



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

“EFECTO DE LOS COMPUESTOS LQM 319 Y 328 CON POSIBLE ACTIVIDAD
ANTIHIPERTENSIVA, SOBRE LA CINÉTICA ENZIMÁTICA “IN VITRO” DE LA
ENZIMA CONVERTIDORA DE ANGIOTENSINA, ESTUDIADO EN UN
MICROARREGLO POR ELECTROFORESIS CAPILAR.”

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
P R E S E N T A :
JAZMÍN ÁLVAREZ FLORES

ASESORES:

Dr. VICTOR HUGO ABREGO REYES.

M.en C. VICTOR HUGO VÁZQUEZ VALADEZ.



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.



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
 UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
 DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO
 DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLÁN
 PRESENTE



ATN: L.A. ARACELI HERRERA HERNÁNDEZ
 Jefa del Departamento de Exámenes
 Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el Art. 28 del Reglamento de Exámenes Profesionales nos permitimos comunicar a usted que revisamos la: TESIS
Efecto de los compuestos LQM319 y 328 con posible actividad antihipertensiva, sobre la cinética enzimática "in Vitro" de la Enzima Convertidora de Angiotensina, estudiado en un microarreglo por electroforesis capilar

Que presenta la pasante: Jazmín Álvarez Flores

Con número de cuenta: 30301110-1 para obtener el Título de: Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 04 de Mayo de 2012.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Luisa Martínez Aguilar	
VOCAL	M. en D. Ma. Esther Revuelta Miranda	
SECRETARIO	Dr. Víctor Hugo Ábrego Reyes	
1er SUPLENTE	QFB. Elia Granados Enriquez	
2do SUPLENTE	Dra. Elizabeth Piñón Segundo	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 120).
 HHA/pm

Todos los viajes por muy largos que sean comienzan por el primer paso.
Proverbio Chino

Agradecimientos.

“Toda la vida tengo la misma dificultad que antes en expresarme clara y concisamente.”

Charles Darwin

*Primero que nada quiero agradecer a mi alma máter la **Universidad Nacional Autónoma de México**, quien me acogió en su seno hace ya una década y me alimento con todo lo que se, y me mostro todo lo que me falta aprender.*

*También quiero “gritar” que estoy orgullosa de pertenecer a la **Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán** y a la generación 2007-2011 (Gen 34) de la carrera de **QFB**.*

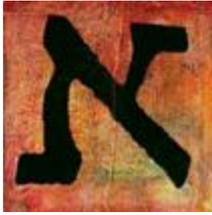
*Quiero agradecer al **Laboratorio de Química Medicinal**; al Dr. Enrique Ángeles Anguiano al Dr. Victor Hugo Abrego Reyes y al M. en C. Victor Hugo Vázquez Valadez por todo su apoyo.*

Debo confesar que cuando comencé a escribir mi tesis sentía que lo que tenía frente a mí era una tarea titánica y que no podría terminarla, pero descubrí que no estaba sola...

He aprendido a través de éste proyecto que aunque las dificultades parezcan infinitas, puedo contar con el apoyo de todos mis profesores de la universidad quienes siempre gentilmente me tendieron la mano para explicarme de forma paciente. En recuerdo a ésta valiosa acción para mí, quiero ofrecerles mi tesis como agradecimiento.

Ellos encendieron en mí la pasión por aprender, aunque como el fuego mismo ésta se ha propagado por si sola.

Es para mi importante agradecer también a los miembros del jurado por sus valiosas aportaciones.



Dedicatorias.

Ich widme meine Thesis für Gott, meiner Familie und mich.

Quiero aprovechar ésta oportunidad de expresar lo que siento hacia las personas que más quiero y dedicarle mi tesis a los seres más valiosos que existen para mí en el mundo: mis padres y mis hermanos. Les ofrezco infinitas gracias por ser parte de mi vida...

A mi mami Amada Flores Renovato, quien es la mujer más inteligente, valiente y sabia que yo conozco, gracias a ti por acompañarme en todo el trayecto de mi vida, por enseñarme a tener entereza, por enseñarme a fijarme metas y a cumplirlas y apoyarme en todo momento, así como me haz acompañado en todos los desvelos y me haz asegurado firmemente que no hay algo que yo no sea capaz de hacer, toma mis triunfos como tuyos.

A mi papá (J. Jesús Álvarez Cervantes) quiero dedicarte mi tesis por que eres una persona muy valiosa para mí, me haz acompañado en todos los momentos de mi vida, siempre me haz apoyado y haz sido un ejemplo firme de superación a lo que pudiera verse como adversidad, y me haz enseñado a no tener miedo de los retos. ¡Te quiero mucho papá!

Quiero dedicarle también mi tesis a mis hermanos: Azucena, Frederick y Ramiro quienes en todo momento han sido un ejemplo a seguir a veces marcándome el trayecto, enseñándome a tomar decisiones, apoyándome cuando siento que algo es muy difícil y estando siempre conmigo como un equipo incondicional. Los quiero mucho hermanos y gracias por llenar de luz mi vida con su presencia.

También quiero dedicar éste proyecto a Jazmín Álvarez Flores por todas las noches de desvelo en las que me acompañó, por ser paciente y tenaz ante los retos, por estudiar tanto y dejar pendientes algunos privilegios de la vida para terminar con su carrera universitaria.

Y finalmente aunque no por ello menos importante quiero dedicar éste proyecto a mis amigos de la universidad como un gesto de cariño por estar presentes en mí vida.

Juan, Carolina, Samuel, Saray, Ángel, Guadalupe, Isabel, Omar, Jey, Adrián, Daniel, Jazmín, Leticia, Julio, Iván, Luisa, Rodolfo, Jannine, Citlalli, Perla, Claudia, Daniela, Mariana, Yesenia, Cristhian, Bianca, Toño, José Oscar, Marijose, Mónica, Miguel, Angie, Gina, Miriam y todos todos todos los demás.

¡¡Los Quiero mucho, y los aprecio más!!...

Índice General.

Índice general.

página

Índice de tablas e imágenes	VI
Índice de abreviaturas	X
Introducción	1
1. Marco teórico	6
1.1 Desarrollo del método analítico, para la determinación de la cuantificación de ácido hipúrico (AH), como producto de la reacción enzimática (ECA-HHL).	7
1.1.1 Desarrollo del método analítico.	7
1.1.2 Evaluación del desempeño del método analítico empleando la quimiometría como herramienta.	9
1.1.2.1 Evaluación del desempeño del método.	9
1.1.2.2 Quimiometría empleada como herramienta de análisis.	9
1.2 Electroforesis capilar aplicada para la determinación de ácido hipúrico.	10
1.2.1 Concepto de Electroforesis Capilar.	10
1.2.1.1 Equipo de electroforesis capilar.	11
1.2.1.2 Proceso de separación electroforético.	12
1.2.1.3 Componentes de la Electroforesis Capilar.	13
1.2.1.3.1 Buffer o electrolito soporte.	13
1.2.1.3.2 El capilar.	13
1.2.1.3.3 El flujo electroosmótico.	13
1.2.1.3.4 Ventajas del empleo de la electroforesis capilar.	14
1.2.2 Técnica de microanálisis regulado electroforéticamente.	15
1.3 Estudio de la cinética enzimática para la determinación de la inhibición de la ECA.	15
1.3.1 Propiedades de las enzimas como catalizadores.	16
1.3.2 Especificidad de las enzimas.	17

	página
1.3.3 Cinética básica de las enzimas.	17
1.3.4 Bases de la catálisis enzimática.	18
1.3.5 Cinética de reacciones con un sustrato.	19
1.3.5.1 La ecuación de Michaelis-Menten.	20
1.3.5.2 Representación de los datos cinéticos.	21
1.3.6 Acción de Efectores sobre la actividad enzimática.	22
1.3.6.1 Inhibición competitiva.	23
1.3.6.2 Inhibición incompetitiva.	24
1.3.6.3 Inhibición no competitiva.	25
1.4 La hipertensión arterial.	26
1.4.1 La presión arterial.	28
1.4.2 El sistema global de regulación de la presión arterial.	29
1.4.3 Mecanismos regulatorios de la presión arterial.	29
1.4.4 Mecanismos hormonales para control rápido de la presión arterial.	31
1.4.5 La meta Terapéutica Antihipertensiva.	34
1.4.5.1 Los fármacos hipotensores-antihipertensivos.	35
1.4.5.2 Angiotensina e inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ECA).	37
1.4.5.3 Inhibidores de la ECA.	39
1.4.5.3.1 Mecanismo de la ECA y su sitio de acción.	40
1.4.5.3.2 El captopril.	40
1.4.5.3.3 Compuestos LQM 319 y 328.	41
2. Objetivos.	42
2.1 Objetivo general.	43
2.2 Objetivos particulares.	43
3. Hipótesis.	44
4. Material y métodos.	46

	página
4.1 Material.	47
4.1.1 Curva de calibración.	47
4.1.2 Cinética enzimática.	47
4.1.3 Inhibición de la ECA por el captopril y los LQM319 y LQM328.	48
4.1.4 Equipos.	48
4.1.5 Reactivos	48
4.2 Metodología.	50
4.2.1 Métodos.	51
4.2.2 Descripción del método empleado para el desarrollo de la curva de calibración y la evaluación de la misma.	51
4.2.3 Descripción del método empleado para la determinación de la cinética enzimática.	52
4.2.4 Descripción del método empleado para la determinación del efecto del captopril y de los LQM319, LQM328.	52
4.2.4.1 Reacción At-inlet.	53
5. Resultados Experimentales.	55
5.1 Resultados experimentales y discusión.	56
5.1.1 Resumen de los resultados experimentales.	56
5.2 Curvas de calibración.	57
5.2.1 Linealidad del sistema.	59
5.2.2 Precisión.	64
5.2.3 Exactitud.	67
5.2.4 Repetitividad entre días.	69
5.3 Cinética de la ECA con el HHL.	71
5.3.1 Resultados experimentales de la cinética de la ECA con el HHL determinados a partir de la producción de ác. hipúrico.	72
5.3.2 Análisis del segmento de orden 1 de reacción enzimática de la ECA con el HHL.	73
5.3.3 Análisis de la relación de la concentración de ác. hipúrico producido en la reacción enzimática de la ECA.	74

	página
5.3.4 Determinación de los parámetros cinéticos mediante la ecuación de lineweber &Burk.	76
5.4 Determinación de la inhibición de la ECA por los compuestos captopril, LQM319 y LQM328.	77
5.4.1 Determinación del % de inhibición de la producción de ác. hipúrico en la reacción enzimática en presencia de diferentes concentraciones de captopril.	78
5.4.2 Determinación de la cantidad de ác. hipúrico producido en la reacción enzimática en presencia de diferentes concentraciones de captopril.	80
5.4.3 Determinación del porcentaje de inhibición (% de inhibición) de la producción de ác. hipúrico en la reacción enzimática en presencia de los compuestos LQM319 y LQM328 usando como referencia una concentración de captopril de [25.5]mM.	81
6. Conclusiones.	84
7. Perspectivas.	86
8. Referencias.	88
9. Anexos.	93

Índice de tablas e imágenes.

Índice de imágenes y tablas.

	página
Imagen 1. Esquema general de la experimentación.	8
Imagen 2. Sistema general del equipo de EC.	11
Imagen 3. Proceso de separación electroforética.	12
Imagen 4. Rapidez inicial de la reacción en función de la concentración del sustrato.	21
Imagen 5. Inhibición competitiva.	23
Imagen 6. Inhibición incompetitiva a incompetitiva.	25
Imagen 7. Inhibición no competitiva.	25
Imagen 8. Esquema del estudio del control inefectivo de la hipertensión en la población.	27
Imagen 9. Esquema del estudio de las enfermedades causadas por la hipertensión.	28
Imagen 10. Sistema Barorreceptor.	30
Imagen 11. Sistema renina-angiotensina.	33
Tabla a. Clasificación farmacológica de los antihipertensivos.	35
Imagen 12. Estructura de la proteína de la ECA.	38
Imagen 13. Estructura de la proteína de la ECA.	39
Imagen 14. Estructura del Captopril.	41
Imagen 15. Estructuras de los compuestos LQM 319 y 328.	41
Tabla b. Modificaciones hechas para el desarrollo de las condiciones finales.	52
Imagen 16. Esquema de los diferentes tipos de inyección.	54
Tabla 1. Resultados generales.	57
Tabla 2. Resultados de las estadísticas de regresión para la determinación de la linealidad del sistema	60
Tabla 3. Tabla del análisis de varianza para la determinación de la linealidad del sistema.	60

	Página
Tabla 4. Resultados de las estadísticas de regresión para la determinación de la linealidad del sistema.	62
Tabla 5. Tabla del análisis de varianza para la determinación de la linealidad del sistema.	62
Tabla 6. Resultados de las estadísticas de regresión para la determinación de la linealidad del sistema.	64
Tabla 7. Tabla del análisis de varianza para la determinación de la linealidad del sistema.	64
Tabla 8. Tabla para la determinación de la precisión mediante intervalos de confianza.	65
Tabla 9. Tabla para la determinación de la precisión mediante intervalos de confianza y análisis de varianza.	66
Tabla 10. Tabla para la determinación de la precisión mediante intervalos de confianza y análisis de varianza.	66
Tabla 11. Tabla para la determinación de la precisión mediante intervalos de confianza y análisis de varianza.	68
Tabla 12. Resumen del análisis de varianza de un solo factor.	68
Tabla 13. Análisis de varianza.	69
Tabla 14. Determinación de la repetitividad entre días.	69
Tabla 15. Resumen del análisis de la repetitividad entre días.	71
Tabla 16. Análisis de varianza, resumen del análisis de la repetitividad entre días.	71
Tabla 17. Área obtenida de HA en función del tiempo en la cinética de la ECA en presencia de HHL sin presencia de inhibidor.	72
Tabla 18. Cinética enzimática. Valor promedio de las áreas en función del tiempo.	73
Tabla 19. Concentración de HA como producto de la reacción enzimática entre la ECA y el HHL determina mediante la ecuación de la curva de calibración 1.	75
Tabla 20. Parámetros para la elaboración de un gráfico de Lineweaver & Burk.	76
Tabla 21. Parámetros obtenidos de la cinética enzimática.	77

	página
Tabla 22. % de inhibición de la producción de HA en función de la concentración de captopril.	79
Tabla 23. Producción de HA en función de la concentración de captopril.*	80
Tabla 24. Porcentaje de inhibición de los compuestos: captopril, LQM319 y LQM328 a una concentración [25.5]nM frente a la ECA.	82

Índice de Abreviaturas.

Índice de Abreviaturas.

HT	Hipertensión arterial
EC	Electroforesis Capilar
ECA	Enzima Convertidora de Angiotensina
EMMA	Microanálisis Regulado Electroforéticamente.
LQM	Laboratorio de Química Medicinal.
HPLC	Cromatografía Líquida de alta resolución.
ECV	Enfermedades Cardiovasculares.
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México.
ECZ	Electroforesis Capilar de Zona.
pH	Potencial de Hidrógeno
uv	Ultravioleta
C	Concentración molar de analito
Z	Carga del analito
I	Intensidad de corriente
E	Voltaje en voltios
R	Resistencia en ohmios
FEO	Flojo electroosmótico
V	Velocidad el analito
μ	Movilidad electroforética
E	Campo eléctrico
q	Carga del analito
η	Viscosidad del analito.
r	Radio molecular
I	Longitud efectiva del capilar al detector
L	Longitud total del capilar
t	Tiempo de migración
P	Producto de reacción
S	Sustrato de la reacción enzimática.
ES	Complejo enzima-sustrato
k	Constante cinética de reacción
km	Constante de Michaelis-Menten
V _{máx}	Velocidad máxima de reacción
CNS	Sistema nervioso central
Ang II	Angiotensina II
ECV	Enfermedades Cardiovasculares
DIU	Diuréticos tiazidicos
BBL	Beta bloqueadores
CCA	Calcio antagonistas
IECA	Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina
ARAII	Antagonistas Receptores de la Angiotensina II.
HAD	Hormona antidiurética
RAS	Sistema Renina-Angiotensina
X	Valor promedio
S	Desviación estándar
CV	Coefficiente de variación
r ²	Coefficiente de determinación
r	Coefficiente de correlación
Y _i	Residuos

α	Nivel de significancia
μM	Micromolar
HA	Ácido hipúrico
T	Temperatura
ICH	Consejo Internacional de armonización.

Introducción.

Introducción.

La hipertensión (HT) es un fenómeno que genera un incremento en la tensión sobre la pared de los vasos sanguíneos frente a la cual éstos responden aumentando su grosor, lo cual repercute negativamente sobre la circulación de la sangre; (Martínez, 2003) ésta ha sido denominada como asesino silencioso, porque ocasiona daños considerables a vasos sanguíneos, corazón, encéfalo y riñones, antes de que se produzca dolor u otros síntomas apreciables (Tortora, 2005).

La HT se ha incrementado de forma importante, y se ha convertido en un problema de salud pública (Morales-Suárez-Varela M. M.-E., 2010).

El desarrollo y la investigación en el área farmacéutica, es de trascendental importancia por su especial valor social, en el que intervienen numerosos profesionistas, así como instituciones de investigación, hospitales, empresas y organizaciones gubernamentales. En México y el mundo las enfermedades cardiovasculares son una de las principales causas de fallecimientos que contribuye a la mortalidad por la hipertensión arterial.

La hipertensión arterial (HA) es una de las enfermedades crónicas que afecta a más del 30% de la población mundial y su presencia se reconoce como factor de riesgo de enfermedades cardiovasculares (ECV). (Mendoza, 2008)

El estudio de la hipertensión arterial como problema de salud, ha existido desde hace ya varias décadas, éste interés está relacionado con los datos derivados de estudios epidemiológicos, de prevalencia que indican que una de las enfermedades de más elevada incidencia dentro de la población, incluso en personas jóvenes es la hipertensión arterial. (Canino de Lambertini, 1997) La hipertensión arterial como tal hay que caracterizarla como una patología que crea un problema sanitario de masas. (Hergueta, 2002)

Por lo tanto, el interés por la investigación de los inhibidores de la ECA se ha incrementado en los últimos años. (Bonesi, 2010) La UNAM a través del Laboratorio de Química Medicinal dirigido por el Dr. Enrique R. Angeles Anguiano contribuye con éste estudio al avance de la salud.

El inicio de ésta línea de investigación surge entre 1983 y 1985 Stout y sus colaboradores estudiaron las propiedades antiarrítmicas de la changrolina, encontrando que la estructura de un 2,6-bis(pirrolidín-1-il-metil)fenol tetrasustituido presentó la mejor actividad antiarrítmica. En 1991 Glówka y colaboradores confirman lo establecido anteriormente. (Velázquez Sánchez , 2007)

En la Facultad de estudios Superiores Cuautitlán en el Laboratorio de Química Medicinal (LQM) se propuso sustituir los grupos pirrolidínicos por otros heterociclos como morfolina, tiomorfolina y piperidina, encontrando que la serie de entrenamiento iniciada con siete compuestos, por la Dra. Luisa Martínez, tenía propiedades no solo antiarrítmicas, sino antihipertensivas en el modelo de rata anestesiada, lo cual confirmó lo que inició Stout en 1985 al incluir también piperidina y morfolina en la estructura de las moléculas estudiadas. (Velázquez Sánchez , 2007) Algunos de los compuestos sintetizados fueron los LQM319 y LQM328 metiltiomorfolinfenólicos derivados del fenol, tiomorfolina y formaldehído, para medir su efecto antihipertensivo (Velazquez, 2008) y hacer una comparación de su actividad con el captopril, sobre la ECA, determinada mediante electroforesis capilar (EC) como ya se ha mencionado.

Desde siempre los científicos que trabajan con material biológico han tenido la necesidad de separar y examinar las propiedades de moléculas con peso molecular alto, una de las técnicas de separación más utilizadas en la actualidad es la EC, su mayor área de impacto está vinculada con el análisis de biomoléculas (Castillo, 2005).

Las enzimas como la Enzima Convertidora de Angiotensina (ECA) son polímeros biológicos que catalizan las reacciones químicas que hacen que la vida sea posible, algunos desequilibrios en la actividad enzimática se atienden mediante agentes farmacológicos que inhiben enzimas específicas, el sistema renin-angiotensina participa en la regulación de la presión arterial (Harper, 2007). Por lo que en el presente trabajo se determinará la inhibición de la ECA en presencia de los compuestos LQM319 y LQM328 mediante una técnica de EC conocida como microanálisis regulado electroforéticamente (EMMA, por sus siglas en inglés: *electrophoretically mediated microanalysis*), que ha sido exitosamente aplicada para reacciones enzimáticas en línea.

EMMA, es decir el método analítico empleado utiliza las diferentes movilidades electroforéticas, de la enzima, el sustrato y el producto, para iniciar la reacción dentro

del capilar y separar cada uno de los componentes para la cuantificación final (Van Dyck, 2003).

En la literatura se reportan diferentes métodos cromatográficos para la determinación del ácido hipúrico como producto de la reacción enzimática de la ECA con el sustrato Hippuryl-L-histidyl-Lleucina (HL) (Mehanna, 1999). También se han desarrollado muchos métodos para ensayos espectrofotométricos y se han hecho algunos ensayos para HPLC, pero se ha observado mediante éstos, que el ácido hipúrico no puede ser completamente separado de la reacción enzimática, (Van Dyck, 2003).

La técnica de electroforesis capilar (EC) fue elegida entre otras técnicas como el HPLC y la espectrofotometría por presentar algunas ventajas como el que los tiempos de análisis sean cortos en comparación con otras técnicas, que los picos presenten buenas resoluciones, el gasto de disolventes, aditivos y demás reactivos sea mínimo, por lo que la cantidad de muestra va de nL a μL y el valor de las columnas cromatográficas por ejemplo es mucho mayor que el de un capilar; además de que los costos de éstos análisis son bajos y los daños al ambiente sean casi nulos ya que no hay generación de reactivos tóxicos.

La determinación de la actividad de la ECA representa un parámetro útil en el estudio de diferentes patologías de la salud, como la hipertensión; la ECA o dipeptidyl-dipeptidasa (Sentandreu, 2006), es una dipeptidil carboxilasa relativamente no selectiva, que acepta varios sustratos (Nováková, 2003).

El sustrato empleado en el presente estudio fue hipuril-histidil-leucina (HHL), el cual también es conocido como N-Benzoyl-Gli-His-Leu, éste es un sustrato sintetizado por la empresa Sigma-Aldrich Química, S.A. de C.V. es un tripéptido que es transformado por la ECA en histidil leucina y ácido hipúrico.



La actividad de la ECA fue determinada por el producto de reacción ácido hipúrico AH a una λ 230 nm; de acuerdo con los datos del proveedor (Sigma-Aldrich Química, S.A. de C.V.) bajo las siguientes condiciones impuestas, 1u ECA produce 1.0 μmol de AH del HHL por min en 50 mM de HEPES y 300 mM NaCl a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

El inhibidor de la ECA empleado fue el captopril, que es un antihipertensivo y cuyo mecanismo “*in vivo*” es inhibir a la ECA impidiendo que se forme AII y que por lo tanto haya una disminución de la presión arterial, en el presente estudio el captopril inhibiría a la ECA impidiendo que se lleve a cabo la reacción enzimática para la producción de HA. Actualmente el efecto de los compuestos LQM300's ha mostrado efectos hipotensores antihipertensivos y vasodilatadores por lo que se espera que éstos tengan un efecto parecido al del captopril.

La técnica empleada para la determinación de la actividad de la ECA en presencia de los LQM319, LQM328 y el captopril, fue la electroforesis capilar. La electroforesis es la migración de iones presentes en una disolución por influencia de su campo eléctrico, bajo una relación carga/masa (Harris, 2002). La EC es una herramienta analítica, y una técnica poderosa que es ampliamente utilizada en la actualidad, presenta una gran resolución en las separaciones, tiene tiempos de análisis cortos y utiliza cargas de concentraciones muy pequeñas.

Una característica propia de la EC es el hecho de que puede desarrollarse en soluciones libres, esto implica que en el capilar la herramienta de separación también puede ser usada como un pequeño recipiente de reacción, de ésta forma los diferentes pasos del ensayo (reacción, separación y cuantificación) pueden ser combinados en un ensayo automatizado, a microescala (Van Dyck, 2003).

La finalidad de éste proyecto es contribuir en la investigación y el desarrollo de nuevos fármacos antihipertensivos; en el mercado ya existen diferentes medicamentos con diversos mecanismos de acción que son eficientes para reducir la presión sanguínea como los inhibidores de la ECA que bloquean la formación de angiotensina II y con ello promuevan la vasodilatación e inhibición de la liberación de la aldosterona (Tortora, 2005). Sin embargo muchos de éstos fármacos ya existentes pueden presentar reacciones adversas desfavorables (Velazquez, 2008), es por ello que en el Laboratorio de química medicinal se trabaja arduamente en el desarrollo de compuestos que pudieran tener una acción terapéutica antihipertensiva.

1. Marco teórico.

1.1 Desarrollo del método analítico, para la determinación de la cuantificación de ácido hipúrico (AH), como producto de la reacción enzimática (ECA-HHL).

1.1.1 Desarrollo del método analítico.

La primera fase experimental de la investigación consistió en el desarrollo de un método analítico que fuera capaz de cuantificar al ácido hipúrico (AH), que es el producto de la reacción enzimática de la ECA con el HHL:



De acuerdo con la “*Guía para la industria de la validación de métodos bioanalíticos*” un método es la descripción exhaustiva de los procedimientos usados en el análisis de una muestra. (U.S. Department of Health and Human Services; Food and Drug Administration; Center for Drug Evaluation and Research (CDER); Center for Veterinary Medicine (CVM); , 2001)

Un químico analítico debe escoger o desarrollar estos procedimientos para realizar una medición cuantitativa o cualitativa de un analito en cuestión, en éste caso el analito es el ác. hipúrico.

Para el desarrollo de dicho método se hizo una revisión de la literatura, en la que se encontró que Sigrid Van Dick había realizado investigaciones previas en las que se empleaba la enzima convertidora de angiotensina (ECA) en presencia de inhibidores como el captopril, el lisinopril y el perindoprilat entre otros; en sus artículos ellos describen las condiciones empleadas en sus investigaciones, así como los resultados que obtuvieron. (Van Dyck, 2003) De ésta literatura fueron tomadas las condiciones iniciales para los análisis exploratorios, y con base en los resultados obtenidos de estos análisis el método se fue adecuando y fue aplicado a los compuestos del Laboratorio de Química Medicinal.

En el desarrollo de éste método analítico se debieron tomar en cuenta todas las condiciones de análisis que afectaban la respuesta analítica para así obtener una respuesta confiable, para ello se procedieron a hacer múltiples análisis exploratorios en los que se variaron las condiciones experimentales. Estas variaciones incluyeron la preparación de la muestra, la temperatura de conservación de los analitos, la concentración de NaCl en el buffer, la concentración de los buffers de corrida y de muestra, el largo del capilar, el lavado del capilar el tiempo de inyección y el voltaje.

El buffer empleado en el presente trabajo de investigación fue el HEPES (*Ácido [N-2-hidroxiethylpiperazina-N'-2-etanosulfónico]*) el cual presenta un $pK_a = 7.55$ y por lo tanto tiene un intervalo de amortiguación de aproximadamente entre 6.5-8.5

El desarrollo del método consistió en cuatro fases generales:

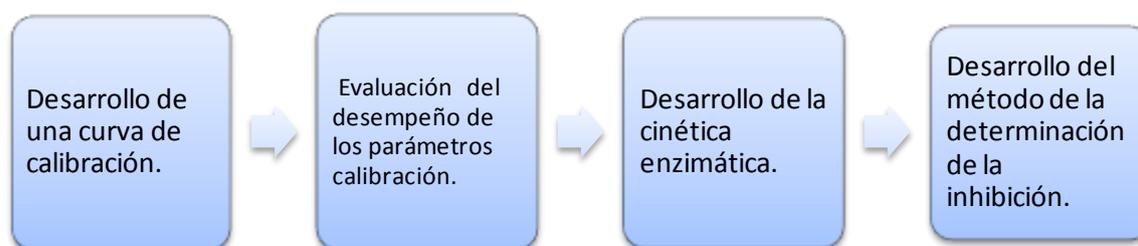


Imagen 1. Esquema general de la experimentación.

En cada una de las fases se obtuvieron resultados; de los cuales se seleccionaron los óptimos, que arrojaban la mayor respuesta analítica. El área obtenida en los electroferogramas que correspondía a una determinada concentración de ácido hipúrico era dicha respuesta analítica, y por ende lo que se pretendía en cada fase de la experimentación, era obtener la mayor área posible de ác. Hipúrico que perteneciera al intervalo de la curva de calibración.

Una vez que fueron fijadas las condiciones de análisis se procedió a hacer una serie de repeticiones experimentales o “ensayos” con el fin de obtener evidencia estadística de la reproducibilidad de los resultados experimentales.

1.1.2 Evaluación del desempeño del método analítico empleando la quimiometría como herramienta.

1.1.2.1 Evaluación del desempeño del método.

Durante el desarrollo del método se obtuvieron una gran cantidad de resultados que debieron ser analizados mediante un análisis estadístico.

Las medidas experimentales conllevan cierta variabilidad, de modo que no se puede sacar ninguna conclusión con certeza. La estadística proporciona los medios para aceptar conclusiones que tienen una alta probabilidad de ser correctas y de rechazar las conclusiones que no lo son. (Harris, 2002)

Para verificar el desempeño de un método analítico existen diferentes guías de validación de los métodos analíticos que pueden ser aplicadas a ya sea a la industria o a la investigación. Los parámetros aceptados dependerán de diversos factores como son el instrumento empleado, la aplicación que se le dará al método, y de la fase de desarrollo del método.

1.1.2.2 Quimiometría empleada como herramienta de análisis.

Una vez que el método analítico para la determinación de ácido hipúrico fue desarrollado se emplearon como ya se mencionó, técnicas estadísticas para el análisis de los resultados experimentales y la extracción de información de dichos resultados. Para ésta fase se empleó la quimiometría.

La quimiometría es una disciplina metrológica, que aplica conocimientos matemáticos especialmente estadísticos, a procesos químicos, para extraer de los datos experimentales la mayor cantidad posible de información y extender el conocimiento del sistema químico. Además para que éste conocimiento sea óptimo se deberá discriminar entre la información relevante y aquella que es de menos interés. (Mongay Fernandez, 2005)

1.2 Electroforesis capilar aplicada para la determinación de ácido hipúrico.

En la literatura se reportan estudios previos de la cinética de la ECA en presencia del HHL por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Mehana S. & Dowling, 1999), en dichos estudios se hace énfasis en la dificultad de la cuantificación del ácido hipúrico, ya que éste no puede ser completamente separado del sustrato mediante una extracción con solvente correspondiente a la técnica de HPLC. Además la mayoría de estos métodos consumían una cantidad relativamente alta de los reactivos de enzima y sustrato.

De la misma forma se reportan estudios realizados por electroforesis Capilar de Zona (ECZ) (Van Dyck, 2003), de acuerdo con la literatura ésta técnica presentaba ventajas sobre el HPLC como el que el ácido hipúrico pudiera ser separado del sustrato y que el consumo de enzima y de sustrato fuera en menor cantidad; esto último como consecuencia de que la reacción enzimática podía llevarse a cabo en línea dentro del capilar antes de que se llevara a cabo la separación electroforética de la reacción enzimática. Se eligió la técnica de EC, la cual brinda resultados reproducibles, y menores costos de reactivos.

A continuación se describirán algunos conceptos básicos para la comprensión de los fundamentos de ésta técnica analítica.

1.2.1 Concepto de Electroforesis Capilar.

Una de las técnicas de separación más utilizadas en la actualidad es la Electroforesis Capilar (EC). Su mayor área de impacto está vinculada con el análisis de biomoléculas, apoyando así a un sin número de áreas y permitiendo resolver gran variedad de problemas analíticos. (Castillo, 2005) El empleo de capilares para la separación de sustancias neutras o iones cargados eléctricamente, apareció en 1967, más adelante en 1980 se emplearon técnicas más avanzadas en la obtención de capilares de sílica fundida así es como fue el lanzamiento de la EC. (Castagnino, 2000)

El término de electroforesis es empleado para describir la migración de compuestos cargados bajo la influencia de un campo eléctrico y de un pH establecido por una solución buffer. Al emplear ésta técnica uno de los objetivos es no dañar o

modificar de manera significativa las propiedades de las moléculas, con ello se contribuye a mejorar el equipo y el desarrollo de las técnicas experimentales.

1.2.1.1 Equipo de electroforesis capilar.

Las partes básicas de dicho sistema son un par de electrodos, una fuente de poder y un medio conductor.

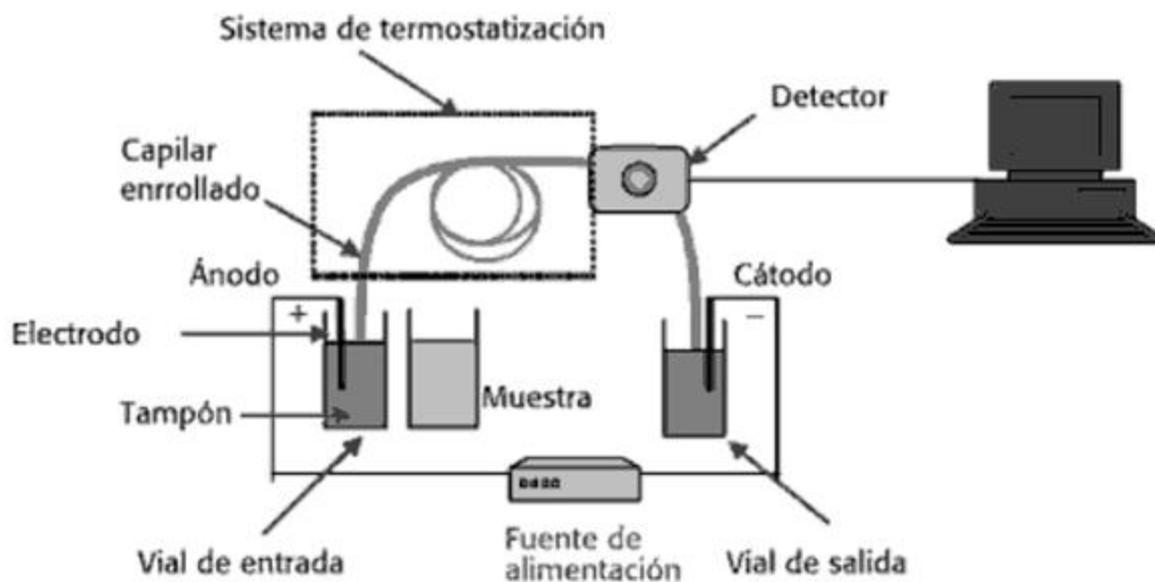


Imagen 2. Sistema general del equipo de EC. (Sierra Alonso, Pérez Quintanilla, Gomez Ruiz, & Morante Zarcero, 2010)

Como se puede observar en la **imagen 1** un sistema de EC consiste básicamente en las siguientes partes básicas:

- Dos electrodos (ánodo y cátodo)
- Fuente de poder.
- Depósito (viales) donde se colocan los electrodos y el electrolito soporte respectivamente.
- Capilar (compartimiento donde se lleva a cabo la separación)

- Un sistema de enfriamiento del capilar (típicamente en la forma de convección de aire forzado o de líquido)
- Un sistema que introduce la muestra.
- Un detector.

1.2.1.2 Proceso de separación electroforético.

El proceso electroforético es el fenómeno que se lleva a cabo cuando las especies cargadas (iones) se separan y migran bajo la influencia de un campo eléctrico. La separación se dará en función de una relación carga masa como se puede observar en la siguiente imagen.

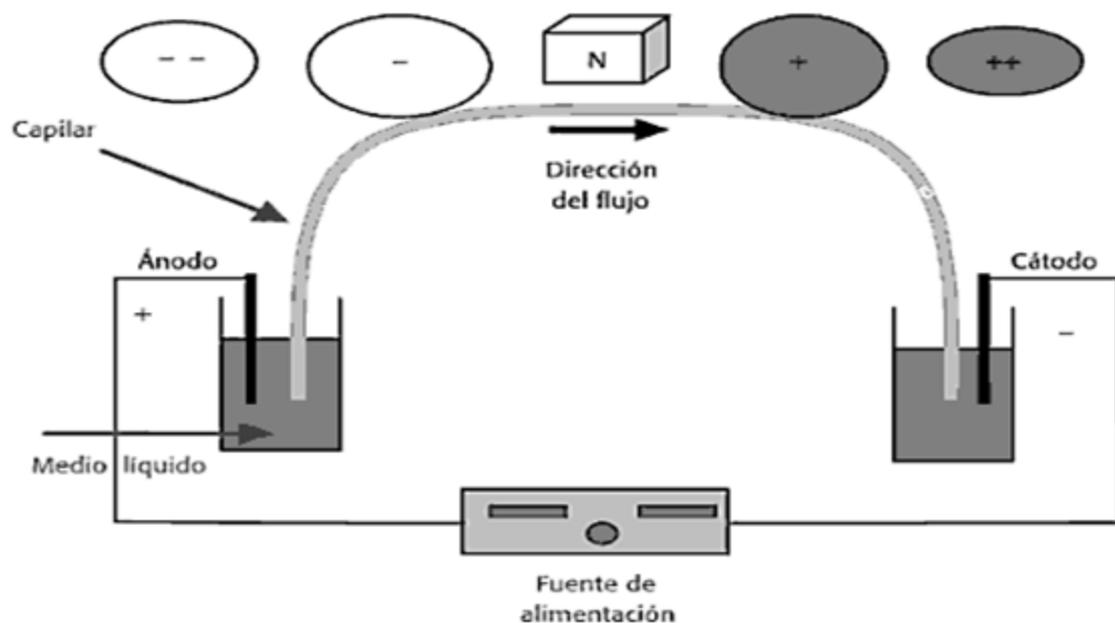


Imagen 3. Proceso de separación electroforética. (Sierra Alonso, Pérez Quintanilla, Gomez Ruiz, & Morante Zarcero, 2010)

Como se puede observar en la **Imagen 2** todas las moléculas que sean ionizables como los aminoácidos, los péptidos, las proteínas y los ácidos nucleicos se presentan con carga eléctrica cuando están en disolución bajo el efecto de un pH definido por un buffer. La carga puede ser positiva formando cationes (+) o negativa formando aniones (-). Además se presenta otro factor que contribuye a la separación entre

moléculas que presentan la misma carga, ya que si su masa es diferente éstas se separarán diferencialmente también

1.2.1.3 Componentes de la Electroforesis Capilar.

1.2.1.3.1 Buffer o electrolito soporte.

La sensibilidad de FEO al pH requiere buffers que mantengan el pH constante. El pH determina las especies químicas predominantes de los analitos con propiedades ácido-base, por lo que afecta a la velocidad de migración de los compuestos además de proporcionar un medio conductor. Los sistemas buffers efectivos tienen un rango de aprox. 2 unidades de pH alrededor del valor del pKa. (Castagnino, 2000)

Como ya se mencionó al inicio el buffer empleado en el presente trabajo de investigación fue el HEPES (*Ácido [N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfónico]*) el cual presenta un $pK_a = 7.55$ y por lo tanto tiene un rango de amortiguación de aproximadamente entre 6.5-8.5

1.2.1.3.2 El capilar.

Puede ser de distinta naturaleza: vidrio, sílice fundida o teflón. Recientemente también de otros materiales tales como el polipropileno y el nailon han sido utilizados. Comúnmente se usan aquellos de sílice fundida porque ésta posee una excelente transparencia a la radiación ultravioleta (UV) y visible (VIS). Además son química y eléctricamente inertes y baratos (aproximadamente \$600.00 pesos/m lineal).

1.2.1.3.3 Flujo electroosmótico.

Es un constituyente fundamental de la EC es el llamado FEO. El flujo se origina por la presencia de un campo eléctrico en una solución con iones disueltos, cuando entra en contacto con un electrolito con una superficie sólida cargada.

El flujo electroosmótico puede describirse como el movimiento relativo de un líquido con respecto a una superficie cargada bajo la acción de un campo eléctrico. Éste se puede explicar mediante la teoría de la doble capa, en la cual la interfase entre un sólido y un líquido se puede formar una doble capa debido a dos fenómenos distintos. A la adsorción específica de iones de la disolución sobre la superficie sólida o bien a que la superficie sólida por su naturaleza se ioniza al estar en contacto con la disolución. (Moronte Zarcero & Sierra Alonso, 2008)

Los iones presentes en el sistema bajo la influencia del voltaje aplicado son desplazados hacia el cátodo de acuerdo a su carga y arrastran disolvente con ellos dada su solvatación, originando así el llamado flujo electroosmótico. El FEO llega a ser significativo a pH mayor de 4. Se presume que resulta de la adsorción de aniones a la superficie de la pared capilar. La magnitud del FEO varía con el pH. A valores más altos de pH hay más grupos silanol ionizados. Dependiendo de las condiciones específicas, el FEO puede variar más de un orden de magnitud entre pH 2 y 12.

Los contraiones en la mayoría de los casos cationes, se localizan cerca de la superficie para mantener el balance de carga, forman una doble capa y crean un potencial muy cerrado a la pared. Este potencial que se origina entre la pared del capilar (grupos silanol ionizados) y los contraiones del electrolito soporte es denominado potencial z. El potencial Z depende de la fuerza iónica del buffer, el incremento de la fuerza iónica comprime la doble capa, originando una disminución del potencial z y del FEO. (Castillo, 2005)

Un beneficio del FEO es provocar movimiento a todas las especies, prescindiendo de la carga, en la misma dirección. Bajo condiciones normales cuando la superficie del capilar está cargada negativamente, el flujo va del ánodo al cátodo.

1.2.1.3.4 Ventajas del empleo de la electroforesis capilar.

Esta técnica se caracteriza por su alta eficiencia de separación, su rapidez, así como el bajo consumo de reactivos y disolventes orgánicos. Estos factores son muy importantes ya que influyen sobre la productividad y el costo de los análisis. Las

diferencias variantes de la EC permiten resolver gran variedad de problemas analíticos, al hacer posible el análisis de una gran variedad de moléculas. (Castillo, 2005)

Sus principales ventajas son:

- Alta resolución.
- Alta eficiencia de separación.
- Corto tiempo de análisis.
- Pequeñas cantidades de muestra.
- Separación de varios tipos de analitos.
- Gran gama de mecanismos que proporcionan una separación selectiva.

1.2.2 Técnica de microanálisis regulado electroforéticamente.

En ésta técnica el capilar puede ser empleado como un pequeño recipiente de reacción, de ésta forma los diferentes pasos del ensayo (reacción separación y cuantificación) pueden ser combinados en un ensayo automatizado a microescala. (Van Dyck, 2003) Como ya se ha mencionado con anterioridad la EC ha sido exitosamente aplicada para las reacciones enzimáticas en línea por el microanálisis regulado electroforéticamente. (EMMA)

EMMA utiliza las diferentes movilidades electroforéticas de los analíticos, en éste caso la enzima, el sustrato y el producto, para iniciar la reacción dentro del capilar y separar a cada uno de los componentes para la cuantificación final. (Van Dyck, 2003)

1.3 Estudio de la cinética enzimática para la determinación de la inhibición de la ECA.

Una vez que fue obtenido un método para la cuantificación de ácido hipúrico, que es el producto de la reacción enzimática entre la ECA y el HHL, era conveniente

hacer una serie de análisis exploratorios en los que pudiera ser medida una concentración de ácido hipúrico que estuviera contenida en el rango de la curva de calibración. Dado que el ácido es el producto de la reacción enzimática, se siguió una cinética para monitorear su concentración.

Los análisis exploratorios serían primeramente obtener la máxima producción de ácido hipúrico en un tiempo de reacción correspondiente, posteriormente obtener la concentración a la cual se da el efecto ya conocido de inhibición por el captopril y finalmente la determinación del efecto producido por los compuestos LQM319 y LQM328 a la misma concentración de referencia empleada con el captopril.

Para la comprensión de ésta fase experimental es conveniente conocer los siguientes conceptos relacionados al estudio de los enzimas.

Las enzimas incrementan la velocidad de la reacción disminuyendo la energía de activación; la energía de unión, derivada de numerosas interacciones débiles entre la enzima y el sustrato, es la fuente del incremento de la velocidad de reacción. El equilibrio de una reacción es dependiente de la diferencia de la energía libre entre sustrato y productos; la posición del equilibrio no está influenciada por la presencia de la enzima. (Garzón , 2006)

Otra propiedad importante de las enzimas es que, a diferencia de la catálisis química, su actividad catalítica a menudo puede regularse mediante iones o moléculas pequeñas. (Scragg, 1997) En éste caso la ECA es dependiente de la presencia de NaCl en solución acuosa, y se hablará de ella con más detalle posteriormente.

1.3.1 Propiedades de las enzimas como catalizadores.

Uno de los primeros y grandes avances en bioquímica, fue el descubrimiento de que las enzimas se unen en forma transitoria a los sustratos, resultado de la investigación de la cinética enzimática. (Horton, Moran, Scrimgeour, & Perry , 2008) Una enzima es un catalizador biológico, y como todos los catalizadores, las enzimas aumentan la rapidez de una reacción química sin sufrir un cambio químico permanente

en sí mismas. Un catalizador influye en la rapidez de esta pero no afecta el equilibrio de ésta. (Scragg, 1997)

Las enzimas, sin embargo, exhiben muchas propiedades que difieren de las mostradas por los catalizadores en general. Las tres más importantes son:

1. Su alto poder catalítico.
2. Su especificidad.
3. La capacidad para regular su actividad catalítica mediante diversos compuestos de origen natural.

1.3.2 Especificidad de las enzimas.

Aunque los enzimas están formados por grupos químicos prostéticos que se comportan de una forma natural, la catálisis por enzimas difiere de la catálisis ordinaria en importantes aspectos. Los grupos reactivos de los enzimas están espaciados según posiciones muy definidas, y así ésta especificidad geométrica permite un mas alto grado de control sobre el proceso catalítico que el observado por catalizadores ordinarios. (McGilvery, 1977)

De ésta misma forma se dice que la enzima está construida para reaccionar con sustratos particulares, su especificidad geométrica determina la especificidad de sustrato.

1.3.3 Cinética básica de las enzimas.

El estudio de la cinética enzimática puede producir mucha información importante, particularmente cuando se combina con otras técnicas, relacionadas con el mecanismo de acción de una enzima, la forma en que responde una enzima a cambios fisiológicos en la concentración de sustrato y como puede controlarse o regularse la actividad de una enzima bajo condiciones fisiológicas.

La velocidad de una reacción catalizada por un enzima, como cualquier otra reacción química, se puede medir por:

1. Una técnica de muestreo discontinuo. (a diferentes intervalos de tiempo, parando la reacción)
2. Una técnica de observación continúa. (espectrofotométricamente)

Sin importar el tipo de ensayo, es necesario tomar las precauciones siguientes para obtener datos confiables:

- 1) Los componentes del sistema de ensayo deben ser de la más alta pureza posible.
- 2) La preparación de la enzima debe estar libre de compuestos que inhiban o interfieran con las actividades enzimáticas.
- 3) La enzima, el sustrato(s) y el(los) producto(s), deben ser estables el tiempo que dure el ensayo.
- 4) El pH y la temperatura deben mantenerse constantes mediante el uso de soluciones amortiguadoras y termostatos, ya que estos factores afectan marcadamente la rapidez de reacción.
- 5) La rapidez de reacción medida debe ser constante durante el ensayo y debe ser proporcional a la cantidad de enzima adicionada.
- 6) Debe medirse la rapidez inicial de la reacción para evitar cambios notables en la concentración del sustrato, inhibición del producto o que se invierta la reacción.

La velocidad de la rapidez de la reacción dependerá de las condiciones de reacción, la temperatura y el pH deben mantenerse constantes, la concentración de reactivos primarios y secundarios y los cofactores deben estar en exceso para llegar a las condiciones óptimas para la acción enzimática. (Morris, 1975)

1.3.4 Bases de la catálisis enzimática.

El contenido de energía de las moléculas en una población sigue una curva de distribución. Sólo aquellas moléculas con una energía suficientemente alta tienen la posibilidad de reaccionar para formar el producto. Para hacer que la reacción proceda con mayor rapidez debe elevarse el contenido de energía de toda la población. Esto se

podría lograr al calentar la mezcla o mediante la adición de un catalizador. En efecto los catalizadores disminuyen la energía de activación de la reacción a permitir que una población mucho mayor reaccione a cualquier tiempo.

El catalizador puede lograr lo anterior al formar un complejo o compuesto intermediario inestable con el sustrato, el cual se descompone rápidamente para formar el producto, con lo que se obtiene una ruta de la reacción a través de la barrera, es decir de la energía de activación. La reacción procede con una mayor rapidez cuando ha sido disminuida la energía de activación, sin embargo como no hay diferencia en el contenido de energía relativa en las reacciones catalizadas y no catalizadas, el punto de equilibrio es el mismo. (Scragg, 1997)

1.3.5 Cinética de reacciones con un sustrato.

En éste experimento el sustrato es el HHL la enzima es la ECA y los productos de reacción serán el ácido hipúrico y histidil-leucina. La cinética enzimática simple se basa en tres principios experimentales:

- 1) Que el sustrato, S, forma un complejo intermediario enzima-sustrato, ES, con la enzima, E.
- 2) Que la rapidez de la reacción al tiempo t (es decir, la rapidez de desaparición del sustrato, $-ds/dt$, o bien la rapidez de formación del producto, dp/dt) se representa con la pendiente de la curva P o $S=f(t)$. Estas pendientes varían con el tiempo durante el curso de la reacción, debido a la desaparición del sustrato. Las mediciones cinéticas se basan generalmente en la parte lineal de la curva, es decir la velocidad inicial o la rapidez inicial de la reacción. En esta región, la concentración del producto es extremadamente pequeña y, en consecuencia, la descomposición de producto a sustrato es insignificante (determinado por la constante de rapidez, k_2) y se puede escribir:



- 3) Para una concentración dada de sustrato, la determinación de la variación en la rapidez de reacción como función de la concentración de la enzima no es lineal, sino hiperbólica. Esto se debe a que todo el sustrato está en la forma de complejo enzima-sustrato, [ES], a altas concentraciones de la enzima. En consecuencia, la rapidez inicial de la reacción como función de la concentración de la enzima permanece constante en esas condiciones. (Horton, Moran, Scrimgeour, & Perry, 2008)

Para mediciones de cinética es necesario trabajar en la región lineal de la curva a baja [E] para que la rapidez de la reacción dependa de la concentración de la enzima. También se puede decir que la concentración de la enzima debe ser muy pequeña comparada con la concentración de sustrato de tal modo que la formación del complejo enzima-sustrato [ES], tiene poco o ningún efecto sobre la concentración de sustrato. (Melo & Cuamatzi, 2006)

1.3.5.1 La ecuación de Michaelis-Menten.

Las reacciones catalizadas por enzimas exhiben cinética de saturación. A bajas concentraciones de sustrato, la velocidad de reacción es proporcional a la concentración de sustrato y la reacción es de primer orden con respecto al sustrato. A medida que la concentración de sustrato aumenta, la rapidez de la reacción disminuye y ya no es proporcional a la concentración de sustrato; la reacción es de orden mixto. A concentraciones aún más altas la rapidez de la reacción es constante e independiente de la concentración de sustrato, la reacción se vuelve de orden cero. (Scragg, 1997)

Estos factores llevaron a Michaelis y Menten en 1913, a proponer una teoría general de cinéticas enzimáticas que más tarde fue extendida por Briggs y Haldane. Esta teoría se basa en tres suposiciones principales:

- 1) Que la concentración de enzima [E] es mucho más baja que la concentración de sustrato [S], de modo que el cambio en [S] durante la reacción es insignificante.
- 2) Que la concentración del producto P es cero, lo cual significa que la cantidad de P formado durante el período de medición de la rapidez es significativo y

demasiado pequeño para que ocurra una reacción inversa- suposición de la rapidez inicial.

- 3) Que la liberación de S a partir del complejo ES es mucho más rápido que la liberación de los productos y, en consecuencia, que E y S pueden considerarse en equilibrio.



Por lo tanto:

$$k_1[E][S] = k_{-1}[ES] \text{ puesto que } k_2 \ll k_{-1}$$

$$[E] = [ES] \frac{k_{-1}}{k_1[S]}$$

Mediante algunos estudios se llegó a que la rapidez de formación de ES es:

$$ES = k_1[E][S]$$

La rapidez de descomposición de ES = $k_{-1}[ES] + k_2[ES]$

1.3.5.2 Representación de los datos cinéticos.

La cinética de una reacción característica catalizada por una enzima con un solo sustrato se muestra en la siguiente figura:

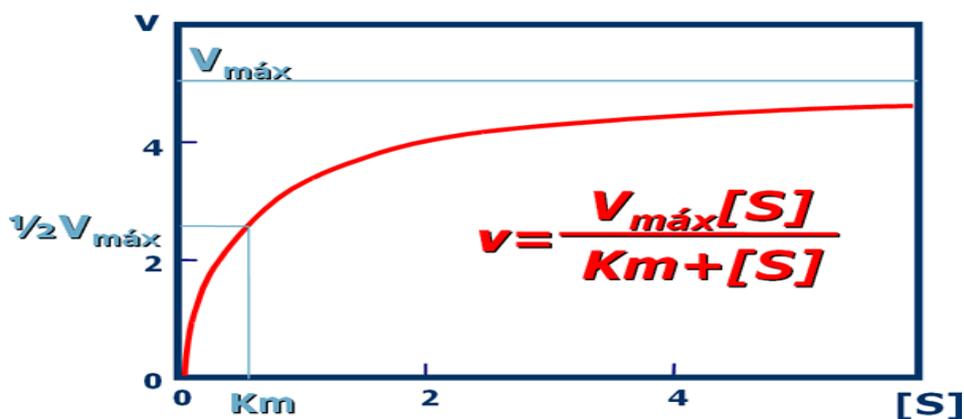


Imagen 4. Rapidez inicial de la reacción en función de la concentración del sustrato. (Universitat de les Illes Balears.)

En una curva hiperbólica es difícil determinar con precisión V_{\max} y, en consecuencia, K_m . Debido a esto se ha recurrido a muchas linealizaciones de la ecuación de Michaelis-Menten, de las cuales la más popular es la gráfica de Lineweaver-Burk, la cuál simplemente implica tomar los recíprocos de ambos lados de la expresión. (Peña, 2004)

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m + [S]}{V_{\max} [S]} = \frac{K_m}{V_{\max} [S]} + \frac{[S]}{V_{\max} [S]}$$

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{[S]}{V_{\max}}$$

Una gráfica de $1/V$ contra $1/[S]$ produce una línea recta con una pendiente, K_m/V_{\max} , una ordenada al origen. $1/V_{\max}$ y una ordenada sobre la abscisa de $-1/K_m$. Por lo tanto en dicha gráfica V_{\max} y K_m se pueden medir directamente.

Se debe tener cuidado al usar la gráfica de Lineweaver-Burk puesto que, al tomar los recíprocos de los resultados de $[S]$ en las concentraciones de sustrato menores, donde es difícil determinar V con precisión, se ejerce un gran efecto sobre la determinación de K_m y V_{\max} . Además, a concentraciones altas de sustrato, un cambio relativamente grande en $[S]$ provoca un cambio pequeño en V , haciendo difícil manejar una recta. (Scragg, 1997)

Para salvar estas dificultades, se han propuesto muchos otros métodos de linealización incluyendo la gráfica de Eadie-Hofstee y la gráfica lineal directa de Eisenthal y Cornish-Bowden.

1.3.6 Acción de Efectores sobre la actividad enzimática.

La rapidez de las reacciones catalizadas por enzimas se puede modificar en presencia de ciertos compuestos, distintos del sustrato, denominados efectores. Los efectores que se emplearán en el presente estudio son tres: el captopril, el LQM319 y el LQM328.

De forma general los efectores desempeñan una función principal en la regulación del metabolismo. Hay dos clases de efectores:

- 1) Activadores-aumentan la rapidez de reacción;
- 2) Inhibidores-disminuyen la rapidez de reacción.

La actividad de muchos enzimas puede inhibirse por la unión de moléculas pequeñas e iones. Esta forma de inhibición de la actividad enzimática constituye el principal mecanismo de control de los sistemas biológicos.

Hay tres tipos principales de inhibición enzimática:

- 1) Competitiva;
- 2) Incompetitiva;
- 3) No-competitiva.

1.3.6.1 Inhibición competitiva.

En este caso el inhibidor es una sustancia con una estructura química y espacial análoga a la del sustrato, que se une al sitio activo de la enzima inhibiendo así la unión del sustrato. (Mark Berg, Stryer, & Tymoczko, 2007)

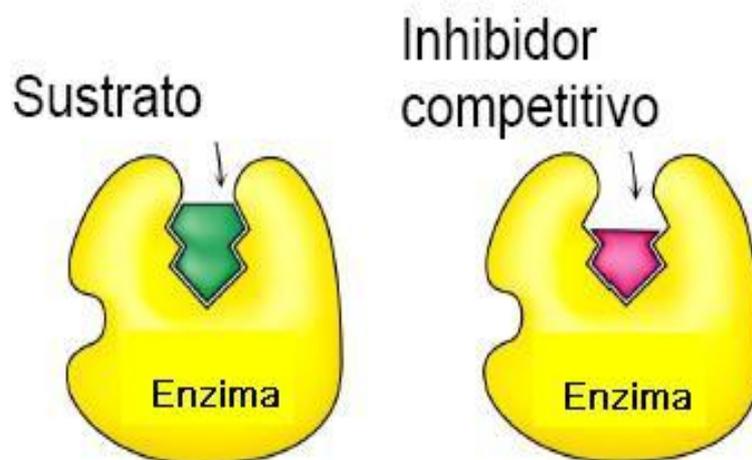
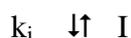


Imagen 5. Inhibición competitiva. (Universitat de les Illes Balears)



$$V = \frac{V_{m\acute{a}x} [S]}{S + K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right)}$$

La ecuación muestra que K_m ahora está aumentada por el término $(1+[I]/k_i)$, lo cual produce una disminución en la rapidez de reacción, V . El grado de inhibición depende claramente de la concentración de sustrato $[S]$ y del inhibidor $[I]$. (Scragg, 1997)

La representación de Lineweber-Burk de la ecuación anterior puede escribirse como:

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right)}{V_{m\acute{a}x}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{m\acute{a}x}}$$

1.3.6.2 Inhibición incompetitiva.

En éste caso el inhibidor se une a ES pero no a la enzima libre; por lo tanto, aún cuando la concentración de sustrato sea saturante, la enzima se distribuirá entre el complejo formador de producto ES y el complejo que contienen el inhibidor EIS , en una relación que depende de K_i . Por lo tanto, EIS es un complejo “terminal” incapaz de dar el producto directamente. En consecuencia, V_{max} aumentará por el factor $(1=I/K_i)$, mientras que la K_m realmente disminuirá. (Mark Berg, Stryer, & Tymoczko, 2007) Esto se debe a que el inhibidor, I , “jala” la enzima hacia el estado unido con el sustrato y K_m es una medida de la habilidad del sustrato para “empujar” la enzima hacia el complejo ES :

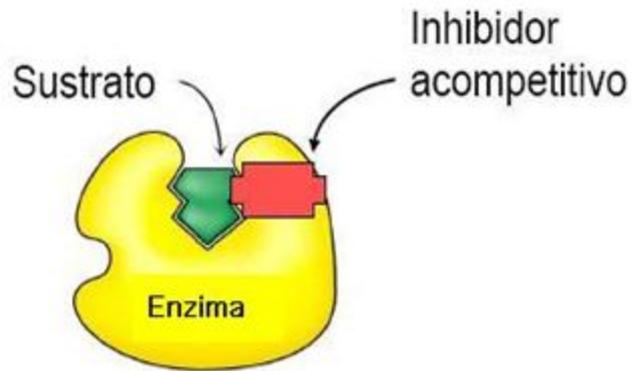


Imagen 6. Inhibición incompetitiva a acompetitiva. (Universitat de les Illes Balears)



Ahora hay dos sitios de unión en la enzima, uno para el sustrato y otro para el inhibidor.

1.3.6.3 Inhibición no competitiva.

Un inhibidor no competitivo se puede unir a la enzima libre, E, y al complejo enzima-sustrato ES para formar EI e EIS. EIS no se puede descomponer para dar el producto y la enzima:

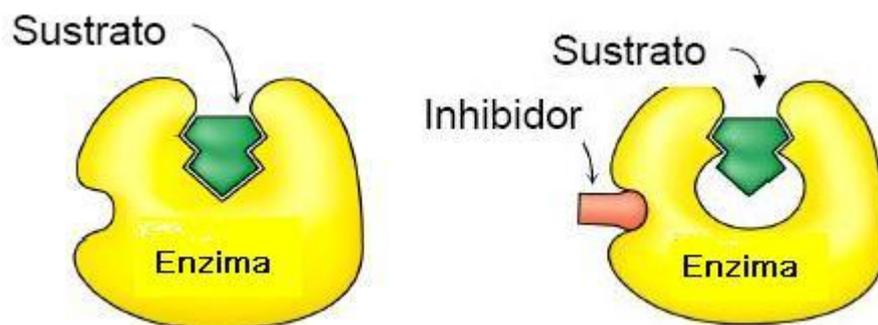


Imagen 7. Inhibición no competitiva. (Universitat de les Illes Balears)



Si las concentraciones de EI e EIS están en equilibrio, las constantes de equilibrio para la unión de I a E (K_{iE}) y a ES (K_{iES}) son idénticas e iguales a K_i , si se supone que la presencia del sustrato unido no afecta a la unión del inhibidor. (Mark Berg, Stryer, & Tymoczko, 2007) Como en el caso de la inhibición incompetitiva, hay dos sitios de unión sobre la enzima, el sitio activo para la unión del sustrato y un segundo sitio al cual se une un inhibidor sin importar si el sustrato ya está unido a la enzima o no. El resultado es que la K_m permanece constante mientras que la $V_{m\acute{a}x}$ cambia. (Scragg, 1997)

1.4 La hipertensión arterial.

La responsabilidad de los profesionales del área de la salud es contribuir a mejorar la calidad de vida de las personas, independientemente del área en la que se labore. El origen del presente estudio está basado el hecho de que la hipertensión arterial es problema grave de salud pública en la actualidad.

La hipertensión arterial es generalmente definida como una entidad clínica caracterizada por una elevación crónica de la presión arterial, usualmente encima de 140/90 mmHg. Cabe señalar que en un hombre de 40 años con hipertensión de 150/100 la esperanza de vida disminuye en 11 años en relación con la persona normotensa (Hergueta, 2002), o debido a sus complicaciones disminuye la esperanza de vida de 10-20 años debido a sus complicaciones. Según cifras de la encuesta Nacional de salud de 2006 en México la prevalencia de HA en la población de 20 años es de 30.8 % y es mayo en los estados del norte del país, (Nayarit, Zacatecas, Sinaloa, Coahuila, Baja California Sur, Durango y Sonora), donde alcanza cifras del 35 al 42%. (Mendoza, 2008)

La HA es un trastorno común y con frecuencia progresivos que representa un riesgo importante para la enfermedad cardiovascular y renal. Los datos revelan que la carga mundial de la hipertensión es un importante y creciente problema de salud pública en todo el mundo y que el nivel de conocimiento, tratamiento y control de la hipertensión varía considerablemente entre países. En el año 2000, 972 millones de la población adulta en todo el mundo ≥ 18 años de edad se vio afectada por la hipertensión, y este número se prevé que aumente de 1,56 millones en el 2025. (Bonesi, 2010)

En la siguiente imagen se puede observar un estudio realizado en una muestra 1514 personas de la población en general, de las cuales 26.93% es hipertensa; un 8.24% es tratada con ECA y un 73.2% no tiene tratamiento de la hipertensión.

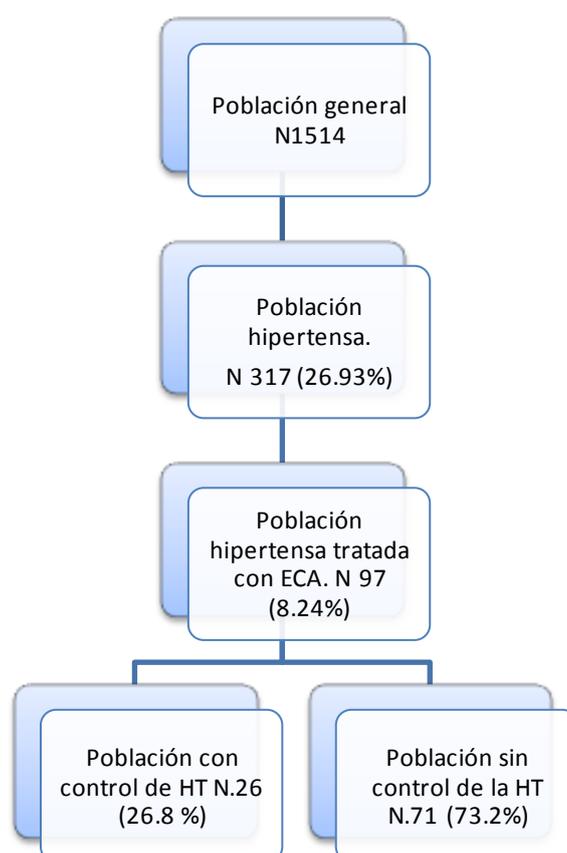


Imagen 8. Esquema del estudio del control inefectivo de la hipertensión en la población. (Morales-Suárez-Varela M. M.-E., 2010)

No obstante, la esperanza de vida de un hipertenso correctamente tratado y controlado es similar a la del normotenso. (Hergueta, 2002) Alrededor de un 10% de

los casos tiene su causa en enfermedades conocidas tales como disfunciones renales y desórdenes endócrinos y neurogénicos.

La hipertensión arterial puede derivar en diversas enfermedades como las que se muestran en la imagen siguiente:

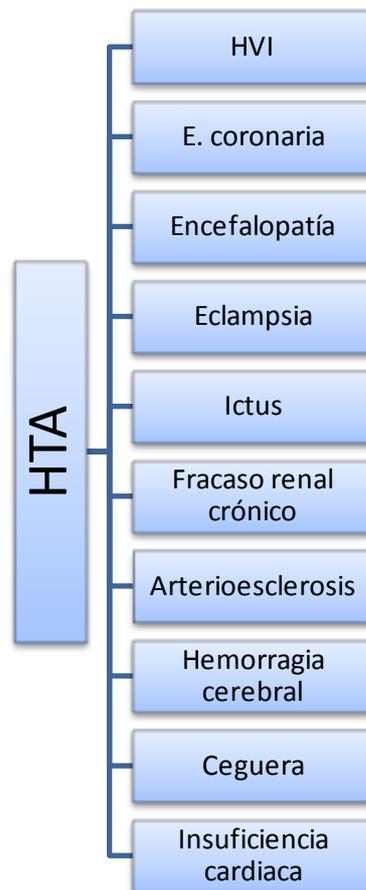


Imagen 9. Esquema del estudio de las enfermedades causadas por la hipertensión.

1.4.1 La presión arterial.

La presión arterial media es la presión promedio durante la totalidad de cada ciclo del latido cardiaco. La presión arterial normal tiene un valor medio de 120/80 mm de Hg, con una amplitud normal de variación de los valores sistólicos y diastólicos, considerables según las personas.

El aumento de presiones arteriales en edades avanzadas suele acompañar al desarrollo de arterioesclerosis. En esta enfermedad aumenta especialmente la presión sistólica.

1.4.2 El sistema global de regulación de la presión arterial.

La presión arterial no está regulada por un solo sistema de control, sino por varios sistemas mutuamente relacionados que tienen a su cargo funciones específicas. Los tipos principales de sistemas de control de la presión arterial en el cuerpo son el sistema de control de acción rápida, y un sistema de control a largo plazo para el valor básico de la presión arterial.

1.4.3 Mecanismos regulatorios de la presión arterial.

Mecanismos nerviosos que actúan rápidamente para el control de la presión arterial.

- El sistema de control arterial Barorreceptor y reflejos Barorreceptores:
Es el más conocido de los mecanismos de control de la presión arterial, también conocido como reflejo barorreceptor. Básicamente se inicia por receptores de la presión arterial llamados barorreceptores o presorreceptores situados en las paredes de las grandes arterias de la gran circulación. Un aumento en la presión hace que los barorreceptores transmitan señales hacia el sistema nervioso central, y a su vez otras señales llegan a la circulación para disminuir la presión arterial nuevamente hasta valores normales.

Los barorreceptores responden con gran rapidez a los cambios de presión arterial; el número de impulsos aumenta incluso durante la sístole y disminuye durante la diástole, responde mucho más a una presión que sube que a una presión estacionaria; inversamente responden menos a una presión que baja que a una estacionaria.

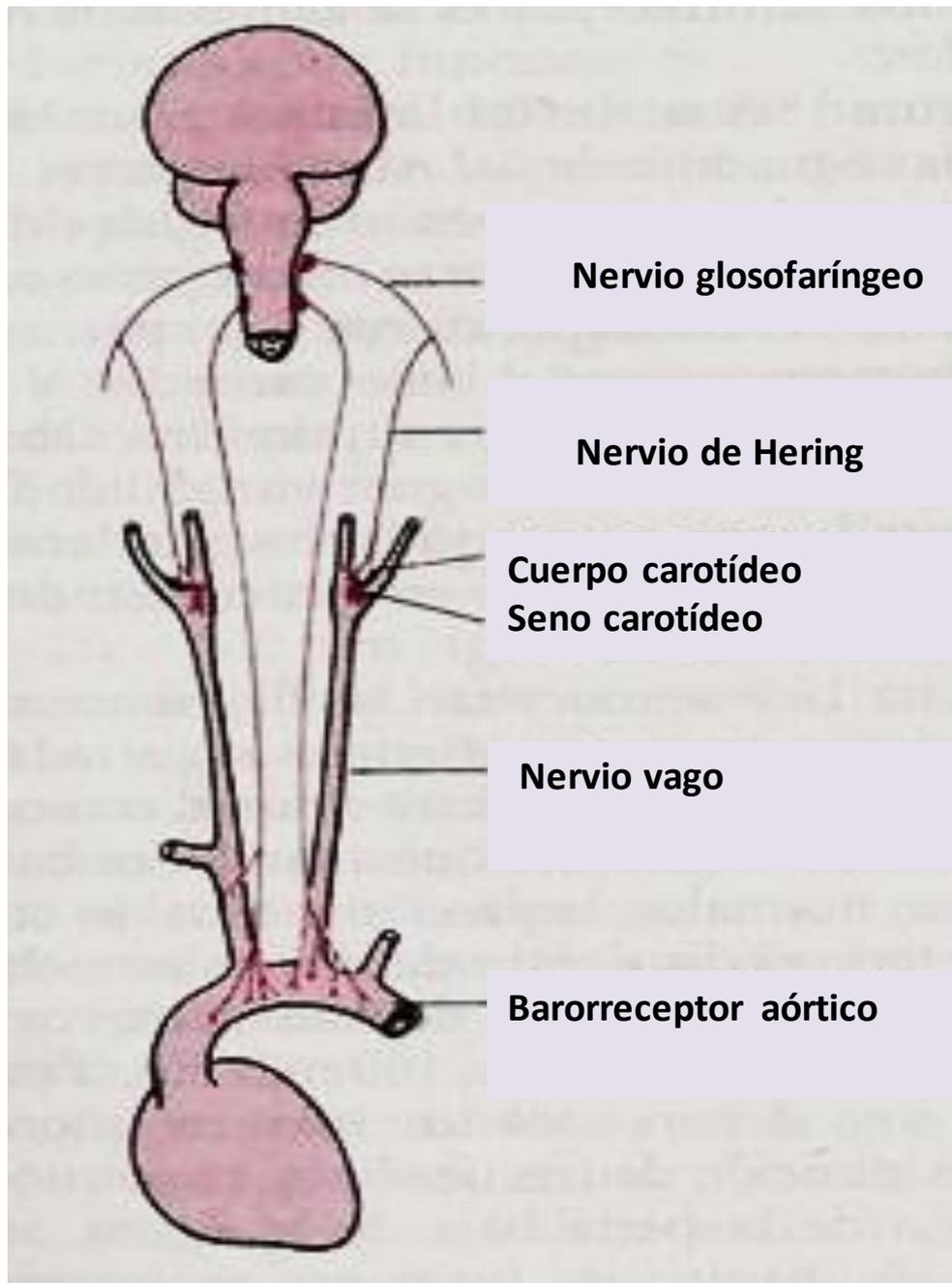


Imagen 10. Sistema Barorreceptor. (Análisis de la hipertensión arterial)

- Control de la presión arterial por los quimiorreceptores carotídeos y aórticos. (Efecto de la carencia de oxígeno en la presión arterial):
- Reflejos auriculares y de arteria pulmonar que ayudan a regular la presión arterial.
- Control de la presión arterial por el centro vasomotor en respuesta a una disminución del riesgo sanguíneo cerebral. (La respuesta isquémica del CNS)
- Participación de las venas en la regulación nerviosa de la circulación.

- Papel de los nervios y músculos esqueléticos en el control circulatorio.
- Ondas respiratorias en la presión arterial.
- Ondas vasomotoras de la presión arterial. (Oscilación de los sistemas reflejos de control de la presión)

1.4.4 Mecanismos hormonales para control rápido de la presión arterial.

Además de los mecanismos nerviosos de acción rápida para el control de la presión arterial, hay por lo menos tres mecanismos hormonales que también proporcionan un control rápido o moderadamente rápido de la presión arterial. Son los siguientes:

- ◆ El mecanismo vasoconstrictor de Noradrenalina- Adrenalina.
- ◆ El mecanismo Vasoconstrictor de renina-Angiotensina para control de la presión arterial.
- ◆ El mecanismo Vasoconstrictor de vasopresina.

El mecanismo Vasoconstrictor de renina-angiotensina para el control de la presión arterial, por ser el empleado como fundamento del presente trabajo será el que se explicará a mayor detalle.

La Angiotensina II (AII), es un octapéptido producto de la cascada enzimática de la renina-angiotensina la cual es responsable por mantener la presión arterial. La AII es un péptido natural producido en la sangre como resultado de dos hidrólisis enzimáticas diferentes que tienen lugar en el sistema de hipertensión renal. Las células yuxtglomerulares, en determinadas circunstancias, liberan a una enzima llamada renina que actúa sobre la proteína completa o sustrato llamado angiotensinógeno para liberar a la angiotensina I, que es un decapeptido, éste es hidrolizado por la ECA para generar AII. (Oliveira, 2011)

AII, es la hormona responsable de ésta función fisiológica, interactúa con varios tejidos, incluyendo la corteza adrenal, el tejido de miocardio, músculo liso vascular, los riñones y el cerebro. Los efectos de la AII incluyen la modulación de la liberación de

aldosterona por la corteza suprarrenal adrenal, el control de la frecuencia cardíaca, el tono vascular, la filtración glomerular y la secreción hipofisaria de la vasopresina. (Oliveira, 2011)

La hormona A II es el vasoconstrictor más poderoso conocido. Siempre que la presión arterial cae mucho aparecen en la circulación grandes cantidades de angiotensina II. Esto resulta de un mecanismo especial que incluye a los riñones y la liberación por ellos de la enzima renina cuando la presión arterial cae demasiado.

BAJA DE TENSIÓN ARTERIAL

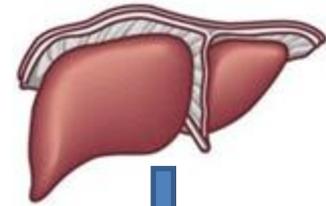
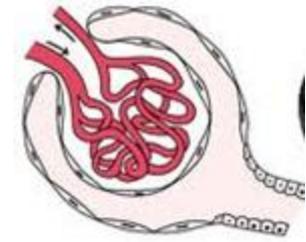
Como respuesta a la reducción de la tensión arterial o disminución de sodio de los túbulos renales el aparato yuxtaglomerular del riñón produce RENINA y la descarga en el torrente sanguíneo.

La RENINA es una enzima producida por las células granulares de las paredes de las arteriolas aferentes (y mucho menos por las eferentes) en el glomérulo del riñón.

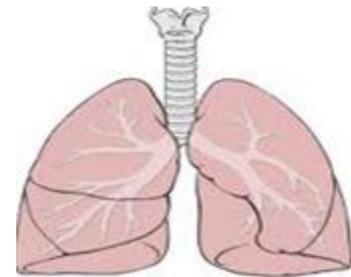
Angiotensinógeno-Sustrato de RENINA

Una vez en sangre, la RENINA actúa sobre el angiotensinógeno –sustrato de la renina del hígado- produciendo ANGIOTENSINA I.

La Angiotensina I no posee efecto fisiológico aparente, pero al pasar a través del pulmón, es transformada por la ECA en Angiotensina II.



ANGIOTENSINA I

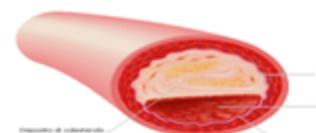


ANGIOTENSINA II

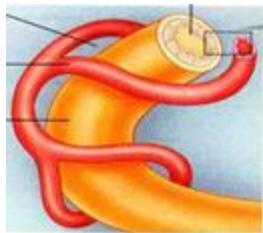
La Angiotensina II es un potente vasoconstrictor y regulador de la presencia de sodio, como también el estímulo primario para la producción de aldosterona en la corteza suprarrenal.



VASOCONSTRICCIÓN



ALDOSTERONA



La aldosterona es un mineral corticoide que produce la reabsorción de agua y sodio por los túbulos renales. De esa manera se eleva el volumen intravascular y el volumen minuto (cantidad de sangre que bombea el corazón en dicho término de tiempo).



Retención de sodio y agua e incremento de volumen

Eleva la tensión arterial



Debido al aumento de tensión, disminuye la excreción de renina.

Feedback negativo.



Imagen 11. Sistema renina-angiotensina. (zonamedica.com. 2006)

Cuando el riego sanguíneo a través de los riñones disminuye, las células yuxtaglomerulares (células localizadas en las paredes de las arteriolas aferentes inmediatamente proximales a los glomérulos) secretan renina que va a la sangre. La renina es una enzima que cataliza la conversión de una de las proteínas plasmáticas, llamada sustrato de renina, en el péptido angiotensina I. La renina persiste en la sangre hasta por una hora, y sigue formando angiotensina I durante todo este tiempo. Al cabo de unos segundos de formada la angiotensina I, se convierte en otro péptido, angiotensina II. Esta conversión ocurre casi por completo en los vasos pequeños de los pulmones, catalizada por una enzima llamada enzima convertidora.

Rápidamente se da una vasoconstricción, especialmente de arteriolas y en menor grado también de venas. Durante su persistencia en la sangre, la angiotensina II ha ejercido varios efectos que pueden aumentar la presión arterial. Uno de ellos tiene lugar muy rápidamente: vasoconstricción especialmente de arteriolas y en menor grado también de venas. La constricción de las arteriolas aumenta la resistencia periférica y, por tanto devuelve la presión arterial hacia las cifras normales.

La constricción de las venas también aumenta la presión de llenado circulatorio, a veces hasta en un 20%, y esto aumenta el retorno venoso de la sangre hacia el corazón, ayudando a que éste la impulse de nuevo contra la carga extra de la presión.

Los otros efectos de la angiotensina guardan relación principalmente con los volúmenes de líquido corporal: 1) La angiotensina tiene efecto directo sobre el riñón provocando una disminución de la eliminación de sal y agua. 2) La angiotensina estimula la secreción de aldosterona por la corteza suprarrenal, y esta hormona a su vez, actúa sobre los riñones disminuyendo la eliminación de sal y agua. Ambos efectos aumentan el volumen sanguíneo, un factor importante en la regulación a largo plazo, de la presión arterial.

1.4.5 La meta Terapéutica Antihipertensiva.

El propósito del tratamiento antihipertensivo es la reducción del riesgo de ECV, enfermedad arterial coronaria, falla cardíaca, así como la mortalidad por causas cardiovascular y renal. (Mendoza, 2008)

El primer indicador de la reducción del riesgo es el logro de la meta terapéutica antihipertensiva, el cual está definido por el acercamiento a las cifras de Tensión arterial (TA) óptima. (Mendoza, 2008)

1.4.5.1 Los fármacos hipotensores-antihipertensivos.

Los hipotensores o antihipertensivos son sustancias que producen la reducción de la tensión arterial mediante acciones específicas sobre sus mecanismos de regulación, o a través de efectos farmacológicos que ejercen en diferentes aparatos y sistemas. (Defillo, 1984)

Las propiedades farmacológicas de los fármacos antihipertensivos para el primer nivel incluyen a los diuréticos tiazídicos (DIU), betabloqueadores (BBL), vasodilatadores directos, antagonistas alfa centrales, calcio-antagonistas (CCA), inhibidores de enzima convertidora de angiotensina II (IECA), y antagonistas de receptores de angiotensina II (ARAI). (Mendoza, 2008)

Tabla a. Clasificación farmacológica de los antihipertensivos. (Mendoza, 2008)

CATEGORÍA	EFEECTO FARMACOLÓGICO	GRUPOS REPRESENTATIVOS
Diuréticos	Inicialmente disminuyen el volumen sanguíneo como consecuencia del GC. Con el tiempo la normalización del GC se acompaña de una disminución de la RVP.	Tiazídicos De asa Ahorradores de potasio
Simpaticolíticos	Disminuyen la RVP, ya sea periféricamente con una disminución concomitante del GC, o bien, inhibiendo la descarga simpática centralmente.	Antagonistas de receptores adrenérgicos alfa y beta. Agentes de acción central Bloqueadores neuronales. Bloqueadores ganglionales.
Inhibidores de angiotensina	Disminuyen el volumen sanguíneo al reducir la secreción de aldosterona e impiden la formación de ANG II y la interacción con el receptor de ANG II.	Inhibidores de la ECA II Antagonistas de receptores de ANG II
Vasodilatadores	Disminuyen la RVP, por una acción directa sobre las arteriolas y pueden disminuir la frecuencia cardiaca.	Bloqueadores de canales de Ca Otros como la hidralazina
Tratamiento de crisis hipertensivas	Disminuyen la RVP, por una acción vasodilatadora sobre arteriolas y/o venas.	Nitroprusiato de Na Diazóxido Trimetafan Labetalol

GC; gasto cardiaco; RVP: Resistencia vascular periférica

Debido a las acciones, a los efectos farmacológicos y al sitio donde los ejercen, los hipotensores pueden clasificarse en los siguientes grupos:

1. Drogas hipotensoras principales.

- a. Diuréticos.
- b. Alcaloides de rawolfia.
- c. Simpaticoplégicos.

- c. Hidrcinofalacinas.
- d. Bloqueantes ganglionares.
- e. Derivados de la imidazolina.

2. Drogas hipotensoras subsidiarias.

- a. Sedantes y tranquilizantes.
- b. Inhibidores enzimáticos.

3. Drogas de tercera generación.

- a. Derivados de la prazocina.
- b. Antagonistas del calcio.
- c. Vasodilatadores puros.

Los fármacos antihipertensivos que pertenecen al grupo de las drogas hipotensoras subsidiarias, ejercen su acción a través de la depresión de funciones del sistema nervioso, como el caso de los sedantes y tranquilizantes, o de bloqueo e inhibición de procesos enzimáticos, de biosíntesis y transformación de catecolaminas, de vasodilatación directa y de inhibición directa adrenérgica. (Defillo, 1984)

Dado que en el presente estudio se trabajo con inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, se estudiarán en específico los inhibidores enzimáticos, éstos producen un bloqueo de los procesos enzimáticos de formación y biotransformación de las catecolaminas, como transmisores químicos simpáticos, y por lo tanto ocasionando una vasodilatación periférica. La estructura química de éstas sustancias constituyen metilderivados de sustancias intermediarias del metabolismo de las catecolaminas. (Defillo, 1984)

1.4.5.2 Angiotensina e inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ECA)

Las angiotensinas son péptidos cuya composición de aminoácidos y estructura es conocida; se derivan del angiotensinógeno, una globulina α_2 plasmática. Este precursor se convierte en el decapeptido angiotensina I por acción de la enzima renina, que libera el riñón. En el plasma y varios tejidos (glandulares, renales, de vasos sanguíneos, cardiacos, etc.) hay una alta concentración de *peptidil dipeptidasa* o *peptidil carboxipeptidasa* (enzima convertidora de angiotensina), la cual convierte la angiotensina I (inactiva) en el octapéptido angiotensina II, que es la forma biológicamente más activa. Este péptido circula en la sangre y se cataboliza de nuevo, a un heptapéptido menos activo (la angiotensina III) o a fragmentos inactivos. (Murray, 2006)

La angiotensina II tiene intensa acción vasoconstrictora, con potencia 40 veces mayor que la adrenalina; estimula tanto la síntesis como la liberación de la aldosterona de la corteza suprarrenal, la liberación de la hormona antidiurética (HAD, vasopresina) en la hipófisis, con lo que promueve la retención de sodio y agua. Al estar en concentración muy elevada, la angiotensina II circulante inhibe directamente la reabsorción de sodio de los túbulos renales distales, como sucede en los casos de insuficiencia hepática terminal. (Murray, 2006)

Un hecho de suma importancia es que los antagonistas del sistema renina-angiotensina son de gran utilidad como antihipertensivos en muchos casos.

Algunas enzimas han sido aisladas de tejido de mamífero que tiene actividad de la dipeptidil coarboxipeptidasa con la que se puede convertir la angiotensina I en angiotensina II. (Nagamatsu, 1981)

Para el presente estudio se empleo enzima proveniente de pulmón de conejo, aunque también puede extraerse de pulmón y riñón de cerdo. El interés en la ECA se basa en su capacidad para controlar la presión arterial en los seres humanos.

La enzima convertidora de angiotensina (ECA) es el sitio de regulación más importante del sistema renina-angiotensina (RAS). La ECA es una dipeptidil

carboxipeptidasa que inactiva el compuesto vasodilatador bradiquinina y activa el potente vasoconstrictor y sustancia promotora del crecimiento angiotensina II por la eliminación del dipéptido carboxi-terminal de la angiotensina I. La principal función fisiológica de la ACE está vinculada a la regulación de la presión arterial y la homeostasis de electrolitos mediante la conversión de angiotensina I en angiotensina II potente vasoconstrictor y por inactivación de la bradiquinina. La importancia de los inhibidores de la ECA en el tratamiento crónico de la diversas enfermedades cardiovasculares tales como infarto de miocardio, insuficiencia cardíaca congestiva, nefropatía diabética, o disfunción renal es bien conocida. De hecho, los inhibidores de la ECA, a saber, captopril, enalapril, fosinopril, y ramepril, están actualmente disponibles en el mercado para el tratamiento de la hipertensión. Sin embargo, algunos de estos inhibidores de la ECA tienen ciertas limitaciones, como la susceptibilidad a la degradación proteolítica que conduce a efectos secundarios. (Bonesi, 2010)

La ECA es una peptidil dipeptidasa hidrolasa que contiene zinc. El sitio activo de la ECA se sabe que consta de tres partes; un carboxilato con funcionalidad de unión tal como el grupo guanidinio de arginina, un hueco o hendidura que acomoda una cadena lateral hidrófoba de C-terminales y de residuos de aminoácidos y de iones de zinc. Y el ion de zinc coordina al carbonilo del enlace peptídico penúltimo del sustrato, con lo que el grupo carbonilo se polariza y está sujeto a un ataque nucleofílico. (Bonesi, 2010)

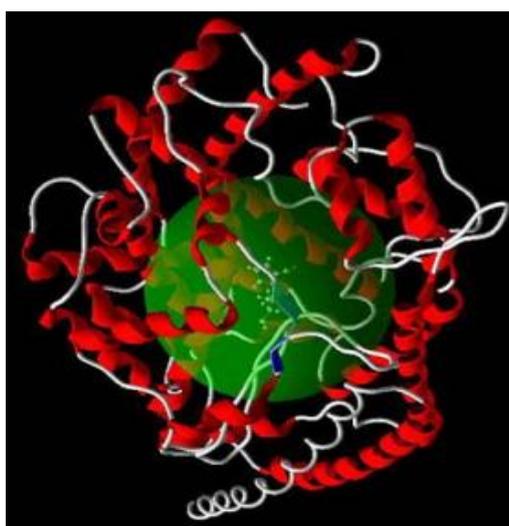


Imagen 12. Estructura de la proteína de la ECA. (Pripp, 2007)

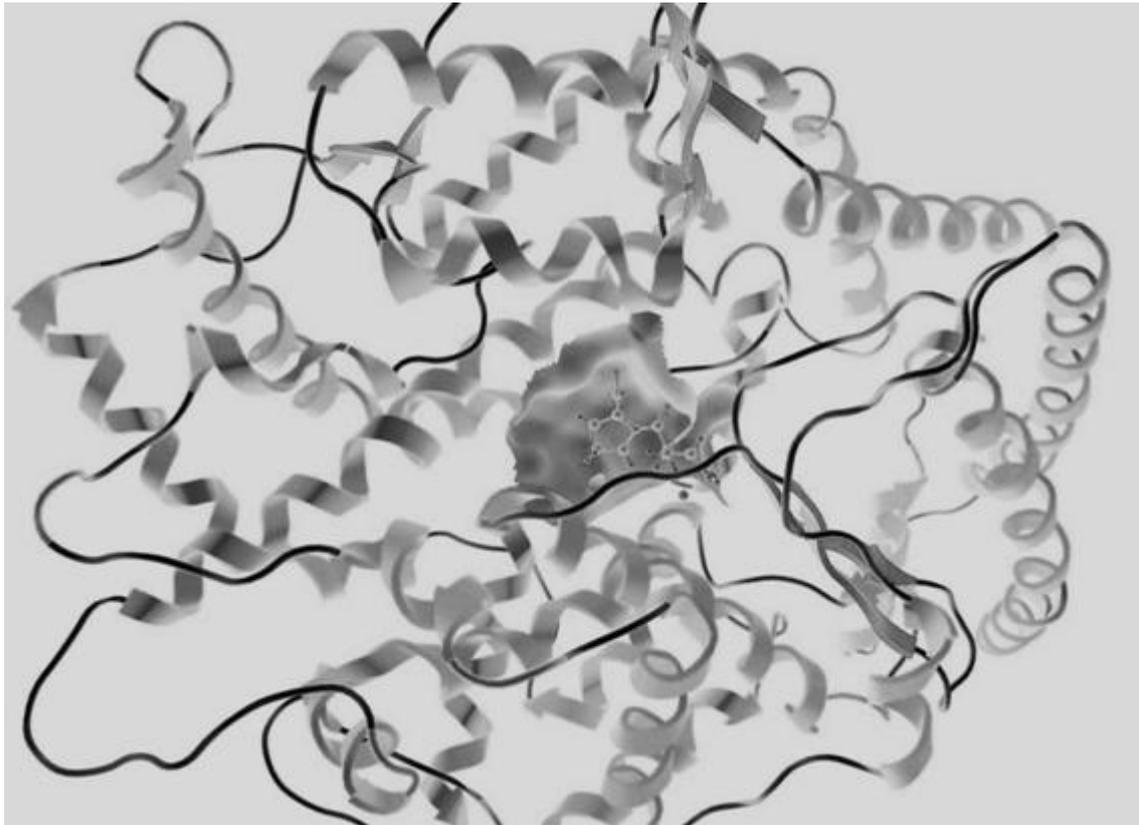


Imagen 13. Estructura de la proteína de la ECA. (Tomada por el M. en C. Victor Hugo Vázquez Valadez en el LQM FES-C UNAM)

En las dos imágenes anteriores se puede observar la interacción entre el captopril y el sitio activo de la enzima.

1.4.5.3 Inhibidores de la ECA.

El desarrollo de inhibidores de la ECA se llevó a cabo durante una búsqueda sistemática de inhibidores de las cininasas, que se desdoblan las cininas (como la bradicinina y la calidina) y convierten la angiotensina I en angiotensina II. (Murray, 2006)

Los inhibidores de la ECA se clasifican según las características químicas de su ligando, que se fija al ión Zinc en el sitio activo de la enzima. Los inhibidores que se estudian actualmente o que están en las últimas etapas de estudio son: 1. Los compuestos con radical solfihidrido (alacepril, captopril, moveltipril, zofenpril); 2. Aquellos con carboxilo (benacepril, cilapril, enalapril, delapril, lisinopril, pentopril etc.) y 3. Los que

tienen radical fosforil (fosinopril y ceronapril). Además, hay más de 80 compuestos en sus primeras fases de desarrollo. (Murray, 2006)

1.4.5.3.1 Mecanismo de la ECA y su sitio de acción.

Los inhibidores de la ECA actúan competitivamente sobre dicha enzima en virtud de su semejanza estructural con los dipéptidos a los que inhibe la ECA. Esto se demostró en animales de experimentación y en seres humanos mediante bloqueo de la conversión de angiotensina I administrada por vía intravenosa a la vez que se impedía el efecto presor. La angiotensina II estimula tanto la síntesis como la liberación de aldosterona, con lo que aumenta el intercambio de sodio-potasio en los túbulos contorneados distales. La formación disminuída de angiotensina durante la terapéutica con inhibidores de la ECA puede ocasionar un descenso importante en los niveles plasmáticos de aldosterona y el aumento subsecuente en la concentración sérica de potasio, con depleción de sodio. Al reducirse la liberación e HAD se incrementa la liberación de agua, lo cual contribuye a la depleción de volumen de los diuréticos administrados simultáneamente. (Murray, 2006)

1.4.5.3.2 El captopril.

Fue el primer inhibidor de la ECA administrado por vía oral que dio buenos resultados clínicos. Se absorbe rápidamente por ésta vía y alcanza su concentración sanguínea máxima en alrededor de una hora. Menos del 30% del fármaco circulante se fija a proteínas del plasma. Se distribuye de manera irregular en al agua corporal total. Una pequeña parte de la sustancia cruza la barrera hematoencefálica en animales de experimentación, pero atraviesa libremente la placenta humana. (Murray, 2006)

Su vida media sérica estimada es aproximadamente de dos horas . El efecto antihipertensivo que produce es mucho más prolongado que la inhibición mostrable de la ECA circulante, tal vez porque el captopril en porciones sumamente bajas inhibe la porción de esta enzima que está en el endotelio vascular. (Murray, 2006)

Más o menos la mitad de la dosis absorbida es excretada en la orina sin cambios, el resto se elimina como el dímero disulfato de captopril y como disulfato de cisteína-captopril. Las dosis recomendadas varían de 25 a 300 mg/día. (Murray, 2006)

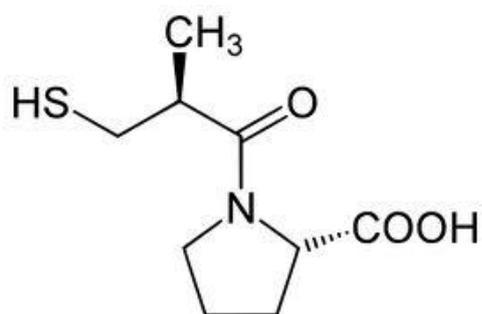


Imagen 14. Estructura del Captopril. (Hillaert & Van den Bosshe, 1999)

1.4.5.3.3 Compuestos LQM 319 y 328.

La actividad de los compuestos LQM 319 y LQM 328 se realizó como ya se ha mencionado anteriormente con la ayuda de la ECA, a la que también se le conoce como *peptidil dipeptidasa*, *dipeptidil carboxipeptidasa*, *quinasa II*, *p-peptidasa*, *carboxicatepsina* y la *angiotensina I (Phea-His) hidrolasa*, éstos nombres se han utilizado para mostrar las diferentes propiedades físicas o químicas y/o fuentes de diversas preparaciones. (Nagamatsu, 1981)

Los compuestos fueron sintetizados y desarrollados en el laboratorio de química medicinal a cargo del Dr. Enrique Angeles Anguiano.

A continuación se presentan las estructuras de los compuestos LQM 319 y 328

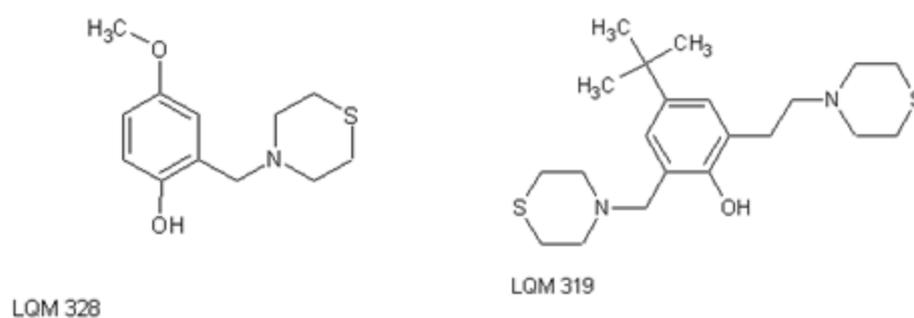


Imagen 15. Estructuras de los compuestos LQM 319 y 328.

2. Objetivos.

2.1 Objetivo general:

- Determinar el efecto de inhibición de la Enzima Convertidora de Angiotensina (ECA) por los compuestos LQM319 y LQM328 mediante una cinética enzimática monitoreada por un microarreglo regulado electroforéticamente para cuantificar la disminución de ác. Hipúrico como producto de la reacción de la ECA con el sustrato hipuril-L-histidil-leucina (HHL).

2.2 Objetivos particulares:

- Desarrollar un método analítico basado en la técnica de Electroforesis Capilar (EC) que sea capaz de cuantificar al producto de reacción entre la ECA y el HHL, el ácido hipúrico (HA).
- Asegurar la confiabilidad del método analítico, a través de los parámetros de exactitud, precisión, linealidad del sistema, y repetitividad entre días.
- Realizar una cinética enzimática entre la ECA y el HHL para determinar el tiempo óptimo en el que se pueda apreciar la inhibición de la enzima por el captopril.
- Hacer una comparación entre el efecto del captopril y los compuestos LQM 319 y 328 sobre la cinética de la ECA.
- Desarrollar la habilidad del manejo del equipo de electroforesis capilar, así como del material biológico. (HHL y ECA)

3. Hipótesis.

Si los compuestos LQM 319 y 328 presentan una interacción de inhibición sobre la ECA, entonces por medio de una cinética enzimática monitoreada con ECZ podremos determinar el porcentaje de inhibición comparado con el captopril.

4. Material y Métodos.

4.1 Material.

4.1.1 Curva de calibración.

- Un matraz aforado de 50mL.
- Un matraz aforado de 100mL.
- 6 matraces aforados de 10mL.
- 2 vasos de pp de 50mL.
- 1 vaso de pp de 100mL.
- 3 agitadores magnéticos.
- 3 barras de agitación magnéticas.
- 1 filtro en línea de 47 mm de policarbonato.
- Membrana de nylon de 0.45 μm por 47mm
- Micropipeta de 100-1000 μL Transferpette Brand.
- Viales de 2mL de vidrio.
- Cuentagotas.

4.1.2 Cinética enzimática.

- 2 matraces aforados de 50mL.
- Un matraz aforado de 100mL.
- 2 vasos de pp de 50mL.
- 1 vaso de pp de 100mL.
- 3 agitadores magnéticos.
- 3 barras de agitación magnéticas.
- 1 filtro en línea de 47mm de policarbonato.
- Membrana de nylon de 0.45 μm por 47mm
- Micropipeta de 100-1000 μL Transferpette Brand.
- Viales de 2mL de vidrio.
- Cuentagotas.

4.1.3 Inhibición de la ECA por el captopril y los LQM319 y LQM328.

- 2 matraces aforados de 50mL.
- Un matraz aforado de 100mL.
- 3 matraces aforados de 10mL.
- 2 vasos de pp de 50mL.
- 1 vaso de pp de 100mL.
- 3 agitadores magnéticos.
- 3 barras de agitación magnéticas.
- 1 filtro en línea de 47mm de policarbonato.
- Membrana de nylon de 0.45 µm por 47mm
- Micropipeta de 100-1000 µL Transferpette Brand.
- Viales de 2ml de vidrio.
- Cuentagotas

4.1.4 Equipos.

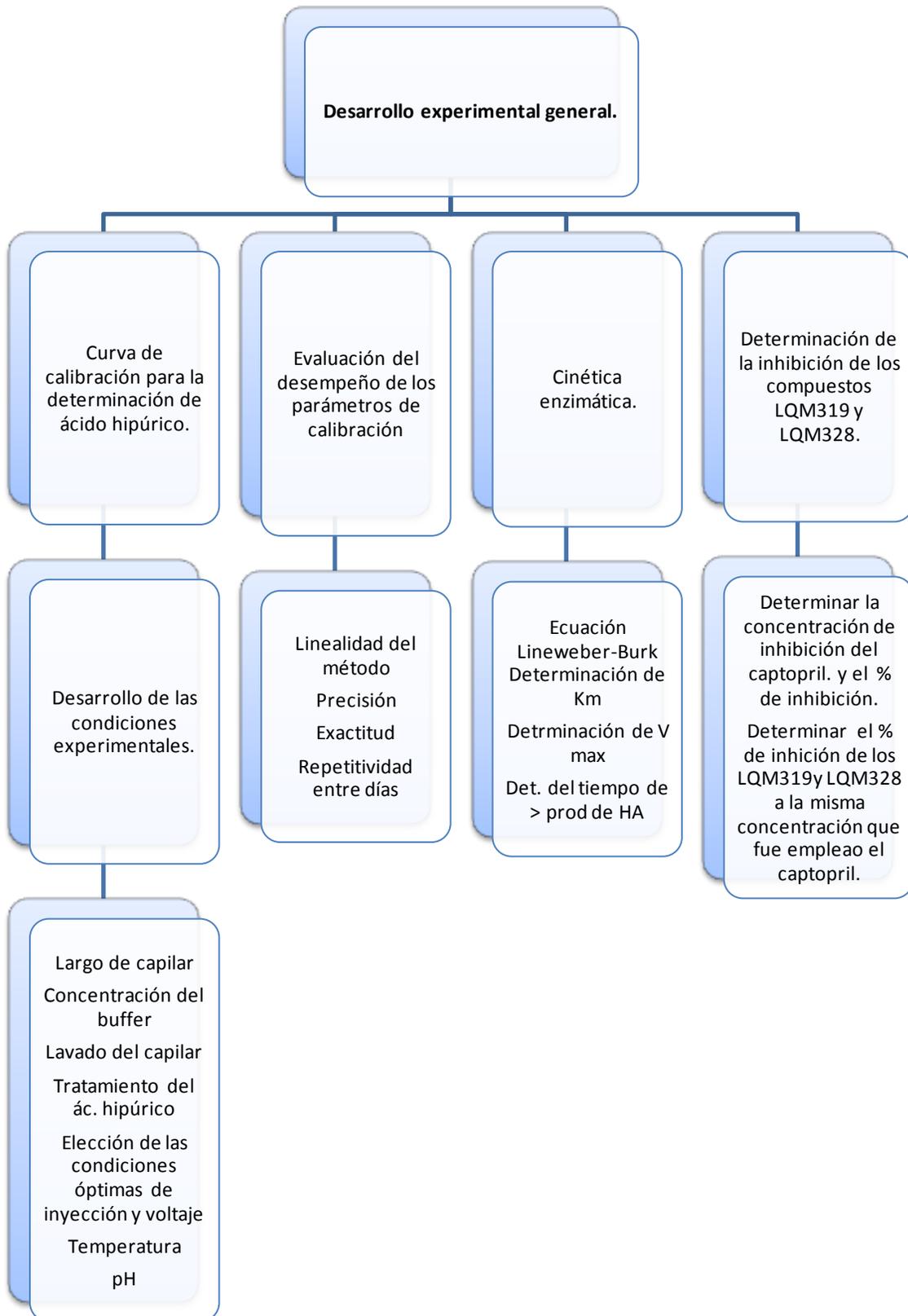
- Balanza analítica Mettler Toledo AT200.
- pH-metro Beckman Coulter 310.
- Equipo de Electroforesis Capilar P/ACE MDQ Beckman Coulter No. Inventario 2115202.
- Ultrasonico LC30H Elma.

4.1.5 Reactivos.

- **Ácido hipúrico.** CAS 495-69-2; SIGMA-Aldrich; Alemania
- **HEPES** (*{2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine]ethane sulfonic acid}*) 7365-45-9; SIGMA-Aldrich St. Louis USA.
- **Enzima convertidora de angiotensina (ECA)** provenía de pulmón de conejo. 9015-82-1; SIGMA-Aldrich; USA.
- **Hipiril histidil leucina HHL** CAS 103404-54-2; SIGMA-Aldrich; USA.
- **Estándar de captopril.** 62571-86-2; SIGMA-Aldrich; Química S.A. de C.V. México.

- **Hidróxido de Sodio.** 1310-73-2; SIGMA-Aldrich; Química S.A. de C.V. México.
- **Cloruro de Sodio.** 7647-14-5; SIGMA-Aldrich; Química S.A. de C.V. México.
- **LQM 319** (Sintetizado en la Unidad de Posgrado de FES-C UNAM)
- **LQM 328** (Sintetizado en la Unidad de Posgrado de FES-C UNAM)

4.2 Metodología.



4.2.1 Métodos.

Son 3 métodos: El método para el desarrollo de la curva de calibración y la evaluación de la misma, el método para la determinación de la cinética enzimática y el método para la determinación del efecto de los compuestos LQM319, LQM328 y el captopril.

4.2.2 Descripción del método empleado para el desarrollo de la curva de calibración y la evaluación de la misma.

Las condiciones iniciales empleadas para el desarrollo del método fueron las maracadas en la literatura, un buffer de corrida de 150mM de HEPES, un buffer de muestra de 10mM de HEPES con 150 mM de NaCl y un tiempo de inyección de 0.3 p.s.i. (Van Dyck, 2003)

Las condiciones finales de ésta fase son: el volumen de aforo de las soluciones para la curva de calibración es a 10 ml, se agrega una concentración de 150mM de NaCl y 10mM de HEPES en el buffer de muestra y 50mM de Hepes en el buffer de corrida. Se sónica cada muestra antes de que sea leída. Los buffers se ajustan a un pH de 8.0 con la ayuda del NaOH 1M, para la preparación de las soluciones se emplea agua desionizada.

La solución stock de ácido hipúrico tiene una concentración de 6.25×10^{-3} M

El NaOH empleado en el lavado del capilar es 0.1 M.

Las concentraciones de las soluciones para la curva de calibración son:

Soln. 1: 1×10^{-4} M; Soln. 2: 1.5×10^{-4} M; Soln. 3: 2.5×10^{-4} M; Soln. 4: 3.5×10^{-4} M y Soln. 5: 4.5×10^{-4} M.

Tabla b. Modificaciones hechas para el desarrollo de las condiciones finales.

Condición experimental	Variación	Condición experimental	Variación
Largo del capilar	30 cm	Lavado del Capilar	0.5 psi
	50cm		0.3psi
Buffer de corrida	150mM	Tratamiento del ác. hipúrico.	Diolución de cristales
	100mM		Disolución de polvo
	50mM	Temperatura de preparación de	37 °C
Buffer de muestra	10 mM	la muestra.	Ambiental
[NaCl] en buffer de muestra	10mM	pH	8
	50mM		
	100mM		
	150mM		

4.2.3 Descripción del método empleado para la determinación de la cinética enzimática.

Las condiciones experimentales son las mismas que se llevaron a cabo para la determinación de del efecto del captopril y de los LQM328 y LQM319 cambiando únicamente la inyección de enzima en la inyección de sándwich, ya que no se inyectaba enzima.

4.2.4 Descripción del método empleado para la determinación del efecto del captopril y de los LQM319, LQM328.

Todos los experimentos fueron realizados en un sistema de electroforesis capilar P/ACE MDQ (Beckam Coutler, Fullerton, CA, USA). La detección en línea fue desarrollada a 230 nm con un detector con arreglo de diodos. La recopilación de los datos y el análisis de las áreas de los picos fueron desarrollados por el software: *32 Karat (versión 5.0)*. El cálculo de los parámetros estadísticos fue hecho mediante el procesador de

hojas de cálculo Microsoft® Office Excel (versión 2007). El capilar fue mantenido a temperatura constante de 37 °C mediante líquido refrigerante a menos que se especifique lo contrario.

La enzima convertidora de angiotensina (ECA) provenía de pulmón de conejo, el hipuril histidil leucina (HHL) y el Captopril fueron comprados a Sigma-Aldrich. Los compuestos LQM 319 y 328 fueron sintetizados y purificados en el Laboratorio de Química Medicinal de la Unidad de Posgrado de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, de la UNAM.

Las soluciones de la HHL y del Captopril y de los LQM 319 y 328 fueron preparadas en buffer 10 mM HEPES {2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine]ethane sulfonic acid, Sigma-Aldrich} ajustado con NaOH 1M a pH de 8.0, que contenía 150 mM de NaCl. Todas las soluciones fueron preparadas con agua desionizada (ELGA, purelab classic labwater) y filtradas a través de membranas de nylon 0.45 µm (Nylaflo™).

4.2.4.1 Reacción At-inlet.

El buffer de corrida de la EC consistió en HEPES 50 mM ajustado con NaOH 1M a pH 8.0. Antes de usarse un capilar nuevo es tratado con NaOH 0.1 M durante 1 hr. Cada vez que se iniciaba un análisis el capilar era acondicionado con un ciclo de agua a 20 p.s.i. durante 20 min comenzando con NaOH 0.1 M durante 20 min. Posteriormente se procedía a correr el método, el cual contenía a su vez un lavado con NaOH 0.1 M, 2 min con agua, 2 min y con buffer por 3 minutos respectivamente.

La solución de enzima y la solución de sustrato con o sin inhibidor fueron introducidas dentro del capilar mediante una inyección tipo sándwich, solución de enzima - (0.5 p.s.i., 5 s)- solución de sustrato-(0.5 p.s.i., 5 s)- solución de enzima -(0.5 p.s.i., 5 s). Antes de cada paso de inyección de sustrato o de enzima. Los extremos del capilar se sumergían en agua con el fin de impedir que pasara muestra a través de los viales. Antes y después de cada inyección tipo sándwich se inyectaba hidrodinámicamente un pequeño

tapón de agua (plug) (0.1 p.s.i., 5 s). Se programó un tiempo de espera y se aplicó un voltaje de 6 kV. La mezcla del sustrato y del inhibidor específico se desarrollo inmediatamente antes de las mediciones para prevenir una reacción.

En la siguiente imagen se observa el orden de la introducción de los reactivos al capilar que ya fueron descritos anteriormente.

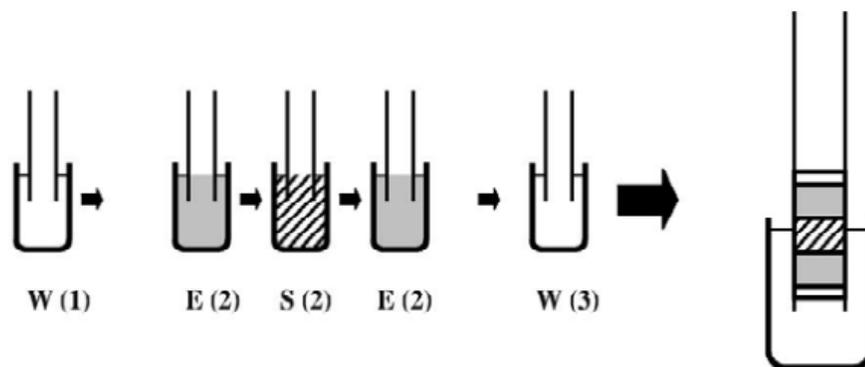


Imagen 16. Esquema de los diferentes tipos de inyección. (Van Dyck, 2003)

En la imagen anterior se puede observar el orden en que eran introducidos los reactivos en la técnica de inyección por sándwich. Al inicio y al final se inyecta agua (w), posteriormente la enzima (E), después el sustrato (S), y nuevamente se inyecta a la enzima (E); es importante recordar que el inhibidor se puede o no encontrar con el sustrato, es decir, cuando se requiere medir el efecto del inhibidor éste se debe de mezclar en la solución del sustrato y cuando no se desea medir éste efecto, éste no se añadirá a dicha solución. La actividad de la ECA fue determinada por el área del pico corregida. Como las áreas de pico no tienen unidades físicas, las velocidades de reacción fueron escaladas con base en la ecuación de Michaelis-Menten y la inhibición fue medida mediante unidades de porcentaje.

5. Resultados experimentales.

5.1 Resultados experimentales y discusión.

En el presente capítulo se presentarán los resultados en tres etapas, primero se presentará el análisis estadístico de las curvas de calibración del ácido hipúrico, esto con el fin de demostrar estadísticamente la reproducibilidad de las condiciones de linealidad del método, precisión, exactitud y repetitividad entre días, éste análisis estadístico está basado en que el número de repeticiones experimentales realizadas proporciona confiabilidad en los resultados inferidos; y sin embargo dado que sólo se ha desarrollado el método no se ha procedido a hacer una validación, quedando ésta como una perspectiva.

Es importante hacer hincapié en que el análisis estadístico de los resultados experimentales concuerdan con los parámetros establecidos por el comité internacional de armonización (ICH Q2), la guía de validación de métodos analíticos editada por el colegio nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos de México A. C. y la guía para la Industria de Validación de métodos Bioanalíticos.

Posteriormente se mostrarán los resultados obtenidos de la cinética enzimática de la ECA con el HHL, empleando al producto de reacción, es decir al ácido hipúrico para monitorear la cinética, y finalmente se encuentran los resultados obtenidos del efecto causado por los compuestos inhibidores de la ECA: captopril, LQM319 y LQM328. En cada etapa se hará un análisis correspondiente de los resultados.

5.1.1 Resumen de los resultados experimentales.

A continuación se presenta una tabla con los resultados experimentales expresados en forma simplificada, esto con el fin de hacer más sencilla la consulta de algún resultado en específico.

Tabla 1. Resultados generales.

Tipo de análisis	Resultados experimentales
CURVA DE CALIBRACIÓN.	
	SÍ NO
Linealidad del sistema	X
Precisión	X
Exactitud	X
Repetitividad entre días	X
CINÉTICA ENZIMÁTICA.	
Ecuación Lineweber-Burk	$y = 2E-09x + 7E-07$
Km	0.00285714
Vmáx	1428571.43
PORCENTAJE DE INHIBICIÓN.	
Captopril	69.123 %
LQM319	39.440 %
LQM328	10.572 %
LQM328	

5.2 Curvas de calibración.

De acuerdo con la guía de validación de métodos analíticos editada por el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos de México A.C. La linealidad del sistema es su habilidad para asegurar que los resultados analíticos pueden ser obtenidos directamente o por medio de una transformación matemática bien definida, demuestra que son proporcionales a la concentración de las sustancias dentro de un intervalo determinado. (U.S. Department of Health and Human Services; Food and Drug Administration; Center for Drug Evaluation and Research (CDER); Center for Veterinary Medicine (CVM) , 2001)

El rango es el intervalo comprendido entre los niveles superior e inferior de concentración del analito de interés, en el cual se ha demostrado que el método es preciso, exacto y lineal, bajo las condiciones establecidas.

Para realizar la linealidad del sistema se construyó una curva de calibración de 6 niveles de diferente concentración por triplicado, preparadas a partir de una misma solución patrón, esto es recomendado por la guía ICH Q2 y por la guía de validación del colegio de QFB mencionada anteriormente. (ICH Harmonised Tripartite Guideline, 2005) (Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México, A. C., 1998)

La linealidad del sistema fue evaluada por un análisis estadístico y una inspección visual en un gráfico de la respuesta analítica (absorbancia) como una función del analito, en donde se aprecia una relación lineal, como es recomendado por la ICH Q2. Así mismo fueron considerados el coeficiente de correlación (r) coeficiente de determinación (r^2), la pendiente, conocida también como coeficiente de regresión (m), la ordenada al origen (b) y el coeficiente de variación global, (CV).

Para la evaluación de la linealidad del sistema se realizaron tres ensayos de la curva de calibración, es decir 3 curvas de calibración, cada una con las características ya mencionadas de 6 niveles cada nivel por triplicado.

Para evaluarla se muestra en las **tablas 2, 4 y 6** y en los **gráficos 1, 3 y 5** que el cambio de la respuesta analítica del ácido hipúrico es directamente proporcional a la concentración.

Los resultados obtenidos experimentalmente fueron tratados para obtener el análisis de regresión, el C.V. el intervalo de confianza (al 95%) de la ordenada al origen para determinar que el sistema era lineal.

Una prueba adicional para corroborar que el sistema era lineal fue un análisis de varianza la cual se puede analizar en las **tablas 3, 5 y 7** y para el cual se establecieron las siguientes hipótesis:

- H_0 : No existe una relación lineal entre la concentración y la respuesta analítica.
- H_a : Existe una relación lineal entre la concentración y la respuesta analítica.

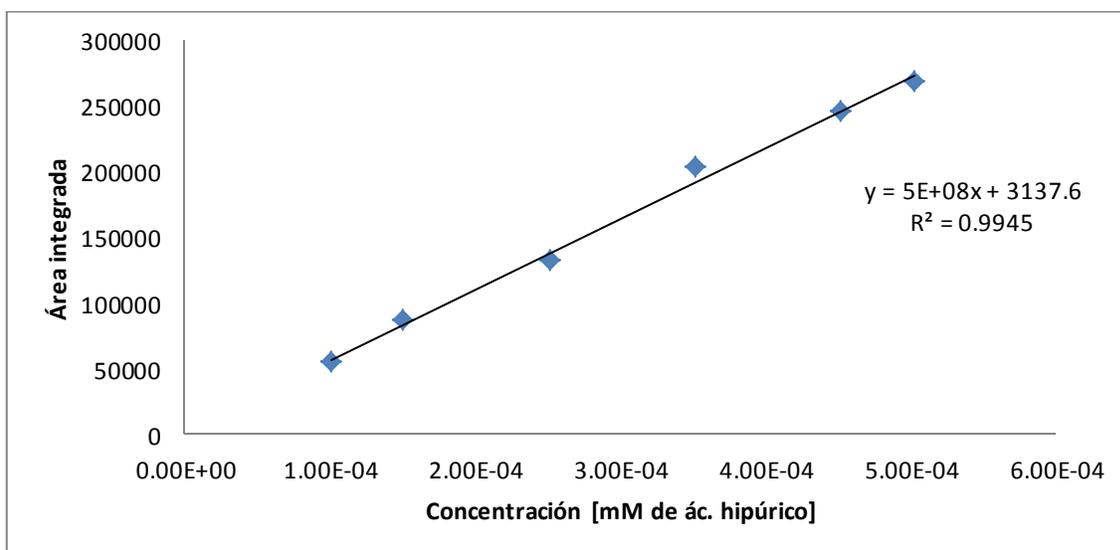
Criterio de aceptación:

Si $P(f) < 0.05$ Se rechaza H_0 .

Si $P(f) > 0.05$ No se rechaza H_0 .

De acuerdo con la hipótesis establecida y los resultados obtenidos del análisis de variancia ($P(f) < 0.05$) se evidenció estadísticamente que existe una relación lineal entre la respuesta analítica y la concentración de ácido hipúrico.

5.2.1 Linealidad del sistema.



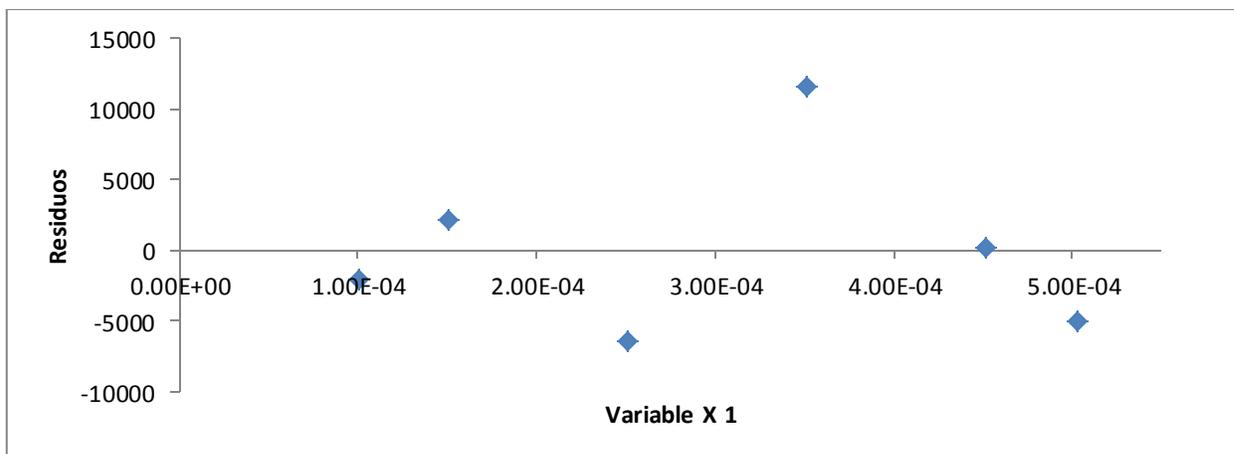
Grafica 1. Área integrada en función de la concentración del ácido hipúrico [mM]. Se puede observar que existe una relación lineal entre la concentración del HA y el área obtenida.

Tabla 2. Resultados de las estadísticas de regresión para la determinación de la linealidad del sistema.

Estadísticas de la regresión	
Coefficiente de correlación múltiple	0.99722844
Coefficiente de determinación R^2	0.99446457
R^2 ajustado	0.99308071
Error típico	7268.33388
Observaciones	6
C.V. general	3.93597742

Tabla 3. Tabla del análisis de varianza para la determinación de la linealidad del sistema.

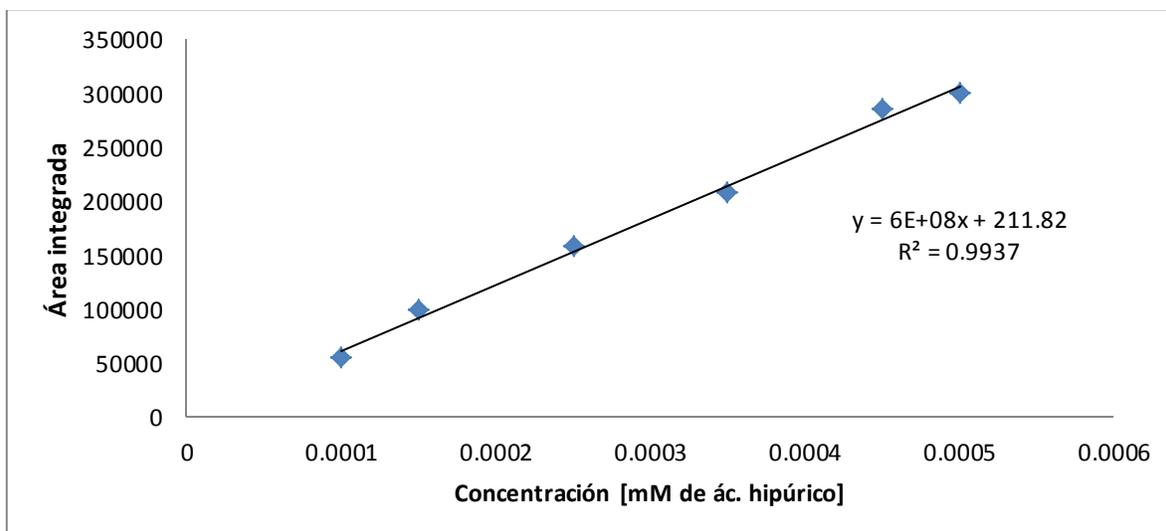
ANÁLISIS DE VARIANZA					
	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	3.7964E+10	3.7964E+10	718.617 695	1.1512E-05
Residuos	4	211314710	52828677.4		
Total	5	3.8175E+10			



Gráfica 2. Errores relativos o residuales, en la gráfica se puede observar que los valores de los residuales obtenidos muestran una tendencia.

Al hacer un análisis de linealidad para el diagnóstico de una regresión, se debe considerar la probable aparición de datos anómalos entre las observaciones experimentales, que pueden ser determinados mediante un gráfico de residuos. Los resultados anómalos surgen inevitablemente en los experimentos de calibración, pero resulta más complicado tratar con ellos en la estadística de regresión. Estos gráficos revelan de manera muy clara valores sospechosos, pero no proporcionan criterios que se puedan utilizar inmediatamente para rechazarlos o aceptarlos. Además resultan de un valor limitado de puntos de calibrado que es a menudo pequeño.

En los **gráficos 2, 4 y 6**; de errores relativos o de los residuales se puede apreciar que de acuerdo con el diagnóstico de la regresión hay una distribución satisfactoria de los residuos ($Y_i - \hat{Y}_i$) al menos en parte ya que en el **gráfico 2** se aprecia un posible valor anómalo, y en la **grafica 6** éstos tienden a crecer a medida que crece el valor individual (y_i), sin embargo cuando se hace la prueba de repetitividad entre días de acuerdo al análisis de varianza y a las pruebas de hipótesis el análisis estadístico muestra que con una confianza del 95% hay suficiente evidencia para demostrar que las variaciones presentadas entre las curvas se deben probablemente al azar.



Grafica 3. Área integrada en función de la concentración del ácido hipúrico [mM]. Se puede observar que existe una relación lineal entre la concentración del HA y el área obtenida.

Tabla 4. Resultados de las estadísticas de regresión para la determinación de la linealidad del sistema.

Estadísticas de la regresión	
Coefficiente de correlación múltiple	0.99686069
Coefficiente de determinación R ²	0.99373124
R ² ajustado	0.99216405
Error típico	8744.74102
Observaciones	6
C.V. gral	6.79257063

Tabla 5. Tabla del análisis de varianza para la determinación de la linealidad del sistema.

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	4.8489E+10	4.8489E+10	634.084	1.4767E-05
Residuos	4	305881982	76470495.4	83	
Total	5	4.8795E+10			

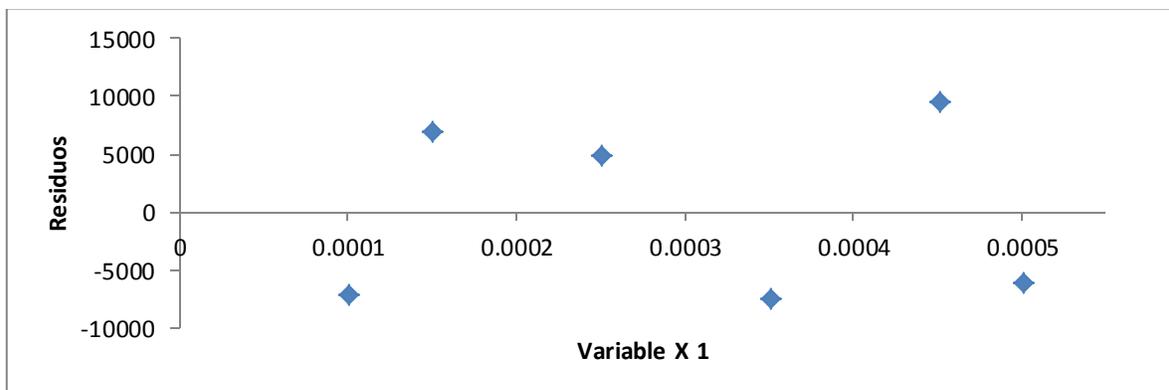
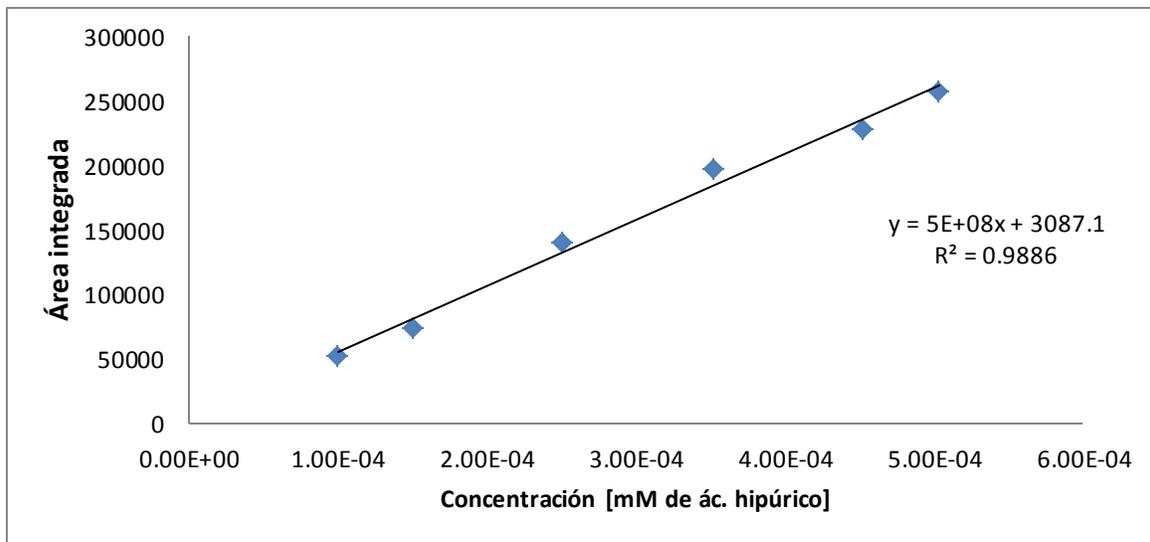
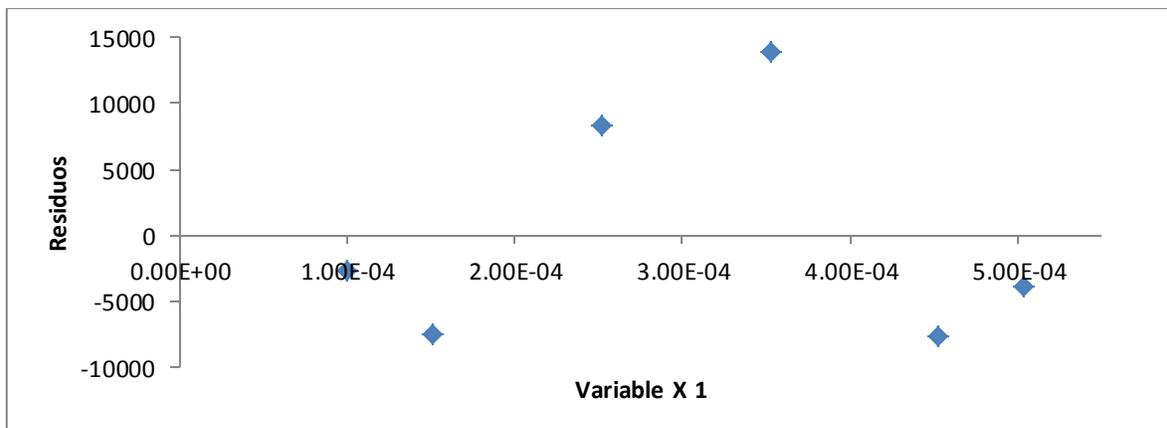


Gráfico 4. Errores relativos o residuales, en la gráfica se puede observar que los valores de los residuales obtenidos muestran una tendencia.



Gráfica 5. Área integrada en función de la concentración del ácido hipúrico [mM]. Se puede observar que existe una relación lineal entre la concentración del HA y el área obtenida.



Gráfica 6. Errores relativos o residuales, en la gráfica se puede observar que los valores de los residuales obtenidos no muestran una tendencia.

Tabla 6. Resultados de las estadísticas de regresión para la determinación de la linealidad del sistema.

Estadísticas de la regresión	
Coeficiente de correlación múltiple	0.99427609
Coeficiente de determinación R ²	0.98858494
R ² ajustado	0.98573118
Error típico	10005.0691
Observaciones	6
CV	5.94813493

Tabla 7. Tabla del análisis de varianza para la determinación de la linealidad del sistema.

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	3.4677E+10	3.4677E+10	346.414 4148	4.90509E- 05
Residuos	4	400405630	100101408		
Total	5	3.5077E+10			

5.2.2 Precisión.

La precisión de un método analítico describe la cercanía entre las mediciones individuales de un analito, cuando el procedimiento es aplicado repetidamente a múltiples alícuotas. Se recomienda preparar por lo menos un sextuplicado de soluciones a la concentración del analito que represente la concentración de la solución de referencia utilizada en ciertos casos y e la concentración que represente el 100% de la muestra. De acuerdo con la ICH Q2 se acepta un coeficiente de variación de hasta un 15% y de hasta un 20% si se trata del límite de cuantificación más bajo.

Para la determinación de la precisión se hizo un análisis de inferencia estadística, mediante intervalos de confianza y pruebas de hipótesis. En las **tablas 8, 9 y 10** se puede

observar que las muestras empleadas para la estimación de la precisión entran en el intervalo con una confianza del 95% , con una probabilidad de cometer el error (nivel de significancia, $\alpha=0.05$) de un 5% . Se hizo una afirmación relativa mediante una hipótesis estadística, donde se aceptó la hipótesis nula ya que las muestras caían dentro del intervalo de confianza como ya se mencionó con anterioridad.

Tabla 8. Tabla para la determinación de la precisión mediante intervalos de confianza.

solución	[HA]	Área	Área /[HA]	Muestra	Población
1	0.00010029	55863	557004716	636246829	595226663.8
1	0.00010029	62376	621945227	52710905.5	66721892.22
1	0.00010029	65479	652884948	8.28466297	11.20949317
1	0.00010029	63766	635804786		
1	0.00010029	72252	720417893		
1	0.00010029	63126	629423406		

Intervalo de confianza ó $\sigma = P \quad x - t \frac{s}{n} < \mu < x + t \frac{s}{n}$

- 1) $H_0 = 595226663.8$
 $H_a \neq 595226663.8$
- 2) $\alpha = 0.05\%$ $\sigma = 0.95\%$
- 3) Se rechaza H_0 si μ cae fuera del intervalo $x - t \frac{s}{n}$, $x + t \frac{s}{n}$
 $P \quad 525205837.2 < \mu < 665247490.1 \quad \mu = 636,246,829; t = 2.5706$
- 4) Lo anterior significa que no hay evidencia suficiente para asegurar que μ sea diferente de H_0 . En otras palabras es probable que las diferencias observadas se deban al azar.

Tabla 9. Tabla para la determinación de la precisión mediante intervalos de confianza y análisis de varianza.

solución	[HA]	Área	Área /[HA]	Muestra	Población
3	0.00025073	159413	635796809	615480091	595226663.8
3	0.00025073	166610	664501053	37959180.3	66721892.22
3	0.00025073	140373	559858390	6.16740994	11.20949317
3	0.00025073	150014	598310191		
3	0.00025073	160342	639501998		
3	0.00025073	149162			

Intervalo de confianza ó $\sigma = P \quad x - t \frac{s}{n} < \mu < x + t \frac{s}{n}$

- 1) $H_0 = 595226663.8$
 $H_a \neq 595226663.8$
- 2) $\alpha = 0.05\%$ $\sigma = 0.95\%$
- 3) Se rechaza H_0 si μ cae fuera del intervalo $x - t \frac{s}{n}$, $x + t \frac{s}{n}$ $P \ 525205837.2 < \mu < 665247490.1$ $\mu = 615480091$; $t = 2.5706$
- 4) Lo anterior significa que no hay evidencia suficiente para asegurar que μ sea diferente de H_0 . En otras palabras es probable que las diferencias observadas se deban al azar.

Tabla 10. Tabla para la determinación de la precisión mediante intervalos de confianza y análisis de varianza.

solución	[HA]	Área	Área /[HA]	Muestra	Población
6	0.000502334	273006	543474954	533953071	595226663.8
6	0.000502334	206401	410883915	62450364.2	66721892.22
6	0.000502334	268824	535149818	11.6958526	11.20949317
6	0.000502334	285441	568229396		
6	0.000502334	290064	577432434		
6	0.000502334	285601	568547909		

Intervalo de confianza ó $\sigma = P \quad x - t \frac{s}{n} < \mu < x + t \frac{s}{n}$

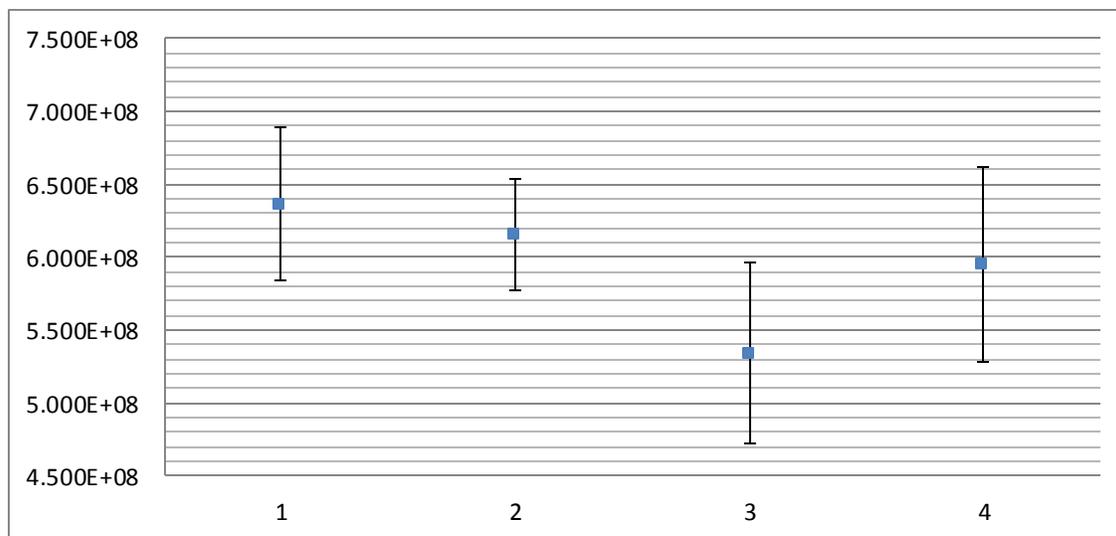
- 1) $H_0 = 595226663.8$
 $H_a \neq 595226663.8$
- 2) $\alpha = 0.05\%$ $\sigma = 0.95\%$

- 3) Se rechaza H_0 si μ cae fuera del intervalo $x - t \frac{s}{n}$, $x + t \frac{s}{n}$ P 525205837.2 <
 $\mu < 665247490.1$ $\mu=533953071$; $t=2.5706$
- 4) Lo anterior significa que no hay evidencia suficiente para asegurar que μ sea diferente de H_0 . En otras palabras es probable que las diferencias observadas se deban al azar.

5.2.3 Exactitud.

La exactitud es el grado de concordancia entre el valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia. A diferencia de la precisión que mide el error aleatorio, la exactitud mide el error sistemático o la tolerancia hacia él. Se requiere que el valor medido de las muestras no difiera significativamente con el valor de referencia. La exactitud debe ser evaluada realizando la determinación de la concentración de tres diferentes muestras, con seis ensayos cada una. Para hacer el análisis estadístico de la exactitud se hizo un gráfico de cotizaciones (**gráfica 7**) donde se contrastaban las medias muestrales con la media poblacional, cuyas barras de error pertenecían a sus correspondientes desviaciones estándar, ya que se presenta una intersección entre todas las barras de error se dice que no hay diferencia significativa entre las muestras. Y por lo tanto que el método es exacto.

Para corroborar lo anterior se hizo un análisis de varianza de un solo factor con un nivel de significancia de 0.01, y se encontró que hay una diferencia entre la media muestral y la media poblacional, ésta variación se podría deber a la variación propia del equipo y al tipo de inyección empleada.



Gráfica 7. Determinación de la exactitud. Se puede observar la intersección de las barras de error asociadas a la desviación estándar de las medias muestrales (1, 2 y 3) con el valor de la media poblacional (4).

Tabla 11. Tabla para la determinación de la precisión mediante intervalos de confianza y análisis de varianza.

	muestra 1	muestra 3	muestra 6	población X
X	636246829	615480091	533953071	595226663.8
s	52710905.5	37959180.3	62450364.2	66721892.22
CV	8.28466297	6.16740994	11.6958526	11.20949317

Análisis de varianza de un factor. $\alpha=0.01$

Tabla 12. Resumen del análisis de varianza de un solo factor.

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Columna 1	6	3817480975	636246829	2.7784E+15
Columna 2	6	3692880547	615480091	1.4409E+15
Columna 3	6	3203718427	533953071	3.9E+15

Tabla 13. Análisis de varianza.

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	3.5084E+16	2	1.7542E+16	6.48149628	0.00936067	6.35887348
Dentro de los grupos	4.0597E+16	15	2.7065E+15			
Total	7.5681E+16	17				

5.2.4 Repetitividad entre días.

La repetitividad entre días es la precisión de un método analítico expresado como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas bajo las mismas condiciones de análisis (analista, instrumentos, laboratorios) pero en días diferentes.

Para la realización del análisis estadístico de ésta prueba se hizo también una inferencia estadística mediante intervalos de confianza con sus respectivas pruebas de hipótesis y un análisis de varianza. Éste análisis se puede observar en las **tablas 14 y 15**, con una confianza del 99% para el análisis de varianza y del 95% para los intervalos de confianza.

Tabla 14. Determinación de la repetitividad entre días.

Días	[ác. hipúrico]	area	area/[ác. hip.]	Parámetros estadísticos.
1	0.00010064	51931.6667	516004698	X 522252619
	0.00015096	73041	483834515	S 31064290.4
	0.0002516	140450	558217092	cv 5.94813493
	0.00035225	197703.667	561265147	
	0.00045289	227759.333	502903970	
	0.00050321	257286	511290291	

2	0.00010047	54999.6667	547441106	X	550603263
	0.0001507	86359.3333	573053764	S	21671620.1
	0.00025117	131745.667	524534041	cv	3.93597742
	0.00035163	203835.667	579681554		
	0.0004521	246375	544956040		
	0.00050233	268222.833	533953071		
3	0.00010029	54033.3333	538761282	X	606402891
	0.00015044	98610.25	655489016	S	41190344.6
	0.00025073	157640.667	628728101	cv	6.79257063
	0.00035102	206401.667	588003313		
	0.00045131	284493	630367318		
	0.00050146	299405.25	597068315		
		X	559752924		
		S	47062986.8		
		cv	8.40781437		

Intervalo de confianza ó $\sigma = P \quad x - t \frac{s}{n} < \mu < x + t \frac{s}{n}$

- 1) $H_0 = 559752924$
 $H_a \neq 559752924$
- 2) $\alpha = 0.005\%$ $\sigma = 0.995\%$
- 3) Se rechaza H_0 si μ cae fuera del intervalo $x - t \frac{s}{n}$, $x + t \frac{s}{n}$
 $P \quad 527603619.3 < \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 < 591902228.7$
 $\mu_1 = 522252619$; $\mu_2 = 550603263$; $\mu_3 = 606402891$; $t = 2.8982$
- 4) Lo anterior significa que hay evidencia suficiente para asegurar que μ sea diferente de H_0 .

Con una confianza del 95 % se puede decir que no hay evidencia suficiente para asegurar que hay repetitividad entre días. Aunque estadísticamente no se puede hablar de una repetitividad entre días experimentalmente, químicamente se puede explicar éste hecho con base en la complejidad de la técnica y específicamente de la inyección utilizada.

Análisis de varianza de un solo factor. Alfa 0.05

Tabla 15. Resumen del análisis de la repetitividad entre días.

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Columna 1	6	948171.667	158028.611	7015395227
Columna 2	6	991538.167	165256.361	7634987420
Columna 3	6	1100584.17	183430.694	9758932619

Tabla 16. Análisis de varianza, resumen del análisis de la repetitividad entre días.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	2055625200	2	1027812600	0.12632	0.882258	3.68232034
Dentro de los grupos	1.2205E+11	15	8136438422			
Total	1.241E+11	17				

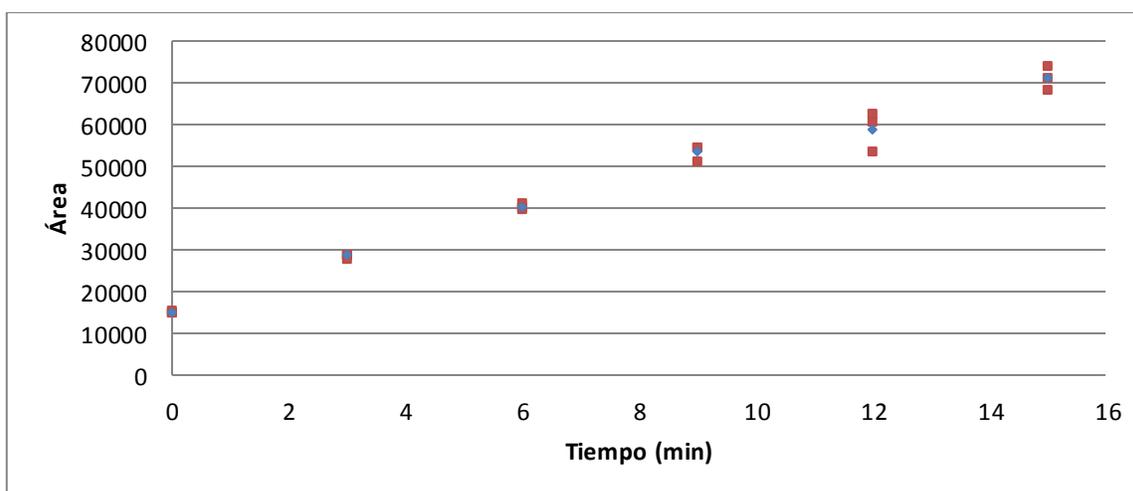
5.3 Cinética de la ECA con el HHL.

Una vez que se obtuvo un método experimental confiable se procedió a la segunda fase experimental en la que se hizo una cinética enzimática con la finalidad de obtener el tiempo óptimo en el que habría una mayor producción de ácido hipúrico, para que fuera apreciable la inhibición por el captopril y los inhibidores LQM319 y LQM328.

5.3.1 Resultados experimentales de la cinética de la ECA con el HHL determinados a partir de la producción de ác. hipúrico.

En la **gráfica 8** se aprecia que a un tiempo de 15 min se obtiene la mayor área, ésta es la que fue empleada para los posteriores análisis, sin embargo no fue tan alta como se esperaba.

La cinética enzimática de la ECA con el HHL fue realizada como ya se mencionó con la finalidad de obtener la máxima producción de ácido hipúrico sin embargo los resultados obtenidos de éste experimento se analizaron para determinar los parámetros cinéticos, la K_m , la $V_{máx}$ y la ecuación del fragmento de orden 0 de la cinética.



Gráfica 8. Cinética de la ECA, se puede observar el área en función del tiempo y se aprecia el cambio de orden cero a orden mixto.

Tabla 17. Área obtenida de HA en función del tiempo en la cinética de la ECA en presencia de HHL sin presencia de inhibidor.

Tiempo	área	Parámetros estadísticos	
15	68349	71121.6667	x
15	70981	2845.60878	s
15	74035	4.00104344	cv
12	53248	58695.6667	x
12	60497	4807.1624	s
12	62342	8.18997836	cv

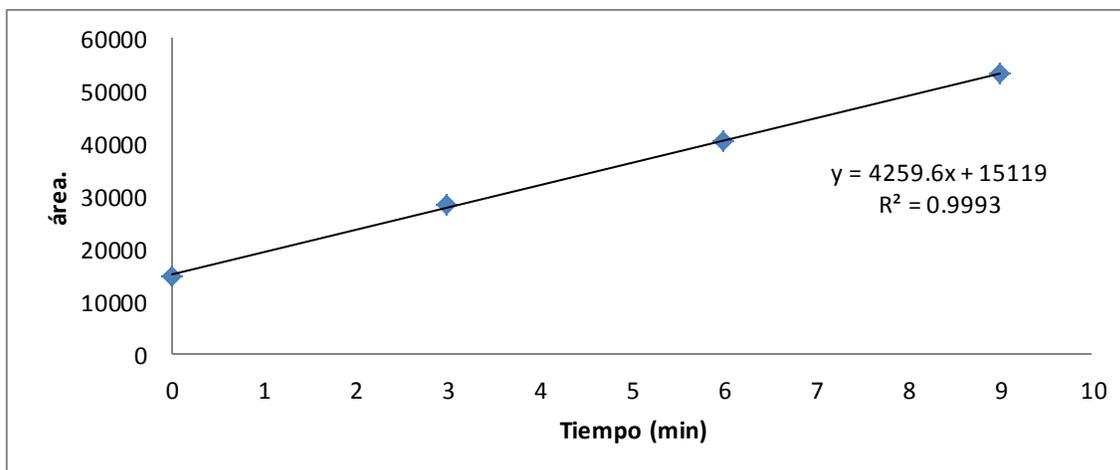
9	51190	53491.3333	x
9	54628	1993.0623	s
9	54656	3.72595368	cv
6	39486	40320.6667	x
6	41199	857.334435	s
6	40277	2.12629033	cv
3	28931	28502.6667	x
3	28593	479.91909	s
3	27984	1.68376909	cv
0	14835	15073.6667	x
0	15472	347.220871	s
0	14914	2.3034931	cv

**Tabla 18. Cinética enzimática.
Valor promedio de las áreas en
función del tiempo.**

15	71121.6667
12	58695.6667
9	53491.3333
6	40320.6667
3	28502.6667
0	15073.6667

5.3.2 Análisis del segmento de orden 1 de reacción enzimática de la ECA con el HHL.

Las cinéticas enzimáticas presentan tres ordenes de reacción, el primero es orden 1, el segundo es mixto y finalmente presentan un orden 0. La ecuación de linealidad y el coeficiente de determinación del fragmento de orden 1 de la cinética enzimática sin tratamiento matemático de linealización se pueden apreciar en la **gráfica 9**.



Gráfica 9. Segmento de orden 1 de la cinética de la ECA y el HHL sin presencia del inhibidor. Se puede apreciar que el coeficiente de determinación es de 0.9993.

5.3.3 Análisis de la relación de la concentración de ác. hipúrico producido en la reacción enzimática de la ECA.

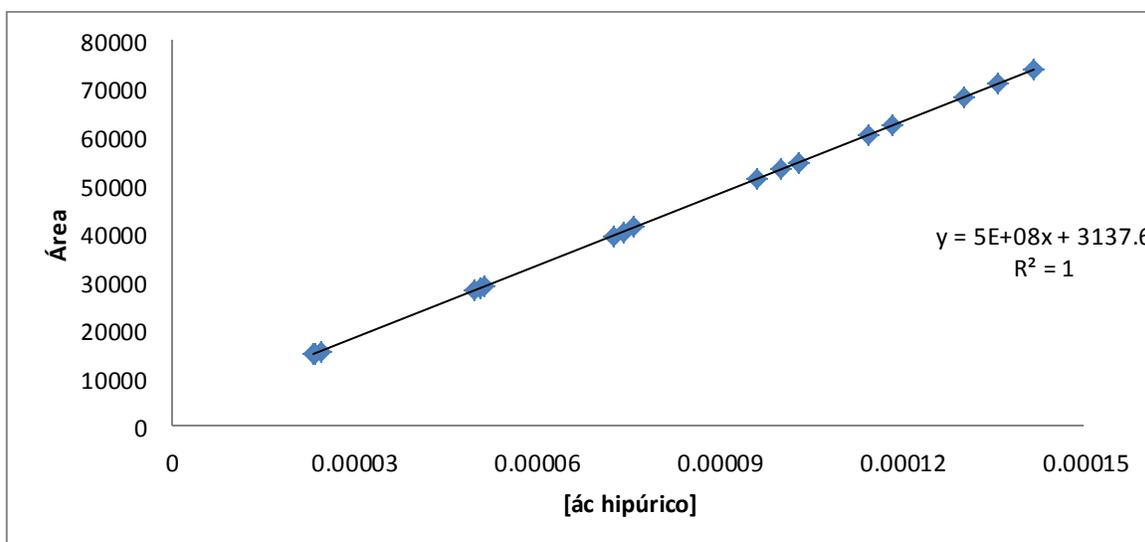
La cinética enzimática fue monitoreada en función de la concentración de ác. hipúrico, que como se puede observar en la siguiente reacción, corresponde al producto de la reacción. De acuerdo con la relación estequiométrica por cada mol de HHL se producirá un mol de ác. hipúrico.



Se esperaba que a un tiempo de 15 minutos la cantidad producida de ácido hipúrico correspondiera al valor medio de la curva de calibración, pero como se puede observar en la **tabla 19**, al tiempo de 15 min la producción de ácido corresponde al nivel más bajo de la curva de calibración. Para que la producción de ácido hipúrico fuera mayor se tenían dos opciones, las cuales no eran viables por las condiciones experimentales; la primera era aumentar el tiempo de la cinética lo que incrementaría los tiempos de análisis y la segunda aumentar las unidades enzimáticas en la reacción, en cualquiera de los dos casos se debía hacer un nuevo método.

Tabla 19. Concentración de HA como producto de la reacción enzimática entre la ECA y el HHL determinada mediante la ecuación de la curva de calibración 1.

tiempo	Concentración de HA determinada con la curva 1	área
15	0.00013042	68349
15	0.00013569	70981
15	0.00014179	74035
12	0.00010022	53248
12	0.00011472	60497
12	0.00011841	62342
9	9.6105E-05	51190
9	0.00010298	54628
9	0.00010304	54656
6	7.2697E-05	39486
6	7.6123E-05	41199
6	7.4279E-05	40277
3	5.1587E-05	28931
3	5.0911E-05	28593
3	4.9693E-05	27984
0	2.3395E-05	14835
0	2.4669E-05	15472
0	2.3553E-05	14914



Gráfica 10. Gráfico de la concentración de HA de producto de la reacción de la cinética enzimática de la ECA con el HHL en función el área.

En la **gráfica 10** se puede observar la relación entre la concentración de ác. hipúrico y el área obtenida, ésta es el tratamiento previo de los datos para hacer la linealización de lineweber & Burk.

5.3.4 Determinación de los parámetros cinéticos mediante la ecuación de lineweber & Burk.

En la **tabla 20** se observa que la cantidad máxima de ác. hipúrico que se obtuvo en la cinética fue al tiempo de 15 min, partiendo de éste resultado se fijarían las condiciones para la siguiente parte de la experimentación, es decir la determinación de la inhibición de los compuestos se haría en un tiempo de 15 minutos.

En la **gráfica 11** se observa el tratamiento matemático de los datos de la cinética para la obtención de los parámetros cinéticos de Km y Vmax, y en la **tabla 21** se encuentran éstos valores.

Tabla 20. Parámetros para la elaboración de un gráfico de lineweber & Burk.

tiempo	1/[HA]	1/área
15	7667.37104	1.46308E-05
15	7369.91365	1.40883E-05
15	7052.4448	1.35071E-05
12	9977.96865	1.878E-05
12	8716.96705	1.65297E-05
12	8445.31825	1.60406E-05
9	10405.3075	1.95351E-05
9	9710.54799	1.83056E-05
9	9705.27035	1.82963E-05
6	13755.7637	2.53254E-05
6	13136.6686	2.42724E-05
6	13462.7915	2.48281E-05
3	19384.8039	3.4565E-05
3	19642.1977	3.49736E-05
3	20123.6396	3.57347E-05
0	42744.5415	6.74082E-05
0	40537.0346	6.46329E-05
0	42457.7969	6.70511E-05

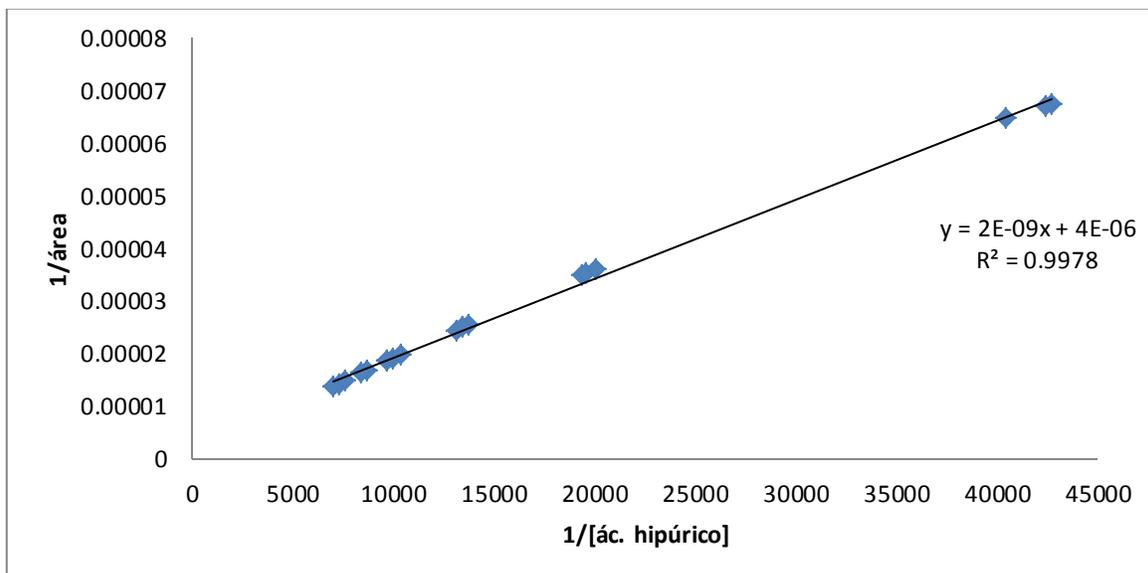


Tabla 21. Parámetros obtenidos de la cinética enzimática.

km	Vmax	1/vmax
5.00E-04	2.50E+05	4.00E-06

5.4 Determinación de la inhibición de la ECA por los compuestos captopril, LQM319 y LQM328.

El objetivo de éste proyecto de investigación era medir el efecto de inhibición de los LQM319 y LQM328 frente al captopril de una forma cuantitativa. Como ya se mencionó anteriormente la cantidad máxima de ácido hipúrico que se produjo en la cinética correspondía al nivel más bajo de la curva de calibración, esto implica que al efectuarse la inhibición de la ECA, la cantidad producida de ácido hipúrico disminuiría y por ende los resultados ya no serían cuantitativos.

Se sabe que existe un error experimental al hacer una interpolación en química, ya que no existe evidencia que justifique que los datos se comportarán bajo una misma tendencia fuera de un intervalo que ha sido evaluado estadísticamente, por lo tanto no es apropiado interpolar.

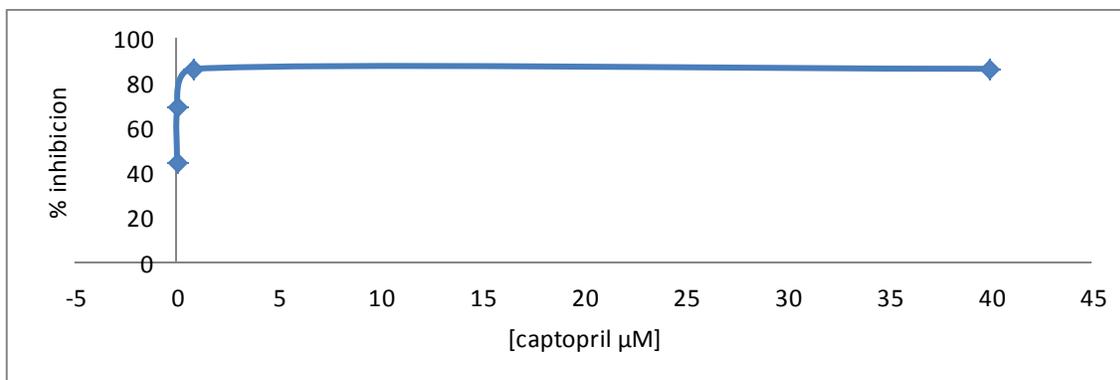
Ya se mencionó anteriormente, que pese al largo tiempo de análisis la cantidad de ácido hipúrico producido por la reacción enzimática no fue tan alta como se esperaba, por lo tanto no se pudo determinar en una forma cuantitativa la inhibición de la enzima por los inhibidores.

Se decidió hacer una determinación cualitativa con los resultados obtenidos empleando porcentajes, ya que el equipo proporcionaba señales reproducibles bajo las condiciones experimentales.

5.4.1 Determinación del % de inhibición de la producción de ác. hipúrico en la reacción enzimática en presencia de diferentes concentraciones de captopril.

Una vez que se obtuvo el tiempo óptimo de análisis que fue de 15 minutos, se procedió a la determinación de la concentración de captopril que diera como resultado una inhibición adecuada, las concentraciones empleadas fueron de 40, 0.8, 0.0255 y 1.26×10^{-3} μM , como se pueden apreciar en la **tabla 22**.

En la **gráfica 12**, se observa la inhibición de la reacción en un 86.41% a una concentración de 0.8 μM , la que de acuerdo con la experimentación es la inhibición máxima, sin embargo se procedió a emplear la concentración de 0.0255 μM , para observar si los LQM's presentaban menor o mayor inhibición que el captopril a esa misma concentración.



Gráfica 12. Porcentaje de inhibición en función de la concentración de captopril [μM]. Se puede observar un porcentaje de inhibición de 86.41 % a una [0.8 μM] de captopril.

Tabla 22. % de inhibición de la producción de HA en función de la concentración de captopril.

[captopril μM]	% inhibición
40	86.411
0.8	86.411
0.0255	69.1225
0.00126	44.5345

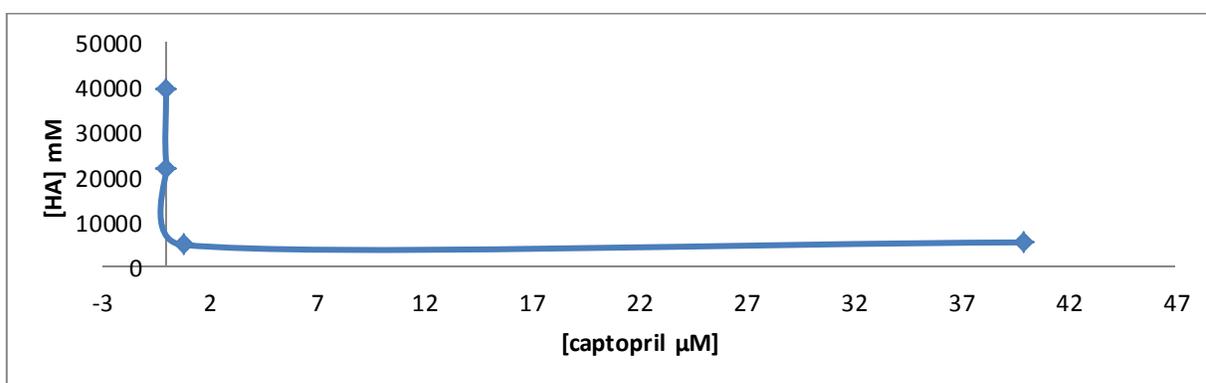
% de Inhibición de la ECA en función de la concentración μM de captopril.

$$\% \text{ inhibición} = 100 - \frac{x}{\text{Blanco}} * 100$$

$$x = [HA]$$

5.4.2 Determinación de la cantidad de ác. hipúrico producido en la reacción enzimática en presencia de diferentes concentraciones de captopril.

En la **gráfica 13** se observa la cantidad producida por la ECA de ácido hipúrico, en función de las concentraciones de captopril empleadas, éstas concentraciones no son validas ya que fueron interpoladas de la ecuación de la curva de calibración de la **gráfica 1**, pero sirven para observar la tendencia de inhibición de la reacción enzimática.



Gráfica 13. Producción de HA a una [0.8 µM] de captopril. Se puede observar la máxima inhibición de la producción de HA a ésta concentración.

Tabla 23. Producción de HA en función de la concentración de captopril.*

[captopril µM]	[HA]
40	5395.41667
0.8	4832.83333
0.0255	21960.3333
0.00126	39448

*A una [0.8 µM] de captopril la producción de HA ya no es cuantitativa con el método empleado ya que es inferior al determinado mediante las curvas de calibración.

5.4.3 Determinación del porcentaje de inhibición (% de inhibición) de la producción de ác. hipúrico en la reacción enzimática en presencia de los compuestos LQM319 y LQM328 usando como referencia una concentración de captopril de [25.5]mM.

Se procedió a hacer un análisis exploratorio de forma cualitativa en porcentajes para observar la tendencia que seguiría la ECA en presencia de los compuestos. En la **tabla 24**, se observa que a una concentración de 25.5nM el captopril presentó una inhibición de la reacción enzimática de un 69.12%; el LQM319 una inhibición del 39.44% ; y el LQM328 tuvo que ser repetido dos veces ya que los coeficientes de variación en la mediciones fueron muy altos y presentaban por ende una dispersión que no es aceptable por las guías de validación; las inhibiciones del LQM328 fueron 10.57 y 9.68%, éstos resultados se expresan por separado ya que como se mencionó la dispersión de ambas muestras en cada caso era alta, con un coeficiente de variación del 64 y 42 % respectivamente.

Ésta variación del coeficiente de variación podría deberse a la solubilidad que presentan los compuestos.

Porcentajes de inhibición de la ECA por la inhibición del compuesto LQM319 y LQM328.

$$\% \text{ inhibición} = 100 - \frac{x}{\text{Blanco}} * 100$$

$$X = [HA]$$

Tabla 24. Porcentaje de inhibición de los compuestos: captopril, LQM319 y LQM328 a una concentración [25.5]nM frente a la ECA.

[25.5]nM	Captopril	LQM319	LQM328	LQM328
	68.7184	41.7351	16.7464	6.5194
	70.5392	42.9119	3.33	8.14
	68.111	33.6743	11.64	14.3864
x	69.1228667	39.4404333	10.5721333	9.68193333
s	1.26361932	5.02816416	6.77164689	4.15398496
cv	1.82807713	12.7487548	64.0518491	42.9044987

En los **gráficos 14 y 15** se puede apreciar la inhibición que presentan los compuestos LQM319 y LQM328 con respecto al captopril, y se puede observar que la inhibición a esa concentración presentada por el captopril es mayor.

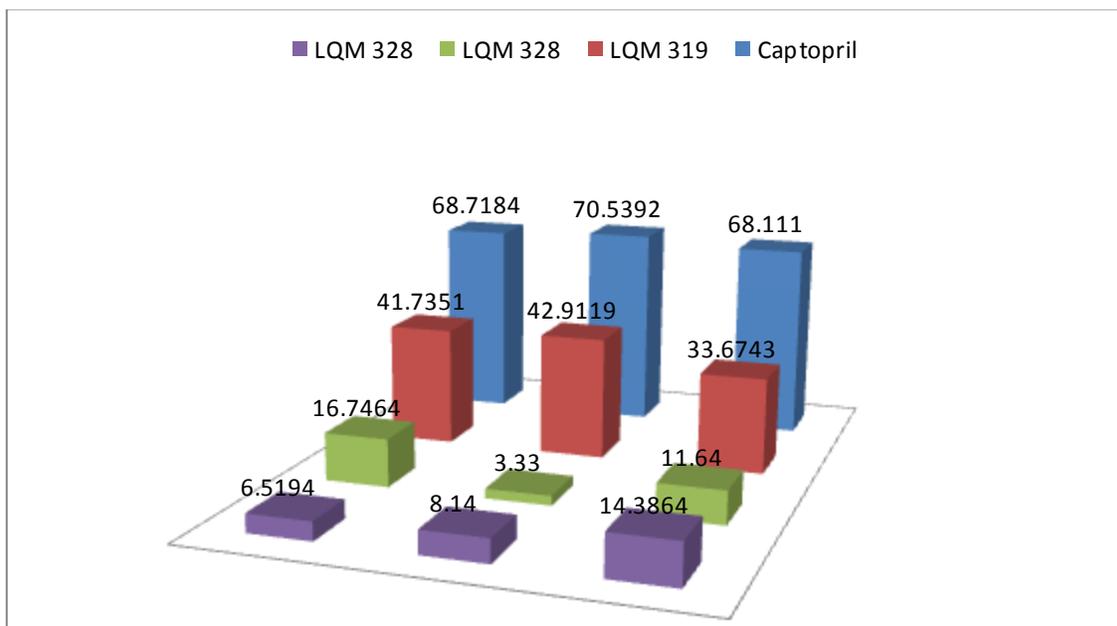
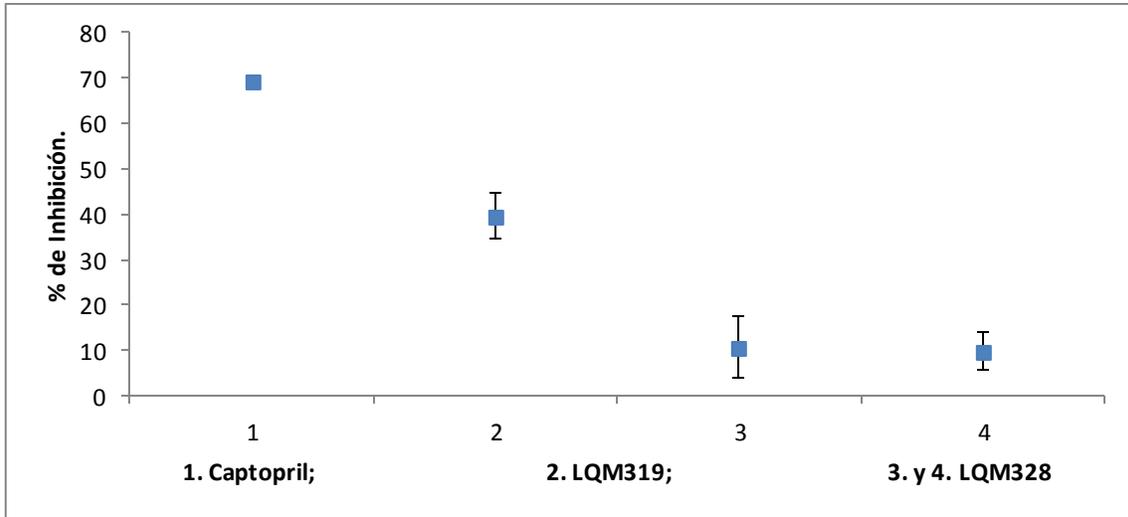


Gráfico 14. % de inhibición por el captopril y los LQM319 y LQM328. Se puede observar que el LQM319 presentó mayor inhibición que el LQM328.



Gráfica 15. % de inhibición promedio con sus respectivas desviaciones estándar como barras de error.

6 Conclusiones.

Conclusiones.

- Los resultados de la experimentación muestran que se determinó el efecto de los compuestos LQM 319 y 328, sobre la cinética enzimática “in vitro” de la Enzima Convertidora de Angiotensina (ECA) y su sustrato hippuryl-L-histidil-leucina; estudiado en un microarreglo por electroforesis capilar y se determinó el cambio en la actividad enzimática de la misma.
- Además se desarrolló un método analítico que es capaz de cuantificar al producto de reacción entre la ECA y el HHL, el ácido hipúrico (HA) con una confianza del 95%, pero en el cual no se pudieron interpolar las concentraciones de la reacción en presencia de los inhibidores, porque éstas salían del intervalo y ya que la extrapolación no proporciona resultados que sean confiables.
- Se aseguró la confiabilidad de la curva de calibración a través de los parámetros de exactitud, precisión, linealidad del sistema y repetitividad entre días.
- El método demostró ser lineal en el rango de concentraciones establecidas, repetible entre días y capaz de cuantificar con precisión y exactitud.
- Se realizó una cinética enzimática entre la ECA y el HHL para determinar el tiempo óptimo en el que se podía apreciar la inhibición de la enzima por el captopril.
- Se hizo una comparación entre el efecto del captopril y los compuestos LQM319 y LQM328 sobre la cinética de la ECA encontrándose que el que presentaba mejor actividad era el LQM319.
- Se desarrolló la habilidad del manejo del equipo de electroforesis capilar, así como del material biológico. (HHL y ECA)

7 Perspectivas.

Perspectivas.

- La optimización del método desarrollado, daría la posibilidad de realizar de forma cuantitativa la determinación del efecto de los compuestos LQM319 y LQM328 sobre la reacción enzimática.
- Validar el desarrollo experimental.
- Se abre también la oportunidad para continuar con el proyecto de investigación y estudiar los mecanismos enzimáticos de inhibición de los compuestos hacia la ECA.
- Sería recomendable hacer estudios fisicoquímicos de solubilidad de los LQM319 y LQM328 para obtener resultados más confiables y reproducibles con coeficientes de variación bajos.
- Desarrollar nuevos métodos analíticos que involucren a fármacos y enzimas y cuyas reacciones se puedan llevar a cabo dentro de un capilar de electroforesis.

8 Referencias.

Referencias:

- Bonesi, M. M. (2010). The synthesis and Angiotensin Converting Enzyme (ACE) inhibitory activity of chalcones and their pyrazole derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters / Elsevier*, 1990-1993.
- Canino de Lambertini, E. (1997). *Hipertensión arterial*. Venezuela: Equinoccio.
- Castagnino, J. M. (2000). Electroforesis capilar. *Bioquímica Vol. 25, No. 1 enero-marzo*, 13-32.
- Castillo, R. M. (2005). *"Fundamentos de electroforesis Capilar"* (1ª ed.). Cuautitlán Izcalli: UNAM, FES Cuautitlán.
- Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos de México, A. C. (1998). Guía de validación de métodos analíticos. 1-43.
- Defillo, M. B. (1984). *Drogas esenciales para el aparato cardiovascular y respiratorio. Farmacología Médica I*. Dominicana: Instituto Tecnológico de Santo Domingo.
- Flores Benitez, F. (2006). *Probabilidad y estadística*. México: ESQUIE IPN-FES-Cuautitlán .
- Garzón , R. (2006). *Bioquímica I. La pregunta como base de la inquietud científica. Orientaciones para el aprendizaje de la Bioquímica*. . Bogotá: Rosarista.
- Harper, H. A. (2007). *"Bioquímica ilustrada de Harper"* (17ª ed.). México , México: El Manual Moderno.
- Harris, C. D. (2002). *"Análisis químico cuantitativo"* (2ª ed.). Barcelona, España: Reverté.
- Hergueta, G. y. (2002). *Guía de la Hipertensión arterial*. (2ª ed.). Madrid, España: Editores Norma Capitel.
- Hillaert, S., & Van den Bosshe, W. (1999). Determination of captopril and its degradation products by capillary electrophoresis. *Journal of pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 65-73.
- Horton, R. H., Moran, L. A., Scrimgeour, G. K., & Perry, M. D. (2008). *Principios de Bioquímica*. (4ª ed.). México: Pearson Educación.
- ICH Harmonised Tripartite Guideline. (2005). Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1). *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human use*, 1-13.
- Mark Berg, J., Stryer, L., & Tymoczko, L. J. (2007). *Bioquímica*. Barcelona: 2008.
- Martínez, R. M. (2003). *"Manual de farmacia práctica"*. Granada: Universidad de Granada.

- McGilvery, W. R. (1977). *Conceptos Bioquímicos*. Barcelona: Reverté.
- Mehana S., A., & Dowling, M. (1999). Liquid chromatographic determination of hippuric acid for the evaluation of ethacrynic acid as angiotensin converting enzyme inhibitor. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 967-973.
- Mehanna, S. A. (1999). "Liquid chromatographic determination of hippuric acid for the evaluation of ethacrynic acid as angiotensin converting enzyme inhibitor". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*(19(1999)), 967 - 973.
- Melo, V., & Cuamatzi, O. (2006). *Bioquímica de los procesos metabólicos*. México: Reverté.
- Mendoza, P. N. (2008). *Farmacología Medica*. (U. F. Medicina, Ed.) México: Panamericana.
- Mongay Fernandez, C. (2005). *Quimiometría*. Valencia: PUV.
- Morales-Suárez-Varela, M. M.-E. (2010). "How ineffective hypertension control in subjects treated with angiotensin-converting enzyme inhibitors is related to polymorphisms in the renin-angiotensin-aldosterone system". *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 380 -386.
- Morales-Suárez-Varela, M. M.-E. (2010). How ineffective hypertension control in subjects treated with angiotensin-converting enzyme inhibitors is related to polymorphisms in the renin-angiotensin-aldosterone system. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 380-386.
- Moronte Zarcero, S., & Sierra Alonso, I. (2008). *Ciencias Experimentales y Tecnología, Desarrollo de Métodos Analíticos para la separación quiral y su aplicación al estudio de procesos de síntesis asimétrica*. Madrid: Universidad Rey Juan Carlos. (Servicio de publicaciones).
- Morris, J. G. (1975). *Serie de Biología Fundamental. Físicoquímica para Biólogos. Conceptos Básicos para las Facultades de Medicina, Farmacia y Biología*. Barcelona: Reverté.
- Murray, K. R. (2006). *Harper Bioquímica Ilustrada*. (17ª ed.). México: Manual Moderno.
- Nagamatsu, I. J.-I. (1981). Tripeptidyl carboxypeptidase activity of kininase II (Angiotensin-converting enzyme). *Biochimica et Biophysica Elsevier/ North Holland Biomedical Press*, 300-307.
- Nováková, S. S. (2003). "Inhibition study of angiotensin converting enzyme by capillary electrophoresis after enzymatic reaction at capillary inlet". *Journal of Chromatography(A)*, 986), 303-311.
- Oliveira, J. V. (2011). Biological and conformational evaluation of angiotensin II lactam bridge containing analogues. *Regulatory Peptides / Elsevier*, 1-7.
- Peña, A. (2004). *Bioquímica*. México: LIMUSA.

- Pripp, A. H. (2007). Docking and virtual screening of ACE inhibitory dipeptides. *Eur Food Res Technol*, 589–592.
- Scragg, A. (1997). *Biotecnología para ingenieros. Sistemas Biológicos en procesos tecnológicos*. México: LIMUSA.
- Sentandreu, M. Á. (29 de Diciembre de 2006). "A fluorescence-based protocol for quantifying angiotensin-converting enzyme activity". *Nature Publishing Group.*, 1(5), 2423-2427.
- Sierra Alonso, I., Pérez Quintanilla, D., Gomez Ruiz, S., & Morante Zarcero, S. (2010). *Análisis Instrumental*. La Coruña: Netbiblo.
- Tortora, J. G. (2005). "*Principios de anatomía y Fisiología*" (9ª ed.). México: Oxford University.
- U.S. Department of Health and Human Services; Food and Drug Administration; Center for Drug Evaluation and Research (CDER); Center for Veterinary Medicine (CVM) . (2001). Bioanalytical Method Validation. *Guidance for Industry*, 1-20.
- U.S. Department of Health and Human Services; Food and Drug Administration; Center for Drug Evaluation and Research (CDER); Center for Veterinary Medicine (CVM); . (Mayo de 2001). *Lab Compliance*. Recuperado el 18 de Junio de 2012, de Lab Compliance: <http://www.labcompliance.de/documents/FDA/FDA-Others/Laboratory/f-507-bioanalytical-4252fml.pdf>
- Universidad de Oviedo, A. E. (2008). *micrux technologies*. Recuperado el 13 de 03 de 2012, de micrux technologies: <http://www.micruxfluidic.com/es/tecnologia.html>
- Universitat de les Illes Balears. (s.f.). *Metabolismo Energético y Nutrición*. Recuperado el 13 de marzo de 2012, de Enzimas: <http://gmein.uib.es/otros/enzimas/Jmoldesarrollo/textos/enzima5.html>
- Universitat de les Illes Balears. (s.f.). *Biopolímeros*. Recuperado el 13 de marzo de 2012, de Enzimas: http://www.uib.es/facultat/ciencias/prof/josefa.donoso/campus/modulos/modulo4/modulo4_14.htm
- Van Dyck, S. S. (2003). "Kinetic study of angiotensin converting enzyme activity by capillary electrophoresis after in-line reaction at the capillary inlet". *Journal of Chromatography (A*, 986), 303-311.
- Velázquez Sánchez, A. M. (2007). *Diseño asistido por computadora, síntesis y actividad antihipertensiva de derivados morfólinicos de fenol*. . México: Programa de maestría y doctorado en ciencias químicas. UNAM.

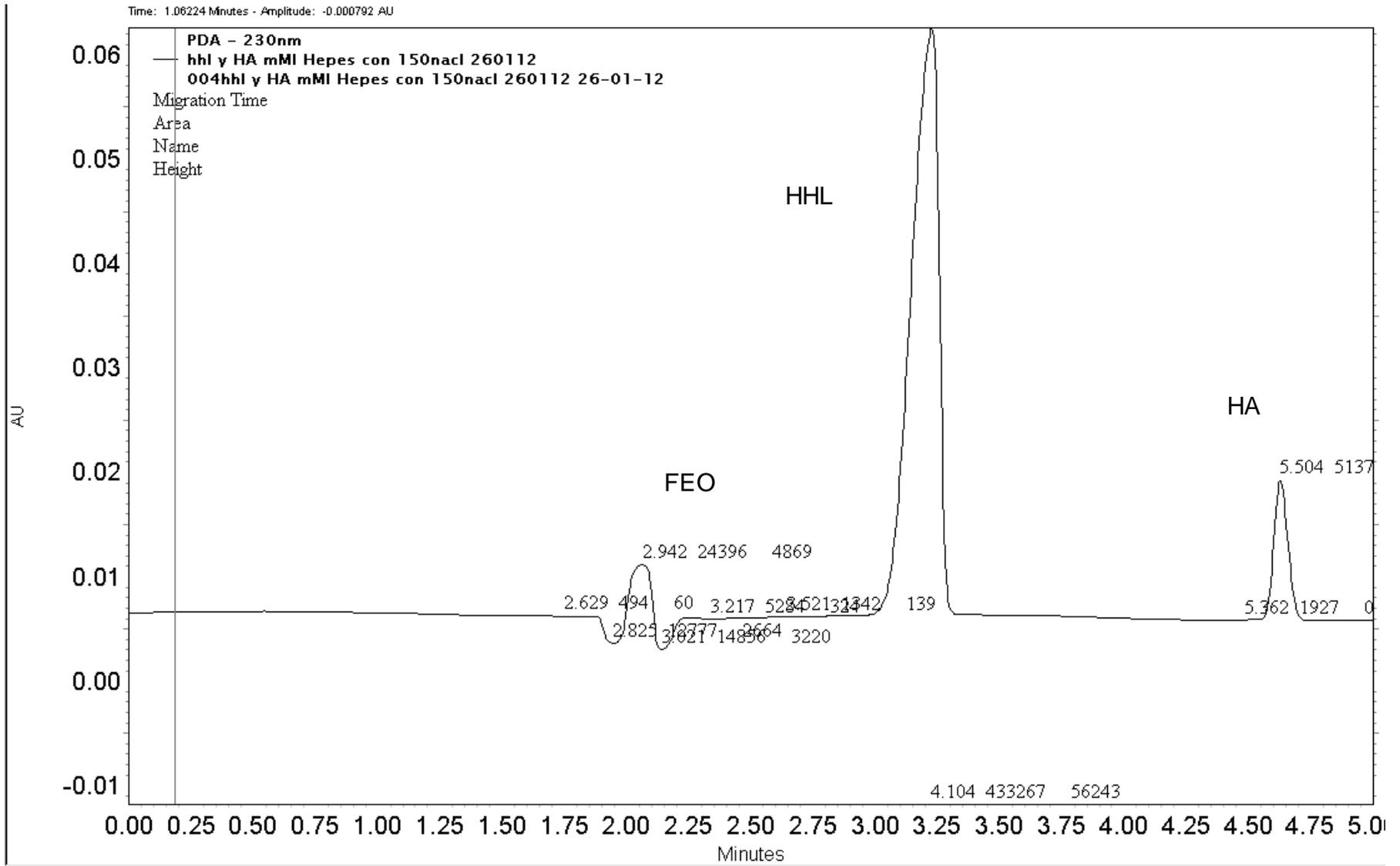
Velazquez, A. M. (2008). "Synthesis and antihypertensive effects of new methylthiomorpholinphenol derivatives". *European Journal of Medicinal Chemistry*, 43 , 486-500.

Vibbiana, S. E. (2012). *Biología Celular y Humana*. Recuperado el 13 de marzo de 2012, de Biología Celular y Humana: http://www.genomasur.com/BCH/BCH_libro/capitulo_02.htm

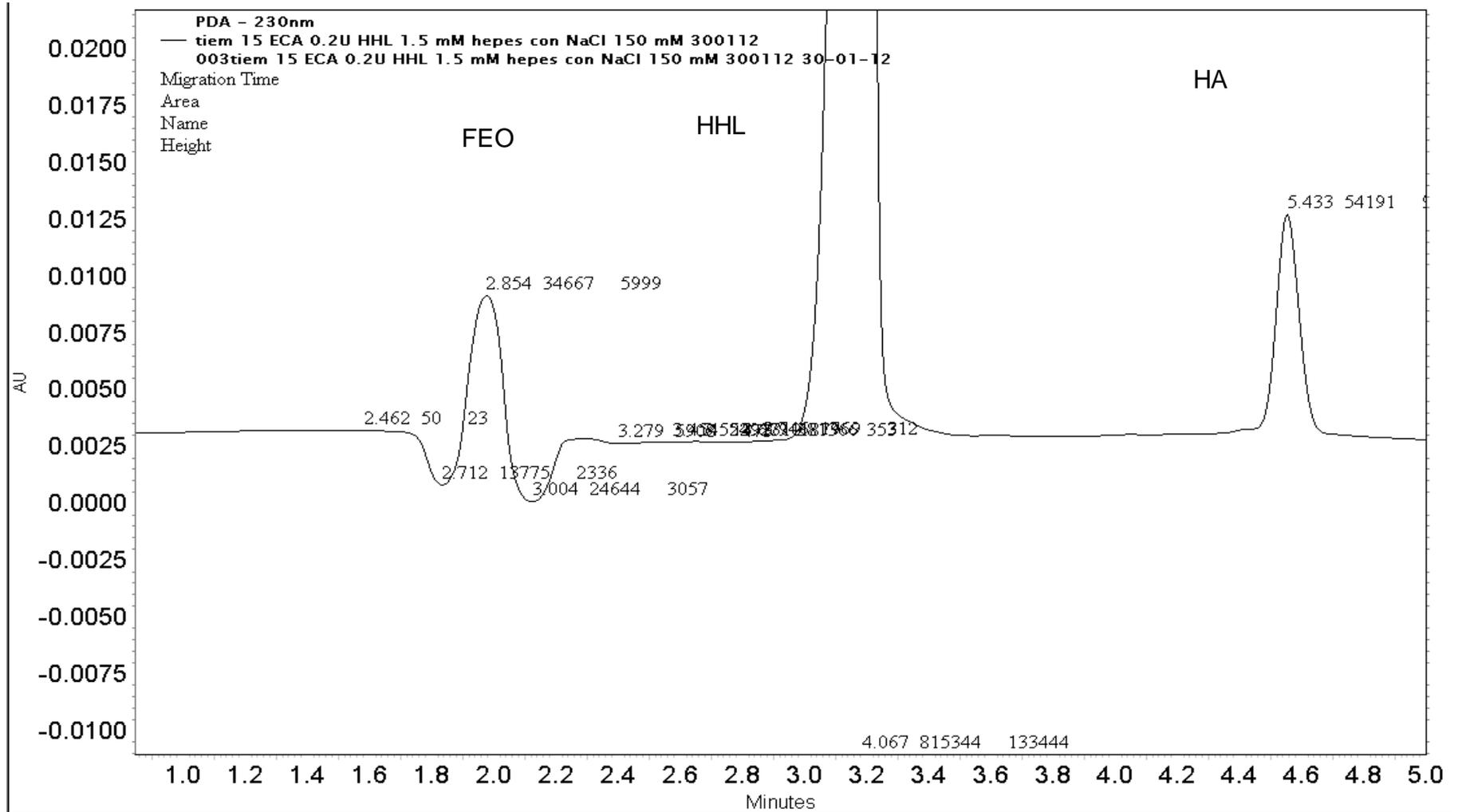
zonamedica.com. (2006). *www.zonamedica.com.ar*. Recuperado el 13 de marzo de 2012, de www.zonamedica.com.ar:
http://www.zonamedica.com.ar/categorias/medicinailustrada/hipertension/sist_renina_angiotensina.htm

9 Anexos.

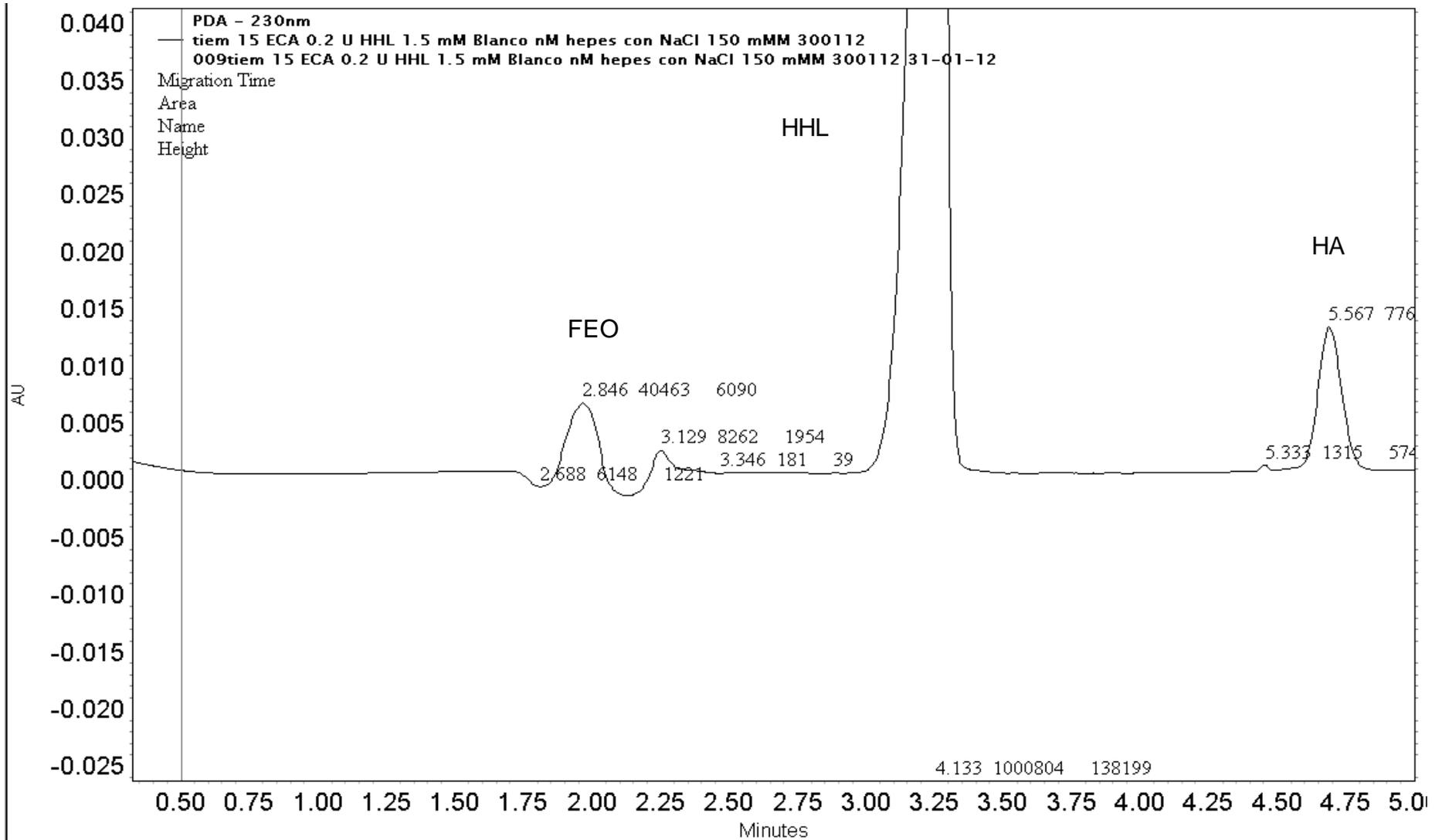
ELECTROFEROGRAMA DEL MÉTODO SIN LA ENZIMA NI EL INHIBIDOR PRESENTES. (SE AÑADIÓ HA.)



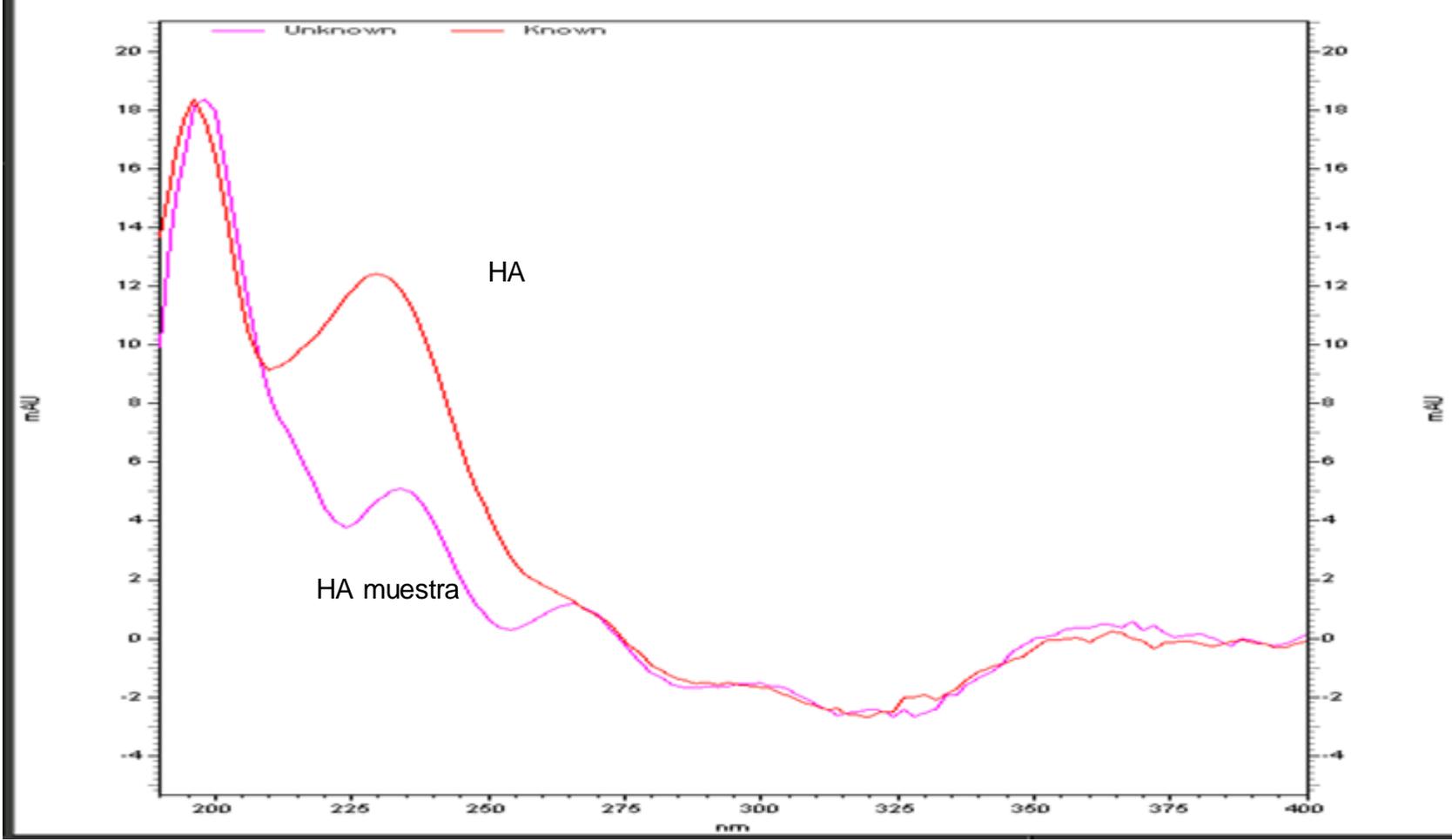
ELECTROFEROGRAMA CON LA ECA PRESENTE SIN EL INHIBIDOR.



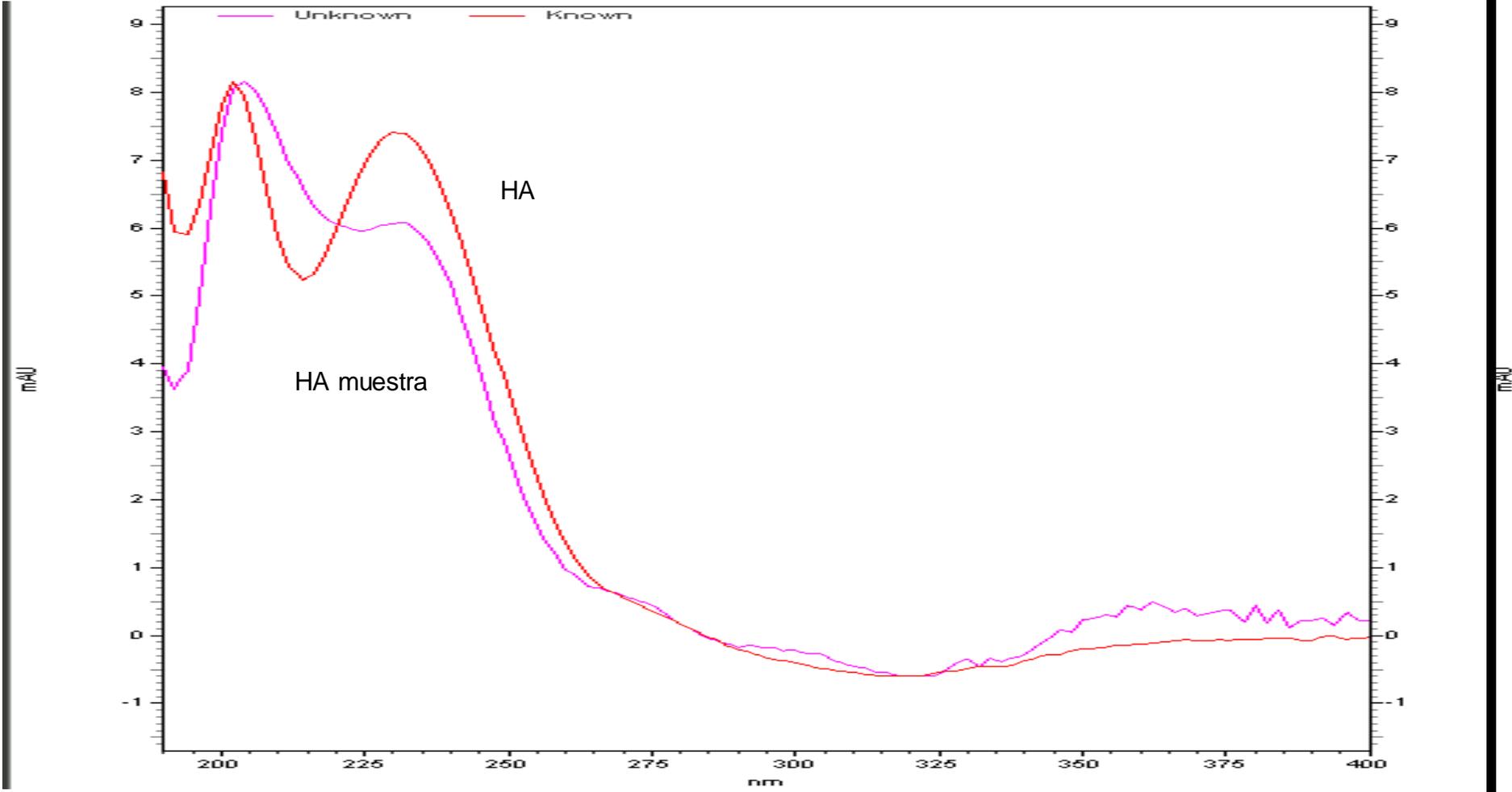
ELECTROFEROGRAMA CON LA ECA PRESENTE SIN EL INHIBIDOR.



COMPARACIÓN DEL ESPECTRO DEL HA EN LA SOLN. DE LA ECA CON HHL VS EL ESPECTRO DE HA EN LA SLN DE HHL CON AH AGRAGADO. SIMILITUD DEL 91.83%



COMPARACIÓN DEL ESPECTRO DEL HA EN LA SOLN. 2 DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN VS EL HA DE LA SLN 6.
SIMILITUD DEL 98.18%



COMPARACIÓN DEL ESPECTRO DEL HA EN LA SOLN. DE LA ECA CON HHL VS EL ESPECTRO DE HA EN LA SLN DE HHL CON AH AGRAGADO. SIMILITUD DEL 84.24%

