influencia del desoxicolato de sodio en la solubilidad.
4. Evaluar el coeficiente de partición octanol/agua.
5. Evaluar la sensibilidad frente a hidrolasas digestivas.

4. HIPOTESIS DE TRABAJO

Al modificar la estructura del albendazol y el mebendazol mediante la preparación de profármacos, la solubilidad acuosa y la liposolubilidad de estos principios activos se incrementará y la biorreversibilidad se hará manifiesta en presencia de enzimas hidrolasas.

5. OBJETIVOS

Objetivo general.

Evaluar la solubilidad acuosa y la liposolubilidad de un profármaco del albendazol y un profármaco del mebendazol así como su sensibilidad frente a enzimas hidrolasas del tracto gastrointestinal.

Objetivos específicos:

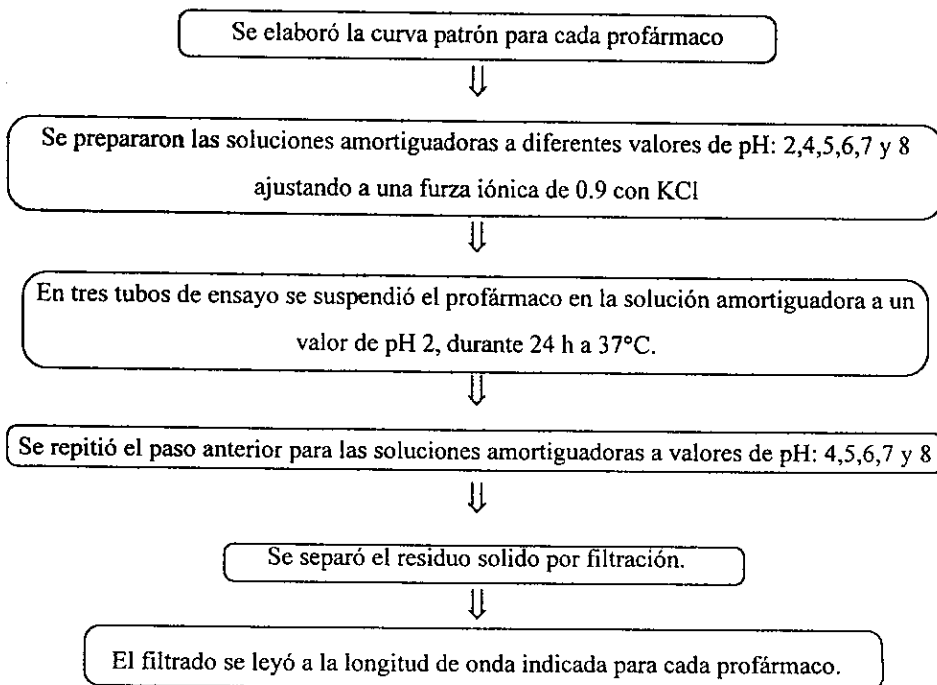
1. Evaluar la solubilidad a diferentes pH.
2. Evaluar la influencia de la fuerza iónica en la solubilidad.
3. Evaluar la influencia del desoxicolato de sodio en la solubilidad.
4. Evaluar el coeficiente de partición octanol/agua.
5. Evaluar la sensibilidad frente a hidrolasas digestivas.

6. MÉTODOS

El profármaco potencial del albendazol y el del mebendazol fueron sintetizados en el laboratorio 122 del Departamento de Farmacia de la Facultad de Química, U.N.A.M.

Para conocer si la solubilidad y el coeficiente de partición de estos nuevos compuestos son diferentes a los de los principios activos que les dieron origen así como si existe la posibilidad de biorreversibilidad en el tracto gastrointestinal o en tejido extraintestinal, de dichos profármacos, se estableció la siguiente metodología de trabajo:

6.1 Pruebas de solubilidad



6.2 Influencia de la fuerza iónica en la solubilidad.

Se prepararon soluciones acuosas de cloruro de potasio a 0.15 M, 0.3 M, 0.45 M, 0.6 M y 0.75 M.



En tres tubos de ensayo se suspendieron los profármacos en la solución acuosa de cloruro de potasio a 0.15 M, durante 24 h a 37 °C.



Se repitió el paso anterior para las soluciones acuosas de cloruro de potasio a 0.3 M, 0.45 M, 0.6 M y 0.75 M.



Se separó el residuo sólido por filtración.



Se leyó el filtrado a la longitud de onda indicada para cada profármaco.

6.3 Coeficiente de partición

Se preparó solución amortiguadora de fosfatos a un valor de pH 6 ajustando la fuerza iónica a 0.9 con KCl.



Se dejó el octanol en contacto con la solución amortiguadora de fosfatos a pH 6 durante 2 días



En tres tubos de ensayo se colocaron 2 mL de la solución amortiguadora de fosfatos a pH 6, que contienen el profármaco y se colocaron 2 mL de octanol, se dejó durante 20 h a temperatura ambiente.



Se congelaron los tubos en hielo seco.



Se separó la fase orgánica (líquida) por decantación de la fase acuosa (congelada).



Se leyó la fase acuosa a la longitud de onda indicada para cada profármaco.

6.4 Influencia del desoxicolato de sodio en la solubilidad

Se prepararon soluciones acuosas de desoxicolato de sodio a 0.5 mM,
1 mM, 2 mM y 2.5 mM.



En tres tubos de ensayo se suspendió el profármaco en el medio acuoso de
desoxicolato de sodio a la concentración de 0.5 mM, durante 24 h a 37 °C



Se repitió el paso anterior para las soluciones acuosas de desoxicolato de
sodio a 1 mM, 2 mM y 2.5 mM.



Se separó el residuo sólido por filtración.



Se leyó el filtrado a la longitud de onda indicada para cada profármaco

6.5 Sensibilidad de los profármacos frente a las hidrolasas digestivas de 0 a 30 minutos.

Se preparó una solución amortiguadora de tris- CaCl_2 con un valor de $\text{pH} = 7.8$



Se trituraron los granulos de las formulaciones de enzimas Pancrease® y Creon®, el polvo se disolvió en 25 mL de agua desionizada



Se separó el residuo solido por filtración.



Se determinó el contenido de proteínas totales y la actividad hidrolítica de los preparados enzimáticos.



El profármaco se preparó a 1×10^{-4} M en acetonitrilo



En la celda se colocó 0.8 mL de solución amortiguadora tris CaCl_2 , se adicionó 0.8 mL del profármaco y se colocó en el espectrofotómetro, en seguida se adicionaron 100 μL del filtrado de la enzima.



Se tomaron las lecturas cada minuto hasta los 30 minutos.

6.6 Sensibilidad de los profármaco frente a las hidrolasas digestivas a los 30, 60 y 120 minutos.

Se prepararon soluciones amortiguadoras a valores de pH: 2, 6 y 7.8.



Se trituró la enzima Pancrease® y Creon®, el polvo se disolvió en 250mL de la solución amortiguadora a valor de pH 2.



Se repitió el paso anteriores para las soluciones amortiguadoras a valores de pH 6 y 7.8.



Se separo el residuo sólido por filtración



El profármaco del mebendazol se suspendió en la solución amortiguadora a pH 2



Se repitió el paso anterior para las soluciones amortiguadoras a valores de pH de 6 y 7.8.



Se separo el residuo solido por filtració



El profármaco del albendazol se disolvió con ayuda de tensoactivos en solución amortiguadora a valor de pH: 2



Se repitió el paso anterior para las soluciones amortiguadoras a valores de pH: 6 y 7.8.



En seis tubos de ensayo, se colocó 1mL del filtrado de la enzima, se colocaron en incubadora a 37° C y se adiciono a 3 tubos 5 mL de la solución del profármaco del mebendazol y a los tres restantes 5 mL de la solución del profármaco del albendazol, se dejo incubando 15 minutos, al final del tiempo se detuvo la reacción sometiendolos a calor.



Se repitió el paso anterior con incubación a 30, 60 y 120 minutos.



Se leyó a la longitud de onda determinada para cada profármaco.

7. PARTE EXPERIMENTAL

7.1 Pruebas de solubilidad

Los profármacos del albendazol y el mebendazol fueron sintetizados en el laboratorio 122 del Departamento de Farmacia de la Facultad de Química, U.N.A.M.

El profármaco del albendazol no ha sido reportado a la literatura, el profármaco del mebendazol fue previamente reportado por Bundgaard y col²⁰.

En un primer experimento se intentó emplear el tween como agente tensoactivo, para mejorar la solubilidad, pero se observó que este compuesto interfiere en la evaluación espectrofotométrica, al presentar variabilidad en la absorbancia.

Los profármacos del albendazol y del mebendazol se disolvieron en metanol absoluto.

Se partió de una solución patrón de 500 ppm. Disolviendo 5 mg del profármaco en 10 mL de metanol.

Con esta solución se realizó un barrido para conocer la longitud de absorción máxima en el rango de luz UV de cada profármaco. El barrido en mezcla metanol/agua (50:50) no provoca desplazamientos en los máximos de absorción (batocromicos e hipsocromicos) del espectro U.V.

En base a esto se elaboró la curva patrón de cada profármaco, empleando el metanol como disolvente.

Diagrama del barrido del profármaco del albendazol

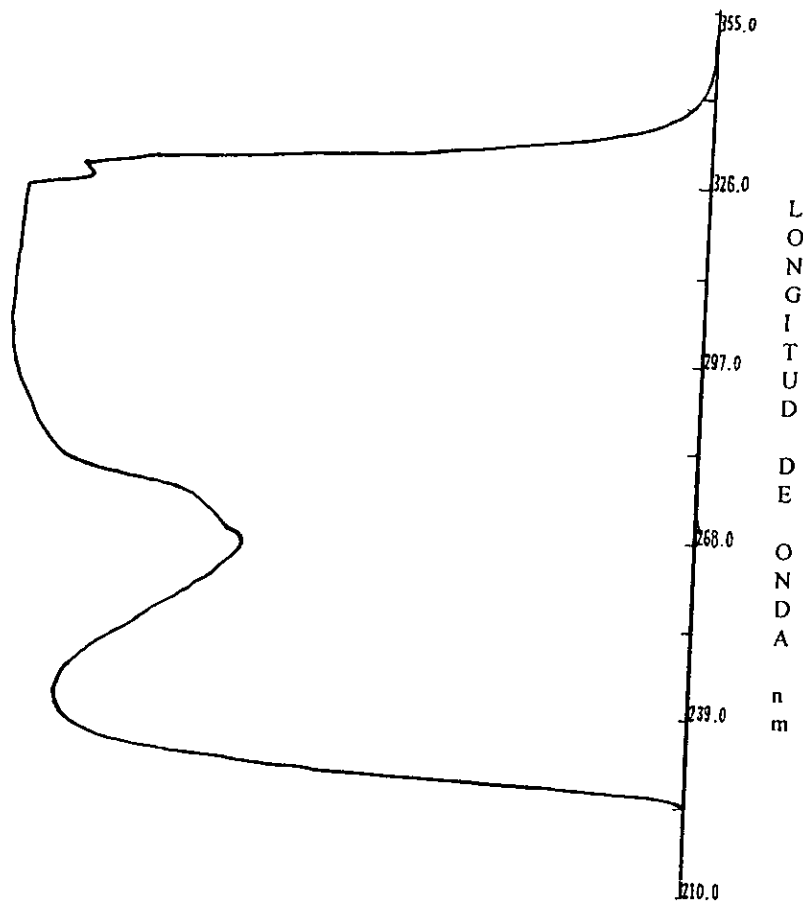
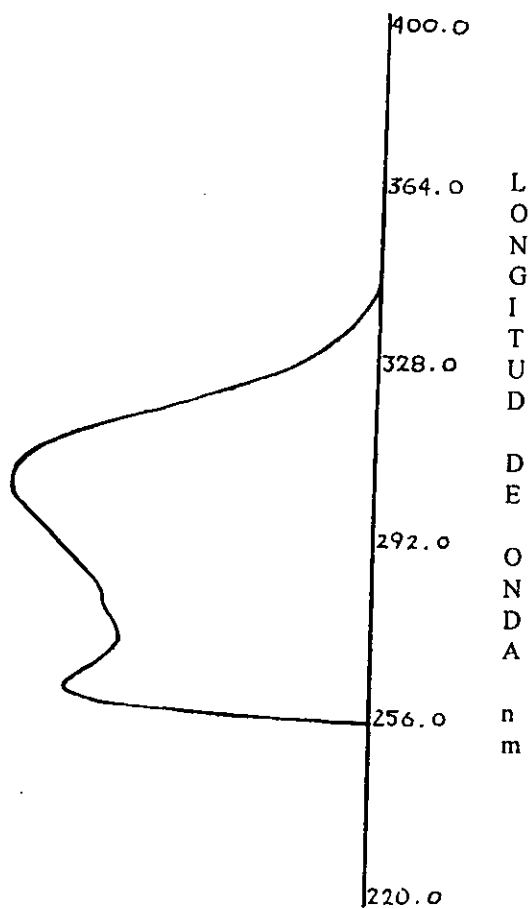


Diagrama del barrido del profármaco del mebendazol



La prueba de solubilidad para ambos profármacos se realizó a pH 2, 4, 5, 6, 7 y 8

Se prepararon buffers a valores de pH de 2, 4, 5, 6, 7 y 8 (ver apendice pagina 70) y se ajustó la fuerza iónica a 0.9 M con KCl.

En 3 tubos de ensayo de 13 X 100 con tapon de rosca se colocaron 10 mg del profármaco, se agregó 5 ml del buffer a pH 2 y se agitó por 5 minutos con un vortex. Esta suspensión se dejó 24 h a 37° C, al termino del tiempo se separó el residuo sólido por filtracion. El filtrado se leyó a 304 nm para el profármaco del mebendazol y a 207 nm para el profármaco del albendazol en el espectrofotometro DU-68 de Beckman en celdas de metacrilato de 1 cm de longitud y 1.5 mL de capacidad.

Se uso como blanco el buffer a pH 2 y albendazol para el profármaco del albendazol y mebendazol para el profármaco del mebendazol.

Esto se repitió para los valores de pH 4, 5, 6, 7 y 8.

➤ El método 6.1 muestra el diagrama de flujo aplicado a las pruebas de solubilidad.

7.2 Influencia de la fuerza iónica en la solubilidad.

Se prepararon soluciones acuosas de cloruro de potasio a concentraciones de 0.15 M, 0.3 M, 0.45 M, 0.6 M y 0.75 M de KCl (ver apendice pagina 71). En 3 tubos de ensayo de 13 X 100 con tapón de rosca se suspendieron 5 mg del profármaco en 5 ml del medio salino a la concentración de 0.15 M de KCl dejando los tubos 24 h a 37°C. Al término

del tiempo se separó el residuo sólido por filtración. El filtrado se leyó a 304 nm para el profármaco del mebendazol y a 207 nm para el profármaco del albendazol en el espectrofotómetro DU-68 de Beckman en celdas de metacrilato de 1 cm de longitud y 1.5 mL de capacidad.

Se usó como blanco solución salina a la concentración de 0.15 M de KCl y albendazol o mebendazol según sea el caso.

Esto se repitió para las concentraciones de 0.3 M, 0.45 M, 0.6 M y 0.75 M de KCl.

➤ El método 6.2 muestra el diagrama de flujo aplicado a las pruebas de influencia de la fuerza iónica en la solubilidad.

7.3 Coeficiente de partición

Para la determinación del coeficiente de partición octanol/agua, previamente, se dejó el octanol en contacto con el buffer a pH 6, 2 días, para saturar el octanol con el buffer.

En 4 tubos de ensayo de 13 X 100 cm con tapón de rosca, se dejó 20 h a temperatura ambiente, el primer tubo contiene el buffer más el compuesto, este se utilizó como control y en los otros 3 tubos se colocaron 2 mL de octanol y 2 mL de buffer pH 6 más el compuesto, posteriormente se congelaron los tubos en hielo seco, el medio acuoso se congeló y se decantó el octanol.

➤ El método 6.3 muestra el diagrama de flujo aplicado a las pruebas de coeficiente de partición.

El coeficiente de partición se calculó de la ecuación¹³:

$$P = \frac{C_i - C_w}{C_w} \frac{V_w}{V_o}$$

C_i = Concentración del profármaco en la fase acuosa antes de la distribución

C_w = Concentración del profármaco en la fase acuosa después de la distribución

V_w = Volumen de la fase acuosa

V_o = Volumen de la fase octanólica

7.4 Influencia del desoxicolato de sodio en la solubilidad

Se prepararon soluciones acuosas de desoxicolato de sodio a concentraciones de 0.5 mM, 1.0 mM, 1.5 mM, 2.0 mM, 2.5 mM (ver apéndice página 71). En 3 tubos de ensayo de 13 X 100 con tapon de rosca se suspendieron 5 mg del profármaco en 4 mL del medio acuoso de desoxicolato de sodio a 0.5 mM, se dejó los tubos 24 h a 37°C, al término del tiempo se separó el residuo sólido por filtración.

El filtrado se leyó a 304 nm para el profármaco del mebendazol y a 207 nm para el profármaco del albendazol en el espectrofotómetro DU-68 de Beckman en celdas de metacrilato de 1 cm de longitud y 1.5 mL de capacidad.

Se usó como blanco solución de desoxicolato de sodio 0.5 M y albendazol para el profármaco del albendazol y mebendazol para el profármaco del mebendazol

Lo anterior se repite para las soluciones de desoxicolato de sodio 1.0 mM, 1.5 mM, 2.0 mM y 2.5 mM.

➤ El método 6.4 muestra el diagrama de flujo aplicado a las pruebas de influencia del desoxicolato de sodio en la solubilidad.

7.5 Determinación de proteínas en las enzimas comerciales.

A. Método de folin.

☛ Preparación de la solución de cobre alcalina.

Se pesaron 0.2 g de NaOH a los que se les adicionaron 50 mL de agua destilada, se pesó 1 g de Na_2CO_3 y se adicionó a los 50 mL de NaOH 0.1M, para obtener 50 mL de una solución 2% m/v de Na_2CO_3 en 0.1M de NaOH, se pesó 0.05 g de NaK tartrato se disolvió en 5 mL de agua destilada, se adicionó 0.025 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, con lo que se obtuvo 5 mL de una solución 0.5% m/v de CuSO_4 en 1% de NaK tartrato.

☛ Determinación de proteínas totales.

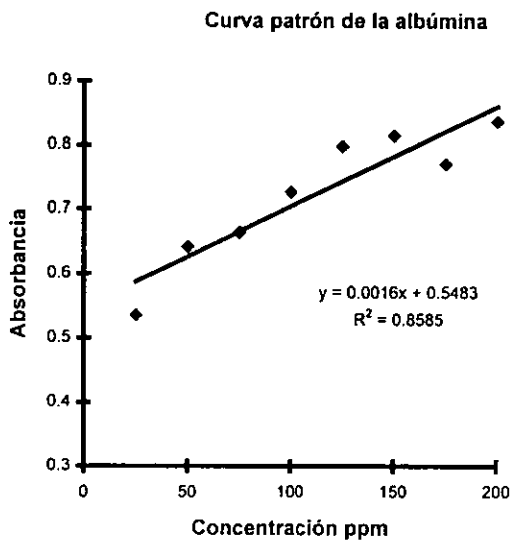
Se pesaron 1.5 mg de proteína pura (albumina), estos se diluyeron en 3 mL de agua destilada, para tener una concentración de 500 ppm.

De esta solución patrón se realizaron diluciones que se llevaron a un volumen final de 0.6 mL para obtener las concentraciones necesarias para preparar la curva patrón.

Alicuota μL	volumen final mL	concentración ppm
30	0.6	25
60	0.6	50
90	0.6	75
120	0.6	100
150	0.6	125
180	0.6	150
210	0.6	175
240	0.6	200

A cada uno de los ocho tubos que contenían 0.6 mL de proteína se les agregó 3 mL de solución de cobre alcalina, se agitó durante 10 minutos, se adicionó 0.3 mL del reactivo de Folin, se mezcló y se dejó reposar 30 minutos, al término del tiempo se leyó a 750 nm.

Concentración $\mu\text{g/ml}$	Absorbancia
25	0.536
50	0.642
75	0.664
100	0.727
125	0.798
150	0.815
175	0.771
200	0.837



Se determinó la cantidad de proteínas en Zimotris[®] por el método de Folin Cicoalteu siguiendo el procedimiento descrito para la determinación de proteína pura (albumina), interpolando los datos obtenidos en la curva patrón de albumina.

Absorbancia	Concentración
0.493	53.6
0.594	64.6
0.549	59.7
0.645	70.1
0.620	67.4
0.628	68.3
0.696	75.7
0.887	96.4

Se determinó la cantidad de proteínas en Creon® siguiendo el procedimiento descrito para la determinación de proteínas pura (albumina), los datos obtenidos se interpolaron en la curva patrón de albumina para conocer la concentración.

Absorbancia	Concentración
0.540	58.7
0.443	48.1
0.424	46.1
0.494	53.7
0.487	52.9
0.482	52.4
0.487	53.7
0.538	58.5

B. Método de Bradford.

Para este ensayo se utilizó el kit BIO RAD® (catálogo 500-0002).

Se preparó la dilución de 1 parte del colorante BIO-RAD con 4 partes de agua desionizada. La solución se pasó por un papel filtro Whatman #1 para la remoción de partículas suspendidas.

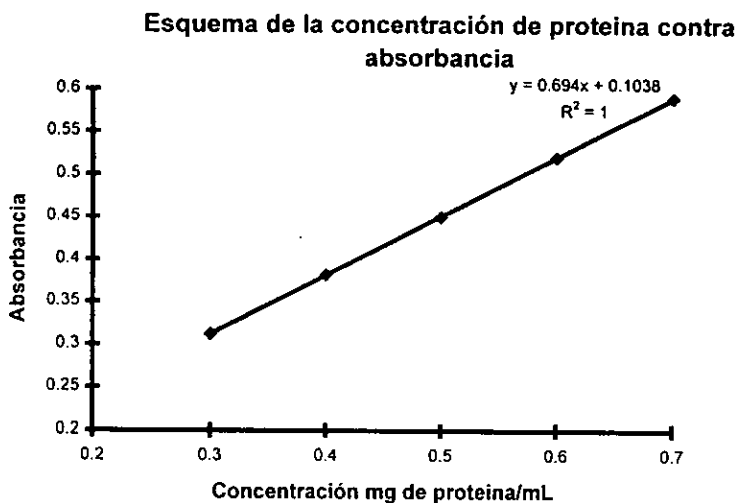
La concentración de la solución patrón de albumina (Sigma) fue de 2.0 mg/mL. Para la preparación de las soluciones de la curva patrón, se hicieron diluciones tomando 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 mL de la solución patrón y se aforaron a 10 mL con agua desionizada. Con esto se obtuvieron las siguientes concentraciones 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7 mg/mL.

En series de tres tubos de ensayo se colocaron 100 μ L de cada solución de la curva patrón, así como de la muestra problema. Luego se adicionaron 5.0 ml del colorante diluido de BIO-RAD y se agitaron mediante un vortex durante 30 s.

Se incubaron los tubos de ensayo a temperatura ambiente durante 5 min. y no más de 30 min (la absorbancia se incrementa con el transcurso de tiempo). Se leyeron las muestras a 595 nm en celdas de poliestireno de 1 cm de longitud y 1.5 mL de capacidad (catálogo BIO-RAD 223-9955)

Concentración mg/mL	Absorbancia*
0.3	0.312
0.4	0.382
0.5	0.450
0.6	0.520
0.7	0.590

*Promedio de tres lecturas



7.6 Hidrólisis con N-benzoil-L-tirosina- etil ester (BTEE).

Esta prueba se realizó para determinar la concentración de la forma comercial de enzima que rompe el sustrato.

☛ Solución del sustrato N-Benzoil-L-tirosina etil ester (BTEE) 0.1 N en 50% p/p metanol acuoso.

Disolver 15.7mg de BTEE en 30 mL de metanol, grado espectro, y agregar hasta 50mL de agua, preparar en el momento de emplear .

☛ Buffer Tris-HCl 0.10 M pH 7.8 que contenga CaCl_2 0.10M

☛ Enzima Zimotris® y Pancrease®

Se pesaron 10 mg de enzima y se disolvieron en 10 mL de HCl 0.01 N, esta solución se diluyo 1:50 con HCl 0.001 M.

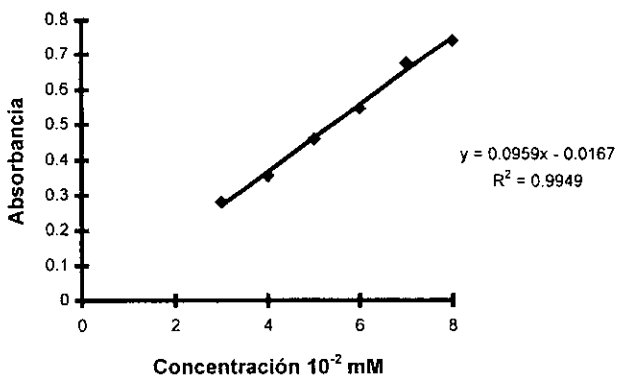
➤ Procedimiento

Realizar el experimento en celdas de metacrilato, colocar a 0.8 mL de buffer en la celda, adicionar 0.8 mL del sustrato, inmediatamente colocar en el espectrofotometro y adicionar 100 μ L de enzima, leer a 405 nm cada 30 segundos tomar las lecturas hasta los 5 minutos.

Curva patrón del sustrato (BTEE)

Concentración 10^{-2} mM	Absorbancia
3	0.281
4	0.357
5	0.459
6	0.549
7	0.676
8	0.743

Curva patrón del sustrato (BTEE)



Se realizó el mismo procedimiento para Zimotris® y Pancrease® interpolando los datos en la curva patrón.

Pancrease®

Tiempo minutos	Concentración 10^{-2} mM
1	2.2
2	3.0
3	3.9
4	4.6
5	5.3

Zimotris®

Tiempo minutos	Concentración 10^{-2} mM
1	0.9
2	1.1
3	1.3
4	1.5
5	1.7

Creon®

Tiempo minutos	Concentración mM 10^{-2}
1	1.2
2	1.3
3	1.4
4	1.6
5	1.7

7.7 Sensibilidad de los profármacos frente a las hidrolasas digestivas.

☛ Preparación de la enzima

Se emplearon enzimas de uso comercial, en cápsulas de 300 mg que contenían el granulado, se trituró el contenido de una capsula, una vez obtenido el polvo, éste se disolvió en 25 mL de agua desionizada, se filtró y se usó.

☛ Preparación del profármaco.

El profarmaco se usó a 1×10^{-4} M disolviendo en 1 mL de acetonitrilo y se llevó a 10 mL con agua desionizada.

☛ Procedimiento.

En la celda se colocó 0.8 mL de buffer 7.8 tris CaCl_2 , se adicionaron 0.8 mL del profármaco correspondiente y se colocó en el espectrofotometro DU-68 de Beckman, aquí se le adicionaron 100 μL de la enzima correspondiente tomando la lectura cada minuto, hasta los 30 min.

☛ Preparación de la enzima para 15 min, 30 min, 60 min y 120 min

Se empleó enzimas de uso comercial, en capsula que contenia el granulado, se trituró el contenido de una capsula, una vez obtenido el polvo, se trabajo con este, se disolvió la enzima en 250 mL del buffer, esta prueba se realizó a pH 2, 7.8 y 6.

☛ Preparación del profármaco para los 15 min, 30 min, 60 min y 120 min.

El profármaco de mebendazol se dejó 12 h en agitación continua, en el buffer correspondiente, posteriormente se filtró y se uso el sobrenadante.

El profármaco de albendazol se preparó disolviendo 5 mg en 1 mL de etanol, se agregaron 0.25 mL de propilenglicol, se agregaron 0.25 ml de agua desionizada. De esta solución se tomaron 0.5 mL y se agregaron 0.5 mL de agua desionizada. De esta solución se tomó 1.6 mL y se llevaron a 500 mL para obtener una concentración de 20 ppm de la curva patrón.

➤ Procedimiento.

En 3 tubos de ensayo de 13 X 100 con tapón de rosca, se colocó 1 mL de enzima, a un cuarto tubo se le colocó 1 mL del buffer correspondiente.

Los 4 tubos se colocaron a 37 °C y se les agregaron 5 mL de la solución del profármaco correspondiente, al final de cada tiempo se detuvo la reacción sometiendolos a calor, y se leyó a 304 nm para el profármaco del mebendazol y a 207 nm para el profármaco del albendazol en el espectrofotometro DU-68 de Beckman en celdas de metacrilato de 1 cm de longitud y 1.5 mL de capacidad.

Como blanco se empleó el buffer correspondiente al cual se le agregó unas gotas de la enzima, y albendazol para el profármaco del albendazol y mebendazol para el profármaco del mebendazol para obtener exclusivamente la lectura del profármaco. Se leyó a los 15 min, 30 min, 1 h 2 h.

➤ Los métodos 6.5 y 6.6 muestran los diagramas de flujo aplicados a las pruebas de sensibilidad de los profármacos frente a las hidrolasas digestivas.

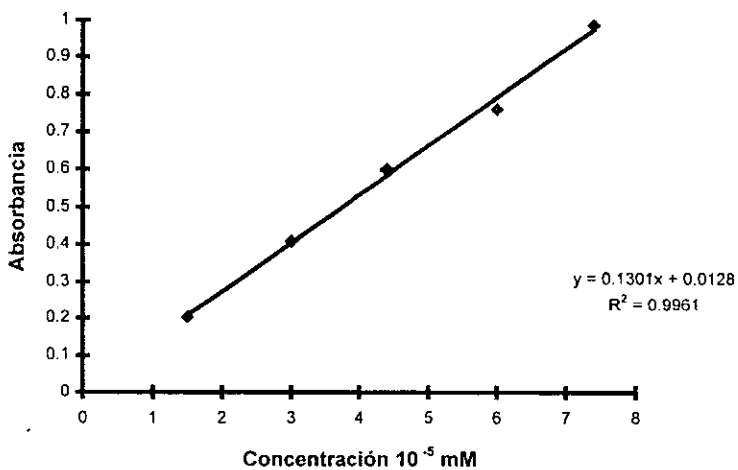
8. RESULTADOS.

8.1 Pruebas de solubilidad.

Curva patrón del profármaco del albendazol

Tabla I

Concentración 10^{-5} mM en metanol	Absorbancia
1.5	0.203
3.0	0.409
4.4	0.601
6.0	0.763
7.4	0.990

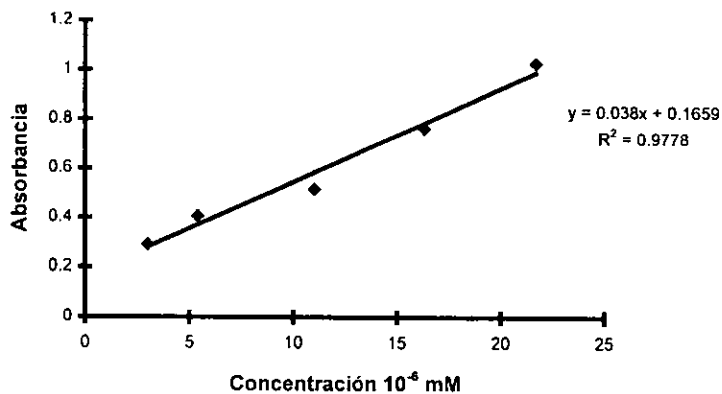


Gráfica I Curva patrón del profármaco del albendazol.

Curva patrón del profármaco del mebendazol

Tabla II

Concentración 10^{-6} mM en metanol absoluto	Absorbancia
3.0	0.291
5.4	0.408
11.0	0.518
16.3	0.763
21.7	1.028

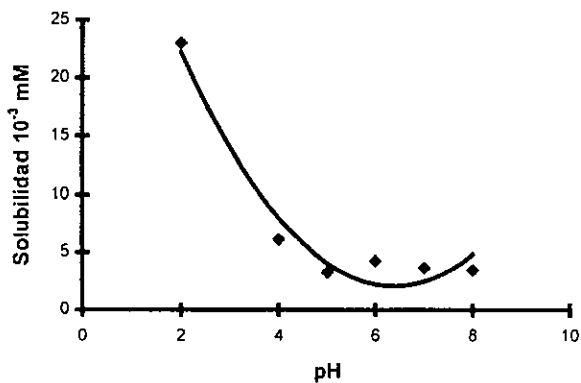


Gráfica II Curva patrón del profármaco del mebendazol

Tabla III.

Influencia del pH en la solubilidad del profármaco de albendazol.

pH (amortiguador)	Solubilidad 10^{-3} mM
2 (HCl 0.001N)	23 ± 0.01
4 (acetatos)	6.1 ± 0.17
5 (acetatos)	0.2 ± 0.25
6 (fosfatos)	4.3 ± 0.17
7 (fosfatos)	3.7 ± 0.14
8 (fosfatos)	3.5 ± 0.34

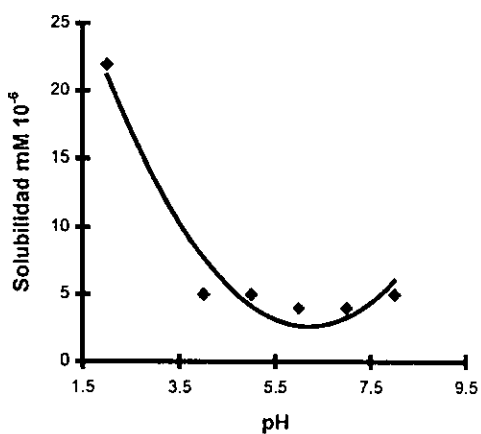


Gráfica III Influencia del pH en la solubilidad del profármaco del albendazol.

Tabla IV.

Influencia del pH en la solubilidad del profármaco de mebendazol

pH (buffer)	Solubilidad 10^{-6} mM
2 (HCl 0.001N)	22 ± 0.47
4 (acetatos)	5 ± 0.47
5 (acetatos)	5 ± 0.35
6 (fosfatos)	4 ± 0.95
7 (fosfatos)	4 ± 0.43
8 (fosfatos)	5 ± 0.35



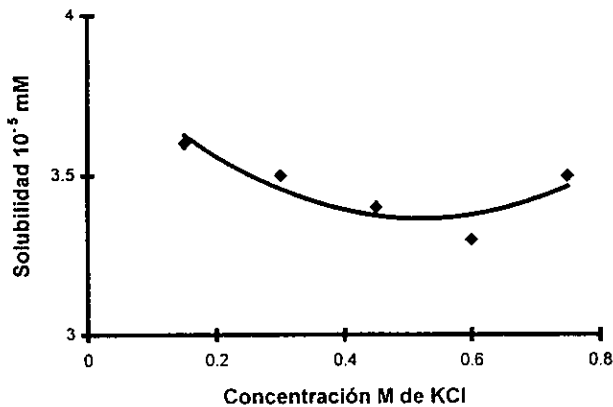
Gráfica IV **Influencia del pH en la solubilidad del profármaco del mebendazol**

8.2 Influencia de la fuerza iónica en la solubilidad

Tabla V.

Influencia de la fuerza iónica en la solubilidad del profármaco del albendazol

Concentración (M) de KCl	Solubilidad 10^{-5} mM
0.15	3.6 ± 0.09
0.30	3.5 ± 0.31
0.45	3.4 ± 0.05
0.60	3.3 ± 0.16
0.75	3.5 ± 0.29

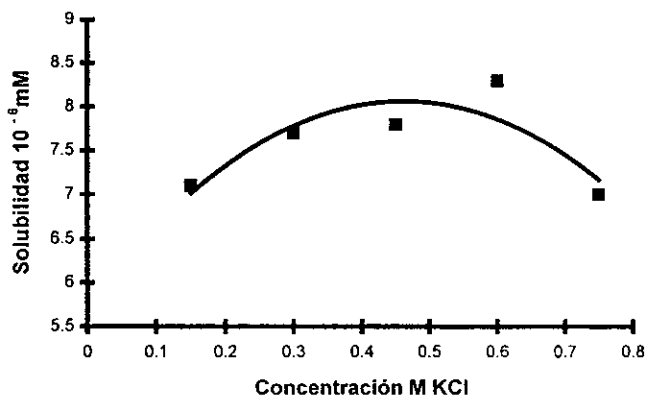


Gráfica V Influencia de la fuerza iónica en la solubilidad del profármaco del albendazol

Tabla VI.

Influencia de la fuerza iónica en la solubilidad del profármaco del mebendazol.

Concentración (M) de KCl	Solubilidad 10^{-6} mM
0.15	7.1 ± 0.05
0.30	7.7 ± 0.005
0.45	7.8 ± 0.01
0.60	8.3 ± 0.02
0.75	7.0 ± 0.01



Gráfica VI **Influencia de la fuerza iónica en la solubilidad del profármaco del mebendazol.**

8.3 Coeficiente de partición

Tabla VII.

Coeficiente de partición octanol/agua con buffer de fosfatos pH 6, fuerza iónica 0.9, T= 37° C

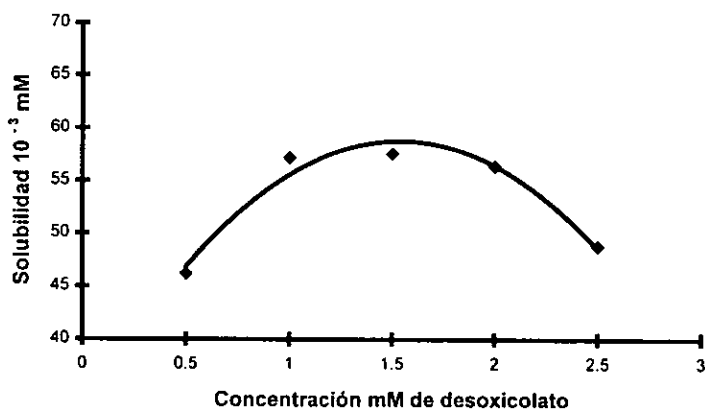
Compuesto	Coeficiente de partición
Albendazol	2.8
Profármaco del albendazol	4.071 ± 0.575
Mebendazol	3.1
Profármaco del mebendazol	2.242 ± 0.490

8.4 Influencia del desoxicolato de sodio en la solubilidad.

Tabla VIII.

Influencia del desoxicolato de sodio en la solubilidad del profármaco del albendazol.

Concentración (mM) de desoxicolato	Solubilidad 10 ⁻³ mM
0.5	46.2 ± 5.1
1.0	57.2 ± 1.8
1.5	57.6 ± 1.4
2.0	56.4 ± 0.5
2.5	48.8 ± 9.3

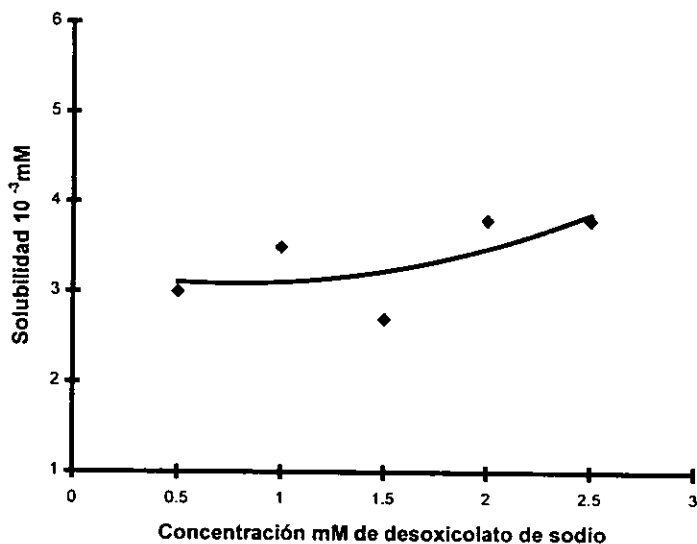


Gráfica VII Influencia del desoxicolato de sodio en la solubilidad del profármaco del albendazol

Tabla IX.

Influencia del desoxicolato de sodio en la solubilidad del profármaco del mebendazol

Concentración (mM) de desoxicolato	Solubilidad 10^{-3} moles
0.5	3.0 ± 0.2
1.0	3.5 ± 0.2
1.5	2.7 ± 0.09
2.0	3.8 ± 0.09
2.5	3.8 ± 0.3

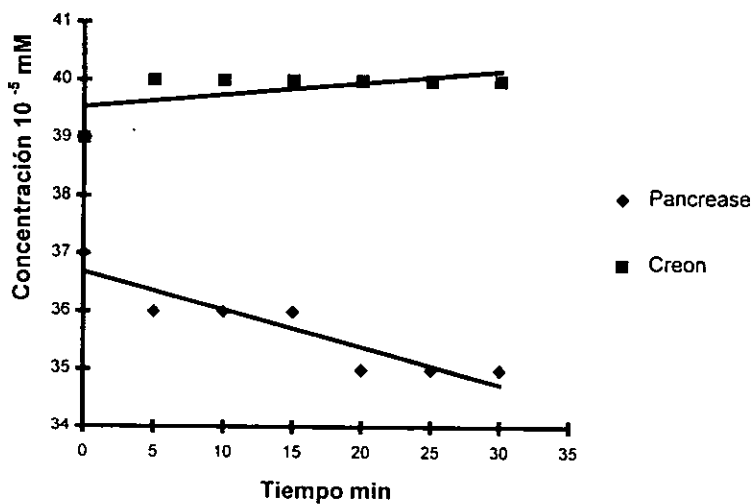


Gráfica VIII Influencia del desoxicolato de sodio en la solubilidad del fármaco del mebendazol

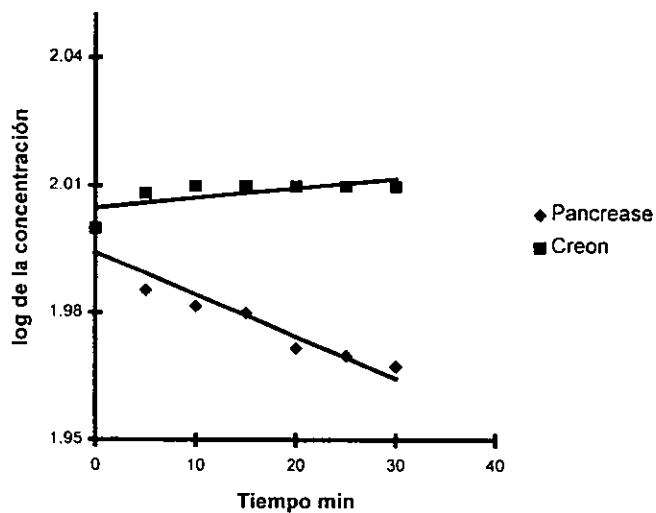
8.5 Sensibilidad de los fármacos frente a las hidrolasas digestivas de 0 a 30 min.

Tabla X. Sensibilidad enzimática con el fármaco del albendazol.

TIEMPO minutos	PANCREASE®		CREON®	
	Concentración 10^{-5} mM			
	log		log	
0	3.7	2	3.9	2
5	3.6	1.985	4.0	2.008
10	3.6	1.982	4.0	2.010
15	3.6	1.980	4.0	2.010
20	3.5	1.972	4.0	2.010
25	3.5	1.970	4.0	2.010
30	3.5	1.967	4.0	2.010



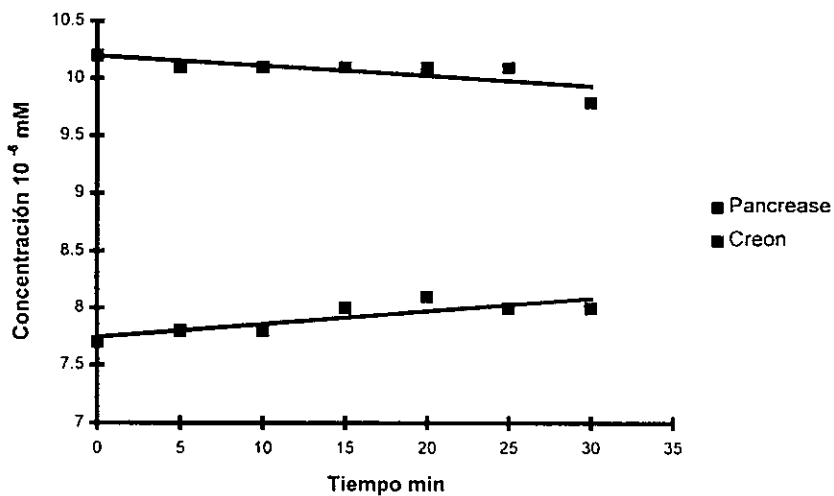
Gráfica IX Sensibilidad enzimática con el profármaco del albendazol



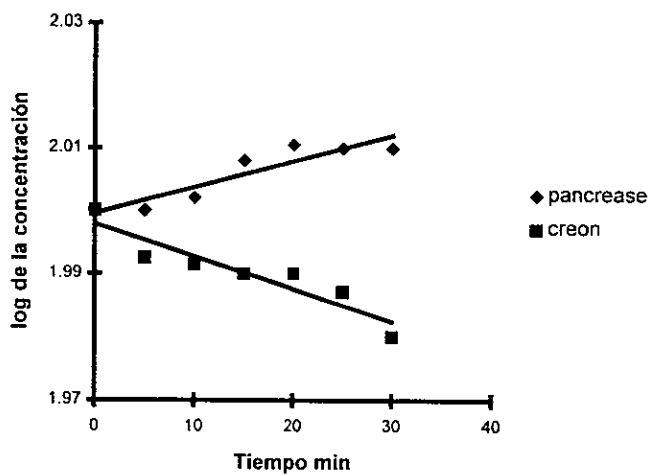
Gráfica X Cinética enzimática con el profármaco del albendazol.

Tabla XI. Sensibilidad enzimática con el profármaco del mebendazol.

TIEMPO minutos	PANCREASE®		CREON®	
	Concentración 10^{-6} mM			
		log		log
0	7.7	2.000	10.2	2
5	7.8	2.000	10.1	1.993
10	7.8	2.002	10.1	1.991
15	8.0	2.018	10.1	1.990
20	8.1	2.011	10.1	1.990
25	8.0	2.010	10.1	1.987
30	8.0	2.010	9.8	1.980



Gráfica XI Sensibilidad enzimática con el profármaco del mebendazol

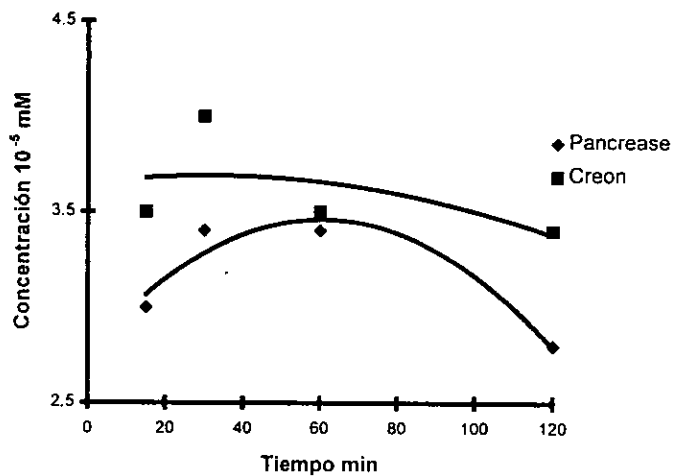


Gráfica XII Cinetica enzimatica con el profármaco del mebendazol.

Tabla XII.

Sensibilidad del profármaco del albendazol frente a las hidrolasas digestivas a pH 2.

TIEMPO minutos	Concentracion mM 10^{-5}	
	PANCREASE®	CREON®
15	3.0	3.5
30	3.4	4.0
60	3.4	3.5
120	2.8	3.4

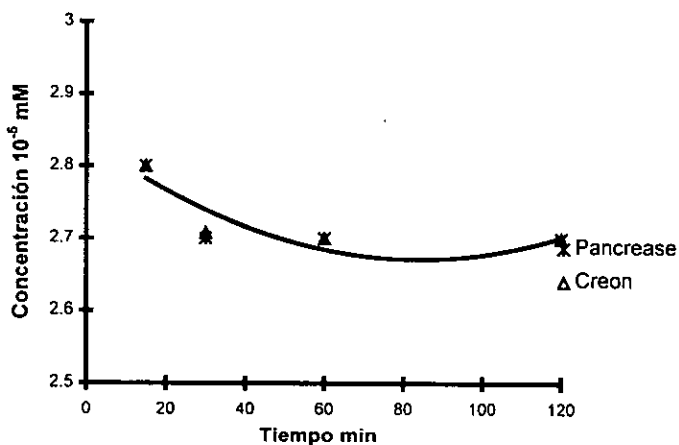


Gráfica XIII Sensibilidad del profármaco del albendazol frente a las hidrolasas digestivas a pH 2

Tabla XIII.

Sensibilidad del profármaco del albendazol frente a hidrolásas digestivas a pH 6

TIEMPO minutos	Concentración mM 10^{-5}	
	PANCREASE®	CREON®
15	2.8	2.8
30	2.7	2.7
60	2.7	2.7
120	2.7	2.7

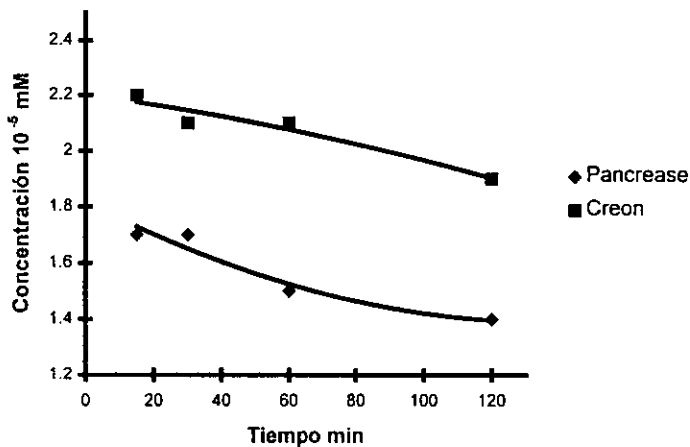


Gráfica XIV Sensibilidad del fármaco del albendazol frente a hidrolasas digestivas a pH 6

Tabla XIV.

Sensibilidad del fármaco del albendazol frente a hidrolasas digestivas a pH 8.3

TIEMPO minutos	Concentración mM 10 ⁻⁵	
	PANCREASE®	CREON®
15	1.7	2.2
30	1.7	2.1
60	1.5	2.1
120	1.4	1.9

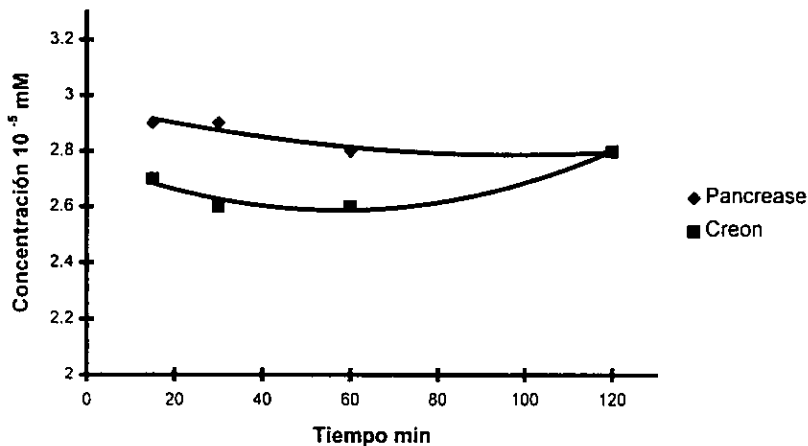


Gráfica XV Sensibilidad del profármaco del albendazol frente a hidrolasas digestivas a pH 8.3

Tabla XV.

Sensibilidad del profármaco del mebendazol frente a hidrolasas digestivas a pH 2

TIEMPO minutos	Concentración mM 10^{-5}	
	PANCREASE®	CREON®
15	2.9	2.7
30	2.9	2.6
60	2.8	2.6
120	2.8	2.8

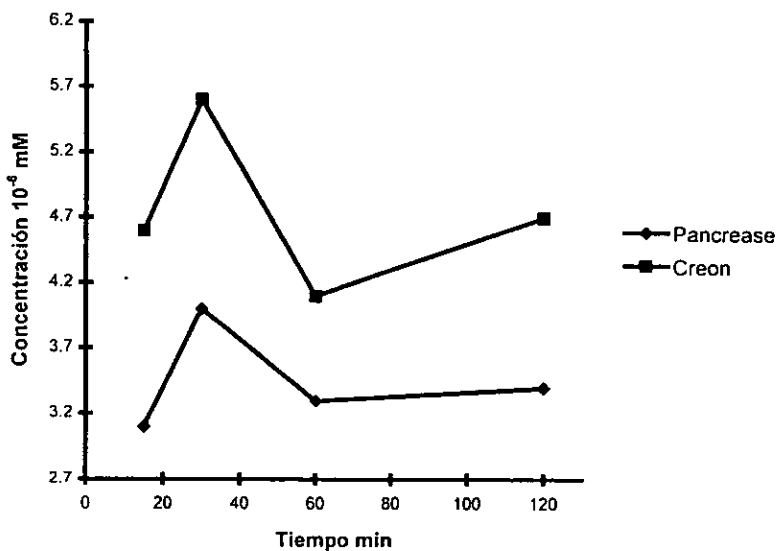


Gráfica XVI Sensibilidad del profármaco del mebendazol frente a hidrolasas digestivas a pH 2

Tabla XVI.

Sensibilidad del profármaco del mebendazol frente a hidrolasas digestivas a pH 6

TIEMPO minutos	Concentración mM 10^{-6}	
	PANCREASE®	CREON®
15	3.1	4.6
30	4	5.6
60	3.3	4.1
120	3.4	4.7

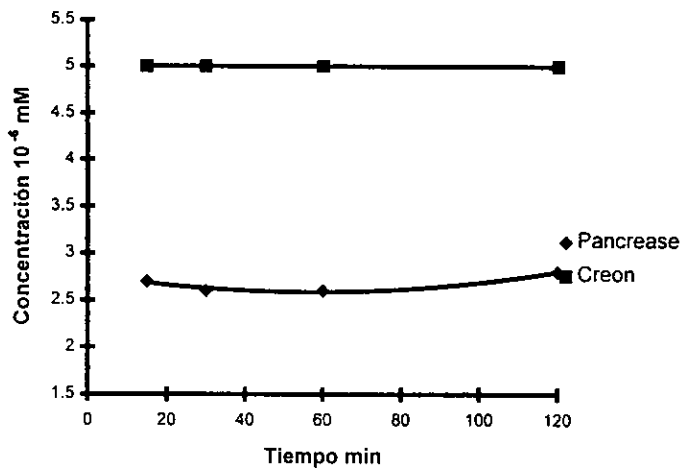


Gráfica XVII Sensibilidad del profármaco del mebendazol frente a hidrolasas digestivas a pH 6

Tabla XVII.

Sensibilidad del profármaco del mebendazol frente a hidrolasas digestivas a pH 7.8

TIEMPO minutos	Concentración mM 10^{-6}	
	PANCREASE®	CREON®
15	2.7	5.0
30	2.6	5.0
60	2.6	5.0
120	2.8	5.0

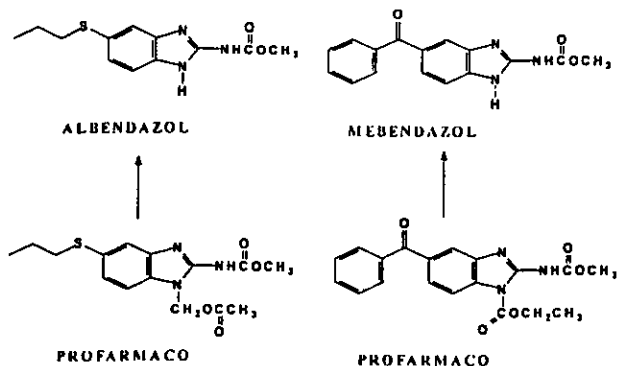


Gráfica XVIII Sensibilidad del profármaco del mebendazol frente a hidrolasas digestivas a pH 7.8

9. DISCUSION DE RESULTADOS

Solubilidad a diferentes pH

Se observa que el profármaco del albendazol y el del mebendazol son más solubles al valor de pH de 2, dicho valor está comprendido dentro del rango de los valores de pH de 1 a 3.5 del estómago, lo que indica que se disuelven con facilidad en este sitio, aunque se espera que el albendazol y el mebendazol también presenten sus mayores grados de solubilidad a los pH ácidos debido a su naturaleza estructural.



El profármaco del albendazol es más soluble a valores de pH inferiores a 4, disminuye su solubilidad notablemente al valor de pH de 5 y es casi constante a valores de pH de 6 a 8. El profármaco del mebendazol es más soluble al valor de pH de 2 y su solubilidad es casi constante a los valores de pH de 4 a 8. Esta diferencia en el comportamiento puede ser atribuida en primer lugar a la naturaleza estructural distinta de los dos principios activos; en segundo lugar, aunque en menor grado, a la naturaleza estructural del progrupo en el albendazol acetiloximetil como progrupo y en el mebendazol etoxicarbonil como progrupo.

Influencia de la fuerza iónica en la solubilidad.

En la tabla III y IV observamos que la solubilidad de ambos profármacos no se vió afectada por la fuerza iónica, lo cual es importante, pues la fuerza iónica del tracto gastrointestinal no siempre es la misma por la ingesta de alimentos.

El que su solubilidad se presente con pocos cambios ante la variación de la fuerza iónica asegura que la solubilidad en el tracto gastrointestinal ante cambios de fuerza iónica no se verá afectada.

Coefficiente de partición

En la tabla VII se observó que el coeficiente de partición del profármaco del albendazol, es similar al del albendazol mismo, lo que llevaría a pensar, que la modificación estructural, en poco afectó la liposolubilidad del fármaco, aunque si logró modificar su solubilidad. Por lo que respecta al profármaco del mebendazol se encontró un decremento en la liposolubilidad del principio activo; sin embargo, el valor obtenido, de 2.242 ± 0.490 , aún se encuentra en el rango aceptable para transportarse a través de las membranas biológicas, ($\log P = 1-2$)²⁴.

Influencia del desoxicolato de sodio en la solubilidad.

En las tablas VIII y IX observamos que el desoxicolato de sodio favoreció la solubilidad tanto del profármaco del albendazol, como la del profármaco del mebendazol, sin una notoria variación a diferentes

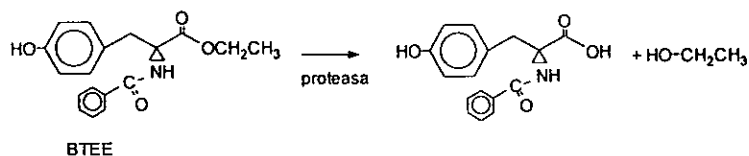
concentraciones del desoxicolato de sodio, siendo mayor la solubilidad del profármaco del albendazol que la del profármaco del mebendazol.

El papel que desempeña el desoxicolato de sodio es el de disminuir la tensión superficial de la fase acuosa, logrando emulsificar a los profármacos. La elección del desoxicolato de sodio, se llevó a cabo, debido a su presencia como emulsificante en el contenido intestinal.

Sensibilidad de los profármacos frente a las hidrolasas digestivas.

La determinación de proteínas por el método de Folin-Ciocalteu no fue lineal para el conteo de proteínas de las enzimas comerciales Zimotris® y Creon®, al observar que a concentraciones de 10 ppm, 30 ppm, y 180 ppm de las enzimas comerciales se obtuvieron resultados constantes, se decidió realizar la prueba a la concentración de enzima indicada posologicamente.

Ante tal situación, se decidió realizar la evaluación de proteínas totales mediante el método de Bradford, adquirido comercialmente de BIO-RAD. Las diferencias presentadas se deben a que el método de Folin es más sensible a la presencia de los ingredientes de la formulación que el método de Bradford.

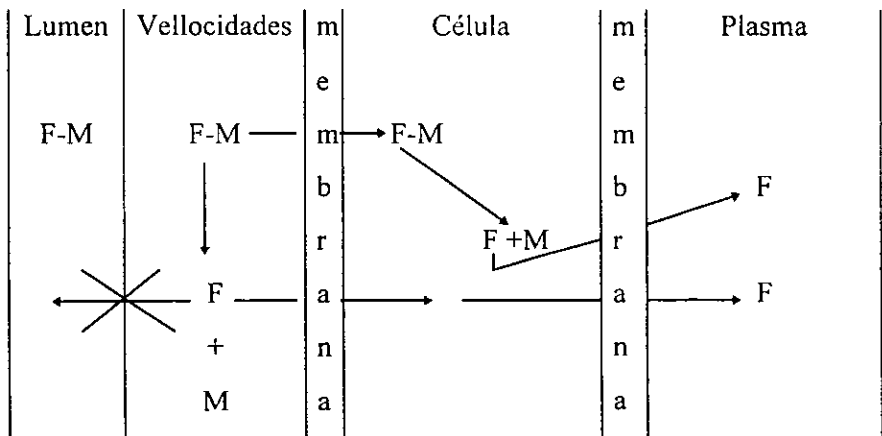


Se utilizó el sustrato (BTEE) N-Benzoil-L-Tirosina etil ester como sustrato comercial para verificar la funcionalidad de las enzimas hidrolasas,

al hidrolizar las enzimas al sustrato se desprende el compuesto que es medido a 405 nm por espectroscopia con luz U.V.

Al enfrentar los profármacos a las enzimas Creon® y Pancrease® a los valores de pH del tracto gastrointestinal, se observó que es lenta la hidrólisis, dado que hasta los 120 minutos los resultados son casi constantes, en estos resultados la enzima comercial Pancrease® mostró ser mejor.

Los constituyentes de la formulación de Pancrease® y Creon®, son enzimas que prácticamente actúan a nivel del lumen intestinal. El hecho de que estos profármacos presenten cierto grado de estabilidad frente a estas enzimas, nos lleva a pensar que probablemente la hidrólisis de los mismos podría iniciarse con las enzimas de las vellocidades intestinales, lo que favorecería adicionalmente la biodisponibilidad de estos profármacos.



10. CONCLUSIONES

La modificación estructural sobre el albendazol y el mebendazol provocó un incremento de la solubilidad acuosa en estos principios activos a diferentes valores de pH. En relación a los principios activos este comportamiento no se ve influenciado con la fuerza iónica del medio, ventaja adicional que presentan este tipo de profármacos.

A pesar del aumento de solubilidad, el coeficiente de partición, para el caso del profármaco de albendazol, se incrementó en su valor lo que no compromete su paso a través de las membranas intestinales. Por lo que respecta al profármaco del mebendazol, se presentó un comportamiento normal en la relación liposolubilidad - solubilidad acuosa, ya que cuando uno de estos parámetros se incrementa el otro disminuye; sin embargo, el valor de coeficiente de partición obtenido aún favorece el transporte del profármaco en las membranas biológicas, $(\log P = 1-2)^{24}$.

El profármaco del albendazol aumenta su solubilidad en presencia del desoxicolato de sodio y es más sensible a las hidrolasas digestivas que el profármaco del mebendazol.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo de tesis serán de utilidad para el diseño de otros profármacos del albendazol y mebendazol con propiedades adecuadas para la liberación sistémica de estos principios activos.

11. REFERENCIAS

1. Romero Cabello, Microbiología y parasitología humana, primera edición, Panamericana, 1993; 104: 28, 32, 572-639.
2. Angus, Bell; Helen, C. Roberts; Leslie, Chappell. The antiparasite effects of Cyclosporin A: Possible drug targets and clinical applications. *General Pharmacology* 1996; 27 (6): 963-971.
3. Markell, Voge, John, *Parasitología Medica*, 1990; 7, 8: 151-287.
4. Sharma, S. Design of new drugs for helminth disease: lead optimization in benzimidazoles. *Advances in Drug Reserch*, 1994; 25: 103-172.
5. W.C. Browman, *Farmacología bases bioquímicas y patológicas, aplicaciones clínicas*, segunda edición, Interamericana, 1980; 37: 37.1-37.25.
6. de Silva, N; Guyatt, H. ; Bundy, D. Anthelmintics. A comparative review of their clinical pharmacology drugs. 1997; 53 (5): 769-788.
7. Manuel Litter, *Farmacología experimental y clínica*, sexta edición, El ateneo, 1980; XII: 1825.
8. Jung, H. Hurtado, M.; Sanchez, M.; Medina, M.T.; Sotelo, J. *Clinical pharmaco Kinetics of albendazole in patients with brain cysticercosis*. *Journal Clinical Pharmacology* 1992; 32 (1): 28-31.
9. Martindale, *The extra pharmacopoeia*, edition 27, Press, 1979, 47-48, 57-58.
10. Jimenez-Gonzalez, A; De-Armas, S.C.; Criado-Fornelio, A; Casado Escribano, N; Rodriguez-Caaberio; Diez, J.C. Preliminary

- characterization and interaction of tubulin from trichinella spiralis larvae with benzimidazole derivatives. *Veterinary Parasitology* 1991; 39 (1-2): 89-99.
11. Andrejus Korolkovas, *Essentials of medicinal chemistry*, second edition, John Wiley, 1988, U.S.A., 1: 99-113.
 12. Sharma, S. *Drugs for filariasis: four decades of research*. *Advances in Drug Research* 1993; 24: 215-217.
 13. Lachman, L, *The theory and practice of industrial pharmacy*, second edición, 1986, 1: 187-189.
 14. Theodorides, V.J.; Gyurik, R.J.; Kingbury, W.D. Parish, R.C. Anthelmintic activity of albendazole against liver flukes, Tapeworms, lung and gastrointestinal round worms. *Experientia* 1976; 32 (6): 702-703
 15. Abdou Mack, *Dissolution, Bioavailability and Bioequivalence*, Mack Publishing. USA, 1989,5.
 16. Gottschall, D.W.; theodorides, V.J.; Wang, R. The metabolism of benzimidazole anthelmintic. *Parasitology Today* 1990; 6 (4): 121-122.
 17. Tortora, *Principios de anatomia y fisiología*, 1989; 24: 759-806.
 18. Lacey, E; Watson, T.R. Structure-Activity relationship of benzimidazoles carbamates as inhibitors of mamalian tubulin, in vitro. *Biochemical Pharmacology* 1985; 34 (7): 1073-1077.
 19. Trevor Palper, *Understanding enzymes*, Prentice Hall 1995; 5: 76-77
 20. Povl Krogsgaard-Larsen and Hans Bundgaard. *A textbook of drug design and development harwood*. Academic publishers. 1991; 5 : 114

21. Donald Voet, Judith G. Voet, Biochemistry, John Wiley & Sons, 1990; 3: 373-382.
22. Hernández-Luis, F.; Castillo, R. *Los Profarmacos una alternativa en la investigación Quimico- Farmacética*. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas. 1993; 24(2):25-30
23. Albert L. Lehninger,. Bioquímica las bases moleculares de la estructura y función celular, Omega, 1995; 5: 97-100, 8: 192-219, 9: 225-250, 10: 572-573.
24. Wells, J.I. Pharmaceutical preformulation: The physicochemical properties of drug substances. John Wiew and Sons. Great Britain. 1988. 13-14, 21.
25. Garrido Pertierra, Química para ciencias de la salud; España, 1991, 232.
26. Secretaria de Salud, Farmacopea, 1994; 247-253.
27. Jonkman-de Vries, J.D.; Flora K.P.; Bult, A.; Beijnen, J.H.; Pharmaceutical Development of anticancer agents for parenteral use- A review. Drug Development and Industrial Pharmacy 1996; 22(6): 475-494.
28. Yalkowsky, S.H; Sinkula, A.A.; Valvania, S.C. Physical Chemical properties of drugs. Marcel Dekker, INC. New York. 1988.; 202-207.

12. APENDICE

Preparación de las soluciones amortiguadoras.

Se ajustó la fuerza iónica a $\mu = 0.9$, empleando para esto KCl, según la fórmula¹³:

$$\mu = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^{i=n} C_i Z_i^2$$

Donde

C: concentración en molaridad de los iones

Z: carga de los iones

☛ pH 2

Pesar 3.28 g de KCl, agregar 59 ml de HCl 0.1M y aforar a 500 mL, agregar 26.54 g de KCl

☛ pH 4

Pesar 2.52 g de Na₂HPO₄ y 1.5 g de KH₂PO₄ aforar a 500 mL y agregar 31.95 g de KCl

☛ pH 5

Pesar 200 g de NaH₂PO₄ y 6.0 g de NaOH y aforar a 500 mL, agregar 11.184 g de KCl

☛ pH 6

Pesar 0.88 g de Na₂HPO₄ y 1.215 g de NaH₂PO₄ y aforar a 500 mL, agregar 32.619 g de KCl

☛ pH 7

Pesar 4.54 mg de KH₂PO₄ y llevar a 500 mL. Pesar 11.9 g de Na₂HPO₄ y llevar a 500 mL. Tomar 194.5 mL de la solución anterior de KH₂PO₄ y

agregar 305.5 mL de la solución anterior de Na_2HPO_4 y aforar a 500 mL,
agregar 30.288 g de KCl

☛ **pH 8**

Pesar 1.46 g de KH_2PO_4 y llevar a 50 mL, agregar 46.8 mL de NaOH 0.2
M y llevar a 500 mL, agregar 25.312 g de KCl

Preparación de soluciones salinas

· Soluciones de KCl

KCl P.M. 74.557 g/mol

Molaridad moles/L	KCl gramos	Aforo ml H ₂ O
0.15	1.12	100
0.3	2.24	100
0.45	3.35	100
0.6	4.47	100
0.75	5.59	100

Preparación de soluciones de desoxicolato de sodio

P.M. 414.57 g/mol

Se preparó una solución 0.01N de la cual se realizaron diluciones:

Concentración mM	Alicuota	Aforo mL H ₂ O
0.5	1.5	30
1.0	3	30
1.5	4.5	30
3.0	9	30
4.5	13.5	30