



ESTUDIO IN VITRO DE LAS INTERACCIONES DE LA  
PEROXISOMACINA A1 CON LA ALBUMINA SERICA BOVINA Y CON  
LA ALBUMINA SERICA HUMANA

**ESTUDIO *IN VITRO* DE LAS INTERACCIONES DE LA  
PEROXISOMICINA A1 CON LA ALBUMINA SERICA BOVINA Y CON  
LA ALBUMINA SERICA HUMANA**

**POR:**

**Q.C.B. ADOLFO CABALLERO QUINTERO**

**TESIS**

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL  
GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN  
QUIMICA ANALITICA BIOMEDICA**

**Monterrey, Nuevo León**

**Diciembre de 1995**

**ESTUDIO *IN VITRO* DE LAS INTERACCIONES DE LA  
PEROXISOMICINA AI CON LA ALBUMINA SERICA BOVINA Y CON  
LA ALBUMINA SERICA HUMANA**

Aprobación de la Tesis:

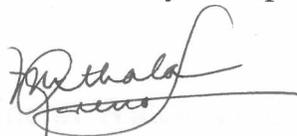


Dra. Noemí Waksman de Torres

Asesor de Tesis



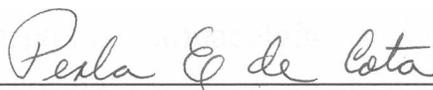
Dr. Alfredo Piñeyro López



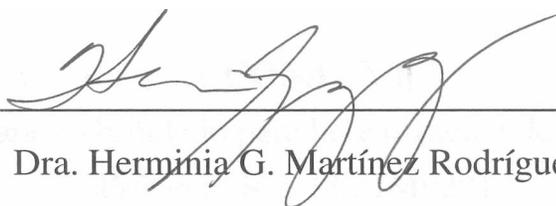
Dra. Myrthala Moreno Sepúlveda



Dr. Mario César Salinas Carmona



M.C. Perla Elizondo de Cota



Dra. Herminia G. Martínez Rodríguez

Secretario Académico del Area Básica

Subdirección de Estudios de Postgrado



## **AGRADECIMIENTOS**

### **A mi familia**

Por su apoyo, estímulo y comprensión.

### **A mis padres**

Que me dieron la formación necesaria para luchar en la vida.

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

Con profundo respeto. Agradezco su tiempo, sus consejos y su asesoría.

### **Al Dr. med. Alfredo Piñeyro López**

Con admiración y respeto. Por el apoyo brindado para la realización de esta tesis en el Depto. de Farmacología y Toxicología.

### **A CONACYT**

v

Por el apoyo brindado para la realización de esta tesis.

Proyecto Ref. 0631M9201.

?:

v • 9.

**Al Sr. Rogerio González Alanís**

Por su ayuda desinteresada.

**A mis amigos y compañeros**

Por su apoyo y estímulo para seguir adelante en la vida.

**Al comité evaluador de Tesis**

Por sus valiosas sugerencias.

# INDICE

	Página
<b>CAPITULO 1</b>	
INTRODUCCION	1
1.1 SITIOS DE UNION Y FUERZAS	2
1.2 MEDICION DE LA UNION DE PEQUEÑAS MOLECULAS A MACROMOLECULAS	2
1.2.1 TECNICAS PARA MEDIR LA UNION DE PEQUEÑAS MOLECULAS A PROTEINAS	3
1.2.1.1 Diálisis	3
1.2.1.2 Ultrafiltración	3
1.2.1.3 Espectroscopia Ultravioleta-Visible y de Fluorescencia	4
1.3 AFINIDAD Y GRADO DE LA UNION	5
1.4 ESTRUCTURA DE LA ALBUMINA	9
1.4.1 ESTRUCTURA PRIMARIA	9
1.4.2 ESTRUCTURA SECUNDARIA Y TERCARIA	9
1.5 PEROXISOMICINA A1 (T514) EXTRAIDA DE PLANTAS DEL GENERO KARWINSKIA	10
HIPOTESIS	13
OBJETIVO GENERAL	13
OBJETIVOS ESPECIFICOS	13
<b>CAPITULO 2</b>	
MATERIAL Y METODOS	14
2.1 EQUIPO	14
2.2 PREPARACION DE SOLUCIONES	14
2.2.1 SOLUCION AMORTIGUADORA DE FOSFATOS	14
2.2.2 SOLUCION PATRON DE ALBUMINA	15
2.2.3 SOLUCION DE TRABAJO DE ALBUMINA SERICA BOVINA Y DE ALBUMINA SERICA HUMANA	15
2.2.4 SOLUCION PATRON DE PEROXISOMICINA A1	16
2.2.5 SOLUCION DE TRABAJO DE T514	16

2.3	METODOLOGIA	17
2.3.1	CONTROL DE CALIDAD DE LA T514	17
2.3.1.1	Punto de fusión	17
2.3.1.2	Pureza espectroscópica	17
2.3.1.3	Pureza cromatográfica	18
2.4	ESTUDIO IN VITRO DE LAS INTERACCIONES DE LA PEROXISOMICINA AI CON LA ALBUMINA SERICA BOVINA Y CON LA ALBUMINA SERICA HUMANA ApH DE 7.2	18
2.4.1	INTERACCIONES ENTRE LA T514 Y LA ALBUMINA	18
2.4.2	ESTUDIO DEL EQUILIBRIO DE LA UNION DE LAT514 CON LA ALBUMINA	19
2.4.2.1	Determinación del tiempo adecuado para tomar la segunda lectura de absorbancia: sistema ASB-T514, 25 °C y pH 7.2	19
2.4.2.2	Titulación de la Albúmina con T514, a 25 °C y a pH de 7.2	19
2.4.2.3	Determinación del AAbsmax a 25 °C y a pH de 7.2	20
2.4.2.4	Determinación de la concentración de T514 unida y de T514 libre	22
2.4.2.5	Determinación del número promedio de moléculas de T514 unidas a la albúmina (r)	23
2.4.3	DETERMINACION DE LOS PARAMETROS TERMODINAMICOS DEL SISTEMA T514-ALBUMINA	23
2.4.3.1	Obtención del Cambio de Entalpia (AH)	23
2.4.3.2	Obtención del Cambio de Energía Libre de Gibbs (AG)	23
2.4.3.3	Obtención del Cambio de Entropía (AS)	24
2.5	ESTUDIO IN VITRO DE LAS INTERACCIONES DE LA PEROXISOMICINA AI CON LA ALBUMINA SERICA BOVINA Y CON LA ALBUMINA SERICA HUMANA ApH DE 7.4	24
2.6	TRATAMIENTO ESTADISTICO	24

## CAPITULO 3

RESULTADOS	25	
3.1	CONTROL DE CALIDAD DE LA T514	25
3.2	ESTUDIO IN VITRO DE LAS INTERACCIONES DE LA PEROXISOMICINA AI CON LA ALBUMINA SERICA BOVINA Y CON LA ALBUMINA SERICA HUMANA ApH 7.2	25
3.2.1	INTERACCIONES ENTRE LA T514 Y LA ALBIMNA.	25

3.2.2 ESTUDIO DEL EQUILIBRIO DE LA UNION DE LA T514 CON LA ALBUMINA	27
3.2.2.1 Determinación del tiempo adecuado para tomar la segunda lectura de absorbancia: sistema ASB-T514, 25 °C y a pH 7.2	27
3.2.2.2 Titulación de la albúmina con T514 a pH 7.2	27
3.2.2.3 Determinación del cambio de absorbancia máximo (AAbsmax) a pH 7.2	31
3.2.2.4 Determinación de la concentración de T514 unida y de T514 libre	40
3.2.2.5 Determinación del número promedio de moléculas de T514 unidas a la albúmina ( $r$ )	40
3.2.3 DETERMINACION DE LOS PARAMETROS TERMODINAMICOS DEL SISTEMA T514-ALBUMINA	59
3.3 ESTUDIO IN VITRO DE LAS INTERACCIONES DE LA PEROXISOMICINA AI CON LA ALBUMINA SERICA BOVINA Y CON LA ALBUMINA SERICA HUMANA A pH 7.4	61
3.3.1 ESTUDIO DEL EQUILIBRIO DE LA UNION DE LA T514 CON LA ALBUMINA	61
3.3.1.1 Titulación de la albúmina con T514 a pH 7.4	61
3.3.1.2 Determinación del cambio de absorbancia máximo (AAbsmax) a pH 7.2	65
3.3.1.3 Determinación de la concentración de T514 unida y de T514 libre	74
3.3.1.4 Determinación del número promedio de moléculas de T514 unidas a la albúmina ( $r$ )	74
3.3.2 DETERMINACION DE LOS PARAMETROS TERMODINAMICOS DEL SISTEMA T514-ALBUMINA	93
 CAPITULO 4	
DISCUSION	96
 CAPITULO 5	
CONCLUSIONES	102
RECOMENDACIONES	103
 BIBLIOGRAFIA	104

## INDICE DE FIGURAS

	Página
Fig. 1 Interacción de un medicamento con una proteína	5
Fig. 2 Gráfica teórica de Scatchard	8
Fig. 3 Estructura química de la Peroxisomicina A1 (T514)	12
Fig. 4 Titulación de la ASB con la T514	20
Fig. 5 Determinación del cambio de absorbancia máximo (AAbsmax.)	22
Fig. 6 Espectros de absorbancia	26
- Espectro de la T514 20 pM	
- Espectro de la ASB 10 pM	
- Espectro de la mezcla T514 (20 pM) y ASB (10 pM)	
Fig. 7 Curva de titulación de la ASB (10 pM) con T541: 7.2 y 15 °C	28
Fig. 8 Curva de titulación de la ASB (10 pM) con T541: 7.2 y 20 °C	28
Fig. 9 Curva de titulación de la ASB (10 pM) con T541: 7.2 y 25 °C	29
Fig. 10 Curva de titulación de la ASB (10 pM) con T541: 7.2 y 30 °C	29
Fig. 11 Curva de titulación de la ASH (10 pM) con T541: 7.2 y 20 °C	30
Fig. 12 Curva de titulación de la ASH (10 pM) con T541: 7.2 y 25 °C	30
Fig. 13 Curva de titulación de la ASH (10 pM) con T541: 7.2 y 30 °C	31
Fig. 14 Estimación del AAbsmax del sistema T514-ASB: pH 7.2 y 15 °C	35
Fig. 15 Estimación del AAbsmax del sistema T514-ASB: pH 7.2 y 20 °C	36
Fig. 16 Estimación del AAbsmax del sistema T514-ASB: pH 7.2 y 25 °C	36
Fig. 17 Estimación del AAbsmax del sistema T514-ASB: pH 7.2 y 30 °C	37
Fig. 18 Estimación del AAbsmax del sistema T514-ASH: pH 7.2 y 20 °C	37
Fig. 19 Estimación del AAbsmax del sistema T514-ASH: pH 7.2 y 25 °C	38
Fig. 20 Estimación del AAbsmax del sistema T514-ASH: pH 7.2 y 30 °C	38
Fig. 21 Gráfica de Scatchard de la unión de T514 con ASB: pH 7.2 y 15 °C	48
Fig. 22 Gráfica de Scatchard de la unión de T514 con ASB en N1: pH 7.2 y 15 °C	48
Fig. 23 Gráfica de Scatchard de la unión de T514 con ASB en N2: pH 7.2 y 15 °C	49
Fig. 24 Gráfica de Scatchard de la unión de T514 con ASB: pH 7.2 y 20 °C	49
Fig. 25 Gráfica de Scatchard de la unión de T514 con ASB en N1: pH 7.2 y 20 °C	50
Fig. 26 Gráfica de Scatchard de la unión de T514 con ASB en N2: pH 7.2 y 20 °C	50
Fig. 27 Gráfica de Scatchard de la unión de T514 con ASB: pH 7.2 y 25 °C	51
Fig. 28 Gráfica de Scatchard de la unión de T514 con ASB en N1: pH 7.2 y 25 °C	51

Fig. 29 Gráfica de Scatchard de la unión de T514 con ASB en N2: pH 7.2 y 25 °C	52
Fig. 30 Gráfica de Scatchard de la unión de T514 con ASB: pH 7.2 y 30 °C	52
Fig. 31 Gráfica de Scatchard de la unión de T514 con ASB en N1: pH 7.2 y 30 °C	53
Fig. 32 Gráfica de Scatchard de la unión de T514 con ASB en N2: pH 7.2 y 30 °C	53
Fig. 33 Gráfica de Scatchard de la unión de T514 con ASH: pFI 7.2 y 20 °C	54
Fig. 34 Gráfica de Scatchard de la unión de T514 con ASH en NI: pH 7.2 y 20 °C	54
Fig. 35 Gráfica de Scatchard de la unión de T514 con ASH en N2: pH 7.2 y 20 °C	55
Fig. 36 Gráfica de Scatchard de la unión de T514 con ASH: pH 7.2 y 25 °C	55
Fig. 37 Gráfica de Scatchard de la unión de T514 con ASH en NI: pH 7.2 y 25 °C	56
Fig. 38 Gráfica de Scatchard de la unión de T514 con ASH en N2: pH 7.2 y 25 °C	56
Fig. 39 Gráfica de Scatchard de la unión de T514 con ASH: pH 7.2 y 30 °C	57
Fig. 40 Gráfica de Scatchard de la unión de T514 con ASH en NI: pH 7.2 y 30 °C	57
Fig. 41 Gráfica de Scatchard de la unión de T514 con ASH en N2: pH 7.2 y 30 °C	58
Fig. 42 Gráfica de Van 't Hof para la unión de T514 a la ASB, pH 7.2	59
Fig. 43 Gráfica de Van 't Hof para la unión de T514 a la ASH, pH 7.2	59
Fig. 44 Curva de titulación de la ASB (10 pM) con T541: 7.4 y 15 °C	61
Fig. 45 Curva de titulación de la ASB (10 pM) con T541: 7.4 y 20 °C	62
Fig. 46 Curva de titulación de la ASB (10 pM) con T541: 7.4 y 25 °C	62
Fig. 47 Curva de titulación de la ASB (10 pM) con T541: 7.4 y 30 °C	63
Fig. 48 Curva de titulación de la ASH (10 pM) con T541: 7.4 y 20 °C	63
Fig. 49 Curva de titulación de la ASH (10 pM) con T541: 7.4 y 25 °C	64
Fig. 50 Curva de titulación de la ASH (10 pM) con T541: 7.4 y 30 °C	64
Fig. 51 Estimación del AAbsmax del sistema T514-ASB: pH 7.4 y 15 °C	69
Fig. 52 Estimación del AAbsmax del sistema T514-ASB: pH 7.4 y 20 °C	69
Fig. 53 Estimación del AAbsmax del sistema T514-ASB: pH 7.4 y 25 °C	70
Fig. 54 Estimación del AAbsmax del sistema T514-ASB: pH 7.4 y 30 °C	70
Fig. 55 Estimación del AAbsmax del sistema T514-ASH: pH 7.4 y 20 °C	71
Fig. 56 Estimación del AAbsmax del sistema T514-ASH: pH 7.4 y 25 °C	71
Fig. 57 Estimación del AAbsmax del sistema T514-ASH: pH 7.4 y 30 °C	72
Fig. 58 Gráfica de Scatchard de la unión de T514 con ASB: pH 7.4 y 15 °C	82
Fig. 59 Gráfica de Scatchard de la unión de T514 con ASB en NI: pH 7.4 y 15°C	83
Fig. 60 Gráfica de Scatchard de la unión de T514 con ASB en N2: pH 7.4 y 15°C	83
Fig. 61 Gráfica de Scatchard de la unión de T514 con ASB: pH 7.4 y 20 °C	84
Fig. 62 Gráfica de Scatchard de la unión de T514 con ASB en NI: pH 7.4 y 20 °C	84

Fig. 63	Gráfica de Scatchard de la unión de T514 con ASB en N2: pFI 7.4 y 20 °C	85
Fig. 64	Gráfica de Scatchard de la unión de T514 con ASB: pH 7.4 y 25 °C	85
Fig. 65	Gráfica de Scatchard de la unión de T514 con ASB en NI: pH 7.4 y 25 °C	86
Fig. 66	Gráfica de Scatchard de la unión de T514 con ASB en N2: pH 7.4 y 25 °C	86
Fig. 67	Gráfica de Scatchard de la unión de T514 con ASB: pH 7.4 y 30 °C	87
Fig. 68	Gráfica de Scatchard de la unión de T514 con ASB en NI: pH 7.4 y 30 °C	87
Fig. 69	Gráfica de Scatchard de la unión de T514 con ASB en N2: pH 7.4 y 30 °C	88
Fig. 70	Gráfica de Scatchard de la unión de T514 con ASH: pH 7.4 y 20 °C	88
Fig. 71	Gráfica de Scatchard de la unión de T514 con ASH en NI: pH 7.4 y 20 °C	89
Fig. 72	Gráfica de Scatchard de la unión de T514 con ASH en N2: pH 7.4 y 20 °C	89
Fig. 73	Gráfica de Scatchard de la unión de T514 con ASH: pH 7.4 y 25 °C	90
Fig. 74	Gráfica de Scatchard de la unión de T514 con ASH en NI: pH 7.4 y 25 °C	90
Fig. 75	Gráfica de Scatchard de la unión de T514 con ASH en N2: pH 7.4 y 25 °C	91
Fig. 76	Gráfica de Scatchard de la unión de T514 con ASH: pH 7.4 y 30 °C	91
Fig. 77	Gráfica de Scatchard de la unión de T514 con ASH en NI: pH 7.4 y 30 °C	92
Fig. 78	Gráfica de Scatchard de la unión de T514 con ASH en N2: pH 7.4 y 30 °C	92
Fig. 79	Gráfica de Van 't Hof para la unión de T514 a la ASB, pH 7.4	94
Fig. 80	Gráfica de Van 't Hof para la unión de T514 a la ASH, pH 7.4	94

## INDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1 Soluciones de estándares de albúmina sérica bovina y humana	15
Tabla 2 Soluciones de estándares de T514	16
Tabla 3 Parámetros de calidad	17
Tabla 4 Control de calidad de la T514 lote 57	25
Tabla 5 Datos de AAbs a los distintos tiempos	27
Tabla 6 Abs a 15 °C ya pH 7.2 para el sistema T514-ASB	32
Tabla 7 Abs a 20 °C ya pH 7.2 para el sistema T514-ASB	32
Tabla 8 Abs a 25 °C ya pH 7.2 para el sistema T514-ASB	33
Tabla 9 Abs a 30 °C ya pH 7.2 para el sistema T514-ASB	33
Tabla 10 Abs a 20 °C y a pH 7.2 para el sistema T514-ASH	34
Tabla 11 Abs a 25 °C y a pH 7.2 para el sistema T514-ASH	34
Tabla 12 Abs a 30 °C y a pH 7.2 para el sistema T514-ASH	35
Tabla 13 AAbsmax para el sistema T514-ASB: pH 7.2	35
Tabla 14 AAbsmax para el sistema T514-ASH: pH 7.2	39
Tabla 15 Unidades de absorbancia producidos por mol de T514 unido: sistema T514-ASB a pH 7.2	40
Tabla 16 Unidades de absorbancia producidos por mol de T514 unido: sistema T514-ASH a pH 7.2	40
Tabla 17 Titulación de la ASB (10 pM): pH 7.2 y 15 °C	41
Tabla 18 Titulación de la ASB (10 pM): pH 7.2 y 20 °C	42
Tabla 19 Titulación de la ASB (10 pM): pH 7.2 y 25 °C	43
Tabla 20 Titulación de la ASB (10 pM): pH 7.2 y 30 °C	44
Tabla 21 Titulación de la ASH (10 pM): pH 7.2 y 20 °C	45
Tabla 22 Titulación de la ASH (10 pM): pH 7.2 y 25 °C	46
Tabla 23 Titulación de la ASH (10 pM): pH 7.2 y 30 °C	47
Tabla 24 Parámetros de unión de T514 a ASB: pH 7.2	58
Tabla 25 Parámetros de unión de T514 a ASH: pH 7.2	58
Tabla 26 Datos termodinámicos de la unión de la T514 con la ASB a 25 °C y a pH 7.2	60
Tabla 27 Interacciones entre la T514 y la ASB: pH 7.2. Porcentaje de contribución al AG	60
Tabla 28 Datos termodinámicos de la unión de la T514 con la ASH a 25 °C y a pH 7.2	60
Tabla 29 Interacciones entre la T514 y la ASH: pH 7.2. Porcentaje de contribución al AG	60

Tabla 30 Abs a 15 °C y a pH 7.4 para el sistema T514-ASB	65
Tabla 31 Abs a 20 °C y a pH 7.4 para el sistema T514-ASB	66
Tabla 32 Abs a 25 °C y a pH 7.4 para el sistema T514-ASB	66
Tabla 33 Abs a 30 °C y a pH 7.4 para el sistema T514-ASB	67
Tabla 34 Abs a 20 °C y a pH 7.4 para el sistema T514-ASH	67
Tabla 35 Abs a 25 °C y a pH 7.4 para el sistema T514-ASH	68
Tabla 36 Abs a 30 °C y a pH 7.4 para el sistema T514-ASH	68
Tabla 37 AAbsmax para el sistema T514-ASB: pH 7.4	72
Tabla 38 AAbsmax para el sistema T514-ASH: pH 7.4	73
Tabla 39 Unidades de absorbancia producidos por mol de T514 unido: sistema T514-ASB a pH 7.4	73
Tabla 40 Unidades de absorbancia producidos por mol de T514 unido: sistema T514-ASH a pH 7.4	74
Tabla 41 Titulación de la ASB (10 pM): pH 7.4 y 15 °C	75
Tabla 42 Titulación de la ASB (10 $\mu$ M): pH 7.4 y 20 °C	76
Tabla 43 Titulación de la ASB (10 pM): pH 7.4 y 25 °C	77
Tabla 44 Titulación de la ASB (10 pM): pH 7.4 y 30 °C	78
Tabla 45 Titulación de la ASH (10 pM): pH 7.4 y 20 °C	79
Tabla 46 Titulación de la ASH (10 pM): pH 7.4 y 25 °C	80
Tabla 47 Titulación de la ASH (10 pM): pH 7.4 y 30 °C	81
Tabla 48 Parámetros de unión de T514 a ASB: pH 7.4	93
Tabla 49 Parámetros de unión de T514 a ASH: pH 7.4	93
Tabla 50 Datos termodinámicos de la unión de la T514 con la ASB a 25 °C y a pH 7.4	95
Tabla 51 Interacciones entre la T514 y la ASB: pH 7.4. Porcentaje de contribución al AG	95
Tabla 52 Datos termodinámicos de la unión de la T514 con la ASH a 25 °C y a pH 7.4	95
Tabla 53 Interacciones entre la T514 y la ASH: pH 7.4. Porcentaje de contribución al AG	95
Tabla 54 Parámetros de unión: T514-ASB y T514-ASH	98
Tabla 55 Parámetros termodinámicos de la unión T514-ASB y T514-ASH	101

## ABREVIATURAS

$a$	Absorbancia producido por la unión de 1 pM de T514
AAbs	Cambio de absorbancia
AAbsMAX	Cambio de absorbancia máximo
AG	Cambio de Energía Libre de Gibbs.
AH	Cambio de Entalpia
AS	Cambio de Entropía
1/AAbs	Valor inverso del cambio de absorbancia
$\epsilon_{1\%}^{1\text{cm}}$	Coefficiente de extinción molar para una solución al 1 %, medido en una celda de un centímetro de trayecto óptico.
0	Fracción de sitios ligados
ADN	Acido desoxirribonucleico
ASB	Albúmina Sérica Bovina
ASH	Albúmina Sérica Humana
°C	Grados Centígrados
cois.	Colaboradores
CT <sub>50</sub>	Concentración tóxica 50
C.V. %	Coefficiente de Variación en porcentaje
Fig.	Figura
K.	Karwinskia
Ka	Constante de afinidad
Kd	Constante de disociación
ln	Logaritmo neperiano
cm	Centímetro
nm	Nanómetro
L	Litro
mL	Mililitro
µL	Microlitro
M	Molar

mMoles	Milimoles
mM	Milimolar
pM	Micromolar
g	Gramo
mg	Miligramo
Mg	Microgramo
min	Minuto
seg	Segundo
Kcal mol <sup>-1</sup>	Kilocalorías/mol
[M]	Concentración de Medicamento
m	Pendiente de la recta
n	Número de repeticiones
N	Número de sitios de unión
OH	Oxhidrilo
pH	Potencial de Hidrógeno
ppm	Partes por millón
<i>r</i>	Número promedio de moléculas de medicamento                      unido
<i>r</i> / <sub>R</sub>	Razón de la velocidad de flujo de la muestra con respecto al eluyente
T514	Toxina 514
T	Temperatura en grados absolutos
u.a.	Unidades arbitrarias
u.e.	Unidades entrópicas
UV-Vis	Ultravioleta Visible

# CAPITULO 1

## INTRODUCCION

La mayoría de los medicamentos son acarreados de sus sitios de absorción a sus sitios de acción y eliminación por la circulación sanguínea. Algunos medicamentos se disuelven simplemente en el agua del plasma, pero muchos otros se asocian parcialmente con constituyentes sanguíneos tales como albúmina, globulinas, lipoproteínas y eritrocitos. Para la gran mayoría de los fármacos unidos a constituyentes séricos, la albúmina es cuantitativamente la macromolécula más importante y más frecuente. Recientemente se ha encontrado que algunos medicamentos básicos se unen extensivamente a la alfa-glicoproteína ácida<sup>n</sup>A

La unión a proteínas plasmáticas influye en el destino de los fármacos en el cuerpo. De esta manera sólo el medicamento no unido o libre difunde a través de la pared capilar y de la membrana celular, alcanzando así su sitio de acción; además la velocidad de transferencia a los tejidos, que es un proceso de difusión, depende de la concentración de medicamento libre. Por otra parte, el medicamento unido a las proteínas no filtra en el glomérulo ni experimenta biotransformaciones, sino cuando está liberado. Ya que la unión del fármaco a la albúmina es fácilmente reversible, los complejos medicamento-proteína sirven como un reservorio circulante de medicamento que libera más fármaco para así ser biotransformado o excretado. De este modo, la unión a albúmina decrece la máxima intensidad, pero incrementa la duración de acción de muchos medicamentos: por ejemplo, algunos compuestos yodados que se emplean como agentes radiopacos de diagnóstico que se unen fuertemente a las proteínas plasmáticas tiene una vida media del orden de los dos años y medio en el hombre<sup>^</sup>

Es importante hacer notar que en pacientes que presentan hipoalbuminemia, si se les administra medicamentos que se unen en una alta proporción a las proteínas plasmáticas, puede ser necesario modificar' la dosis.

Otra consecuencia importante de este fenómeno lo constituye el hecho de que la unión a proteínas puede aumentar la solubilidad de un medicamento en el plasma. La bishidroxicumarina que se une en un 98% a la albúmina, tiene en la sangre una solubilidad considerablemente mayor que en el agua<sup>O</sup>).

# CAPITULO 1

## INTRODUCCION

La mayoría de los medicamentos son acarreados de sus sitios de absorción a sus sitios de acción y eliminación por la circulación sanguínea. Algunos medicamentos se disuelven simplemente en el agua del plasma, pero muchos otros se asocian parcialmente con constituyentes sanguíneos tales como albúmina, globulinas, lipoproteínas y eritrocitos. Para la gran mayoría de los fármacos unidos a constituyentes séricos, la albúmina es cuantitativamente la macromolécula más importante y más frecuente. Recientemente se ha encontrado que algunos medicamentos básicos se unen extensivamente a la alfa-glicoproteína ácida<sup>(1)</sup>.

La unión a proteínas plasmáticas influye en el destino de los fármacos en el cuerpo. De esta manera sólo el medicamento no unido o libre difunde a través de la pared capilar y de la membrana celular, alcanzando así su sitio de acción; además la velocidad de transferencia a los tejidos, que es un proceso de difusión, depende de la concentración de medicamento libre. Por otra parte, el medicamento unido a las proteínas no filtra en el glomérulo ni experimenta biotransformaciones, sino cuando está liberado. Ya que la unión del fármaco a la albúmina es fácilmente reversible, los complejos medicamento-proteína sirven como un reservorio circulante de medicamento que libera más fármaco para así ser biotransformado o excretado. De este modo, la unión a albúmina decrece la máxima intensidad, pero incrementa la duración de acción de muchos medicamentos: por ejemplo, algunos compuestos yodados que se emplean como agentes radiopacos de diagnóstico que se unen fuertemente a las proteínas plasmáticas tiene una vida media del orden de los dos años y medio en el hombre<sup>^</sup>.

Es importante hacer notar que en pacientes que presentan hipoalbuminemia, si se les administra medicamentos que se unen en una alta proporción a las proteínas plasmáticas, puede ser necesario modificar la dosis.

Otra consecuencia importante de este fenómeno lo constituye el hecho de que la unión a proteínas puede aumentar la solubilidad de un medicamento en el plasma. La bishidroxicumarina que se une en un 98% a la albúmina, tiene en la sangre una solubilidad considerablemente mayor que en el agua<sup>O</sup>).

## 1.1 SITIOS DE UNION Y FUERZAS.

La albúmina tiene una carga neta negativa al pH del suero, sin embargo, puede interactuar con medicamentos con carga tanto positiva como negativa. Teóricamente, todos los sitios cargados en la albúmina pueden funcionar como sitios de unión para drogas cargadas apropiadamente, pero muchos sitios están ocultos o protegidos en la estructura tridimensional de la molécula. Las uniones iónicas entre fármacos y la albúmina generalmente no son fuertes, y hay poca correlación entre la carga neta en la albúmina y el grado de unión de la mayoría de los medicamentos. No obstante, la atracción inicial y la especificidad de la orientación de una molécula de fármaco hacia su sitio de unión en la albúmina puede ser una interacción electrostática, la cual se refuerza por uniones de hidrógeno, uniones hidrofóbicas y uniones dipolo inducido-dipolo (atracciones de Van der Waals). Muchos fármacos que se unen fuertemente a la albúmina son débilmente solubles en agua, y para tales medicamentos las uniones hidrofóbicas en la albúmina frecuentemente son importantes. Se pueden formar uniones covalentes en los casos de uniones irreversibles<sup>3,4, 5\</sup>

La presencia de un grupo ionizable exalta aparentemente la afinidad del medicamento por la proteína; tanto la naturaleza como la posición de los sustituyentes puede influir sobre las características de dicha asociación. La presencia de cadenas alquílicas no polares y sustituyentes como alcoholes, ácidos o sulfatos de cadena lineal, puede incrementar señaladamente la interacción. Este tipo de incremento parece deberse a una interacción entre las porciones lipofílicas de la proteína y del medicamento. De modo similar, los electrones de un anillo aromático pueden contribuir a esta clase de asociación lipofílica<sup>^</sup>).

## 1.2 MEDICION DE LA UNION DE PEQUEÑAS MOLECULAS A MACROMOLECULAS .

La unión de medicamentos a la albúmina usualmente se ha estudiado *in vitro* por equilibrio de diálisis, ultrafiltración o por métodos espectroscópicos. Estas técnicas dan resultados similares pero no siempre idénticos.

Los estudios *in vitro* de la interacción de fármacos a proteínas debe establecer no sólo la extensión de la unión del medicamento sino además el número de sitios de unión y sus afinidades por el fármaco. Estudios más detallados pueden determinar la naturaleza de las fuerzas de unión y la influencia de factores como la temperatura, el pH y la fuerza iónica<sup>^5</sup>).

## 1.2.1 TECNICAS PARA MEDIR LA UNION DE PEQUEÑAS MOLECULAS A PROTEINAS.

### 1.2.1.1 Diálisis.

Este método “clásico” para estimar el grado de unión de moléculas de fármaco a proteínas involucra la separación física de las moléculas de medicamento libre que son relativamente pequeñas (en la mayoría de los casos) de las partículas de proteínas y de complejos medicamento-proteína. Tal separación se efectúa por el uso de una membrana que tiene poros grandes que permiten el paso de moléculas pequeñas pero no lo suficiente para permitir el paso de grandes moléculas

La técnica convencional de diálisis consiste en colocar la solución a dializar en una bolsa atada de ambos extremos, dicha bolsa se pone en un contenedor con una solución amortiguadora y se mantiene en agitación por varias horas. Para lograr el equilibrio bajo tales condiciones se requiere un tiempo relativamente grande, 10-20 horas o más, dependiendo primeramente de los volúmenes de las soluciones y del área de lamembrana<sup>(7)</sup>). Luego de establecerse el equilibrio, se determina la concentración del medicamento en el contenedor libre de proteína<sup>(8)</sup>).

$$f_u = \frac{A_b}{A_t} = \frac{A_t - A_f}{A_t} \sim \frac{[M]_{LIBRE} \cdot V_t}{A_t}$$

fb	fracción de medicamento unida a proteína
Ab	cantidad de medicamento unida a proteína
At	cantidad de medicamento total
Af	cantidad de medicamento libre
[ M I LIBRE	concentración de medicamento libre
Vt	volumen total.

Lo anterior conduce a errores debido a difusión del amortiguador a través de la membrana modificando las concentraciones de proteína y medicamento.

### 1.2.1.2 Ultrafiltración.

La separación de una pequeña porción del fármaco libre en el equilibrio con una proteína se realiza fácilmente por filtración a través de una membrana adecuada, usualmente con la ayuda de centrifugación o de una presión alta<sup>(?)</sup>.

Los resultados se pueden alterar por uniones del medicamento a la membrana. Para compensarlo se puede hacer un blanco de medicamento<sup>(8)</sup>).

## 1.2.1 TECNICAS PARA MEDIR LA UNION DE PEQUEÑAS MOLECULAS A PROTEINAS.

### 1.2.1.1 Diálisis.

Este método “clásico” para estimar el grado de unión de moléculas de fármaco a proteínas involucra la separación física de las moléculas de medicamento libre que son relativamente pequeñas (en la mayoría de los casos) de las partículas de proteínas y de complejos medicamento-proteína. Tal separación se efectúa por el uso de una membrana que tiene poros grandes que permiten el paso de moléculas pequeñas pero no lo suficiente para permitir el paso de grandes moléculas

La técnica convencional de diálisis consiste en colocar la solución a dializar en una bolsa atada de ambos extremos, dicha bolsa se pone en un contenedor con una solución amortiguadora y se mantiene en agitación por varias horas. Para lograr el equilibrio bajo tales condiciones se requiere un tiempo relativamente grande, 10-20 horas o más, dependiendo primeramente de los volúmenes de las soluciones y del área de lamembrana<sup>(7)</sup>). Luego de establecerse el equilibrio, se determina la concentración del medicamento en el contenedor libre de proteínaW.

$$f_u = \frac{A_b}{A_t} = \frac{A_t - A_f}{A_t} \sim \frac{[M]_{LIBRE} \cdot V_t}{A_t}$$

fb	fracción de medicamento unida a proteína
Ab	cantidad de medicamento unida a proteína
At	cantidad de medicamento total
Af	cantidad de medicamento libre
[ M ] LIBRE	concentración de medicamento libre
Vt	volumen total.

Lo anterior conduce a errores debido a difusión del amortiguador a través de la membrana modificando las concentraciones de proteína y medicamento.

### 1.2.1.2 Ultrafiltración.

La separación de una pequeña porción del fármaco libre en el equilibrio con una proteína se realiza fácilmente por filtración a través de una membrana adecuada, usualmente con la ayuda de centrifugación o de una presión alta<sup>(?)</sup>.

Los resultados se pueden alterar por uniones del medicamento a la membrana. Para compensarlo se puede hacer un blanco de medicamento<sup>(8)</sup>).

### 1.2.1.3 Espectroscopia Ultravioleta- Visible y de Fluorescencia.

Los métodos espectrofotométricos son adecuados para mediciones de la estequiometría de la unión y de la afinidad entre el ligando y la macromolécula. Además, tales métodos pueden proveer más información acerca del complejo proteína-ligando, como son:

- (i) cinética de formación o ruptura del complejo.
- (ii) cambios estructurales en la proteína seguidos de la unión.
- (iii) información limitada de la naturaleza de los sitios de unión: polaridad, pK de grupos ionizables, residuos vecinos, etc.

La medición espectrofotométrica de la unión de ligandos a macromoléculas requiere que las propiedades ópticas del complejo proteína-ligando difiera del ligando libre y de la macromolécula libre, ya sea en cambios espectrales en la proteína o en el ligando. Una ventaja de estos métodos es que los resultados son instantáneos (a diferencia de la diálisis).

La desventaja principal es que las medidas de la señal óptica son empíricas (no se tiene idea del cambio óptico que se espera). Si hay múltiples sitios de unión, no se puede asumir que los cambios espectrales observados al unir un segundo ligando será idéntico al del primero. Sin embargo, mediante un adecuado tratamiento de datos se puede solucionar este problema.

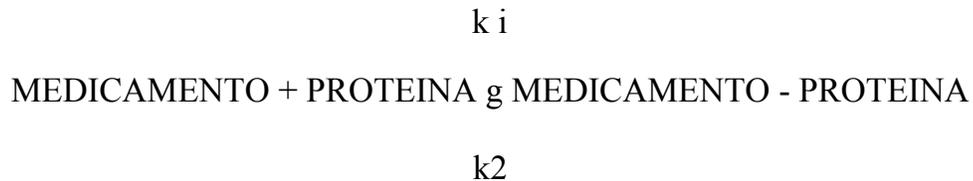
Por otro lado la espectroscopia de absorción es uno de los métodos instrumentales más útiles que dispone el químico para el análisis cuantitativo. Las características más importantes de los métodos espectrométricos son: gran aplicación, alta sensibilidad, selectividad moderada a alta, buena precisión, facilidad y comodidad.

Los métodos fluorométricos son inherentemente aplicables a escalas de concentración más bajas que las determinaciones espectrofotométricas, y figuran así entre las técnicas analíticas más sensibles de que dispone el químico.

Para llevara cabo dichos experimentos se determina la absorción (o fluorescencia) de la proteína y/o del medicamento y se monitorea el efecto de agregar valias concentraciones de medicamento; se debe observar una respuesta lineal al graficar el logaritmo de la absorbancia (o fluorescencia relativa) contra el logaritmo de la concentración. Cualquier desviación indicaría que hay reacciones laterales: descomposición, autoagregación, etc.

### 1.3 AFINIDAD Y GRADO DE LA UNIÓN.

La interacción de un medicamento con un sitio de unión en una proteína puede ser considerada una reacción reversible que obedece la Ley de acción de masas. La concentración total del medicamento medido en suero es la suma de las concentraciones de medicamento libre y medicamento unido (Figura 1).



**Figura 1. Interacción de un medicamento y una proteína.**

El proceso de asociación y disociación del medicamento y la proteína tienen una vida media de pocos milisegundos. La afinidad entre un medicamento y sus sitios de unión en la macromolécula se expresa como la relación de concentraciones del medicamento unido ( $[PM]$ ) entre el producto de la concentración de medicamento no unido ( $[M]_{LIBRE}$ ) y de la concentración de albúmina ( $[P]$ ):

$$\frac{[PM]}{[M]_{LIBRE} [P]} = \frac{k_1}{k_2} = K_a \quad (1)$$

En donde,  $k_1$  y  $k_2$  son las constantes de velocidad de asociación y de disociación respectivamente. El valor de la relación de las constantes  $k_1/k_2$  es la constante de asociación ( $K_a$ ) o constante de afinidad y sus unidades son litros por mol. Esta, es más frecuentemente expresada en términos de la constante de disociación ( $K_d$ ), la que es igual a  $k_2/k_1$ , sus unidades son moles por litro y es inversamente proporcional a la afinidad. La constante de disociación iguala al valor de la concentración del medicamento libre, cuando el 50% de los sitios de unión correspondientes en la proteína están saturados.

A cualquier concentración de un determinado medicamento y a cualquier concentración de albúmina, la fracción no unida se eleva con el decremento de la afinidad (incremento de la constante de disociación,  $K_d$ ) y con el incremento de la concentración total de fármaco o cuando la concentración de la albúmina decrece. Si

la concentración de la albúmina está en el intervalo normal y tiene una afinidad de unión muy alta ( $K_d$  muy bajo) y por otra parte la concentración total de medicamento es baja, prácticamente todo el medicamento puede estar presente en el complejo de unión en el suero. Aún con muy alta afinidad de unión y con una concentración normal de albúmina la capacidad de unión se satura a altas concentraciones de fármaco y la concentración de medicamento libre se eleva rápidamente.

La temperatura, el pH y la fuerza iónica pueden afectar el número de sitios de unión y su constante de disociación *in vitro* y cuando clínicamente encontramos variaciones en estos factores pueden ser de importancia. La competencia por sitios de unión en proteínas plasmáticas por sustancias endógenas, tales como ácidos grasos libres u otros ácidos orgánicos, pueden jugar un papel importante<sup>11</sup>).

*El número promedio de moléculas de medicamento ligadas a proteínas ( $\bar{r}$ ), está dado por la relación de la concentración de medicamento unido entre la concentración de proteína<sup>110</sup>).*

Esto es:

$$\bar{r} = \frac{[M]_{\text{UNIDO}}}{pT} \quad (2)$$

El número de moléculas de medicamento unido depende de la constante de equilibrio de la unión, del número de sitios de unión, de la concentración de la macromolécula y de la concentración del medicamento. Cuando hay solamente un sitio de unión,  $\bar{r}$  varía desde 0 hasta 1 y es idéntico a  $\theta$ , la *fracción de sitios ligados*. Si hay  $N$  sitios de unión, la fracción de sitios ligados es:

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

Si los sitios de unión de la proteína son idénticos e independientes, la expresión para  $\theta$  en el equilibrio no depende del número de sitios por macromolécula. Los términos “idénticos” e “independientes” significa que la unión en un sitio no cambia la unión en otro sitio y todos los sitios tienen la misma constante de equilibrio de enlace. Podemos deducir con relativa facilidad una expresión para  $\theta$  para un sitio y aplicarla a cualquier número de sitios.

La fracción de sitios ocupados por M es:

$$\frac{[PM]}{[P] + [PM]} \quad (4)$$

Estamos ignorando coeficientes de actividad. Usando la constante de equilibrio (Ec. 1) para sustituir [PM] en (4) resulta:

$$\frac{K_a[P][M]}{[P] + K_a[P][M]}$$

y reorganizando se obtiene:

$$\frac{K_a[M]}{1 + K_a[M]} \quad (6)$$

Esta ecuación es cierta para todos los N, si los sitios son idénticos e independientes. Resolviendo para  $K_a[M]$  obtenemos:

$$r/N = K_a[M] \quad (7)$$

Sustituyendo  $r/N$  (Ec. 3) y simplificando, tenemos:

$$N - r = \frac{r}{K_a[M]} \quad (8)$$

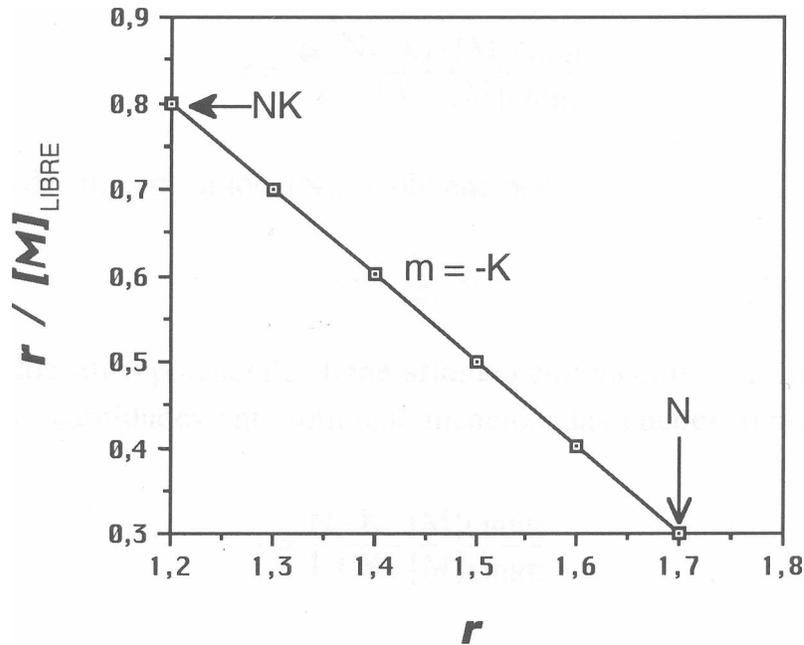
Reordenando obtenemos la ecuación de Scatchard<sup>10, 11</sup>), la cual se usa frecuentemente para estudiar la unión de especies a una macromolécula.

$$\frac{r}{[M]_{LIBRE}} = K_a(N - r) \quad (9)$$

Después de obtener los valores de  $r$  y de  $[M]_{LIBRE}$  en cada punto de la curva de titulación se grafican los valores de  $r/[M]_{LIBRE}$  en función de  $r$  (10,11) (Véase Fig. 2).

Una gráfica de  $r/[M]_{LIBRE}$  en función de  $r$  debería dar una línea recta con pendiente  $-K_a$ , el intercepto en  $y$  es  $NK_a$  y el intercepto en  $x$  es  $N/2$ . Si la gráfica no da una línea recta, ello indica que los sitios de unión no son idénticos o no son independientes. A menudo se encuentran una línea recta para bajos valores de  $r$ , pero la curvatura se acentúa a medida que M se liga. Esto indica que las primeras

moléculas ligadas no afectan las propiedades de las macromoléculas, pero al aumentar el número de M ligadas, se incrementan las interacciones)<sup>10</sup>).



**Figura 2. Gráfica teórica de Scatchard.**

A concentraciones altas de medicamento, la mayoría de los sitios de unión en la molécula de proteína están saturados. Cuando un medicamento se une con distinta afinidad en los diferentes sitios de la molécula de albúmina, se involucran varios equilibrios. Cada uno de estos se caracteriza por una constante de disociación. La capacidad máxima de unión de la albúmina para un medicamento dado es igual a la concentración molar de la albúmina multiplicada por el número de sitios de unión para el medicamento<sup>11</sup>).

En muchos casos de interés biológico, una de las dos especies que interaccionan es una macromolécula compleja y la otra es una molécula relativamente pequeña. Usualmente la macromolécula tiene más de un sitio donde puede unirse a la pequeña molécula. En consecuencia se pueden formar muchos complejos moleculares diferentes, dependiendo de cual sitio de la macromolécula resulta ocupado por la molécula pequeña. Por ejemplo una molécula de hemoglobina ofrece 4 sitios para la unión de oxígeno. Un ADN de alto peso molecular tiene numerosos sitios para la

unión con actinomicina. Se podría escribir una constante de equilibrio para cada una de las posibles especies, pero el número es a menudo muy grande y tales casos se pueden tratar más fácilmente usando métodos estadísticos!<sup>10</sup>).

Si la proteína tiene m clases de sitios independientes y equivalentes, el modelo general de unión será:

$$r = \frac{\sum_{i=1}^m N_i \cdot k_i \cdot [M]_{LIBRE}}{1 + \sum_{i=1}^m k_i \cdot [M]_{LIBRE}} \quad (10)$$

El número total de sitios de unión, (N), se obtiene por:

$$N = \sum_{i=1}^m N_i \quad (11)$$

Cuando todos los sitios potenciales tiene afinidad equivalente y no interaccionan, la relación entre las cantidades anteriormente mencionadas pueden representarse por la ecuación:

$$\frac{N \cdot K \cdot [M]_{LIBRE}}{1 + K \cdot [M]_{LIBRE}} \quad (12)$$

## 1.4 ESTRUCTURA DE LA ALBUMINA.

### 1.4.1 ESTRUCTURA PRIMARIA.

La molécula de albúmina contiene 585 residuos de aminoácidos en una cadena lineal sin rupturas con un solo residuo de cisterna en la posición 34 y un solo residuo de triptófano en la posición 214. Hasta la fecha se conocen al menos 20 variantes electroforéticas. Se han identificado treinta, por cambios en la estructura primaria!<sup>13</sup>).

### 1.4.2 ESTRUCTURA SECUNDARIA Y TERCIARIA.

La cadena peptídica está formada aparentemente por 9 lazos peptídicos y presenta 17 uniones disulfuro. El contenido de  $\alpha$ -hélice es grande, entre 45% y 75%. El contenido de hoja- $\beta$  es baja, probablemente un 18%. Datos experimentales indican que la cadena peptídica simple se organiza en una estructura de dominio. Las dimensiones de la molécula de albúmina son 140 Å X 40 Å, formando una elipse!<sup>13</sup>).

El modelo de dominio se construye en base al arreglo regular de residuos de cisterna, el alto contenido de hélice y a la localización de residuos de prolina. Los lazos peptídicos se organizan en 6 semidominios (subdominios), cada uno organizado en un a-hélice antiparalelo formando una superficie externa hidrofílica y una superficie interna hidrofóbica!<sup>13</sup>).

La molécula de albúmina es globular, su estructura terciaria se estabiliza por uniones internas de puentes de hidrógeno y disulfuro. AlpH fisiológico su superficie contiene un gran número de grupos cargados, que explican su solubilidad en agua a pesar de su elevada proporción (cerca del 56%) de grupos hidrofóbicos. Por ejemplo: hay 83 aniones carboxilato de los ácidos aspártico y glutámico, 83 átomos de nitrógeno protonados de la lisina y arginina y 16 átomos de nitrógeno parcialmente protonados de histidina. Además, hay 49 grupos OH de serina y treonina y 18 de tirosina, así como 4 sulfhidrilos de cisterna. Hay grandes regiones hidrofóbicas que se pueden considerar como "parches oleosos" compuestos de cadenas laterales alifáticas y aromáticas de la alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, metionina, fenilalanina y tirosina. Es fácil imaginar como pueden estar presentes en esta superficie sitios de unión con diferentes grados de especificidad complementarios a las diferentes partes de una molécula de fármaco, debido a las distancias de grupos iónicos, formadores de puentes de hidrógeno e hidrofóbicos!<sup>13</sup>).

## **1.5 PEROXISOMICINA A1 (T514) EXTRAIDA DE PLANTAS DEL GENERO KARWINSKIA**

En el Departamento de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, la principal línea de investigación se centra en el estudio de la actividad biológica de la toxina T514y sustancias afines extraídas de plantas del género *Kcirwinskia*.

El género *Karwinskia* es un taxón constituido básicamente de arbustos y árboles pequeños, los cuales crecen tanto en áreas desérticas como tropicales. Incluye cerca de 15 especies encontradas desde Texas hasta Colombia! <sup>14</sup>

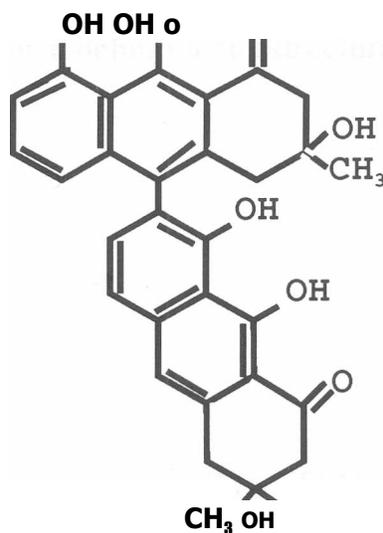
En la literatura existen datos sobre el efecto tóxico de la *K. humboltiana*. Desde el siglo XVIII se conocía que el agente tóxico se encontraba en la semilla y se supuso que era de naturaleza química hidrosoluble!<sup>15</sup>). Escobar y Nieto observaron y describieron una polineuropatía ascendente, simétrica y progresiva en el humano!<sup>16</sup>). Dreyer y cois, en 1975 aislaron del fruto de esta planta cuatro toxinas a las que denominaron en base a su peso molecular como T544, T496, T516 y T514.

Bermudez y cois/<sup>18'</sup> <sup>191</sup> realizaron estudios de toxicidad *in vivo* en distintas especies animales tanto con el fruto molido de *K. humboldtianci* como con las toxinas puras y encontraron que la sustancia responsable de la neurotoxicidad era la T544 y que la T514 presentó una selectividad para hígado y pulmón sin presentar daño neurológico a las dosis ensayadas. Tal selectividad, junto con una curva de distribución de la letalidad de forma particularmente empinada (que habla de una variación biológica estrecha), hizo pensar a Piñeyro López que la T514 tuviera toxicidad selectiva entre células de origen benigno y células neoplásicas malignas. Posteriormente, estudios *in vitro* realizados por Piñeyro López y cois, con la T514 en líneas celulares continuas de origen benigno y neoplásico de hígado, pulmón y colon demostraron que la T514 posee toxicidad selectiva hacia las células neoplásicas, lo cual los llevó a postular su uso potencial como agente antineoplásico<sup>1201</sup>.

Dentro de los intentos hechos para elucidar el mecanismo de acción de la T514 se puede mencionar el efecto sobre la lipidoperoxidación microsomal hepática<sup>1211</sup>. Aunque aún no se conoce su mecanismo de acción, ciertas observaciones experimentales permiten señalar que no actúa sobre el núcleo celular como la mayoría de los antineoplásicos de referencia. Se demostró que esta sustancia produce, a dosis subletales, daño selectivo e irreversible *in vivo* a peroxisomas de levaduras<sup>1221</sup>; por esta razón se le ha llamado Peroxisomicina, y para diferenciarla de otras toxinas que tienen la misma fórmula molecular se le ha denominado Peroxisomicina A1.

Dentro de esta mismalínea de trabajo se investigó el efecto *in vitro* de la T514 y otros compuestos afines sobre la enzima catalasa, la cual es exclusivamente de origen peroxisomal. Así, se comprobó que la actividad de dicha enzima es inhibida de forma no competitiva por efecto de la T514 y otros compuestos antracénicos; encontrándose una relación estrecha entre estructura y grado de inhibición<sup>1231</sup>. Es decir, entre más parecidos son estructuralmente a la T514, mayor porcentaje de inhibición presentan.

La Peroxisomicina A1 es una antracena dimérica, cuyos monómeros están formados por dos anillos fenólicos y una cetona cíclica de 6 miembros la cual se encuentra sustituida en la posición 3 y 3' por un hidroxilo y un radical metilo (figura 3). El nombre IUPAC de esta sustancia es: 3,3'- dimetil- 3,3', 8,8', 9,9' - hexahidroxi - 3, 3', 4,4' - tetrahydro (7, 10' - biantracen) -1,1' (2H, 2'H) diona<sup>1171</sup>.



**Figura 3. Estructura química de la Peroxisomicina Al (T514).**

Dicha molécula es un ácido débil de pKa igual a  $7.27 \pm 0.09$ ; otro dato importante es la escasa solubilidad en agua de la toxina<sup>24</sup>).

En la literatura se han encontrado compuestos estructuralmente similares a la peroxisomicina Al que interaccionan fuertemente con la albúmina (hidroxiquinonas)<sup>25</sup>).

En base a lo anteriormente citado, y tomando en cuenta el uso potencial de la peroxisomicina Al (T514) como agente antineoplásico nos propusimos estudiar *in vitro* la interacción de la peroxisomicina Al (T514) con la albúmina sérica bovina y con la albúmina sérica humana. Es así como hemos planteado la siguiente hipótesis de trabajo.

## **HIPOTESIS**

La peroxisomicina A1 (T514) interacciona fuertemente con la albúmina sérica bovina y con la albúmina sérica humana, debido a su estructura química y a sus propiedades fisicoquímicas.

## **OBJETIVO GENERAL**

Determinar *in vitro* si la Peroxisomicina A1 (T514) interacciona con la Albúmina Sérica Bovina (ASB) y con la Albúmina Sérica Humana (ASH) y de ser así caracterizar dicha interacción.

## **OBJETIVOS ESPECIFICOS**

1. Realizar determinaciones puntuales para determinar si hay interacciones entre la Peroxisomicina A1 (T514) y la Albúmina Sérica Bovina (ASB).
2. Precisar el equilibrio de la unión ASB-T514 a pH de 7.2 y 7.4:
  - a. Determinar el número de sitios de unión existentes en la molécula de ASB para la T514.
  - b. Definir las constantes de unión para el complejo ASB- T514.
3. Establecer los valores termodinámicos del sistema ASB-T514.
4. Caracterizar el tipo de unión de la Peroxisomicina A1 con la Albúmina Sérica Humana.

## **CAPITULO 2**

### **MATERIAL Y METODOS**

#### **2.1 EQUIPO**

Las mediciones de absorbancia se realizaron con un espectrofotómetro UV-VIS Beckman modelo DU-7500 con arreglo de diodos y con un controlador de temperatura Peltier (con variación de temperatura de  $\pm 0.1$  °C). Se utilizaron cubetas de cuarzo y de vidrio de trayecto óptico de 1 cm para contener las soluciones a analizar.

Las soluciones de trabajo se mantuvieron a la temperatura deseada utilizando un baño de agua con termostato marca Craft: instrumentos científicos, modelo HP1000

Las mediciones de pH se realizaron con un potenciómetro Beckman modelo 3500 (061 pHmeter) y un electrodo combinado de vidrio Ag/AgCl (Beckman). El electrodo fue calibrado a la temperatura de la muestra usando amortiguadores estándares de pH conocido (Beckman).

Se utilizó un liofilizador Mr Tis 12 modelo 6211-0120 para eliminar el agua presente en las soluciones de albúmina.

Las sustancias fueron pesadas en una balanza analítica marca Sartorius modelo Ball05.

El punto de fusión se tomó utilizando un Electrothermal IA9100.

#### **2.2 PREPARACION DE SOLUCIONES**

##### **2.2.1 SOLUCION AMORTIGUADORA DE FOSFATOS.**

Se utilizó la sal fosfato monoácido de sodio para preparar soluciones amortiguadoras de pH 7.2 y 7.4. Se utilizó hidróxido de sodio 0.1 N y ácido clorhídrico 0.1 N para ajustar las soluciones amortiguadoras a los pHs señalados. Las soluciones amortiguadoras se filtraron utilizando membranas de diámetro de poro de 0.45 micras. Se utilizó agua bidestilada para la preparación de las soluciones amortiguadoras.

### 2.2.2 SOLUCION PATRON DE ALBUMINA.

La Albúmina Sérica Bovina (ASB) se obtuvo de la Compañía Sigma Chemical como cristales. La Albúmina Sérica Humana (ASH) se adquirió como solución al 25% del laboratorio Fustery (Lote N9 M65205); esta solución se encontraba libre de preservativos. A la solución de ASH se le practicó diálisis contra agua bidestilada con el fin de eliminar sales presentes. La solución libre de iones se liofilizó para eliminar el agua. Los cristales de albúmina se mantuvieron en pistolas de desecación por espacio de 48 horas para eliminar restos de agua, si existiera. La albúmina se almacenó a 5 °C en un medio libre de humedad. Se prepararon soluciones de ambas albúminas en concentraciones de 1.55 y de 0.31 mmoles por litro utilizando el amortiguador de fosfatos 0.018 Molar como solvente. La fuerza iónica de esta solución fue de 0.054 Molar. La concentración de la Albúmina Sérica Bovina fue determinada espectrofotométricamente asumiendo un  $\epsilon_{cm}^{1\%}$  de 6.67 a 280 nm un peso molecular de 66,000<sup>(26)</sup>. La concentración de la Albúmina Sérica Humana fue determinada espectrofotométricamente asumiendo un  $\epsilon_{cm}^{1\%}$  de 5.8 a 280 nm un peso molecular de 66,500<sup>(27)</sup>.

### 2.2.3 SOLUCION DE TRABAJO DE ALBUMINA SERICA BOVINA Y DE ALBUMINA SERICA HUMANA.

A partir de la solución patrón de concentración 1.55 mMoles/L se prepararon soluciones estándares en volúmenes de 500 pL (Tabla 1).

**TABLA1**  
**SOLUCIONES ESTANDARES DE ALBUMINA SERICA**  
**BOVINA Y HUMANA**

Concentración fM /L	Solución patrón pL	Concentración pM/L	Solución patrón pL
17.5	175	35.0	350
20.0	200	37.5	375
22.5	250	40.0	400
25.0	250	42.5	425
27.5	275	45.0	450
30.0	300	47.5	475
32.5	325	50.0	500

#### 2.2.4 SOLUCION PATRON DE PEROXISOMICINA AI.

La Peroxisomicina AI se obtuvo del laboratorio de extracción del Departamento de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, y se mantuvo en refrigeración a 5 °C en la oscuridad en un desecador. Debido a que la solubilidad de la T514 en solución acuosa es muy pobre<sup>(24)</sup> la toxina se solvató en etanol grado espectrofotométrico, utilizando un agitador Pulse Vortexer Glas-Col para mejorar la solvatación. Se prepararon soluciones de 2.626 mM y 21.01 pM.

#### 2.2.5 SOLUCION DE TRABAJO DE TOXINA 514.

A partir de la solución de 2.626 mM/L se prepararon soluciones en matraces volumétricos de 25 mL (Tabla 2). La disolución se aforó con la solución amortiguadora.

**TABLA2**  
**SOLUCIONES ESTANDARES DE T514**

Concentración	Solución patrón	Concentración	Solución patrón
pM/L	pL	pM/L	pL
17.5	175	35.0	350
20.0	200	37.5	375
22.5	225	40.0	400
25.0	250	42.5	425
27.5	275	45.0	450
30.0	300	47.5	475
32.5	325		

La concentración final de etanol en las soluciones analizadas fue menor de un 1.9% en todos los casos.

#### 2.2.4 SOLUCION PATRON DE PEROXISOMICINA AI.

La Peroxisomicina AI se obtuvo del laboratorio de extracción del Departamento de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, y se mantuvo en refrigeración a 5 °C en la oscuridad en un desecador. Debido a que la solubilidad de la T514 en solución acuosa es muy pobre<sup>24</sup>), la toxina se solvató en etanol grado espectrofotométrico, utilizando un agitador Pulse Vortexer Glas-Col para mejorar la solvatación. Se prepararon soluciones de 2.626 mM y 21.01 pM.

#### 2.2.5 SOLUCION DE TRABAJO DE TOXINA 514.

A partir de la solución de 2.626 mM/L se prepararon soluciones en matraces volumétricos de 25 mL (Tabla 2). La disolución se aforó con la solución amortiguadora.

**TABLA 2**  
**SOLUCIONES ESTANDARES DE T514**

Concentración	Solución patrón	Concentración	Solución patrón
pM/L	pL	pM/L	pL
17.5	175	35.0	350
20.0	200	37.5	375
22.5	225	40.0	400
25.0	250	42.5	425
27.5	275	45.0	450
30.0	300	47.5	475
32.5	325		

La concentración final de etanol en las soluciones analizadas fue menor de un 1.9% en todos los casos.

#### 2.2.4 SOLUCION PATRON DE PEROXISOMICINA AI.

La Peroxisomicina AI se obtuvo del laboratorio de extracción del Departamento de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, y se mantuvo en refrigeración a 5 °C en la oscuridad en un desecador. Debido a que la solubilidad de la T514 en solución acuosa es muy pobre<sup>24</sup>), la toxina se solvató en etanol grado espectrofotométrico, utilizando un agitador Pulse Vortexer Glas-Col para mejorar la solvatación. Se prepararon soluciones de 2.626 mM y 21.01 pM.

#### 2.2.5 SOLUCION DE TRABAJO DE TOXINA 514.

A partir de la solución de 2.626 mM/L se prepararon soluciones en matraces volumétricos de 25 mL (Tabla 2). La disolución se aforó con la solución amortiguadora.

**TABLA2**  
**SOLUCIONES ESTANDARES DE T514**

Concentración	Solución patrón	Concentración	Solución patrón
pM/L	pL	pM/L	pL
17.5	175	35.0	350
20.0	200	37.5	375
22.5	225	40.0	400
25.0	250	42.5	425
27.5	275	45.0	450
30.0	300	47.5	475
32.5	325		

La concentración final de etanol en las soluciones analizadas fue menor de un 1.9% en todos los casos.



Los datos de absorbancia a 430 nm se relacionaron con los datos de absorbancia a 415 nm mediante la fórmula:

Pureza espectroscópica = Absorbancia a 430 nm / Absorbancia a 415 nm.

### **2.3.1.3 Pureza cromatográfica**

La pureza cromatográfica se verificó mediante cromatografía en capa fina.

Para verificar la pureza por medio de cromatografía en capa fina se disolvió una pequeña alícuota de T514 en cloroformo.

El sistema de eluentes se preparó utilizando benceno y acetona en una proporción 3:1 adicionándole una gota de ácido acético concentrado. El eluyente se vertió en una cuba de vidrio y se permitió que ésta se saturara con los solventes.

La solución de T514 se sembró en una placa cromatográfica utilizando un capilar de 5 µL de capacidad. Además, se sembró un estándar de T514.

## **2.4 ESTUDIO *IN VITRO* DE LAS INTERACCIONES DE LA PEROXISOMICINA A1 CON LA ALBUMINA SERICA BOVINA Y CON LA ALBUMINA SERICA HUMANA A pH DE 7.2.**

Se utilizó la misma metodología tanto para el estudio de las interacciones de la T514 con la albúmina sérica bovina como para la albúmina sérica humana.

### **2.4.1 INTERACCIONES ENTRE LA T514 Y LA ALBUMINA.**

Para establecer si existen interacciones entre la toxina T514 con la albúmina se trabajó con la siguiente estrategia experimental:

Se vertió una alícuota de la solución amortiguadora en una celda de cuarzo y se obtuvo el espectro de absorbancia en el intervalo de 200 nm hasta 800 nm, usando agua bidestilada como blanco.

En una celda de cuarzo se vertieron 3 mL de una solución 21.01 µM de T514 y se le agregaron 100 µL de solución amortiguadora para obtener así una concentración final de 20 pM, se agitó por inversión para posteriormente tomarle el espectro Ultravioleta Visible, comprendido entre los 200 nm y los 800 nm.

Subsecuentemente, a 3 mL de solución amortiguadora se le adicionó una alícuota de 100 pL de la solución de albúmina de concentración 0.31 mM, se agitó, y de esta formase obtuvo una solución de concentración final de albúmina de 10 pMoles por litro. A esta solución se le tomaron los valores de absorbancia en el intervalo de longitud de onda comprendido entre 200 nm y los 800 nm, usando como blanco la solución amortiguadora de fosfatos.

Se adicionaron 100 pL de la solución de albúmina de concentración 0.31 mM a 3 mL de una solución de T514 de concentración 21.01 pM. El contenido fue mezclado por inversión, y posteriormente se tomaron las lecturas de absorbancia en el intervalo comprendido de los 200 nm a los 800 nm.

#### **2.4.2 ESTUDIO DEL EQUILIBRIO DE LA UNIÓN DE LA T514 CON LA ALBUMINA.**

Para precisar el equilibrio de la unión de la T514 con la albúmina se requería conocer los valores de  $r$  (número promedio de sitios ocupados) y de la concentración de T514 libre necesarios para obtener una gráfica de Scatchard y para ello se recurrió a la siguiente estrategia experimental.

##### **2.4.2.1 Determinación del tiempo adecuado para tomar la segunda lectura de absorbancia: sistema ASB-T514, 25 °C y pH 7.2.**

Se vertieron 3 mL de una solución de T514 (21.01 pM) de pH 7.2 a una cubeta de vidrio, se tomó la lectura de absorbancia a 422 nm (AbsQ). La temperatura de las soluciones se mantuvo a 25 °C.

Se le adicionaron 100 pL de albúmina (0.31 mM), se agitó la solución (concentración final de albúmina 10 pM) y se tomó la lectura de absorbancia cada 5 segundos después de la primera lectura hasta 60 segundos.

Posteriormente se calculó el AAbs.

Este procedimiento se realizó por triplicado,

##### **2.4.2.2 Titulación de la Albúmina con T514, a 25 °C y a pH de 7.2.**

Se vertieron 3 mL de una solución de T514 de pH 7.2 (la concentración final varió de 17.5 a 46 pM) a una cubeta de vidrio, se tomó la lectura de absorbancia a una longitud de onda de 422 nm (Abs<sup>^</sup>) (Figura 4). La temperatura de las soluciones se mantuvo a 25 °C.

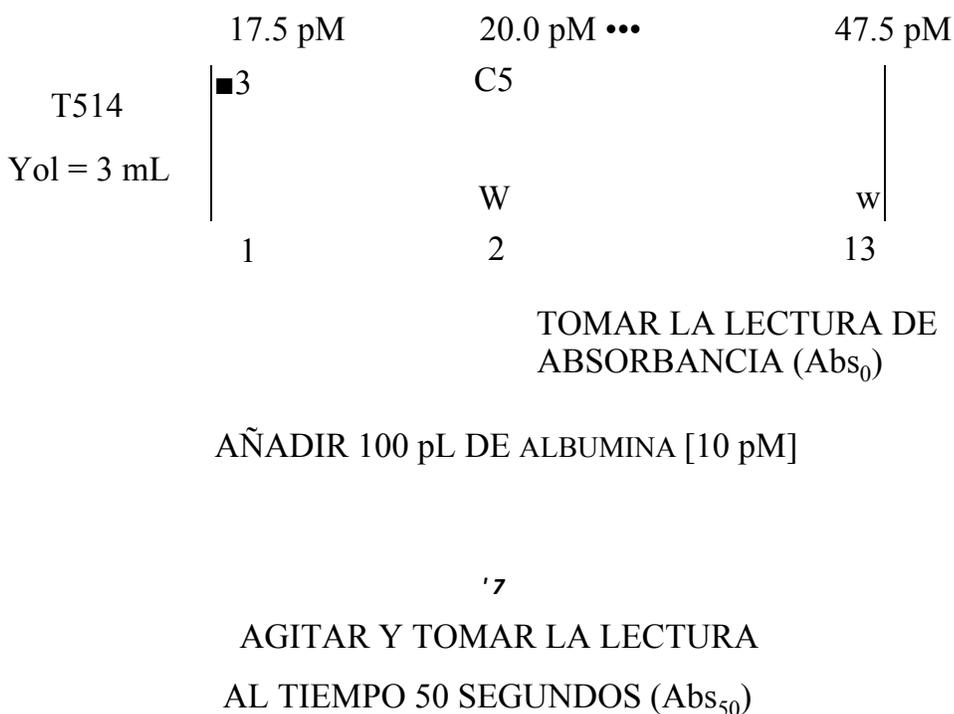
Se le adicionaron 100 pL de albúmina de concentración 0.31 mMolar (concentración final 10 pM), se agitó la solución y se tomó la lectura de absorbancia a los 50 segundos después de la primera lectura, Figura 4.

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

$$AAbs = (Abs^Q) - (AbsQ).$$

Cada punto de la curva se realizó tres veces.

Se graficaron los valores de AAbs en función de las concentraciones.



**Figura 4. Titulación de la ASB con la T514.**

#### 2.4.2.3 Determinación de AAbsmax a 25 °C y a pH de 7.2.

Con la finalidad de determinar el AAbsmax a 25 °C se utilizó el procedimiento de titular soluciones de T514 de pH 7.2 con alícuotas de albúmina de concentración creciente.

Se vertieron 3 ml de una solución 21.01  $\mu$ Molar de T514 (concentración final 20  $\mu$ Molar, pH 7.2) en una cubeta de vidrio. Se utilizó el amortiguador de fosfatos como blanco espectral. Se tomó el valor de absorbancia de la T514 (AbsQ) a 422 nm.

Se adicionó una alícuota de 100  $\mu$ l de una solución 1.55 mmolar de albúmina a la cubeta (la concentración final de la albúmina varió de 20 a 60  $\mu$ Molar).

Después de la adición, se agitó por inversión y se tomó la lectura de absorbancia a los 50 segundos después de la primera lectura (AOS<sup>Q</sup>), Figura 5.

Subsecuentemente se calcularon los cambios de absorbancia utilizando los valores de absorbancia al tiempo 0 y al tiempo 50.

Se construyeron gráficas relacionando los valores inversos de los cambios de absorbancia en función de los valores inversos de las concentraciones.

Conociendo el AAbsmax se calculó el valor de absorbancia producido por la unión de 1  $\mu$ M de T514 (a):

$$a = \text{AAbsmax} / [\text{T514}]_{\text{XOTAL}}$$

Se vertieron 3 ml de una solución 21.01  $\mu$ Molar de T514 (concentración final 20  $\mu$ Molar, pH 7.2) en una cubeta de vidrio. Se utilizó el amortiguador de fosfatos como blanco espectral. Se tomó el valor de absorbancia de la T514 (AbsQ) a 422 nm.

Se adicionó una alícuota de 100  $\mu$ l de una solución 1.55 mmolarde albúmina a la cubeta (la concentración final de la albúmina varió de 20 a 60  $\mu$ Molar).

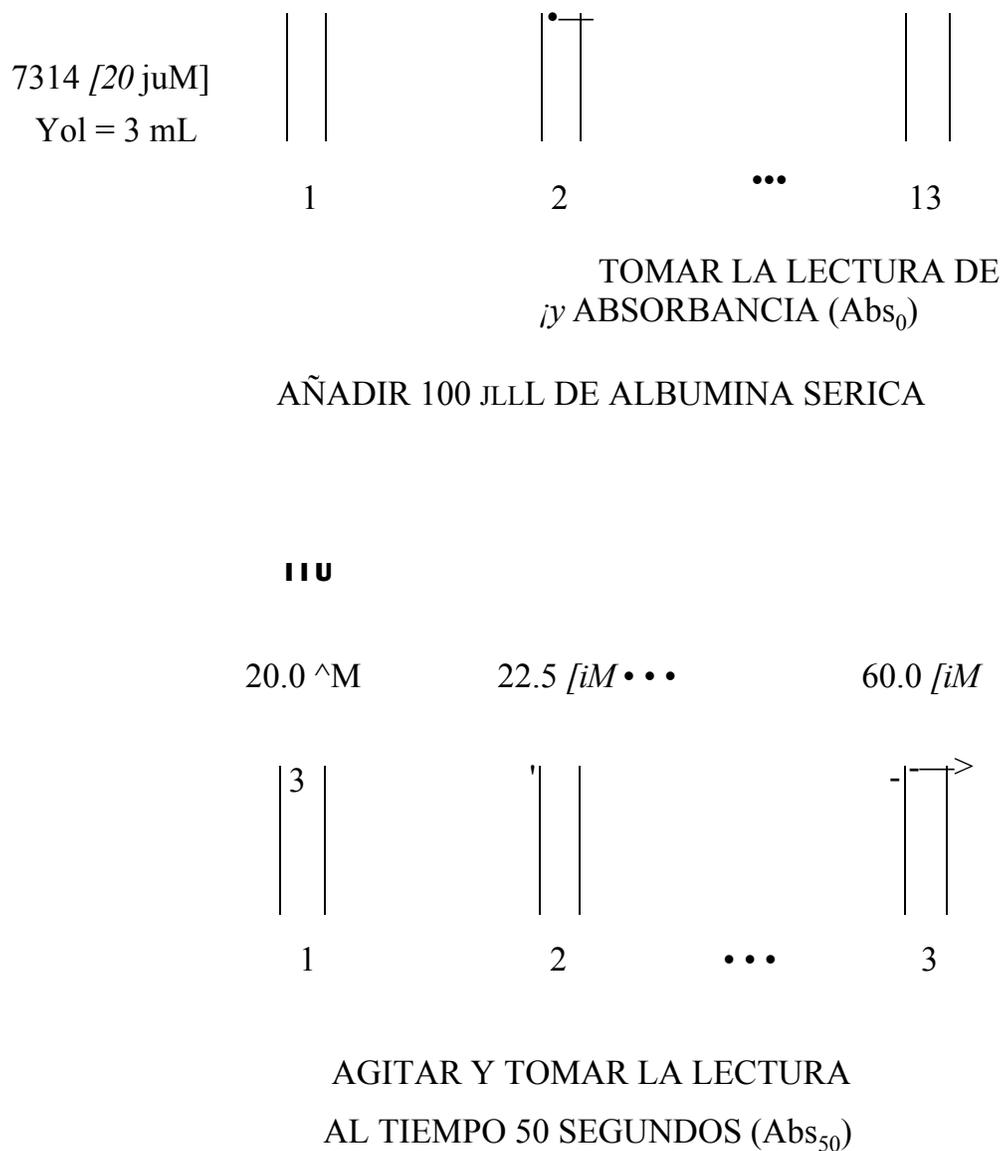
Después de la adición, se agitó por inversión y se tomó la lectura de absorbancia a los 50 segundos después de la primera lectura (AOS<sup>Q</sup>), Figura 5.

Subsecuentemente se calcularon los cambios de absorbancia utilizando los valores de absorbancia al tiempo 0 y al tiempo 50.

Se construyeron gráficas relacionando los valores inversos de los cambios de absorbancia en función de los valores inversos de las concentraciones.

Conociendo el AAbsmax se calculó el valor de absorbancia producido por la unión de 1  $\mu$ M de T514 (a):

$$a = \text{AAbsmax} / [\text{T514}]_{\text{TOTAL}}$$



**Figura 5. Determinación del cambio de absorbancia máximo (AAbsMAX).**

#### 2.4.2.4 Determinación de la concentración de T514 unida y de T514 libre.

La concentraciones de T514 unida y de T514 libre en cada uno de los puntos de la curva de titulación se calcularon utilizando las siguientes ecuaciones

$$[T514]_u = AAbs / a$$

$$[T514]_j = [T514]_t - [T514]_u$$

#### 2.4.2.5 Determinación del número promedio de moléculas de T514 unidas a la albúmina ( $r$ ).

Después de obtener la concentración de T514 ligada a la albúmina en cada punto de la curva de titulación, se obtuvo el valor promedio del número de moléculas de T514 unidas a la albúmina ( $r$ ), mediante la ecuación<sup>1</sup>;

$$\frac{[T514]_{UNIDA}}{[Albúmina]_{TOTAL}}$$

Con los datos de  $r$  y de  $r / [T514]_{LIBRE}$  y utilizando la ecuación de Scatchard se graficaron los valores de  $r / [T514]_{LIBRE}$  en función de  $r$ .

#### 2.4.3 DETERMINACION DE LOS PARAMETROS TERMODINAMICOS DEL SISTEMA T514-ALBUMINA.

Para determinar los parámetros termodinámicos, la titulación se realizó a tres temperaturas adicionales, que fueron 15, 20 y 30 °C. Cada temperatura se trabajó por triplicado.

##### 2.4.3.1 Obtención del cambio de entalpia ( $\Delta H$ )

El cambio en la entalpia ( $\Delta H$ ) se obtuvo utilizando una gráfica de Van't Hoff, en la cual se grafican los valores de logaritmo natural de las constantes de afinidad ( $\ln K_a$ ) en función de los valores inversos de la temperatura absoluta ( $1 / T$ ) de acuerdo a la ecuación<sup>8, 29</sup>.

$$\ln K_a = -\frac{\Delta H}{RT} + \text{constante}$$

##### 2.4.3.2 Obtención del cambio de energía libre de Gibbs ( $\Delta G$ )

El cambio en la Energía Libre de Gibbs ( $\Delta G$ ) se calculó a 25 °C usando la ecuación:

$$\Delta G = -RT \ln K_a$$

en donde,  $R$  es la constante de los gases ideales,  $T$  es la temperatura en grados absolutos y  $K_a$  es la constante de unión.

#### **2.4.3.3 Obtención del cambio de entropía (AS)**

El cambio en la entropía (AS) se calculó a 25 °C usando la ecuación:

$$AG = AH - T AS$$

#### **2.5 ESTUDIO *IN VITRO* DE LAS INTERACCIONES DE LA PEROXISOMICINA A1 CON LA ALBUMINA SERICA BOVINA Y CON LA ALBUMINA SERICA HUMANA A pH DE 7.4.**

Se siguió la misma estrategia experimental que se mencionó para el punto 2.3 pero el pH al que se trabajó fue de 7.4.

#### **2.6 TRATAMIENTO ESTADISTICO.**

Se utilizó el paquete estadístico computacional Mstat de Macintosh para analizarlos datos experimentales. Por otra parte, para demostrar si las diferencias entre los parámetros de unión a las distintas temperaturas fueron estadísticamente significativas se utilizó la t de Student.

## CAPITULO 3

### RESULTADOS

#### 3.1 CONTROL DE CALIDAD DE LA T514

Para el desarrollo de esta tesis se utilizaron los lotes 50 y 57 de T514. Los parámetros de calidad que se obtuvieron se muestran en la Tabla 4.

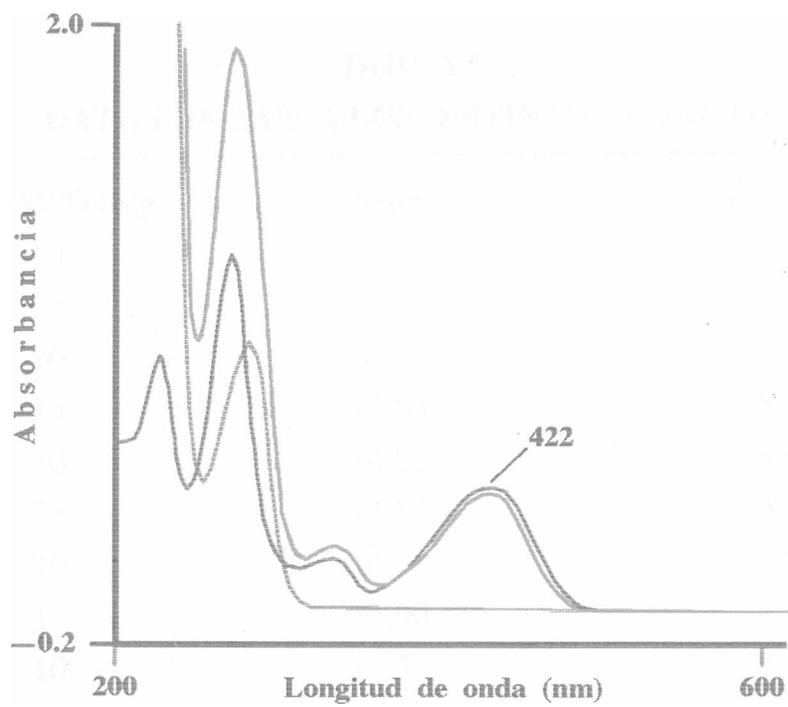
**TABLA4**  
**CONTROL DE CALIDAD DE LA T514, LOTE 57**

- Punto de fusión inicial:	183.6 ±2.2	n = 6
- Punto de fusión final:	185.0 ± 2.5	n = 6
- Pureza cromatográfica	Rf = 0.435	
- Pureza espectroscópica:		
Reí A430/A415:	0.99 ± 0.005	n = 3
- Inhibición de la enzima catalasa:	47.2 ± 1.12	n = 3
- Actividad celular: CT50 Chang:	56.0 pg/ml	
CT50 hep:	2.5 jig/ml	

#### 3.2 ESTUDIO *IN VITRO* DE LAS INTERACCIONES DE LA PEROXISOMICINA A1 CON LA ALBUMINA SERICA BOVINA Y CON LA ALBUMINA SERICA HUMANA A pH DE 7.2.

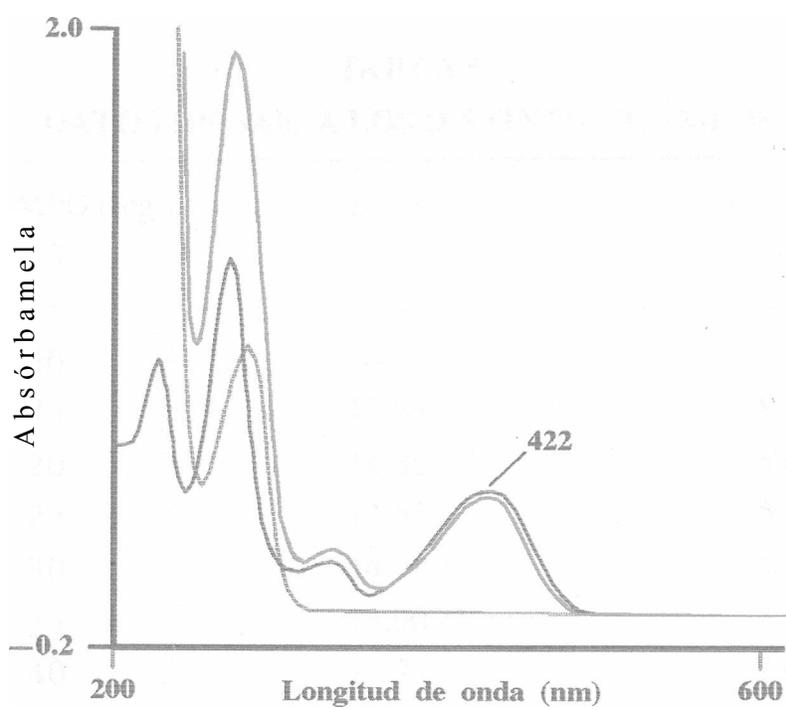
##### 3.2.1 INTERACCIONES ENTRE LA T514 Y LA ALBUMINA.

Se comparó el espectro de la T514 con el espectro de la mezcla Albúmina-T514; como primera opción se buscaron diferencias a longitud de onda mayor a los 400 nm, ya que en esta zona la albúmina no absorbe (Fig. 6). Se encontraron diferencias apreciables a 422 nm, las cuales no se debían a efectos de dilución ya que se trabajó con volúmenes controlados.



**Figura 6. Espectros de Absorbancia:**

- = T514 20 nM**
- ASB 10 pM**
- T514 (20 pM) y ASB (10 pM)**



**Figura 6. Espectros de Absorbancia:**

**== T514 20pM**  
**ASE 10 pM**  
**— T514 (20 pM) y ASE (10 pM)**

### 3.2.2 ESTUDIO DEL EQUILIBRIO DE LA UNION DE LA T514 CON LA ALBUMINA.

#### 3.2.2.1 Determinación del tiempo adecuado para tomar la segunda lectura de absorbancia: sistema ASB-T514, 25 °C y pH 7.2.

Después de añadir la alícuota de albúmina a la solución de T514 se tomaron lecturas de absorbancia cada 5 segundos después de la primera lectura hasta 60 segundos. Posteriormente se calculó el AAbs. Este procedimiento se realizó por triplicado (Tabla 5).

**TABLA5**  
**DATOS DE AAbs A LOS DISTINTOS TIEMPOS**

TIEMPO (seg.)	AAbs	C.V. %
0		
5		
10		
15	13.83	5.34
20	14.86	5.05
25	14.53	5.17
30	14.90	4.87
35	14.90	4.82
40	15.73	7.06
45	15.67	6.34
50	15.87	4.56
55	15.45	5.90
60	15.84	4.83

#### 3.2.2.2 Titulación de la albúmina con T514 a pH 7.2.

La titulación de las albúminas se realizó por triplicado a 4 temperaturas: 15,20, 25 y 30 °C. Los valores promedios se observan en las columnas 1 y 2 de las Tablas de la 17 hasta 23.

### 3.2.2 ESTUDIO DEL EQUILIBRIO DE LA UNION DE LA T514 CON LA ALBUMINA.

#### 3.2.2.1 Determinación del tiempo adecuado para tomar la segunda lectura de absorbancia: sistema ASB-T514, 25 °C y pH 7.2.

Después de añadir la alícuota de albúmina a la solución de T514 se tomaron lecturas de absorbancia cada 5 segundos después de la primera lectura hasta 60 segundos. Posteriormente se calculó el AAbs. Este procedimiento se realizó por triplicado (Tabla 5).

**TABLA5**  
**DATOS DE AAbs A LOS DISTINTOS TIEMPOS**

TIEMPO (seg.)	AAbs	C.V. %
0		
5		
10		
15	13.83	5.34
20	14.86	5.05
25	14.53	5.17
30	14.90	4.87
35	14.90	4.82
40	15.73	7.06
45	15.67	6.34
50	15.87	4.56
55	15.45	5.90
60	15.84	4.83

#### 3.2.2.2 Titulación de la albúmina con T514 a pH 7.2.

La titulación de las albúminas se realizó por triplicado a 4 temperaturas: 15,20, 25 y 30 °C. Los valores promedios se observan en las columnas 1 y 2 de las Tablas de la 17 hasta 23.

### 3.2.2 ESTUDIO DEL EQUILIBRIO DE LA UNION DE LA T514 CON LA ALBUMINA.

#### 3.2.2.1 Determinación del tiempo adecuado para tomar la segunda lectura de absorbancia: sistema ASB-T514, 25 °C y pH 7.2.

Después de añadir la alícuota de albúmina a la solución de T514 se tomaron lecturas de absorbancia cada 5 segundos después de la primera lectura hasta 60 segundos. Posteriormente se calculó el AAbs. Este procedimiento se realizó por triplicado (Tabla 5).

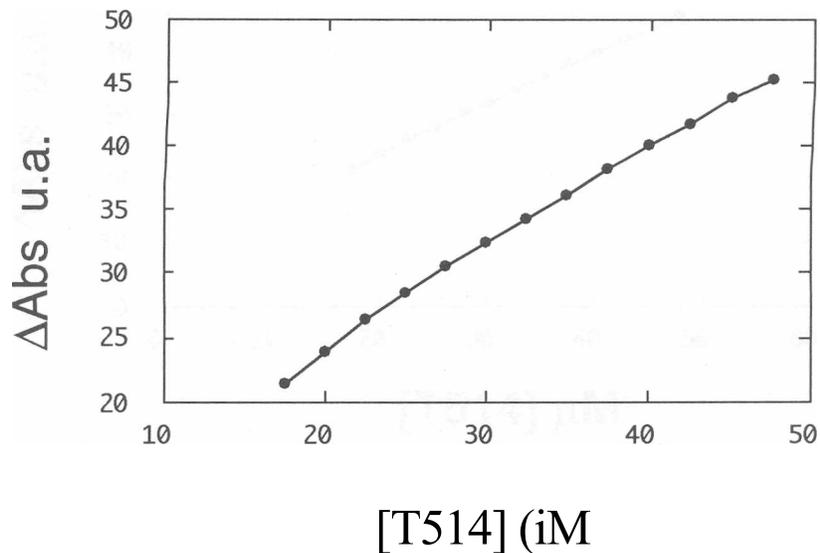
**TABLA5**  
**DATOS DE AAbs A LOS DISTINTOS TIEMPOS**

TIEMPO (seg.)	AAbs	C.V. %
0		
5		
10		
15	13.83	5.34
20	14.86	5.05
25	14.53	5.17
30	14.90	4.87
35	14.90	4.82
40	15.73	7.06
45	15.67	6.34
50	15.87	4.56
55	15.45	5.90
60	15.84	4.83

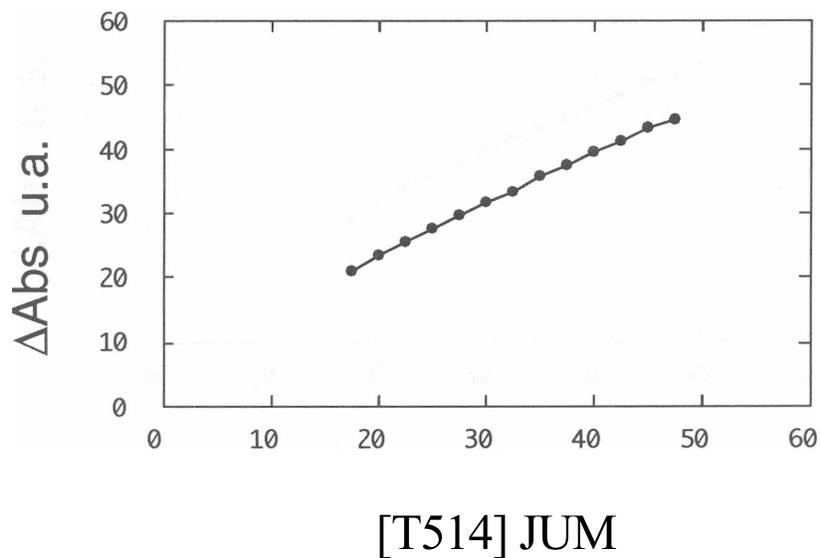
#### 3.2.2.2 Titulación de la albúmina con T514 a pH 7.2.

La titulación de las albúminas se realizó por triplicado a 4 temperaturas: 15,20. 25 y 30 °C. Los valores promedios se observan en las columnas 1 y 2 de las Tablas de la 17 hasta 23.

Con los datos de las titulaciones se graficaron los valores de AAbs en función de los valores de las concentraciones de **T514** para cada sistema: **T514-ASB** y **T514-ASH**, Figuras 7 a la 13.



**Figura 7. Curva de titulación de la ASB (10 pM) con T514: pH 7.2 y 15 °C.**



**Figura 8. Curva de titulación de la ASB (10 pM) con T514: pH 7.2 y 20 °C.**

Con los datos de las titulaciones se graficaron los valores de AAbs en función de los valores de las concentraciones de T514 para cada sistema: T514-ASB y T514-ASH, Figuras 7 a la 13.

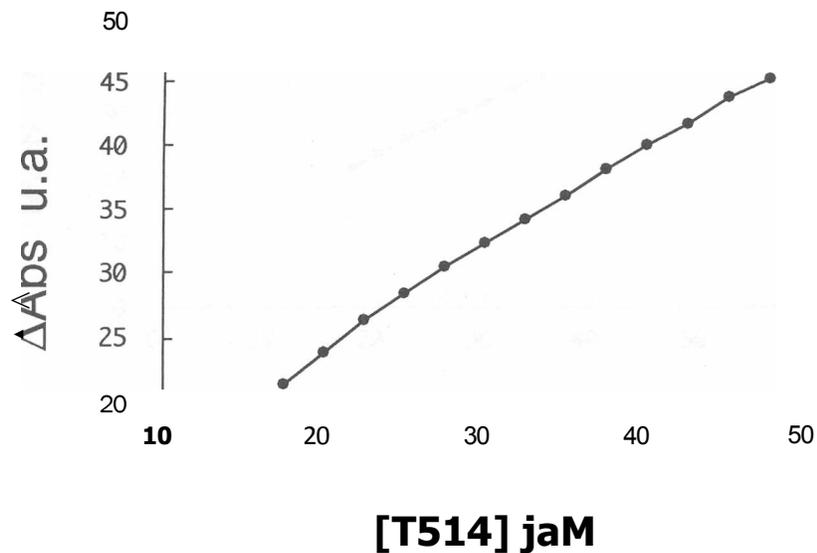


Figura 7. Curva de titulación de la ASB (10  $\mu M$ ) con T514: pH 7.2 y 15 °C.

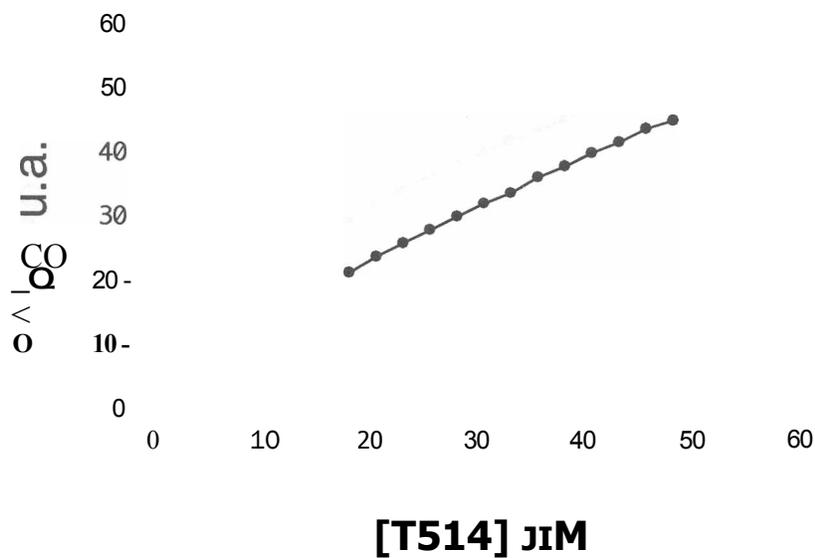


Figura 8. Curva de titulación de la ASB (10  $\mu M$ ) con T514: pH 7.2 y 20 °C.

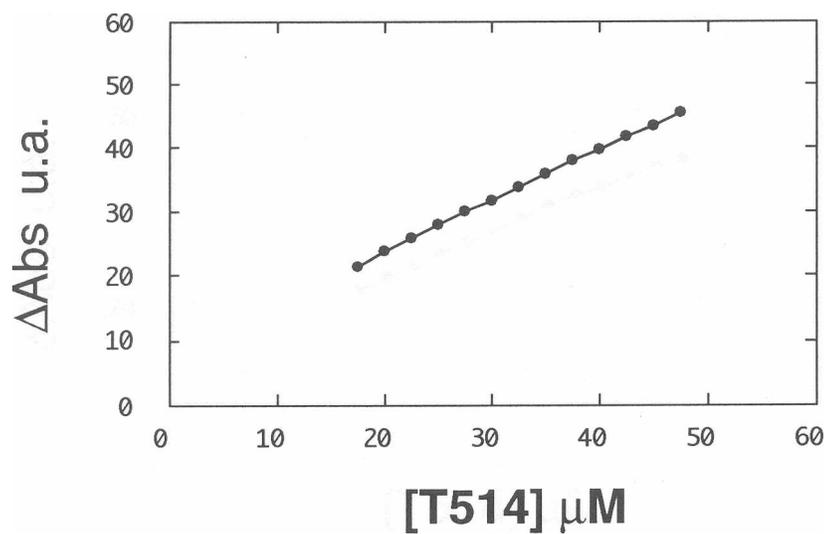


Figura 9. Curva de titulación de la ASB (10 μM) con T514: pH 7.2 y 25 °C.

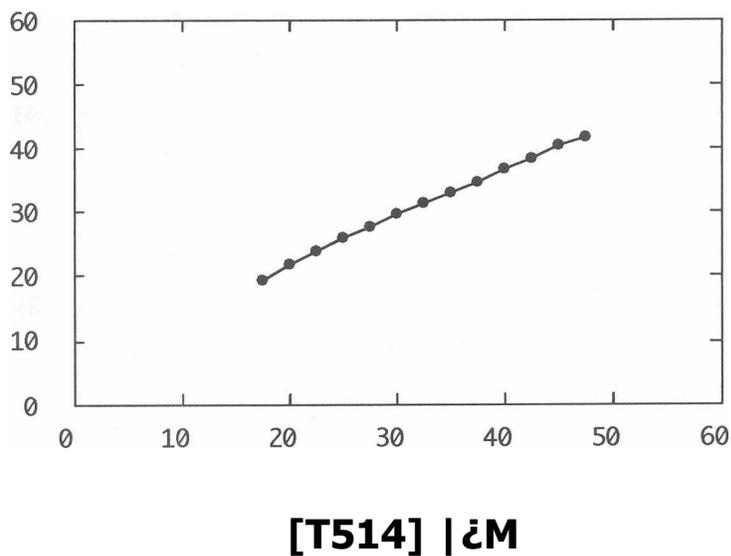
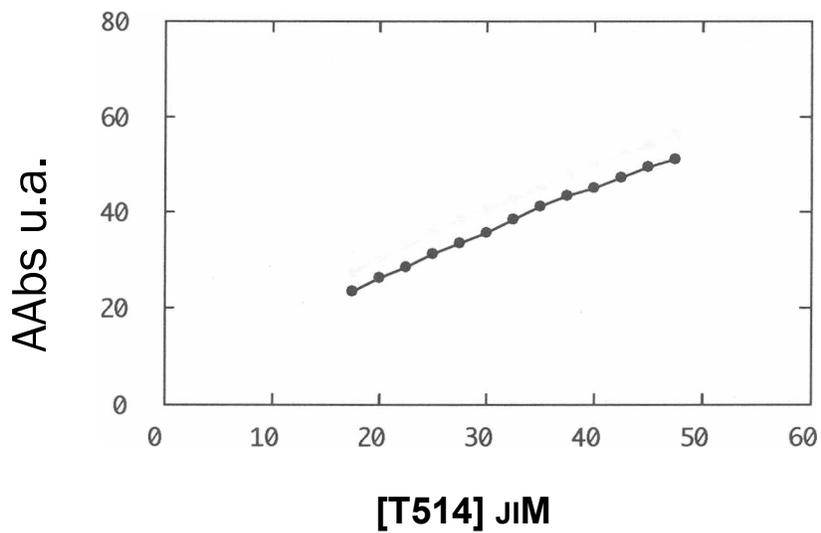
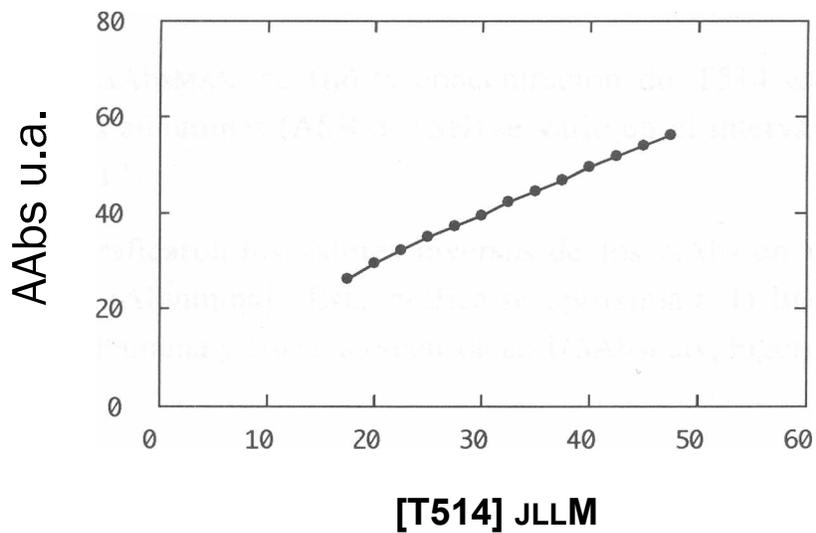


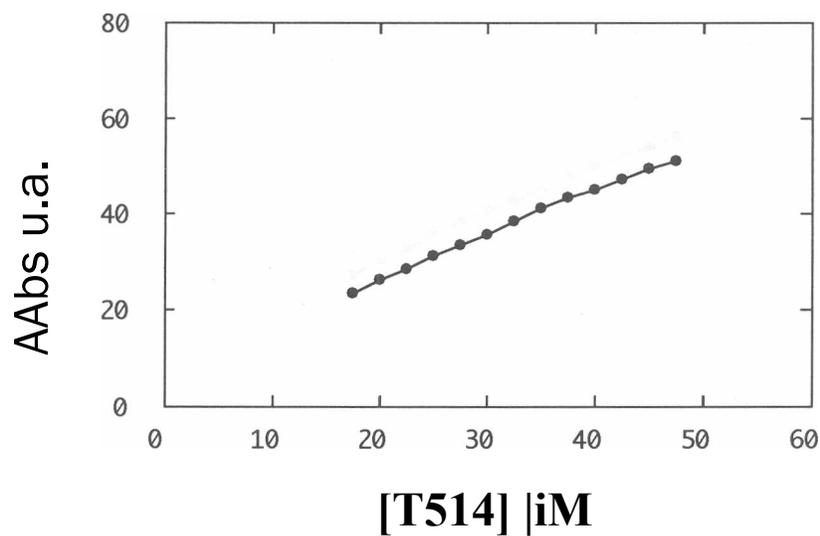
Figura 10. Curva de titulación de la ASB (10 pM) con T514: pH 7.2 y 30 °C.



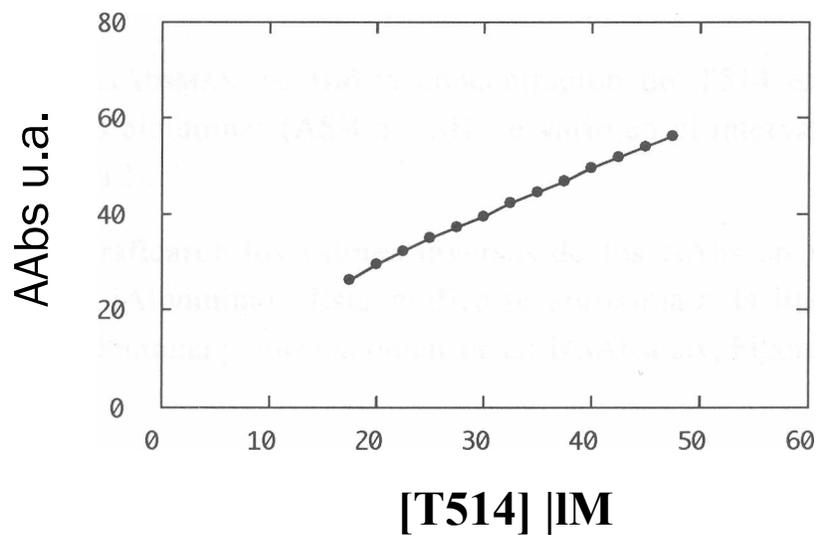
**P** írva de titulación de la ASH (10 μM) con T514: pH 7.2 y 20 °C.



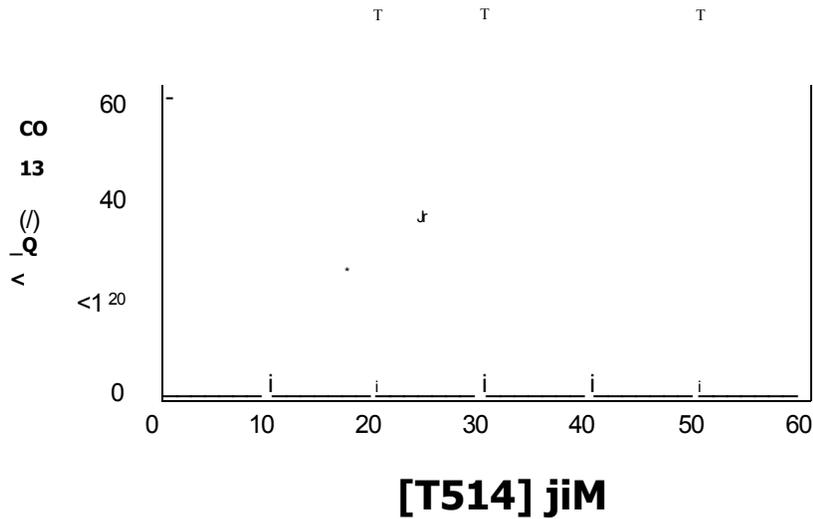
**Figura 12.** Curva de titulación de la ASH (10 μM) con T514: pH 7.2 y 25 °C.



**p** de titulación de la ASH (10 μM) con T514: pH 7.2 y 20 °C.



**Figura 12.** Curva de titulación de la ASH (10 pM) con T514: pH 7.2 y 25 °C.

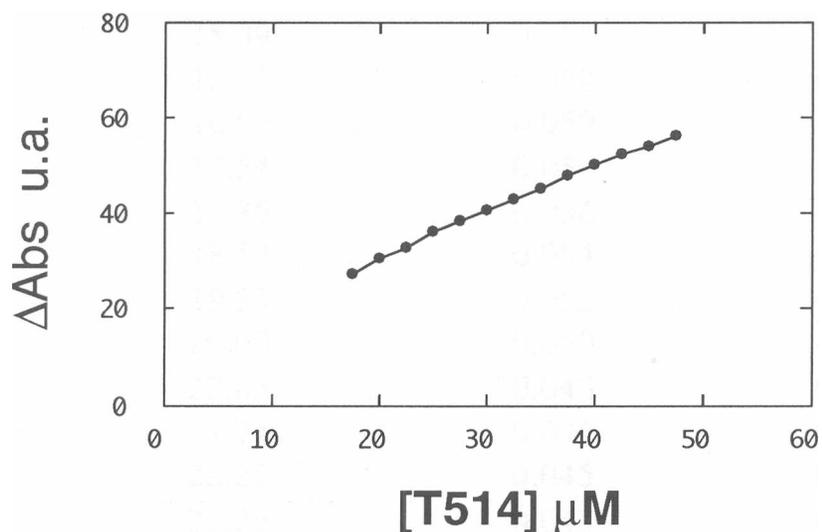


**Figura 13. Curva de titulación de la ASH (10 pM) con T514: pH 7.2 y 30 °C.**

### **3.2.2.3 Determinación del cambio de absorbancia máximo (AAbsMAX) a pH de 7.2**

Para determinar el AAbsMAX, se fijó la concentración de T514 en 20 pM y la concentración de las albúminas (ASB o ASH) se varió en el intervalo de 20 hasta 60 pM (Tablas 6 a la 12).

Posteriormente se graficaron los valores inversos de los AAbs en función de los valores inversos de [Albúmina]. Esta gráfica se aproxima a la linealidad a altas concentraciones de albúmina y cruza la ordenada en  $1/AAbs_{max}$ , Figuras 14 a la 20.

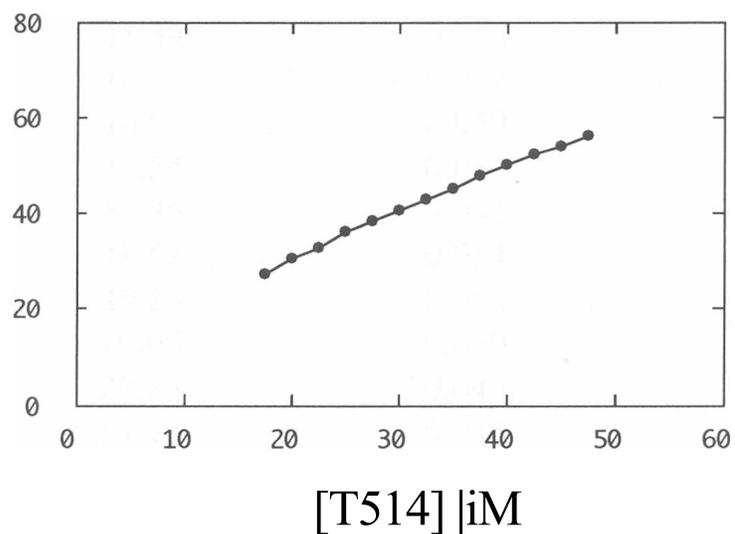


**Figura 13. Curva de titulación de la ASH (10 μM) con T514: pH 7.2 y 30 °C.**

### **3.2.2.3 Determinación del cambio de absorbancia máximo (AAbsMAX) a pH de 7.2**

Para determinar el AAbsMAX, se fijó la concentración de T514 en 20 pM y la concentración de las albúminas (ASB o ASH) se varió en el intervalo de 20 hasta 60 pM (Tablas 6 a la 12).

Posteriormente se graficaron los valores inversos de los AAbs en función de los valores inversos de [Albúmina]. Esta gráfica se aproxima a la linealidad a altas concentraciones de albúmina y cruza la ordenada en 1/AAbsmax, Figuras 14 a la 20.

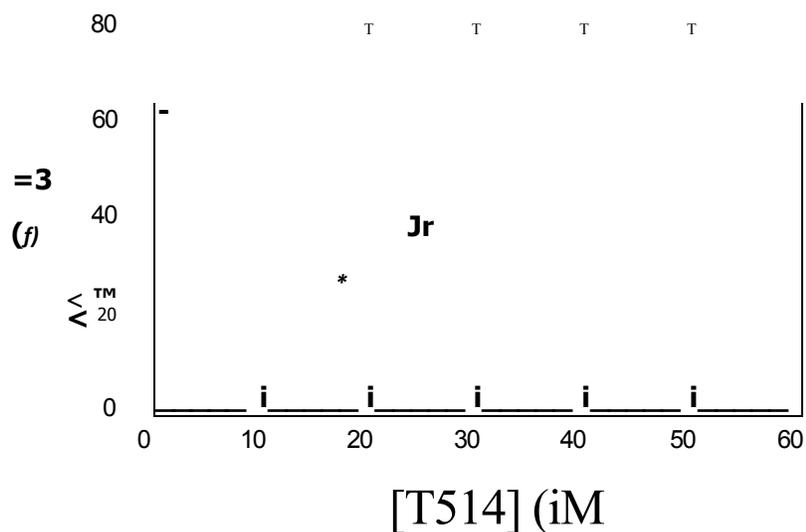


**Figura 13. Curva de titulación de la ASH (10 pM) con T514: pH 7.2 y 30 °C.**

### **3.2.2.3 Determinación del cambio de absorbancia máximo (AAbsMAX) a pH de 7.2**

Para determinar el AAbsMAX, se fijó la concentración de T514 en 20 pM y la concentración de las albúminas (ASB o ASH) se varió en el intervalo de 20 hasta 60 pM (Tablas 6 a la 12).

Posteriormente se graficaron los valores inversos de los AAbs en función de los valores inversos de [Albúmina]. Esta gráfica se aproxima a la linealidad a altas concentraciones de albúmina y cruza la ordenada en 1/AAbsmax, Figuras 14 a la 20.

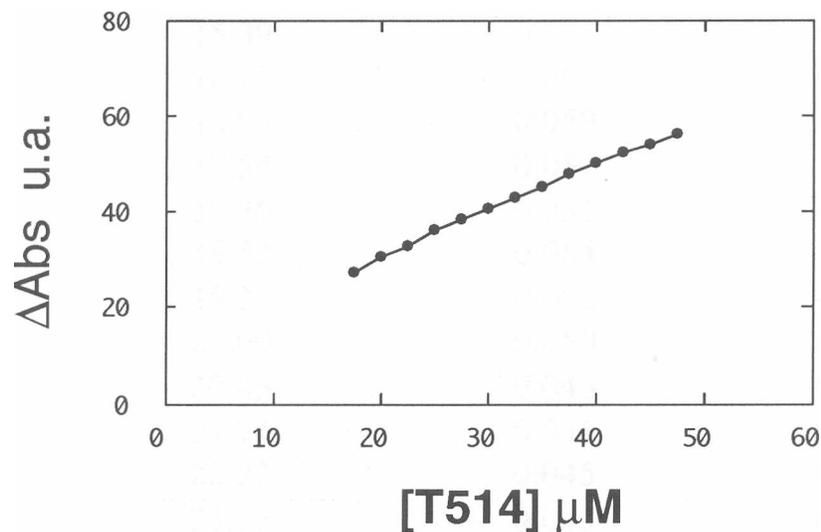


**Figura 13. Curva de titulación de la ASH (10 pM) con T514: pH 7.2 y 30 °C.**

### **3.2.2.3 Determinación del cambio de absorbancia máximo (AAbsMAX) a pH de 7.2**

Para determinar el AAbsMAX, se fijó la concentración de T514 en 20 pM y la concentración de las albúminas (ASB o ASH) se varió en el intervalo de 20 hasta 60 pM (Tablas 6 a la 12).

Posteriormente se graficaron los valores inversos de los AAbs en función de los valores inversos de [Albúmina]. Esta gráfica se aproxima a la linealidad a altas concentraciones de albúmina y cruza la ordenada en 1/AAbsmax, Figuras 14 a la 20.



**Figura 13. Curva de titulación de la ASH (10 pM) con T514: pH 7.2 y 30 °C.**

### **3.2.2.3 Determinación del cambio de absorbancia máximo (AAbsMAX) a pH de 7.2**

Para determinar el AAbsMAX, se fijó la concentración de T514 en 20 pM y la concentración de las albúminas (ASB o ASH) se varió en el intervalo de 20 hasta 60 pM (Tablas 6 a la 12).

Posteriormente se graficaron los valores inversos de los AAbs en función de los valores inversos de [Albúmina]. Esta gráfica se aproxima a la linealidad a altas concentraciones de albúmina y cruza la ordenada en 1/AAbsmax, Figuras 14 a la 20.

**TABLA 6. AAbs A15 °C Y A pH 7.2 PARA EL SISTEMA T514-AS**

[ASB]	AAbs	1/AAbs	1/[ASB]
20.0	15.39	0.065	0.050
22.5	16.13	0.062	0.044
25.0	16.95	0.059	0.040
27.5	17.54	0.057	0.036
30.0	17.86	0.056	0.033
32.5	18.52	0.054	0.031
35.0	19.23	0.052	0.029
37.0	20.00	0.050	0.027
40.0	20.83	0.048	0.025
42.5	21.74	0.046	0.024
45.0	22.22	0.045	0.022
47.5	23.26	0.043	0.021
50.0	24.39	0.041	0.020
55.0	25.00	0.040	0.018
60.0	25.64	0.039	0.017

**TABLA 7. AAbs A 20 °C Y A pH 7.2 PARA EL SISTEMA T514-ASB**

[ASB]	AAbs	1/AAbs	1/[ASB]
20.0	16.39	0.061	0.050
22.5	16.95	0.059	0.044
25.0	18.18	0.055	0.040
27.5	18.87	0.053	0.036
30.0	19.61	0.051	0.033
32.5	20.41	0.049	0.031
35.0	20.82	0.048	0.029
37.0	21.28	0.047	0.027
40.0	22.25	0.045	0.025
42.5	23.27	0.043	0.024
45.0	24.39	0.041	0.022
47.5	25.15	0.040	0.021
50.0	25.66	0.039	0.020
55.0	26.33	0.038	0.018
60.0	27.05	0.037	0.017

**TABLA 8. AAbs A 25 °C Y ApH 7.2 PARA EL SISTEMA T514-ASB**

---

<b>[ASB]</b>	<b>AAbs</b>	<b>1/AAbs</b>	<b>1/[ASB]</b>
20.0	16.97	0.059	0.050
22.5	17.84	0.056	0.044
25.0	19.23	0.052	0.040
27.5	19.62	0.051	0.036
30.0	20.19	0.050	0.033
32.5	20.85	0.048	0.031
35.0	21.75	0.046	0.029
37.0	22.73	0.044	0.027
40.0	23.24	0.043	0.025
42.5	24.39	0.041	0.024
45.0	25.63	0.039	0.022
47.5	26.34	0.038	0.021
50.0	27.04	0.037	0.020
55.0	27.78	0.036	0.018
60.0	28.57	0.035	0.017

**TABLA 9. AAbs A 30 °C Y A pH 7.2 PARA EL SISTEMA T514-ASB**

<b>[ASB]</b>	<b>AAbs</b>	<b>1/AAbs</b>	<b>1/[ASB]</b>
20.0	17.24	0.058	0.050
22.5	18.19	0.055	0.044
25.0	18.87	0.053	0.040
27.5	19.63	0.051	0.036
30.0	20.42	0.049	0.033
32.5	21.29	0.047	0.031
35.0	22.24	0.045	0.029
37.0	23.25	0.043	0.027
40.0	23.81	0.042	0.025
42.5	24.40	0.041	0.024
45.0	25.65	0.039	0.022
47.5	26.35	0.038	0.021
50.0	27.79	0.036	0.020
55.0	28.59	0.035	0.018
60.0	29.41	0.034	0.017

**TABLA 10. AAbs A 20 °C Y A pH 7.2 PARA EL SISTEMA T514-ASH**

[ASB]	AAbs	1/AAbs	1/[ASB]
20.0	11.24	0.089	0.050
22.5	12.05	0.083	0.044
25.0	13.16	0.076	0.040
27.5	13.70	0.073	0.036
30.0	14.54	0.069	0.033
32.5	15.25	0.066	0.031
35.0	15.46	0.065	0.029
37.0	16.21	0.062	0.027
40.0	16.69	0.060	0.025
42.5	17.31	0.058	0.024
45.0	17.75	0.056	0.022
47.5	18.08	0.055	0.021
50.0	18.45	0.054	0.020
55.0	18.93	0.053	0.018
60.0	19.29	0.052	0.017

**TABLA 11. AAbs A 25 °C Y A pH 7.2 PARA EL SISTEMA T514-ASH**


---

[ASB]	AAbs	1/AAbs	1/[ASB]
20.0	12.35	0.081	0.050
22.5	13.33	0.075	0.044
25.0	14.49	0.069	0.040
27.5	15.63	0.064	0.036
30.0	16.13	0.062	0.033
32.5	16.97	0.059	0.031
35.0	17.37	0.058	0.029
37.0	17.56	0.057	0.027
40.0	18.51	0.054	0.025
42.5	18.89	0.053	0.024
45.0	19.63	0.051	0.022
47.5	20.48	0.049	0.021
50.0	21.29	0.047	0.020
55.0	21.77	0.046	0.018
60.0	22.25	0.045	0.017

**TABLA 10. AAbs A 20 °C Y A pH 7.2 PARA EL SISTEMA T514-ASH**

[ASB]	AAbs	1/AAbs	1/[ASB]
20.0	11.24	0.089	0.050
22.5	12.05	0.083	0.044
25.0	13.16	0.076	0.040
27.5	13.70	0.073	0.036
30.0	14.54	0.069	0.033
32.5	15.25	0.066	0.031
35.0	15.46	0.065	0.029
37.0	16.21	0.062	0.027
40.0	16.69	0.060	0.025
42.5	17.31	0.058	0.024
45.0	17.75	0.056	0.022
47.5	18.08	0.055	0.021
50.0	18.45	0.054	0.020
55.0	18.93	0.053	0.018
60.0	19.29	0.052	0.017

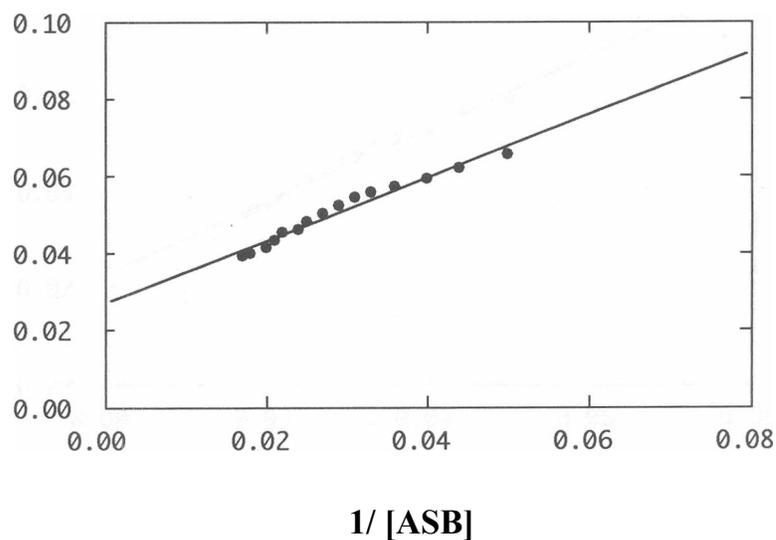
**TABLA 11. AAbs A 25 °C Y A pH 7.2 PARA EL SISTEMA T514-ASH**

---

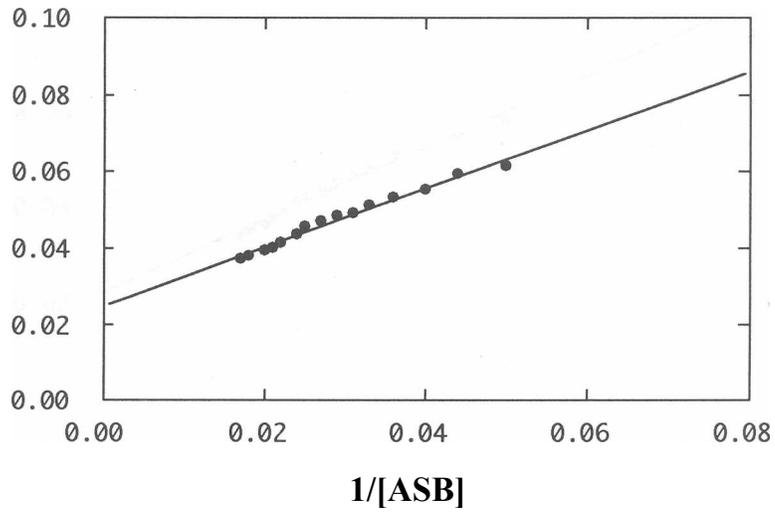
[ASB]	AAbs	1/AAbs	1/[ASB]
20.0	12.35	0.081	0.050
22.5	13.33	0.075	0.044
25.0	14.49	0.069	0.040
27.5	15.63	0.064	0.036
30.0	16.13	0.062	0.033
32.5	16.97	0.059	0.031
35.0	17.37	0.058	0.029
37.0	17.56	0.057	0.027
40.0	18.51	0.054	0.025
42.5	18.89	0.053	0.024
45.0	19.63	0.051	0.022
47.5	20.48	0.049	0.021
50.0	21.29	0.047	0.020
55.0	21.77	0.046	0.018
60.0	22.25	0.045	0.017

**TABLA 12. AAbs A 30 °C Y A pH 7.2 PARA EL SISTEMA T514-ASH**

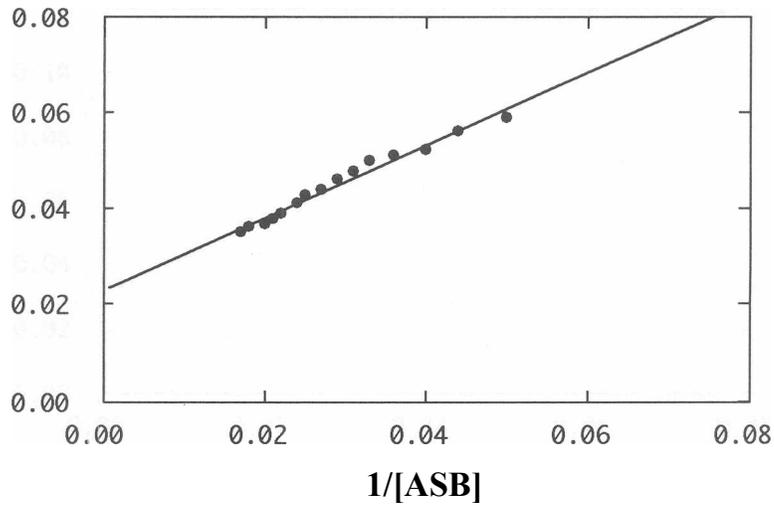
[ASB]	AAbs	1/AAbs	1/[ASB]
20.0	13.78	0.073	0.050
22.5	14.87	0.067	0.044
25.0	15.71	0.064	0.040
27.5	17.21	0.058	0.036
30.0	17.71	0.056	0.033
32.5	18.21	0.055	0.031
35.0	18.94	0.053	0.029
37.0	19.33	0.052	0.027
40.0	20.08	0.050	0.025
42.5	20.54	0.049	0.024
45.0	21.32	0.047	0.022
47.5	22.31	0.045	0.021
50.0	23.28	0.043	0.020
55.0	23.84	0.042	0.018
60.0	24.44	0.041	0.017



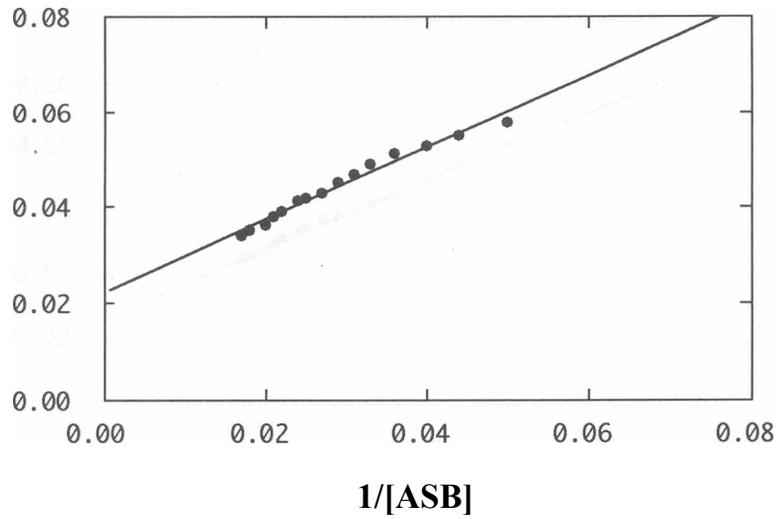
**Figura 14. Estimación del AAIJSMAx del sistema T514-ASB: pH 7.2 y 15 °C.  
La recta cruza la ordenada en  $1/AAbs_{MAX} = 0.027$ ,  $AAbs_{MAX} = 37.04$  u.a.**



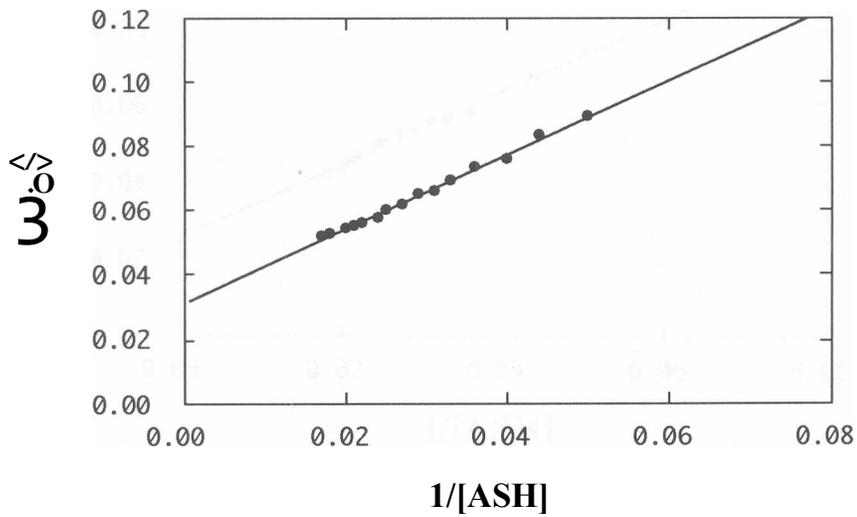
**Figura 15. Estimación del AAóSMAX del sistema T514-ASB: pH 7.2 y 20 °C.  
La recta cruza la ordenada en  $1/AAbsMAX = 0.025$ , AAóSMAX = 40.00 u.a.**



**Figura 16. Estimación del AAóSMAX del sistema T514-ASB: pH 7.2 y 25 °C.  
La recta cruza la ordenada en  $1/AAbsMAX = 0.023$ , AAbsMAX = 43.48 u.a.**

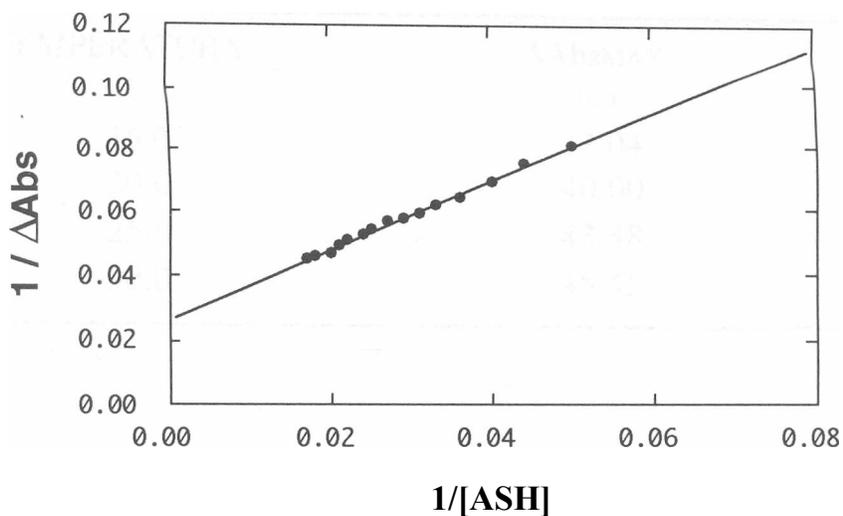


**Figura 17. Estimación del AAÓSMAX del sistema T514-ASB: pH 7.2 y 30 °C.  
La recta cruza la ordenada en  $1/AAbsMAX = 0.022$ , AAÓSMAX = 45.45 u.a.**

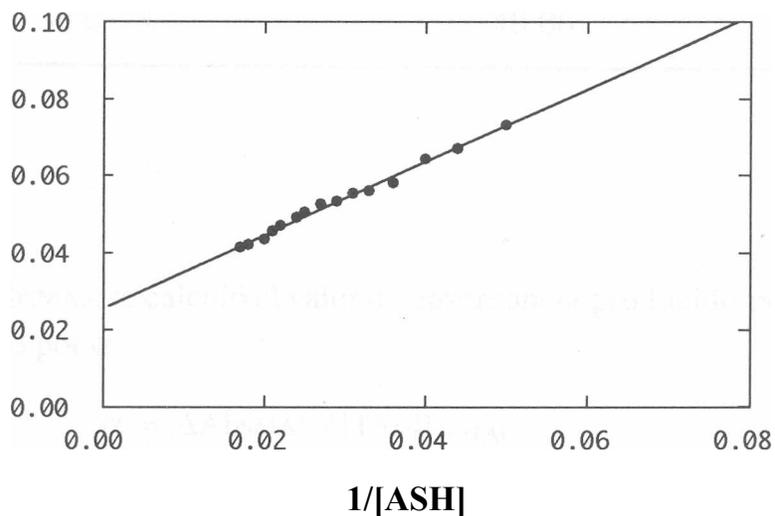


**Figura 18. Estimación del AAÓSMAX del sistema T514-ASH: pH 7.2 y 20 °C.  
La recta cruza la ordenada en  $1/AAÓSMAX = 0.031$ , AAÓSMAX = 32.26 u.a.**



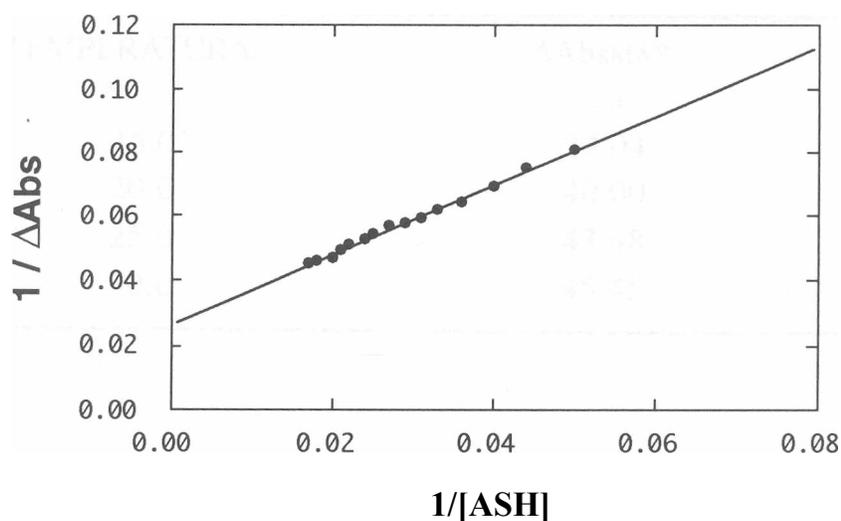


**Figura 19. Estimación del AAbsMAX del sistema T514-ASH: pH 7.2 y 25 °C. La recta cruza la ordenada en  $1/\text{AAbsMAX} = 0.027$ ,  $\text{AAbsMAX} = 37.04$  u.a.**

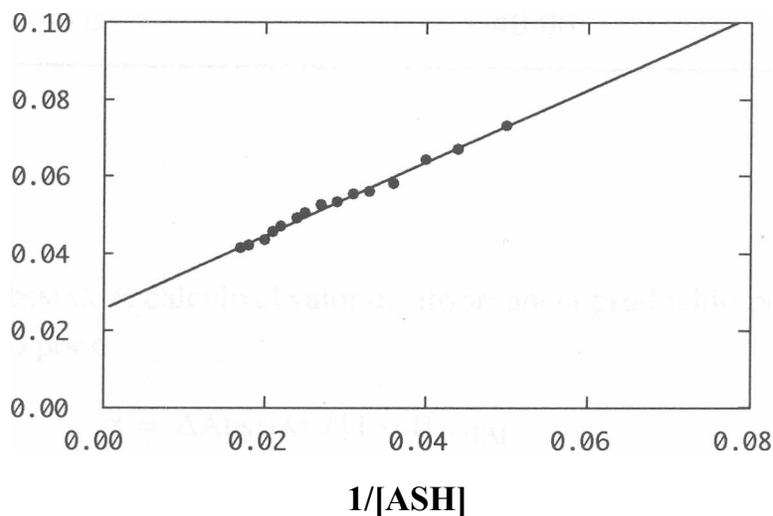


**Figura 20. Estimación del AAbsMAX del sistema T514-ASH: pH 7.2 y 30 °C. La recta cruza la ordenada en  $1/\text{AAbsMAX} = 0.025$ ,  $\text{AAbsMAX} = 40.00$  ua.**

Los valores de los AAbsMAX se resumen en las Tablas 21 y 22.



**Figura 19. Estimación del AAbsMAX del sistema T514-ASH: pH 7.2 y 25 °C.  
La recta cruza la ordenada en  $1/AAbsMAX = 0.027$ ,  $AAbsMAX = 37.04$  u.a.**



**Figura 20. Estimación del AAbsMAX del sistema T514-ASH: pH 7.2 y 30 °C.  
La recta cruza la ordenada en  $1/AAbsMAX = 0.025$ ,  $AAbsMAX = 40.00$  ua.**

Los valores de los AAbsMAX se resumen en las Tablas 21 y 22.

**TABLA 13. AAbsMAX PARA EL SISTEMA T514-ASB: pH 7.2**

TEMPERATURA	AAbsMAX
°C	u.a.
15.0	37.04
20.0	40.00
25.0	43.48
30.0	45.45

**TABLA 14. AAbsMAX PARA EL SISTEMA T514-ASH: pH 7.**

---

TEMPERATURA	AAbsMAX
°C	u.a.
20.0	32.26
25.0	37.04
30.0	40.00

---

Conociendo el AAbsMAX se calculó el valor de absorbancia producido por la unión de 1 pM de T514, dado por  $a$ :

$$a = \text{AAbsMAX}/[\text{T514}]_{\text{XOTAL}}$$

Los valores de  $a$  se resumen en las Tablas 15 y 16.

**TABLA 13. AAbsMAX PARA EL SISTEMA T514-ASB: pH 7.2**

TEMPERATURA	AAbsMAX
°C	u.a.
15.0	37.04
20.0	40.00
25.0	43.48
30.0	45.45

**TABLA 14. AAbsMAX PARA EL SISTEMA T514-ASH: pH 7.**

---

TEMPERATURA	AAbsMAX
°C	u.a.
20.0	32.26
25.0	37.04
30.0	40.00

---

Conociendo el AAbsMAX se calculó el valor de absorbancia producido por la unión de 1 (iM de T514, dado por a:

$$ot = AAbsMAX / [T514]_{TQ_{TAL}}$$

Los valores de a se resumen en las Tablas 15 y 16.

**TABLA 15. UNIDADES DE ABSORBANCIA PRODUCIDOS POR MOL DE T514 UNIDA PARA EL SISTEMA T514-ASB a pH 7.2**

TEMPERATURA	<i>a</i>
°C	u.a.
15	1.852
20	2.000
25	2.174
30	2.273

**TABLA 16. UNIDADES DE ABSORBANCIA PRODUCIDOS POR MOL DE T514 UNIDA PARA EL SISTEMA T514-ASH a pH 7.2**

---

TEMPERATURA	<i>a</i>
°C	u.a.
20	1.613
25	1.852
30	2.000

---

#### **3.2.2.4 Determinación de la concentración de T514 unida y de T514 libre**

Después de conocer el valor de *a* se determinaron los valores de las concentraciones unida y libre de la T514, columnas 3 y 4 de las Tablas 17 a la 23.

#### **3.2.2.5 Determinación del número promedio de moléculas de T514 unida a la albúmina (*r*)**

Con los valores de las concentraciones de T514 unida a la albúmina en cada punto de la curva de titulación y tomando en cuenta la concentración de proteína utilizada en esta estrategia se obtuvieron los valores de *r* (número promedio de moléculas de T514 unida a la proteina), columna 5 de las Tablas 17 a la 23.

**TABLA 15. UNIDADES DE ABSORBANCIA PRODUCIDOS POR MOL DE T514 UNIDA PARA EL SISTEMA T514-ASB a pH 7.2**

TEMPERATURA	a
°C	u.a.
15	1.852
20	2.000
25	2.174
30	2.273

**TABLA 16. UNIDADES DE ABSORBANCIA PRODUCIDOS POR MOL DE T514 UNIDA PARA EL SISTEMA T514-ASH a pH 7.2**

TEMPERATURA	a
°C	u.a.
20	1.613
25	1.852
30	2.000

#### **3.2.2.4 Determinación de la concentración de T514 unida y de T514 libre**

Después de conocer el valor de  $a$  se determinaron los valores de las concentraciones unida y libre de la T514, columnas 3 y 4 de las Tablas 17 a la 23.

#### **3.2.2.5 Determinación del número promedio de moléculas de T514 unida a la albúmina ( $r$ )**

Con los valores de las concentraciones de T514 unida a la albúmina en cada punto de la curva de titulación y tomando en cuenta la concentración de proteína utilizada en esta estrategia se obtuvieron los valores de  $r$  (número promedio de moléculas de T514 unida a la protema), columna 5 de las Tablas 17 a la 23.

**TABLA 17**  
**TITULACION DE LA ASB (10 (iM): pH 7.2 Y 15 °C**

[T514]TOTAL	AAbs	[T514]UNIDA	[T514]LIBRE	r	C.V. %	r/[T514]i_iBRE	C.V. %
17.50	21.46	11.59	5.91	1.159	2.15	0.196	9.82
20.00	23.96	12.94	7.06	1.294	2.08	0.182	9.53
22.50	26.28	14.19	8.31	1.419	1.75	0.171	8.16
25.00	28.48	15.38	9.62	1.538	1.35	0.161	7.25
27.50	30.54	16.49	11.01	1.649	1.12	0.151	6.81
30.00	32.45	17.52	12.48	1.752	1.07	0.139	5.67
32.50	34.13	18.43	14.07	1.843	1.43	0.131	7.63
35.00	36.13	19.51	15.49	1.951	1.29	0.126	7.09
37.50	38.17	20.61	16.89	2.061	1.65	0.122	7.64
40.00	39.98	21.59	18.41	2.159	1.31	0.117	6.95
42.50	41.76	22.55	19.95	2.255	1.57	0.113	7.33
45.00	43.65	23.57	21.43	2.357	1.69	0.110	7.16
47.50	45.28	24.45	23.05	2.445	1.88	0.106	8.43

El 0C que se utilizó fue de 1.852

**TABLA 18**  
**TITULACION DE LA ASB (10  $\mu$ M): pH 7.2 Y 20 °C**

[T514]TOTAL	AAbs	[T514]UNIDA	[T514]LIBRE	$r$	C.V. %	$\tau$	$\tau_{\text{SW}}$	$\tau_{\text{E}}$	C.V. %
17.50	20.98	10.49	7.01	1.049	1.89	0.151			8.16
20.00	23.48	11.74	8.26	1.174	1.54	0.142			6.34
22.50	25.68	12.84	9.66	1.284	1.31	0.133			5.87
25.00	27.74	13.87	11.13	1.387	1.29	0.125			5.59
27.50	29.74	14.87	12.63	1.487	1.65	0.118			7.76
30.00	31.56	15.78	14.22	1.578	1.38	0.111			5.79
32.50	33.60	16.80	15.70	1.680	2.16	0.107			9.73
35.00	35.70	17.85	17.15	1.785	1.87	0.104			7.95
37.50	37.68	18.84	18.66	1.884	1.34	0.101			5.29
40.00	39.58	19.79	20.21	1.979	1.52	0.098			6.81
42.50	41.40	20.70	21.80	2.070	1.06	0.095			5.64
45.00	43.14	21.57	23.43	2.157	1.66	0.092			7.82
47.50	44.74	22.37	25.13	2.237	1.44	0.089			7.11

El  $a$  que se utilizó fue de 2

**TABLA 20**  
**TITULACION DE LA ASB (10 JIM): pH 7.2 Y 30 °C**

[T514]TOTAL	AAbs	[T514]UNIDA	[T514]LIBRE	<i>r</i>	C.V. %	<i>r</i> /[T514] <sub>i</sub> _IBRE	C.V. %
17.50	19.48	8.57	8.93	0.857	2.71	0.096	12.26
20.00	21.80	9.59	10.41	0.959	2.64	0.093	11.39
22.50	23.93	10.53	11.97	1.053	2.12	0.088	10.82
25.00	25.96	11.42	13.58	1.142	1.79	0.085	8.67
27.50	27.78	12.22	15.28	1.222	1.56	0.080	8.16
30.00	29.69	13.06	16.94	1.306	1.63	0.077	9.23
32.50	31.16	13.71	18.79	1.371	1.29	0.073	7.41
35.00	33.05	14.54	20.46	1.454	1.14	0.071	6.78
37.50	34.80	15.31	22.19	1.531	1.01	0.069	5.33
40.00	36.80	16.19	23.81	1.619	1.37	0.068	7.74
42.50	38.39	16.89	25.61	1.689	1.68	0.066	8.69
45.00	40.30	17.73	27.27	1.773	1.93	0.065	9.72
47.50	41.73	18.36	29.14	1.836	1.84	0.063	8.87

El  $\sigma$  que se utilizó fue de 2.273

**TABLA 21**  
**TITULACION DE LA ASH (10  $\mu$ M): pH 7.2 Y 20 °C**

[T514]TOTAL	AAbs	[T514]UNIDA	[T514]LIBRE	$r$	C.V. %	$r/[T514]_{LIBRE}$	C.V. %
17.50	23.61	14.64	2.86	1.464	1.88	0.512	8.95
20.00	26.31	16.31	3.69	1.631	1.06	0.442	6.01
22.50	28.79	17.85	4.65	1.785	1.18	0.384	6.93
25.00	31.44	19.49	5.51	1.949	1.43	0.354	6.98
27.50	33.66	20.87	6.63	2.087	1.71	0.315	8.34
30.00	35.74	22.16	7.84	2.216	1.22	0.283	6.67
32.50	38.53	23.89	8.61	2.389	1.37	0.277	7.04
35.00	41.10	25.48	9.52	2.548	1.03	0.268	4.79
37.50	43.31	26.85	10.65	2.685	1.64	0.252	7.26
40.00	45.28	28.07	11.93	2.807	1.79	0.235	8.12
42.50	47.47	29.43	13.07	2.943	0.95	0.225	5.63
45.00	49.55	30.72	14.28	3.072	1.28	0.215	6.91
47.50	51.16	31.72	15.78	3.172	1.72	0.201	8.33

El  $a$  que se utilizó fue de 1.613

**TABLA 22**  
**TITULACION DE LA ASH (10  $\mu$ M): pH 7.2 Y 25 °C**

[T514]TOTAL	AAbs	[T514]UNIDA	[T514]LIBRE	<i>r</i>	C.V. %	/7[T514]LIBRE	C.V. %
17.50	26.26	14.18	3.32	1.418	1.77	0.427	8.63
20.00	29.39	15.87	4.13	1.587	1.68	0.384	7.59
22.50	32.28	17.43	5.07	1.743	1.43	0.343	7.26
25.00	34.98	18.89	6.11	1.889	1.59	0.309	7.15
27.50	37.37	20.18	7.32	2.018	1.33	0.276	5.51
30.00	39.54	21.35	8.65	2.135	1.89	0.247	8.24
32.50	42.24	22.81	9.69	2.281	1.25	0.235	5.61
35.00	44.80	24.19	10.81	2.419	1.15	0.224	5.44
37.50	46.71	25.52	11.98	2.552	1.06	0.213	4.57
40.00	49.56	26.76	13.24	2.676	1.64	0.202	7.09
42.50	53.87	27.94	14.56	2.794	1.27	0.192	5.39
45.00	53.87	29.09	15.91	2.909	1.46	0.183	7.36
47.50	55.86	30.16	17.34	3.016	1.59	0.174	7.77

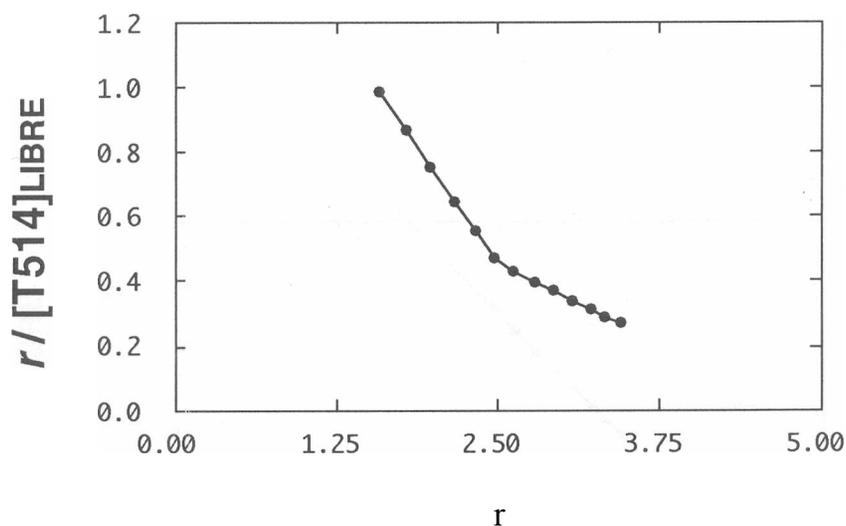
El *a* que se utilizó fue de 1.852

**TABLA 23**  
**TITULACION DE LA ASH (10 (iM): pH 7.2 Y 30 °C**

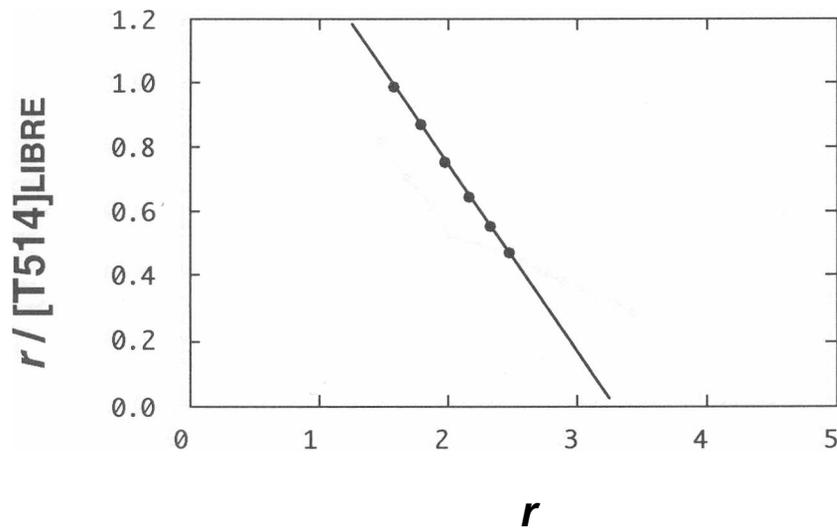
[T514]TOTAL	AAbs	[T514]UNIDA	[T514]LIBRE	<i>r</i>	C.V. %	/7[T514]LIBRE	C.V. %
17.50	27.48	13.74	3.76	1.378	2.11	0.365	16.05
20.00	30.46	15.23	4.77	1.523	1.46	0.319	10.14
22.50	33.14	16.57	5.93	1.657	1.23	0.279	8.65
25.00	35.98	17.99	7.01	1.799	1.67	0.257	11.30
27.50	38.32	19.16	8.34	1.916	1.49	0.230	6.22
30.00	40.56	20.28	9.72	2.028	1.01	0.209	5.41
32.50	42.68	21.34	11.16	2.134	1.84	0.191	9.27
35.00	45.30	22.65	12.35	2.265	1.38	0.183	6.54
37.50	47.64	23.82	13.68	2.382	1.88	0.174	7.73
40.00	50.12	25.06	14.94	2.506	1.53	0.168	6.08
42.50	52.18	26.09	16.41	2.609	1.40	0.159	5.82
45.00	54.08	27.04	17.96	2.704	1.26	0.151	5.66
47.50	56.38	28.19	19.31	2.819	1.78	0.146	7.91

El OC que se utilizó fue de 2

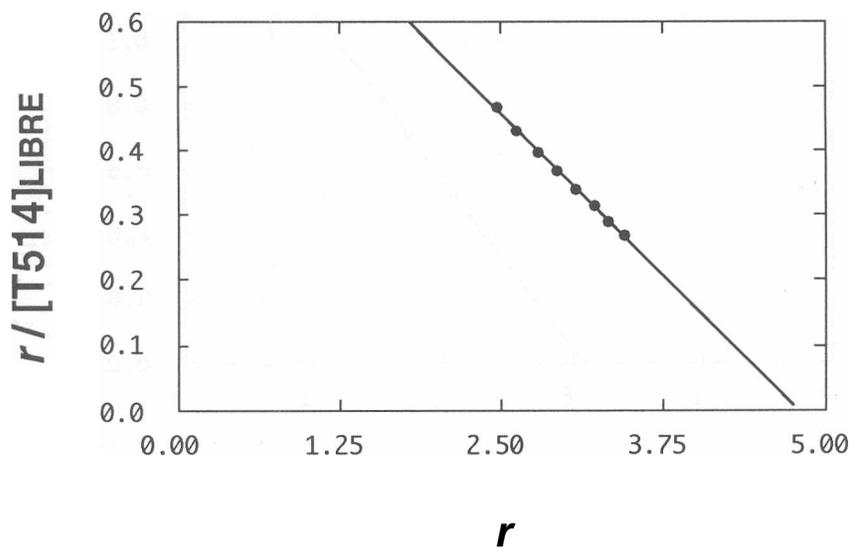
Consecutivamente se graficaron los valores de  $r / [T514]_{LIBRE}$  en función de  $r$ , de lo que resultó una curva con dos tendencias lineales, Figuras de la 58 a la 78. Debido a esto se asumió que cada molécula de albúmina (ASB,ASH) tiene dos tipos de sitios de unión independientes. Cada tendencia se trató independientemente y de cada una de ellas se obtuvo una recta con pendiente negativa ( $-K_a$ ) y con intercepto en la abscisa (N). Se le denominó  $K_{a1}$  y  $K_{a2}$  a las constantes de unión correspondientes a  $N_1$  y  $N_2$ , los números de los sitios de unión primarios y secundarios. Los valores de N y de  $K_a$  para cada caso se muestran en las Tablas 48 y 49.



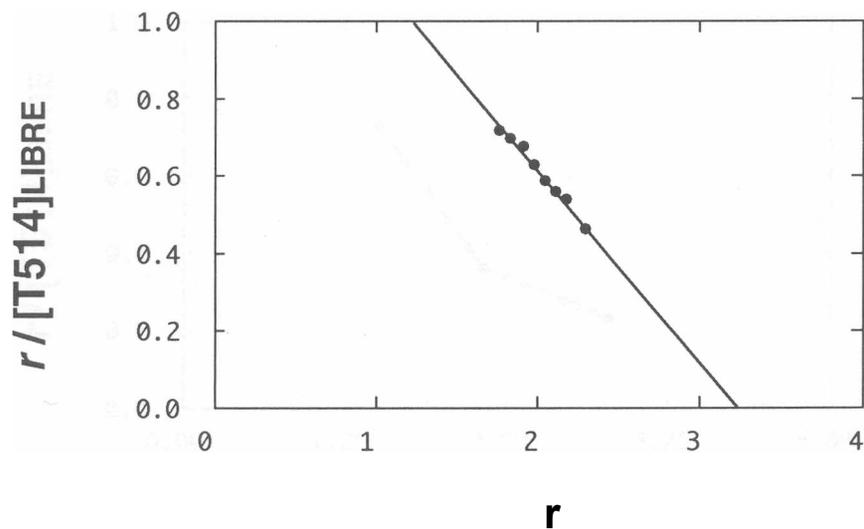
**Figura 58. Gráfica de Scatchard de la unión de T514 con ASB: pH 7.4 y 15 °C.**



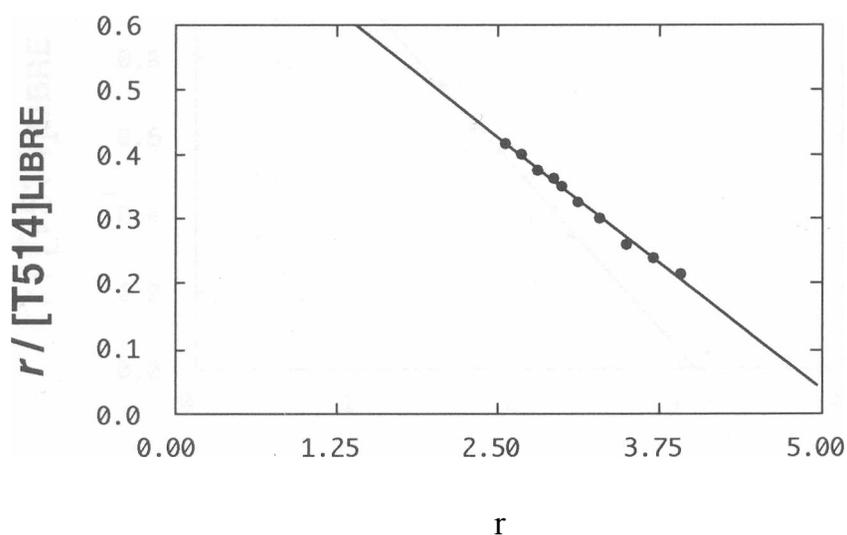
**Figura 59. Gráfica de Scatchard de la unión de T514 con ASB en Ni: pH 7.4 y 15 °C. La línea continua fue obtenida por análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados,  $r^2 = 0.996$ .**



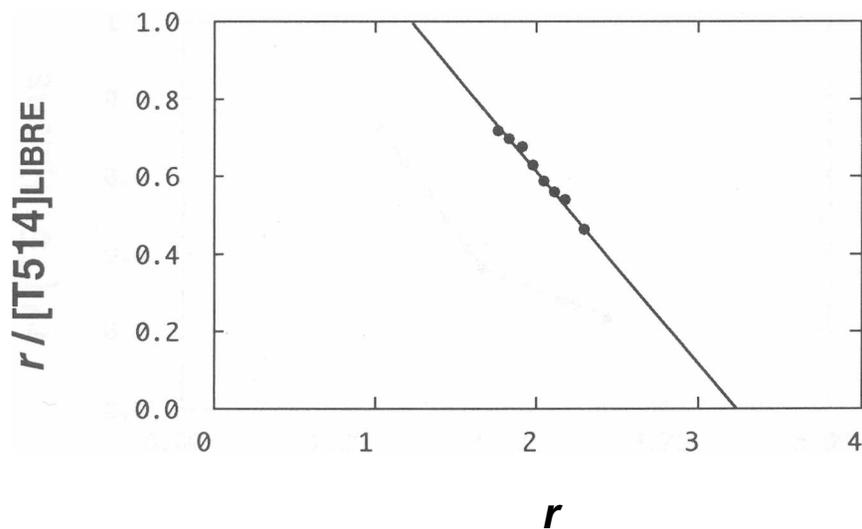
**Figura 60. Gráfica de Scatchard de la unión de T514 con ASB en N2: pH 7.4 y 15 °C. La línea continua fue obtenida por análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados,  $r^2 = 0.986$ .**



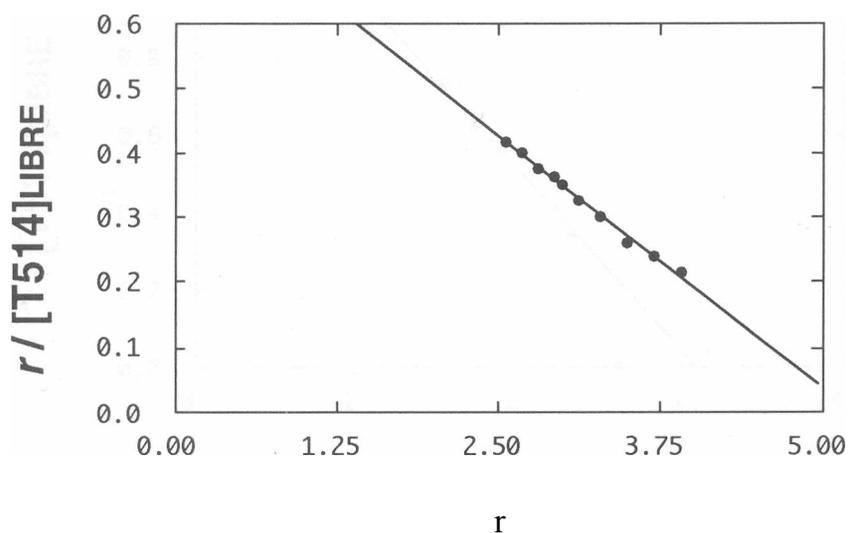
**Figura 65. Gráfica de Scatchard de la unión de T514 con ASB en NI: pH 7.4 y 25 °C. La línea continua fue obtenida por análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados,  $r^2 = 0.991$ .**



**Figura 66. Gráfica de Scatchard de la unión de T514 con ASB en N2: pH 7.4 y 25 °C. La línea continua fue obtenida por análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados,  $r^2 = 0.996$ .**



**Figura 65. Gráfica de Scatchard de la unión de T514 con ASB en NI: pH 7.4 y 25 °C. La línea continua fue obtenida por análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados,  $r^2 = 0.991$ .**



**Figura 66. Gráfica de Scatchard de la unión de T514 con ASB en N2: pH 7.4 y 25 °C. La línea continua fue obtenida por análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados,  $r^2 = 0.996$ .**

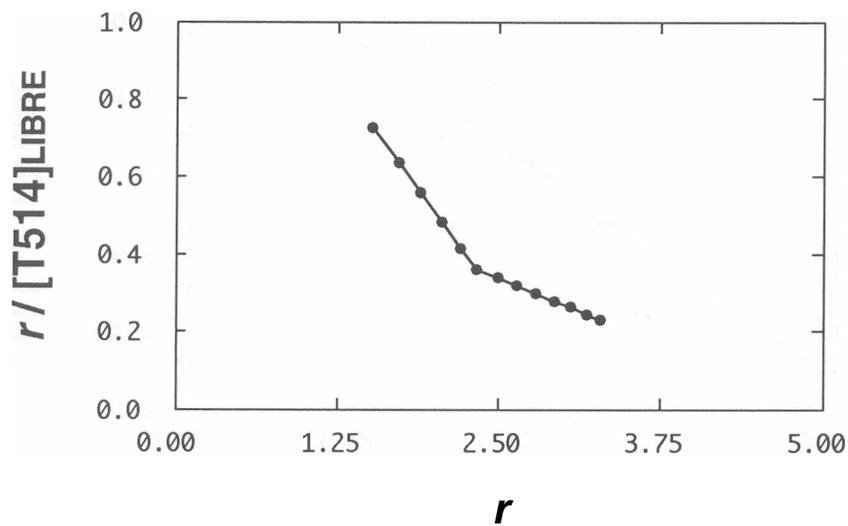


Figura 67. Gráfica de Scatchard de la unión de T514 con ASB: pH 7.4 y 30 °C.

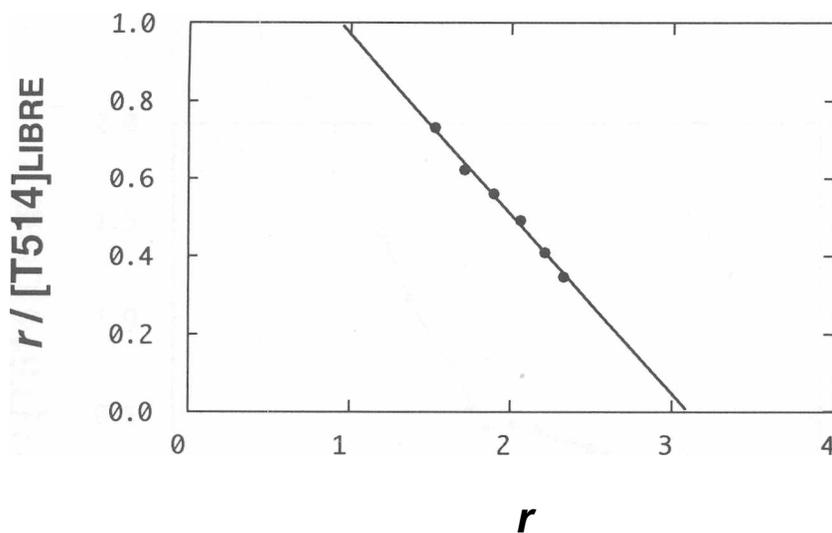


Figura 68. Gráfica de Scatchard de la unión de T514 con ASB en NI: pH 7.4 y 30 °C. La línea continua fue obtenida por análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados,  $r^2 = 0.996$ .

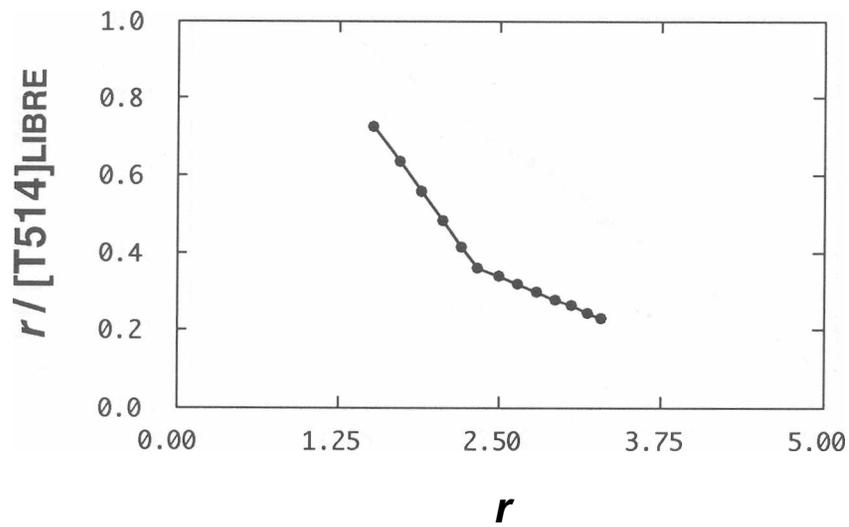


Figura 67. Gráfica de Scatchard de la unión de T514 con ASB: pH 7.4 y 30 °C.

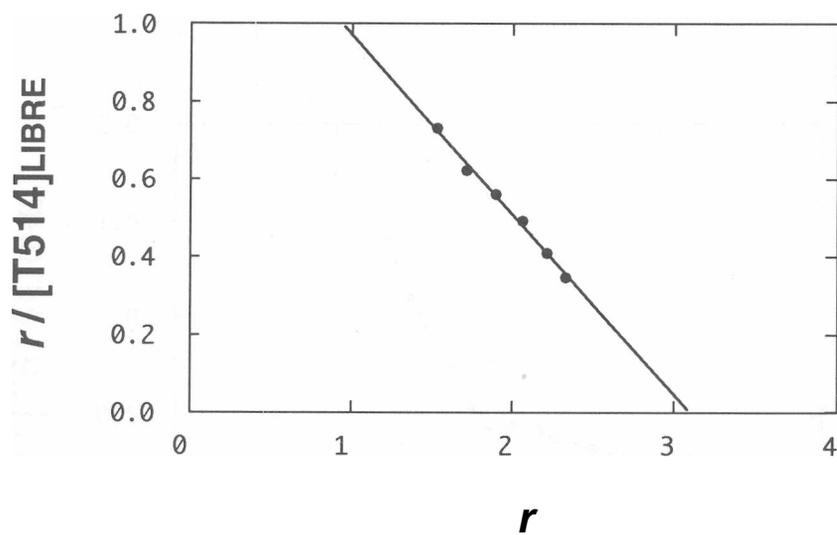
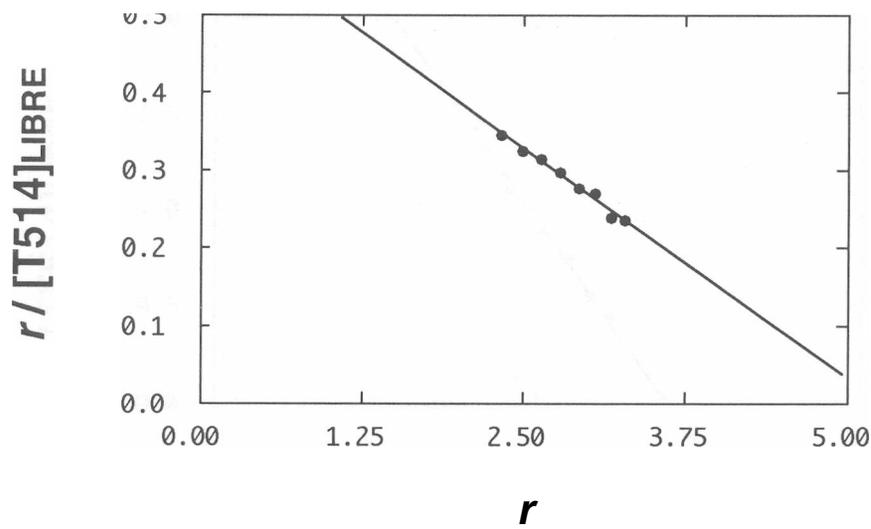
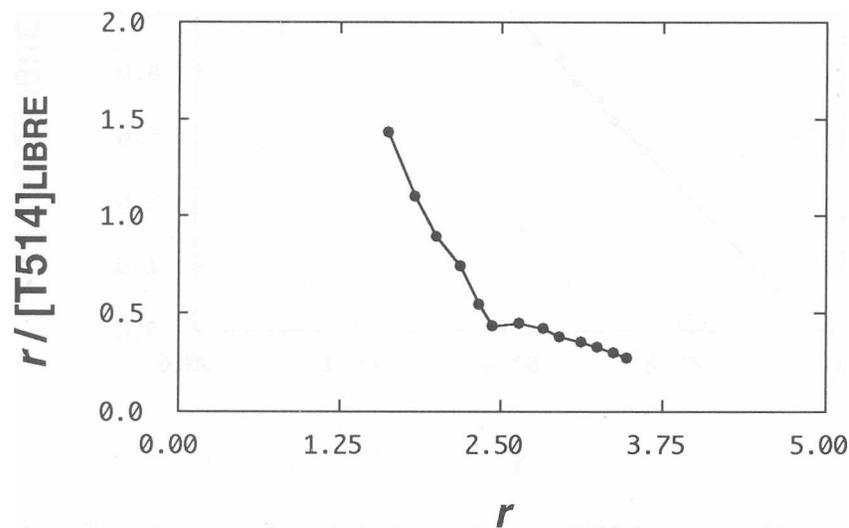


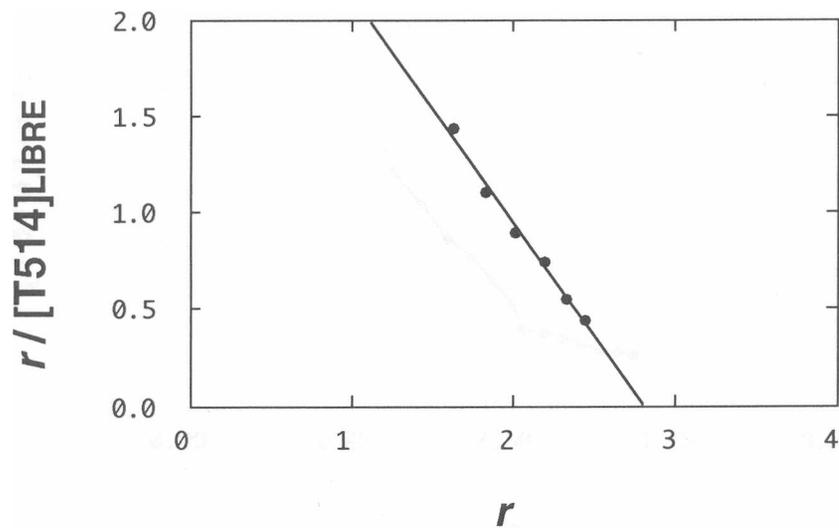
Figura 68. Gráfica de Scatchard de la unión de T514 con ASB en NI: pH 7.4 y 30 °C. La línea continua fue obtenida por análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados,  $r^2 = 0.996$ .



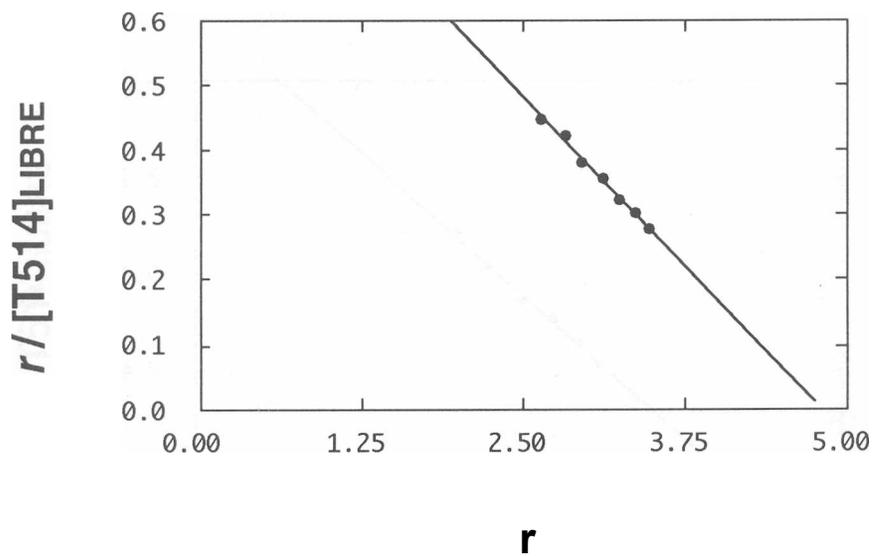
**Figura 69. Gráfica de Scatchard de la unión de T514 con ASB en N<sub>2</sub>: pH 7.4 y 30 °C. La línea continua fue obtenida por análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados,  $r^2 = 0.984$ .**



**Figura 70. Gráfica de Scatchard de la unión de T514 con ASH: pH 7.4 y 20 °C.**



**Figura 71. Gráfica de Scatchard de la unión de T514 con ASH en Ni: pH 7.4 y 20 °C. La línea continua fue obtenida por análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados,  $r^2 = 0.990$ .**



**Figura 72. Gráfica de Scatchard de la unión de T514 con ASH en N2: pH 7.4 y 20 °C. La línea continua fue obtenida por análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados,  $r^2 = 0.995$ .**

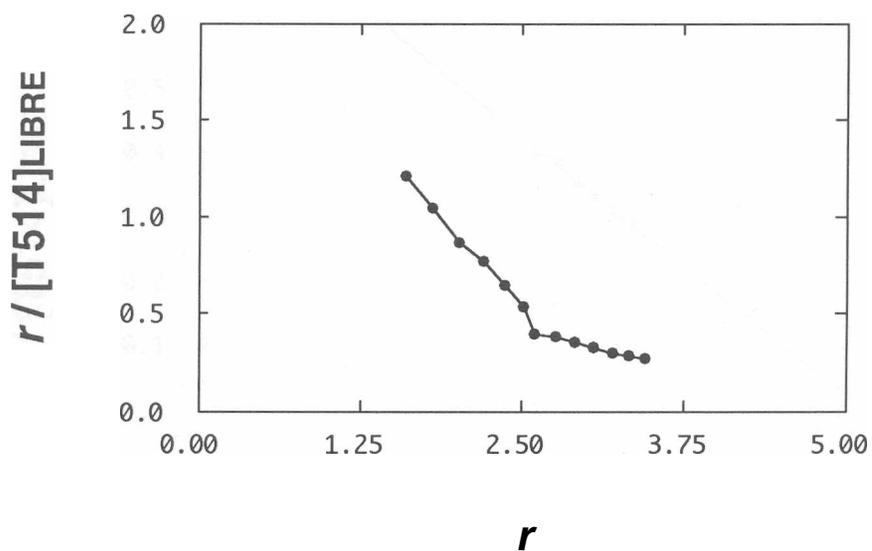


Figura 73. Gráfica de Scatchard de la unión de T514 con ASH: pH 7.4 y 25 °C.

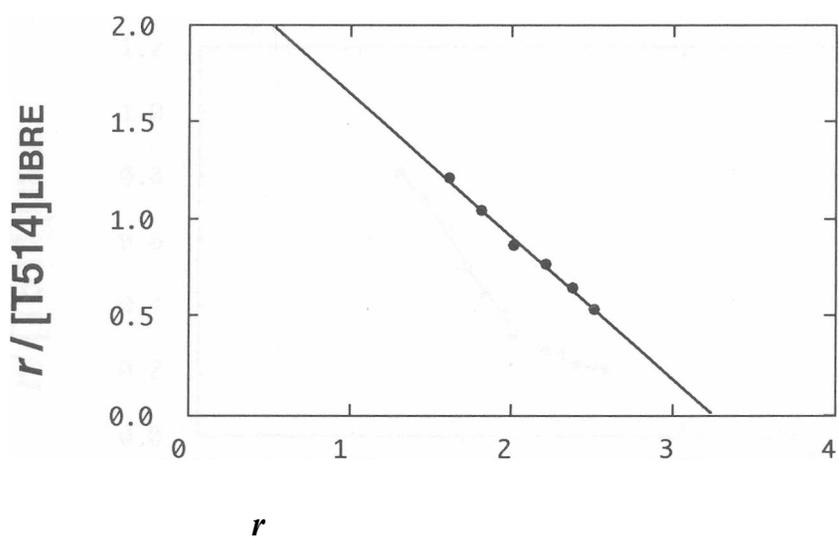


Figura 74. Gráfica de Scatchard de la unión de T514 con ASH en NI: pH 7.4 y 25 °C. La línea continua fue obtenida por análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados,  $r^2 = 0.995$ .

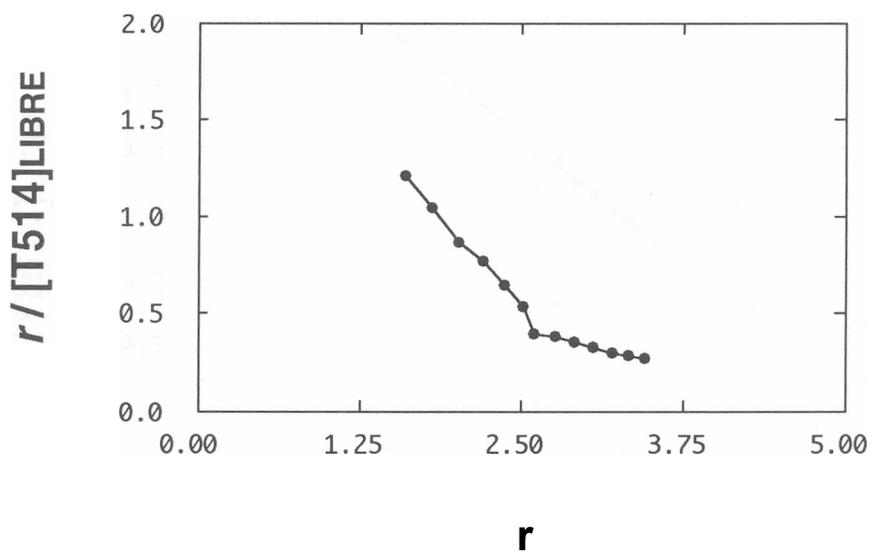


Figura 73. Gráfica de Scatchard de la unión de T514 con ASH: pH 7.4 y 25 °C.

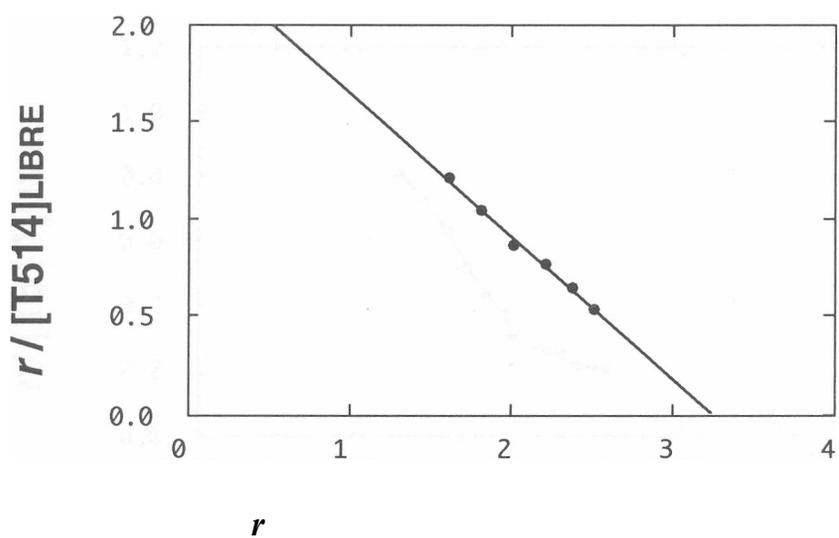
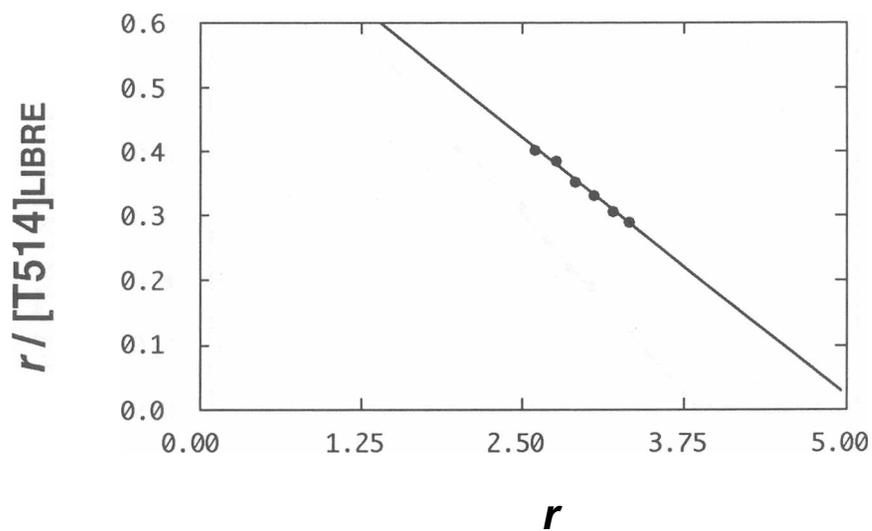
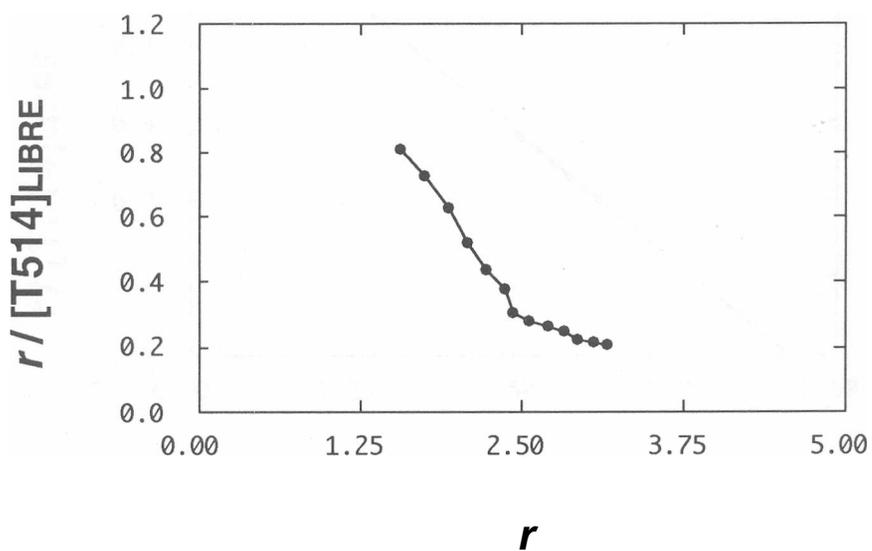


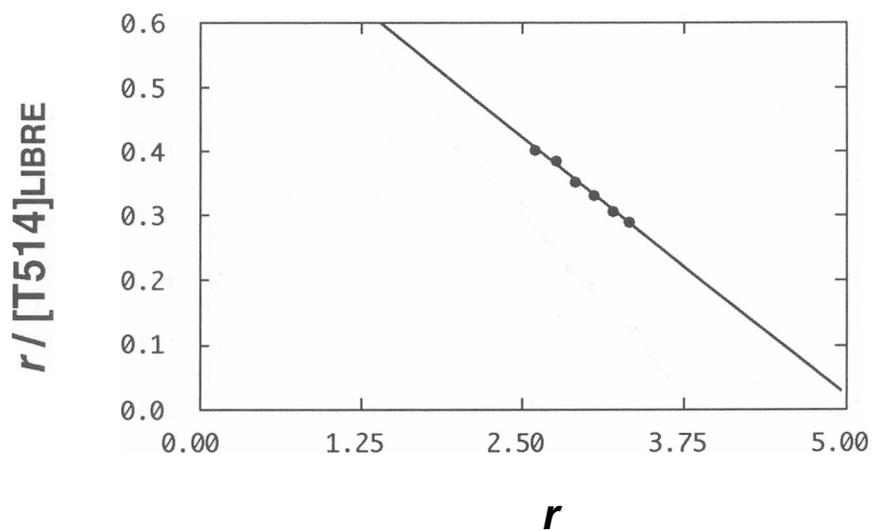
Figura 74. Gráfica de Scatchard de la unión de T514 con ASH en NI: pH 7.4 y 25 °C. La línea continua fue obtenida por análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados,  $r^2 = 0.995$ .



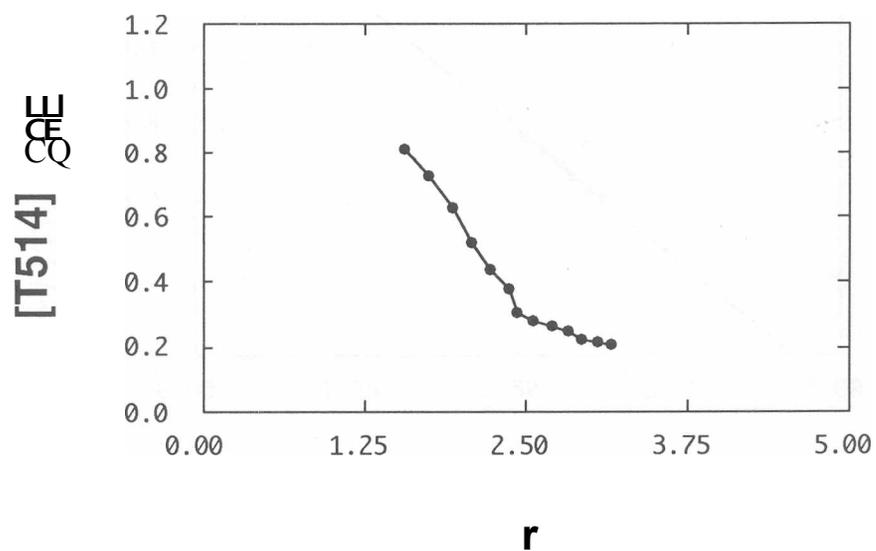
**Figura 75. Gráfica de Scatchard de la unión de T514 con ASH en N<sub>2</sub>: pH 7.4 y 25 °C. La línea continua fue obtenida por análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados,  $r^2 = 0.994$ .**



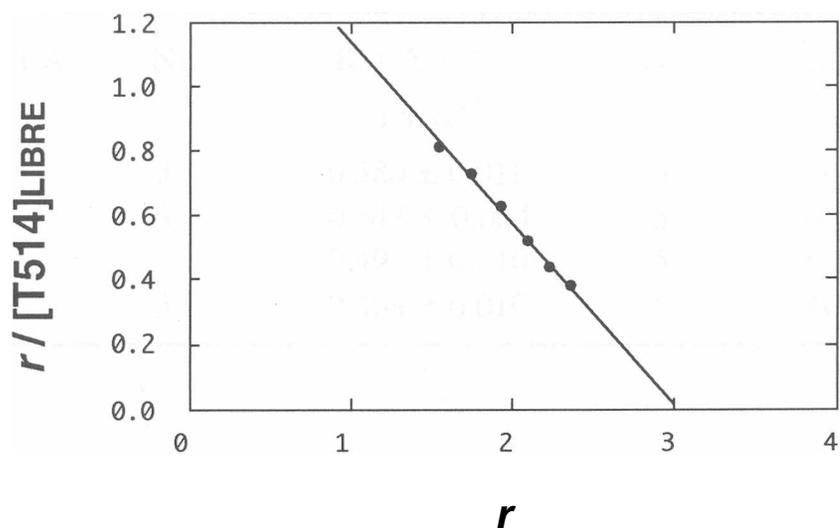
**Figura 76. Gráfica de Scatchard de la unión de T514 con ASH: pH 7.4 y 30 °C.**



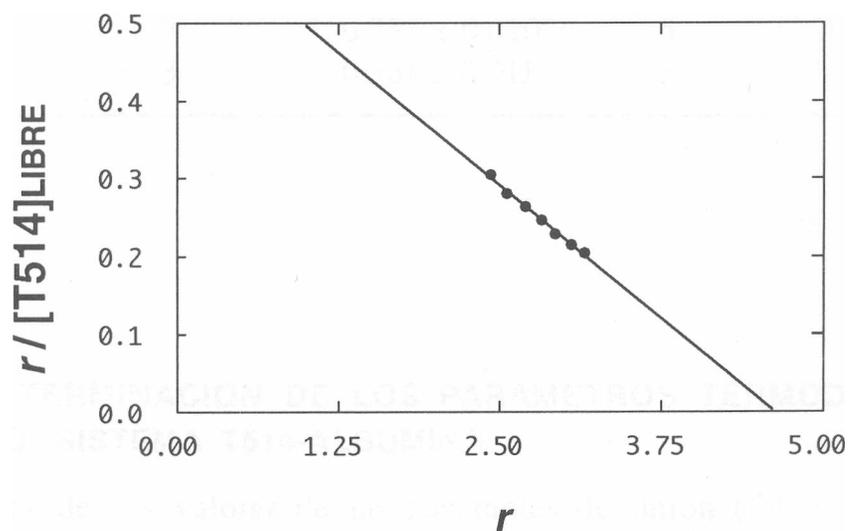
**Figura 75. Gráfica de Scatchard de la unión de T514 con ASH en N<sub>2</sub>: pH 7.4 y 25 °C. La línea continua fue obtenida por análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados,  $r^2 = 0.994$ .**



**Figura 76. Gráfica de Scatchard de la unión de T514 con ASH: pH 7.4 y 30 °C.**



**Figura 77. Gráfica de Scatchard de la unión de T514 con ASH en NI: pH 7.4 y 30 °C. La línea continua fue obtenida por análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados,  $r^2 = 0.995$ .**



**Figura 78. Gráfica de Scatchard de la unión de T514 con ASH en N2: pH 7.4 y 30 °C. La línea continua fue obtenida por análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados,  $r^2 = 0.993$ .**

)

**TABLA 48**

**PARAMETROS DE LA UNION DE T514 A ASB: pH 7.4**

TEMPERATURA °C	Ni	Kal X 10 <sup>6</sup> Lmol <sup>-1</sup>	N2	Ka2 x 10 <sup>6</sup> L mol <sup>-1</sup>
15	3	0.580 ± 0.011	5	0.211 ± 0.008
20	3	0.543 ± 0.004	5	0.187 ± 0.006
25	3	0.497 ± 0.010	5	0.157 ± 0.007
30	3	0.468 ± 0.010	5	0.119 ± 0.006

**TABLA 49**

**PARAMETROS DE LA UNION DE T514 A ASH: pH 7.4**

TEMPERATURA °C	Ni	Kal x 10 <sup>6</sup> Lmol <sup>-1</sup>	N2	Ka2 x 10 <sup>6</sup> Lmol <sup>-1</sup>
20	3	1.179 ± 0.016	5	0.211 ± 0.007
25	3	0.731 ± 0.010	5	0.161 ± 0.008
30	3	0.561 ± 0.011	5	0.137 ± 0.006

**3.3.2 DETERMINACION DE LOS PARAMETROS TERMODINAMICOS DEL SISTEMA T514-ALBUMINA.**

Con los datos de los valores de las constantes de unión (Tablas 48 y 49) se obtuvieron los valores del Cambio de Energía Libre de Gibbs, el cambio de entalpia se obtuvo de gráficas de Van't Hoff, Figuras 79 y 80. Los parámetros termodinámicos de los sistemas T514-ASB y T514-ASH se resumen en las Tabla 50 y Tabla 52.

**TABLA 48****PARAMETROS DE LA UNION DE T514 A ASB: pH 7.4**

TEMPERATURA °C	Ni	Kai X 10 <sup>6</sup> L mol <sup>-1</sup>	N2	Ka2 x 10 <sup>6</sup> Lmol <sup>-1</sup>
15	3	0.580 ± 0.011	5	0.211 ± 0.008
20	3	0.543 ± 0.004	5	0.187 ± 0.006
25	3	0.497 ± 0.010	5	0.157 ± 0.007
30	3	0.468 ± 0.010	5	0.119 ± 0.006

**TABLA 49****PARAMETROS DE LA UNION DE T514 A ASH: pH 7.4**

TEMPERATURA °C	Ni	Kai x 10 <sup>6</sup> L mol <sup>-1</sup>	N2	Ka2 x 10 <sup>6</sup> Lmol <sup>-1</sup>
20	3	1.179 ± 0.016	5	0.211 ± 0.007
25	3	0.731 ± 0.010	5	0.161 ± 0.008
30	3	0.561 ± 0.011	5	0.137 ± 0.006

### 3.3.2 DETERMINACION DE LOS PARAMETROS TERMODINAMICOS DEL SISTEMA T514-ALBUMINA.

Con los datos de los valores de las constantes de unión (Tablas 48 y 49) se obtuvieron los valores del Cambio de Energía Libre de Gibbs, el cambio de entalpia se obtuvo de gráficas de Van't Hoff, Figuras 79 y 80. Los parámetros termodinámicos de los sistemas T514-ASB y T514-ASH se resumen en las Tabla 50 y Tabla 52.

14

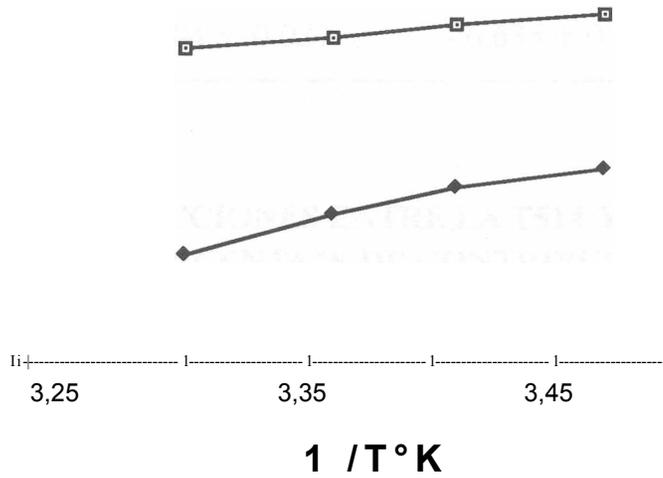


Figura 79. Gráfica de Van't Hoff de la unión de la T514 a la ASB, pH 7.4.

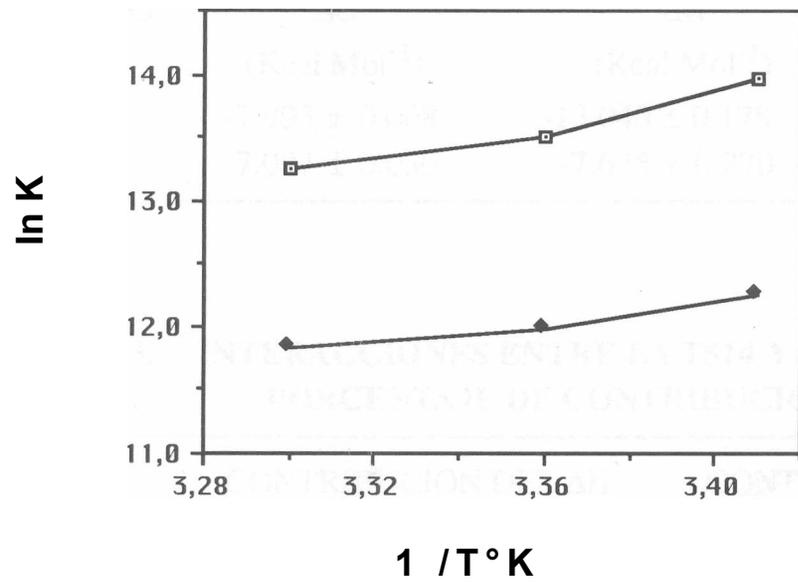


Figura 80. Gráfica de Van't Hoff para la unión de la T514 a la ASH, pH 7.4.

**TABLA 50. PARAMETROS TERMODINAMICOS DE LA UNION DE T514 A ALBUMINA SERICA BOVINA (ASB) A pH 7.4 Y 25 °C**

TIPO DE SITIO DE UNION	AG (Kcal Mol <sup>-1</sup> )	AH (Kcal Mol <sup>-1</sup> )	AS (ue)
NI	-7.766 ± 0.012	-2.551 ± 0.194	+ 17.503 ± 0.683
N2	-7.084 ± 0.027	- 6.635 ± 0.214	+ 1.522 ± 0.619

**TABLA 51. INTERACCIONES ENTRE LA T514 Y LA ASB: pH 7.4 PORCENTAJE DE CONTRIBUCION AL AG**

	CONTRIBUCION DEL AH %	CONTRIBUCION DEL AS %
NI	32.84 ± 2.54	67.16 ± 2.54
N2	93.68 ± 3.17	6.32 ± 3.17

**TABLA 52. PARAMETROS TERMODINAMICOS DE LA UNION DE T514 A ALBUMINA SERICA HUMANA (ASH) A pH 7.4 Y 25 °C**

TIPO DE SITIO DE UNION	AG (Kcal Mol <sup>-1</sup> )	AH (Kcal Mol <sup>-1</sup> )	AS (ue)
NI	-7.995 ± 0.008	-13.040 ± 0.178	-16.931 ± 0.627
N2	-7.097 ± 0.030	-7.625 ± 0.270	-1.772 ± 1.002

**TABLA 53. INTERACCIONES ENTRE LA T514 Y LA ASH: pH 7.4 PORCENTAJE DE CONTRIBUCION AL AG**

	CONTRIBUCION DEL AH %	CONTRIBUCION DEL AS %
NI	36.89 ± 2.40	63.22 ± 1.97
N2	92.55 ± 4.24	7.45 ± 4.24

## CAPITULO 4

### DISCUSION

En el estudio de las interacciones de la T514 con la ASB y con la ASH se utilizó la espectroscopia Ultravioleta-Visible por ser una técnica sencilla y rápida; esto aunado con el hecho de que el equipo utilizado está provisto con arreglo de diodos, lo cual resulta en mayor rapidez y precisión en las respuestas en relación con los instrumentos de óptica tradicional. Por todo esto la metodología utilizada es altamente confiable aunque los cambios de absorbancia medidos hayan sido muy pequeños. (Ver coeficientes de variación, Tablas 17-23 y 41-47 ).

En el trabajo experimental se requería el uso de sustancias puras. Debido a esto sólo se usó toxina que cumplió con los parámetros de calidad ya establecidos en el laboratorio de extracción del Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L, (Tabla 3); sin embargo, durante el desarrollo de la tesis se monitorearon algunos de los patrones de calidad para corroborar la pureza; para esto, se tomó el punto de fusión inicial y final, se practicó cromatografía en capa fina y se determinó la pureza espectroscópica, para detectar cualquier degradación y/o contaminación que pudiera haberse producido con el tiempo; cuando se encontraba alguna variación respecto de los patrones originales, se examinaba otro lote de toxina.

Para precisar si la T514 interactuaba con la albúmina sérica (tanto con la ASB como con la ASH) se analizaron los espectros de la T514, de la Albúmina y el de la mezcla T514-Albúmina, (Figura 4). Al comparar los espectros de absorbancia se observó que existían diferencias entre ellos: a longitud de onda superior a 400 nm la albúmina no absorbe y el espectro de la T514 presenta una banda de absorción con un valor máximo a 422 nm, además existen diferencias en los valores de absorbancia a 422 nm en el espectro de la T514 con respecto al espectro de la mezcla. Cabe señalar que las concentraciones de la T514 en ambas soluciones fue la misma, por lo tanto, no hubo efectos de dilución ni superposición de bandas de absorción. Por lo anterior se infirió que la T514 interactúa con la albúmina. Si bien la diferencia espectral a 422 nm es pequeña se podía medir con buena precisión en el equipo utilizado. Debido a esto se seleccionó esta longitud de onda para estudiar las interacciones de dichas sustancias.

Es necesario mencionar que la T514 es una sustancia inestable en solución acuosa, por lo que era importante estudiar el proceso de interacción entre las sustancias en un

tiempo corto, para de esta manera evitar errores debidos a cambios en la absorbancia de la solución producidos por la descomposición de la T514. Por otro lado, para estudiar el proceso de unión por medio de la espectroscopia UV-VIS se requería que existiera un cambio espectral y para esto era necesario tomar dos lecturas de absorbancia: la primera correspondía a la solución de T514 y la segunda a la solución de la mezcla T514-Albúmina, es decir se requería tomar la última lectura a un tiempo óptimo hasta que se hubiera establecido el equilibrio de unión T514-Albúmina, sin que se notaran evidencias de descomposición. De esta manera, se estudió el efecto del tiempo en el proceso de unión y la medición a los tiempo 50 segundos después de la primera lectura resultó ser la más adecuada ya que su coeficiente de variación fue el más bajo (Tabla 5).

Para estudiar la unión de la T514 con la albúmina sérica se procedió a titular la albúmina con soluciones de T514 cuyas concentraciones variaron en el intervalo de 17.5 y 47.5 (iM/L; se escogió este intervalo después de haber verificado en forma experimental que concentraciones menores daban respuesta muy baja por lo que no eran confiables, y concentraciones más altas daban coeficientes de variación muy grandes. En las gráficas donde se relacionan los valores de los cambios de absorbancia (AAbs) con las concentraciones de la T514 ([T514])se observa que los AAbs están directamente relacionados con la concentración de T514, figuras 7 a la 13 y 44 a la 50.

Por otra parte era necesario relacionar el cambio de absorbancia que se producía con la concentración de toxina unida; para esto se requería conocer el cambio de absorbancia máximo (AAbsMAX), es decir, cambio en la absorbancia cuando hay saturación de la molécula de albúmina con T514; se graficaron los valores  $1/\text{AAbs}$  en función de los valores  $1/[\text{ALBUMINA}]$ , esta gráfica se aproxima a la linearidad a altas concentraciones de albúmina y cruza la ordenada en  $1 / \text{AAbsMAX}$  <sup>(9)</sup>. Así se pudo calcular los AAbsMAX para los sistemas T514-ASB y T514-ASH a las diferentes condiciones de trabajo (Tablas 13-14 y 37-38).

El estudio de la unión de la T514 a la albúmina sérica bovina y a la albúmina sérica humana resultó en gráficas de Scatchard curvilineales. Es posible que estas gráficas se hayan comportado de esta forma debido a una distribución estadística de la energía libre de unión. Las gráficas están formadas por dos tendencias, y cada tendencia corresponde a un tipo o clase de sitio de unión. Debido a esto se asumió que cada molécula de albúmina (ASB, ASH) tiene dos tipos de sitios de unión independientes<sup>(30)</sup>. En este trabajo se usó un programa computacional simple

(Mystat) basado en mínimos cuadrados para linearizarla forma de las ecuaciones de unión, los coeficientes de correlación fueron buenos ( 0.982 - 0.998).

De acuerdo con las constantes de unión así calculadas (Tabla 54) podemos inferir que la T514 interacciona con la ASH con 67 a un 81% más que con la ASB, esto a pH 7.2. A pH 7.4 la diferencia en la interacción es menor, ya que en los sitios NI es un 17 a un 54% mayor y en los sitios N2 es de un 2.5 a un 12.5% mayor. La diferencia es estadísticamente significativa ( $\alpha = 0.05$ ), excepto en los sitios N2 a 25 °C y a pH 7.4.

La disminución del valor de las constantes de afinidad con el incremento de la temperatura es característico de las reacciones exotérmicas, esto ya se ha reportado para muchas interacciones medicamentos-proteínas<sup>131, 32, 33</sup>. Esto se puede ver también en el caso que nos ocupa (Tabla 54). Al incrementar la temperatura 5 °C, en el sistema con ASB a pH 7.2 la interacción disminuye en un 14 a un 35%, en el sistema con ASH a pH 7.2 la interacción disminuye en un 4 a un 20%, en el sistema con ASB a pH 7.4 la interacción en los sitios NI disminuye en un 5 a un 9% y en los sitios N2 en un 12 a un 24%, en el sistema con ASH a pH de 7.4 la interacción disminuye en un 15 a un 38%. La diferencia es estadísticamente significativa ( $\alpha = 0.05$ ).

El valor negativo del cambio de energía libre de Gibbs ( $\Delta G$ ) indica que el proceso de unión es espontáneo<sup>128, 29, 34</sup>) (Tabla 55).

**TABLA 54. PARAMETROS DE UNION: T514-ASB Y T514-ASH**

Temperatura		ASB		ASH	
		pH 7.2 Ka * 10 <sup>6</sup>	pH 7.4 Ka * 10 <sup>6</sup>	pH 7.2 Ka * 10 <sup>6</sup>	pH 7.4 Ka * 10 <sup>6</sup>
20 °C	NI	0.079	0.543	0.295	1.179
	N2	0.032	0.187	0.112	0.211
25 °C	NI	0.068	0.497	0.246	0.731
	N2	0.024	0.157	0.087	0.161
30 °C	NI	0.045	0.468	0.176	0.561
	N2	0.020	0.119	0.055	0.137

Las constantes de unión están dadas en L mol<sup>-1</sup>

(Mystat) basado en mínimos cuadrados para linearizar la forma de las ecuaciones de unión, los coeficientes de correlación fueron buenos ( 0.982 - 0.998).

De acuerdo con las constantes de unión así calculadas (Tabla 54) podemos inferir que la T514 interacciona con la ASH con 67 aun 81% más que con la ASB, esto a pH 7.2. A pH 7.4 la diferencia en la interacción es menor, ya que en los sitios NI es un 17 a un 54% mayor y en los sitios N2 es de un 2.5 a un 12.5% mayor. La diferencia es estadísticamente significativa ( $\alpha = 0.05$ ), excepto en los sitios N2 a 25 °C y a pH 7.4.

La disminución del valor de las constantes de afinidad con el incremento de la temperatura es característico de las reacciones exotérmicas, esto ya se ha reportado para muchas interacciones medicamentos-proteínas<sup>31, 32, 33</sup>. Esto se puede ver también en el caso que nos ocupa (Tabla 54). Al incrementar la temperatura 5 °C, en el sistema con ASB a pH 7.2 la interacción disminuye en un 14 a un 35%, en el sistema con ASH a pH 7.2 la interacción disminuye en un 4 a un 20%, en el sistema con ASB a pH 7.4 la interacción en los sitios NI disminuye en un 5 a un 9% y en los sitios N2 en un 12 a un 24%, en el sistema con ASH a pH de 7.4 la interacción disminuye en un 15 a un 38%. La diferencia es estadísticamente significativa ( $\alpha = 0.05$ ).

El valor negativo del cambio de energía libre de Gibbs ( $\Delta G$ ) indica que el proceso de unión es espontáneo<sup>28, 29, 34</sup> (Tabla 55).

**TABLA 54. PARAMETROS DE UNION: T514-ASB Y T514-ASH**

Temperatura		ASB		ASH	
		pH 7.2 Ka * 10 <sup>6</sup>	pH 7.4 Ka * 10 <sup>6</sup>	pH 7.2 Ka * 10 <sup>6</sup>	pH 7.4 Ka * 10 <sup>6</sup>
20 °C	NI	0.079	0.543	0.295	1.179
	N2	0.032	0.187	0.112	0.211
25 °C	NI	0.068	0.497	0.246	0.731
	N2	0.024	0.157	0.087	0.161
30 °C	NI	0.045	0.468	0.176	0.561
	N2	0.020	0.119	0.055	0.137

Las constantes de unión están dadas en L mol<sup>-1</sup>

De acuerdo a O'Reilly!<sup>32)</sup> el incremento en la interacción con un incremento en el pH (de 7.4 a 9.0) está de acuerdo con el descubrimiento (formación) de nuevos sitios de unión en la molécula de albúmina. En nuestro caso sucede de una manera similar, la diferencia en los pHs (7.2 y 7.4) es pequeña, sin embargo con un incremento en el pH hay un incremento en la interacción T514-Albúmina. La diferencia es estadísticamente significativa ( $\alpha = 0.05$ ). En el estudio con ASB, la interacción aumenta en un 83 a un 90% al incrementar el pH. Por otro lado, en el estudio con la ASH la interacción aumenta en un 50 a un 75%. Esto no coincide con un mecanismo electrostático, en el cual un incremento en el número de cargas negativas en la proteína debe llevar a una disminución en la unión!<sup>35) 36) 37)</sup>

Además, si la naturaleza de las interacciones proteína toxina fuera principalmente electrostática, es decir, si la parte iónica de la molécula de T514 se combinara con la parte catiónica de la molécula de albúmina, la principal fuente del valor del AG debería derivarse de una gran contribución del AS con poca contribución del factor AH!<sup>31)</sup>. Sin embargo, los parámetros termodinámicos de la unión de T514-Albúmina (Tabla 55) indican una gran contribución del AH al valor del AG (esta contribución es aproximadamente del 40 a un 90%). Es muy poco probable que la unión sea electrostática, por lo tanto, la porción significativa de la energía de unión puede ser derivada de otras fuentes.

Como se observa en la Tabla 55, el factor de desorden molecular (AS) para la unión de la T514 a la albúmina sérica en unos casos fue mayor que cero y en otros menor. De manera muy simple, se puede esperar que el cambio de entropía (AS) en la formación de un complejo sea marcadamente negativo a causa de una restricción en la entropía de traslación y de rotación acompañada de una disminución en el número de iones en solución. El AS positivo, usualmente es atribuido a desorientación y desdoblamiento de la molécula de proteína. Sin embargo, es poco probable que el cambio de entropía positivo sea el resultado de una desorientación significativa de la molécula de albúmina, al menos para las primeras moléculas iónicas de la T514, ya que la reacción fue exotérmica mientras que un proceso de desdoblamiento con rupturas de uniones debe ser una reacción endotérmica!<sup>32) 34) 37)</sup>. En este caso debe considerarse el papel del solvente acuoso. Cuando un compuesto se disuelve en un solvente polar, la solvatación de iones y grupos polares es un factor importante en la reducción de la entropía del sistema. Debido a que las moléculas de albúmina y de T514 se hidratan en solventes acuosos, la interacción debe incrementar el número de especies moleculares en la unión debido a la liberación de agua de solvatación de ambas moléculas. Por lo tanto, se puede esperar un incremento en la entropía para la interacción!<sup>32)</sup>.

ξ

i *ETcanwio* de entropía positivo (+AS ) probablemente resultó de uniones hidrofóbicas en el cual los grupos no polares de la superficie de las moléculas de la albúmina y de la T514 se mantienen juntos, por lo tanto reducen el contacto con el agua. La exclusión del agua de los iones de T514 y de las cadenas laterales de la proteína alinea los sitios de unión y mantiene las dos superficies muy juntas y así facilita la formación de las distancias apropiadas para la formación de los puentes de hidrógeno. Se ha mostrado experimentalmente que las interacciones hidrofóbicas mejoran la formación de puentes de hidrógeno<sup>34</sup>). Así un cambio de entalpía negativo (-AH) y un cambio de entropía positivo (+AS) sugieren que las interacciones se llevan a cabo por uniones hidrofóbicas y por puentes de hidrógeno<sup>33, 34</sup>. Lo anterior se ha mostrado experimentalmente que ocurren juntos<sup>37</sup>). Por otra parte la molécula de T514 forma puentes de hidrógeno internos muy fuertes (entre los hidrógenos de los OH de los carbonos 9 y 9' y los grupos carbonilo); esto se puede observar en el hecho de que en los espectros de resonancia magnética de hidrógeno (RMN, <sup>1</sup>H) aparecen señales muy desplazadas (16.1 y 16.4 ppm), producto de la existencia de puentes de hidrógeno; esto apoya las conclusiones tentativas de que las interacciones con las moléculas de albúmina se llevan a cabo por puentes de hidrógeno.

Por otra parte, un valor del cambio de entropía cercano al cero parece indicar que las uniones hidrofóbicas no operan<sup>28</sup>). Esto se puede sugerir en los casos de las interacciones de la T514 tanto con la ASB en los sitios N2 a pH de 7.4 como con la ASH en los sitios N2 a pH de 7.2 (Tabla 55). Tomando en consideración el valor del AH para los casos anteriores, se sugiere que las interacciones entre la Peroxisomicina A1 y la ASB y la ASH bajo esta condición experimental se llevan a cabo principalmente por medio de puentes de hidrógeno,

Se puede postular también que las interacciones de la T514 con la ASB a pH de 7.2 y con la ASH a pH 7.4 se establecen a través de fuerzas de Van der Waals, ya que un valor del cambio de entropía negativo es indicativo de ello (-AS)<sup>3h</sup> (Tabla 55).

**TABLA 55. PARAMETROS TERMODINAMICAS DE LA UNION:  
T514-ASB Y T514-ASH**

		ASB		ASH	
		pH 7.2	pH 7.4	pH 7.2	pH 7.4
AG (Kcal mol <sup>-1</sup> )	NI	-6.585	-7.766	-7.348	-7.995
	N2	-5.980	-7.084	-6.764	-7.097
AH (Kcal mol <sup>-1</sup> )	NI	-8.149	-2.551	-4.631	-13.040
	N2	-7.896	-6.635	-6.443	-7.625
AS (u.e.)	NI	-5.246	+17.503	+9.116	-16.931
	N2	-6.429	+1.522	+0.977	-1.772

En cualquier caso, está claro que los parámetros termodinámicos no proveen un criterio de diagnóstico para escoger entre los tipos de fuerzas involucradas en la unión de los ligandos por las proteínas. Los valores termodinámicos no dependen de detalles moleculares. El mecanismo molecular debe armonizar con los datos termodinámicos, o ellos deben proporcionar una base para el mecanismo. Sin embargo, los datos termodinámicos por sí mismos no pueden seleccionarse entre las alternativas para una explicación molecular consistente<sup>38</sup>. Por lo tanto, el mecanismo exacto de la unión de la Peroxisomicina A1 a los dos tipos de albúmina (ASB y ASH) no puede ser elucidado a través de este estudio. Sin embargo, se pueden hacer ciertas conclusiones tentativas.

## CAPITULO 5

### CONCLUSIONES

La T514 (Peroxisomicina A1) interacciona fuertemente tanto con la ASB como con la ASH, como lo podemos constatar por el valor de las constantes de afinidad del orden de  $10^6$ , con lo que se acepta la hipótesis de trabajo.

Las moléculas de albúmina tienen dos tipos de sitios de unión: N1 con 3 sitios iguales y N2 con 5 sitios de unión de iguales características. Los sitios N2 tienen constantes de afinidad más débiles que los N1.

Además, los sitios de unión tienen parámetros termodinámicos diferentes para la ASB y la ASH lo cual sugiere diferencias en las regiones implicadas en ambas moléculas.

La T514 interacciona con la albúmina sérica humana de forma más fuerte que como lo hace con la albúmina sérica bovina.

La interacción de la T514 con las albúminas a pH 7.4 es más fuerte que a pH 7.2.

Al aumentar la temperatura en el sistema de estudio, la fuerza de la interacción disminuye.

## CAPITULO 5

### CONCLUSIONES

La T514 (Peroxisomicina A1) interacciona fuertemente tanto con la ASB como con la ASH, como lo podemos constatar por el valor de las constantes de afinidad del orden de  $10^6$ , con lo que se acepta la hipótesis de trabajo.

Las moléculas de albúmina tienen dos tipos de sitios de unión: NI con 3 sitios iguales y N2 con 5 sitios de unión de iguales características. Los sitios N2 tienen constantes de afinidad más débiles que los NI.

Además, los sitios de unión tienen parámetros termodinámicos diferentes para la ASB y la ASH lo cual sugiere diferencias en las regiones implicadas en ambas moléculas.

La T514 interacciona con la albúmina sérica humana de forma más fuerte que como lo hace con la albúmina sérica bovina.

La interacción de la T514 con las albúminas a pH 7.4 es más fuerte que a pH 7.2.

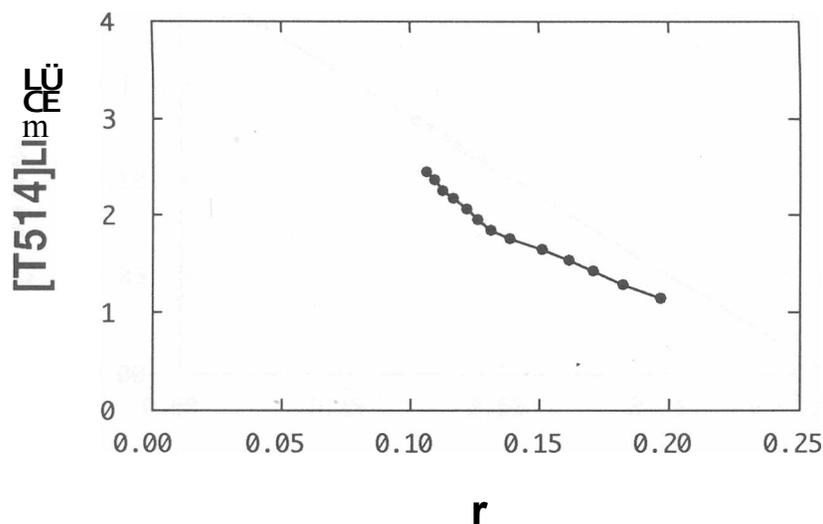
Al aumentar la temperatura en el sistema de estudio, la fuerza de la interacción disminuye.

## **RECOMENDACIONES**

Si bien he cumplido con los objetivos propuestos, considero que será de interés continuar los estudios para comprender más acerca de las interacciones de la T514 con las albúminas y realizar futuras investigaciones al respecto, como son:

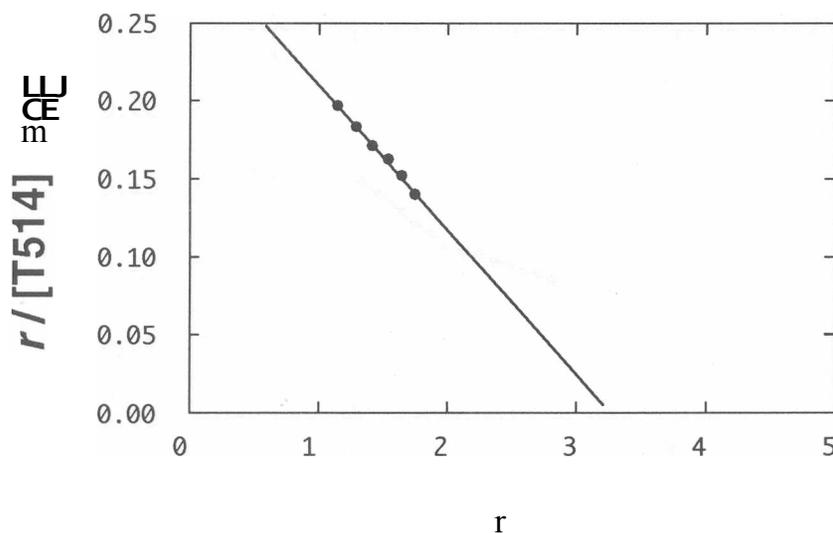
- a) . Estudios de competitividad con otros fármacos para establecer el tipo de sitios de unión en las moléculas de albúmina con los que la T514 interacciona.
- b) . Estudio de la interacción de la T514 con otras macromoléculas como la enzima catalasa (esto por la acción que tiene la T514 de inhibir la actividad de dicha enzima).
- c) . Estudio de las interacciones de la T514 con el ADN.

Consecutivamente se graficaron los valores de  $r / [T514]_{libre}$  en función de  $r$ , de lo que resultó una curva con dos tendencias lineales.

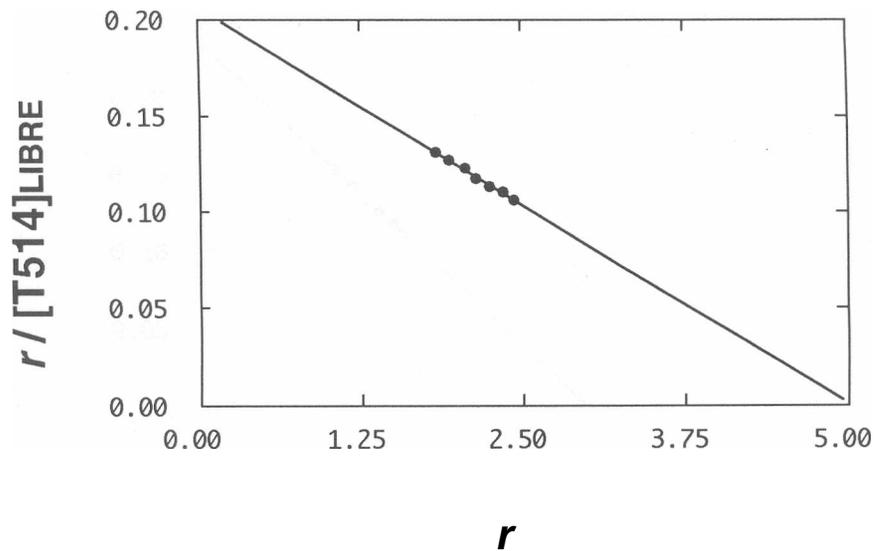


**Figura 21. Gráfica de Scatchard de la unión de T514 con ASB: pH 7.2 y 15 °C.**

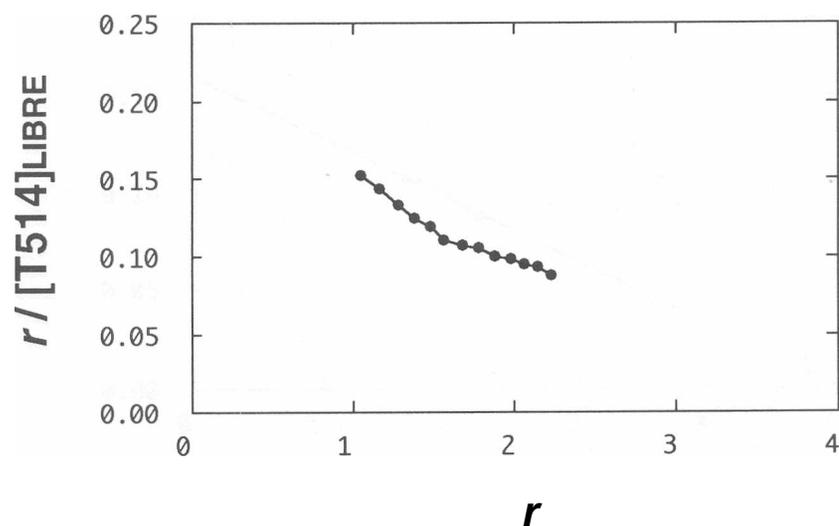
Cada tendencia se trató independientemente. De cada una de ellas se obtuvo una recta con pendiente negativa ( $-K_a$ ) y de intercepto en la abscisa ( $N$ ). Los valores de  $N$  y de  $K_a$  para cada caso se muestran en las Tablas 24 y 25.



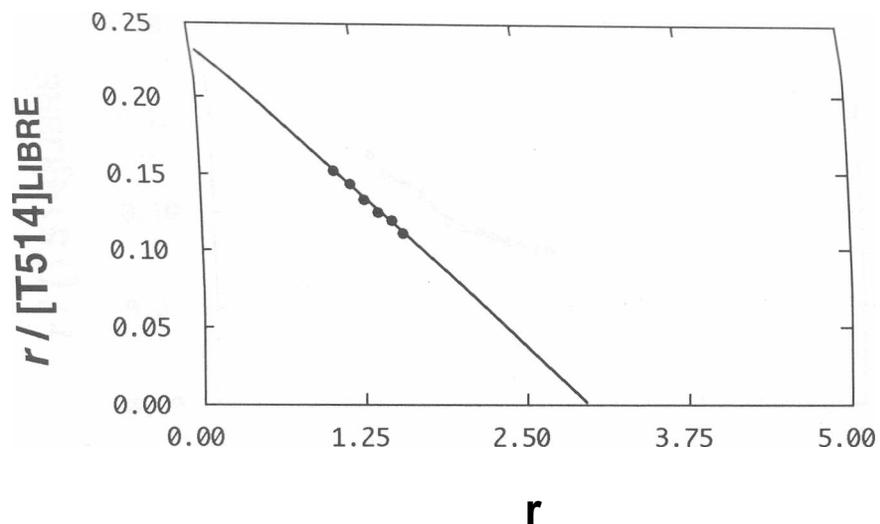
**Figura 22. Gráfica de Scatchard de la unión de T514 con ASB en NI: pH 7.2 y 15 °C. La línea sólida fue obtenida por análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados,  $r^2 = 0.998$ .**



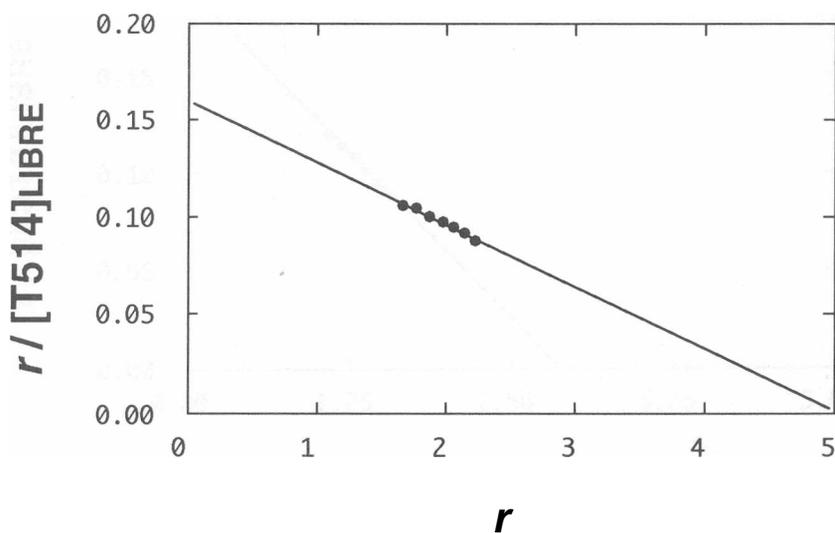
**Figura 23. Gráfica de Scatchard de la unión de T514 con ASB en N<sub>2</sub>: pH7.2y 15 °C. La línea sólida fue obtenida por análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados,  $r^2 = 0.997$ .**



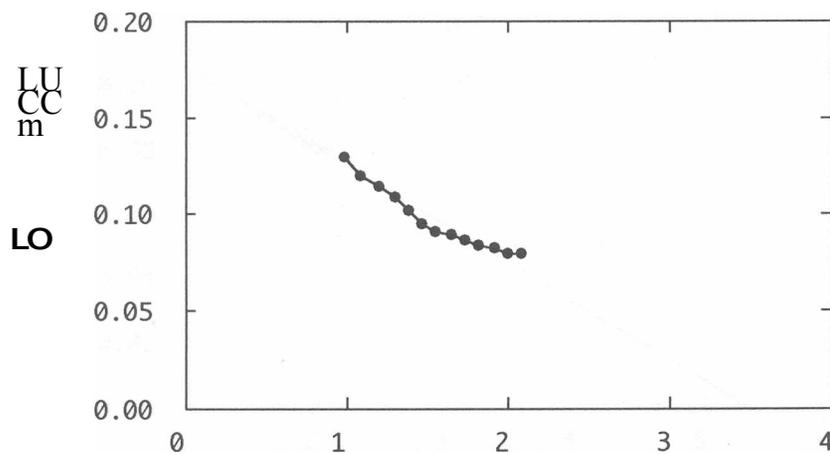
**Figura 24. Gráfica de Scatchard de la unión de T514 con ASB: pH 7.2 y 20 °C.**



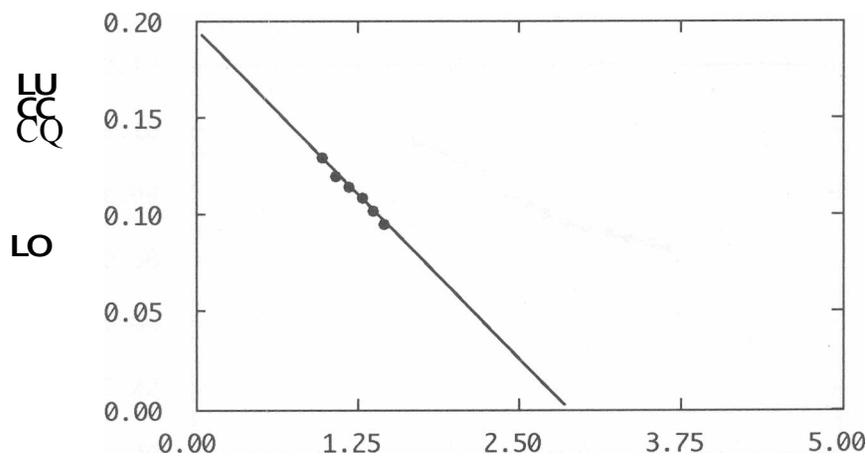
**Figura 25. Gráfica de Scatchard de la unión de T514 con la ASB en NI: pH 7.2 y 20 °C. La línea sólida fue obtenida por análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados,  $r^2 = 0.997$ .**



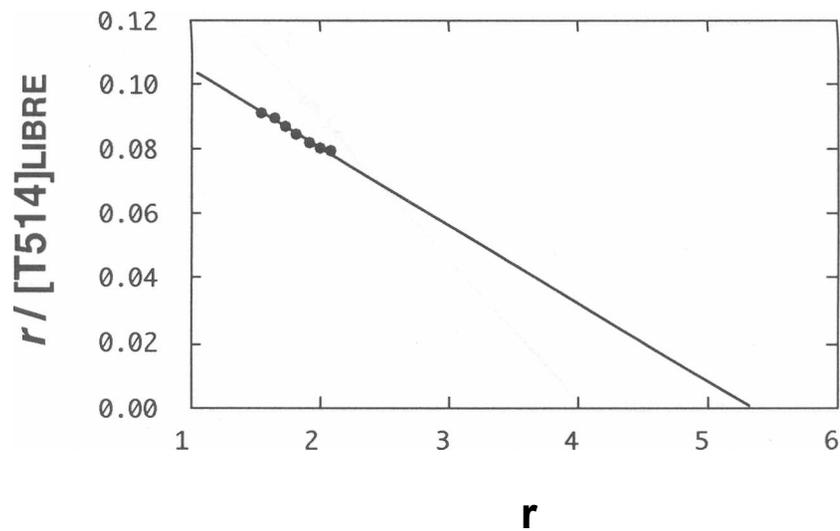
**Figura 26. Gráfica de Scatchard de la unión de T514 con ASB en N2: pH 7.2 y 20 °C. La línea continua fue obtenida por análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados,  $r^2 = 0.987$ .**



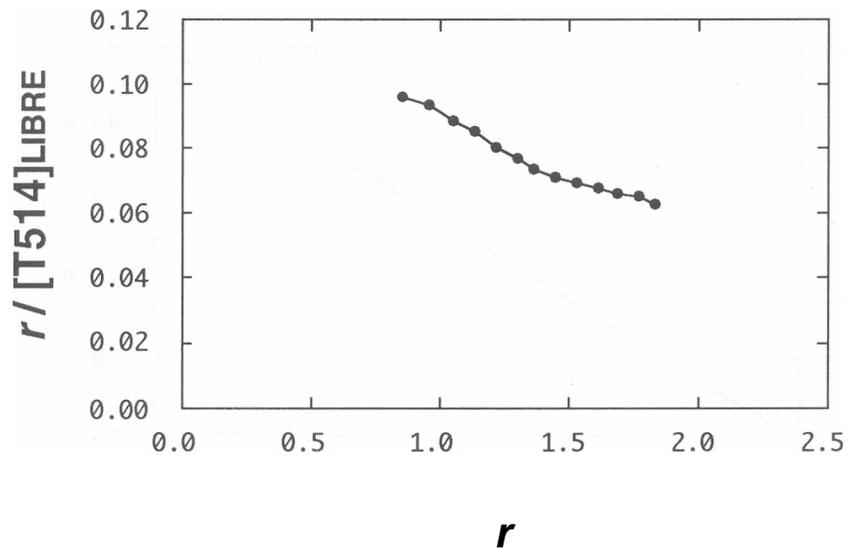
**Figura 27. Gráfica de Scatchard de la unión de T514 con ASB: pH 7.2 y 25 °C.**



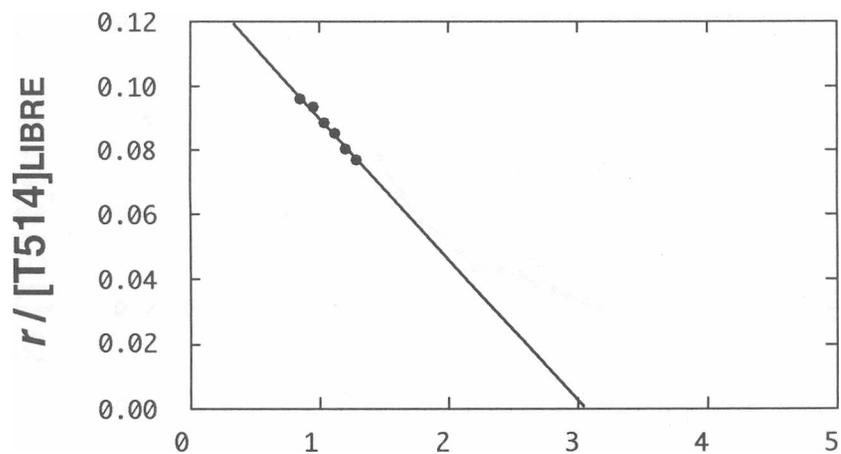
**Figura 28. Gráfica de Scatchard de la unión de T514 con ASB en NI: pH 7.2 y 25 °C. La línea continua fue obtenida por análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados,  $r^2 = 0.993$ .**



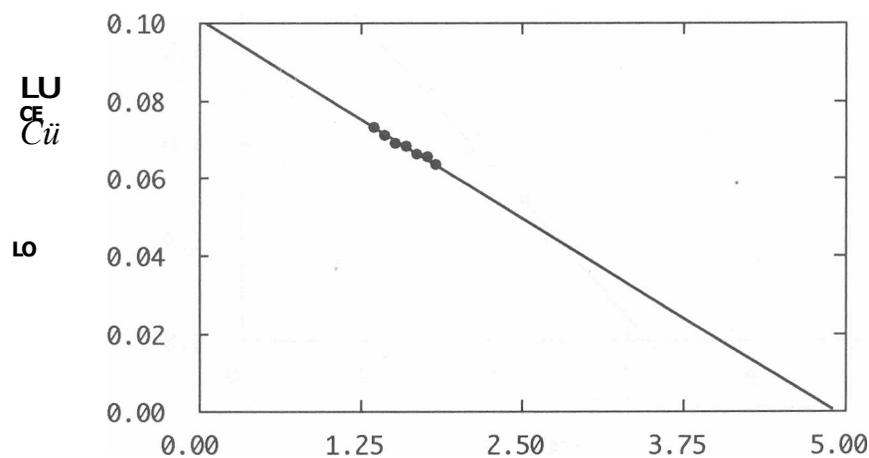
**Figura 29. Gráfica de Scatchard de la unión de T514 con ASB en N2: pH 7.2 y 25 °C. La línea continua fue obtenida por análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados,  $r^2 = 0.990$ .**



**Figura 30. Gráfica de Scatchard de la unión de la T514 con ASB: pH 7.2 y 30 °C.**



**Figura 31. Gráfica de Scatchard de la unión de T514 con ASB en NI: pH 7.2 y 31 °C. La línea continua fue obtenida por análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados,  $r^2 = 0.992$ .**



**Figura 32. Gráfica de Scatchard de la unión de T514 con ASB en N2: pH 7.2 y 30 °C. La línea continua fue obtenida por análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados,  $r^2 = 0.990$ .**

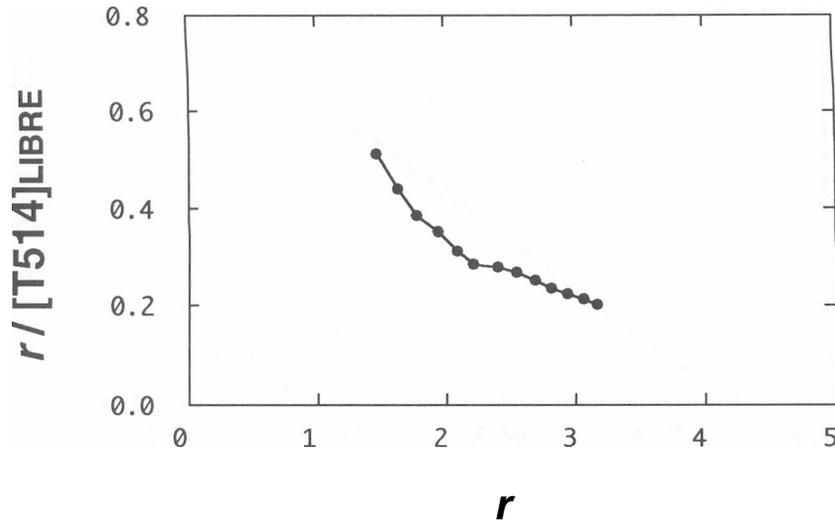


Figura 33. Gráfica de Scatchard de la unión de T514 con ASH: pH 7.2 y 20 °C.

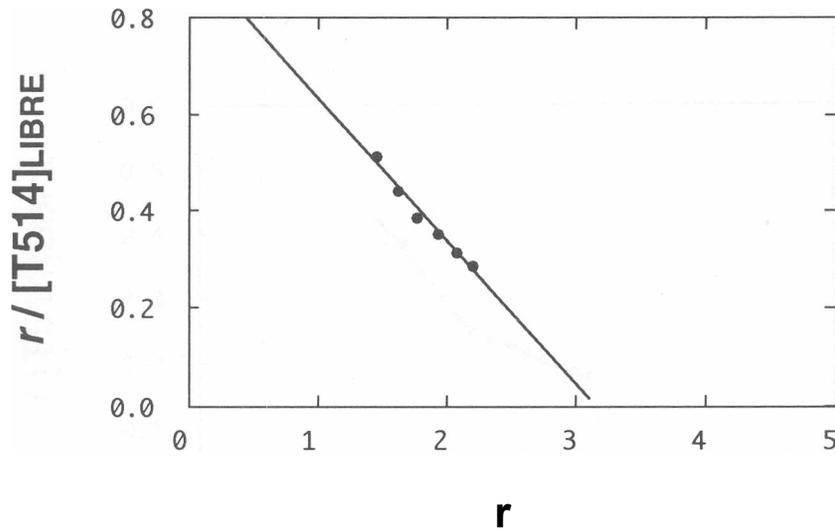
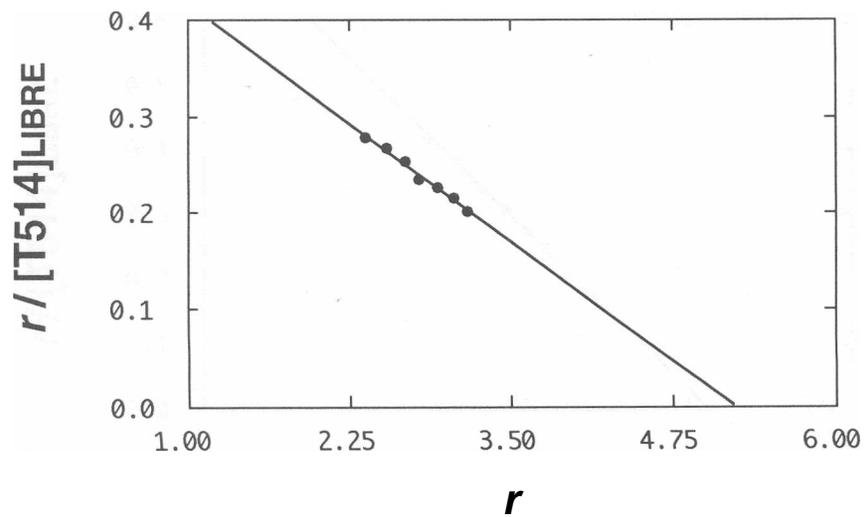
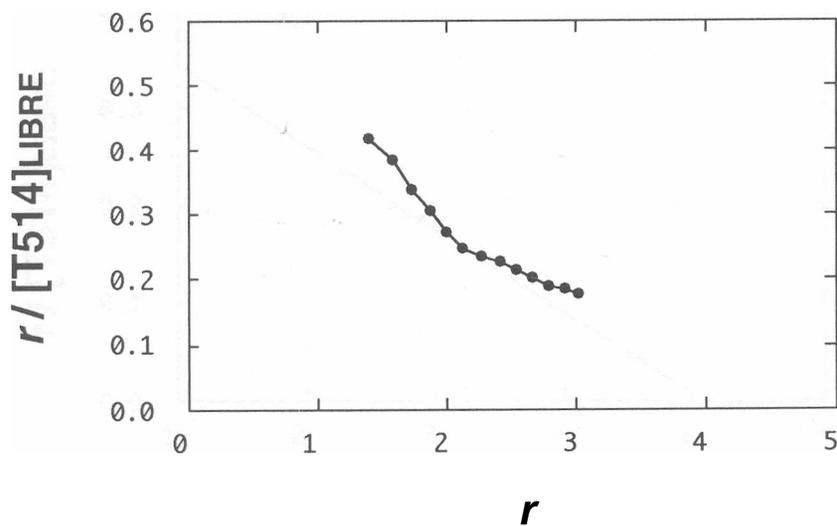


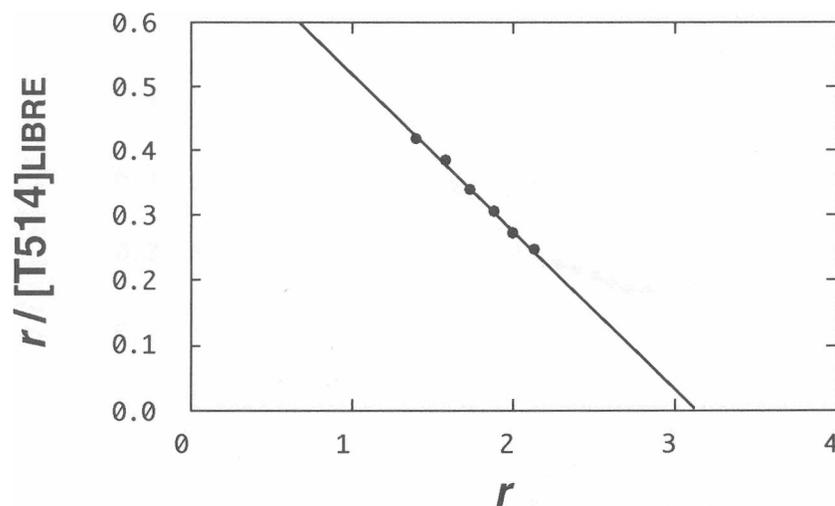
Figura 34. Gráfica de Scatchard de la unión de T514 con ASH en NI: pH 7.2 y 20 °C. La línea continua fue obtenida por análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados,  $r^2 = 0.982$ .



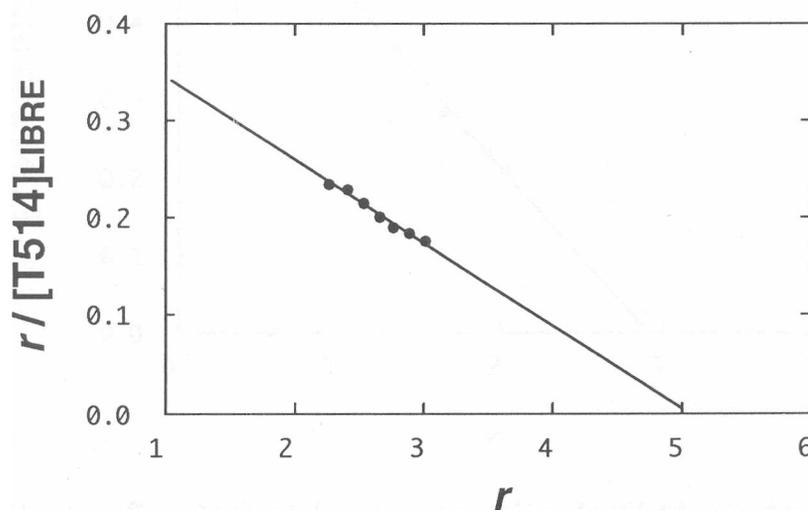
**Figura 35. Gráfica de Scatchard de la unión de T514 con ASH en N<sub>2</sub>: pH 7.2 y 20 °C. La línea continua fue obtenida por análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados,  $r^2 = 0.990$ .**



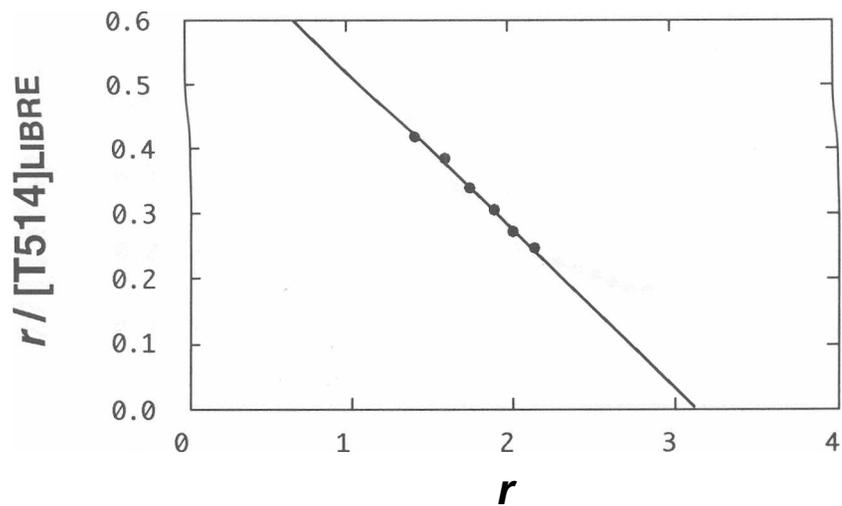
**Figura 36. Gráfica de Scatchard de la unión de T514 con ASH: pH 7.2 y 25 °C.**



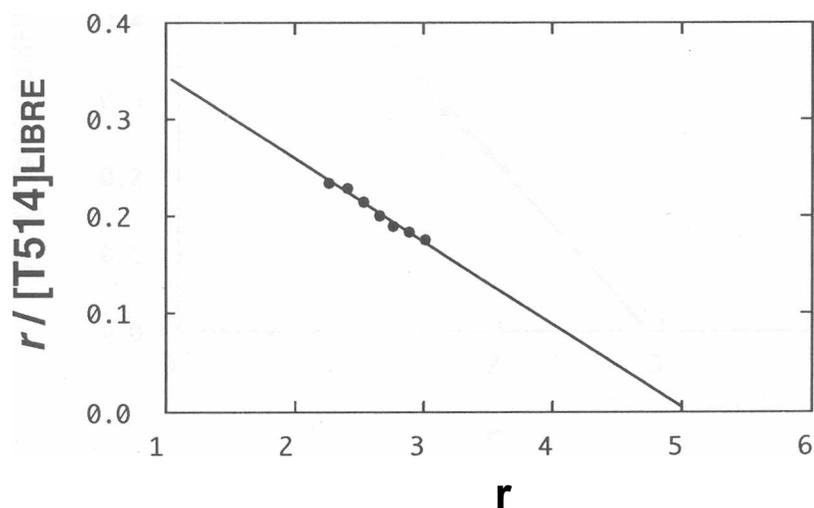
**Figura 37. Gráfica de Scatchard de la unión de T514 con ASH en NI: pH 7.2 y 25 °C. La línea continua fue obtenida por análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados,  $r^2 = 0.996$ .**



**Figura 38. Gráfica de Scatchard de la unión de T514 con ASH en N2: pH 7.2 y 25 °C. La línea continua fue obtenida por análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados,  $r^2 = 0.987$ .**



**Figura 37. Gráfica de Scatchard de la unión de T514 con ASH en NI: pH 7.2 y 25 °C. La línea continua fue obtenida por análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados,  $r^2 = 0.996$ .**



**Figura 38. Gráfica de Scatchard de la unión de T514 con ASH en N2: pH 7.2 y 25 °C. La línea continua fue obtenida por análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados,  $r^2 = 0.987$ .**

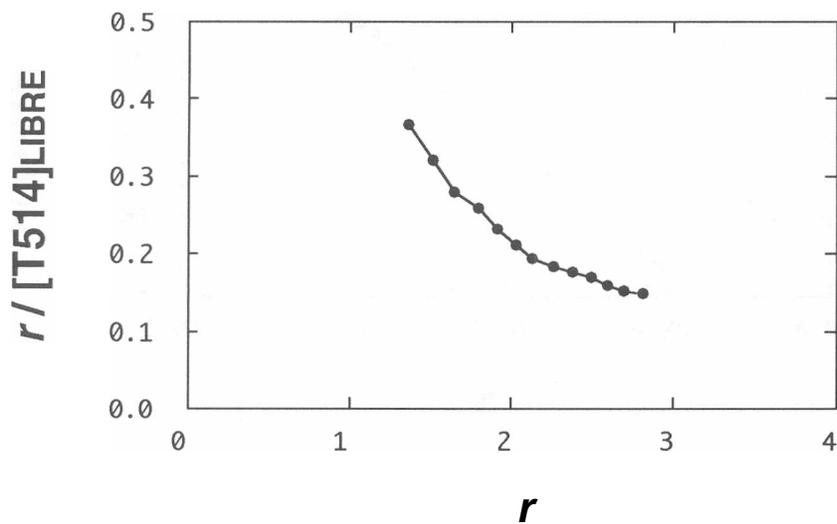


Figura 39. Gráfica de Scatchard de la unión de T514 con ASH: pH 7.2 y 30 °C.

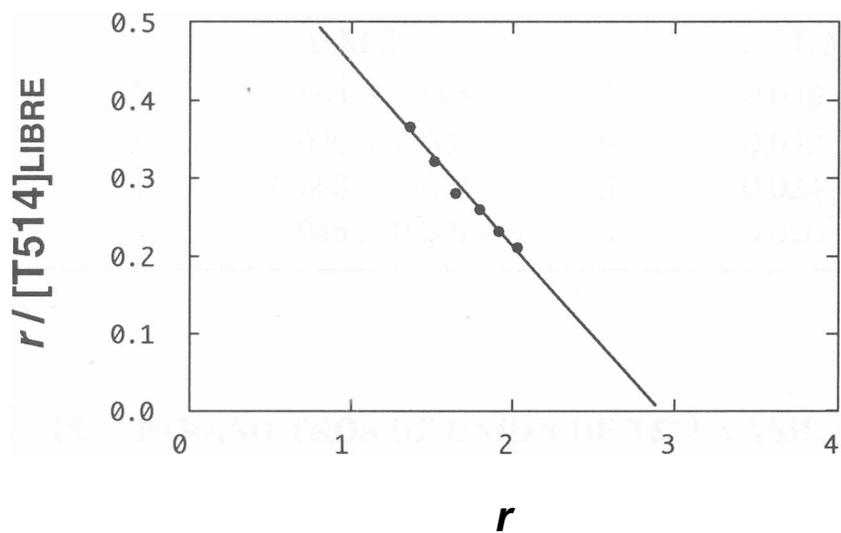
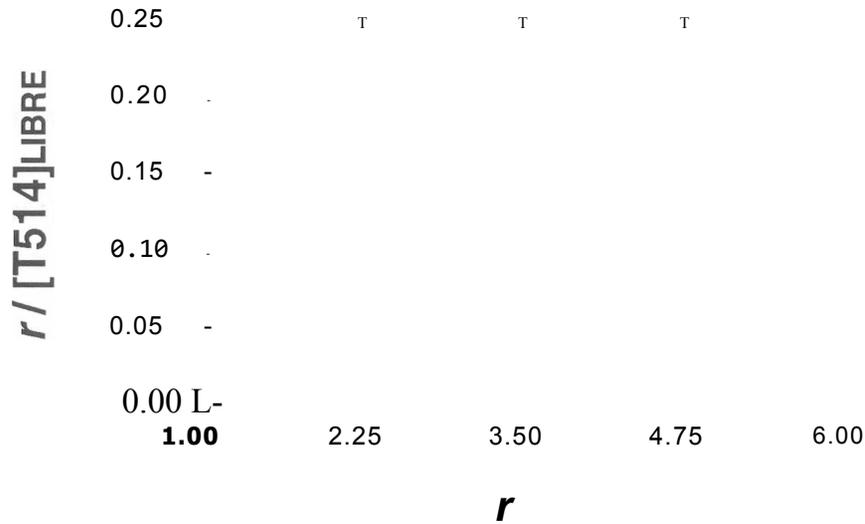


Figura 40. Gráfica de Scatchard de la unión de T514 con ASH en NI: pH 7.2 y 30 °C. La línea continua fue obtenida por análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados,  $r^2 = 0.986$ .



**Figura 41. Gráfica de Scatchard de la unión de T514 con ASH en N2: pH 7.2 y 30 °C. La línea continua fue obtenida por análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados,  $r^2 = 0.995$ .**

**TABLA 24. PARAMETROS DE UNION DE T514 A ASB: pH 7.2**

TEMPERATURA	NI	Ka1 x 10 <sup>6</sup>	N2	Ka2 x 10 <sup>6</sup>
°C		L MoU <sup>1</sup>		L Mol <sup>1</sup>
15	3	0.094 ± 0.005	5	0.039 ± 0.002
20	3	0.079 ± 0.003	5	0.032 ± 0.003
25	3	0.068 ± 0.006	5	0.024 ± 0.002
30	3	0.045 ± 0.001	5	0.020 ± 0.001

**TABLA 25. PARAMETROS DE UNION DE T514 A ASH: pH 7.2**

TEMPERATURA	NI	Ka1 x 10 <sup>6</sup>	N2	Ka2 x 10 <sup>6</sup>
°C		L Mol <sup>1</sup>		L Mol <sup>1</sup>
20	3	0.295 ± 0.001	5	0.112 ± 0.003
25	3	0.246 ± 0.002	5	0.087 ± 0.001
30	3	0.176 ± 0.005	5	0.055 ± 0.003

### 3.2.3 DETERMINACION DE LOS PARAMETROS TERMO DINAMICOS DEL SISTEMA T514-ALBUMINA.

Con los datos de los valores de las constantes de unión (Tablas 24 y 25) se obtuvieron los valores del Cambio de Energía Libre de Gibbs; el cambio de entalpia se obtuvo de gráficas de Van't Hoff, Figuras 42 y 43. Los parámetros termodinámicos de los sistemas T514-ASB Y T514-ASH se resumen en las Tablas 26 y 28.

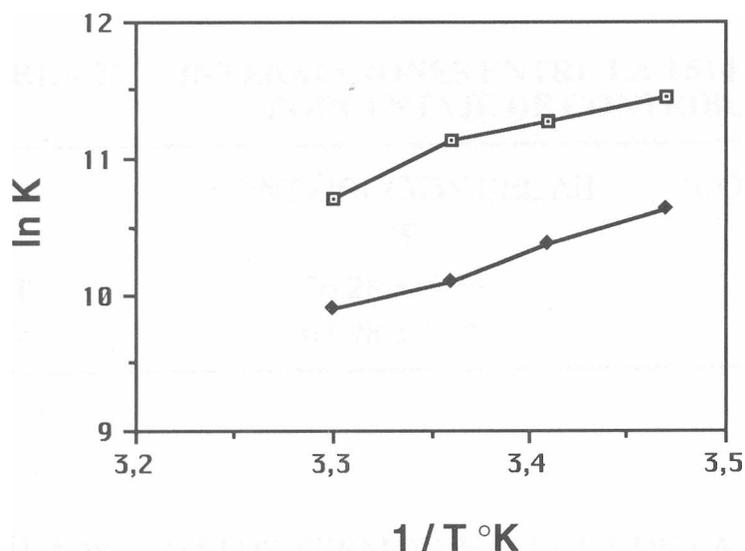


Figura 42. Gráfica de Van 't Hoff para la unión de T514 a la ASB, pH 7.2.

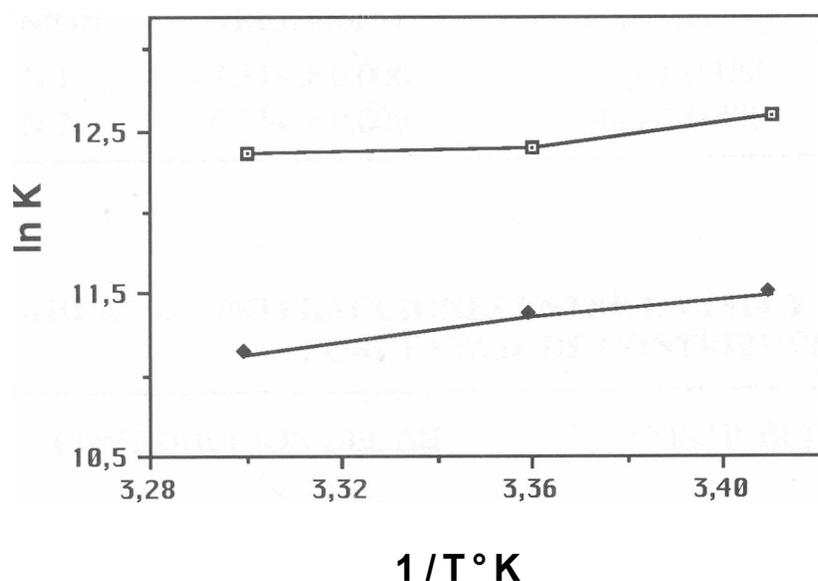


Figura 43. Gráfica de Van 't Hoff para la unión de T514 a la ASH, pH 7.2.

**TABLA 26. DATOS TERMODINAMICAS DE LA UNION DE LA T514  
CON LA ASB A 25 °C Y pH 7.2**

TIPO DE SITIO DE UNION	AG (Kcal Mol <sup>-1</sup> )	AH (Kcal Mol <sup>-1</sup> )	AS (ue)
NI	- 6.585 ± 0.049	-8.149 + 0.451	-5.246 ±1.416
N2	- 5.980 ± 0.053	- 7.896 ± 0.466	-6.429 ±1.479

**TABLA 27. INTERACCIONES ENTRE LA T514 Y LA ASB: pH 7.2  
PORCENTAJE DE CONTRIBUCION AL AG**

	CONTRIBUCION DEL AH % %	CONTRIBUCION DEL AS
NI	76.28 ± 6.33	23.72 ± 6.33
N2	67.98 ± 7.25	32.02 ± 7.25

**TABLA 28. DATOS TERMODINAMICOS DE LA UNION DE LA T514  
CON LA ASHA 25 °C Y pH 7.2**

TIPO DE SITIO DE UNION	AG (Kcal Mol <sup>-1</sup> )	AH (Kcal Mol <sup>-1</sup> )	AS (ue)
NI	- 7.348 ±0.006	-4.631 ±0.188	+9.116 ±0.651
N 2	- 6.734 ± 0.009	- 6.443 ± 0.400	+ 0.977 ± 1.347

**TABLA 29. INTERACCIONES ENTRE LA T514 Y LA ASH: pH 7.2  
PORCENTAJE DE CONTRIBUCION AL AG**

	CONTRIBUCION DEL AH % %	CONTRIBUCION DEL AS
NI	63.03 ± 2.61	36.97 ± 2.61
N2	95.05 ±5.18	5.18 ±4.95

### 3.3 ESTUDIO *IN VITRO* DE LA UNIÓN DE LA T514 CON LA ALBUMINA SERICA BOVINA Y CON LA ALBUMINA SERICA HUMANA A pH 7.4.

#### 3.3.1 ESTUDIO DEL EQUILIBRIO DE LA UNIÓN DE LA T514 CON LA ALBUMINA.

##### 3.3.1.1 Titulación de la albúmina con T514 a pH 7.4.

La titulación de las albúminas se realizó a 4 temperaturas: 15, 20, 25 y 30 °C. Los resultados se observan en las columnas 1 y 2 de las Tablas de la 41 hasta 47.

Con los datos de las titulaciones se graficaron los valores de los cambios de absorbancia (AAbs) en función de los valores de las concentraciones de T514 para cada sistema: T514-ASB y T514-ASH, Figuras 44 a la 50.

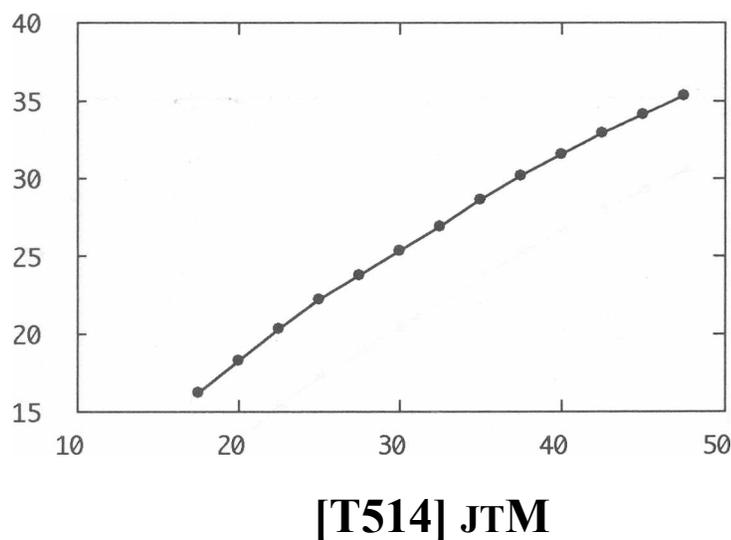


Figura 44. Curva de titulación de la ASB (10  $\mu$ M) con T514: pH 7.4 y 15 °C.

### 3.3 ESTUDIO *IN VITRO* DE LAS INTERACCIONES DE LA PEROXISOMICINA AI CON LA ALBUMINA SERICA BOVINA Y CON LA ALBUMINA SERICA HUMANA A pH 7.4.

#### 3.3.1 ESTUDIO DEL EQUILIBRIO DE LA UNION DE LA T514 CON LA ALBUMINA.

##### 3.3.1.1 Titulación de la albúmina con T514 a pH 7.4.

La titulación de las albúminas se realizó a 4 temperaturas: 15, 20, 25 y 30 °C. Los resultados se observan en las columnas 1 y 2 de las Tablas de la 41 hasta 47.

Con los datos de las titulaciones se graficaron los valores de los cambios de absorbancia (AAbs) en función de los valores de las concentraciones de T514 para cada sistema: T514-ASB y T514-ASH, Figuras 44 a la 50.

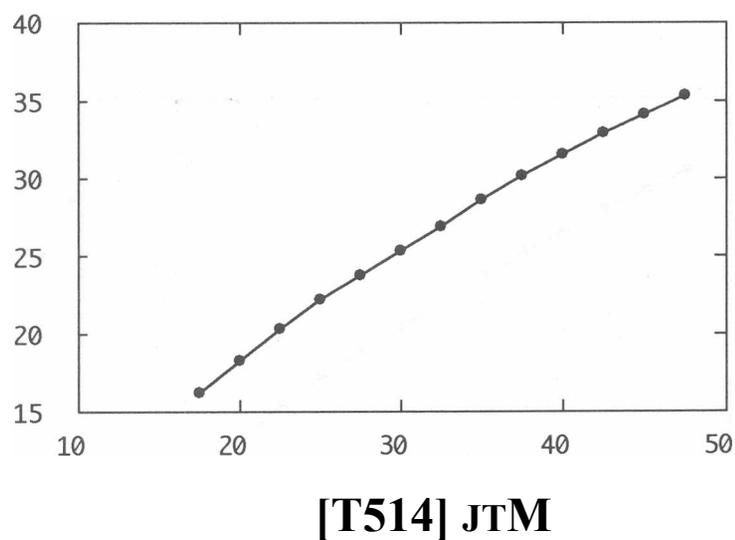


Figura 44. Curva de titulación de la ASB (10  $\mu$ M ) con T514: pH 7.4 y 15 °C.

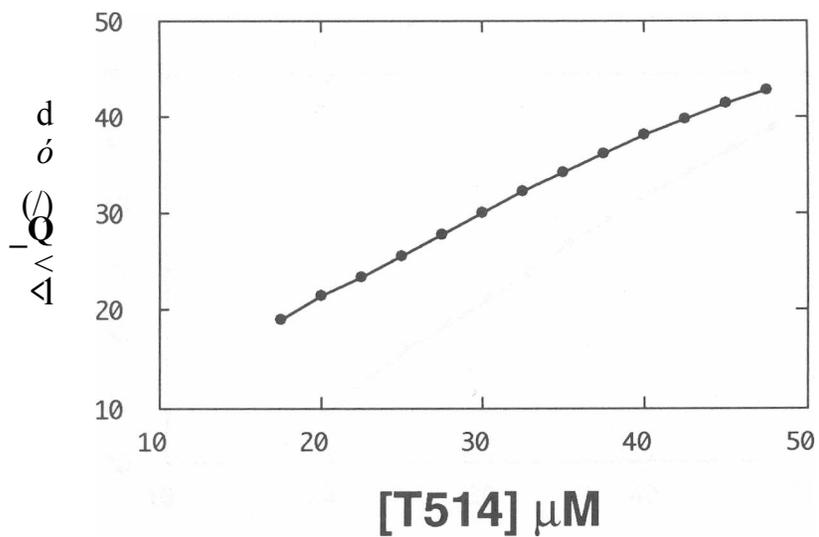


Figura 45. Curva de titulación de la ASB (10 μM) con T514: pH 7.4 y 20 °C.

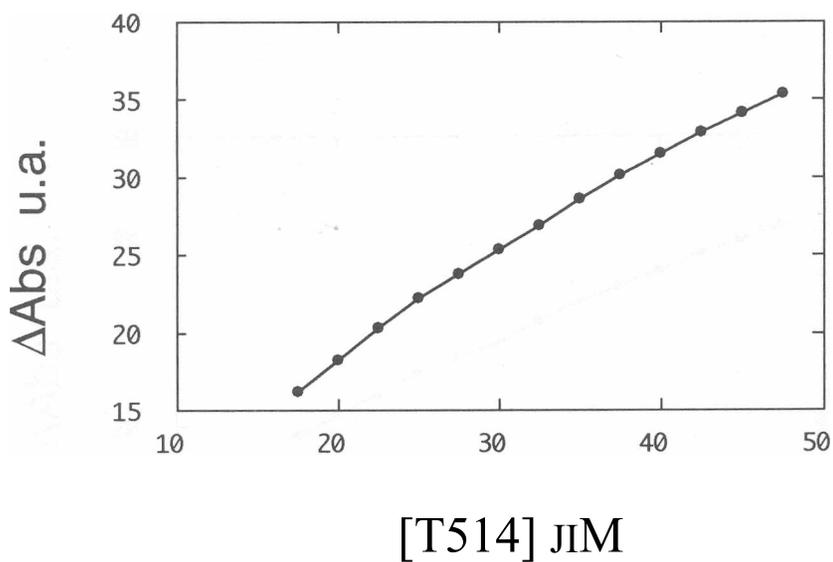


Figura 46. Curva de titulación de la ASB (10 μM) con T514: pH 7.4 y 25 °C.

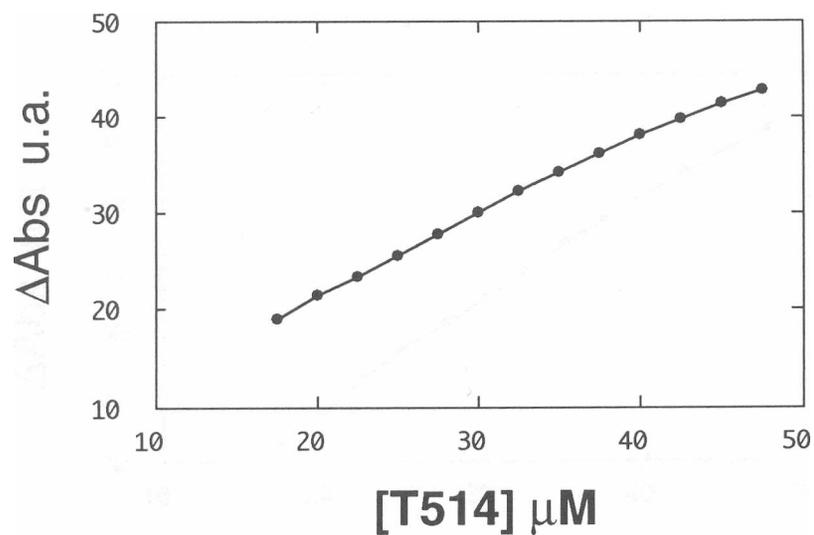


Figura 45. Curva de titulación de la ASB (10  $\mu\text{M}$ ) con T514: pH 7.4 y 20 °C.

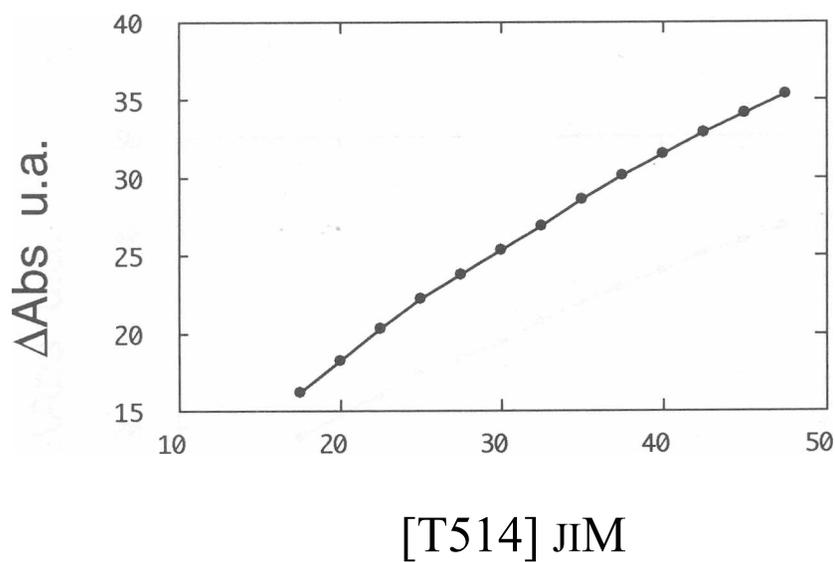


Figura 46. Curva de titulación de la ASB (10  $\mu\text{M}$ ) con T514: pH 7.4 y 25 °C.

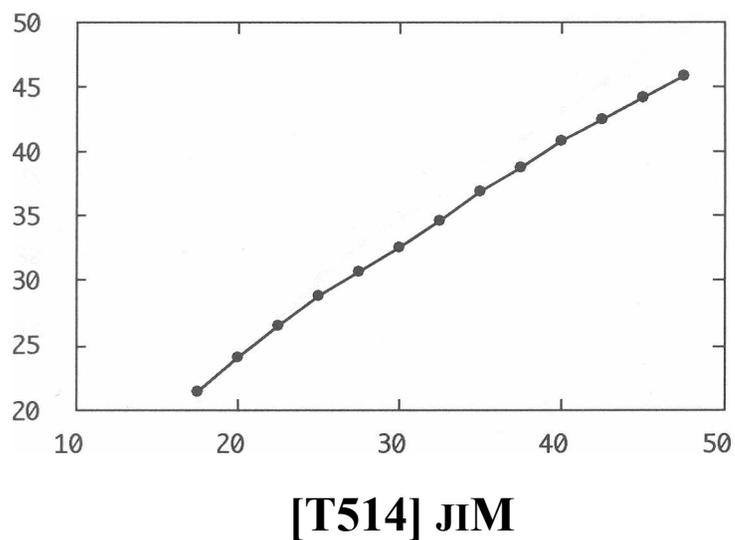


Figura 47. Curva de titulación de la ASB (10 pM) con T514: pH 7.4 y 30 °C.

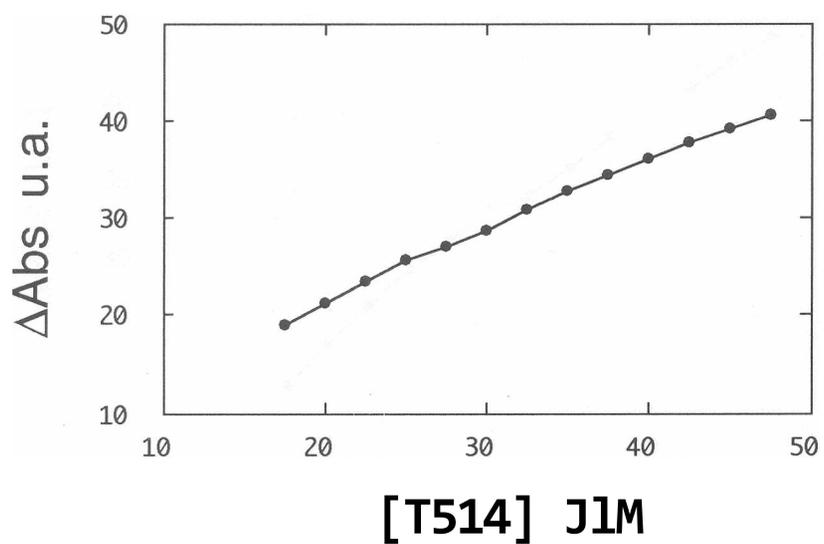


Figura 48. Curva de titulación de la ASH (10 μM) con T514: pH 7.4 y 20 °C.

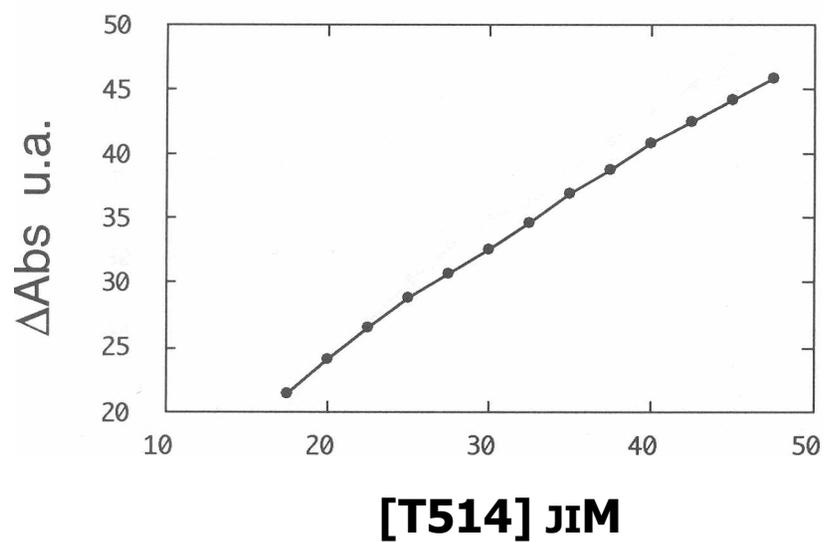


Figura 47. Curva de titulación de la ASB (10 µM) con T514: pH 7.4 y 30 °C.

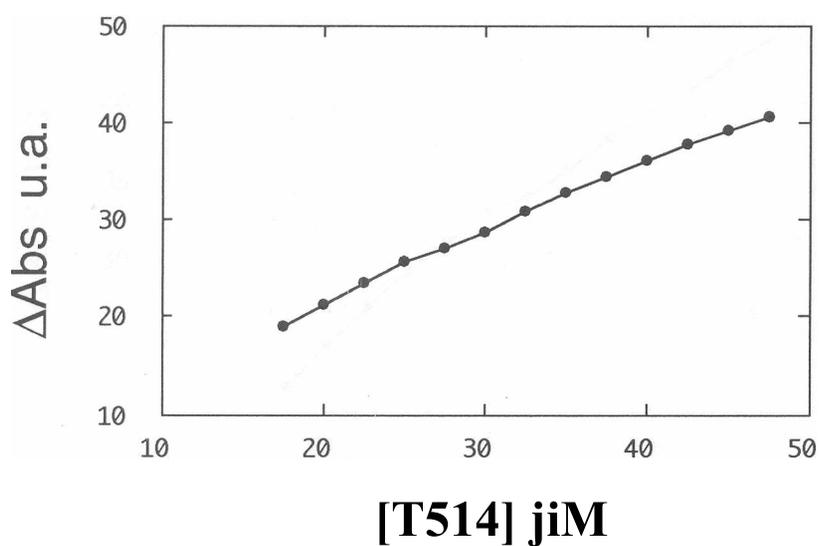


Figura 48. Curva de titulación de la ASH (10 µM) con T514: pH 7.4 y 20 °C.

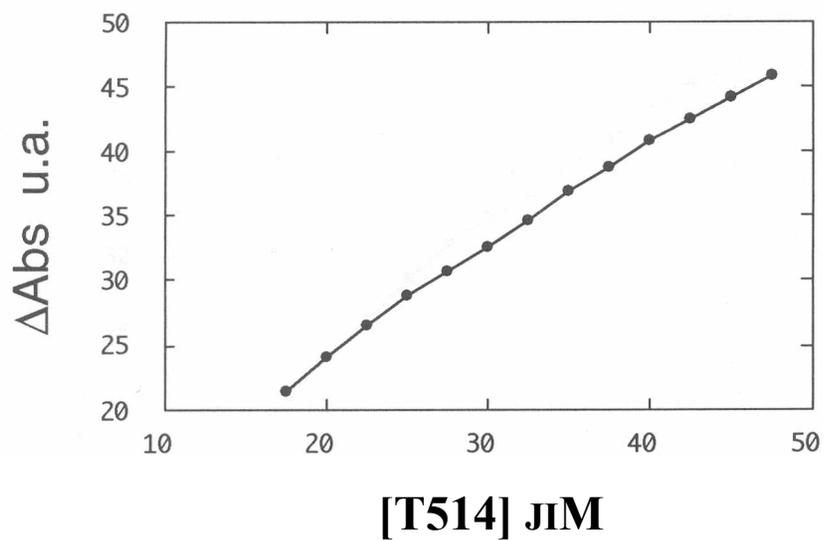


Figura 47. Curva de titulación de la ASB (10 pM) con T514: pH 7.4 y 30 °C.

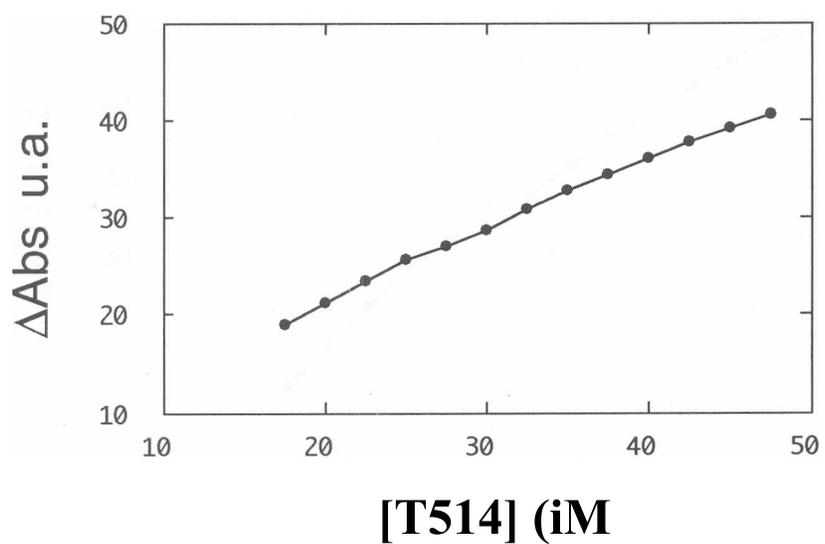


Figura 48. Curva de titulación de la ASH (10 pM) con T514: pH 7.4 y 20 °C.

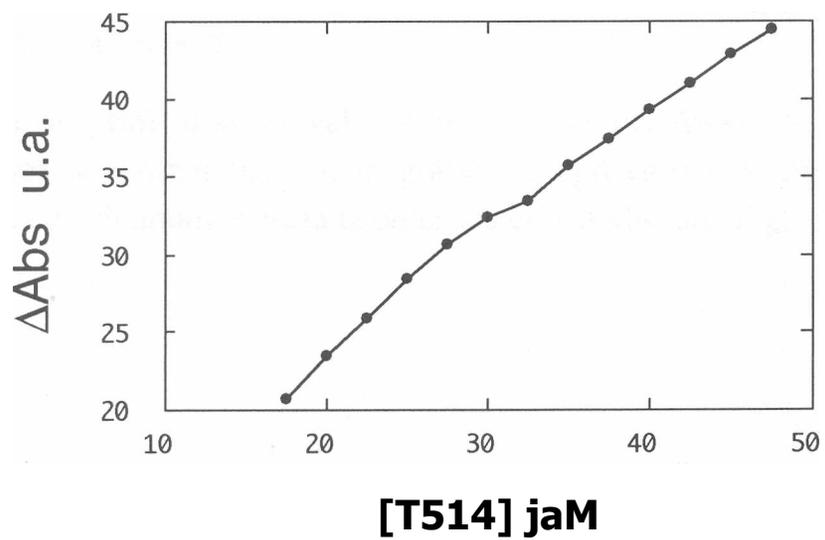


Figura 49. Curva de titulación de la ASH (10 μM) con T514: pH 7.4 y 25 °C.

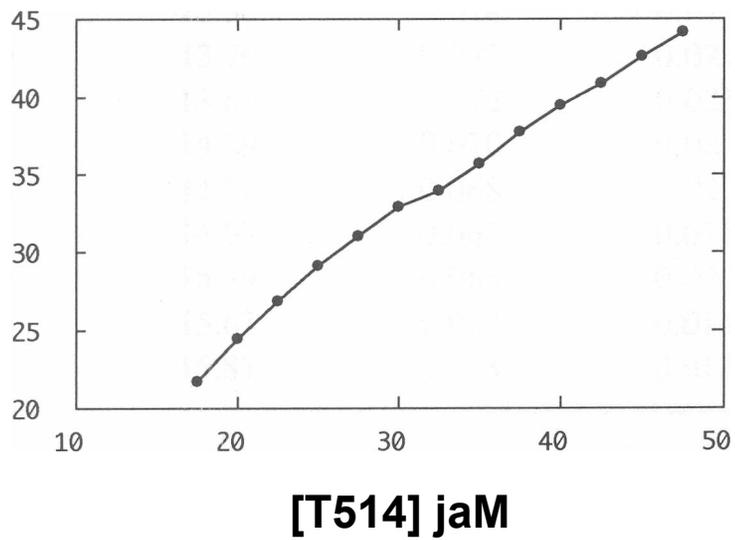


Figura 50. Curva de titulación de la ASH (10 μM) con T514: pH 7.4 y 30 °C.

**^ A A .1 vrñnacÁór\ Aei\ carrocho úfe atosottonúa rt\áx\n\o V^hAiswvfoC) a**  
**pH 7.4.**

Para determinar el AAbsMAX, se fijó la concentración de T514 en 20  $\mu\text{M}$  y la concentración de las albúminas (ASB o ASH) se varió en el intervalo de 20 hasta 60  $\mu\text{M}$  (Tabla 30 a la Tabla 36).

Posteriormente se graficaron los valores inversos de los AAbs en función de los valores inversos de [Albúmina]. Esta gráfica se aproxima a la linealidad a altas concentraciones de albúmina y cruza la ordenada en 1/AAbsmax, Fig. 51 a la Fig. 57.

TABLA 30

AAbs A15 °C Y A pH 7.4 PARA EL SISTEMA T514-ASB

[ASB]	AAbs	1/AAbs	1/[ASB]
20.0	10.99	0.091	0.050
22.5	11.63	0.086	0.044
25.0	12.05	0.083	0.040
27.5	12.50	0.080	0.036
30.0	12.99	0.077	0.033
32.5	13.16	0.076	0.031
35.0	13.52	0.074	0.029
37.0	13.70	0.073	0.027
40.0	13.89	0.072	0.025
42.5	14.29	0.070	0.024
45.0	14.71	0.068	0.022
47.5	14.93	0.067	0.021
50.0	15.39	0.065	0.020
55.0	15.63	0.064	0.018
60.0	15.87	0.063	0.017

### 3.3.1.2 Determinación del cambio de absorbancia máximo (AAbsMAX) a pH 7.4.

Para determinar el AAbsMAX, se fijó la concentración de T514 en 20 pM y la concentración de las albúminas (ASB o ASH) se varió en el intervalo de 20 hasta 60 pM (Tabla 30 a la Tabla 36).

Posteriormente se graficaron los valores inversos de los AAbs en función de los valores inversos de [Albúmina]. Esta gráfica se aproxima a la linealidad a altas concentraciones de albúmina y cruza la ordenada en 1/AAbsmax, Fig. 51 a la Fig. 57.

**TABLA 30**

#### **AAbs A 15 °C Y A pH 7.4 PARA EL SISTEMA T514-ASB**

<b>[ASB]</b>	<b>AAbs</b>	<b>1/AAbs</b>	<b>1/[ASB]</b>
20.0	10.99	0.091	0.050
22.5	11.63	0.086	0.044
25.0	12.05	0.083	0.040
27.5	12.50	0.080	0.036
30.0	12.99	0.077	0.033
32.5	13.16	0.076	0.031
35.0	13.52	0.074	0.029
37.0	13.70	0.073	0.027
40.0	13.89	0.072	0.025
42.5	14.29	0.070	0.024
45.0	14.71	0.068	0.022
47.5	14.93	0.067	0.021
50.0	15.39	0.065	0.020
55.0	15.63	0.064	0.018
60.0	15.87	0.063	0.017

**TABLA 31****AAbs A 20 °C Y A pH 7.4 PARA EL SISTEMA T514-ASB**

<b>[ASB]</b>	<b>AAbs</b>	<b>1/AAbs</b>	<b>1/[ASB]</b>
20.0	11.36	0.088	0.050
22.5	12.05	0.083	0.044
25.0	12.35	0.081	0.040
27.5	13.33	0.075	0.036
30.0	13.51	0.074	0.033
32.5	13.89	0.072	0.031
35.0	14.29	0.070	0.029
37.0	14.93	0.067	0.027
40.0	15.39	0.065	0.025
42.5	15.63	0.064	0.024
45.0	15.87	0.063	0.022
47.5	16.26	0.062	0.021
50.0	16.53	0.061	0.020
55.0	17.24	0.058	0.018
60.0	17.54	0.057	0.017

**TABLA 32****AAbs A 25 °C Y A pH 7.4 PARA EL SISTEMA T514-ASB**


---

<b>[ASB]</b>	<b>AAbs</b>	<b>1/AAbs</b>	<b>1/[ASB]</b>
20.0	11.11	0.090	0.050
22.5	11.91	0.084	0.044
25.0	12.50	0.080	0.040
27.5	13.16	0.076	0.036
30.0	13.70	0.073	0.033
32.5	14.09	0.071	0.031
35.0	14.49	0.069	0.029
37.0	14.93	0.067	0.027
40.0	15.39	0.065	0.025
42.5	15.63	0.064	0.024
45.0	16.13	0.062	0.022
47.5	16.39	0.061	0.021
50.0	16.67	0.060	0.020
55.0	17.54	0.057	0.018
60.0	17.86	0.056	0.017

---

**TABLA 33****AAbs A 30 °C Y A pH 7.4 PARA EL SISTEMA T514-ASB**


---

<b>[ASB]</b>	<b>AAbs</b>	<b>1/AAbs</b>	<b>1/[ASB]</b>
20.0	11.24	0.089	0.050
22.5	12.20	0.082	0.044
25.0	12.66	0.079	0.040
27.5	13.33	0.075	0.036
30.0	13.89	0.072	0.033
32.5	14.58	0.069	0.031
35.0	15.04	0.067	0.029
37.0	15.39	0.065	0.027
40.0	15.87	0.063	0.025
42.5	16.13	0.062	0.024
45.0	16.67	0.060	0.022
47.5	16.95	0.059	0.021
50.0	17.54	0.057	0.020
55.0	18.18	0.055	0.018
60.0	18.52	0.054	0.017

**TABLA 34****AAbs A 20 °C Y A pH 7.4 PARA EL SISTEMA T514-ASH**


---

<b>[ASB]</b>	<b>AAbs</b>	<b>1/AAbs</b>	<b>1/[ASB]</b>
20.0	10.25	0.098	0.050
22.5	11.28	0.089	0.044
25.0	11.81	0.085	0.040
27.5	12.55	0.080	0.036
30.0	13.03	0.077	0.033
32.5	13.20	0.076	0.031
35.0	13.38	0.075	0.029
37.0	13.74	0.073	0.027
40.0	14.13	0.071	0.025
42.5	14.54	0.069	0.024
45.0	14.75	0.068	0.022
47.5	15.20	0.066	0.021
50.0	15.92	0.063	0.020
55.0	16.17	0.062	0.018
60.0	16.44	0.061	0.017

---

**TABLA 35****AAbs A 25 °C Y A pH 7.4 PARA EL SISTEMA T514-ASH**

---

<b>[ASB]</b>	<b>AAbs</b>	<b>1/AAbs</b>	<b>1/[ASB]</b>
20.0	10.32	0.097	0.050
22.5	11.12	0.090	0.044
25.0	12.21	0.082	0.040
27.5	12.67	0.079	0.036
30.0	13.00	0.077	0.033
32.5	13.34	0.075	0.031
35.0	13.71	0.073	0.029
37.0	14.09	0.071	0.027
40.0	14.72	0.068	0.025
42.5	15.16	0.066	0.024
45.0	15.40	0.065	0.022
47.5	16.14	0.062	0.021
50.0	16.40	0.061	0.020
55.0	16.96	0.059	0.018
60.0	17.25	0.058	0.017

---

**TABLA 36****AAbs A 30 °C Y A pH 7.4 PARA EL SISTEMA T514-ASH**

---

<b>[ASB]</b>	<b>AAbs</b>	<b>1/AAbs</b>	<b>1/[ASB]</b>
20.0	10.55	0.095	0.050
22.5	11.54	0.087	0.044
25.0	12.23	0.082	0.040
27.5	13.23	0.076	0.036
30.0	13.54	0.074	0.033
32.5	13.91	0.072	0.031
35.0	14.13	0.071	0.029
37.0	14.49	0.069	0.027
40.0	14.95	0.067	0.025
42.5	15.91	0.063	0.024
45.0	16.16	0.062	0.022
47.5	16.70	0.060	0.021
50.0	17.27	0.058	0.020
55.0	17.57	0.057	0.018
60.0	17.89	0.056	0.017

---

**TABLA 35****AAbs A 25 °C Y A pH 7.4 PARA EL SISTEMA T514-ASH**


---

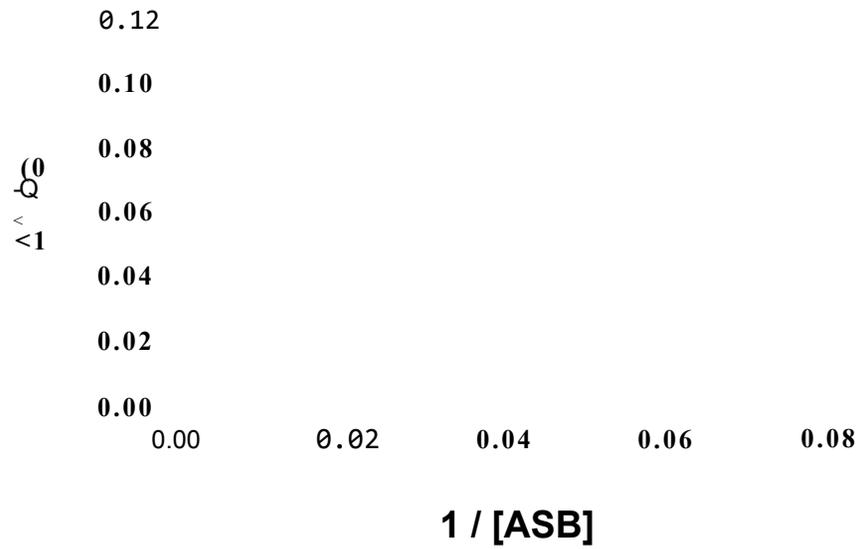
<b>[ASB]</b>	<b>AAbs</b>	<b>1/AAbs</b>	<b>1/[ASB]</b>
20.0	10.32	0.097	0.050
22.5	11.12	0.090	0.044
25.0	12.21	0.082	0.040
27.5	12.67	0.079	0.036
30.0	13.00	0.077	0.033
32.5	13.34	0.075	0.031
35.0	13.71	0.073	0.029
37.0	14.09	0.071	0.027
40.0	14.72	0.068	0.025
42.5	15.16	0.066	0.024
45.0	15.40	0.065	0.022
47.5	16.14	0.062	0.021
50.0	16.40	0.061	0.020
55.0	16.96	0.059	0.018
60.0	17.25	0.058	0.017

**TABLA 36****AAbs A 30 °C Y A pH 7.4 PARA EL SISTEMA T514-ASH**

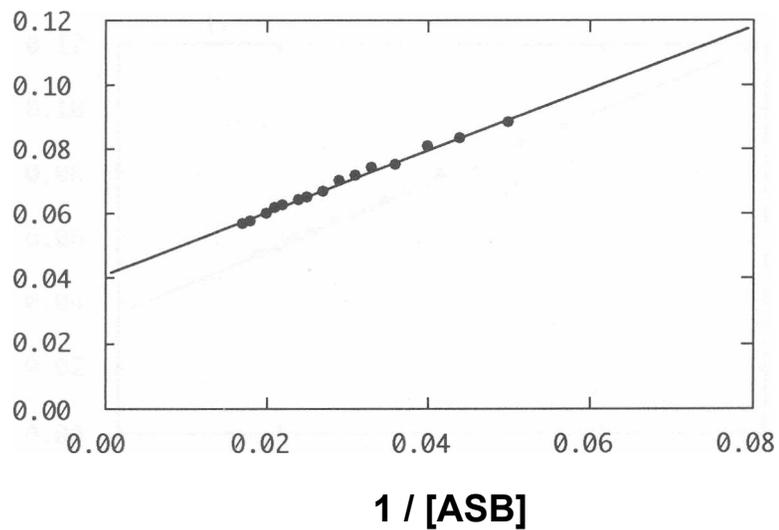

---

<b>[ASB]</b>	<b>AAbs</b>	<b>1/AAbs</b>	<b>1/[ASB]</b>
20.0	10.55	0.095	0.050
22.5	11.54	0.087	0.044
25.0	12.23	0.082	0.040
27.5	13.23	0.076	0.036
30.0	13.54	0.074	0.033
32.5	13.91	0.072	0.031
35.0	14.13	0.071	0.029
37.0	14.49	0.069	0.027
40.0	14.95	0.067	0.025
42.5	15.91	0.063	0.024
45.0	16.16	0.062	0.022
47.5	16.70	0.060	0.021
50.0	17.27	0.058	0.020
55.0	17.57	0.057	0.018
60.0	17.89	0.056	0.017

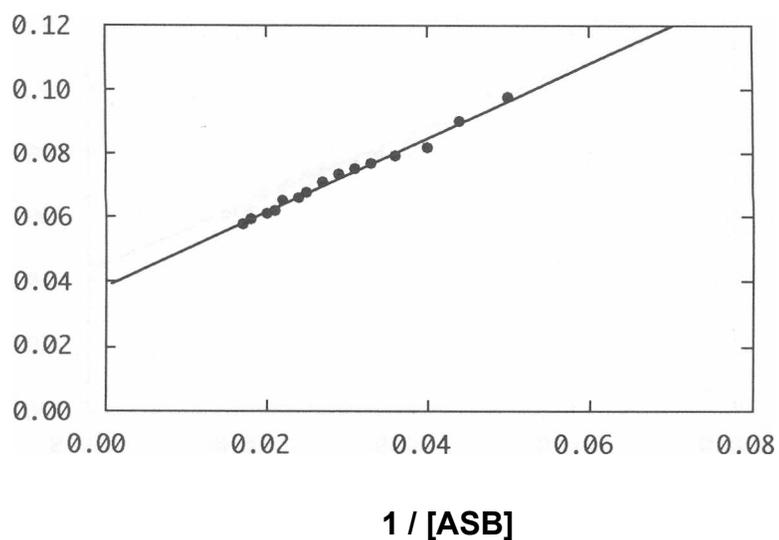
---



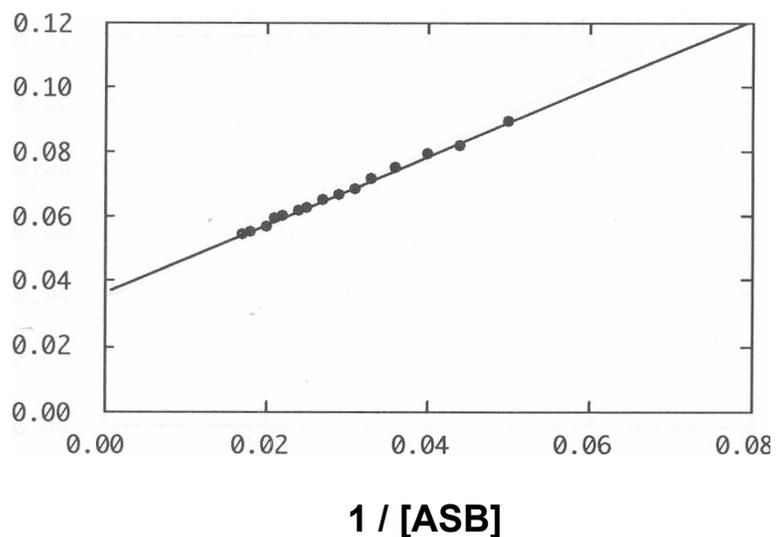
**Figura 51. Estimación del  $AA_{\text{óS}}^{\text{MAX}}$  del sistema T514-ASB: pH 7.4 y 15 °C.  
La recta cruza la ordenada en  $1/AAbsMAX = 0.049$ ,  $AAbsMAX = 20.41$ .**



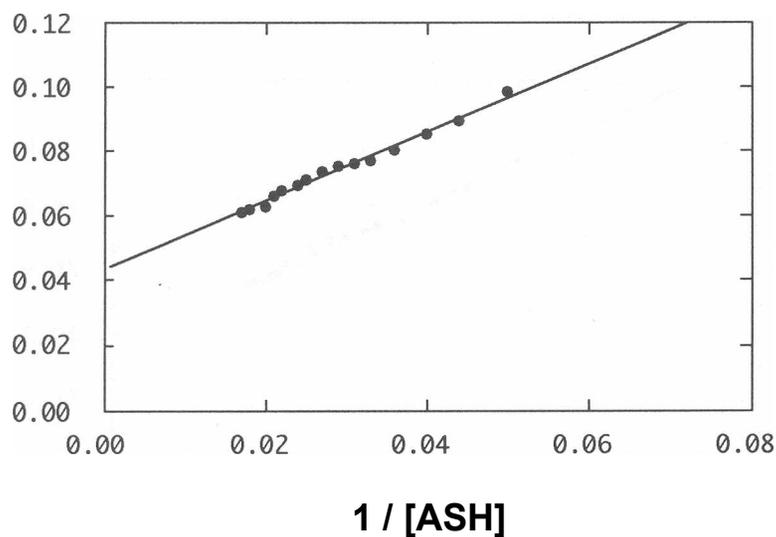
**Figura 52. Estimación del  $AAbsMAX$  del sistema T514-ASB: pH 7.4 y 20 °C.  
La recta cruza la ordenada en  $1/AAbsMAX = 0.041$ ,  $AAbsMAX = 24.39$  u.a.**



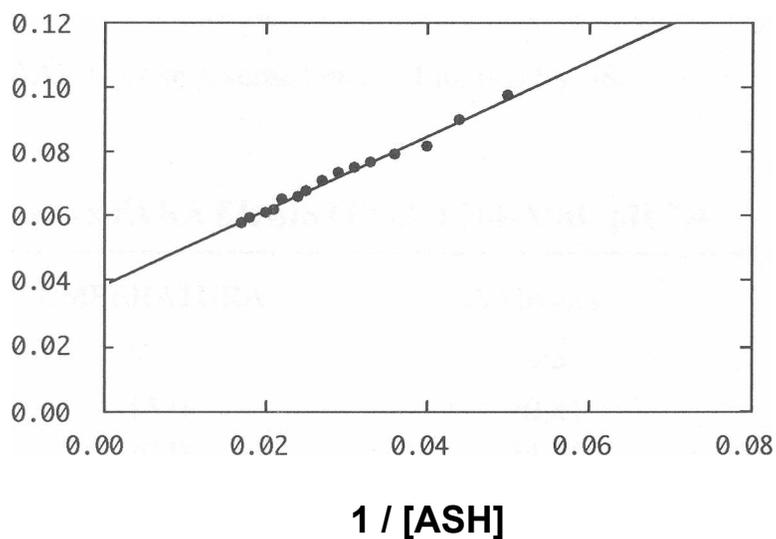
**Figura 53. Estimación del AAbsMAX del sistema T514-ASB: pH 7.4 y 25 °C.  
La recta cruza la ordenada en  $1/AAbsMAX = 0.039$ ,  $AAbsMAX = 25.64$  u.a.**



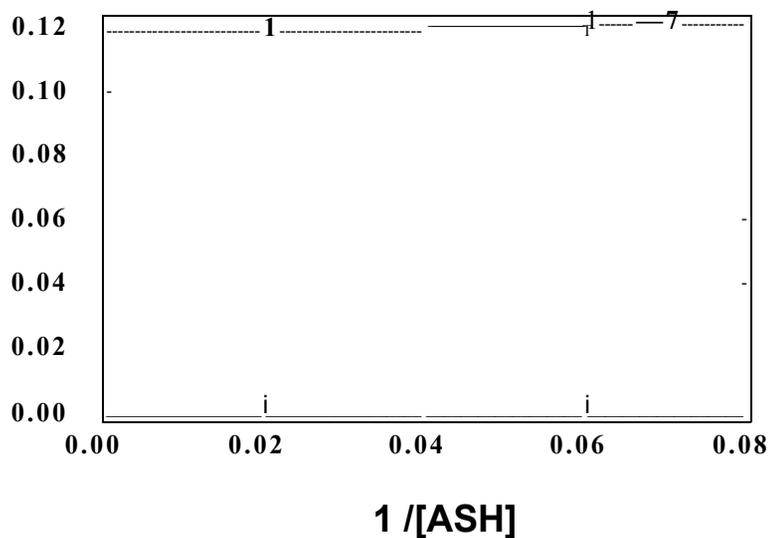
**Figura 54. Estimación del AAbsMAX del sistema T514-ASB: pH 7.4 y 30 °C.  
La recta cruza la ordenada en  $1/AAbsMAX = 0.036$ ,  $AAbsMAX = 27.78$  u.a.**



**Figura 55. Estimación del AAbsMAX del sistema T514-ASH: pH 7.4 y 20 °C.  
La recta cruza la ordenada en  $1/\text{AAbsMAX} = 0.043$ ,  $\text{AAbsMAX} = 23.26$  u.a.**



**Figura 56. Estimación del AAbsMAX del sistema T514-ASH: pH 7.4 y 25 °C.  
La recta cruza la ordenada en  $1/\text{AAbsMAX} = 0.039$ ,  $\text{AAbsMAX} = 25.64$  u.a.**



**Figura 57. Estimación del AAÓSMAX del sistema T514-ASH: pH 7.4 y 30 °C.  
La recta cruza la ordenada en  $1/\text{AAbsMAX} = 0.036$ ,  $\text{AAbsMAX} = 27.78$  u.a.**

Los valores de los AAÓSMAX se resumen en las Tablas 37 y 38.

**TABLA 37. AAbsMAX PARA EL SISTEMA T514-ASB: pH 7.4**

TEMPERATURA	AAÓSMAX
°c	u.a.
15.0	20.41
20.0	24.39
25.0	25.64
30.0	27.78

**TABLA 38. AAbsMAX PARA EL SISTEMA T514-ASH: pH 7.4**

TEMPERATURA	AAbsMAX
°C	u.a.
20.0	23.26
25.0	25.64
30.0	27.78

Conociendo el AAbsMAX se calculó el valor de absorbancia producido por la unión de 1 pM de T514, dado por a:

$$a = \text{AAbsMAX} / [\text{T514}]_{\text{TOTAL}}$$

Los valores de *a* se resumen en las Tablas 39 y 40

**TABLA 39**

**UNIDADES DE ABSORBANCIA PRODUCIDOS POR MOL DE T514  
PARA EL SISTEMA T514-ASB a pH 7.4**

---

Temperatura	a
°C	u.a.
15	1.020
20	1.220
25	1.282
30	1.389

**TA.BLA40****UNIDADES DE ABSORBANCIA PRODUCIDOS POR MOL DE T514  
PARA EL SISTEMA T514-ASH a pH 7.4**

Temperatura	a
°C	u.a.
20	1.163
25	1.282
30	1.389

**3.3.1.3 Determinación de la concentración de T514 unida y T514 libre.**

Después de conocer el valor de  $a$  se determinaron los valores de las concentraciones unida y libre de la T514, columnas 3 y 4 de las Tablas 41 a la 47.

**j.2.1.4 Determinación del número promedio de moléculas de T514 unidas a la albúmina ( $r$ ).**

Con los valores de las concentraciones de T514 unida a la albúmina en cada punto de la curva de titulación y tomando en cuenta la concentración de proteína utilizada en esta estrategia se obtuvieron los valores de  $r$  (número promedio de moléculas de T514 unida a la proteína), columna 5 de las Tablas 41 a la 47.

**TABLA 41**  
**TITULACION DE LA ASB (10 jIM): pH 7.4 Y 15 °C**

[T514]TOTAL	AAbs	[T514]UNIDA	[T514]LIBRE	<i>r</i>	<b>C.V. %</b>	r/[T514]nBRE	C.V. %
17.50	16.21	15.89	1.62	1.589	1.68	0.982	17.02
20.00	18.29	17.93	2.08	1.793	1.06	0.864	8.55
22.50	20.24	19.84	2.63	1.984	1.34	0.754	6.17
25.00	22.16	21.73	3.77	2.173	0.91	0.644	4.08
27.50	23.76	23.29	4.20	2.329	1.12	0.554	5.79
30.00	25.27	24.77	5.50	2.477	0.96	0.467	4.74
32.50	26.88	26.35	6.14	2.635	0.75	0.429	4.26
35.00	28.53	27.97	7.05	2.797	0.99	0.397	4.13
37.50	30.06	29.47	8.03	2.947	2.28	0.367	7.31
40.00	31.51	30.89	9.09	3.089	1.45	0.340	5.48
42.50	32.85	32.21	10.29	3.221	1.21	0.313	5.34
45.00	34.10	33.43	11.57	3.343	1.25	0.289	5.17
47.50	35.26	34.57	12.95	3.457	0.95	0.267	4.53

El a que se utilizó fue de 1.02

**TABLA 42**  
**TITULACION DE LA ASB (10 μM): pH 7.4 Y 20 °C**

[T514]TOTAL	AAbs	[T514]UNIDA	[T514]LIBRE	<i>r</i>	C.V. %	<i>r</i> /[T514]nBRE	C.V. %
17.50	19.00	15.57	1.93	1.557	1.67	0.808	16.03
20.00	21.37	17.52	2.49	1.752	1.31	0.705	11.27
22.50	23.57	19.32	3.17	1.932	0.57	0.609	4.11
25.00	25.58	20.97	4.03	2.097	0.52	0.521	3.27
27.50	27.94	22.90	4.60	2.290	0.48	0.498	2.61
30.00	30.13	24.70	5.30	2.470	0.36	0.466	2.36
32.50	32.25	26.43	6.08	2.643	0.79	0.435	4.36
35.00	34.26	28.08	6.93	2.808	1.10	0.405	5.65
37.50	36.17	29.65	7.86	2.965	0.88	0.377	4.23
40.00	37.98	31.13	8.87	3.113	0.96	0.351	4.56
42.50	39.69	32.53	9.98	3.253	1.29	0.326	4.81
45.00	41.26	33.82	11.16	3.382	1.45	0.303	5.94
47.50	42.74	35.03	12.47	3.503	0.66	0.281	2.49

El OC que se utilizó fue de 1.22

**TABLA 42**  
**TITULACION DE LA ASB (10 <sup>-4</sup>M): pH 7.4 Y 20 °C**

[T514]TOTAL	AAbs	[T514]UNIDA	[T514]LIBRE	<i>r</i>	C.V. %	/7[T514]LIBRE	C.V. %
17.50	19.00	15.57	1.93	1.557	1.67	0.808	16.03
20.00	21.37	17.52	2.49	1.752	1.31	0.705	11.27
22.50	23.57	19.32	3.17	1.932	0.57	0.609	4.11
25.00	25.58	20.97	4.03	2.097	0.52	0.521	3.27
27.50	27.94	22.90	4.60	2.290	0.48	0.498	2.61
30.00	30.13	24.70	5.30	2.470	0.36	0.466	2.36
32.50	32.25	26.43	6.08	2.643	0.79	0.435	4.36
35.00	34.26	28.08	6.93	2.808	1.10	0.405	5.65
37.50	36.17	29.65	7.86	2.965	0.88	0.377	4.23
40.00	37.98	31.13	8.87	3.113	0.96	0.351	4.56
42.50	39.69	32.53	9.98	3.253	1.29	0.326	4.81
45.00	41.26	33.82	11.16	3.382	1.45	0.303	5.94
47.50	42.74	35.03	12.47	3.503	0.66	0.281	2.49

El  $\alpha$  que se utilizó fue de 1.22

**TABLA 43**  
**TITULACION DE LA ASB (10  $\mu$ M): pH 7.4 Y 25 °C**

[T514]TOTAL	AAbs	[T514]UNIDA	[T514]LIBRE	<i>r</i>	C.V. %	r/[T514]LIBRE	C.V. %
17.50	20.04	15.63	1.87	1.563	1.78	0.836	18.12
20.00	22.56	17.60	2.39	1.760	1.06	0.736	8.55
22.50	24.97	19.48	3.02	1.948	1.18	0.645	8.47
25.00	27.15	21.18	3.82	2.118	1.09	0.554	7.39
27.50	29.19	22.77	4.73	2.277	2.30	0.481	7.59
30.00	31.02	24.20	5.80	2.420	0.95	0.417	4.78
32.50	33.42	26.07	6.43	2.607	1.06	0.405	4.91
35.00	35.73	27.87	7.13	2.787	0.93	0.391	4.59
37.50	37.63	29.35	8.15	2.935	1.23	0.360	5.26
40.00	39.55	30.85	9.15	3.085	2.20	0.337	9.73
42.50	41.25	32.18	10.32	3.218	0.93	0.312	3.85
45.00	43.05	33.58	11.42	3.358	1.34	0.294	5.10
47.50	44.59	34.78	12.72	3.478	0.92	0.273	3.28

El  $\alpha$  que se utilizó fue de 1.282

**TABLA 44**  
**TITULACION DE LA ASB (10  $\mu$ M): pH 7.4 Y 30 °C**

[T514]TOTAL	AAbs	[T514]UNIDA	[T514]LIBRE	<i>r</i>	C.V. %	r/[T514] $\mu$ BRE	C.V. %
17.50	21.35	15.37	2.14	1.537	1.78	0.719	15.64
20.00	23.99	17.27	2.72	1.727	1.51	0.634	6.17
22.50	26.47	19.06	3.44	1.906	1.25	0.554	4.36
25.00	28.75	20.70	4.30	2.070	2.45	0.481	5.53
27.50	30.78	22.16	5.34	2.216	1.19	0.415	5.01
30.00	32.50	23.40	6.59	2.340	1.26	0.355	4.14
32.50	34.73	25.00	7.49	2.500	1.34	0.334	4.89
35.00	36.84	26.52	8.47	2.652	0.99	0.313	4.52
37.50	38.86	27.98	9.52	2.798	1.37	0.294	4.96
40.00	40.77	29.35	10.64	2.935	1.11	0.276	4.57
42.50	42.56	30.64	11.86	3.064	1.41	0.259	5.61
45.00	44.24	31.85	13.15	3.185	1.09	0.242	4.89
47.50	45.80	32.97	14.53	3.297	2.33	0.227	9.45

El  $\alpha$  que se utilizó fue de 1.389

**TABLA 44**  
**TITULACION DE LA ASB (10 jIM): pH 7.4 Y 30 °C**

[T514]TOTAL	AAbs	[T514]UNIDA	[T514]LIBRE	<i>r</i>	C.V. %	/7[T514]LIBRE	C.V. %
17.50	21.35	15.37	2.14	1.537	1.78	0.719	15.64
20.00	23.99	17.27	2.72	1.727	1.51	0.634	6.17
22.50	26.47	19.06	3.44	1.906	1.25	0.554	4.36
25.00	28.75	20.70	4.30	2.070	2.45	0.481	5.53
27.50	30.78	22.16	5.34	2.216	1.19	0.415	5.01
30.00	32.50	23.40	6.59	2.340	1.26	0.355	4.14
32.50	34.73	25.00	7.49	2.500	1.34	0.334	4.89
35.00	36.84	26.52	8.47	2.652	0.99	0.313	4.52
37.50	38.86	27.98	9.52	2.798	1.37	0.294	4.96
40.00	40.77	29.35	10.64	2.935	1.11	0.276	4.57
42.50	42.56	30.64	11.86	3.064	1.41	0.259	5.61
45.00	44.24	31.85	13.15	3.185	1.09	0.242	4.89
47.50	45.80	32.97	14.53	3.297	2.33	0.227	9.45

El *a* que se utilizó fue de 1.389

**TABLA 45**  
**TITULACION DE LA ASH (10  $\mu$ M): pH 7.4 Y 20 °C**

[T514]TOTAL	AAbs	[T514]UNIDA	[T514]LIBRE	<i>r</i>	C.V. %	r/[T514]nBRE	C.V. %
17.50	19.13	16.45	1.05	1.645	2.08	0.808	8.46
20.00	21.32	18.33	1.67	1.833	1.47	0.705	5.57
22.50	23.42	20.14	2.26	2.014	1.29	0.609	5.12
25.00	25.60	22.01	2.99	2.201	1.33	0.521	6.23
27.50	27.09	23.29	4.21	2.329	1.22	0.498	5.48
30.00	28.66	24.64	5.36	2.464	2.25	0.466	7.05
32.50	30.88	26.55	5.95	2.655	1.54	0.435	5.61
35.00	32.78	28.19	6.83	2.819	1.15	0.405	4.89
37.50	34.53	29.69	7.81	2.969	1.06	0.377	4.67
40.00	36.20	31.13	8.87	3.113	0.97	0.351	4.28
42.50	37.74	32.45	10.05	3.245	1.10	0.326	5.05
45.00	39.18	33.69	11.31	3.369	0.89	0.303	4.33
47.50	40.48	34.81	12.69	3.481	1.36	0.281	6.26

El  $\alpha$  que se utilizó fue de 1.163

**TABLA 46**  
**TITULACION DE LA ASH (10 pM): pH 7.4 Y 25 °C**

[T514]TOTAL	AAbs	[T514]UNIDA	[T514]LIBRE	<i>r</i>	C.V. %	<i>r</i> /[T514]LiBRE	C.V. %
17.50	20.72	16.16	1.34	1.616	2.54	0.808	12.16
20.00	23.41	18.26	1.74	1.826	2.13	0.705	9.63
22.50	25.87	20.18	2.32	2.018	1.82	0.609	8.08
25.00	28.37	22.13	2.87	2.213	1.15	0.521	7.64
27.50	30.56	23.84	3.66	2.384	1.34	0.498	7.55
30.00	32.34	25.23	4.77	2.523	1.09	0.466	6.59
32.50	33.36	26.02	6.48	2.602	1.68	0.435	7.73
35.00	35.56	27.74	7.26	2.774	2.39	0.405	8.97
37.50	37.41	29.18	8.32	2.918	1.78	0.377	7.81
40.00	39.34	30.69	9.31	3.069	1.24	0.351	6.35
42.50	41.04	32.01	10.49	3.201	1.03	0.326	5.13
45.00	42.81	33.39	11.61	3.339	1.97	0.303	7.32
47.50	44.36	34.60	12.90	3.460	2.13	0.281	10.65

El *a* que se utilizó fue de 1.282

**TABLA 47**  
**TITULACION DE LA ASH (10 pM): pH 7.4 Y 30 °C**

[T514]TOTAL	AAbs	[T514]UNIDA	[T514]LIBRE	r	C.V. %	r/[T514]LIBRE	C.V. %
17.50	21.64	15.58	1.92	1.558	2.77	0.811	9.81
20.00	24.42	17.58	2.42	1.758	2.05	0.726	8.23
22.50	26.93	19.39	3.11	1.939	1.59	0.623	7.22
25.00	29.10	20.95	4.05	2.095	1.68	0.517	7.35
27.50	31.03	22.34	5.16	2.234	1.39	0.433	6.08
30.00	32.91	23.69	6.31	2.369	1.45	0.375	6.79
32.50	33.92	24.42	8.23	2.442	1.73	0.302	7.56
35.00	35.71	25.71	9.29	2.571	1.16	0.277	5.87
37.50	37.66	27.11	10.39	2.711	1.25	0.261	5.95
40.00	39.46	28.41	11.59	2.841	1.08	0.245	5.51
42.50	40.89	29.44	13.06	2.944	1.34	0.225	6.19
45.00	42.60	30.67	14.33	3.067	2.01	0.214	7.88
47.50	44.06	31.72	15.78	3.172	2.22	0.201	8.54

El a que se utilizó fue de 1.389

Consecutivamente se graficaron los valores de  $r / [T514]_{LIBRE}$  en función de  $r$ , de lo que resultó una curva con dos tendencias lineales, Figuras de la 58 a la 78. Debido a esto se asumió que cada molécula de albúmina (ASB,ASH) tiene dos tipos de sitios de unión independientes. Cada tendencia se trató independientemente y de cada una de ellas se obtuvo una recta con pendiente negativa ( $-K_a$ ) y con intercepto en la abscisa ( $N$ ). Se le denominó  $K_{a1}$  y  $K_{a2}$  a las constantes de unión correspondientes a  $N_1$  y  $N_2$ , los números de los sitios de unión primarios y secundarios. Los valores de  $N$  y de  $K_a$  para cada caso se muestran en las Tablas 48 y 49.

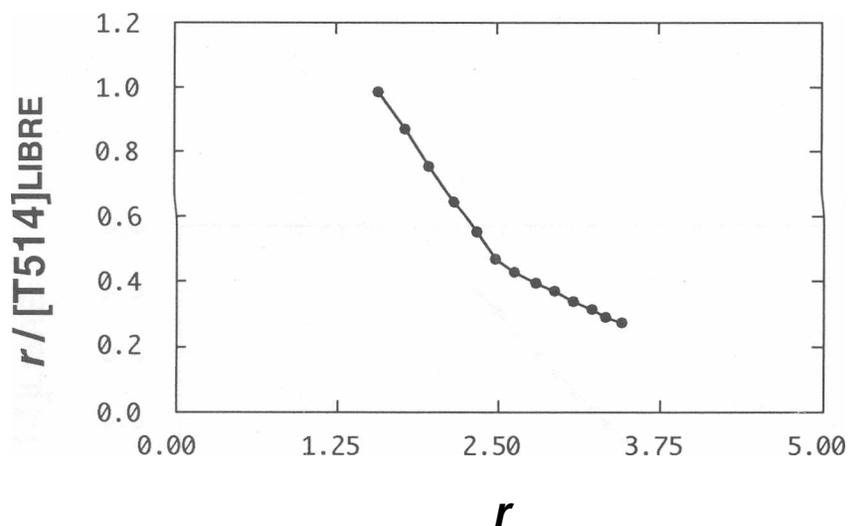
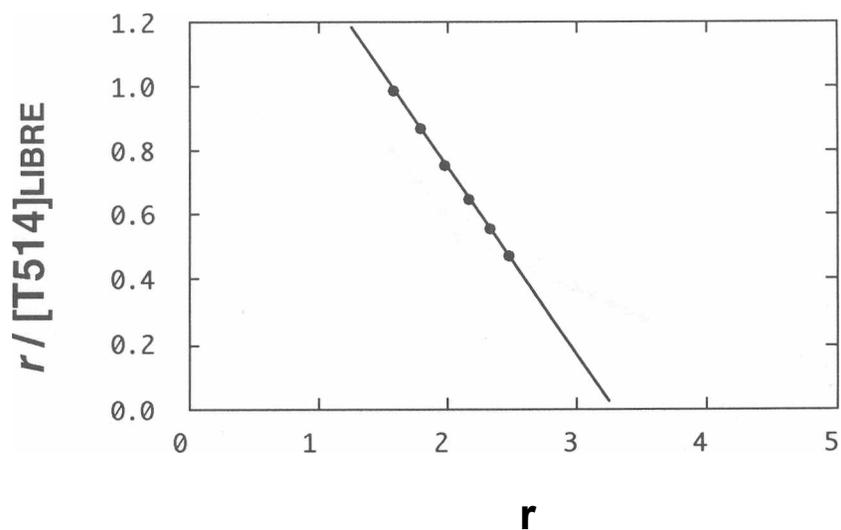
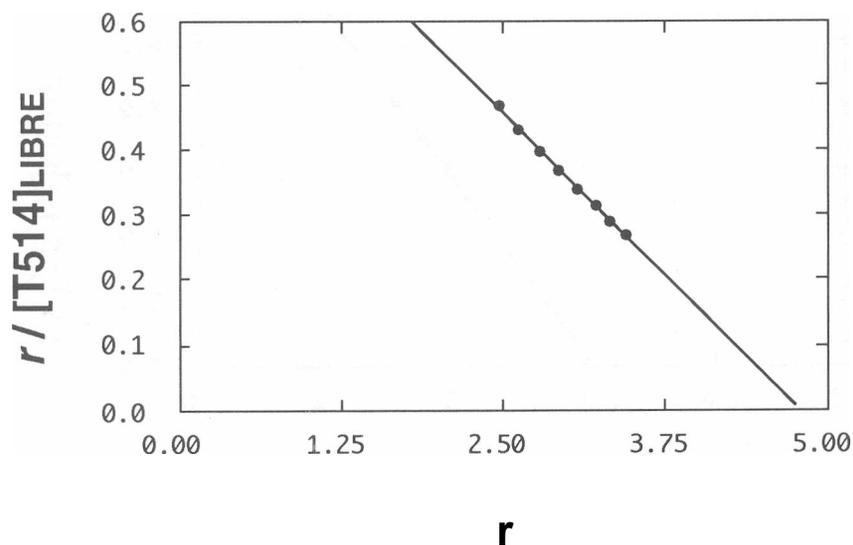


Figura 58. Gráfica de Scatchard de la unión de T514 con ASB: pH 7.4 y 15 °C.



**Figura 59. Gráfica de Scatchard de la unión de T514 con ASB en Ni: pH 7.4 y 15 °C. La línea continua fue obtenida por análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados,  $r^2 = 0.996$ .**



**Figura 60. Gráfica de Scatchard de la unión de T514 con ASB en N2: pH 7.4 y 15 °C. La línea continua fue obtenida por análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados,  $r^2 = 0.986$ .**

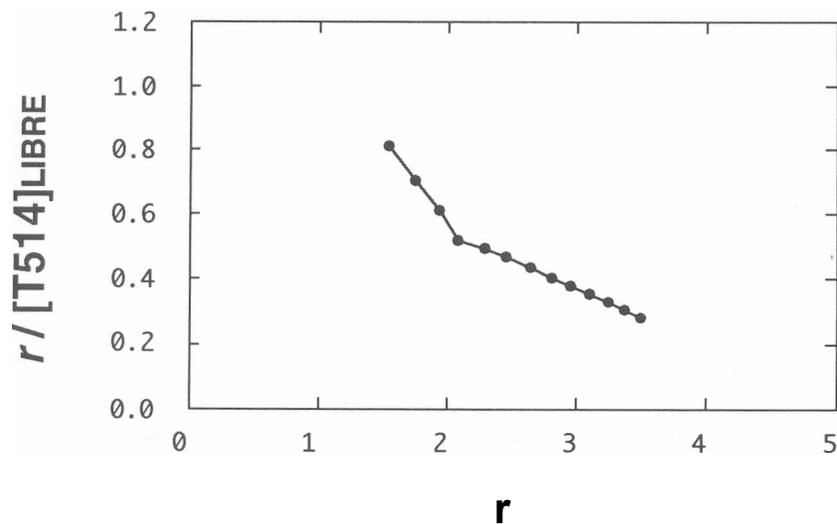


Figura 61. Gráfica de Scatchard de la unión de T514 con ASB: pH 7.4 y 20 °C.

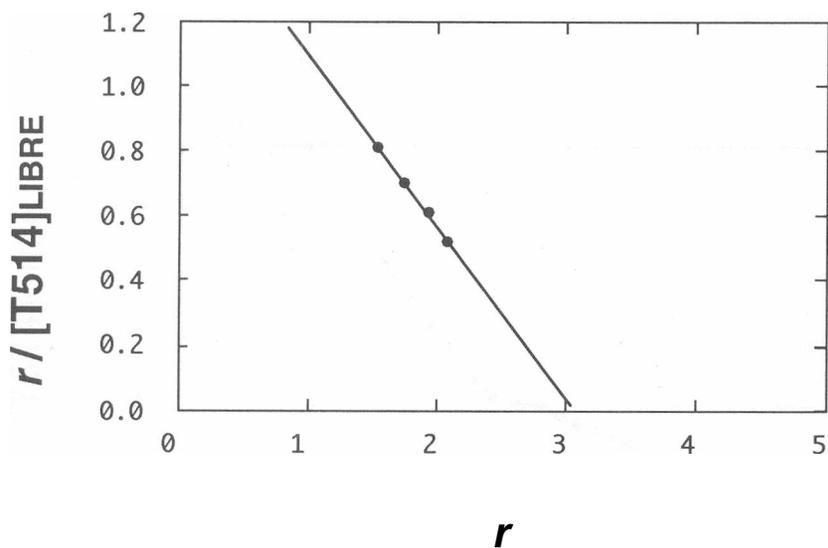
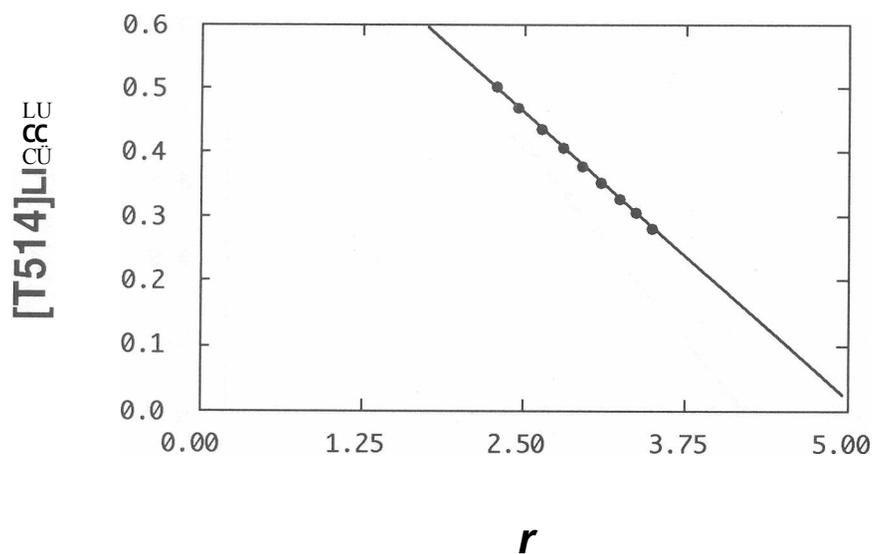
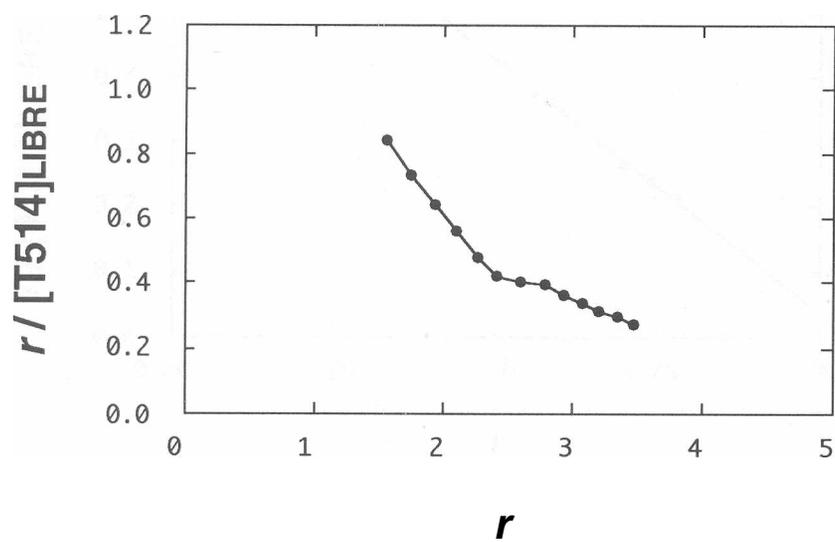


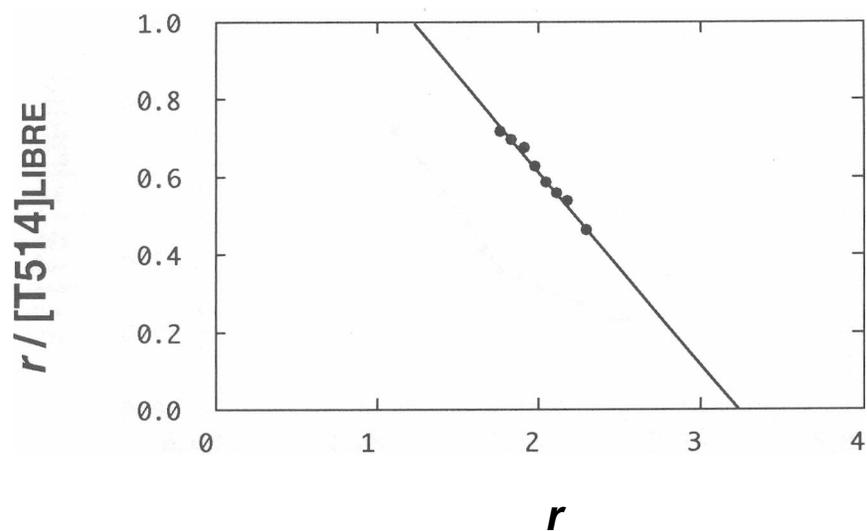
Figura 62. Gráfica de Scatchard de la unión de T514 con ASB EN NI: pH 7.4 y 20 °C. La línea continua fue obtenida por análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados,  $r^2 = 0.995$ .



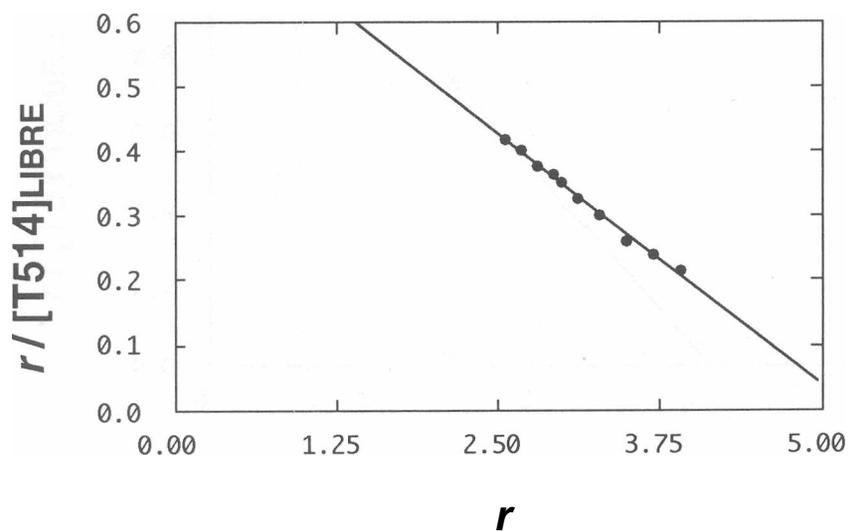
**Figura 63. Gráfica de Scatchard de la unión de T514 con ASB en N2: pH 7.4 y 20 °C. La línea continua fue obtenida por análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados,  $r^2 = 0.994$ .**



**Figura 64. Gráfica de Scatchard de la unión de T514 con ASB: pH 7.4 y 25 °C.**



**Figura 65. Gráfica de Scatchard de la unión de T514 con ASB en Ni: pH 7.4 y 25 °C. La línea continua fue obtenida por análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados,  $r^2 = 0.991$ .**



**Figura 66. Gráfica de Scatchard de la unión de T514 con ASB en N2: pH 7.4 y 25 °C. La línea continua fue obtenida por análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados,  $r^2 = 0.996$ .**

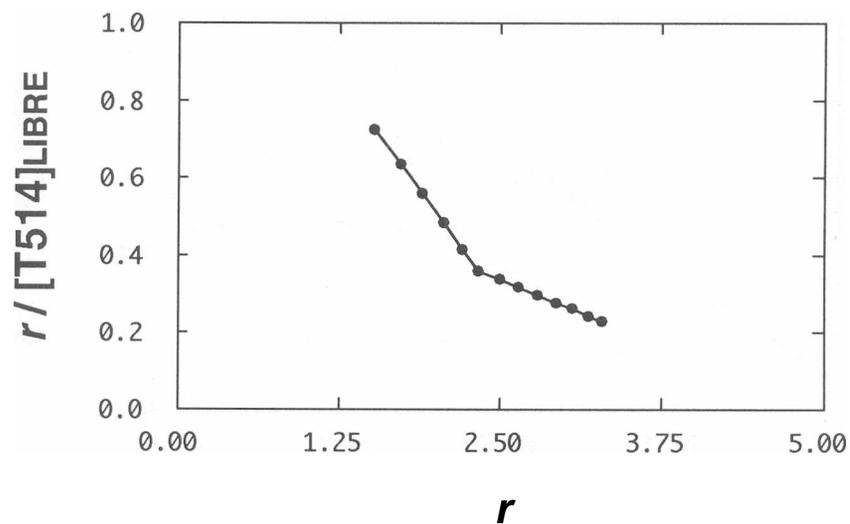


Figura 67. Gráfica de Scatchard de la unión de T514 con ASB: pH 7.4 y 30 °C.

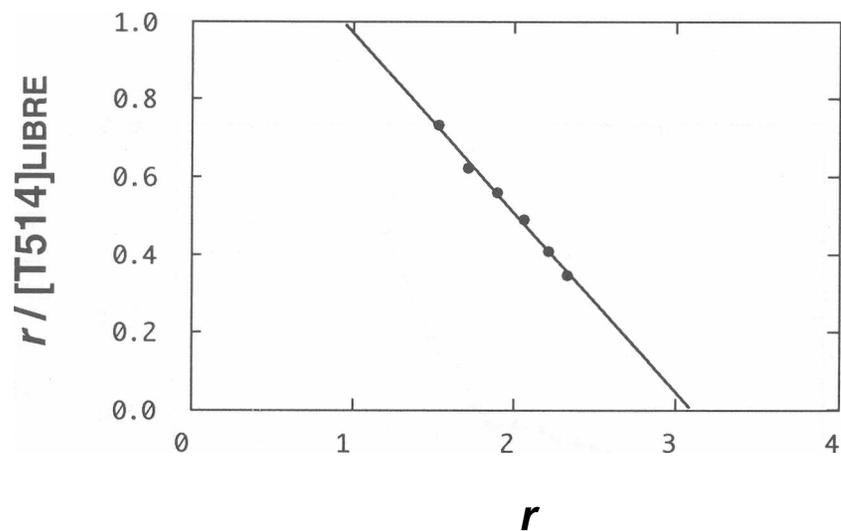
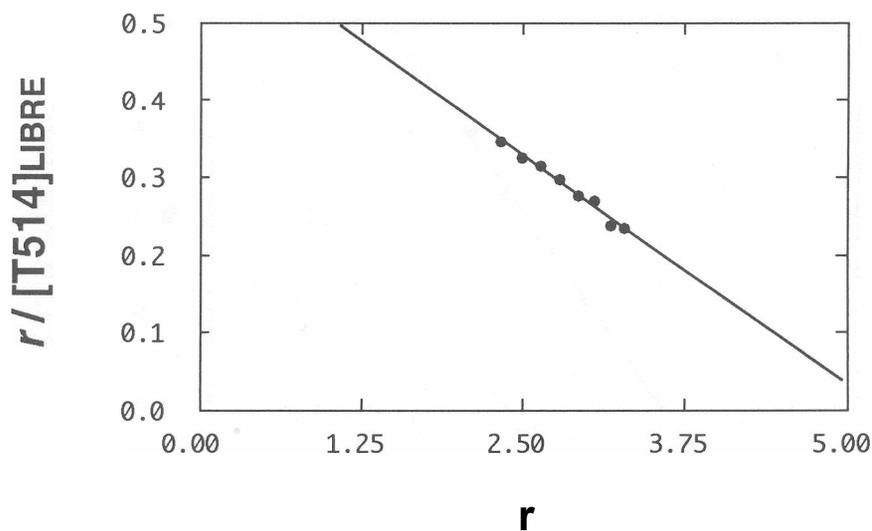
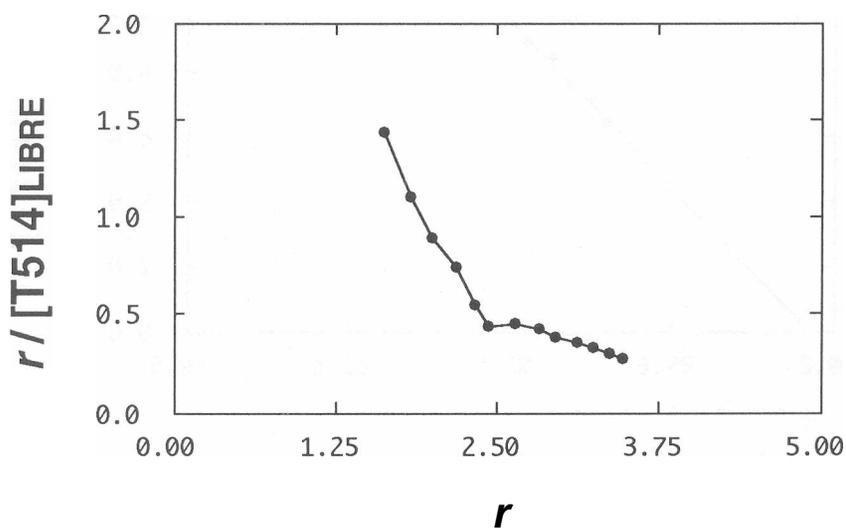


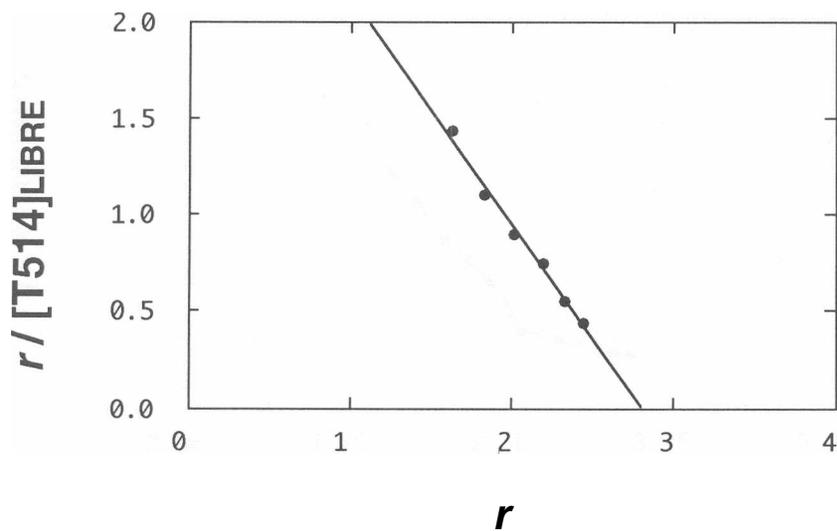
Figura 68. Gráfica de Scatchard de la unión de T514 con ASB en NI: pH 7.4 y 30 °C. La línea continua fue obtenida por análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados,  $r^2 = 0.996$ .



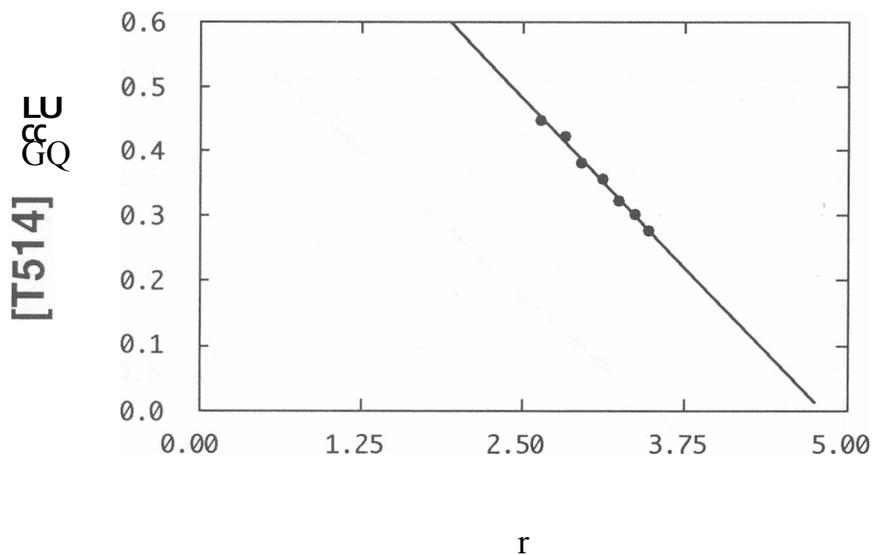
**Figura 69. Gráfica de Scatchard de la unión de T514 con ASB en N<sub>2</sub>: pH 7.4 y 30 °C. La línea continua fue obtenida por análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados,  $r^2 = 0.984$ .**



**Figura 70. Gráfica de Scatchard de la unión de T514 con ASH: pH 7.4 y 20 °C.**



**Figura 71. Gráfica de Scatchard de la unión de T514 con ASH en NI: pH 7.4 y 20 °C. La línea continua fue obtenida por análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados,  $r^2 = 0.990$ .**



**Figura 72. Gráfica de Scatchard de la unión de T514 con ASH en N2: pH 7.4 y 20 °C. La línea continua fue obtenida por análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados,  $r^2 = 0.995$ .**

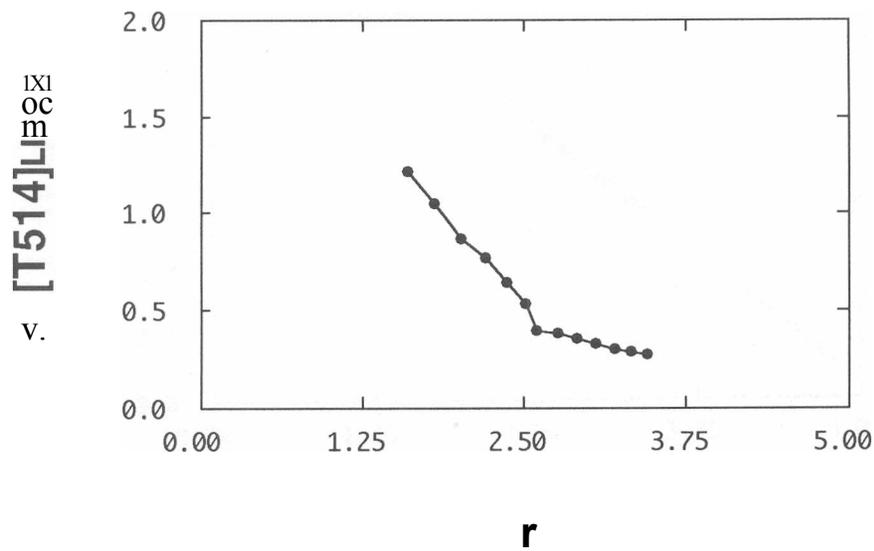


Figura 73. Gráfica de Scatchard de la unión de T514 con ASH: pH 7.4 y 25 °C.

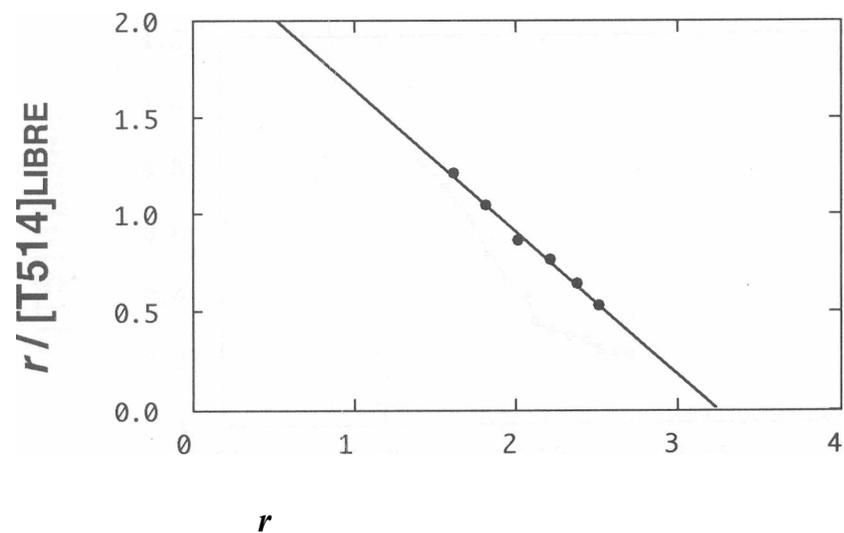
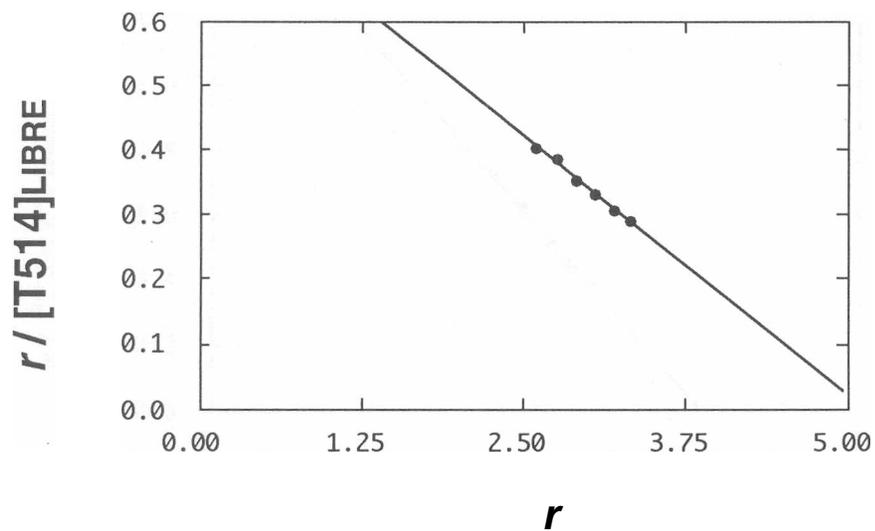
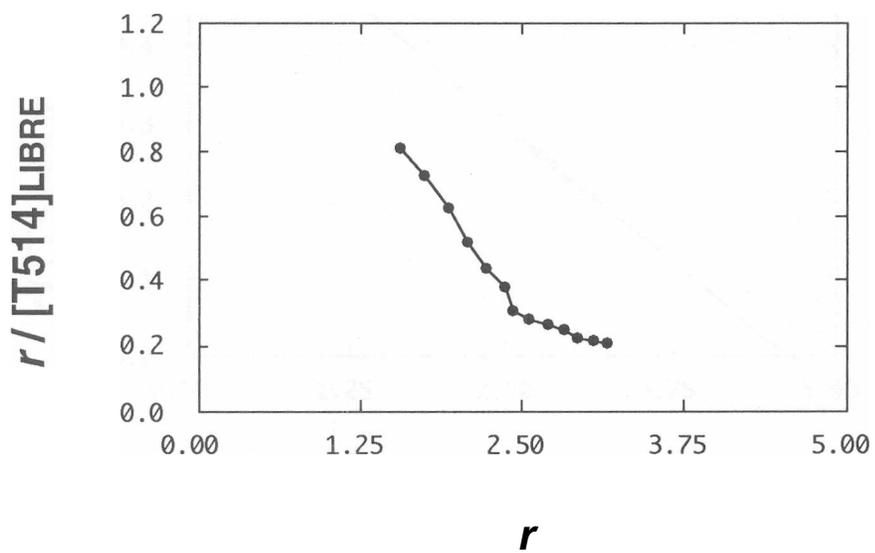


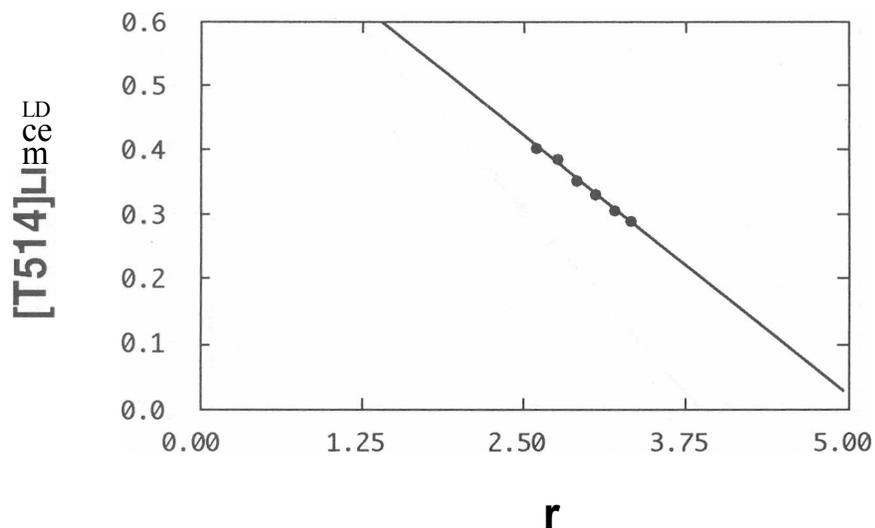
Figura 74. Gráfica de Scatchard de la unión de T514 con ASH en NI: pH 7.4 y 25 °C. La línea continua fue obtenida por análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados,  $r^2 = 0.995$ .



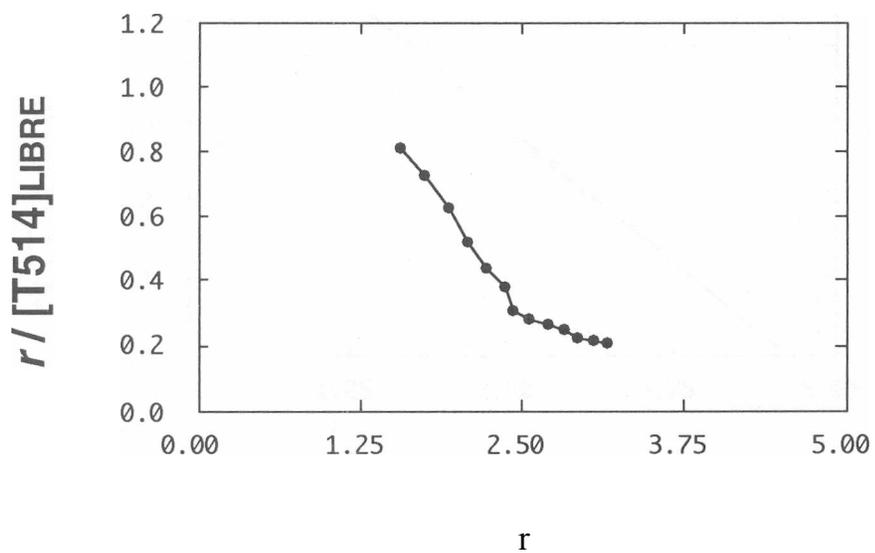
**Figura 75. Gráfica de Scatchard de la unión de T514 con ASH en N2: pH 7.4 y 25 °C. La línea continua fue obtenida por análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados,  $r^2 = 0.994$ .**



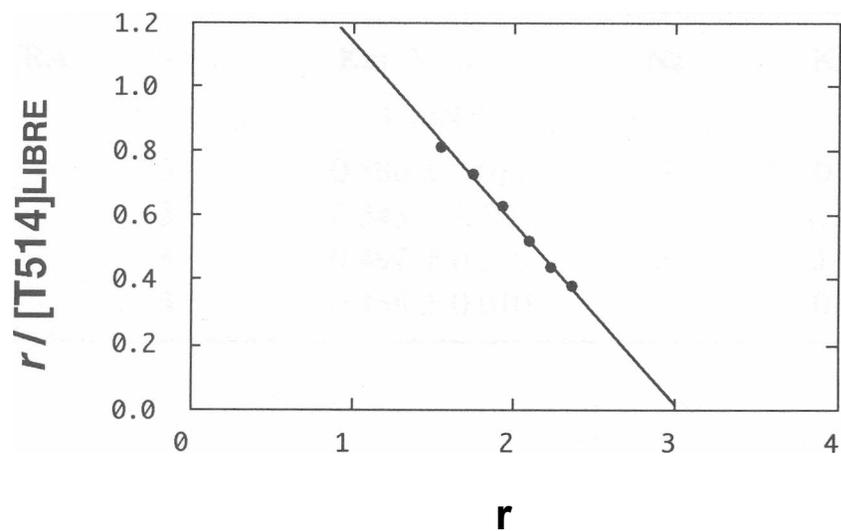
**Figura 76. Gráfica de Scatchard de la unión de T514 con ASH: pH 7.4 y 30 °C.**



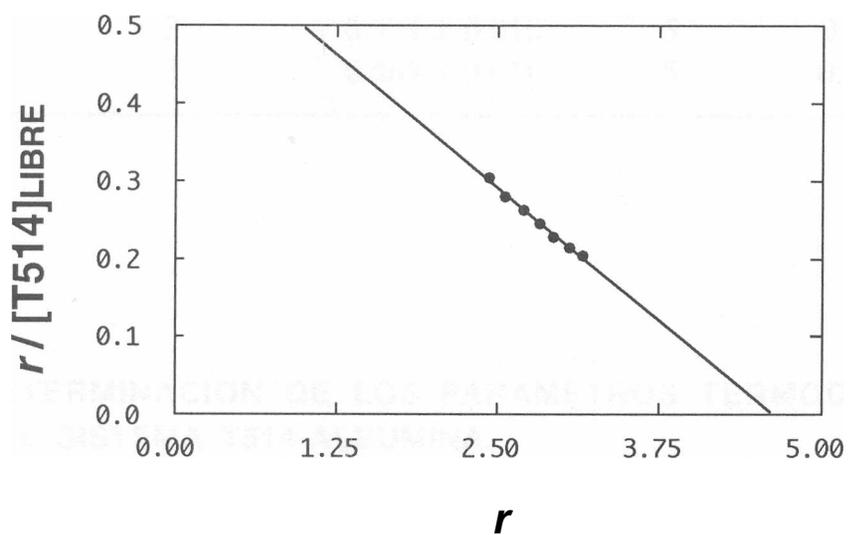
**Figura 75. Gráfica de Scatchard de la unión de T514 con ASH en N2: pH 7.4 y 25 °C. La línea continua fue obtenida por análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados,  $r^2 = 0.994$ .**



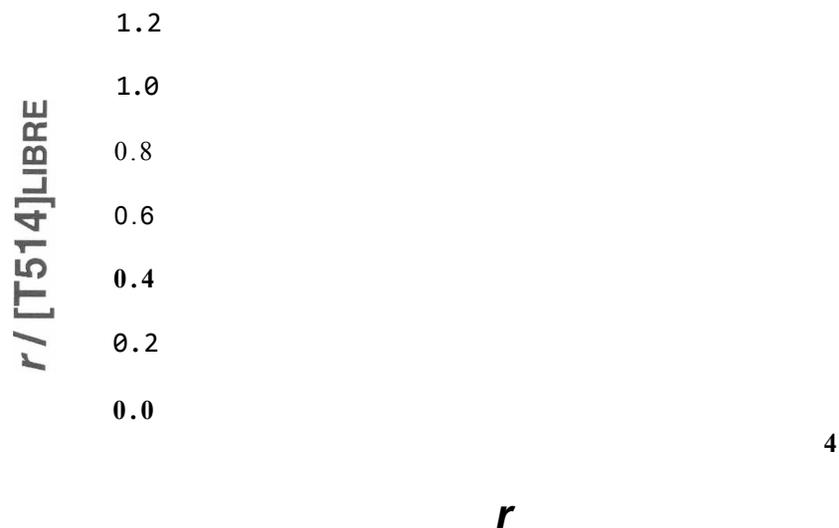
**Figura 76. Gráfica de Scatchard de la unión de T514 con ASH: pH 7.4 y 30 °C.**



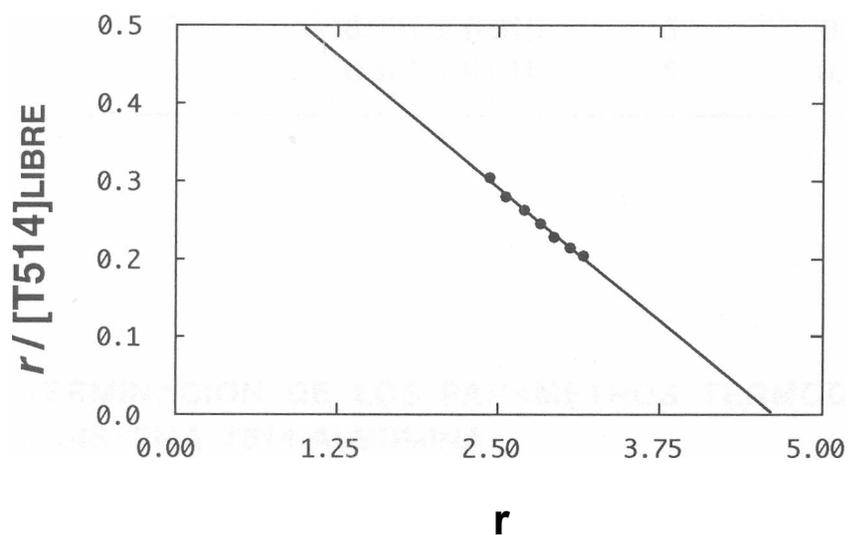
**Figura 77. Gráfica de Scatchard de la unión de T514 con ASH en NI: pH 7.4 y 30 °C. La línea continua fue obtenida por análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados,  $r^2 = 0.995$ .**



**Figura 78. Gráfica de Scatchard de la unión de T514 con ASH en N2: pH 7.4 y 30 °C. La línea continua fue obtenida por análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados,  $r^2 = 0.993$ .**



**Figura 77. Gráfica de Scatchard de la unión de T514 con ASH en NI: pH 7.4 y 30 °C. La línea continua fue obtenida por análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados,  $r^2 = 0.995$ .**



**Figura 78. Gráfica de Scatchard de la unión de T514 con ASH en N2: pH 7.4 y 30 °C. La línea continua fue obtenida por análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados,  $r^2 = 0.993$ .**

**TABLA 48****PARAMETROS DE LA UNION DE T514 A ASB: pH 7.4**

TEMPERATURA °C	Ni	Kai X 106 Lmol <sup>l</sup>	N2	Ka2 x 10 <sup>6</sup> L mol <sup>l</sup>
15	3	0.580 ± 0.011	5	0.211 ± 0.008
20	3	0.543 ± 0.004	5	0.187 ± 0.006
25	3	0.497 ± 0.010	5	0.157 ± 0.007
30	3	0.468 ± 0.010	5	0.119 ± 0.006

**TABLA 49****PARAMETROS DE LA UNION DE T514 A ASH: pH 7.4**

TEMPERATURA °C	Ni	Kai x 10 <sup>6</sup> L mol <sup>l</sup>	N2	Ka2 x 10 <sup>6</sup> Lmol <sup>l</sup>
20	3	1.179 + 0.016	5	0.211 ± 0.007
25	3	0.731 +0.010	5	0.161 ±0.008
30	3	0.561 ±0.011	5	0.137 ± 0.006

**3.3.2 DETERMINACION DE LOS PARAMETROS TERMODINAMICOS DEL SISTEMA T514-ALBUMINA.**

Con los datos de los valores de las constantes de unión (Tablas 48 y 49) se obtuvieron los valores del Cambio de Energía Libre de Gibbs, el cambio de entalpia se obtuvo de gráficas de Van't Hoff, Figuras 79 y 80. Los parámetros termodinámicos de los sistemas T514-ASB y T514-ASH se resumen en las Tabla 50 y Tabla 52.

**TABLA 48****PARAMETROS DE LA UNION DE T514 A ASB: pH 7.4**

TEMPERATURA °C	Ni	Ka1 x 10 <sup>6</sup> L mol <sup>-1</sup>	N2	Ka2 x 10 <sup>6</sup> L mol <sup>-1</sup>
15	3	0.580 ± 0.011	5	0.211 ± 0.008
20	3	0.543 ± 0.004	5	0.187 ± 0.006
25	3	0.497 ± 0.010	5	0.157 ± 0.007
30	3	0.468 ± 0.010	5	0.119 ± 0.006

**TABLA 49****PARAMETROS DE LA UNION DE T514 A ASH: pH 7.4**

TEMPERATURA °C	Ni	Ka1 x 10 <sup>6</sup> Lmol <sup>-1</sup>	N2	Ka2 x 10 <sup>6</sup> Lmol <sup>-1</sup>
20	3	1.179 ± 0.016	5	0.211 ± 0.007
25	3	0.731 ± 0.010	5	0.161 ± 0.008
30	3	0.561 ± 0.011	5	0.137 ± 0.006

**3.3.2 DETERMINACION DE LOS PARAMETROS TERMODINAMICOS DEL SISTEMA T514-ALBUMINA.**

Con los datos de los valores de las constantes de unión (Tablas 48 y 49) se obtuvieron los valores del Cambio de Energía Libre de Gibbs, el cambio de entalpia se obtuvo de gráficas de Van't Hoff, Figuras 79 y 80. Los parámetros termodinámicos de los sistemas T514-ASB y T514-ASH se resumen en las Tabla 50 y Tabla 52.

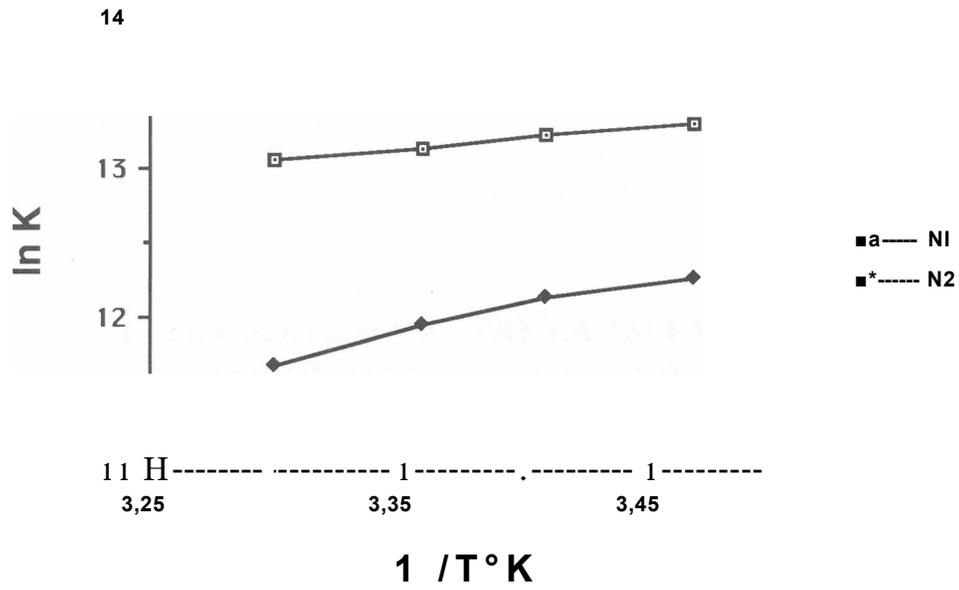


Figura 79. Gráfica de Van't Hoff de la unión de la T514 a la ASB, pH 7.4.

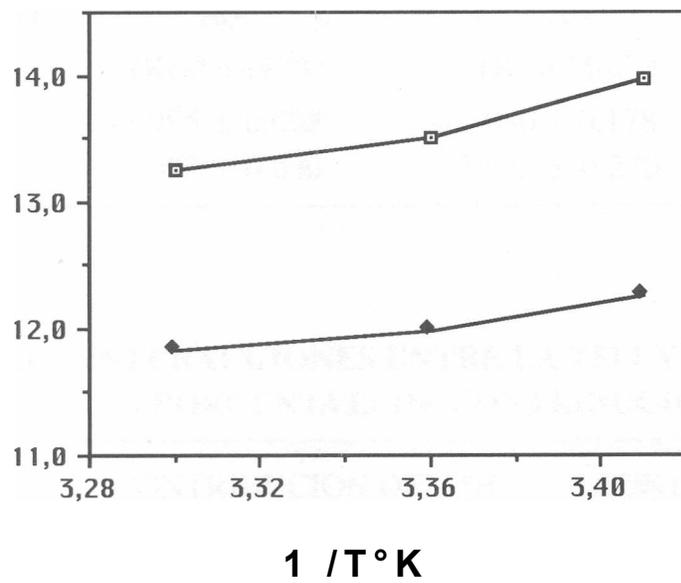


Figura 80. Gráfica de Van't Hoff para la unión de la T514 a la ASH, pH 7.4.

**TABLA 50. PARAMETROS TERMODINAMICAS DE LA UNION DE T514 A ALBUMINA SERICA BOVINA (ASB) A pH 7.4 Y 25 °C**

TIPO DE SITIO DE UNION	AG (Kcal Mol <sup>-1</sup> )	AH (Kcal Mol <sup>-1</sup> )	AS (ue)
NI	-7.766 ± 0.012	-2.551±0.194	+ 17.503 ± 0.683
N2	-7.084 ± 0.027	- 6.635 + 0.214	+ 1.522 + 0.619

**TABLA 51. INTERACCIONES ENTRE LA T514 Y LA ASB: pH 7.4 PORCENTAJE DE CONTRIBUCION AL AG**

	CONTRIBUCION DEL AH % %	CONTRIBUCION DEL AS
NI	32.84 ± 2.54	67.16 ± 2.54
N2	93.68 ± 3.17	6.32 ± 3.17

**TABLA 52. PARAMETROS TERMODINAMICOS DE LA UNION DE T514 A ALBUMINA SERICA HUMANA (ASH) A pH 7.4 Y 25 °C**

TIPO DE SITIO DE UNION	AG (Kcal Mol <sup>-1</sup> )	AH (Kcal Mol <sup>-1</sup> )	AS (ue)
NI	-7.995 ± 0.008	-13.040 ± 0.178	-16.931 ± 0.627
N2	-7.097 ± 0.030	-7.625 ± 0.270	-1.772 ± 1.002

**TABLA 53. INTERACCIONES ENTRE LA T514 Y LA ASH: pH 7.4 PORCENTAJE DE CONTRIBUCION AL AG**

	CONTRIBUCION DEL AH % %	CONTRIBUCION DEL AS
NI	36.89 ± 2.40	63.22 ± 1.97
N2	92.55 ± 4.24	7.45 ± 4.24

## CAPITULO 4

### DISCUSION

En el estudio de las interacciones de la T514 con la ASB y con la ASH se utilizó la espectroscopia Ultravioleta-Visible por ser una técnica sencilla y rápida; esto aunado con el hecho de que el equipo utilizado está provisto con arreglo de diodos, lo cual resulta en mayor rapidez y precisión en las respuestas en relación con los instrumentos de óptica tradicional. Por todo esto la metodología utilizada es altamente confiable aunque los cambios de absorbancia medidos hayan sido muy pequeños. (Ver coeficientes de variación, Tablas 17-23 y 41-47 ).

En el trabajo experimental se requería el uso de sustancias puras. Debido a esto sólo se usó toxina que cumplió con los parámetros de calidad ya establecidos en el laboratorio de extracción del Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L, (Tabla 3); sin embargo, durante el desarrollo de la tesis se monitorearon algunos de los patrones de calidad para corroborar la pureza; para esto, se tomó el punto de fusión inicial y final, se practicó cromatografía en capa fina y se determinó la pureza espectroscópica, para detectar cualquier degradación y/o contaminación que pudiera haberse producido con el tiempo; cuando se encontraba alguna variación respecto de los patrones originales, se examinaba otro lote de toxina.

Para precisar si la T514 interactuaba con la albúmina sérica (tanto con la ASB como con la ASH) se analizaron los espectros de la T514, de la Albúmina y el de la mezcla T514-Albúmina, (Figura 4). Al comparar los espectros de absorbancia se observó que existían diferencias entre ellos: a longitud de onda superior a 400 nm la albúmina no absorbe y el espectro de la T514 presenta una banda de absorción con un valor máximo a 422 nm, además existen diferencias en los valores de absorbancia a 422 nm en el espectro de la T514 con respecto al espectro de la mezcla. Cabe señalar que las concentraciones de la T514 en ambas soluciones fue la misma, por lo tanto, no hubo efectos de dilución ni superposición de bandas de absorción. Por lo anterior se infirió que la T514 interacciona con la albúmina. Si bien la diferencia espectral a 422 nm era pequeña se podía medir con buena precisión en el equipo utilizado. Debido a esto se seleccionó esta longitud de onda para estudiar las interacciones de dichas sustancias.

Es necesario mencionar que la T514 es una sustancia inestable en solución acuosa, por lo que era importante estudiar el proceso de interacción entre las sustancias en un

tiempo corto, para de esta manera evitar errores debidos a cambios en la absorbancia de la solución producidos por la descomposición de la T514. Por otro lado, para estudiar el proceso de unión por medio de la espectroscopia UV-VIS se requería que existiera un cambio espectral y para esto era necesario tomar dos lecturas de absorbancia: la primera correspondía a la solución de T514 y la segunda a la solución de la mezcla T514-Albúmina, es decir se requería tomar la última lectura a un tiempo óptimo hasta que se hubiera establecido el equilibrio de unión T514-Albúmina, sin que se notaran evidencias de descomposición. De esta manera, se estudió el efecto del tiempo en el proceso de unión y la medición a los tiempo 50 segundos después de la primera lectura resultó ser la más adecuada ya que su coeficiente de variación fue el más bajo (Tabla 5).

Para estudiar la unión de la T514 con la albúmina sérica se procedió a titular la albúmina con soluciones de T514 cuyas concentraciones variaron en el intervalo de 17.5 y 47.5  $\mu\text{M/L}$ ; se escogió este intervalo después de haber verificado en forma experimental que concentraciones menores daban respuesta muy baja por lo que no eran confiables, y concentraciones más altas daban coeficientes de variación muy grandes. En las gráficas donde se relacionan los valores de los cambios de absorbancia (AAbs) con las concentraciones de la T514 ( $[T514]$ ) se observa que los AAbs están directamente relacionados con la concentración de T514, figuras 7 a la 13 y 44 a la 50.

Por otra parte era necesario relacionar el cambio de absorbancia que se producía con la concentración de toxina unida; para esto se requería conocer el cambio de absorbancia máximo (AAbsMAX), es decir, cambio en la absorbancia cuando hay saturación de la molécula de albúmina con T514; se graficaron los valores  $1/\text{AAbs}$  en función de los valores  $1/[\text{ALBUMINA}]$ , esta gráfica se aproxima a la linealidad a altas concentraciones de albúmina y cruza la ordenada en  $1 / \text{AAbsMAX}$  <sup>(9)</sup>. Así se pudo calcular los AAbsMAX para los sistemas T514-ASB y T514-ASH a las diferentes condiciones de trabajo (Tablas 13-14 y 37-38).

El estudio de la unión de la T514 a la albúmina sérica bovina y a la albúmina sérica humana resultó en gráficas de Scatchard curvilíneas. Es posible que estas gráficas se hayan comportado de esta forma debido a una distribución estadística de la energía libre de unión. Las gráficas están formadas por dos tendencias, y cada tendencia corresponde a un tipo o clase de sitio de unión. Debido a esto se asumió que cada molécula de albúmina (ASB, ASH) tiene dos tipos de sitios de unión independientes<sup>0^</sup>. En este trabajo se usó un programa computacional simple

tiempo corto, para de esta manera evitar errores debidos a cambios en la absorbancia de la solución producidos por la descomposición de la T514. Por otro lado, para estudiar el proceso de unión por medio de la espectroscopia UV-VIS se requería que existiera un cambio espectral y para esto era necesario tomar dos lecturas de absorbancia: la primera correspondía a la solución de T514 y la segunda a la solución de la mezcla T514-Albúmina, es decir se requería tomar la última lectura a un tiempo óptimo hasta que se hubiera establecido el equilibrio de unión T514-Albúmina, sin que se notaran evidencias de descomposición. De esta manera, se estudió el efecto del tiempo en el proceso de unión y la medición a los tiempo 50 segundos después de la primera lectura resultó ser la más adecuada ya que su coeficiente de variación fue el más bajo (Tabla 5).

Para estudiar la unión de la T514 con la albúmina sérica se procedió a titular la albúmina con soluciones de T514 cuyas concentraciones variaron en el intervalo de 17.5 y 47.5 pM/L; se escogió este intervalo después de haber verificado en forma experimental que concentraciones menores daban respuesta muy baja por lo que no eran confiables, y concentraciones más altas daban coeficientes de variación muy grandes. En las gráficas donde se relacionan los valores de los cambios de absorbancia (AAbs) con las concentraciones de la T514 ([T514])se observa que los AAbs están directamente relacionados con la concentración de T514, figuras 7 a la 13 y 44 a la 50.

Por otra parte era necesario relacionar el cambio de absorbancia que se producía con la concentración de toxina unida; para esto se requería conocer el cambio de absorbancia máximo (AAbsMAX), es decir, cambio en la absorbancia cuando hay saturación de la molécula de albúmina con T514; se graficaron los valores  $1/\text{AAbs}$  en función de los valores  $1/[\text{ALBUMINA}]$ , esta gráfica se aproxima a la linealidad a altas concentraciones de albúmina y cruza la ordenada en  $1 / \text{AAbsMAX}$  (9) Así se pudo calcular los AAbsMAX para los sistemas T514-ASB y T514-ASH a las diferentes condiciones de trabajo (Tablas 13-14 y 37-38).

El estudio de la unión de la T514 a la albúmina sérica bovina y a la albúmina sérica humana resultó en gráficas de Scatchard curvilíneas. Es posible que estas gráficas se hayan comportado de esta forma debido a una distribución estadística de la energía libre de unión. Las gráficas están formadas por dos tendencias, y cada tendencia corresponde a un tipo o clase de sitio de unión. Debido a esto se asumió que cada molécula de albúmina (ASB, ASH) tiene dos tipos de sitios de unión independientes<sup>(30)</sup> En este trabajo se usó un programa computacional simple

tiempo corto, para de esta manera evitar errores debidos a cambios en la absorbancia de la solución producidos por la descomposición de la T514. Por otro lado, para estudiar el proceso de unión por medio de la espectroscopia UV-VIS se requería que existiera un cambio espectral y para esto era necesario tomar dos lecturas de absorbancia: la primera correspondía a la solución de T514 y la segunda a la solución de la mezcla T514-Albúmina, es decir se requería tomar la última lectura a un tiempo óptimo hasta que se hubiera establecido el equilibrio de unión T514-Albúmina, sin que se notaran evidencias de descomposición. De esta manera, se estudió el efecto del tiempo en el proceso de unión y la medición a los tiempo 50 segundos después de la primera lectura resultó ser la más adecuada ya que su coeficiente de variación fue el más bajo (Tabla 5).

Para estudiar la unión de la T514 con la albúmina sérica se procedió a titular la albúmina con soluciones de T514 cuyas concentraciones variaron en el intervalo de 17.5 y 47.5  $\mu\text{M/L}$ ; se escogió este intervalo después de haber verificado en forma experimental que concentraciones menores daban respuesta muy baja por lo que no eran confiables, y concentraciones más altas daban coeficientes de variación muy grandes. En las gráficas donde se relacionan los valores de los cambios de absorbancia (AAbs) con las concentraciones de la T514 ( $[T514]$ ) se observa que los AAbs están directamente relacionados con la concentración de T514, figuras 7 a la 13 y 44 a la 50.

Por otra parte era necesario relacionar el cambio de absorbancia que se producía con la concentración de toxina unida; para esto se requería conocer el cambio de absorbancia máximo (AAbsMAX), es decir, cambio en la absorbancia cuando hay saturación de la molécula de albúmina con T514; se graficaron los valores  $1/\text{AAbs}$  en función de los valores  $1/[\text{ALBUMINA}]$ , esta gráfica se aproxima a la linealidad a altas concentraciones de albúmina y cruza la ordenada en  $1 / \text{AAbsMAX}$  (9). Así se pudo calcular los AAbsMAX para los sistemas T514-ASB y T514-ASH a las diferentes condiciones de trabajo (Tablas 13-14 y 37-38).

El estudio de la unión de la T514 a la albúmina sérica bovina y a la albúmina sérica humana resultó en gráficas de Scatchard curvilíneas. Es posible que estas gráficas se hayan comportado de esta forma debido a una distribución estadística de la energía libre de unión. Las gráficas están formadas por dos tendencias, y cada tendencia corresponde a un tipo o clase de sitio de unión. Debido a esto se asumió que cada molécula de albúmina (ASB, ASH) tiene dos tipos de sitios de unión independientes<sup>30</sup>. En este trabajo se usó un programa computacional simple

(Mystat) basado en mínimos cuadrados para linearizar la forma de las ecuaciones de unión, los coeficientes de correlación fueron buenos ( 0.982 - 0.998).

De acuerdo con las constantes de unión así calculadas (Tabla 54) podemos inferir que la T514 interacciona con la ASH con 67 a un 81% más que con la ASB, esto a pH 7.2. A pH 7.4 la diferencia en la interacción es menor, ya que en los sitios NI es un 17 a un 54% mayor y en los sitios N2 es de un 2.5 a un 12.5% mayor. La diferencia es estadísticamente significativa ( $\alpha = 0.05$ ), excepto en los sitios N2 a 25 °C y a pH 7.4.

La disminución del valor de las constantes de afinidad con el incremento de la temperatura es característico de las reacciones exotérmicas, esto ya se ha reportado para muchas interacciones medicamentos-proteínas<sup>13 L 32> 33</sup>). Esto se puede ver también en el caso que nos ocupa (Tabla 54). Al incrementar la temperatura 5 °C, en el sistema con ASB a pH 7.2 la interacción disminuye en un 14 a un 35%, en el sistema con ASH a pH 7.2 la interacción disminuye en un 4 a un 20%, en el sistema con ASB a pH 7.4 la interacción en los sitios NI disminuye en un 5 a un 9% y en los sitios N2 en un 12 a un 24%, en el sistema con ASH a pH de 7.4 la interacción disminuye en un 15 a un 38%. La diferencia es estadísticamente significativa ( $\alpha = 0.05$ ).

El valor negativo del cambio de energía libre de Gibbs ( $\Delta G$ ) indica que el proceso de unión es espontáneo<sup>128> 29> 341</sup> (Tabla 55).

**TABLA 54. PARAMETROS DE UNION: T514-ASB Y T514-ASH**

Temperatura		ASB		ASH	
		pH 7.2 Ka * 10 <sup>6</sup>	pH 7.4 Ka * 10 <sup>6</sup>	pH 7.2 Ka * 10 <sup>6</sup>	pH 7.4 Ka * 10 <sup>6</sup>
20 °C	NI	0.079	0.543	0.295	1.179
	N2	0.032	0.187	0.112	0.211
25 °C	NI	0.068	0.497	0.246	0.731
	N2	0.024	0.157	0.087	0.161
30 °C	NI	0.045	0.468	0.176	0.561
	N2	0.020	0.119	0.055	0.137

Las constantes de unión están dadas en L mol<sup>-1</sup>

De acuerdo a O'Reilly<sup>32)</sup> el incremento en la interacción con un incremento en el pH (de 7.4 a 9.0) está de acuerdo con el descubrimiento (formación) de nuevos sitios de unión en la molécula de albúmina. En nuestro caso sucede de una manera similar, la diferencia en los pHs (7.2 y 7.4) es pequeña, sin embargo con un incremento en el pH hay un incremento en la interacción T514-Albúmina. La diferencia es estadísticamente significativa ( $\alpha = 0.05$ ). En el estudio con ASB, la interacción aumenta en un 83 a un 90% al incrementar el pH. Por otro lado, en el estudio con la ASH la interacción aumenta en un 50 a un 75%. Esto no coincide con un mecanismo electrostático, en el cual un incremento en el número de cargas negativas en la proteína debe llevar a una disminución en la unión<sup>35, 36, 37)</sup>

Además, si la naturaleza de las interacciones proteína toxina fuera principalmente electrostática, es decir, si la parte iónica de la molécula de T514 se combinara con la parte catiónica de la molécula de albúmina, la principal fuente del valor del AG debería derivarse de una gran contribución del AS con poca contribución del factor AEh<sup>31)</sup>. Sin embargo, los parámetros termodinámicos de la unión de T514-Albúmina (Tabla 55) indican una gran contribución del AH al valor del AG (esta contribución es aproximadamente del 40 a un 90%). Es muy poco probable que la unión sea electrostática, por lo tanto, la porción significativa de la energía de unión puede ser derivada de otras fuentes.

Como se observa en la Tabla 55, el factor de desorden molecular (AS) para la unión de la T514 a la albúmina sérica en unos casos fue mayor que cero y en otros menor. De manera muy simple, se puede esperar que el cambio de entropía (AS) en la formación de un complejo sea marcadamente negativo a causa de una restricción en la entropía de traslación y de rotación acompañada de una disminución en el número de iones en solución. El AS positivo, usualmente es atribuido a desorientación y desdoblamiento de la molécula de proteína. Sin embargo, es poco probable que el cambio de entropía positivo sea el resultado de una desorientación significativa de la molécula de albúmina, al menos para las primeras moléculas iónicas de la T514, ya que la reacción fue exotérmica mientras que un proceso de desdoblamiento con rupturas de uniones debe ser una reacción endotérmica<sup>32- 34, 37)</sup> En este caso debe considerarse el papel del solvente acuoso. Cuando un compuesto se disuelve en un solvente polar, la solvatación de iones y grupos polares es un factor importante en la reducción de la entropía del sistema. Debido a que las moléculas de albúmina y de T514 se hidratan en solventes acuosos, la interacción debe incrementar el número de especies moleculares en la unión debido a la liberación de agua de solvatación de ambas moléculas. Por lo tanto, se puede esperar un incremento en la entropía para la interacción<sup>2)</sup>.

De acuerdo a CTReillyG2) el incremento en la interacción con un incremento en el pH (de 7.4 a 9.0) está de acuerdo con el descubrimiento (formación) de nuevos sitios de unión en la molécula de albúmina. En nuestro caso sucede de una manera similar, la diferencia en los pHs (7.2 y 7.4) es pequeña, sin embargo con un incremento en el pH hay un incremento en la interacción T514-Albúmina. La diferencia es estadísticamente significativa ( $\alpha = 0.05$ ). En el estudio con ASB, la interacción aumenta en un 83 a un 90% al incrementar el pH. Por otro lado, en el estudio con la mVetacción anmcnVa en nn 50 ann 159c. LAO no coincide con un mecanismo electrostático, en el cual un incremento en el número de cargas negativas en la proteína debe llevar a una disminución en la unión<sup>35, 36> 37\</sup>

Además, si la naturaleza de las interacciones proteína toxina fuera principalmente electrostática, es decir, si la parte iónica de la molécula de T514 se combinara con la parte catiónica de la molécula de albúmina, la principal fuente del valor del AG debería derivarse de una gran contribución del AS con poca contribución del factor AH<sup>(31)</sup>. Sin embargo, los parámetros termodinámicos de la unión de T514- Albúmina (Tabla 55) indican una gran contribución del AH al valor del AG (esta contribución es aproximadamente del 40 a un 90%). Es muy poco probable que la unión sea electrostática, por lo tanto, la porción significativa de la energía de unión puede ser derivada de otras fuentes.

Como se observa en la Tabla 55, el factor de desorden molecular (AS) para la unión de la T514 a la albúmina sérica en unos casos fue mayor que cero y en otros menor. De manera muy simple, se puede esperar que el cambio de entropía (AS) en la formación de un complejo sea marcadamente negativo a causa de una restricción en la entropía de traslación y de rotación acompañada de una disminución en el número de iones en solución. El AS positivo, usualmente es atribuido a desorientación y desdoblamiento de la molécula de proteína. Sin embargo, es poco probable que el cambio de entropía positivo sea el resultado de una desorientación significativa de la molécula de albúmina, al menos para las primera moléculas iónicas de la T514, ya que la reacción fue exotérmica mientras que un proceso de desdoblamiento con rupturas de uniones debe ser una reacción endotérmica<sup>32, 34, 37)</sup> g<sub>n</sub> este caso debe considerarse el papel del solvente acuoso. Cuando un compuesto se disuelve en un solvente polar, la solvatación de iones y grupos polares es un factor importante en la reducción de la entropía del sistema. Debido a que las moléculas de albúmina y de T514 se hidratan en solventes acuosos, la interacción debe incrementar el número de especies moleculares en la unión debido a la liberación de agua de solvatación de ambas moléculas. Por lo tanto, se puede esperar un incremento en la entropía para la interacción<sup>^</sup>).

el cambio de entropía positivo (+AS) probablemente resultó de uniones hidrofóbicas en el cual los grupos no polares de la superficie de las moléculas de la albúmina y de la T514 se mantienen juntos, por lo tanto reducen el contacto con el agua. La exclusión del agua de los iones de T514 y de las cadenas laterales de la proteína alinea los sitios de unión y mantiene las dos superficies muy juntas y así facilita la formación de las distancias apropiadas para la formación de los puentes de hidrógeno. Se ha mostrado experimentalmente que las interacciones hidrofóbicas mejoran la formación de puentes de hidrógeno<sup>34</sup>). Así un cambio de entalpía negativo (-AH) y un cambio de entropía positivo (+AS) sugieren que las interacciones se llevan a cabo por uniones hidrofóbicas y por puentes de hidrógeno<sup>33, 34</sup>. Lo anterior se ha mostrado experimentalmente que ocurren juntos<sup>37</sup>). Por otra parte la molécula de T514 forma puentes de hidrógeno internos muy fuertes (entre los hidrógenos de los OH de los carbonos 9 y 9' y los grupos carbonilo); esto se puede observar en el hecho de que en los espectros de resonancia magnética de hidrógeno (RMN, <sup>1</sup>H) aparecen señales muy desplazadas (16.1 y 16.4 ppm), producto de la existencia de puentes de hidrógeno; esto apoya las conclusiones tentativas de que las interacciones con las moléculas de albúmina se llevan a cabo por puentes de hidrógeno.

Por otra parte, un valor del cambio de entropía cercano al cero parece indicar que las uniones hidrofóbicas no operan<sup>28</sup>). Esto se puede sugerir en los casos de las interacciones de la T514 tanto con la ASB en los sitios N2 a pH de 7.4 como con la ASHen en los sitios N2 a pH de 7.2 (Tabla 55). Tomando en consideración el valor del AH para los casos anteriores, se sugiere que las interacciones entre la Peroxisomicina A1 y la ASB y la ASH bajo esta condición experimental se llevan a cabo principalmente por medio de puentes de hidrógeno,

se puede postular también que las interacciones de la T514 con la ASB a pH de 7.2 y con la ASH a pH 7.4 se establecen a través de fuerzas de Van der Waals, ya que un valor del cambio de entropía negativo es indicativo de ello (-AS<sup>30</sup>) (Tabla 55).

**TABLA 55. PARAMETROS TERMODINAMICAS DE LA UNION:  
T514-ASB Y T514-ASH**

		ASB		ASH	
		pH 7.2	pH 7.4	pH 7.2	pH 7.4
AG(Kcalmol <sup>-1</sup> )	NI	-6.585	-7.766	-7.348	-7.995
	N2	-5.980	-7.084	-6.764	-7.097
AHt(Kcalmol <sup>-1</sup> )	NI	-8.149	-2.551	-4.631	-13.040
	N2	-7.896	-6.635	-6.443	-7.625
AS (u.e.)	NI	-5.246	+17.503	+9.116	-16.931
	N2	-6.429	+1.522	+0.977	-1.772

En cualquier caso, está claro que los parámetros termodinámicos no proveen un criterio de diagnóstico para escoger entre los tipos de fuerzas involucradas en la unión de los ligandos por las proteínas. Los valores termodinámicos no dependen de detalles moleculares. El mecanismo molecular debe armonizar con los datos termodinámicos, o ellos deben proporcionar una base para el mecanismo. Sin embargo, los datos termodinámicos por sí mismos no pueden seleccionarse entre las alternativas para una explicación molecular consistente<sup>(38)</sup>. Por lo tanto, el mecanismo exacto de la unión de la Peroxisomicina A1 a los dos tipos de albúmina (ASB y ASH) no puede ser elucidado a través de este estudio. Sin embargo, se pueden hacer ciertas conclusiones tentativas.

## CAPITULO 5

### CONCLUSIONES

La T514 (Peroxisomicina A1) interacciona fuertemente tanto con la ASB como con la ASH, como lo podemos constatar por el valor de las constantes de afinidad del orden de  $10^6$ , con lo que se acepta la hipótesis de trabajo.

Las moléculas de albúmina tienen dos tipos de sitios de unión: N1 con 3 sitios iguales y N2 con 5 sitios de unión de iguales características. Los sitios N2 tienen constantes de afinidad más débiles que los N1.

Además, los sitios de unión tienen parámetros termodinámicos diferentes para la ASB y la ASH lo cual sugiere diferencias en las regiones implicadas en ambas moléculas.

La T514 interacciona con la albúmina sérica humana de forma más fuerte que como lo hace con la albúmina sérica bovina.

La interacción de la T514 con las albúminas a pH 7.4 es más fuerte que a pH 7.2.

Al aumentar la temperatura en el sistema de estudio, la fuerza de la interacción disminuye.

## RECOMENDACIONES

Si bien he cumplido con los objetivos propuestos, considero que será de interés continuar los estudios para comprender más acerca de las interacciones de la T514 con las albúminas y realizar futuras investigaciones al respecto, como son:

- a) . Estudios de competitividad con otros fármacos para establecer el tipo de sitios de unión en las moléculas de albúmina con los que la T514 interacciona.
- b) . Estudio de la interacción de la T514 con otras macromoléculas como la enzima catalasa (esto por la acción que tiene la T514 de inhibir la actividad de dicha enzima).
- c) . Estudio de las interacciones de la T514 con el ADN.

## BIBLIOGRAFIA

1. Kalant, H., and Roschlau, W. H.F., Principles of Medical Pharmacology, B. C. Decker Inc., Toronto; Philadelphia, Ch 3, 29-31, (1989).
2. Helman, J. Farmacotecnia teórica y práctica. Tomo III, 3 Ed. Cía Editorial Continental, S. A. (cecsa), México. 2531-2532, (1982).
3. García-Valdecasas, F., Farmacología, Ed. Espaxs, España. Cp 2, 41-43, (1978).
4. Velázquez, B., Farmacología y su proyección a la clínica, Ed. Oteo, España. 40-43, (1987).
5. Koch-Weser, J., Sellers, E., Binding of Drugs to Serum Albumin. *The New England Journal of Medicine*. 294,311- 316, (1976).
6. - Bevan, J. and Thompson, J., Essentials of Pharmacology, Ed. Harper & Row Publishers Inc., Philadelphia. 2-4, (1983).
7. Bush, M. and Alvin, J. Characterization of Drug-Protein Interactions by Classic Methods. *Annals New York Academy of Sciences*, 226, 36-43, (1973).
8. Seville, B., Zini, R., Madjar, C.-V., Thuaud, N., and Tillement, J.-P. Separation Procedures Used to Reveal and Follow Drug-Protein Binding. *Journal of Chromatography*, 531, 51-77, (1990).
9. Harris, C.R. and Bashford, C.L. Spectrophotometry and Spectrofluorimetry, IRL Press, Oxford: Washinston, D.C. Cp 4, pp 91-113, (1988).

Tinoco, I., Sauer, K., Wang, J. C., Físicoquímica: Principios y aplicaciones en las ciencias biológicas. Prentice-Hall International, Englewood. Cp 5, 160- 162, (1980).

Scatchard, G. The Attractions of Protein for Small Molecules and Ions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 51, 660-672, (1949).

Goldstein, A., Aronow, L. y Kalman, S. Farmacología. Limusa, 1979. 2nd. Edición en inglés, primera en español. Cp 1, 57-61.

Honoré, B., Conformational changes in human serum albumin induced by ligand binding. Tesis 8-9 (1990).

Fernández, R., Nombres comunes, usos y distribución Geográfica del Género *Karwinskia* (Rhamnaceae) en México. *Anales Inst. Biol. Univ. Nac. Autón. México, Ser. Bot.* 63, (1), 1-23, (1992).

Padrón, R, Estudio Clínico Experimental de la Parálisis por *Karwinskia humboldtiana* (Tullidora) en Niños. *Gaceta Médica de México*, Tomo LXXXI, 299-310, (1995).

Puertolas, M., Nava, O., Medina, H., López, F. y Oyervides, J., Polirradiculoneuritis por *Karwinskia Humboldtiana*, Informe de Seis Casos. *Rev. Méd. IMMS.*, México, 22, 25, (1984).

Dreyer, D., Arai, I., Bachman, C., Anderson, W., Smith, R., and Daves, D. Toxins Causing Noninflammatory Paralytic Neuronopathy. Isolation and Structure Elucidation. *Journal of the American Chemical Society.* 97, 4985-4990, (1975).

Bermúdez, M. V, González Spencer, D., Guerrero, M., Waksman, N., Piñeyro, A., “Experimental Intoxication with Fruit and Purified Toxins of Buckthorn (*Karwinskia humboldtiana*)”, *Toxicon*, 24; 1091-1097, (1986).

Bermúdez, M. V, Martínez, F. J., Salazar, M. E., Waksman, N. and Piñeyro, A. Experimental acute intoxication with ripe fruit of *Karwinskia humboldtiana* (Tullidora) in rat, guinea-pig, hámster and dog. *Toxicon*, 30, 1493-1496, (1992).

Piñeyro, A., Martínez, L and González, R. In vitro selective toxicity of toxin T-514 from *Karwinskia Humboldtiana* (buckthorn) plant on various human tumor cell lines. *Toxicology*, 92, 217-227, (1994).

Garza, L., Hiseh, G., Acosta, D., Torres, O. and Piñeyro, A., Toxicity assesement of toxins T514 and T544 of buckthorn ( *K. humboldtiana*) in Primary skin and Liver Cell Cultures. *Toxicology*, 13, 191-201, (1992).

Sepulveda, J., van der Klei, I. J., Piñeyro, A., Harder, W. and Veenhuis, M. *FEMS Microbiology Letters*, 91, 207-212, (1992).

Moreno, M., Vargas, R., Esquivel, D., Waksman, N. and Piñeyro, A. Effect of peroxisomicine and related anthracenones on catalase activity. *Planta Medica*, 61, (4), 337-340, (1995).

artínez, L. E. Estudio de las Propiedades Fisicoquímicas de Toxinas Aisladas de *karwinskia Humboldtiana*. Tesis de maestría. U.A.N.L., Monterrey, Nuevo León, p. 37, 48 (1990).

usko, W. and Gretch, M. Plasma and Tissue Protein Binding of Drugs in harmacokinetics. *Drug Metabolism Reviews*, 5, (1), 43-140, (1976).

alfman, C., Nishida, T., Method for Measuring of Small Molecules to Proteins omBinding-Induced Alterations of Phisical-Chemical Properties. *Biochemistry*, ,(18), 3493-3498,(1972).

ntner, C., Geigy Scientific Tables. 136-137, (1984).

Sathyanarayana, M., Upadrashta and Dale Eric Wurster. Equilibrium Binding Studies of the Interaction Between Anthralin and Bovine Serum Albumin.

*International Journal of Pharmaceutics*, 49, 103-108, (1989).

Dale Eric Wurster and Sathyanarayana, M.,Upadrashta. Equilibrium Binding Studies of the 1,8-Dihydroxy-9,10-Antraquinone Bovine Serum Albumin Interaction. *Internactional Journal of Pharmaceutics*, 55, 221-227, (1989).

Nishijo, J.,Morita, N.,Asada, A., Nakae, H., and Iwamoto, E. Interaction of Theophylline with Bovine Serum Albumin and Competitive Displacement by Benzoic Acid. *Chem. Pharm. Bull*,33, (7) 2648-2653, (1985).

O'Reilly, R. and Kowitz, P. Studies on the Coumarin Anticoagulant Drugs: Interaction of Human Plasma Albumin and Warfarin Sodium. *Journal of Clinical Investigation*. 46, 829-837, (1967).

O'Reilly, R. Interaction of the Anticoagulant Drug Warfarin and Its Metabolites with Human Plasma Albumin. *Journal of Clinical Investigation*. 48, 193- 202, (1969).

O'Reilly. The Binding of Sodium Warfarin to Plasma Albumin and its Displacement by Phenylbutazone. *Annals New York Academy of Sciences*, 226, 293-308, (1973).

Goto, S., Odawara, Y. Nakano, M. and Araki, Y. Binding of Comercial Diuretics with Bovine Serum Albumin. *Chem. Pharm. Bull*. 26, 2298- 2304, (1978).

Klotz, I., Walker, F. and Pivan, R. The Binding of Organic Ions by Proteins. *Journal American Chemical Society*. 68, 1486- 1490, (1946).

Klotz I. The Effects os Salts and Protein on the Spectra of some Dyes and Indicators. *Chemical Review*. 41, 373- 399, (1947).

Klotz, I. and Urquhart J. The Binding of Organic Ions by Proteins. Effect of Temperature. *Journal America Chemical Society*. 71, 847-851, (1949).

Nemethy, G., Steinberg, I. and Scheraga, H. Influence of water structure and hydrophobic interactions on the strength of side-chain hydrogen bonds in proteins. *Biopolymers*, 1, 43-69, (1963).

Klotz, I. Physicochemical Aspects of Drug-Protein Interactions: a General Perspective. *Annals of New York Academy of Sciences*. 226, 18-35, (1973).