

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**ESTIMACIÓN DE LA UNIÓN A ALBÚMINA DE DERIVADOS
BENCIMIDAZÓLICOS ANTIPARASITARIOS**

T E S I S

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

PRESENTA

LILIAN ALEXANDRA SÁNCHEZ CASTAÑEDA

MÉXICO, D. F.

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado asignado:

Presidente Ma. del Socorro Alpizar Ramos

Vocal José Federico del Río Portilla

Secretario Francisco Hernández Luis

1er Suplente Erika María Ramírez Maya

2do Suplente Efrén Hernández Baltazar

Sitio en donde se desarrolló el tema:

Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Química
Conjunto E
Laboratorio 122.
Av. Universidad 3000 Col. Copilco-Universidad C.P. 04510 Del. Coyoacán, D.F.
Tel: 56225287

Asesor del tema _____
Dr. Francisco Hernández Luis

Sustentante _____
Lilian Alexandra Sánchez Castañeda

“DRACO DORMIENS NUNQUAM TITILLANDUS”

DEDICATORIAS

- ❖ *A mamá por estar ahí siempre que te necesito, por ayudarme a superar todos los obstáculos que se me han atravesado, por hacer hasta lo imposible por sacarnos adelante y sobre todo por no dejarme caer cuando la mente me hizo presa de sus engaños.*
- ❖ *A Clau por apoyarme, por hacerme entender que la vida real necesita sacrificios y preparación, pero también necesita diversión.*
- ❖ *A Raúl por entenderme, aún cuando tu tienes la razón, por comprenderme cuando me abogo en mi propio vaso, por apoyarme en cada pequeño proyecto que se me ocurre, por compartir todas mis locuras, por reírte de cada chiste, por cuidarme hasta de la más inofensiva brisa, por recordar todo lo que yo olvido, por conocerme tanto que las palabras sobran y en pocas palabras, por formar parte de mi mundo.*
- ❖ *A Rosalinda, Laura y Samuel por su amistad incondicional, por su apoyo ilimitado, por hacerme reír hasta de los más absurdos temas, por escuchar todas mis tonterías y por bajarme de mi nube siempre que es necesario. Con ustedes aprendí el significado de la palabra amigo.*
- ❖ *A Oscar, Janis, Mitzi, Prisci, Angy, Faby y José Antonio por escucharme una y otra vez hablar de los mismos temas, por demostrarme que las apariencias engañan, por apoyarme y ayudarme en los momentos más difíciles sacrificando sus propios intereses, por los grandes momentos en las clases, por las desveladas, por contar conmigo y simplemente por dejarme ser su amiga.*
- ❖ *A Roy, Natalia, Paola, Isabel, Héctor, Dengel, Juan y Toño por enseñarme que el mundo no gira alrededor de la escuela, por hacerme reír, por obligarme a jugar, por permitirme recordarles que el mundo no se limpia solo, por aceptar mis consejos, por darme consejos pero sobretodo enseñarme que una de las cosas más geniales del mundo es crecer cerca de tus amigos de la infancia.*

AGRADECIMIENTOS

- ❖ *Gracias Dios por ayudarme a alcanzar un éxito más en mi vida y por llevarme en brazos cuando lo creía todo perdido.*

- ❖ *Gracias a la Universidad Nacional Autónoma de México y en especial a la Facultad de Química por permitirme estudiar en sus instalaciones y por darme las armas necesarias para convertirme en una profesionista.*
- ❖ *Gracias Dr. Francisco Hernández Luis por permitirme estar bajo su tutela, por ayudarme en todos los aspectos del trabajo de tesis, por su preocupación constante, pero sobre todo por compartir una pequeña parte de sus conocimientos conmigo.*
- ❖ *Gracias Dr. Sergio Rodríguez por aclarar todas mis dudas, por sus valiosos consejos y por recordarme la labor de la investigación.*
- ❖ *Gracias al Dr. Rafael Castillo y a la M. en C. Alicia Hernández por su apoyo en el laboratorio.*
- ❖ *Gracias a todos los compañeros del laboratorio, Toño H., Toño R., Eliana, Cecilia, Gisela, Sonia, Paola, Jaime, Israel, David, Alejandro, Pancho, Silvia y a la M. en C. Olivia, por ser los responsables de una extraordinaria convivencia y por hacer mi tiempo en el laboratorio más llevadero.*
- ❖ *A la M. en F. Socorro Alpizar Ramos, a la Dra. Luz Elena Vera Ávila, a la Q.F.B. Isaura Carrera García, al Q.F.B. Raúl Garza Velasco por ser a mi juicio los mejores profesores de la carrera y por lo tanto por poner el alto en nombre del Q.F.B. y por tanto de la Facultad de Química de la UNAM.*
- ❖ *A mi mamá por impulsarme a lo largo de toda la carrera y por recordarme lo que es importante.*
- ❖ *A Raúl por su apoyo a lo largo de toda la carrera, por obligarme a relajarme y por comprender la importancia que las letras Q.F.B. tienen para mí.*
- ❖ *A mis amigos de la Facultad por ayudarme a que el largo, arduo, divertido y difícil tiempo en la escuela fuera más llevadero.*
- ❖ *A Miguel P. por el apoyo a mi madre, mi hermana y a mí a lo largo de los últimos años.*
- ❖ *A HP por transportarme a un mundo mágico.*

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. HIPOTESIS Y OBJETIVOS	
2.1 Hipótesis	4
2.2 Objetivo general	4
2.3 Objetivos específicos	4
3. ANTECEDENTES	
3.1 Parasitosis intestinales	6
3.2 Los derivados del bencimidazol como antiparasitarios	7
3.3 Unión a proteínas	9
3.3.1 Técnicas empleadas en la determinación de unión a proteínas	11
3.3.2 Método de Bradford para cuantificación de proteínas	13
3.4 Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR)	13
3.4.1 Cromatografía de fase reversa	14
3.4.2 Variabilidad intradía e interdía	15
4. DESARROLLO EXPERIMENTAL	
4.1 Desarrollo de un método analítico para la cuantificación de los derivados bencimidazólicos GNV14 y VMAS82	17
4.2 Implementación de un método de unión a proteínas mediante ultrafiltración.	19
4.3 Determinación del porcentaje de unión a albúmina de los derivados bencimidazólicos GNV14 y VMAS82	28
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
5.1 Cuantificación de derivados bencimidazólicos	30
5.1.1 Variabilidad intradía	30
5.1.1.1 GNV14 50 μ M	30
5.1.1.2 GNV14 5 μ M	31
5.1.1.3 GNV14 0.5 μ M	31
5.1.2 Variabilidad interdía	32
5.1.2.1 GNV14 50 μ M	32
5.1.2.2 GNV14 5 μ M	32
5.1.2.3 GNV14 0.5 μ M	33
5.2 Evaluación de la unión a albúmina a través de ultrafiltración	34
5.2.1 Ensayo de Bradford	34
5.2.2 Acerca de la metodología	35
5.3 Resultados de la estimación de la unión a albúmina.	37
5.3.1 GNV14	37
5.3.1.1 Cromatograma obtenido. GNV14	37
5.3.1.2 Corrida PBS. GNV14	37
5.3.1.3 Corrida A. GNV14	39
5.3.1.4 Corrida B. GNV14	40
5.3.2 VMAS82	41
5.3.2.1 Cromatograma obtenido. VMAS82	41
5.3.2.2 Corrida PBS. VMAS82	41
5.3.2.3 Corrida A. VMAS82	42

5.3.2.4 Corrida B. VMAS82	43
6. CONCLUSIONES	46
7. PERSPECTIVAS	48
BIBLIOGRAFÍA	50
APÉNDICES	
Apéndice I. Sustancias químicas, materiales y equipo	52
Apéndice II. Ensayo de Bradford (modalidad de microensayo)	56

1. INTRODUCCIÓN

Las parasitosis intestinales, ocasionadas por protozoarios o helmintos, afectan a más de 3000 millones de personas en el mundo. Estas enfermedades constituyen un problema de salud pública para países como la República Mexicana.¹

Para tratar de combatir estos padecimientos, se utilizan principalmente medidas sanitarias o la quimioterapia. En este último ámbito se ubica nuestro grupo de investigación, donde se diseñan y sintetizan moléculas con actividad antiparasitaria. Una vez que los compuestos son sintetizados, se evalúa su efectividad *in vitro* contra los parásitos de interés. Aquellos compuestos que presentan las mejores potencias de actividad se evalúan en estudios *in vivo*. Lamentablemente, muchos de los compuestos con buena potencia *in vitro*, no presentan actividad *in vivo*, por lo que tienen que ser excluidos del proceso de investigación. Una de las causas del fracaso de los compuestos en los estudios *in vivo* son sus deficientes propiedades farmacocinéticas. Por lo que es necesario determinar la mayor cantidad de estas propiedades desde la etapa del descubrimiento de moléculas activas, antes de realizar los estudios *in vivo*. Sin embargo, los métodos tradicionales para la determinación de estas propiedades, demandan cantidades mayores a un gramo de los compuestos problemas y un tiempo de análisis de varias semanas de realización; situación que no es favorable en la etapa del descubrimiento, donde se tienen decenas de compuestos en cantidades menores a 50 miligramos.

En este contexto se ubica el presente trabajo de tesis, el cual tiene como propósito contar con un procedimiento que nos permita determinar la unión a proteínas plasmáticas de un compuesto utilizando una cantidad de 10 mg del mismo y un tiempo de análisis no mayor a dos semanas.

La unión a proteínas plasmáticas es una propiedad farmacocinética importante, debido a que los compuestos que se unen a ellas en un alto porcentaje, mostrarán problemas de actividad *in vivo*. El término unión a proteínas plasmáticas, incluye a la albúmina, α -1-glicoproteína, lipoproteínas y globulinas, que son algunas de las proteínas que pueden interaccionar con fármacos. La albúmina, fue la proteína que se eligió para el desarrollo de este trabajo. Esta macromolécula es a la que con mayor frecuencia se unen los fármacos y la que tiene mayor probabilidad de fijar los derivados bencimidazólicos que se estudian en este trabajo de tesis.

2. HIPÓTESIS y OBJETIVOS

2.1. Hipótesis

- Mediante procedimientos de ultrafiltración y la cromatografía de líquidos de alta resolución, se podrá determinar el porcentaje de unión a albúmina de derivados bencimidazólicos, utilizando una pequeña cantidad del compuesto problema en un tiempo de operación menor a dos semanas.

2.2. Objetivo general

- Implementar un método para estimar la unión a albúmina de dos derivados bencimidazólicos, utilizando 10.0 mg del compuesto problema.

2.3. Objetivos particulares

- 2.3.1. Desarrollar un método analítico para la cuantificación de los derivados bencimidazólicos **GNV14** y **VMAS82**.
- 2.3.2. Implementar un método de unión a proteínas mediante ultrafiltración.
- 2.3.3. Determinar el porcentaje de unión a albúmina de los derivados bencimidazólicos **GNV14** y **VMAS82**.

3. ANTECEDENTES

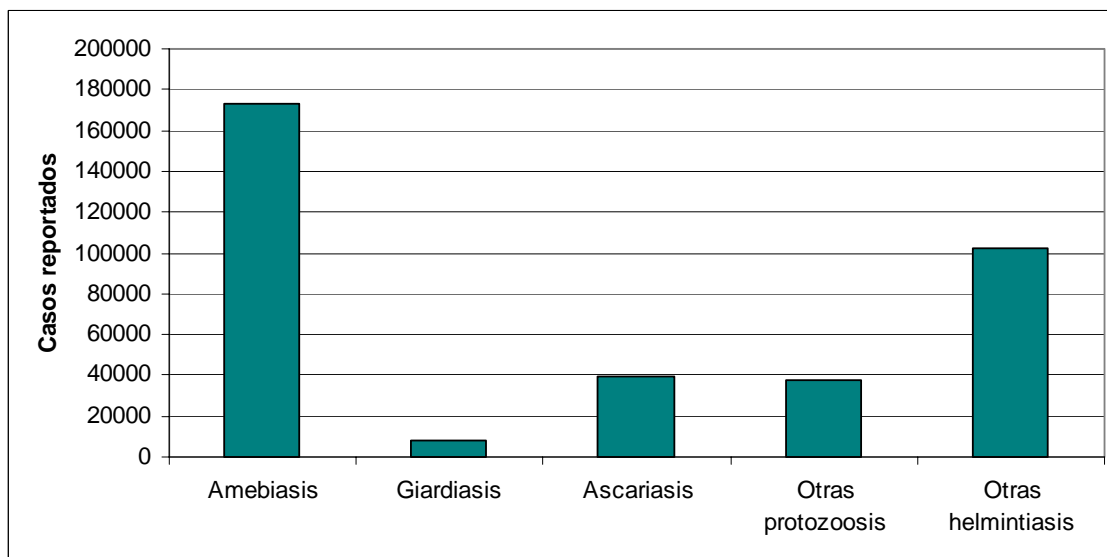
3.1. Parasitosis intestinales

Son un grupo de enfermedades que representan un problema de salud pública en los países en vías de desarrollo, como la República Mexicana, debido tanto a la insalubridad en que viven algunos grupos marginados, como a la falta de información sobre medidas sanitarias preventivas.³

Los síntomas más comunes de estas enfermedades son dolor abdominal y diarrea lo que provoca que se confundan con otra clase de enfermedades de diferente etiología. Ésta situación dificulta su censo sanitario. Adicionalmente, es común la automedicación que conlleva a la aparición de parásitos resistente a los fármacos presentes en el mercado.⁴

Las parasitosis intestinales son causadas por protozoarios y helmintos; los primeros originan los padecimientos como la amebiasis, giardiasis; los segundos ocasionan la ascariasis, oxiuriasis, entre otras.^{3,5}

De acuerdo al Boletín de Epidemiología de la Secretaría de Salud, hasta la semana 17 del 2007, en México se reportaron los siguientes casos de enfermedades parasitarias del aparato digestivo.⁶

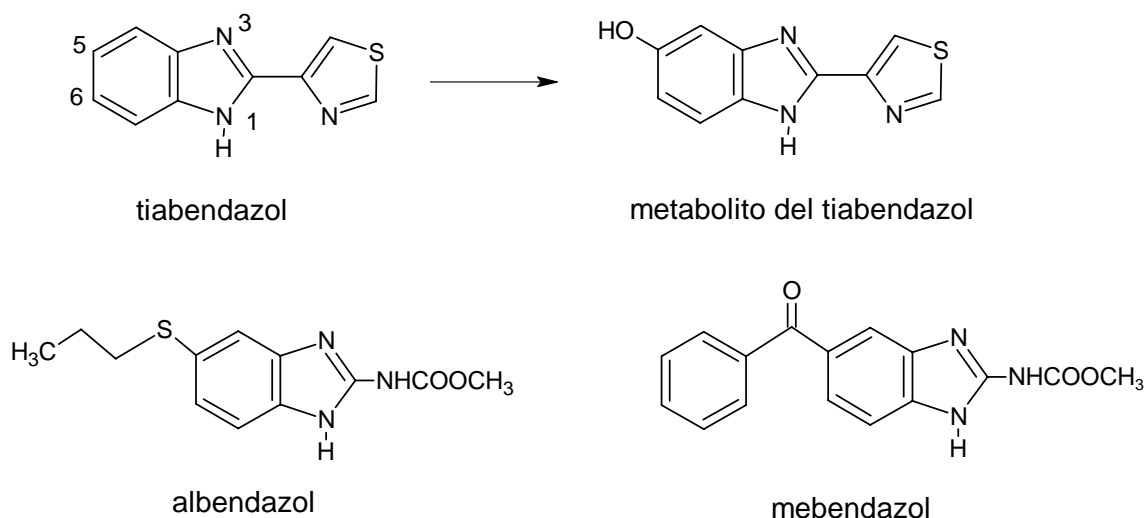


Esquema 1. Incidencia de parasitosis en México (semana 17, 2007)

Como se puede apreciar en el Esquema 1, la incidencia de este tipo de enfermedades es elevada y cada vez es más común encontrar parásitos resistentes, por lo que actualmente es una necesidad importante, la búsqueda de nuevos compuestos antiparasitarios.

3.2. Los derivados del bencimidazol como antiparasitarios

El descubrimiento del tiabendazol en 1961 abrió las puertas para el desarrollo de toda una gama de derivados del bencimidazol como agentes antiparasitarios de amplio espectro, tanto en medicina humana como en veterinaria. Sin embargo, algunos de ellos, como el tiabendazol, mostraron extenso metabolismo de primer paso y pérdida de eficacia durante su administración en animales de experimentación, por lo que fueron retirados para uso terapéutico en medicina humana.⁴



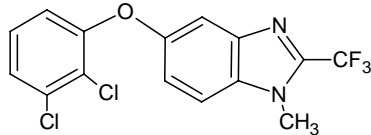
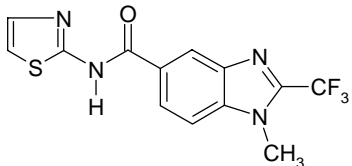
Esquema 2. Derivados del bencimidazol antiparasitarios

Actualmente, los derivados del bencimidazol más conocidos como antiparasitarios son el albendazol y el mebendazol. Estos compuestos son efectivos y seguros para el tratamiento de la mayoría de las parasitosis intestinales provocadas por helmintos. La razón de su éxito en el tratamiento de dichas infecciones radica en que, además de su acción antiparasitaria, prácticamente no se absorben por el tracto gastrointestinal debido a su escasa solubilidad acuosa; circunstancia que favorece su acción localizada. Sin embargo, esta ventaja para el tratamiento de infecciones intestinales, se transformó en una desventaja cuando dichos compuestos se emplearon en el tratamiento de parasitosis extraintestinales, donde los resultados obtenidos fueron erráticos.³

Para tratar de rebasar los problemas de insolubilidad acuosa que presentan el albendazol y el mebendazol, así como incrementar el número de compuestos antiparasitarios disponibles, tanto para parasitosis intestinales como extraintestinales, nuestro grupo de investigación sintetizó nuevos derivados bencimidazólicos sustituidos con diferentes grupos en las posiciones 1, 2, 5 y 6 (Esquema 2). Varios de estos compuestos mostraron actividad

antiparasitaria *in vitro* con valores de concentración inhibitoria media (CI₅₀) menores a 10 µM. Dos de estos compuestos, el **GNV14** y el **VMAS82**, fueron evaluados frente a dos protozoarios que infectan el tracto gastrointestinal (*Giardia intestinales* y *Entamoeba histolytica*), un protozoario que causa infección extraintestinal (*Trichomonas vaginalis*) y un helminto (*Trichinella spiralis*) que infecta músculos en su fase larvaria. Es importante señalar que el **GNV14** superó al albendazol en todos los casos y **VMAS82** superó al albendazol en *Entamoeba histolytica*, agente causal de la amebiasis, y en *Trichomonas vaginalis*, agente causal de la tricomoniasis (Tabla 1).

Tabla 1. Actividad antiparasitaria de nuevos derivados del bencimidazol

Compuesto	Estructura	<i>Giardia intestinalis</i> CI ₅₀ (µM)	<i>Entamoeba histolytica</i> CI ₅₀ (µM)	<i>Trichomonas vaginalis</i> CI ₅₀ (µM)	<i>Trichinella spiralis</i> % de reducción ^a
GNV14		0.030	0.009	0.016	80
VMAS82		0.310	0.242	0.320	NR
albendazol		0.037	56.60	1.592	67

^aconcentración de 1.88 µM; NR: no redujo

Además de la actividad biológica que presente una molécula (propiedad farmacodinámica), un aspecto adicional que debe de cubrirse es la determinación de sus propiedades farmacocinéticas. Para que una molécula pueda tener posibilidades de formar parte de un medicamento, debe presentar ambas propiedades evaluadas y con valores aceptables para el uso requerido.

Las propiedades farmacocinéticas de un principio activo tradicionalmente se determinan cuando los compuestos activos llegan a las etapas de evaluación clínica, cinco a siete años después de ser descubiertos. Para su evaluación se siguen los procedimientos establecidos por la Farmacopea, los cuales demandan una cantidad de al menos 1 g del compuesto y un periodo de al menos seis meses para desarrollar un método analítico validado del mismo. Una desventaja de esta tradicional forma de evaluación es que el compuesto rechazado en esta

etapa prácticamente ya no tiene posibilidad de ser optimizado para continuar su desarrollo. Desafortunadamente cuando esto sucede ya se invirtió mucho esfuerzo y dinero en los estudios de investigación previos. La mayoría de los compuestos que son rechazados en las etapas clínicas presentan propiedades farmacocinéticas inadecuadas para convertirse en medicamentos.

Con la intención de contar con mejores criterios de selección de moléculas para estudios posteriores y disminuir el riesgo de ser rechazadas por presentar propiedades farmacocinéticas inadecuadas, nuestro grupo de investigación pretende adelantar la determinación de algunas de dichas propiedades a la etapa del descubrimiento. Algunas de las propiedades que se pudiesen determinar en esta etapa inicial son la liposolubilidad, la solubilidad acuosa, la estabilidad metabólica y la unión a proteínas. Es importante indicar que en la etapa del descubrimiento se cuentan con muchas moléculas para este tipo de estudios, en cantidades de unos cuantos miligramos de las mismas. Situación que demanda hacer cambios en las metodologías tradicionales tanto en su implementación como en los criterios establecidos para su validación y tiempos de operación.

3.3. Unión a proteínas

Una vez que un fármaco ha sido administrado, su efecto terapéutico depende de diversas variables, algunas de ellas son características intrínsecas del mismo compuesto y otras son resultado de la interacción del compuesto con el organismo receptor.

Entre las propiedades referentes al fármaco se encuentran: ^{2,7}

- Estructura y tamaño de la molécula
- Constante de acidez (pka)
- Solubilidad acuosa
- Liposolubilidad (Log P)

Entre los relativos al organismo, se encuentran: ^{2,7}

- Unión a proteínas
- Metabolismo (reacciones de biotransformación)
- Características del paciente (enfermedades, edad, sexo, etc.)

Actualmente nuestro grupo de investigación ya implementó los procedimientos para la determinación experimental de la solubilidad acuosa y la liposolubilidad; y la determinación del pKa mediante el uso del programa ACD-Labs.

En este trabajo de tesis se abocará a la determinación de la unión de compuestos a la albumina. La unión de fármacos a proteínas es un parámetro farmacocinético muy importante, ya que solamente la fracción libre del fármaco se encuentra en disposición de acceder a su sitio de acción o a su blanco de acción y, por lo tanto, ser eficaz.¹

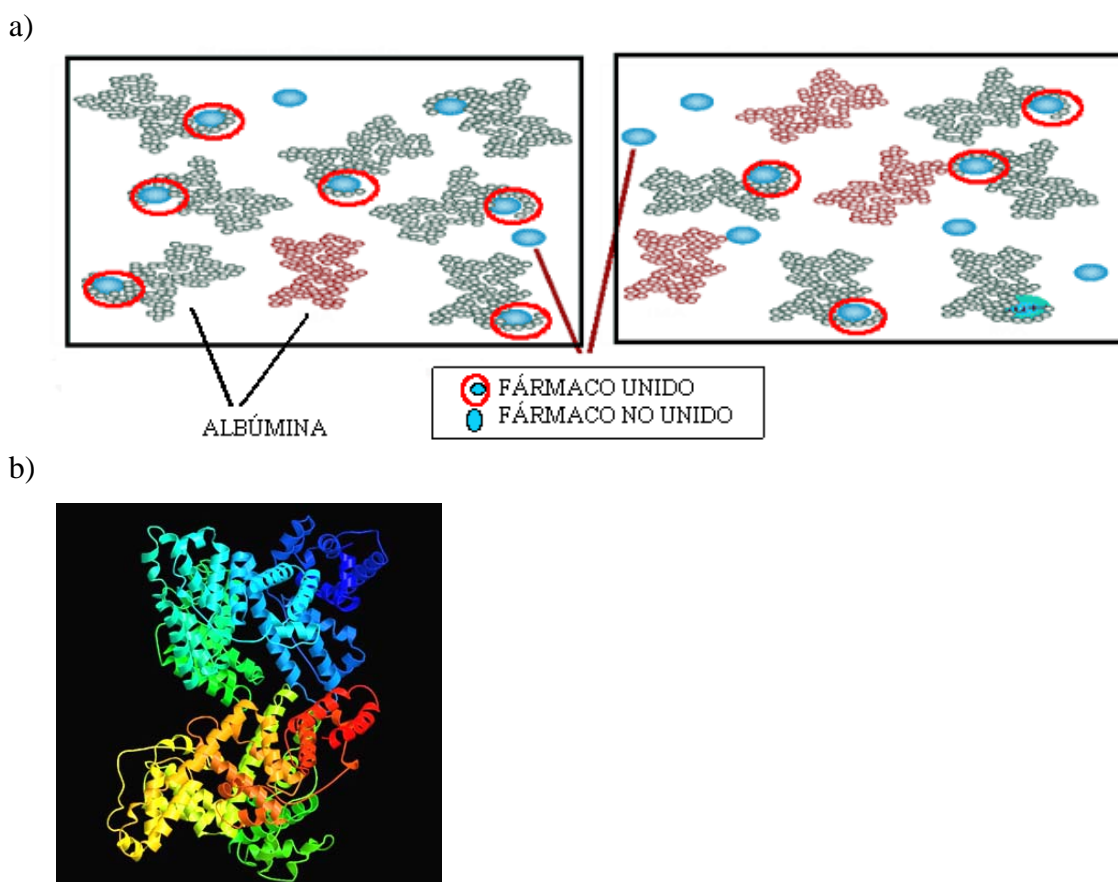


Figura 3. a) Uniones inespecíficas de la albúmina⁸ b) Estructura de la albúmina.⁹

Al llegar al torrente sanguíneo, las proteínas plasmáticas pueden fijar moléculas de fármacos principalmente mediante interacciones reversibles tales como enlaces de hidrógeno o fuerzas de Van der Waals. Los aminoácidos que componen las proteínas tienen grupos carboxilo, hidroxilo, etc. responsables de la interacción reversible con fármacos. Estas uniones son, por lo general, inespecíficas [Fig.3 (a)].³

La unión irreversible de un fármaco a una proteína plasmática es mucho menos frecuente y se produce como consecuencia de una activación química del fármaco que se une a la proteína mediante un enlace covalente. Esta unión irreversible es la responsable de ciertos tipos de toxicidad que se presentan a largo plazo.³

El plasma humano contiene más de sesenta proteínas de las cuales las más importantes para la fijación de fármacos son:³

- a) La albúmina [Fig. 3 (b)]. Es la más abundante y la máxima responsable de la fijación de fármacos. Su peso molecular es 66 000 daltons. En condiciones normales los niveles plasmáticos de albúmina son de 30-45 g/L. Aunque la albúmina fija una gran variedad de fármacos, desempeña un papel fundamental en la fijación de fármacos neutros y ácidos débiles. El sitio de unión de los ácidos es el grupo *N*-terminal de las proteínas mientras que las bases parece ser que se fijan de una forma inespecífica.
- b) La α -1-glicoproteína. Es la más pequeña de las proteínas plasmáticas, con un peso molecular de 41 000 daltons y un gran contenido de ácido siálico, lo que le proporciona una naturaleza ácida y un bajo *pka*, es por eso que fija principios activos básicos.
- c) Lipoproteínas. Moléculas de gran tamaño, cuyo peso molecular alcanza y, a menudo sobrepasa los 2 500 000 daltons. Fijan, principalmente, fármacos muy liposolubles y, generalmente, de naturaleza básica.
- d) Globulinas. Las α , β y γ globulinas constituyen un grupo importante de proteínas con capacidad para fijar fármacos. Su peso molecular varía según la clase a la que pertenezcan. Las α y β globulinas presentan una gran afinidad por sustancias endógenas y exógenas de estructura similar. Mientras que la γ -globulina reacciona específicamente con antígenos, pero inapreciablemente con la mayoría de los fármacos.

De las macromoléculas anteriores, la albúmina es la proteína de interés para el desarrollo de este trabajo. Existen diferentes técnicas para la determinación de la unión a proteínas.

3.3.1 Técnicas empleadas en la determinación de unión a proteínas

Las más importantes son las siguientes:³

- a) Ultrafiltración: Es una técnica sencilla y rápida. El plasma con fármaco se sitúa en una unidad de ultrafiltración, que consta de dos compartimentos separados por una membrana. Esta membrana permitirá el paso del plasma y de sustancias de bajo peso

molecular, mientras que las moléculas de gran tamaño, como las proteínas, quedarán retenidas. El plasma se filtra satisfactoriamente utilizando centrifugación o una presión negativa. El filtrado obtenido en el compartimiento inferior tendrá una concentración igual a la del fármaco libre. Una limitación de esta técnica es la posibilidad de que se produzca adsorción del fármaco a la membrana del filtro.

En la Tabla 2 se muestra un ejemplo del porcentaje de unión a albúmina de dos fármacos, que es obtenido por medio de ultrafiltración.²⁷

Tabla 2. Porcentaje de unión a albúmina obtenido por medio de ultrafiltración¹⁰

Fármaco	% de unión a albúmina a 37 °C
Oxycodon	45.1
Morfina	35.3

- b) Diálisis de equilibrio: Es la técnica más utilizada en los estudios de unión a proteínas “in vitro”. En una célula de diálisis con dos compartimentos separados por una membrana de diálisis semipermeable se colocan el plasma y la solución amortiguadora. El sistema así dispuesto se incuba a 37 °C hasta que se alcanza el equilibrio. Una vez que se ha alcanzado el equilibrio se procede a determinar el fármaco en cada compartimiento.
- c) La microdiálisis. Este método permite la determinación “in vivo” de la concentración libre de fármaco en plasma, tejidos y otros fluidos biológicos. Mediante un procedimiento quirúrgico se implanta una sonda con una membrana de diálisis en un vaso, en un espacio tisular o en un espacio que contenga un fluido. A través de la sonda se bombea una solución amortiguadora a una velocidad de flujo baja y el fármaco no unido difundirá a la sonda, a través de la membrana, como consecuencia del gradiente de concentración. La concentración de fármaco libre se determina analizando el dializado.

La técnica utilizada en el desarrollo de esta tesis fue la ultrafiltración. El filtrado obtenido a partir de la ultrafiltración no debe conservar restos de albúmina, ya que al momento de la cuantificación del analito se puede obtener un falso positivo. Se utilizó el método de Bradford para garantizar que esto no sucedería.

3.3.2. Método de Bradford para cuantificación de proteínas

Se requiere un rápido y sensible método de cuantificación de proteínas en la práctica común de laboratorios bioquímicos y microbiológicos.¹³

La mayoría de los métodos convencionales, como el de Lowry o el de Biuret, interfieren con otros componentes químicos que podrían estar presentes en las muestras como sales de potasio, magnesio, EDTA, detergentes, amortiguadores básicos y algunos carbohidratos.^{11, 12, 13}

El método de Bradford no presenta esos problemas y puede ser fácilmente utilizado para procesar un número grande de muestras.¹³ Está basado en un cambio en la coloración del colorante azul brillante de Coomassie, que cambia del color rojo al azul; debido a su unión con aminoácidos aromáticos, en especial arginina. La unión del colorante a la proteína, se lleva a cabo en aproximadamente 2 minutos y mantiene un color estable por 1 hora.^{13, 14} La absorbancia del complejo colorante-proteína se mide a una longitud de onda a 595 nm.¹⁴ El complejo tiene un alto coeficiente de extinción molar, lo que brinda mayor sensibilidad al método.

Se utilizó el método de Bradford sólo para detectar la presencia de albúmina en el desarrollo experimental de esta tesis, no cuantitativamente.

3.4. Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR)

La cromatografía líquida de alta resolución, comúnmente llamada HPLC por sus siglas en inglés (High Performance Liquid Chromatography), es el tipo de cromatografía de elución más versátil y ampliamente utilizado, debido a su capacidad para separar especies químicas estrechamente relacionadas entre sí; pero, también se puede emplear para la identificación cualitativa y cuantitativa de especies separadas.^{15, 16}

La determinación cuantitativa se lleva a cabo mediante el uso de integradores computarizados en donde la señal cromatográfica, inicialmente analógica, se digitaliza; es por eso que a través de algunos programas, se detecta la presencia de compuestos, hacer correcciones por la desviación de la línea base, calcular áreas y tiempos de retención, así como determinar la concentración de los componentes.¹⁶

Actualmente, para optimizar separaciones o cuantificaciones cromatográficas se utilizan diversas variables. Entre las más importantes se encuentran escoger una fase estacionaria ideal para el proceso cromatográfico y, utilizar una fase móvil a conveniencia del resultado deseado.^{15, 16}

Cuando se menciona a la fase móvil no sólo se incluye la elección de disolventes para las corridas cromatográficas, también se engloba, el tipo de elución. En cromatografía en columna, existen diferentes tipos de elución. La elución isocrática es la que se lleva a cabo con un único disolvente o una mezcla de disolventes de composición constante; y la elución en gradiente, donde se usan dos o más disolventes que difieren significativamente en su polaridad; las proporciones de los disolventes varían de manera programada durante la separación. Esta variación puede ser en forma continua o de un modo escalonado. La elución en gradiente, con frecuencia, mejora la eficiencia de la separación.^{15, 16}

Si se eligen las condiciones ideales en cromatografía, se pueden obtener resultados excelentes. Además existen diferentes tipos de CLAR diseñadas para una gran diversidad de análisis instrumentales.¹⁸

La cromatografía de fase reversa es uno de los tipos de CLAR más utilizado, sobretodo en el campo farmacéutico debido al amplio espectro de compuestos que pueden ser cromatografiados.¹⁶

3.4.1. Cromatografía de fase reversa

La cromatografía en fase reversa permite separar moléculas con base en su polaridad.¹⁹ La fase estacionaria está compuesta por partículas de sílica químicamente modificadas con hidrocarburos saturados, insaturados o aromáticos. Comúnmente, son más utilizados los empaques que tienen enlazados cadenas de hidrocarburos de 18 átomos de carbono (columnas C-18) o cadenas de ocho átomos de carbono (columna C-8).^{15, 16}

Las columnas C-8 son ideales para la separación de compuestos de baja a alta polaridad y de muestras que contienen compuestos con un intervalo amplio de polaridades. Las columnas C-18 se pueden utilizar para las aplicaciones donde se requiere un máximo de retención.

La fase estacionaria, por tanto es una matriz no polar; por lo que las fases móviles se seleccionan entre los disolventes polares, como el agua, metanol, acetonitrilo y acetato de etilo.

La fuerza motriz de la retención en este tipo de cromatografía es el efecto de la fase móvil para forzar al soluto hacia el interior de la capa hidrofóbica. En oposición se encuentra la interacción de los grupos polares del soluto con la fase móvil. En consecuencia, la retención hidrofóbica involucra principalmente sustancias no polares o la porción no polar de la molécula.¹⁸ Por lo tanto, ésta técnica proporciona retención y selectividad óptimas cuando los compuestos tienen un carácter predominante alifático o aromático.

En CLAR, como en muchos otros métodos analíticos, que incluyen equipos para cuantificación, se debe de tener una medida de la confiabilidad de los resultados.

3.4.2. Variabilidad intradía e interdía

La confiabilidad en un método analítico, la dan un conjunto de parámetros, entre los cuales se encuentra la precisión.¹⁸ La precisión describe la proximidad entre diferentes medidas individuales. Para medir la precisión en un método analítico se debe determinar tanto a nivel intradía como interdía.¹⁷

Cuando se menciona el término intradía, significa que la misma metodología se llevará a cabo dos veces en el mismo día bajo las mismas condiciones y con los mismos instrumentos.

Cuando se menciona el término interdía, significa que la misma metodología se llevará a cabo una vez en cada uno de dos días diferentes, a la misma hora bajo las mismas condiciones y con los mismos instrumentos.

Al cuantificar en CLAR se debe determinar la precisión intradía e interdía con un mínimo de tres concentraciones (alta, media y baja), cada una por quintuplicado. El coeficiente de variación (CV) de la precisión determinada a cada nivel de concentración no debe exceder el 15% entre los replicados.¹⁷

4. DESARROLLO EXPERIMENTAL

Este apartado incluye los diferentes procedimientos experimentales realizados en el presente trabajo. Su presentación está dividida en tres partes principales acorde con los objetivos particulares indicados previamente.

4.1 Desarrollo de un método analítico para la cuantificación de los derivados bencimidazólicos GNV14 y VMAS82

El desarrollo de una metodología para la cuantificación de derivados bencimidazólicos consistió en preparar las soluciones del analito y cuantificarlas y, con la finalidad de verificar la precisión del estudio, se llevó a cabo el ensayo interdía e intradía.

El ensayo intradía e interdía consistió en evaluar un mínimo de tres concentraciones, cada una por quintuplicado. El ensayo se realizó tres veces, dos en un mismo día (día 1) en la mañana y en la tarde, a la que se le denomina variabilidad intradía, y uno más en un día diferente (día 2) en la mañana, a la que se le denomina variabilidad interdía.

Los datos obtenidos en la variabilidad intradía (mañana y tarde, día 1) se compararon entre sí, así como los datos obtenidos en la variabilidad interdía (mañana de día 1 y día 2). El coeficiente de variación (CV) de la precisión determinada a cada nivel de concentración no debía de exceder el 15% entre los replicados.¹⁷

El ensayo interdía e intradía entonces consistió en cuantificar la cantidad de analito a tres niveles de concentración (50 μM , 5 μM y 0.5 μM) cada una por quintuplicado; en total se obtuvieron 15 datos de cada concentración: 5 en la mañana del día 1, y para su comparación; 5 en la tarde del día 1 (intradía) y 5 en la mañana del día 2 (interdía).

a) Preparación de las soluciones 50 μM , 5 μM y 0.5 μM de analito problema.

Material:

- 1 navecilla de vidrio
- 1 espátula
- 3 tubos viales
- 1 tubo eppendorf de 1.5 mL
- 1 micropipeta de 1000 μL
- Puntas para micropipeta de 1000 μL
- 1 micropipeta de 200 μL
- Puntas para micropipeta de 200 μL

Sustancias:

- Analito
- Acetonitrilo (ACN)
- Agua desionizada
- Dimetil sulfóxido (DMSO)

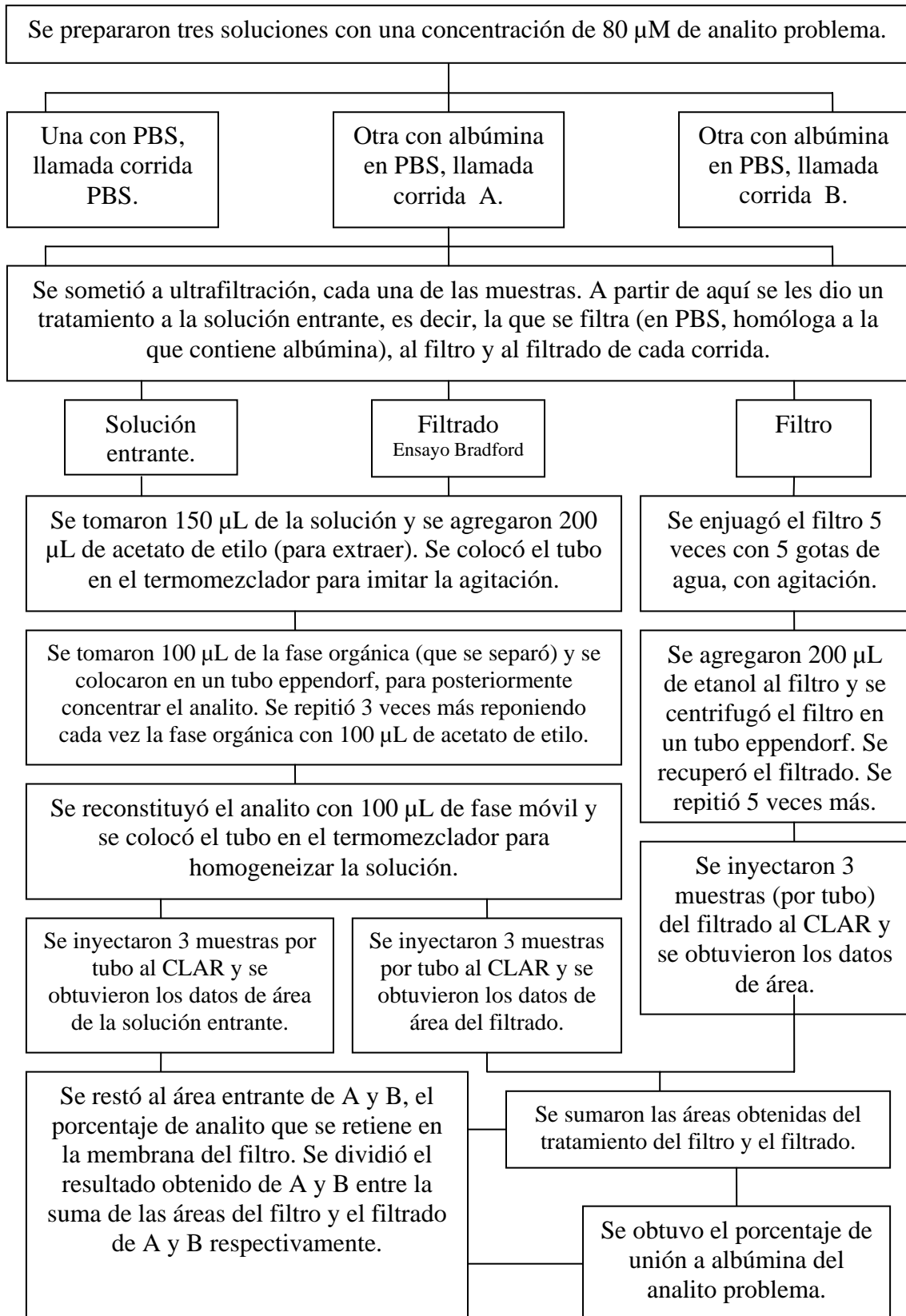
Procedimiento:

1. Se pesaron 10.0 mg de analito problema y se disolvieron en 2.0 mL de DMSO. Se obtuvo una solución con una concentración de 5 mg/mL
2. Se hicieron 2 diluciones consecutivas 1:10 utilizando como disolvente ACN. Se obtuvo una solución con una concentración de 0.05 mg/mL.
3. Se agregó a un tubo eppendorf, el volumen necesario de la solución de 0.05 mg/mL, para obtener 1.0 mL de una solución 50.0 μ M de analito problema. Se completó el volumen faltante con una mezcla de ACN y agua desionizada de tal forma que se obtuvo la misma proporción final de ACN:AGUA que la utilizada en la fase móvil del análisis cromatográfico.

b) Cuantificación de las soluciones 50 μ M, 5 μ M y 0.5 μ M de analito problema y determinación de la precisión de la técnica.

1. Se inyectaron 5 muestras por cada concentración de analito.
2. Se obtuvo el área correspondiente a cada inyección.
3. Se compararon los resultados obtenidos para obtener la variabilidad intradía y la interdía.
4. Se tomó la decisión acerca de la precisión de la técnica.

4.2. Implementación de un método de unión a proteínas mediante ultrafiltración.



La metodología que se siguió para la evaluación de la unión a albúmina es la siguiente:

a) Preparación de la solución 80 μM de analito problema, para el ensayo con PBS. [Esta solución se utilizó tanto como solución entrante de las tres corridas, como para el ensayo sin albúmina, que tuvo como objetivo determinar el porcentaje de analito que se retiene en la membrana del filtro]

Material:

- 1 navecilla de vidrio
- 1 espátula
- 3 tubos viales
- 1 tubo eppendorf de 1.5 mL
- 1 micropipeta de 1000 μL
- Puntas para micropipeta de 1000 μL
- 1 micropipeta de 200 μL
- Puntas para micropipeta de 200 μL

Sustancias:

- Analito
- PBS (La concentración depende del analito)
- Dimetil sulfóxido (DMSO)

Procedimiento:

1. Se pesaron 10.0 mg de analito problema y se disolvieron en 2.0 mL de DMSO. Se obtuvo una solución con una concentración de 5 mg/mL
2. Se hicieron 2 diluciones consecutivas 1:10, con una mezcla de ACN:AGUA 1:1, Se obtuvo una concentración de 0.05 mg/mL.
3. Se agregó a un tubo eppendorf, el volumen necesario de la solución de 0.05 mg/mL, para obtener 1.0 mL de una solución 80.0 μM de analito problema y se completó el volumen faltante con una solución de PBS con tal concentración que al diluirse a 1.0 mL, se obtuvo una concentración final de 0.01M.

a) Preparación de la solución 80 μM de analito problema, para el ensayo con albúmina.

Material:

- 1 navecilla de vidrio
- 1 espátula
- 3 tubos viales
- 1 tubo eppendorf de 1.5 mL
- 1 micropipeta de 1000 μL
- Puntas para pipeta de 1000 μL
- 1 micropipeta de 200 μL
- Puntas para pipeta de 200 μL

Sustancias:

- Analito
- Albúmina en PBS (Su concentración depende del analito)
- DMSO

Procedimiento:

1. Se pesaron 10.0 mg de analito problema y se disolvieron en 2.0 mL de DMSO. Se obtuvo una solución con una concentración de 5 mg/mL.
2. Se hicieron 2 diluciones consecutivas 1:10, con una mezcla de ACN:AGUA 1:1, Se obtuvo una concentración de 0.05 mg/mL.
3. Se agregó a un tubo eppendorf, el volumen necesario de la solución de 0.05 mg/mL, para obtener 1.0 mL de una solución 80.0 μM de analito problema y se completó el volumen faltante con una solución de albúmina en PBS, la albúmina tenía que estar a tal concentración que al ser diluida a 1.0 mL se obtuviera una concentración final de 35 mg/mL (ésta es la concentración de la albúmina en el plasma humano). El PBS debía tener tal concentración que al ser diluido a 1.0 mL, se obtuviera una concentración final de 0.01M.

Cabe aclarar que la preparación de las soluciones 80 μM tanto con o sin albúmina, debían ser preparadas por la misma persona, al mismo tiempo y con las mismas micropipetas, con el fin de que los resultados obtenidos fueran comparables.

b) Incubación con albúmina.

Material y equipo:

- Termomezclador (Apéndice I)

Sustancias:

- Solución 80 μM de analito problema

Procedimiento:

1. Se colocó el tubo eppendorf (con la solución para el ensayo) en el termomezclador, y se activó la agitación por 20 minutos a una temperatura de 25 $^{\circ}\text{C}$, a una velocidad de 1000 rpm

c) Acondicionamiento del filtro

Material:

- 1 filtro (para centrifugar) para eppendorf (Apéndice I)
- 1 tubo eppendorf
- 1 micropipeta de 1000 μL
- Puntas para micropipeta de 1000 μL

Sustancias:

- Solución de PBS 0.01M

Procedimiento:

1. Se agregaron 200 μL de PBS 0.01M en el filtro y se colocó el mismo dentro del tubo eppendorf.
2. Se colocó el tubo dentro de la centrífuga, y ésta se activó a 8000 rpm a una temperatura de 25 $^{\circ}\text{C}$ por 50 minutos.

c) Ultrafiltración.

Material y equipo:

- 1 filtro acondicionado
- 1 tubo eppendorf
- 1 micropipeta de 1000 μL

- Puntas para micropipeta de 1000 μL
- Centrífuga (Apéndice I)

Sustancias:

- Solución 80 μM de analito problema

Procedimiento:

1. Tomar 300 μL de la solución 80 μM de analito problema y colocarlos en el filtro para tubo eppendorf.
2. Colocar el filtro dentro del tubo eppendorf y asegurarse de cerrarlo bien.
3. Colocar el tubo dentro de la centrífuga, y activar la misma a 8000 rpm a una temperatura de 25 $^{\circ}\text{C}$ por 50 minutos.

d) Tratamiento del filtrado.

Material y equipo:

- 5 tubos eppendorf
- 1 micropipeta de 200 μL
- Puntas para micropipeta de 200 μL
- Termomezclador
- Concentrador (Apéndice I)

Sustancias

- Filtrado del analito
- Acetato de etilo

Procedimiento:

1. Se tomaron 150 μL de filtrado y se colocaron en un tubo eppendorf limpio.
2. Se agregaron 200 μL de acetato de etilo al tubo.
3. Se cerró bien el tubo y se colocó en el termomezclador por 20 minutos a 25 $^{\circ}\text{C}$ a una velocidad de 1000 rpm. (para imitar una extracción en un embudo para extracción)
4. Posteriormente se tomaron 100 μL de la fase orgánica y se colocaron en un tubo eppendorf limpio, se sometió a evaporación a sequedad por medio del Concentrador, por 30 minutos, a 45 $^{\circ}\text{C}$.

5. Mientras tanto se reponían 100 μL de acetato de etilo al tubo eppendorf al cual le habían sido retirados 100 μL de fase orgánica. Se pasó al paso tres. Se repitió dos veces más para tener en total 4 tubos con analito concentrado.

e) Reconstitución del filtrado y cuantificación.

Material y equipo:

- 1 micropipeta de 200 μL
- Puntas para micropipeta de 200 μL
- CLAR (Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución)
- Jeringa para inyección
- Termomezclador

Sustancias:

- Fase móvil [Preparada según el analito]
- Analito (filtrado) concentrado en tubos eppendorf

Procedimiento:

1. Se agregaron 100 μL de fase móvil a los tubos con analito concentrado. La composición de la fase móvil, dependía del análisis en CLAR.
2. Se colocaron los tubos en el termomezclador y se sometieron a agitación por 5 minutos a 25 $^{\circ}\text{C}$, a una velocidad de 1000 rpm
3. Se inyectaron 3 muestras de 25 μL cada una, por cada tubo preparado, en el CLAR.
4. Se obtuvieron los resultados.

f) Tratamiento de la parte entrante.

Material y equipo:

- 5 tubos eppendorf
- 1 micropipeta de 200 μL
- Puntas para micropipeta de 200 μL
- Termomezclador
- Concentrador

Sustancias

- Solución 80 μM de analito problema en PBS (como homólogo a los que fueron filtrados pero sin albúmina)
- Acetato de etilo

Procedimiento:

1. Se tomaron 150 μL de filtrado y se colocaron en un tubo eppendorf limpio.
2. Se agregaron 200 μL de acetato de etilo.
3. Se cerró el tubo y se colocó en el termomezclador por 20 minutos a 25 $^{\circ}\text{C}$ a una velocidad de 1000 rpm
4. Posteriormente se tomaron 100 μL de la fase orgánica y se colocaron en un tubo eppendorf limpio, éste se sometió a evaporación a sequedad por medio del Concentrador, por 30 minutos, a 45 $^{\circ}\text{C}$.
5. Mientras tanto se reconstituía con 100 μL de acetato de etilo al tubo eppendorf al cual le fueron retirados 100 μL de fase orgánica. Se pasó al paso tres. Se repitió dos veces más para tener en total 4 tubos con analito concentrado.

g) Reconstitución de la parte entrante y cuantificación.

Material y equipo:

- 1 micropipeta de 200 μL
- Puntas para micropipeta de 200 μL
- CLAR (Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución) [Apéndice I]
- Jeringa para inyección
- Termomezclador

Sustancias:

- Fase móvil [Preparada según el analito]
- Analito (parte entrante) concentrado en tubos eppendorf

Procedimiento:

1. Se agregaron 100 μL de fase móvil a los tubos con analito concentrado. La composición de la fase móvil, dependía del análisis en CLAR.

2. Se colocaron los tubos en el termomezclador y se sometieron a agitación por 5 minutos a 25 °C, a una velocidad de 1000 rpm
3. Se inyectaron 3 muestras de 25 µL cada una, por cada tubo preparado, en el CLAR.
4. Se obtuvieron los resultados.

h) Lavado del filtro

Material:

- 1 tubo eppendorf
- Filtro utilizado para el ensayo

Sustancias:

- Alcohol etílico

Procedimiento:

1. Se enjuagó el filtro 5 veces con 5 gotas de agua.
2. Se agregaron 200 µL de etanol al filtro.
3. Se colocó el tubo dentro de la centrífuga, y ésta se activó a 8000 rpm a una temperatura de 25 °C por 50 minutos. Se repitió cinco veces más, hasta un total de seis lavadas con etanol.

i) Tratamiento de los filtrados con etanol.

Material y equipo:

- 1 micropipeta de 200 µL
- Puntas para micropipeta de 200 µL.
- CLAR (Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución)
- Jeringa para inyección
- Termomezclador

Sustancias:

- Acetonitrilo (ACN)
- Filtrado de etanol.

Procedimiento:

1. Se tomaron 50 μL de filtrado de etanol y se depositaron en un tubo eppendorf limpio.
2. Se agregaron 75 μL de acetonitrilo al filtrado con etanol.
3. Se colocaron los tubos en el termomezclador y se sometieron a agitación por 5 minutos a 25 $^{\circ}\text{C}$ a una velocidad de 1000 rpm
4. Se inyectaron 3 muestras de 25 μL cada una por cada tubo preparado, en el CLAR.
5. Se obtuvieron los resultados.

4.2.1 Condiciones cromatográficas

a) Condiciones cromatográficas para el GNV14

El ensayo del compuesto GNV14, se llevó a cabo con una columna C-18, con un flujo de 0.5 mL/min, de forma isocrática, con una fase móvil acetonitrilo-agua (85:15). El tiempo de corrida fue de 15 minutos en cada inyección.

b) Condiciones cromatográficas para el VMAS82

El ensayo del compuesto VMAS82, se llevó a cabo con una columna C-18, con un flujo de 0.5 mL/min, utilizando un gradiente escalonado, con una fase móvil acetonitrilo-agua [0-3 min (60:40), 3-6 min (70:30) y de 6-15 (60:40)]. El tiempo de corrida fue de 15 minutos en cada inyección.

4.3. Determinación del porcentaje de unión a albúmina de los derivados bencimidazólicos GNV14 y VMAS82

Para el estudio de la estimación de la unión a albúmina de cada derivado bencimidazólico, primero se determinó que porcentaje del compuesto se unía a la membrana del filtro (corrida en PBS sin albúmina). Para determinarlo se llevó a cabo el siguiente procedimiento:

1. Se preparó una solución de analito con una concentración 80 μM en PBS 0.01M (sin albúmina).
2. Se sometió a ultrafiltración.
3. Se cuantificó tanto la solución entrante (la que se depositó en el filtro) [T_E], como el filtrado y los lavados con etanol [T_S]
4. Para obtener el resultado del porcentaje de analito que se unió a la membrana, se hizo el cociente entre total de la parte entrante (T_E) y el total de la parte que sale (T_S).

$$\%union = \frac{T_S}{T_E} \times 100 \quad \text{ecuación (1)}$$

El porcentaje que se obtuvo, se consideró para la estimación de la unión a albúmina del analito problema.

Una vez que se obtuvo el porcentaje de compuesto que se unió a la membrana del filtro utilizado para la ultrafiltración; se llevaron a cabo los ensayos para determinar qué porcentaje del compuesto se unía a la albúmina. Se siguió la metodología mencionada en el punto 4.2 del presente desarrollo experimental.

Una vez obtenidos los resultados del total de analito que entró y el total que salió de la corrida que ya utilizó albúmina, se restó a la parte entrante (T_E), el porcentaje de analito que se unió a la membrana, para después poder comparar el resultado obtenido (T_{Ereal}) con el total de compuesto que salió. (T_S)

$$T_E - \%unión \text{ a membrana} = T_{Ereal} \quad \text{ecuación (2)}$$

$$\%union = \frac{T_S}{T_{Ereal}} \times 100 \quad \text{ecuación (3)}$$

De esta manera se obtuvo el porcentaje de unión a albúmina de cada compuesto.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este apartado se encuentran los resultados de los diferentes procedimientos experimentales realizados en el presente trabajo. Su presentación está dividida en tres partes principales acorde con los objetivos particulares indicados previamente.

5.1. Cuantificación de derivados bencimidazólicos.

5.1.1. Variabilidad intradía

La Tabla 3 muestra los datos obtenidos para **GNV14** a partir de los cromatogramas de cada analito: número de réplica, tiempo de retención, altura, porcentaje de área y área. Este mismo formato se mantiene para las siguientes tablas de este apartado del informe.

5.1.1.1. **GNV14** (50 μ M)

Tabla 3. Variabilidad intradía para **GNV14** (50 μ M)

Número de réplica	Tiempo de retención	Altura	%Área	Área
Mañana (Día 1)				
1	4.068	229,506	96.81	1,559,203
2	4.063	233,211	96.28	1,579,995
3	4.061	228,726	97.54	1,550,404
4	4.055	235,739	97.29	1,578,785
5	4.058	243,949	96.90	1,645,388
Tarde (Día 1)				
1	4.068	239,115	97.19	1,630,228
2	4.060	253,748	97.42	1,723,648
3	4.056	246,653	97.90	1,679,169
4	4.061	233,204	97.94	1,572,498
5	4.072	248,830	97.27	1,679,600
				$\bar{X} = 1,619,892$
				$\sigma = 60,222.25$
				C.V. = 3.7 %

5.1.1.2. GNV14 (5 µM)

Tabla 4. Variabilidad intradía para GNV14 (5 µM)

Número de réplica	Tiempo de retención	Altura	%Área	Área
Mañana (Día 1)				
1	4.063	43,131	93.34	281,645
2	4.066	40,998	93.59	275,944
3	4.061	39,152	93.41	266,237
4	4.055	40,009	92.87	270,844
5	4.058	38,065	92.41	251,972
Tarde (Día 1)				
1	4.067	35,161	92.97	236,299
2	4.058	36,723	95.89	246,350
3	4.062	35,341	92.71	236,293
4	4.056	35,812	94.51	241,229
5	4.060	38,412	95.12	252,367
				$\bar{X} = 255,918$
				$\sigma = 16,659.08$
				C.V. = 6.5 %

5.1.1.3. GNV14 (0.5 µM)

Tabla 5. Variabilidad intradía para GNV14 (0.5 µM)

Número de réplica	Tiempo de retención	Altura	%Área	Área
Mañana (Día 1)				
1	4.068	229,506	96.81	26,894
2	4.063	233,211	96.28	23,224
3	4.061	228,726	97.54	28,121
4	4.055	235,739	97.29	31,730
5	4.058	243,949	96.90	28,330
Tarde (Día 1)				
1	4.068	239,115	97.19	28,040
2	4.060	253,748	97.42	25,342
3	4.056	246,653	97.90	22,215
4	4.061	233,204	97.94	25,128
5	4.072	248,830	97.27	20,987
				$\bar{X} = 26,001$
				$\sigma = 3,267.29$
				C.V. = 12.6 %

5.1.2. Variabilidad interdía

5.1.2.1. GNV14 50 µM

Tabla 6. Variabilidad interdía para GNV14 (50 µM)

Número de réplica	Tiempo de retención	Altura	%Área	Área
Mañana (Día 1)				
1	4.068	229,506	96.81	1,559,203
2	4.063	233,211	96.28	1,579,995
3	4.061	228,726	97.54	1,550,404
4	4.055	235,739	97.29	1,578,785
5	4.058	243,949	96.90	1,645,388
Mañana (Día 2)				
1	4.068	241,169	97.40	1,635,141
2	4.062	238,094	97.58	1,615,848
3	4.061	243,243	96.94	1,626,426
4	4.062	224,155	97.49	1,512,937
5	4.071	262,315	97.16	1,796,798
				$\bar{X} = 1,610,092$
				$\sigma = 77,824.39$
				C.V. = 4.8 %

5.1.2.2. GNV14 5 µM

Tabla 7. Variabilidad interdía para GNV14 (5 µM)

Número de réplica	Tiempo de retención	Altura	%Área	Área
Mañana (Día 1)				
1	4.063	43,131	93.34	281,645
2	4.066	40,998	93.59	275,944
3	4.061	39,152	93.41	266,237
4	4.055	40,009	92.87	270,844
5	4.058	38,065	92.41	251,972
Mañana (Día 2)				
1	4.087	35,647	94.62	255,243
2	4.058	36,877	98.65	261,466
3	4.062	35,371	95.23	240,543
4	4.056	33,150	92.72	227,740
5	4.060	33,371	95.22	227,837
				$\bar{X} = 255,947$
				$\sigma = 19,026.06$
				C.V. = 7.4 %

5.1.2.3. GNV14 0.5 μM

Tabla 8. Variabilidad interdía para GNV14 (0.5 μM)

Número de réplica	Tiempo de retención	Altura	%Área	Área
Mañana (Día 1)				
1	4.068	229,506	96.81	26,894
2	4.063	233,211	96.28	23,224
3	4.061	228,726	97.54	28,121
4	4.055	235,739	97.29	31,730
5	4.058	243,949	96.90	28,330
Mañana (Día 1)				
1	4.078	228,765	95.20	21,458
2	4.062	225,786	97.95	25,673
3	4.056	246,754	97.00	29,089
4	4.071	219,875	97.12	20,876
5	4.072	239,854	96.90	24,675
				$\bar{X} = 25,907$
				$\sigma = 3,435.55$
				C.V. = 13.3 %

En CLAR, una medida directamente proporcional a la concentración de un analito, es el área bajo la curva, obtenida del cromatograma del mismo analito.¹⁵ Por lo que para la evaluación de que tan precisa fue la técnica utilizada (variabilidad interdía e intradía), se tomó en cuenta el área como una medida de concentración.

En cuanto a la variabilidad intradía, para la concentración 50 μM , se obtuvo un coeficiente de variación de 3.7 %, para 5 μM un C.V. de 6.5%, y para 0.5 μM , 12.6%. Mientras que para la variabilidad interdía, para la concentración 50 μM , se obtuvo un coeficiente de variación de 4.8 %, para 5 μM , un C.V. de 7.4%, y para 0.5 μM , 13.3%.

Como se puede observar en ambos ensayos (intradía e interdía) se obtuvieron coeficientes de variación menores al 15 %, lo que indica que el instrumento es preciso bajo las condiciones de análisis establecidas, debido a que el coeficiente de variación de la precisión determinada a cada nivel de concentración no debe exceder el 15 % entre los replicados.¹⁷

Algo interesante que se debe resaltar es la tendencia que presentan los resultados obtenidos en la variabilidad intradía e interdía. Independientemente si los datos se obtuvieron en la mañana o en la tarde de cualquier de los dos días, mientras menor es la concentración, mayor es el

coeficiente de variación, lo que significa que entre mayor era la concentración del analito más precisos eran los resultados obtenidos a través de esta metodología.

5.2. Evaluación de la unión a albúmina a través de ultrafiltración.

5.2.1 Ensayo de Bradford

Aunque este ensayo se utiliza comúnmente con fines de cuantificación.¹³ En el desarrollo de esta tesis se utilizó únicamente para detectar la presencia de albúmina o de algunos residuos de aminoácidos.

El ensayo de Bradford se utilizó en dos secciones del desarrollo de esta tesis; para ambos casos se usó la modalidad de microensayo (Apéndice II):

- a) En primer lugar, se evaluó si el filtrado obtenido a través de los ensayos de ultrafiltración, contenía albúmina o algunos residuos de aminoácidos.

En la evaluación del filtrado se obtuvo un resultado negativo, el reactivo de Bradford permaneció con su característico color rojo, lo que indica que no se unió a ningún aminoácido aromático presente en la albúmina.¹³

El resultado de esta prueba significa que, al llevar a cabo la ultrafiltración, ni la albúmina ni algún otro péptido contaminante de alto peso molecular fueron capaces de pasar a través de la membrana del filtro.

Si el resultado del ensayo de Bradford fuera positivo, se revelaría la presencia de albúmina en el filtrado. Si existiera proteína en el filtrado se podría entonces obtener un falso positivo en la estimación de la unión a albúmina, debido a la posible cuantificación de compuesto que se encontrara unido a algún residuo de aminoácido presente. Además si alguna muestra del filtrado que contiene proteína se inyecta al cromatógrafo, se podría tapar la columna como resultado de la precipitación de la albúmina por su interacción con acetonitrilo, disolvente presente en la fase móvil del cromatógrafo.

- b) El ensayo de Bradford, también se utilizó para la detección de proteína en el filtro.

Recordemos que en la metodología establecida para la estimación de la unión a albúmina a través de ultrafiltración, en el desarrollo de esta tesis, se indica que antes de lavar la membrana del filtro con etanol, se enjuaga cinco veces con cinco gotas de agua cada vez, con el fin de eliminar toda la albúmina presente en el filtro, dejando sólo al compuesto adsorbido en la membrana.

Para determinar el número de veces que el filtro debía ser enjuagado con agua, se utilizó el ensayo de Bradford. De esta manera se determinó que al cuarto lavado, el agua no contenía proteína al menos no una cantidad mayor a 1 µg total de albúmina, que es la sensibilidad del reactivo utilizado para el microensayo.¹⁴ Por seguridad se agregó un lavado más, estableciéndose 5 enjuagues con agua como el número óptimo para eliminar a la albúmina. Es importante aclarar, que se tomó la decisión de eliminar a la albúmina del filtro, por la necesidad de utilizar un disolvente para lavar la membrana, debido a la desventaja que tiene la ultrafiltración de que los compuestos se adsorban en ésta.³

Como se seleccionó al etanol como el disolvente capaz de arrastrar a los compuestos embebidos en la membrana del filtro, se eliminó a la albúmina remanente de la superficie de ésta, ya que de lo contrario, la proteína podría haberse aglomerado debido a su desnaturalización por acción del disolvente, tapando el filtro, e impidiendo la salida del analito en los lavados con etanol.

Aunque los analitos probados tienen una escasa solubilidad en agua a 25 °C, se consideró la posible pérdida de analito, como consecuencia de los lavados de agua que se hicieron en la membrana, realizando una corrida blanco, que se llevó a cabo con PBS sin albúmina, misma que se realizó en primera instancia sólo para la determinación del porcentaje de analito que se unía a la membrana del filtro.

Una vez que se verificó a través del ensayo de Bradford que el filtrado, producto del lavado con etanol, no contenía albúmina, se llevó a cabo la metodología para la determinación de unión a albúmina a través de ultrafiltración.

5.2.2 Acerca de la metodología

La metodología implementada, cumple con las premisas establecidas en este trabajo de tesis, es decir, utiliza una muy pequeña cantidad de compuesto (10 mg) y se lleva a cabo en un corto tiempo, ya que se logró establecer una semana como la duración total del ensayo de cada compuesto, es decir, una vez sabiendo las condiciones cromatográficas necesarias para el análisis de los compuestos, la determinación de que porcentaje se une a la albúmina se puede obtener en sólo una semana.

El estudio se demora una semana, sólo en la cuantificación a través de CLAR, porque de hecho la ultrafiltración se lleva a cabo en menos de una hora y media. Sin embargo si se utilizara la microdiálisis, o la diálisis en equilibrio, la técnica tardaría más tiempo, además de que sería más cara y utilizaría mayor cantidad de muestra, al menos en el caso de la diálisis. Obviamente la microdiálisis tiene la ventaja de la determinación in vivo. Pero como nuestro interés es sólo estimar un parámetro de forma preliminar, esta ventaja sólo nos dificultaría el trabajo.

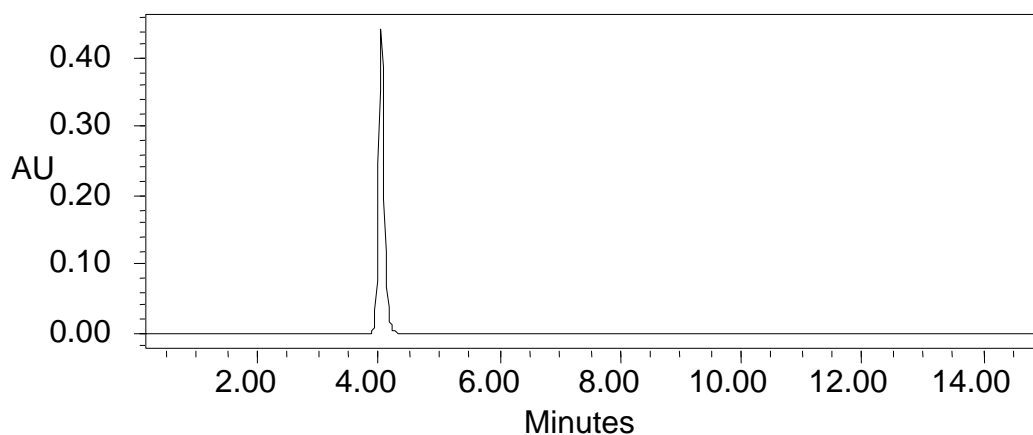
Posterior a la ultrafiltración que es relativamente fácil, se procede a la cuantificación. El uso del cromatógrafo de líquidos es muy sencillo, una vez que se aprende su uso y se ejercita la utilización del software. Los resultados obtenidos además son precisos. Tal vez no son exactos, pero los resultados obtenidos, nos dan una idea de que tanto se une un compuesto, ya sea en baja proporción, media proporción o alta proporción; a la albúmina. Y es que cuando un equipo de trabajo se encuentra en la etapa de descubrimiento, como es nuestro caso, muchas veces se debe sacrificar exactitud, por tiempo. Si el compuesto llega a la etapa clínica, se le determinará la unión exacta que tiene a las proteínas, porque ésta ya será necesaria para aspectos biofarmacéuticos.

5.3. Resultados de la estimación de la unión a albúmina.

5.3.1 GNV14

5.3.1.1 Cromatograma obtenido. GNV14

En el Esquema 5, se muestra un cromatograma típico del compuesto **GNV14**.



Esquema 5. Cromatograma de **GNV14**. Tiempo de retención: 4.047 min. Área: 2,948,999, % de área: 98.06, Altura: 442,224.

5.3.1.2. Corrida PBS. **GNV14**

Para el estudio de la estimación de la unión a albúmina de cada derivado bencimidazólico, primero se debe determinar que porcentaje del compuesto se une a la membrana del filtro (corrida PBS).

La Tabla 9 es un ejemplo de cómo se presentan los resultados en esta parte.

Del total de los datos cromatográficos, sólo se muestra el área bajo la curva. El coeficiente de variación (C.V.), es el obtenido de la dispersión de los resultados obtenidos a partir de las tres inyecciones que se hacen de cada extracción (de la parte entrante y del filtrado) o lavado de etanol (de la membrana del filtro). El Factor de dilución (F.D.) es el correspondiente al tratamiento de cada muestra. El total, se refiere al área multiplicada por el factor de dilución.

Tabla 9. Determinación de la unión a membrana GNV14

Fracción	Tratamiento	Área	C.V. (%)	F.D.	Total
Parte Entrante	1 ^a extracción	886,530	2.6	1.33	1179085
	2 ^a extracción	552,246	2.5	1.33	734487
	3 ^a extracción	139,609	1.4	1.33	185680
	4 ^a extracción	81,040	3.9	1.33	107783
Total parte entrante					T _E = 2,207,035
Filtrado	1 ^a extracción	194,969	2.5	1.33	259,309
	2 ^a extracción	94,706	3.9	1.33	125,959
	3 ^a extracción	32,796	4.3	1.33	43,619
	4 ^a extracción	9,448	2.0	1.33	12,566
Lavado del filtro Con etanol	1 ^{er} lavado	190,380	1.6	2.50	475,950
	2 ^{do} lavado	121,637	2.3	2.50	304,093
	3 ^{er} lavado	54,279	1.4	2.50	135,696
	4 ^{to} lavado	72,877	2.2	2.50	182,191
	5 ^{to} lavado	24,417	3.7	2.50	61,043
	6 ^{to} lavado	16,905	4.2	2.50	42,263
Total filtrado + lavado del filtro					T _S = 1,642,689

C.V. coeficiente de variación; F.D. factor de dilución

Aplicando la ecuación (1):

$$\%union = \frac{1642689}{2207035} \times 100 = 74.43 \%$$

$$100\% - 74.43\% = 25.6\%$$

Por lo tanto el GNV14, se une en una proporción de 25.6% a la membrana del filtro.

5.3.1.3. GNV14 (Corrida A)

Una vez que se sabe cual es el porcentaje de compuesto que se une a la membrana del filtro utilizado para la ultrafiltración; se pueden llevar a cabo los ensayos para determinar qué porcentaje del compuesto se une a la albúmina.

Tabla 10. Estimación de la unión a albúmina **GNV14** (Corrida A).

Fracción	Tratamiento	Área	C.V. (%)	F.D.	Total
Entrada	1 ^a extracción	626731	2.1	1.33	833552
	2 ^a extracción	498740	1.9	1.33	663324
	3 ^a extracción	321704	2.3	1.33	427866
	4 ^a extracción	160852	2.4	1.33	213933
	Total parte entrante				
Filtrado	1 ^a extracción	40163	1.9	1.33	53417
	2 ^a extracción	22004	1.9	1.33	29266
	3 ^a extracción	36021	3.0	1.33	47908
	4 ^a extracción	7205	2.7	1.33	9583
Lavado del filtro con etanol	1 ^{er} lavado	197377	2.9	2.50	493443
	2 ^{do} lavado	133323	5.5	2.50	333307
	3 ^{er} lavado	68127	4.1	2.50	170319
	4 ^{to} lavado	65731	3.5	2.50	164328
	5 ^{to} lavado	18425	2.9	2.50	46063
	6 ^{to} lavado	11365	3.9	2.50	28413
Total filtrado + lavado del filtro					T _S = 1376047

C.V. coeficiente de variación; F.D. factor de dilución

Aplicando las ecuaciones (2) y (3):

$$2138676 - 25.6\% = 1591175$$

$$\%union = \frac{1376047}{1591175} \times 100 = 86.48 \%$$

$$100\% - 86.48\% = \mathbf{13.52 \%$$

En la corrida “A” se obtuvo como resultado, que el **GNV14**, se une un 13.52 % a la albúmina.

5.3.1.4. **GNV14** (Corrida B)

Tabla 11. Estimación de la unión a albúmina **GNV14** (Corrida B)

Fracción	Tratamiento	Área	C.V. (%)	F.D.	Total
Entrada	1 ^a extracción	656656	1.6	1.33	873352
	2 ^a extracción	596640	2.0	1.33	793531
	3 ^a extracción	228363	1.5	1.33	303723
	4 ^a extracción	258423	1.2	1.33	343703
	Total parte entrante				
Filtrado	1 ^a extracción	189870	3.9	1.33	252528
	2 ^a extracción	20783	2.9	1.33	27641
	3 ^a extracción	58166	3.1	1.33	77361
	4 ^a extracción	22281	5.0	1.33	29633
Lavado del filtro Con etanol	1 ^{er} lavado	192685	4.3	2.50	481713
	2 ^{do} lavado	160218	1.7	2.50	400544
	3 ^{er} lavado	63701	6.0	2.50	159253
	4 ^{to} lavado	34212	5.0	2.50	85530
	5 ^{to} lavado	23806	4.2	2.50	59514
	6 ^{to} lavado	2982	6.1	2.50	7455
Total filtrado + lavado del filtro					T _S = 1581172

C.V. coeficiente de variación; F.D. factor de dilución

$$2314309 - 25.6\% = 1721846$$

$$\%union = \frac{1581172}{1721846} \times 100 = 91.83\%$$

$$100\% - 91.83\% = \mathbf{8.17\%}$$

En la corrida “B” se obtuvo como resultado, que el **GNV14**, se une un 8.17 % a la albúmina.

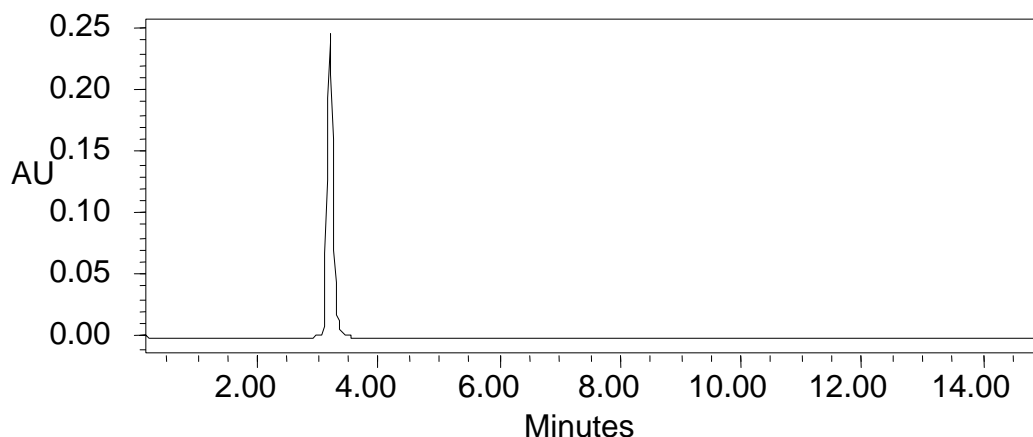
Los resultados obtenidos en ambas corridas son muy interesantes, porque aunque no son iguales, sí son muy similares. Corrida A: 13.52 %; Corrida B: 8.17%

Lo más importante de estos resultados, es la tendencia que muestran de unirse en un bajo porcentaje a la albúmina.

5.3.2. VMAS82

5.3.2.1. Cromatograma obtenido. VMAS82

En el Esquema 5, se muestra un cromatograma típico del compuesto VMAS82.



Esquema 5. Cromatograma de VMAS82. Tiempo de retención: 3.194 min. Área: 1628191. % de área: 98.81. Altura: 246434.

5.3.2.2. Corrida con PBS. VMAS82

Tabla 12. Determinación de la unión a membrana. VMAS82

Fracción	Tratamiento	Área	C.V. (%)	F.D.	Total
Entrada	1 ^a extracción	1705291	1.4	1.33	2268037
	2 ^a extracción	1054323	1.7	1.33	1402249
	3 ^a extracción	813233	2.0	1.33	1081600
	4 ^a extracción	849225	5.6	1.33	1129469
	Total parte entrante				
Filtrado	1 ^a extracción	601725	2.2	1.33	800294
	2 ^a extracción	437510	3.3	1.33	581888
	3 ^a extracción	297912	2.6	1.33	396223
	4 ^a extracción	196854	5.6	1.33	261816
Lavado del filtro Con etanol	1 ^{er} lavado	451890	4.3	2.50	1129725
	2 ^{do} lavado	330875	2.9	2.50	827188
	3 ^{er} lavado	219075	5.9	2.50	547688
	4 ^{to} lavado	113741	5.2	2.50	284353
	5 ^{to} lavado	89768	4.2	2.50	224420
	6 ^{to} lavado	72795	2.2	2.50	181988
Total filtrado + lavado del filtro					T _S = 5235583

C.V. coeficiente de variación; F.D. factor de dilución

$$\% \text{unión} = \frac{5235583}{5881355} \times 100 = 89.02 \%$$

$$100\% - 89.02\% = 10.98 \%$$

Por lo tanto el compuesto **VMAS82**, se une un 10.98% a la membrana del filtro.

Este dato es muy interesante, ya que se demuestra que el **VMAS82**, se une a la membrana del filtro, en un porcentaje menor a la mitad de cómo lo hace el **GNV14**.

5.3.2.3. Corrida A. **VMAS82**

Tabla 13. Estimación de la unión a albúmina **VMAS82** (Corrida A)

Fracción	Tratamiento	Área	C.V. (%)	F.D.	Total
Entrada	1 ^a extracción	1815129	1.6	1.33	2414122
	2 ^a extracción	1000719	2.4	1.33	1330956
	3 ^a extracción	754398	4.3	1.33	1003349
	4 ^a extracción	519675	5.6	1.33	691168
	Total parte entrante				
Filtrado	1 ^a extracción	501432	3.8	1.33	666905
	2 ^a extracción	340750	4.7	1.33	453198
	3 ^a extracción	350630	5.2	1.33	466338
	4 ^a extracción	161525	6.5	1.33	214828
Lavado del filtro Con etanol	1 ^{er} lavado	343170	4.8	2.50	857925
	2 ^{do} lavado	127573	5.1	2.50	318933
	3 ^{er} lavado	125930	5.7	2.50	314825
	4 ^{to} lavado	115471	5.7	2.50	288678
	5 ^{to} lavado	75432	3.8	2.50	188580
	6 ^{to} lavado	48214	4.9	2.50	120535
Total filtrado + lavado del filtro					T _S = 3890745

C.V. coeficiente de variación; **F.D.** factor de dilución

$$5439595 - 10.98\% = 4842327$$

$$\% \text{ union} = \frac{3890745}{4842327} \times 100 = 80.35 \%$$

$$100\% - 80.35\% = \mathbf{19.65 \%$$

En esta primera corrida, se obtuvo que el **VMAS82**, se une a la albúmina en un porcentaje de 19.65 %

5.3.2.4. Corrida B. VMAS82

Tabla 14. Estimación de la unión a albúmina **VMAS82** (Corrida B)

Fracción	Tratamiento	Área	C.V. (%)	F.D.	Total
Entrada	1 ^a extracción	1428904	1.9	1.33	1900442
	2 ^a extracción	1061174	2.8	1.33	1411361
	3 ^a extracción	865411	2.1	1.33	1150997
	4 ^a extracción	679643	5.9	1.33	903925
	Total parte entrante				$\Sigma = 5366725$
Filtrado	1 ^a extracción	374056	3.8	1.33	497494
	2 ^a extracción	239945	5.1	1.33	319126
	3 ^a extracción	331718	4.2	1.33	441185
	4 ^a extracción	60256	4.4	1.33	80140
Lavado del filtro Con etanol	1 ^{er} lavado	542498	3.7	2.50	1356245
	2 ^{do} lavado	204723	4.3	2.50	511806
	3 ^{er} lavado	202078	5.6	2.50	505195
	4 ^{to} lavado	77900	4.0	2.50	194750
	5 ^{to} lavado	31182	5.0	2.50	77955
	6 ^{to} lavado	20267	4.1	2.50	50666
	Total filtrado + lavado del filtro				$\Sigma = 4034562$

C.V. coeficiente de variación; F.D. factor de dilución

$$5366725 - 10.98\% = 4777459$$

$$\% \text{ union} = \frac{4034562}{4777459} \times 100 = 84.45 \%$$

$$100 \% - 84.45\% = \mathbf{15.55 \%$$

En esta segunda corrida, se obtuvo que el **VMAS82**, se une a la albúmina en un porcentaje de 19.65 %

Con todos los datos obtenidos anteriormente se deduce lo siguiente:

En primer lugar hay que hacer notar que los compuestos se retuvieron de manera diferente en la membrana. En el caso del **GNV14**, se recuperó menor cantidad de compuesto, ya que tuvo una retención en la membrana del 25.60%, mientras que el **VMAS82**, sólo tuvo una retención de 10.98%. Esto por supuesto debe deberse a la diferencia en sus estructuras, puesto que el tratamiento experimental que se les dio fue el mismo en ambos casos, sin embargo aunque ambas son derivados bencimidazólicos, tienen sustituyentes diferentes en la posición 5 del bencimidazol.

Cuando se menciona el porcentaje de retención en la membrana, se incluye, tanto la fracción de analito que permaneció embebida a ésta, así como la porción de analito que se pierde en los lavados de agua que tienen como propósito eliminar a la albúmina. Por lo que ambos compuestos podrían unirse en un porcentaje similar, a la membrana de celulosa regenerada. Pero en los lavados de agua, puede ser que la solubilidad en agua de cada uno de éstos, haga la diferencia.

Si el porcentaje de retención de los compuestos a la membrana del filtro fuera muy grande, los datos obtenidos no serían confiables, además de que no se podría estimar un porcentaje de unión en caso de que el compuesto se uniera en gran proporción a la albúmina.

Como se mencionó anteriormente la membrana utilizada para ultrafiltración, sí presentó adsorción de los compuestos evaluados. Ésta membrana es de un material llamado celulosa regenerada, este tipo de membranas ofrecen una alta retención de proteínas, misma que pudimos rectificar al evaluar la presencia de proteínas en el filtrado a través del ensayo de Bradford. El uso de celulosa regenerada, también ofrece cierta resistencia a solventes, la que pudimos comprobar con las lavadas que hicimos con etanol, que no destruyeron a la membrana.

Quizá, y sólo con el fin de disminuir la adsorción de compuestos en la membrana del filtro, se debería de probar con membranas para ultrafiltración de otro material, como polietersulfona, que ofrece una mayor resistencia a los disolventes; por lo que se podría utilizar esta cualidad para usar un disolvente como acetonitrilo para lavar la membrana del filtro.¹⁹

En cuanto a la unión a albúmina. Ambos compuestos mostraron tener un porcentaje de unión a albúmina bajo, en ambos casos menor al 20%. El compuesto **GNV14**, presentó un valor menor (8.17% /13.52%) a comparación de **VMAS82** (15.55% / 19.65%).

Aunque los compuestos mostraron una baja unión a albúmina, esto no garantiza que no se unan a ninguna otra proteína plasmática. Aunque se debe mencionar que la albúmina era la proteína a la que más posibilidades tienen de unirse, debido a la preferencia de ésta a fijar compuestos neutros —como el **GNV14** y el **VMAS82**, que son moléculas neutras a pH fisiológico— o ácidos débiles, en comparación con la α -glicoproteína y las lipoproteínas que

prefieren fijar compuestos básicos, o las globulinas que tienen preferencia por compuestos endógenos.³

Tener un porcentaje de unión a proteínas bajo es una ventaja, ya que sólo la parte no unida (fracción libre) de los fármacos es la que ejerce el efecto terapéutico.² Esto involucra que al menos en este sentido se necesite una dosis menor para alcanzar el efecto deseado. Por supuesto que para determinar un parámetro tan importante como la dosis a administrar, se necesita más información que sólo la unión a proteínas, por ejemplo, el metabolismo que los compuestos presenten en el organismo, la rapidez de eliminación, etc.³

La baja unión a albúmina es un dato muy importante no sólo por las consecuencias que tiene este resultado en el posible desempeño de estos compuestos en el organismo, sino porque presentan un porcentaje de unión muy bajo a comparación de otros derivados bencimidazólicos como el mebendazol (90%)²⁰, el metabolito activo del albendazol, el sulfóxido de albendazol (70%)³ y el omeprazol (95%)²⁰, éste último no es un fármaco antiparasitario, es auxiliar en el tratamiento del reflujo gastroesofágico.²¹ Ésto brinda información muy valiosa, que nos ayuda para poder diseñar nuevos y mejores compuestos antiparasitarios, en concreto derivados bencimidazólicos, con mejores perfiles farmacocinéticos.

El **GNV14** y el **VMAS82** han demostrado tener actividad in vitro contra los protozoarios *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica*, *Trichomonas vaginalis*. Adicionalmente, **GNV14** ha mostrado muy buena eficacia contra el nematodo *Trichinella spiralis* en su fase de infección intestinal y sistémica. A ambos compuestos se les determinaron otros parámetros fisicoquímicos como el coeficiente de partición (Log P) y la solubilidad acuosa que sumadas a la baja unión a albúmina que presentaron en este estudio, les dan muy buena perspectiva para seguirse desarrollando en las investigaciones posteriores.

6. CONCLUSIONES

Después de realizar los ensayos descritos en este trabajo y rebasar todos los inconvenientes experimentales que se presentaron, se logró implementar un procedimiento de determinación de unión a proteínas mediante el uso de la ultrafiltración y la cromatografía de líquidos. Se logró determinar la unión a la albumina de dos derivados del bencimidazol utilizando cantidades pequeñas de ambos compuestos en un tiempo de trabajo menor a dos semanas.

Al término de este trabajo podemos concluir con base a los resultados obtenidos que la hipótesis planteada se acepta.

7. PERSPECTIVAS

Los resultados de este trabajo de tesis, fueron muy satisfactorios, pero aún hay muchas cosas por hacer.

- Con el fin de ahorrar tiempo. Sabiendo que según esta técnica se cuantifican 3 partes entrantes de solución (la de PBS, corrida A y corrida B) por compuesto, que se preparan al mismo tiempo, con los mismos materiales y por la misma persona; se debería de cuantificar sólo 1 parte entrante, ya que éstas son homólogas.
- Para tener una mayor confiabilidad en la técnica, ésta debería ser validada, con el fin de extender su uso a más laboratorios de la Universidad, contando ya con sus dos mejores cualidades, el corto tiempo de duración y el uso de poca cantidad de compuesto.
- A través de esta técnica, se debería de cuantificar la unión a albúmina que tienen otros compuestos, utilizándolos como estándares, con el fin de comparar los resultados experimentales con los teóricos, para poder convertir un resultado experimental en uno más real.

BIBLIOGRAFÍA.

1. Goodman, Gilman; Las bases farmacológicas de la terapéutica. 9^a edición. Ed. McGraw Hill. Volumen 2. México, 1996. pp 1017-1023, 1050-1051, 1073-1074, 1077-1079
2. Doménech, J., Martínez J., Plá J.M.; Biofarmacia y Farmacocinética. Ed. Síntesis. Volumen 2. España. pp.191-196, 467-472, 478-482, 497-498
3. Goodman, Gilman; Las bases farmacológicas de la terapéutica. 9^a edición. Ed. McGraw Hill. Volumen 1. México, 1996. pp.3, 9-10, 12-13, 24-25
4. Horton, R. J.; Benzimidazoles in a wormy World. Parasitology Today, 1990; 6(4): 106
5. Boletín de Epidemiología de México. SSA
(<http://www.dgepi.salud.gob.mx/boletin/2007/sem18/index.htm>)
6. Boletín de vigilancia epidemiológica. IMSS
(http://www.e-salud.gob.mx/wb2/eMex/eMex_Instituto_Mexicano_del_Seguro_Social2)
7. Avendaño, C.: Introducción a la Química Farmacéutica. 2^a edición. Ed. McGraw Hill. España, 2004. pp 25-27, 39-40
8. www.vasocare.co.kr
9. www.spectroscopynow.com
10. Leow, K.P., Wright, A.W., Cramond, T.: Determination of the serum protein binding of oxycodone and morphine using ultrafiltration. Therapy Drug Monitoring, 1993;15 (5): 440-447.
11. Gornall, A.G., Bardawill, C.J.: Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. Journal of Biological Chemistry, 1949; 177: 751-766.
12. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Far, L.A., Randail, R.J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry, 1951,193: 265-275.
13. Bradford, M.M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, 1976, 72: 248-254.
14. Protein Assays. General Information. BIO-RAD. pp. 336-338

15. Willard, H., Merrit, L., Dean, J.; Métodos Instrumentales de Análisis. 7^a edición. Ed. Grupo Editorial Iberoamérica S.A. de C.V.; México, 1991. pp. 569, 574-578, 590, 592, 605-609, 611-618.
16. Skoog, D., Holler, F., Nieman, T.; Principles of Instrumental Analysis. 5^a edición. Ed. Brooks/Cole Thomson Learning.; E.U.A., 1998. Pp 931-932, 953-954, 985, 988-989.
17. <http://www.biotech.bioetica.org/d154.pdf>
18. Perrin, D., Dempséy, B.; Buffer for pH and Metal Ion Control. Ed. Science Paperbacks. pp 138-139.
19. <http://www.millipore.com/markets/appliedmkts.nsf/docs/ultrafiltration>
20. Yamazaki K., Kanaoka M.: Computational Prediction of the plasma Protein-Binding Percent of Diverse Pharmaceutical Compounds. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2004; 93(6): 1480-1494
21. Diccionario de Especialidades Farmacéuticas
(<http://www.libreriamedica8a.com/productos/1670.htm>)

APÉNDICES

Apéndice I. Sustancias químicas, materiales y equipo

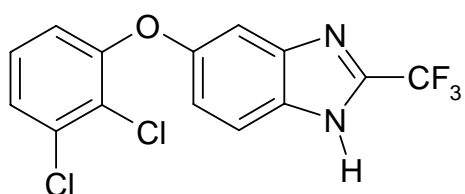
A lo largo del trabajo realizado se utilizaron diferentes materiales, sustancias químicas y equipos, que no son comunes en cualquier laboratorio químico. Por lo tanto se mencionarán en este apartado.

Sustancias químicas.

- GNV14

Sintetizado en el Laboratorio 122, Conjunto E de la Facultad de Química, UNAM.

Posee la siguiente estructura:

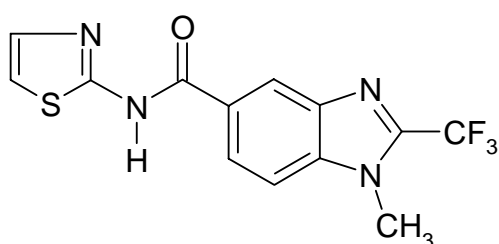


P.M. 346 g/mol

- VMAS82

Sintetizado en el Laboratorio 122, Conjunto E de la Facultad de Química, UNAM.

Posee la siguiente estructura:



P.M. 326 g/mol

- Albúmina

Albúmina de bovino

Marca: Sigma Co.® 96-99%

Peso molecular: 66200 D

- Solución Buffer de Fosfatos (PBS)

Para preparar la solución de Buffer de Fosfatos pH 7.4, se utilizaron las siguientes materias primas:

- Fosfato monobásico de sodio monohidratado [$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$]

Peso molecular: 137.99 g/mol

Marca: Mallinckrodt ®

No. de catálogo: 7892

- Fosfato dibásico de sodio dodecahidratado [$\text{NaHPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$]

Peso molecular: 358.14 g/mol

Marca: Merck ®

No. de catálogo: A484279

- Cloruro de sodio [NaCl]

Peso molecular: 58.44 g/mol

Marca: Merck ®

No. de catálogo: 704101

- Acetonitrilo (ACN)

Acetonitrilo, grado HPLC

No. de catálogo: 9017-03

Marca: J.T.Baker

- Dimetil sulfóxido

Dimetilsulfóxido

No. de catálogo: 9224-01

Marca: J. T. Baker

- Acetato de etilo

Acetato de etilo, grado HPLC 9282-03

No. de catálogo: 9282-03

Marca: J.T. Baker

- Reactivo para el ensayo de proteínas
Reactivo concentrado para ensayo de proteínas
Catálogo: 500-0006
Marca: BIO-RAD

Material

- Membrana para la filtración de acetonitrilo
Membrana Nylon (Whatman ®) 7404-004
Poro: 0.45µm, 47mm
- Filtros para centrifugación
Filtros para centrifugación
Marca: Microcon®
Modelo: YM-10
Membrana de celulosa regenerada; poro: 10kD

Equipo

- Termomezclador
Modelo: Thermomixer R
Marca: eppendorf ®
- Centrífuga
Modelo: Centrifuge 5804 R
Marca: eppendorf ®
- Condensador
Modelo: Concentrator 5301
Marca: eppendorf ®

- Purificador de agua (Desionizador)
 - Modelo: Milli-Q™ Water System
 - Marca: Millipore
 - Membrana de Acetato de celulosa (Sartorius) No. 11106
 - Poros: 0.45µm, 47mm

- Degasificador
 - Modelo: Branson 2510
 - Marca: Branson ®

- Cromatógrafo de Líquidos de Alto Rendimiento
- Sistema de administración de disolventes
 - Modelo: Binary HPLC Pump, Waters 1525
 - Marca: Waters

- Válvula de inyección
 - Loop de 20 µL
 - Marca: Rheodyne

- Detector
 - Modelo: Photodiode Array Detector, Waters 996
 - Marca: Waters

- Software
 - Millenium³²
 - Versión 3.20
 - Copyright © 1999 Waters Corporation

- Columna
 - Atlantis™ dC₁₈ 5µm S/N
 - 3.9 x 150 mm W41171K 02

Apéndice II. Ensayo de Bradford (modalidad de microensayo)

Material:

- 1 Tubo de ensaye
- 1 micropipeta de 1000 μL
- Puntas para micropipeta de 1000 μL

Sustancias químicas:

- Muestra problema
- Reactivo de ensayo de proteínas Bio-Rad

Metodología:

1. Agregar al tubo de ensaye 800 μL de muestra problema.
2. Agregar 200 μL de reactivo.
3. Esperar dos minutos.
4. Observar si existe un cambio de coloración.