

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
Departamento de Físico-química y Técnicas Instrumentales



TESIS DOCTORAL

**Interacciones de la dicloxacilina con seroalbumina e
influencia de la vitamina B12**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Rosa Pablos Sanchez

DIRECTOR:

Isabel Cayre Serrano

Madrid, 2015

TP
1981
028

Rosa Pablos Sánchez



* 5 3 0 9 8 5 4 6 6 7 *
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

X - 92 - 22664 9

INTERACCIONES DE LA DICLOXACILINA CON SEROALBUMINA
E INFLUENCIA DE LA VITAMINA B₁₂

Departamento de Físico-Química y Técnicas Instrumentales
Facultad de Farmacia
Universidad Complutense de Madrid
1981



BIBLIOTECA

© Rosa Pablos Sánchez
Edita e imprime la Editorial de la Universidad
Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía
Noviciado, 3 Madrid-8
Madrid, 1981
Xerox 9200 XB 480
Depósito Legal: M-2134-1981

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

FACULTAD DE FARMACIA

INTERACCIONES DE LA DICLOXACILINA CON
SEROALBUMINA E INFLUENCIA DE LA VITA-
MINA B₁₂

Memoria para aspirar a la obtención del
grado de Doctor en Farmacia por:
ROSA PABLOS SANCHEZ

DON ENRIQUE OTERO AENLLE, CATEDRATICO DE
FISICO-QUIMICA DE LA FACULTAD DE FARMACIA.
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID.

CERTIFICA: Que la presente memoria experimental y
bibliográfica para optar al grado de doctor en farmacia ,
elaborada por D^a Rosa Pablos Sánchez ha sido realiza-
da bajo la dirección de D^a Isabel Cayre Serrano, se en-
cuentra ya ,concluida,por lo cual autorizo su presentación
a fin de que pueda ser juzgada por el Tribunal correspon-
diente.

Y para que asi conste , expido y firmo la presente en
Madrid, Febrero 1.980

A mi esposo e hijos por su constante estímulo

Agradecimiento

Quisiera manifestar mi más sincero agradecimiento al Doctor D. Enrique Otero Aenlle por su confianza y estímulo en la realización de la presente memoria.

A la Doctora D^a Isabel Cayre Serrano por la dirección y consejo en la forma de orientar el presente trabajo.

Al Doctor D. José Ramón Chantres Antorana por su ayuda.

También deseo expresar mi gratitud a todos los compañeros y personal del Departamento por su colaboración desinteresada.

INDICE

	<u>Paginas</u>
Introducción.....	1
Objetivo y planteamiento.....	4

PARTE GENERAL

Seroalbúmina.....	7
Dicloxacilina.....	17
Vitamina B ₁₂	23
Unión de medicamentos a proteínas plasmáticas Factores interferentes en los métodos fisicoquímicos.....	30
Estudio de las interacciones.....	33
Métodos de unión " In Vitro" de medicamento a seroalbúmina	54

PARTE EXPERIMENTAL

Métodos de valoración.....	81
----------------------------	----

	<u>Páginas</u>
Aparatos	82
Espectros de absorción de la Dicloxacilina, Proteína y vitamina B ₁₂	89
Diálisis de equilibrio	93
a) ensayo dicloxacilina SAH.	96
b) ensayo vitamina B ₁₂ - SAH.	115
c) ensayo dicloxacilina - vit B ₁₂ -SAH.	134
Ensayos de Fluorescencia.	147
a) dicloxacilina - SAH	159
b) Influencia de la vitamina B ₁₂ en la fluorescencia de la seroalbúmina	172
c) Amortiguación de la fluorescencia en la asociación de dicloxacilina a la seroal- búmina, en presencia de vitamina B ₁₂	178
Resultados y Discusión.	190
Resumen y conclusiones	199
Bibliografía	202

INTRODUCCION

El conocimiento de los antibióticos ha constituido uno de los principales problemas desde que se inició el descubrimiento y la investigación sobre éstos fármacos y actualmente se está prestando una gran atención a los métodos para su estudio y análisis. Anteriormente el mayor interés cifraba en las técnicas para obtener antibióticos en productos naturales, ya que la síntesis de los antibióticos se ha realizado en las últimas décadas.

El desarrollo de procedimientos prácticos para el análisis de antibióticos integrantes de preparaciones farmacéuticas en muestras biológicas ; sangre, orina, o en los órganos de animales de experimentación tiene una especial importancia en Medicina, y el empleo progresivo de antibióticos sintéticos ha proporcionado un mayor estímulo al perfeccionamiento de los métodos para la determinación de antibióticos utilizados en medicina humana y animal (veterinaria).

Los primeros análisis de antibióticos se hicieron empleando métodos biológicos y los efectos específicos producidos en animales de experimenta-

ción sirvieron de base para la valoración cuantitativa de los mismos. Los métodos químicos y fisicoquímicos se han ido desarrollando gradualmente y han ido reemplazando a los métodos biológicos, por lo mismo el empleo de los métodos biológicos se van limitando sucesivamente pues requieren mayor tiempo para su ejecución, son normalmente más caros, y sus límites de error son con frecuencia amplios.

La gran mayoría de los medicamentos utilizados en la terapéutica moderna se unen en proporciones variables a la seroalbúmina u otras proteínas plasmáticas o tisulares, constituyendo ésta unión una interacción reversible análoga a la que tiene lugar entre enzima y substrato, con la diferencia de que el medicamento unido a proteína no origina nuevos productos y se comporta como un reservorio inactivo de medicamento, que podrá desencadenar el efecto terapéutico una vez disociado de su combinación al soporte proteico ().

En el caso concreto de antibióticos y en general de agentes quimioterápicos, el grado de combinación de medicamentos con seroalbúmina supone por una parte la prolongación de la semi-vida del medicamento, por otra que las concentraciones de medicamento libre son muy inferiores a las concentraciones totales de medicamentos en plasma. La fracción de medicamento unida a seroalbúmina es inactiva. La forma llamada libre (no fijada), es la farmacológicamente activa y difusible. Y es ésta, la responsable de la actividad biológica del medicamento que se utilice y de su difusibilidad

a las distintas estructuras tisulares a las que interesa que el medicamento llegue con una concentración eficaz . El equilibrio entre la porción de medicamento fijada y la porción libre en sangre depende de factores múltiples como pueden ser naturaleza química del medicamento, especie animal, condiciones fisicoquímicas del medio etc.

El estudio de los parámetros de interacción puede realizarse " in vitro " e "in vivo ". Los resultados obtenidos por técnicas "in vitro " nos permiten una aproximación racional y bastante exacta para poder prever el comportamiento " in vivo " del medicamento a efectos de su unión a seroalbúmina, confinamiento en compartimento plasmático, extravasación y demás parámetros farmacocinéticos que puedan depender de la interacción medicamentos-seroalbúmina. Teniendo en cuenta que las técnicas " in vitro " tienen interés cuando la sustancia a experimentar se fija a seroalbúmina en proporciones relativamente altas. ()

OBJETIVO Y PLANTEAMIENTO

Basándonos en que la unión de los medicamentos a las diferentes proteínas séricas o tisulares pueden influir sobre su acción terapéutica, farmacodinámica y tóxicológica, y teniendo en cuenta la trascendencia de este fenómeno, hemos elaborado nuestra memoria experimental de grado de doctor de una forma muy específica y concreta. Tratándose de un estudio "in vitro" de la fijación de un medicamento a proteína plasmática. El medicamento objeto de estudio ha sido la dicloxacilina y como proteína hemos utilizado seroalbúmina humana observando asimismo la influencia que tiene en el fenómeno la vitamina B₁₂. Los métodos que se han utilizado son el de Diálisis de equilibrio y el de la amortiguación de la Fluorescencia. El tratamiento de datos ha sido realizado por el método de Scatchard y de Regresión lineal.

Los resultados obtenidos por la utilización de técnicas "in vitro" nos ha permitido una aproximación racional y suficientemente exacta para poder prever el comportamiento a efectos de su unión a seroalbúmina, confinamiento en compartimento plasmático, extravasación y

demás parámetros farmacocinéticos que pueden depender de la interacción del medicamento con seroalbúmina.

Las penicilinas naturales administradas por vía oral se destruyen en un ochenta por ciento por el jugo gástrico y por la penicilinasas de la flora intestinal, de forma que para conseguir niveles eficaces hay que dar dosis cinco veces superiores a las parenterales. La cefalosporinas se absorben todavía peor que las penicilinas y análogo comportamiento tienen la alilmercaptopenicilina y la meticilina.

Debido a esto en los últimos años, los intentos de desarrollar nuevas penicilinas a través de la modificación molecular han sido amplios y afortunados, esforzándose en encontrar la denominada " penicilina ideal ", (estable frente a los ácidos y a las beta - lactamasas, bien absorbidas, poco ligable al suero, no alérgica y con un amplio espectro de actividad antibacteriana), por lo que hemos considerado interesante el estudio de la DICLOXACILINA.

PARTE GENERAL

SEROALBUMINA HUMANA

Estructura.- El plasma contiene gran cantidad de proteína, el 50% de las proteínas plasmáticas lo constituyen la albúmina, luego la albúmina humana, es una proteína plasmática con un peso molecular que oscila entre 66.300 y 69.000, dependiendo de la suma de pesos residuales del análisis de aminoácidos, o de las propiedades físicas de los coeficientes de sedimentación y difusión empleados. La seroalbúmina contiene 584 aminoácidos con gran abundancia en ácidos glutámicos y aspárticos y con un notable defecto en triptofano. La albúmina produce el 80% de la presión oncótica del plasma aunque esta presión oncótica no es una función lineal de la albúmina pues cuando la concentración de albúmina disminuye a la mitad de lo normal, la presión oncótica baja a un tercio. (1). Un punto de interés, como indica Howland es la variación de la presión oncótica entre la bipedestación y la posición supina. (2)

La albúmina sanguínea que constituye entre el 30 y 40% de la albúmina del cuerpo, está en intercambio activo con otros fluidos del organismo.

El 10% o más de la albúmina circulante pasa cada hora al fluido intersticial desde donde es retornada a la sangre, via sistema linfático.

La albúmina tiene una gran actividad para combinarse, de manera reversible con cationes y aniones, por lo que tiene vital importancia en el transporte o inactivación de un sin número de sustancias, incluyendo metales, medicamentos, colorantes, ácidos grasos, hormonas y enzimas. Y son los medicamentos acídicos los generalmente más ávidamente unidos (3).

(4) Goldstein recogió en 1.949 toda la información obtenida hasta aquel momento sobre las interacciones entre medicamentos y proteínas, este trabajo sirvió de estímulo para que numerosos investigadores se ocupasen del tema tratando de contestar a las cuestiones planteadas por Scatchard: ¿ Por qué ?, ¿ donde ?, ¿ cuantos ?, ¿ qué cantidad ?, ¿ en qué extensión ? (5)

Actualmente se acepta que un gran número de los medicamentos utilizados en la terapéutica moderna se unen, en grado variable, a las proteínas plasmáticas de forma reversible, con lo que se modifican algunos parámetros farmacocinéticos del medicamento en cues

tión. Van Os y colaboradores (6) observan la influencia que tienen la unión de medicamentos a proteínas plasmáticas en cuanto a eliminación, concentración en tejidos, actividad y toxicidad.

Brodie (7) observa la importancia de los medicamentos que interactúan al penetrar a través de las membranas biológicas.

Al llegar el medicamento al compartimento plasmático difunde hacia el fluido extramuscular y esta transferencia de un compartimento a otro es función de la concentración libre del fármaco, por lo que el equilibrio se ve afectado al modificarse la proporción de medicamento libre como consecuencia de la fijación a proteínas plasmáticas.

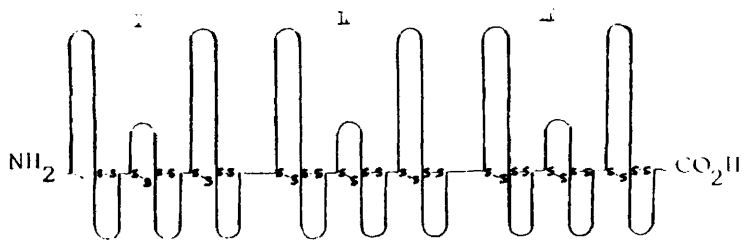
Son varias las clases de proteínas plasmáticas que interactúan con pequeñas moléculas pero la fracción que contribuye más poderosamente a la unión con medicamentos es la seroalbúmina. Con un peso molecular de 69.000 y un punto isoeléctrico de pH 5, presenta alrededor de 100 puntos de carga positiva y otros tantos de carga negativa por molécula. El número de puntos de unión es muy inferior al de puntos de carga, y las características de la unión dependen fundamentalmente de la estructura molecular del medicamento.

La naturaleza y mecanismo íntimo de la unión de medicamentos

a proteínas circulantes es bastante confusa y todavía no se ha formulado un mecanismo general de interacción existiendo diversas teorías según los autores: Geisow (8) hace referencia a un modelo de Brown que supone un motivo formado por dobles bucles o dobles curvas cruzadas por restos de cisteína adyacentes que definen tres regiones homólogas de las cadenas: marcadas I, II y III en la figura número (1) que forman compartimentos tridimensionales y esta suposición junto con el número considerable de restricciones impuestas por 17 puentes de disulfuro, ha conducido a la idea de que cada recinto está formado por 6^αhélices (tres dobles bucles) que definen una forma cilíndrica y la albúmina está formada por tres recintos cilíndricos de este tipo.

En ellos se encuentran las cadenas de puntos liofóbicos y la entrada a los recintos está formada por los bucles largos con cadenas positivas localizadas, con las que se unen los aniones orgánicos que actúan como ligandos de la seroalbúmina. Y llega a indicar que los ácidos grasos se ligarán de preferencia al cilindro número III, mientras la bilirrubina y otros ligandos aromáticos prefieren los recintos I, y II.

Karush dice la seroalbúmina posee una adaptabilidad configura-



ESTRUCTURA DE LA SEROALBUMINA SEGUN BROWN

Figura nº 1

cional para una gran variedad de pequeñas moléculas, de tal manera que los puntos de unión se van formando o configurando durante el proceso de interacción por el medicamento (9).

MC. Dougal expresa de acuerdo con Yu y sus colaboradores que en medicamentos ácidos, como el ácido acetilsalicílico, los puntos receptores son la función amino del grupo lisina de la albúmina (10).

Skidmore y Whitehouse (11) establecen para medicamentos antiinflamatorios, como fenilbutazona e indometacina, una primera unión a la molécula de seroalbúmina por medio de fuerzas electrostáticas.

(12) Cho y sus colaboradores expresan que la unión de la seroalbúmina humana y la bis-hidroxicumarina sería el resultado de una transferencia de moléculas hidrofóbicas de un medio acuoso a una región de menor constante dieléctrica, con disminución de la entalpia del sistema.

La albúmina mantiene marcadamente constante el anabolismo, catabolismo y la consiguiente concentración plasmática en situaciones de salud aunque hay diversos factores que influyen en la síntesis de albúmina, entre los que se encuentran la nutrición, el medio

ambiente, el entorno hormonal y la presencia de una enfermedad. Entre las hormonas que han demostrado afectar a la síntesis de albúmina están; la hormona tiroidea, insulina, hormona de crecimiento, testosterona ACTH y hormonas adrenocorticales (13).

Cuando la nutrición, medio ambiente, entorno hormonal y la salud son normales, el principal regulador de la síntesis de albúmina es la presión coloidosmótica en los lugares de síntesis o cerca de ellos. El contenido de albúmina dentro de las células hepáticas donde se sintetiza, se estima que corresponde a 200 mcg/g - 500 mcg/g de tejido hepático (La extraordinaria capacidad de síntesis proteica del hígado se comprueba indirectamente en el hombre en ciertos casos de nefritis y nefrosis, en los que pueden eliminarse diariamente de 15 a 20 g de proteínas durante largos periodos sin que lleguen a aparecer modificaciones graves en la concentración de seroalbúmina). Después de la síntesis, las moléculas de albúmina pueden alcanzar el torrente circulatorio por dos caminos:

primero - pasar directamente a través de la pared de la célula hepática a los sinusoides

segundo - pasar al espacio de Disse y desde

alli a los linfáticos hepáticos, al conducto tráxico, y finalmente al es pacio intravascular.

La semivida de la albúmina oscila entre 10 y 25 días, aproximadamente es de 17 días (14) . La concentración de albúmina en líquido intersticial es del 20 al 80 % de la concentración plasmática, siendo esta de 3'5 a 4'5 g/ 100 ml (15).

La fracción albúmina parece sintetizarse de modo exclusivo en el hígado, no obstante, algunos investigadores sostienen que su formación dentro del hígado no la realizarían los propios hepatocitos, sino las células del sistema reticuloendotelial.

El catabolismo tiene lugar en distintos puntos preferentemente hígado, riñones y tracto-gastrointestinal (16).

La albúmina disponible comercialmente es una solución esteril de albúmina sérica preparada a partir de un pool de sangre humana normal, plasma, suero o placentas, de acuerdo con las exigencias establecidas en diversas farmacopeas. No menos del 96 % del total de proteínas en el producto es albúmina. Cada unidad de plasma empleado en la preparación de albúmina ha dado resultado negativo frente al antíge no de superficie de la hepatitis B (H B _s A)

y el producto es pasteurizado a 60 ° C durante 10 horas.

Las soluciones de albúmina no contienen isoaglutininas clínicamente significativas ni otros anticuerpos el pH de la soluciones de albúmina se ajusta a 6,4 - 7,4 con carbonato sódico, bicarbonato sódico y / o ácido acético. En el comercio nos encontramos que el producto tiene caprilato sódico y acetil triptófano sódico como estabilizadores. (17)

FUNCIONES FISIOLÓGICAS

Desde un punto de vista teórico, el empleo terapéutico de la albúmina será correcto siempre que se aprovechen las propiedades fisiológicas de la misma. Sin embargo, en muchos estados clínicos con indicación teórica su empleo se ve restringido, pues hay que contar con dos problemas que a nivel hospitalario hacen disminuir el número de cuadros clínicos en que está indicado su uso, como son su alto coste y, en ciertas ocasiones, su ausencia en el mercado.

Su relativamente bajo Pm y su alta concentración en plasma le hacen el mayor determinante de la presión oncótica.

Una de sus funciones más importantes es la de servir de transportador de materiales endógenos y pequeñas moléculas, como son los medicamentos en la sangre. Los medicamentos como compuestos endógenos que son cuando están unidos a seroalbúminas son biológicamente inactivos. La unión a seroalbúmina puede considerarse como una forma de suprimir la potencial actividad biológica de una amplia variedad de compuestos, así como un reser-

torio de los mismos.

El empleo terapéutico de la albúmina está claramente indicado en shock hipovolémico, es decir en estados en que la gravedad del cuadro se deba a la pérdida de plasma más que a la pérdida de hematies (18,19), como es el shock debido a quemaduras, traumatismos, aplastamientos, etc.

Cada gramo de albúmina administrada arrastra aproximadamente 20 ml. de agua al compartimento vascular.

Quemados.- Durante las primeras 24 horas, después del accidente térmico, hay un incremento en la permeabilidad del lecho vascular con pérdidas de agua y proteínas al compartimento extravascular con la consiguiente hemoconcentración intravascular; en estas circunstancias se deben administrar grandes cantidades de solución cristaloide y menores cantidades de albúmina para mantener el volumen plasmático y contenido proteico apropiados. Pasadas las primeras 24 horas, cuando el endotelio ya ha recobrado su grado normal de permeabilidad, pero todavía hay un notable edema cutáneo (y en otras áreas afectadas por quemaduras) se usarán mayores cantidades de albúmina y menores de soluciones cristaloides (14,3)

Hipoproteinemia.- Es lógico pensar que en las situaciones con descenso en la concentración plasmática de proteínas, ya sea por exceso en las pérdidas (nefrosis) ya sea por déficit de síntesis (cirrosis) se traten con administración de albúmina, que es la proteína plasmática más importante cuantitativamente hablando. (20, 21)

DICLOXACILINA

El grupo isoxazolid-penicilina o grupo isoxazólico, ha sido estudiado con intensidad en estos últimos años por reunir dos condiciones esenciales:

- a).-Estabilidad del fármaco en el medio gástrico
- b).-Resistencia al poder destructor de la penicilinasa segregada por el estafilococo.

Este grupo está integrado por diversas penicilinas sintéticas como oxacilina, cloxacilina, dicloxacilina, nafcilina, difenicilina y glucoxacilina, siendo de mayor importancia las tres primeras. (22)

Su modo de acción es de tipo bactericida en fase de multiplicación. Son activas frente a estreptococos del grupo A y a estafilococos penicilin susceptibles. Presentan intensa unión a proteínas plasmáticas con una proporción del 95' - 98%. (23)

La dicloxacilina, es la más efectiva de las penicilinas isoxazólicas para el tratamiento de infecciones por estafilococos en seres hu

manos. Posee una marcada acción sinérgica con la ampicilina contra *Aerobacter*, *Próteus*, *Klebsiella*, especies de *Shigella*, *Pseudomonas pyocyanea*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus fecalis*. También inhibe la degradación de la ampicilina por la penicilinasa aislada de *Escherichia coli* o *Staphylococci* resistentes a la penicilina.

La dicloxacilina, es estable en el medio gástrico y buena su absorción en el tracto intestinal comparativamente mayor a la de la oxacilina y cloxacilina. Esta absorción aumenta en proporción a la cantidad suministrada y logra obtener niveles sanguíneos altos importantes.

Las elevadas concentraciones en suero de la dicloxacilina no son debidas probablemente solo, a la mejor absorción por el tracto intestinal sino a una combinación de factores: Así la oxacilina, da más bajo nivel en sangre debido a su muy rápida destrucción y excreción por el hígado. La cloxacilina y dicloxacilina se metabolizan por el hígado en más baja proporción. La dicloxacilina también da más elevadas concentraciones en suero puesto que se excreta en menor cantidad por los riñones.

En resumen, por dar más elevadas concentraciones en suero, la

dicloxacilina es significativamente más activa frente a los estafilococos productores de penicilinas que cualquiera de las otras penicilinas isoxazólicas.

Los estafilococos coagulasa positivos y meticilín - resistentes aislados de exudado nasal son también inhibidos por bajas concentraciones de dicloxacilina, siendo aquí las diferencias muy llamativas si la comparamos con la oxacilina.

Las infecciones clínicas debidas a cepas meticilín - resistentes se han encontrado raramente, pero la dicloxacilina da buenos valores terapéuticos si acaso ocurre.

Las tres principales penicilinas isoxazólicas tienen como vemos, un elevado grado de afinidad por las proteínas del suero, pero la ligadura a las proteínas plasmáticas en el caso de la dicloxacilina es aún más fuerte. (

(24) J. Ximénes y J. Perche de Menezes han realizado estudios de niveles sanguíneos tras la administración oral de trihidrato de ampicilina y dicloxacilina sódica juntas, frente a las dosis orales de ambos antibióticos por separado. En el trihidrato de ampicilina se obtienen los mismos niveles sanguíneos en la administración aislada y en la mezcla y lo mismo pasa con la dicloxacilina (un poco más en combinación).

Los mismos autores, comparan la ampicilina potásica en mezcla con dicloxacilina sódica, con la absorción oral de cada antibiótico por separado. Los resultados son semejantes a los anteriores.

(25) Ch. F. Graven Kemper, J.V. Benet, J. L. Brodie y W.M. Kirby realizaron una comparación farmacológica " in vitro " con oxacilina y cloxacilina y estos mismos autores compararon varias propiedades "in vitro" y farmacológicas de la dicloxacilina con las de la oxacilina y cloxacilina. El efecto de las proteínas séricas sobre la actividad de estos tres antibióticos lo estudiaron por tres métodos: Método de dilución , método de placas modificado (el organismo test es la *Sarcina lútea*) de Schollan y Schmidt y un tercer método por el procedimiento de ultrafiltración.

Tampoco la dicloxacilina disminuye la actividad frente a neumococos, como sucede con la cloxacilina. Administrada por vía oral produce niveles sanguíneos cuatro veces más elevados que la oxacilina y dobles que la cloxacilina. (26)

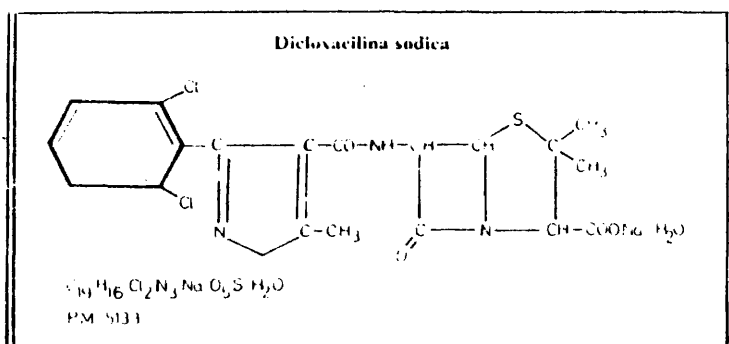
Nosotros hemos utilizado la DICLOXACILINA SODICA, que es un polvo cristalino de color blanco y sabor amargo, inodoro, soluble en agua, metanol y butanol, el pH está comprendido entre 5'5 y 8. La

humedad no debe exceder del 5 por 100. (27)

Reacciones de identificación, -

- 1) Se incinera una pequeña muestra; el residuo de las reacciones características del sodio.
- 2) Se incinera una pequeña muestra en un crisol con exceso de carbonato sódico anhidro. El residuo de las reacciones características del cloro.

Valoración - Puede determinarse su riqueza por la técnica de Schmith incluida en la Farmacopea Británica y por el método yodométrico, según descripción de la F. D. A.



5 - Metil - 3 - diclorofenil - 4 - isoxazolilpenicilina

FIGURA N° 2

La presencia del segundo átomo de cloro en el grupo fenilo, con fiere a la dicloxacilina mayor actividad, especialmente frente a los estafilococos productores de penicilinas. (28)

V I T A M I N A B₁₂

Conocida por factor extrínseco, factor L. leichmanni, factor antitiroides, factor de empollado de las gallinas (hatchability - factor), factor del estiércol de vaca (cow manure factor), hemógeno, eritrotina, factor antianémico, factor lactobacillus lactis Dorner, o (FLLD), EMF (eritrocito maduración factor). APAF (antipernicioso anémico factor). HGF (human growth factor).

Internacionalmente se conocen varias sustancias con actividad vitamínica B₁₂ : cianocobalamina (B_{12a}), hidroxicobalamina (B_{12b}), nitrocobalamina o nitritocobalamina (B_{12c}) que, en general se designan con el nombre de cobalaminas.

La vitamina B₁₂ se encuentra en múltiples microorganismos, principalmente en bacterias y actinomicetos; en los hongos aumenta su proporción por adición de cobalto a los cultivos. La levadura carece de ella prácticamente y tampoco ^{existe.} en las plantas superiores.

Donde se encuentra en proporción bastante elevada es en los materiales de origen animal, especialmente hígado, riñón, estómago, carne muscular. También existe en los huevos, queso, caseína comercial, etc. En muchos casos es necesario liberarla mediante tratamiento enzimático con proteidasa, ya que se encuentra ligada en forma de complejo protídico, como ocurre, por ejemplo en el hígado.

En principio se obtuvo extrayéndolo del hígado. En la actualidad la fuente industrial de obtención de esta vitamina son los líquidos de fermentación del *Streptomyces olivaceus*, *Streptomyces rosochromogenus*, *Streptomyces antibioticus*, *Mycobacterium smegmatis*, *Lactobacillus arabinosus*, etc. pero principalmente a partir del *Streptomyces griseus*.

(29) La estructura esencial de la vitamina B₁₂ representa un nuevo tipo de anillo compuesto similar, y sin embargo, con diferencias al tetrapirrólico de las porfirinas. Consta en efecto, de cuatro anillos eslabonados, cada uno compuesto de cuatro átomos de carbono y un átomo de nitrógeno, pero cada anillo tiene por lo menos, un átomo de carbono tetraconstituido; por tanto, le falta la doble ligazón del anillo pirrol.

Como en la estructura de la porfirina, los cuatro anillos en la molécula de la vitamina B₁₂ van unidos por tres —C— puentes, pero el eslabón final de cierre, que une a los A y D, es directo. El único átomo de cobalto de la molécula ocupa el centro al estado de complejo interno, como el magnesio en la clorofila, y el hierro en los hemos, y lleva además

un grupo cianuro; de ahí el nombre de cianocobalamina que se le aplica. 25

Mapas de densidad electrónica y datos cristalográficos, como también el análisis clínico, demuestran las características detalladas de las cadenas laterales fijas en los anillos. Existen tres de acetamida, tres de propionamida, seis metilos en los anillos y dos metilos en los puentes de carbono. El anillo D lleva una cadena lateral de ácido propiónico, que está combinada con un residuo de isopropilamina, que forma un eslabón ester con el ácido fosfórico de un mononucleótido, con ribosa y dimetil benzilimidazol, que también está coordinado con el átomo de cobalto. Las fórmulas empíricas y desarrolladas pueden verse en la figura (nº 3) (30)

Se presenta en cristales aciculares de color rojo oscuro o polvo del mismo color, inodoros e insípidos. Esta vitamina es muy higroscópica; el producto comercial contiene casi siempre 12% de agua. Muy soluble en agua, soluble en alcohol etílico, insoluble en éter, éter de petróleo, acetona y cloroformo. Es sensible a la luz pero estable en presencia de oxígeno y soporta la ebullición en solución acuosa. Es termoestable a pH ácido, el pH óptimo para su conservación es desde 4 a 5. Por debajo de pH 2 o por encima de 7 se destruye rápidamente. (31)

La vitamina B₁₂ posee acción eficaz en las anemias perniciosas clásicas de los addisonianos, así como en los pacientes con anemia macrocítica nutritiva y sprue (Goldsmith). Actúa sobre otros síntomas tales como los dolores abdominales, la degeneración subaguda del cordón espinal y lesiones neurológicas (Ungley). Tiene efecto aunque menor, por vía

oral, y éste aumenta al administrar simultáneamente jugo gástrico ácido, 26 lo que implica que el factor intrínseco de Castle capacite la vitamina B₁₂ para ser utilizada en buenas condiciones, probablemente por aumento de su absorción por el tracto gastrointestinal. Rosenthal ha demostrado que la vitamina B₁₂ se absorbe principalmente en el duodeno y no en el estómago. Esta vitamina una vez absorbida, se acumula en el hígado; en el plasma circula unida a una alfa glicoproteína., penetra dentro de todas las células y se elimina por el riñón y la glándula mamaria. La vitamina B₁₂ es esencial para la maduración de los hemafíes, ya que interviene en la transformación del ácido ribonucleico en desoxirribonucleico, interviene en la formación de grupos metílicos lábiles esenciales para la síntesis de metionina y ácido fólico, y en conversión del metilmalonil-coenzima A en succinil-coenzima A. La vitamina B₁₂ tiene efectos lipotróficos, comportándose como factor hepatoprotector y favoreciendo el anabolismo proteico. Todas las sustancias con actividad vitamínica B₁₂ carecen de toxicidad y su tolerancia es perfecta; pueden darse a dosis elevadas sin que se presenten el más mínimo trastorno. Estos fármacos se emplean en el tratamiento de la anemia perniciosa por vía parenteral, ya que la absorción oral no es posible por ausencia del factor intrínseco. Los fármacos que se emplean en el tratamiento de la anemia perniciosa son la cianocobalamina e hidroxocobalamina a una dosis de 15 a 30 microgramos por vía intramuscular. En polineuritis, neuralgias del trigémino se administra en dosis de hasta 1.000 microgramos diarios.

(32) Cuando la vitamina B₁₂ se administra asociada a una proteína se produce una deficiencia de esta vitamina B₁₂ debido a una mala absorción del complejo vitamina B₁₂ - albumina, como demuestran, Charles E. King, John Leibach, y Phillip P. Toskes, en sus ensayos clínicos sobre la "Significación clínica de la deficiencia de vitamina B₁₂ a consecuencia de una mala absorción de la vitamina B₁₂ ligada a proteína ". - También demostraron que la vitamina B₁₂ se asocia de manera diferente a la seroalbumina procedente de distintos animales e incluso a los distintos órganos. Así mismo observaron también, que la ligazón depende de la forma química de la vitamina B₁₂ (cianocobalamina, hidroxicobalamina o nitrocobalamina) .

Las diferencias de comportamiento frente a las distintas seroalbuminas se deben a la distinta composición de aminoácidos que presentan las diferentes especies animales, ya que ninguna de ellas presenta una seroalbumina análoga a la humana.

Se conocen diversos métodos de valoración para la vitamina B₁₂ : físicos, químicos y biológicos.

El análisis de la vitamina B₁₂ por procedimientos físico-químicos se basan en la absorción de la luz de la propia vitamina B₁₂ en solución acuosa o bien en la determinación fotométrica del grupo cianuro de la cianocobalamina (30).

El análisis espectrofotométrico de la vitamina B₁₂ presenta el máximo de absorción a trescientas sesenta y una (361 nm), midiendo en el espectrofotómetro frente al disolvente en una cubeta de cuarzo de 1 cm.

Vitamina B₁₂
Cianocobalamina

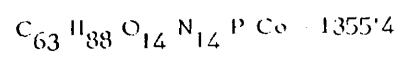
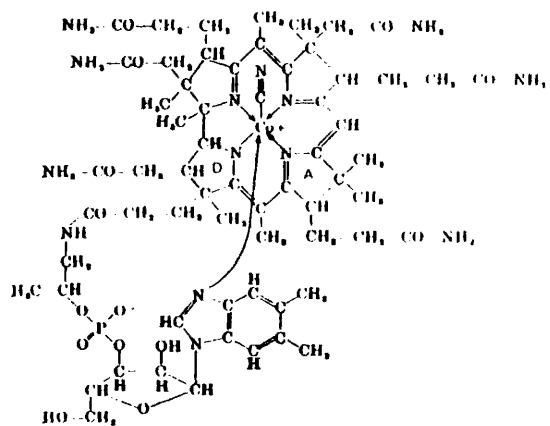


FIGURA n° 3

UNION DE MEDICAMENTOS A PROTEINAS PLASMATICAS

FACTORES INTERFERENTES EN LOS METODOS FISICOQUIMICOS

La unión de los medicamentos a las diferentes proteínas séricas o tisulares pueden influir sobre su acción terapéutica, farmacodinámica y toxicológica. La unión a las proteínas puede modificar profundamente la distribución del medicamento. El complejo proteína-medicamento cursa como un sistema de transporte para acercar el medicamento a su sitio de acción y éste transporte es en extremo importante para los medicamentos que presentan una débil solubilidad en la porción acuosa del plasma. La ligazón a las proteínas puede retardar el paso de medicamento libre del plasma a los tejidos disminuyendo el gradiente de concentración. Este complejo forma igualmente una fuente de medicamento libre para reemplazar el que va desapareciendo en los diferentes procesos de distribución y eliminación.

La mayoría de los estudios de ligazón a las proteínas conciernen a la interacción medicamento sero-albúmina. La seroalbúmina en efecto, tiene la propiedad de formar complejos reversibles con un gran número de compuestos orgánicos. Posee diversos sitios de ligazón en los que el nú-

mero, la naturaleza y la afinidad varía según la clase del ligando orgánico. 31

Una modificación estructural de un medicamento puede afectar de forma significativa a su naturaleza fisicoquímica, y en consecuencia modificar el grado de ligazón con la sero-albúmina, modificando asimismo la actividad terapéutica del medicamento ya que su respuesta farmacológica es en efecto función de la cantidad de medicamento libre en el plasma.

Se han llevado a cabo diferentes estudios para determinar la naturaleza fisicoquímica de las fuerzas de ligazón medicamento-proteína y se han encontrado correlaciones cuantitativas entre los parámetros fisicoquímicos tales como la liposolubilidad, el pH y la densidad de carga electrónica, y la fuerza de ligazón del medicamento a la seroalbúmina. (64) .

MÉTODOS DE ESTUDIO

Deben satisfacer los criterios siguientes:

- 1) No modificar el equilibrio entre medicamento libre y ligado.
- 2) Debe ser válido para un largo intervalo de concentraciones de medicamento y proteínas.
- 3) Debe hacer posible el control exacto de pH de la fuerza iónica y de la temperatura, para minimizar el efecto Dounan .
- 4) Debe evitar la desnaturalización de la proteína o su contaminación, así como la adsorción sobre las paredes de los aparatos, membranas y otros

compuestos.

32

5) Debe ser capaz de detectar la ligazón reversible e irreversible y las fases rápidas o lentas de asociación y de disociación del complejo medicamento-proteína.

6) No deben introducir agentes perturbadores como los solventes orgánicos.

7) Debe permitir la extrapolación al estudio " in vivo "

Las técnicas disponibles actualmente no satisfacen todas estas demandas, pero los métodos utilizados apelan a uno de los cuatro principios siguientes:

1) La concentración del medicamento libre y su actividad termodinámica se base en su ligazón a la proteína.

2) El medicamento muestre transformaciones medibles de sus propiedades distintas de las que se atribuyen a la disminución de la acción terapéutica.

3) Una modificación de las propiedades de las proteínas que se pueda medir que se deban a la ligazón del medicamento.

4) La interacción del medicamento se estudia gracias a su capacidad de desplazar a un compuesto test de su sitio de ligazón a la proteína.

ESTUDIO DE LAS INTERACCIONES

Las interacciones entre un medicamento y las proteínas sanguíneas tienen una influencia directa sobre la concentración de las moléculas activas disponibles a nivel de sitios receptores. A este título, el conocimiento preciso de los parámetros de ligazón es indispensable para establecer modelos farmacocinéticos.

Las proteínas en solución pueden fijar un gran número de sustancias diversas, tales como los iones simples, las hormonas, medicamentos y otras proteínas. La fijación de una sustancia sobre una proteína hace intervenir diversos equilibrios cuyas leyes se han establecido admitiendo que existen sobre la molécula de proteína, sitios de fijación de esa sustancia. Estas leyes son diferentes según el tipo de sistema proteína-sustancia observada. Los sitios receptores de la sustancia pueden, en efecto, ser todos idénticos, o por el contrario tener para ésta afinidades diferentes ; pueden ser independientes o pueden presentar interacciones entre ellos , por ejemplo de naturaleza electrostática o configuracional.

En el estudio de una interacción proteína-sustancia, se deberá primero determinar el modelo que describe mejor el sistema y calcular además los parámetros que le caracterizan , constante de afinidad de los di-

ferentes sitios y el número de ellos.

Los métodos que permiten hacer tales determinaciones son numerosos.

Las leyes relativas a los equilibrios proteína-medamento y la representación de Scatchard .

(33) La composición de una solución que contiene a la vez una proteína y un medicamento se caracterizan por los parámetros siguientes:

C_c = concentración molar medicamento libre

C_L = concentración molar medicamento ligado a la proteína

C_T = concentración molar total medicamento

$f_L = \frac{C_L}{C_T}$ = fracción ligada del medicamento

$f_C = \frac{C_c}{C_T}$ = fracción libre del medicamento

C_p = concentración molar de la proteína

Estos parámetros están ligados por las relaciones :

$$C_T = C_L + C_c \quad \text{y} \quad f_L + f_C = 1$$

Estas magnitudes caracterizan la composición de la solución permitiendo definir el coeficiente molar de ligazón \bar{r} que representa el número medio de moléculas de sustancias o mejor medicamento ligado por la molé-

$$\text{grupos de proteína} = \frac{C_L}{C_P}$$

$$r = \frac{C_L}{C_P}$$

35

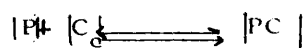
La teoría de los equilibrios múltiples propuesta por KLOTZ para describir las interacciones entre una proteína y un medicamento en solución ha permitido a este autor establecer entre los parámetros que acabamos de definir un cierto número de relaciones de las que entresacamos las más importantes. (34)

Distinguiremos casos en que los sitios de fijación del medicamento son idénticos, o pueden agruparse en categorías que pueden ser independientes o no.

Para hacer los resultados experimentales es necesario apelar a las leyes que conciernen a los equilibrios medicamento-proteína.

Los parámetros que tienen mayor interés en el estudio de la interacción medicamento-proteína, son la constante de asociación, K y el número de puntos de unión, n. (35)

Sea un a proteína P y un medicamento C_c que se asocian según un equilibrio reversible que obedece a la ley de acción de masas.



C_c - concentración de medicamento libre

P - concentración de proteína libre

PC_c - concentración de complejo formado

Cuando se alcanza el equilibrio, el valor de la constante de asociación K vendrá dado por

$$K = \frac{|PC_c|}{|P| |C_c|} \quad (1)$$

o lo que es lo mismo

36

$$[PC] = K [P] [C_c]$$

Si llamamos r a la relación que existe entre moles de medicamentos unido y moles totales de proteína,

$$r = \frac{[PC]}{[P] + [C_cP]}$$

Por la ecuación(1) :

$$r = \frac{K [P] [C_c]}{K [C_c] [P] + [P]} = \frac{K [C_c]}{1 + K [C_c]}$$

Esto sería el caso que solo exista un punto de unión implicado en la interacción.

1)- La molécula de proteína presenta n sitios de fijación del medicamento, idénticos e independientes.

En este caso, los sitios se caracterizan por la constante de asociación intrínseca K común, y la relación fundamental es la siguiente

$$r = \frac{n K [C_c]}{1 + K [C_c]} \quad (2)$$

Esta relación pone en evidencia la importancia de la concentración C_c del medicamento. Este parámetro es el que caracteriza un equilibrio y el coeficiente molar de ligazón r solo depende para un sistema proteína-medamento dado del valor de C_c sea la que sea la concentración de proteína de la solución C_p .

Al representar en la ecuación (2) $[C_c]$ (valor determinado experimentalmente) frente a r (que puede ser calculado para cada punto experimental, se obtiene un trazado hiperbólico, a través del cual podrían determinarse n y K .

Esta representación tiene el inconveniente, que para altos valores de r , las variaciones en la unión solo resultan pequeñas alteraciones en la curva -

tura.

37

Se han propuesto diferentes transformaciones de la relación (2) que conducen a representaciones gráficas de las isoterms de ligazón, presentando cada una sus ventajas propias. Estas transformaciones de la ecuación han sido realizadas por Klotz, Scott y Scatchard, consiguiéndose representaciones gráficas más favorables. Fig (4, 5 y 6)

(36) La que se utiliza más corrientemente es la de Scatchard, que escribe la relación en la forma siguiente:

$$n K C_c = r K C_c + r$$

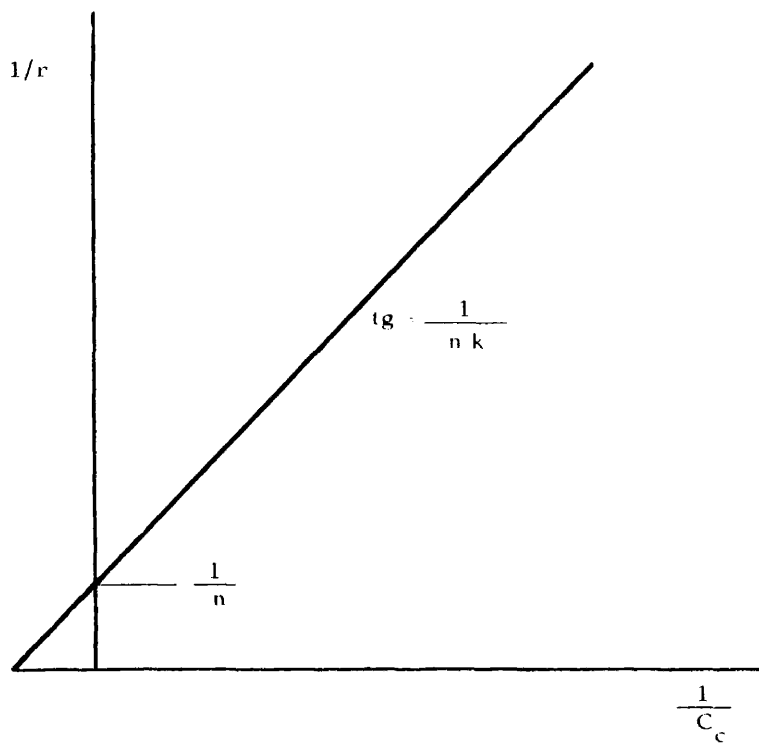
dividiendo por C_c

$$\frac{r}{C_c} = K n - K r \quad (2'')$$

Ecuación de Scatchard

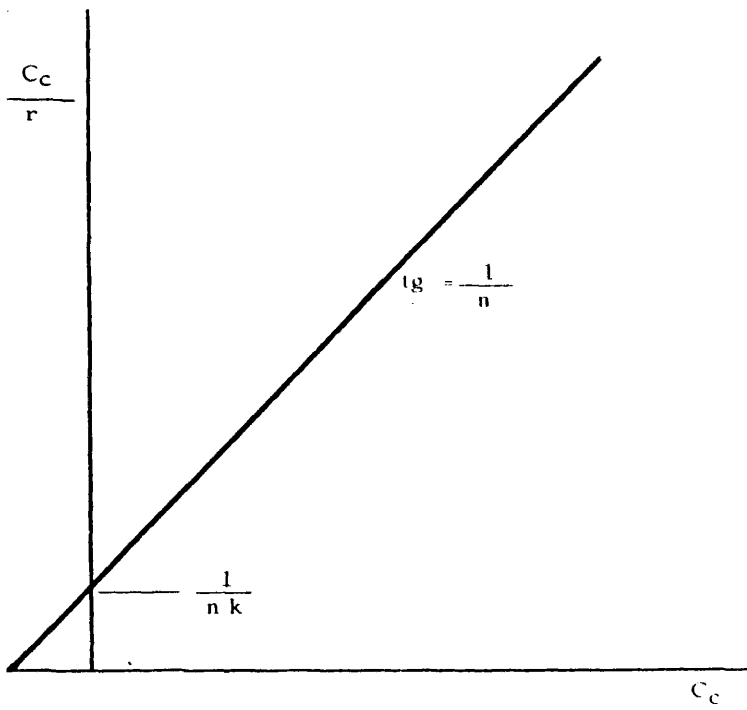
Tomando en abscisas el valor de r y en ordenadas el cociente r/C_c , se obtiene la representación de la figura (6). Este es el método gráfico de elección por que la ecuación de Scatchard no ofrece la desventaja aludida anteriormente. Esta representación es una línea recta cuando solo existe una clase de puntos de unión sobre la macromolécula.

En este sistema de ejes un equilibrio dado está caracterizado por el valor de la concentración libre del medicamento y estará representado por un punto, intersección de la isoterma de ligazón y de la recta que pase por el origen



Representación de Klotz

FIGURA N° 4



Representación de Scott

FIGURA N° 5

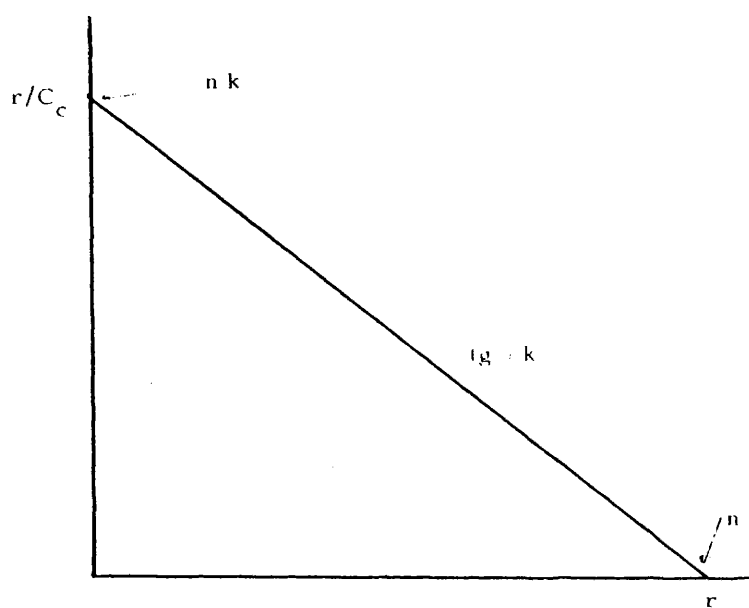


Fig. 6

REPRESENTACION DE
SCATCHARD
(para una sola clase de sitios)

y cuya pendiente es igual a $\frac{1}{C_c}$

Para trazar la isoterma de ligazón $\frac{r}{C_c}$ en función de la r hay pues que determinar para diferentes valores de la concentración libre del medicamento, por una parte, la concentración ligada C_L y por otra la concentración de proteína C_P .

Cuando la concentración C_P no es medible solo se podrán representar las variaciones $\frac{C_L}{C_c}$ en función de C_L . La relación (2") se podría escribir de la forma siguiente

$$\frac{C_L}{C_c} = k n C_P - k C_L \quad (3)$$

Para una solución de proteína de concentración desconocida, pero constante, la isoterma de ligazón es siempre lineal. La pendiente será $-k$ y al cortar el eje de abscisas nos da el valor global $n C_P$.

Nos saldrán pues una serie de isotermas paralelas correspondientes cada una a una concentración de proteínas. Para una concentración libre (C_c) dada, la recta que pasando por el origen tie

ne una pendiente $\frac{1}{C_c}$ cortarfa la serie de isotermas en diferen-
tes puntos cuyos valores de abscisas darán las concentraciones $\underline{l_i}$
gadas (C_L) del medicamento para cada concentración de proteínas.

2) La molécula de proteína presenta n sitios de fijación del me-
dicamento, independientes, pero no idénticos.

Es el caso en que hay sitios idénticos pero no todos y por tanto
pueden agruparse en diferentes clases o categorías que se caracte-
rizarán por el número de sitios y su constante de asociación intrín-
seca. (37)

Sea por ejemplo m el número de categorías de sitios y n_i y
 k_i el número de sitios y la constante de asociación de la categoría
 i para lo cual, el coeficiente molar parcial de asociación se repre-
senta por r_i . Para cada valor de la concentración libre C_c , el coe-
ficiente molar de asociación global r será igual a la suma de los coe-
ficientes parciales. Luego la relación (2) se escribirá

$$r = \frac{n_1 k_1 C_c}{1 + k_1 C_c} + \frac{n_2 k_2 C_c}{1 + k_2 C_c} + \dots + \frac{n_i k_i C_c}{1 + k_i C_c}$$

$$r = \sum_{i=1}^m \frac{n_i k_i C_c}{1 + k_i C_c}$$

y la representación de $\frac{r}{C_c}$ frente a r no será lineal como lo demuestra la fórmula siguiente deducida de la anterior

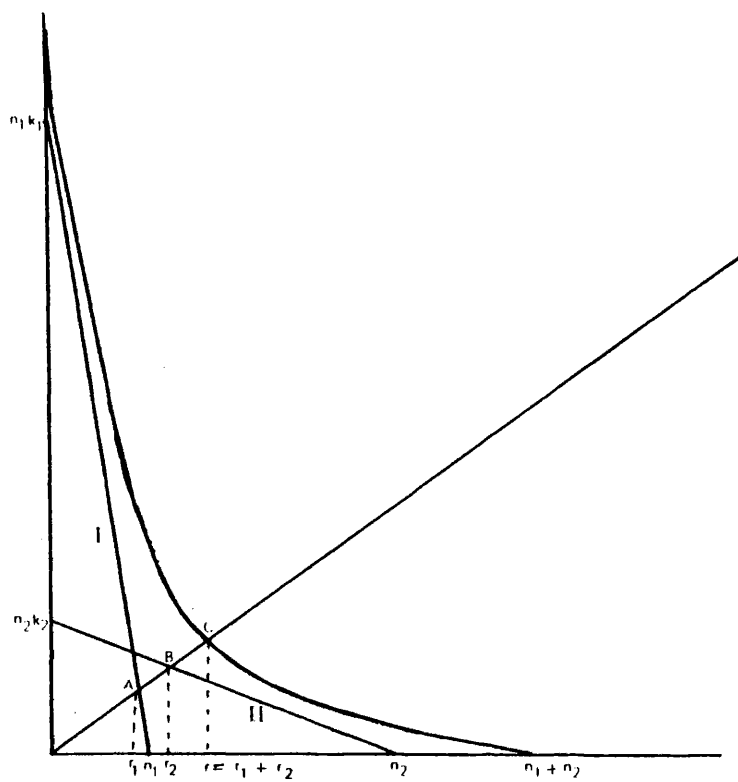
$$\frac{r}{C_c} = \sum_{i=1}^m (k_i n_i - k_i r_i) \quad (4)$$

esta isoterma de ligazón resultante puede construirse punto por punto a partir de las isotermas componentes lineales, como se puede ver en la figura (7)

La recta que pasa por el origen y cuya pendiente es $\frac{1}{C_c}$ = constante, corta las dos isotermas componentes en dos puntos A y B en que las abscisas son iguales a los coeficientes parciales r_1 y r_2 . El coeficiente molar de ligazón global r es igual a la suma $r_1 + r_2$ de los coeficientes parciales y le corresponde el punto C sobre la isoterma resultante que es fácil construir haciendo variar C_c .

En este caso particular la ecuación de la curva se obtiene haciendo $m = 2$ en la relación (4)

$$\frac{r}{C_c} = k_1 n_1 + k_2 n_2 - (k_1 r_1 + k_2 r_2) \quad (5)$$



REPRESENTACION DE SCATCHARD

(para dos clases de sitios unos más fuertes y otros más débiles)

En este caso $m = 2$ (2 categorías de sitios); $n_1 k_1$ y $n_2 k_2$

FIGURA N° 7

La isoterma corta ahora el eje de abscisas en un punto que da el valor total de sitio $n_1 + n_2$ y la extrapolación a $\bar{r} = 0$ permite determinar $(K_1 n_1 + K_2 n_2)$.

Para este tipo de modelo con dos categorías de sitios independientes la ecuación de la isoterma de ligazón puede obtenerse bajo la forma de una función tal que

$$f\left(r, \frac{r}{C_c}\right) = 0 \quad \text{ó} \quad f(x, y) = 0$$

si se hace $\bar{r} = x$ e $\frac{\bar{r}}{C_c} = y$

en efecto, se puede escribir

$$r = \frac{n_1 k_1 C_c}{1 + k_1 C_c} + \frac{n_2 k_2 C_c}{1 + k_2 C_c} \quad C_c = \frac{y}{y} = \frac{r}{\frac{r}{C_c}}$$

sea

$$x = \frac{n_1 k_1 \left(\frac{x}{y}\right)}{1 + k_1 \left(\frac{x}{y}\right)} + \frac{n_2 k_2 \left(\frac{x}{y}\right)}{1 + k_2 \left(\frac{x}{y}\right)}$$

de donde la ecuación de la isoterma

$$y^2 + x y (k_1 + k_2) + k_1 k_2 x^2 - y (n_1 k_1 + n_2 k_2) - k_1 k_2 x (n_1 + n_2) = 0$$

(6)

ecuación de una hipérbola que posee dos asíntotas obligadas definidas por las relaciones

$$y = n_1 k_1 - k_1 x \quad \text{y} \quad y = n_2 k_2 - k_2 x$$

estas dos asintotas son pues las dos isothermas componentes que corresponden a las dos categorias de sitios.

En la práctica es el problema de la descomposición de la isoterma experimental en sus isothermas componentes lineales el que hay que resolver.

El estudio de las tangentes a la isoterma en los puntos de intersección con los ejes, permitirá obtener un cierto número de relaciones entre los parámetros n_1 , n_2 , k_1 , k_2 en el caso particular en que $m=2$, la pendiente de la tangente en cada punto de la isoterma se obtendrá calculando la derivada en relación a n de la ecuación (6)

o sea

$$\frac{dy}{dx} \quad 2y + x(k_1 + k_2) - (n_1 k_1 + n_2 k_2) - k_1 k_2 (n_1 + n_2 - 2x) + (k_1 + k_2)y = 0$$

de donde

$$\frac{dy}{dx} = \frac{k_1 k_2 (n_1 + n_2 - 2x) - (k_1 + k_2)y}{2y + x(k_1 + k_2) - (n_1 k_1 + n_2 k_2)}$$

Teniendo en cuenta las relaciones existentes entre x , y , \bar{r} , \bar{r}' y las que definen \bar{r}'_1 y \bar{r}'_2 la expresión anterior puede escribirse también

$$\frac{d(\frac{\bar{r}}{C_c})}{d\bar{r}} = - \frac{n_1 k_1^2 (1 + k_2 C_c)^2 + n_2 k_2^2 (1 + k_1 C_c)^2}{n_1 k_1 (1 + k_2 C_c)^2 + n_2 k_2 (1 + k_1 C_c)^2} \quad (7)$$

y para $\bar{r}'=0$ la derivada vale

$$- \frac{n_1 k_1^2 + n_2 k_2^2}{n_1 k_1 + n_2 k_2}$$

y para $\frac{r}{C_c} = 0$ la derivada vale $\longrightarrow - \frac{n_1 + n_2}{\left(\frac{n_1}{k_1}\right) + \left(\frac{n_2}{k_2}\right)}$ 47

o sea, que la tangente en el punto $r = 0$ corta el eje de abscisas en el punto

$$\left(\frac{n_1 k_1 + n_2 k_2}{n_1 k_1^2 + n_2 k_2^2} \right)^2$$

y el eje de ordenadas en el punto $n_1 k_1 + n_2 k_2$

La tangente en el punto $\frac{r}{C_c} = 0$ corta el eje de abscisas en el punto

$$n_1 + n_2 \text{ y el de ordenadas en el punto } \left(n_1 + n_2 \right)^2 / \left(\frac{n_1}{k_1} + \frac{n_2}{k_2} \right)$$

Teóricamente se pueden calcular pues, los valores de los parámetros; n_1, n_2, k_1, k_2 , buscando para cada tangente dos de las tres relaciones que tenemos.

Sin embargo, conviene tener en cuenta que si se opera así, se utiliza solo las dos porciones extremas de la isoterma conocida con poca precisión. En estas condiciones es indispensable operar por aproximaciones sucesivas haciendo variar n_1, n_2, k_1 y k_2 alrededor de los valores así obtenidos, hasta que se obtiene la mejor concordancia posible con los valores experimentales.

Las relaciones precedentes se pueden simplificar si se encuentra en condiciones tales que la concentración de saturación de los sitios de segunda categoría es muy débil.

En este caso $k_2 C_c$ es muy inferior a 1 y se puede escribir el coeficiente de asociación global bajo la forma

$$r = \frac{n_1 k_1 C_c}{1 + k_1 C_c} + n_2 k_2 C_c$$

y la ecuación de la isoterma si $x = r$ e $y = \frac{r}{C_c}$

$$x = \frac{n_1 k_1 \left(\frac{x}{y}\right)}{1 + k_1 \left(\frac{x}{y}\right)} + n_2 k_2 \left(\frac{x}{y}\right)$$

o sea

$$y^2 + k_1 x y - (n_1 k_1 + n_2 k_2) y - n_1 k_1 k_2 x = 0 \quad (8)$$

y la isoterma da una hipérbola con 2 asíntotas;

una oblicua de ecuación

$$y = n_1 k_1 - k_1 x$$

y otra horizontal de ecuación

$$y = n_2 k_2$$

Insistimos que en este caso particular solo los parámetros n_1, k_1 y $n_2 k_2$ son accesibles al experimentador. Pueden calcularse estos parámetros, a partir de la extrapolación de la isoterma

$r = 0$ que es igual a $n_1 k_1 + n_2 k_2$ de la determinación de la posición de la asíntota horizontal y, de la pendiente de la tangente a la isoterma para $r = 0$

Como en el caso anterior la pendiente de la tangente en cada punto de la isoterma se obtiene derivando en relación a x la ecuación (8)

$$\frac{dy}{dx} = \frac{n_1 k_1 k_2 - k_1 y}{2y + k_1 x - (n_1 k_1 + n_2 k_2)}$$

y para $x = r = 0$ toma el valor

49

$$= \frac{k_1}{1 + \left(\frac{n_2 k_2}{n_1 k_1} \right)}$$

Esta pendiente proporciona una buena estimación de la constante k_1 si los parámetros de ligazón son tales que el producto $n_2 k_2$ es mucho menor que el producto $n_1 k_1$.

La clasificación de los sitios de ligazón de la proteína en dos o más categorías no es sin embargo, siempre posible; es el caso en que todos los sitios tienen constantes de asociación diferentes o cuando se está en presencia de una mezcla heterogénea de proteínas que tienen cada una uno o más sitios de ligazón independientes, idénticos o no.

Si se admite que los sitios de ligazón son numerosos y tales que las diferentes constantes de asociación se reparten siguiendo una ley normal el fenómeno de asociación puede describirse por la ecuación SIPS(

$$r = \frac{n (k_1 C_c)^a}{1 + (k_1 C_c)^a} = \frac{n k C_c^a}{1 + k C_c^a} \quad (9)$$

donde $k = k_1^a$

El coeficiente (a) comprendido entre 0 y 1 traduce la dispersión de las constantes de asociación. Y la constante k_1 representa aquí una constante de asociación intrínseca media de las constantes de asociación.

Esta relación conduce a una isoterma no lineal en la representación de Scatchard y su ecuación viene dada por

$$\frac{r}{C_c} = \left[n k (r)^{a-1} - k (r)^a \right]^{1/a} \quad 50$$

Pero en el caso del modelo de Sips, la representación de $\log r / n-r$ en función de $\log C_c$ es lineal y la pendiente de la recta obtenida permite calcular el coeficiente a , y la ordenada en el origen el valor de la constante k .

3) La molécula de proteína lleva n sitios de fijación de la sustancia idénticos, pero que presentan interacciones entre ellos.

Cuando los sitios de fijación de la sustancia no son independientes las isotermas de asociación tampoco son lineales.

Este fenómeno se presenta cada vez que el estado de un sitio libre de una molécula de proteína está afectado por el comportamiento de sitios de la misma molécula ya ocupados por la sustancia.

Las interacciones cooperativas, positivas o negativas resultantes pueden tener diversos orígenes; interferencias estéricas, cambios de conformación de la molécula de proteína, o efectos electrostáticos.

Como las ecuaciones de las isotermas son entonces más complejas su análisis presenta siempre un gran interés pues aporta como en los otros casos datos importantes sobre la asociación entre la proteína y la sustancia:

Se han propuesto numerosos modelos para describir estas interacciones que conducen a las isotermas de ligazón en la representación de Sc-

tchard de forma muy variable. Así, en el caso de las interacciones electrostáticas o cooperativas negativas, las isothermas son cóncavas, mientras que en las interacciones cooperativas positivas presentan un máximo eventualmente asociado a un mínimo.

El modelo de Sips que hemos descrito anteriormente puede caracterizar un fenómeno de ligazón poniendo en juego las interacciones cooperativas pues estas tendrán el efecto de modificar cada una de las constantes de asociación, pero el número de sitios de asociación permanece constante.

En estas condiciones, la relación (9) puede también servir para caracterizar ese fenómeno.

Esta relación tendrá la misma forma matemática que la propuesta de una manera empírica por Hill (37) para caracterizar interacciones cooperativas positivas.

La relación de Hill es

$$r = \frac{n (k' C_c)^a}{1 + (k' C_c)^a} = \frac{n k' C_c^a}{1 + k' C_c^a} \quad (10)$$

$$\text{si } k' = k^a$$

a se define aquí como un coeficiente de interacción.

Las diferencias entre las ecuaciones (9) y (10) consisten por una parte en la significación y el valor del parámetro a y por otra en la significación de las constantes que figuran en cada una de las fórmulas.

En el caso en que la partícula que se fija esté ionizada, la ligazón modifica la carga neta de la proteína. El trabajo necesario para la fijación de iones sucesivos va a aumentar y aparecerán entonces interacciones llamadas electrostáticas entre los sitios.

En estas condiciones el coeficiente molar de ligazón será

$$r = \frac{n k e^{2wr} C_c}{1 + k e^{2wr} C_c} \quad (11)$$

o bien
$$\frac{r}{C_c} e^{-2wr} = k n - k r \quad (12)$$

relaciones en las cuales w es un coeficiente definido a partir de la teoría de Debye - Hückel (38).

La relación (12) muestra que la isoterma de ligazón según Scatchard no es lineal. Por el contrario la representación de $r/C_c \cdot e^{2wr}$ en función de r conduce a una recta que permite determinar los pará-

metros n y k a condición de que el coeficiente w sea conocido o medido.

Insistimos que en todos los casos las isotermas de ligazón no lineales obtenidas en la representación de Scatchard no son hiperbólicas contrariamente a lo que se puede observar cuando la proteína tiene 2 categorías de sitios de ligazón independientes.

MÉTODOS DE UNIÓN "IN VITRO" DE
MEDICAMENTO A SEROALBUMINA

Las técnicas que se han seguido para el estudio de la interacción medicamento-seroalbúmina, han sido las de diálisis de equilibrio y las de amortiguación de la fluorescencia.

El método de diálisis se basa en la separación física de las moléculas de medicamento libre de las proteínas y del complejo medicamento - proteína. Esta separación se realiza mediante una membrana cuyo tamaño de poro es lo suficientemente grande como para permitir el paso de las moléculas de medicamento, pero no lo suficientemente grande como para ser atravesada por las proteínas.

Valorando el medicamento libre conocida la cantidad inicial, se calcula el medicamento que se ha combinado.

Este método presenta el problema de la cantidad de tiempo necesaria para alcanzar el equilibrio, que es normalmente de unas sesen-

ta horas. Además, al ser tan largo el tiempo de experimentación se puede producir contaminación bacteriana y desnaturalización de la proteína.

En la diálisis de equilibrio la solución de proteína se coloca dentro de un tubo de colodión o de una membrana dializante similar. El tubo se suspende en un recipiente que contiene la solución de medicamento de concentración conocida (fig22). La membrana que separa ambas soluciones es solamente permeable a las pequeñas moléculas de medicamento. Este conjunto se introduce en la nevera a 4 grados centígrados durante al menos 60 horas y el medicamento que está en la solución externa difunde a través de la membrana de colodión, produciéndose una variación en su concentración, y el gradiente de concentración desciende con el tiempo, llegándose de esta forma a un equilibrio. El procedimiento de diálisis de equilibrio ha sido perfeccionado por Klotz y colaboradores (33). Empleando este método P. Aussel, M. Andrau y J. L. Chanal investigaron la interacción de la suxibuzona y diferentes albúminas, comprobando que la molécula proteínica tiene un cierto número de puntos activos de enlace.(35). Así mismo Walter D. Wosilait y Martín P. Ryan, investigaron los efectos del ácido aléico, de la tolbutamida , y de la oxipenbutazona en la unión de la warfarina a la seroalbúmina humana (38). A. M. Carrancio de la Plaza en "influencia del benzoato sódico en la interacción ácido salicílico - seroalbúmina (39) .

Muchos estudios recientes conciernen a la interacción de proteínas con pequeñas moléculas, (las pequeñas moléculas son los ligandos usando la terminología general para la formación de complejos moleculares).

La unión de pequeñas moléculas, las interacciones proteína-proteína y los cambios conformacionales son importantes para la actividad biológica de las proteínas, Ejemplos de tales sistemas son los enzimas que unidos a sustratos, efectores y grupos prostéticos, ligan gases a proteínas respiratorias, metabolitos ligados a las proteínas de transportes, enzimas que ligan la oxidación - reducción de electrones y sistemas antígeno - anticuerpo.

La facultad de muchas proteínas de ligar sustancias no biológicas que se designan con el nombre de ligandos o ligarse a las regiones hidrofóbicas de las proteínas, se han utilizado también para los estudios de asociación a proteínas.

Recientes trabajos nos hacen comprender de la especificidad con la que una proteína enlaza un ligando en términos de un sitio sobre la proteína que puede interaccionar con el ligando a través de fuerzas iónicas, puentes de H o fuerzas hidrofóbicas.

La misma clase de interacciones físicas específicas encerradas

en la unión a proteínas puede basarse en la organización de otros componentes celulares, pero las proteínas aparecen únicas en su variedad, especificidad y control de sus interacciones. La naturaleza compleja de las interacciones proteínas - pequeñas moléculas y la posibilidad de estudiarlas como sistemas físicos aislados, las hace interesantes e importantes. Los estudios de los mecanismos de interacción de proteínas y cambios conformacionales proporcionan conocimientos en la acción dinámica de las proteínas y pueden contribuir a la comprensión de muchos de los mecanismos fundamentales de especificidad biológica.

La unión puede estudiarse por dos métodos; el cinético y el de equilibrio y los datos obtenidos por esos métodos son a menudo complementarios. Los métodos cinéticos han sido usados muy extensamente para el estudio de los escalones de unión en las reacciones enzimáticas (Vestling 1.963 ; Day y Col 1.963) y la unión de los efectores alostéricos a los enzimas.

Recientemente se han hecho consideraciones sistemáticas a los métodos de equilibrio y a la información obtenida de ellos (Weber 1965, Weber y Anderson 1.965). (40)

La caracterización del equilibrio de unión encierra la determinación de las concentraciones de los componentes del sistema en equili -

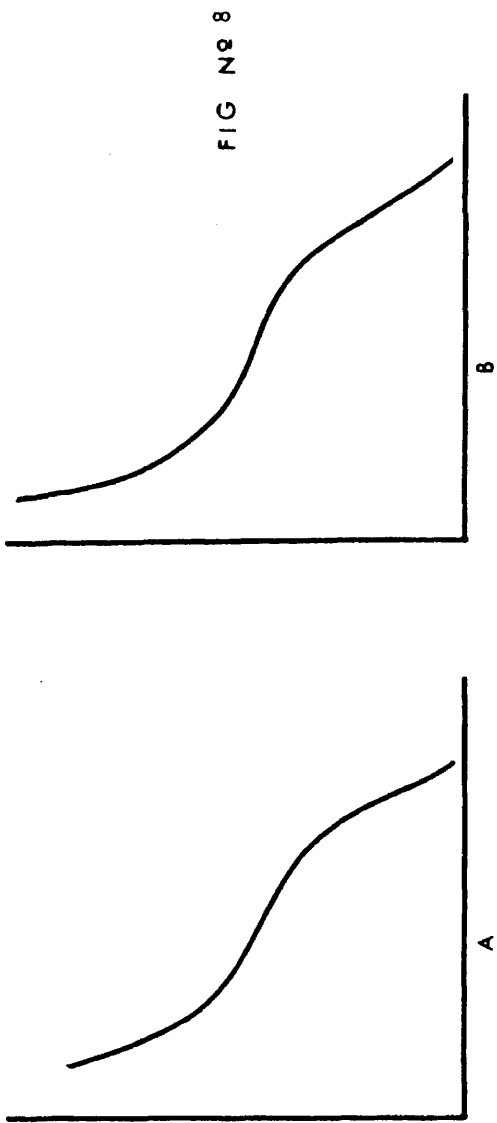
brio: es decir P , C_c y $P C_c$ en el equilibrio $P + C_c \rightleftharpoons P C_c$ (como en la valoración de ácido con una base). Una curva similar caracteriza el equilibrio de unión de un sistema proteína-pequeñas moléculas y un sistema ácido-base. Ver figura (8). Vemos que en la unión compleja encontrada a menudo en proteínas, tal curva completa de valoración es capaz de producir mucha más información que una simple constante de equilibrio.

La curva de valoración puede representarse de diferentes formas, pero una de las más usadas es análoga a la curva de titulación ácido - base. El logaritmo negativo de la concentración de ligando libre frente a la saturación de la especie unida.

Medidas de parámetros de sistemas de unión

En orden a caracterizar un sistema de unión, se pueden determinar cosas tales como el número de sitios de unión, su afinidad, naturaleza, localización en la proteína y la significación biológica de su unión (Edsall y Wyman 1.958). (41).

Nosotros tratamos de la estequiometría, el equilibrio de unión y su implicación para dilucidar el mecanismo de unión. Estos parámetros pueden discutirse en detalle matemáticamente después de haber sido medidos con gran precisión por los métodos de fluorescencia.



Comparación de una curva de titulación por variación de pH (A),
con la que corresponde a unión de un ligando simple (B)

Los métodos de fluorescencia para las medidas de equilibrios de unión, dependen del cambio de un parámetro medible del sistema proteína - ligando con asociación. El parámetro más comúnmente utilizado es la intensidad de fluorescencia de la proteína o del ligando.

Varias condiciones deben satisfacerse para que un sistema de unión pueda ser tratado por medidas de fluorescencia. El cambio de fluorescencia debe ser rápido relativo al proceso de unión de forma que el proceso dependiente del tiempo (si hay escala de tiempos de una serie de medidas de fluorescencia) sea el proceso de unión actual. En suma, la constante de disociación de un ligando no puede ser menor de aproximadamente 10^{-8} M. este límite, está impuesto por la concentración de ligando unido, requerido para que de una señal de fluorescencia leible con un manantial de luz y unos detectores normales, y también por la menor concentración de proteínas que puede generalmente manejarse sin desnaturalización.

MÉTODOS DE VALORACION

La estequiometría y equilibrio se determinan por procedimientos de valoración, bajo diferentes condiciones.

A menudo se ha hablado en los estudios de unión de la impor tan -

cia del método usado en la titulación. Hay dos métodos básicos de valoración; un método de adición con la concentración de proteína cons tante, y un método de dilución con la concentración de proteína variando la concentración de ligando para la concentración estequiométrica a través de toda la región de equilibrio. El conocimiento de las ven tajas y limitaciones de cada método es muy importante en los estudios de unión con proteínas.

1 - Valoración de adición

Este método, análogo al de la titulación ácido - base, consiste en adicionar sucesivos incrementos de ligando a una solución de proteína. Idealmente, el volumen de ligando añadido debe ser pequeño para que la concentración de proteína permanezca constante, es por esto necesario hacer adiciones separadas para determinar la estequiometría y el equilibrio. En ciertos casos el cambio dependiente del tiempo puede ocurrir en la proteína durante los estudios de unión y será necesario usar una nueva solución de proteína con las sucesivas cantidades crecientes de ligando para cada punto de la curva de titulación.

Este método, tiene la ventaja de que con un ligando realmente solu

ble, la concentración de proteína puede mantenerse en una zona estrecha pero debe cuidarse de que la concentración de proteína sea suficientemente baja para que la primera parte de la curva no pierda la unión estequiométrica.

Para el ligando con una constante de asociación de aproximadamente 10^6 M^{-1} o mayor es difícil evitar pérdidas en la curva de unión en condiciones estequiométricas. Muchos trabajos en la literatura se basan en los métodos de adición con pocos puntos en la región de equilibrio y sin información del proceso de unión excepto en la constante media de unión.

2 - Método de dilución

Es un método muy superior, particularmente para constantes de asociación mayores de 10^6 M^{-1} , el método de dilución (42).

Una titulación de dilución comienza con una solución inicial de proteína y ligando en la que la concentración del ligando es ligeramente superior a la concentración de los sitios de unión de la proteína y de suficiente concentración, la concentración de proteína y ligando sea al menos 10 veces mayor que la constante de disociación del complejo. Usualmente no es posible detectar el cambio de unión con suficiente precisión en el primero y el último 10% de saturación.

ración, así no hay ventaja en empezar la valoración con valores de r superiores a 0'9 - 0'95.

La dilución se realiza en una serie de escalones espaciados para obtener la mayor información, es decir la mayor resolución de la curva de unión. En una buena valoración deben obtenerse al menos 20 o 30 puntos espaciados aproximadamente dos veces la desviación standard de un punto solo. La dilución debe hacerse si es posible hasta que $r = 0'1$ ó $0'05$ ó aproximadamente 100 veces de la solución inicial (10 veces en cada lado de la constante media de disociación). Si no es posible empezar a una saturación de 0'9, se puede llegar a valores más altos de la saturación para medidas de estequiometría con una titulación de adición con la misma solución inicial.

En una valoración de dilución $[P]$ (concentración inicial de proteína) empieza en la región estequiométrica y así la estequiometría y el equilibrio pueden determinarse en el mismo experimento. Es necesario en este método mostrar que las interacciones proteína - proteína o disociación de subunidades no afectan a la unión del ligando en un rango de concentración de proteínas de al menos diez veces a cada lado de la constante media de disociación (o a las mayor y menor constantes en el caso de unión múltiple).

El comportamiento del equilibrio de unión (es decir, k) debe ser independiente de $[P]$, aunque la zona de saturación en la cual ocurre la unión estequiométrica del ligando añadido es dependiente de $[P]$, Sin embargo, un equilibrio de unión normal puede ser perturbado en sistemas protéicos por las interacciones proteína - proteína que dependen del coeficiente de actividad de la proteína (γ , para nuestro propósito de la concentración). Es necesario establecer que en la zona de concentraciones de proteínas usadas en un estudio de unión, la unión es independiente de la concentración de proteína.

Recíprocamente, en las proteínas con subunidades es posible invertir la situación y el estudio de los efectos de la disociación en subunidades durante la unión. En este último caso deben obtenerse independientemente medidas de disociación mientras en el primer caso la demostración de una dependencia de la concentración de proteína es suficiente.

Diversos y recientes artículos han discutido los equilibrios proteína - proteína. Deranleau (1.964), Chun y Fred (1.967), Nichol y Col (1.967), Adams y Lewis (1.968), Klapper y Klotz (1.968) (58, 59, 60, 61, 62)

Muchas proteínas, incluyendo la albúmina muestran fluorescencia en el ultravioleta. Cuando ciertos ligandos se unen a la proteína pueden inhibir su fluorescencia natural. Esta inhibición ocurre solo cuando hay ligazón (43).

La espectroscopia de fluorescencia es uno de los métodos más versátiles y sensibles para el estudio físico de sistemas de proteínas y ha sido objeto de aplicación a estudios de desnaturalización, transiciones conformacionales, cambios en la subunidad de asociación, caracterización de los procesos de unión, medida de la polaridad de los sitios de unión y orientación y distribución de los ligandos.

En esto han trabajado autores como VELICK (44), STEINER y EDELHOCH (45), CHEN (46), PARKER (47), EDELMAN y Mc CLURE (48) y STRYER (49), aunque el proceso de unión ha sido menos estudiado y para él la fluorescencia no deja de ser un método complementario de otros físicos y químicos.

La obtención de isothermas de ligazón a partir de datos experimentales de extinción de fluorescencia es a menudo difícil. El aprovechamiento de los resultados experimentales responde, en efecto a un cierto número de hipótesis que no son siempre verificadas.

El análisis crítico de las relaciones teóricas y de las hipótesis de base han permitido fijar las condiciones experimentales que conducen a una utilización óptima del método.

El conocimiento de las constantes de interacción medicamento-proteína presenta un gran interés en los estudios de distribución de los principios activos.

Las técnicas de diálisis de equilibrio y de difusión browniana se han utilizado a menudo para este objeto en el laboratorio (50,51). Es pues, interesante revisar la técnica de estudio por inhibición de fluorescencia, relativamente rápido y fácil de poner en marcha. Conviene en particular comparar los resultados obtenidos pues los métodos de aproximación y los fenómenos físicos de base son muy diferentes.

Es importante un análisis teórico y crítico del fenómeno de amortiguación o inhibición de la fluorescencia para deducir las condiciones experimentales óptimas.

La intensidad de fluorescencia I_F emitida por una proteína en presencia de un medicamento a la concentración C_T viene dado por la relación STERN - VOLMER (52) (67)

$$\frac{I_0 - I_F}{I_F} = k C_T$$

donde I_0 es la intensidad de la fluorescencia en ausencia del medicamento.

Esta relación solo es válida si la solución medicamento-proteína no presenta otra absorción que la de la proteína a la longitud de onda de excitación.

Si la extinción de la fluorescencia se hace por choques la constante de Stern - Volmer tiene por expresión

$$k = \frac{k_p}{k_f + k_n + k_g + A} \quad (68) \quad (69)$$

siendo k_p = constante de velocidad de la reacción de amortiguación

k_f , k_n y k_g las constantes de velocidad de emisión de fluorescencia, de conversión interna y de cambio entre sistemas respectivamente.

$A = \sum K_Q [Q]$ representa la contribución de todos los otros inhibidores y comprende las moléculas no excitadas de proteínas.

Si la amortiguación se hace por formación de un complejo reversible no fluorescente y no absorbente para la longitud de onda de emisión, se demuestra fácilmente que la constante de Stern-Volmer, k , es entonces igual que la constante de equilibrio del com -

plejo (53).

Desde el punto de vista experimental la magnitud más accesible directamente es la relación $\frac{I_F}{I_0}$

Se tiene pues:

$$\frac{I_F}{I_0} = \frac{1}{1 + k C_T} = \frac{1}{1 + k R [P]}$$

si se introduce $\frac{C_T}{P} = R$ de las concentraciones totales de medicamento - proteína.

La curva $\frac{I_F}{I_0} = f(C_T)$ se representa en la figura (1), es una función homográfica que tiene por asíntotas las rectas $\frac{I_F}{I_0} = 0$ y $C_T = -\frac{1}{k}$

Las magnitudes $\frac{I_F}{I_0}$ y C_T son esencialmente positivas, por tanto solo la parte de la curva situada en el primer cuadrante tiene significación física.

Si se estudia $\frac{I_F}{I_0} = f(R)$ para $P = \text{constante}$ se demuestra fig (10a) que es una función uniformemente decreciente con concavidad hacia arriba en la cual la primera derivada con relación a R es máxima en el punto $(R = 0, I_F/I_0 = 1)$, e igual a $-K_P$

Si se estudia esta función para diferentes valores de $[P]$, se comprueba (fig10b) que la primera derivada con respecto a R , siem-

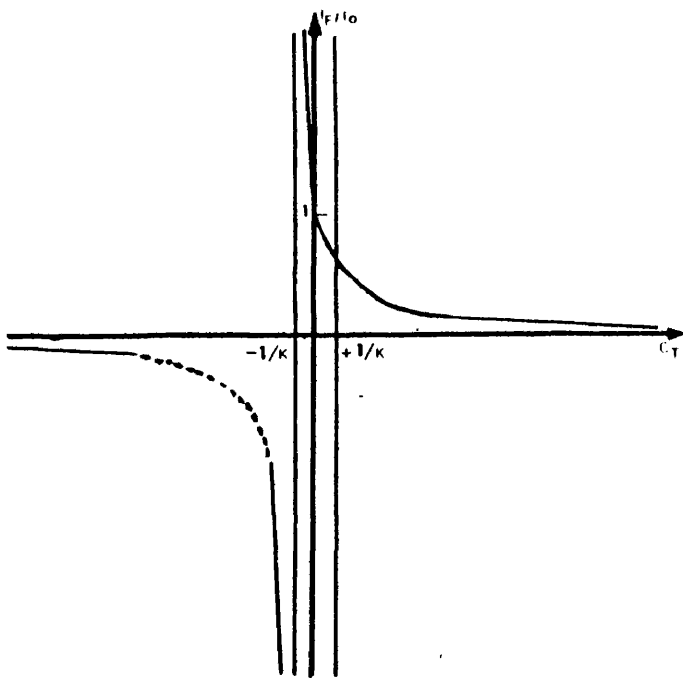


FIG 9

CURVA DE EXTINCION TEORICA $I_f/I_0 = 1/C_T$

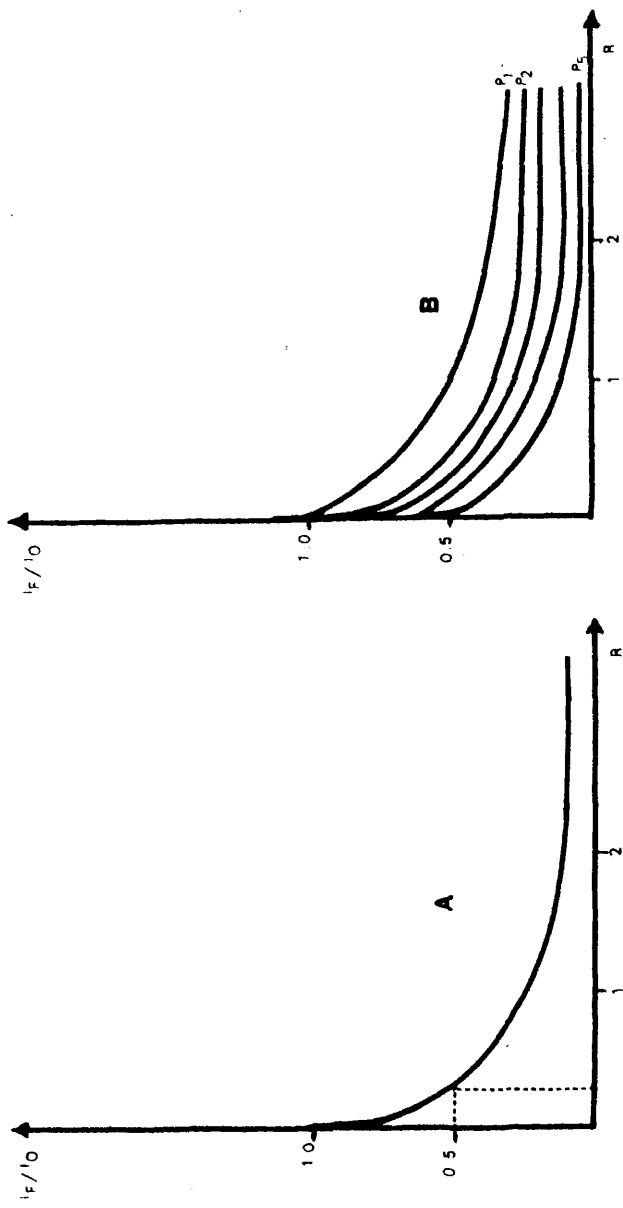


FIG 10

- a) CURVA TEORICA $I_F/I_0 = f(R)$
- b) INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION EN PROTEINA P
($P_1 < P_2 < \dots < P_5$)

pre máxima para $R = 0$, es tanto mayor en valor absoluto cuanto mayor sea $[P]$.

Por otra parte para R distinto de cero, la derivada, es decir la pendiente de la tangente pasa por un máximo en valor absoluto pa
ra $[P] = \frac{1}{k R}$

Si se estudia $\frac{l_F}{l_0} = f [P]$ para $R = \text{constante}$, los resulta
dos son simétricos, y se obtiene una función uniformemente decre -
ciente (fig1a) con concavidad hacia arriba en la que la derivada es
máxima en el punto $[P] = 0$ e igual a $-k R$.

Si se estudia esta función para diferentes valores de R , se
comprueba (fig11,b) que la derivada siempre máxima para $[P] = 0$,
es tanto mayor en valor absoluto cuanto mayor sea R . Por otra par
te, para $[P]$ distinto de cero la derivada pasa por un máximo en va
lor absoluto para $R = \frac{1}{k [P]}$

Se debe insistir sobre el carácter formal de las deducciones
precedentes, en efecto, las variables R y $[P]$ no son independien
tes y cuando se hace variar $[P]$ manteniendo R constante, hay que

hacer variar C_T
Puesto que $(R = \frac{C_T}{P})$

y cuando $[P]$ tiende a cero o a infinito, R es indeterminado.

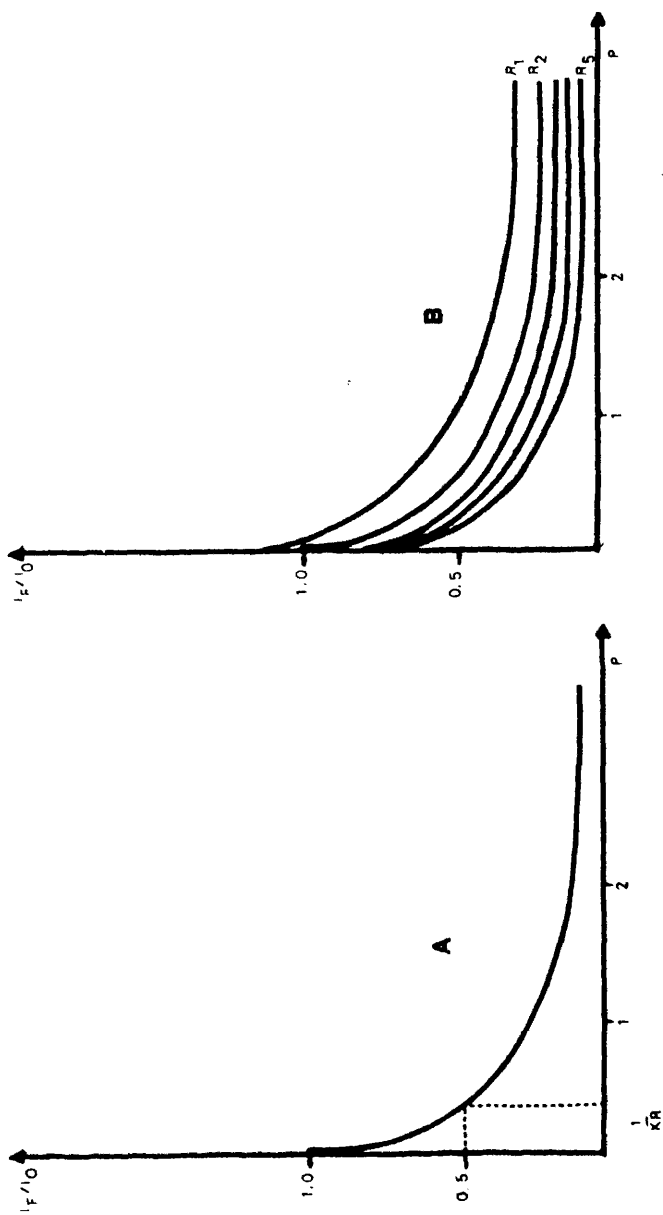


FIG 11

a) CURVA TEORICA $I_F/I_0 = f(P)$

b) INFLUENCIA DE R
 $(R_1 < R_2 < R_3 < \dots < R_5)$

Es importante observar que, para un valor dado de R , la relación $\frac{I_F}{I_0}$ decrece cuando R aumenta y tiende asintóticamente a cero.

Las curvas $\frac{I_F}{I_0} = f(R)$ tienden a superponerse cuando amenta [1].

Algunos autores (54,55,56) han pensado que esto corresponde a la fijación de la totalidad del medicamento sobre la proteína. Esto puede parecer lógico a primera vista, pero una deducción tal viene a suponer implícitamente que la relación de concentraciones iniciales R es igual a la relación de moléculas libres en el equilibrio, lo que no es forzosamente el caso, en particular cuando hay varios sitios de fijación.

Por tanto no es necesaria esa interpretación pues como hemos visto se encuentra este resultado matemáticamente sin hablar de saturación.

Por el contrario, se debe insistir sobre la importancia de la introducción del parámetro R y no ver en él una simple comodidad de cálculo. En efecto, cuando existen uno o varios sitios de fijación se tendrán otras tantas formas de fijar la totalidad del medicamento en las que R será más pequeño e inferior a la unidad.

Si se trazaran pués, las curvas experimentales (fig 12)

$$\frac{I_F}{I_0} = f (R)$$

para diferentes concentraciones de proteínas, es facil demostrar que para concentraciones en proteínas $P_1 < P_2$, un mismo valor

$\frac{I_F}{I_0}$ corresponde a concentraciones totales de medicamento idénti
cas: $C_T^1 = C_T^2$

Para trazar las isotermas de ligazón, la representación de Scatchard (57) es la más cómoda.

Hay que expresar r y C_c a partir de los datos de amortiguación de fluorescencia.

Siendo la intensidad de fluorescencia proporcional al número de emisores, en presencia del medicamento será pués, proporcional a la diferencia entre el número total de emisores E_{TP} y el número de emisores inhibidos por el medicamento E_{TQ} . Si B es una constante

$$I_F = B (E_{TP} - E_{TQ})$$

Aquí es donde interviene la hipótesis fundamental del método que puede dar lugar a discusión.

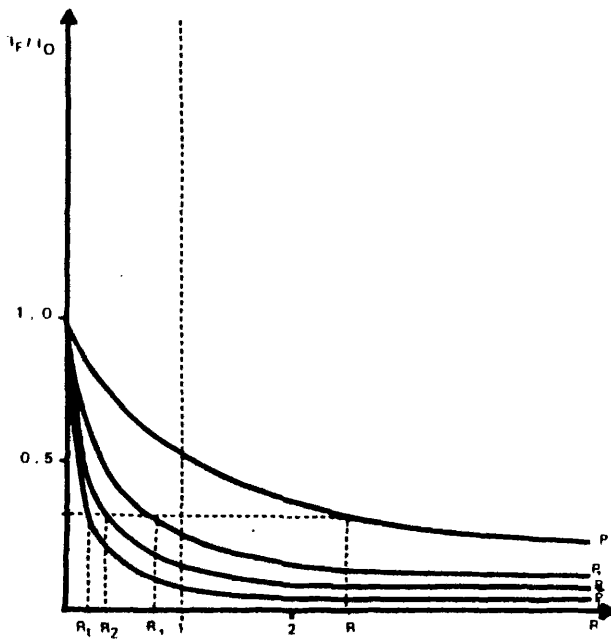


FIG 12

CURVAS EXPERIMENTALES $I_f/I_0 = f(R)$
PARA
DIFERENTES CONCENTRACIONES DE P

Se quiere en efecto, determinar la concentración en droga libre C_C igual a la diferencia entre la concentración total en droga C_T y la concentración en droga ligada C_L .

Para poder determinar la concentración en droga ligada C_L se supone que un emisor (Triptófano) está inhibido por una sola molécula de droga y por tanto

$$C_L = E_{TQ}$$

Si se tiene n emisores por molécula de proteína se puede escribir

$$I_F = B (n [P] - C_L)$$

de donde

$$\frac{I_F}{I_0} = 1 - \frac{C_L}{n [P]}$$

Se puede entonces relacionar las concentraciones en droga ligada (C_L) produciendo una misma disminución relativa de la fluorescencia para dos concentraciones diferentes de proteína $[P_1]$ y $[P_2]$ (para las cuales se tiene $C_T^1 = C_T^2$)

$$C_L^1 = C_L^2 \frac{R_2}{R_1}$$

A partir de aquí si sobre una de las curvas experimentales se puede considerar que se obtiene una fijación de la totalidad del me -

dicamento es decir

$$C_L = C_T$$

se tiene que

$$C_L = C_T \frac{Q}{R} = [P]Q$$

para una concentración de proteína en que R sea mayor que Q .

En consecuencia se obtiene por definición (ver fig 12)

$$r = \frac{C_L}{[P]} = Q$$

$$C_c = C_T - C_L = [P] (R - Q)$$

$$\frac{r}{C_c} = \frac{Q}{P (R - Q)}$$

según lo anterior vemos que en el método de estudio de interacciones por amortiguación de fluorescencia es imprescindible aproximarse a la unión total del medicamento, para ello es necesario poder alcanzar valores de R muy inferiores a la unidad. (6'5)

En efecto, sobre las curvas $\frac{l_f}{l_0} = f (R)$ para un valor de $[P]$ determinado, los valores pequeños de R corresponden a un exceso de proteína (y no es imposible que el medicamento esté ligado totalmente), mientras que los valores elevados de R corresponden a un

exceso de medicamento (y es imposible esté ligado en su totalidad) .

Por tanto, dado que la relación $\frac{I_F}{I_0}$ tiende a la unidad y que la derivada aumenta en valor absoluto cuando R tiende a cero vemos que la precisión de los datos resulta muy pequeña.

Hay que aprovechar el hecho de que a $R = \text{constante}$ la relación $\frac{I_F}{I_0}$ tiende asintóticamente hacia cero a medida que aumenta la concentración de proteína.

Para cualquier concentración de proteína se puede encontrar una concentración de medicamento tal que sea fijado en su totalidad. Sin embargo, las medidas de extinción de fluorescencia en este caso particular no serán posibles más que si se toma la concentración en proteína $[P]_1$ lo más elevada posible para poder conservar una precisión suficiente sobre las medidas a valores muy bajos de Q.

Las concentraciones en proteína $[P]$ deberán ser elegidas en consecuencia de forma que se disponga de un número de puntos suficientes para el trazado de las isotermas.

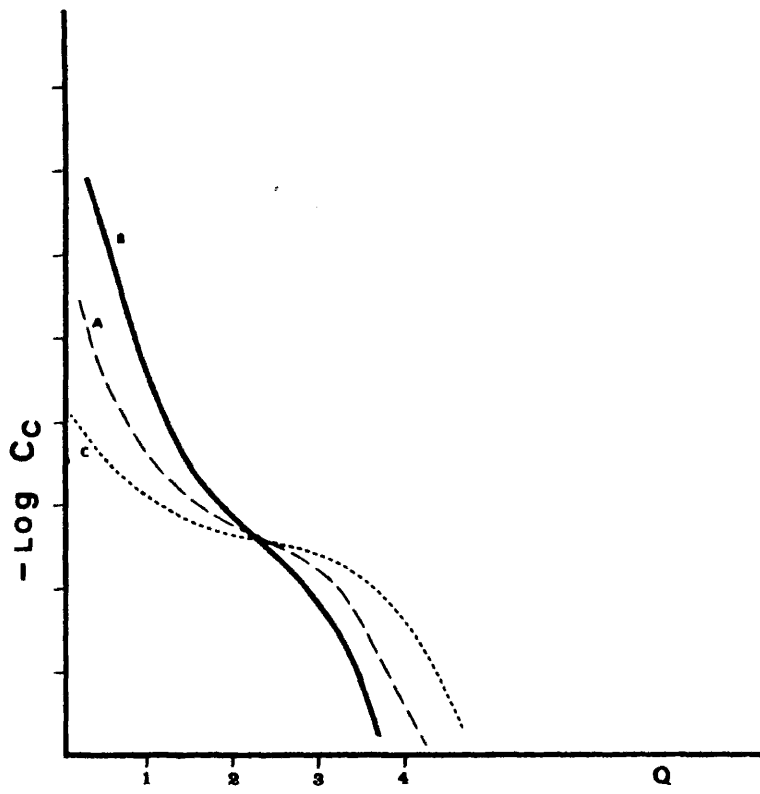


FIG N° 13

Muchos autores han trabajado sobre la asociación de diversas sustancias a la albúmina por el método de amortiguación de la fluorescencia así Chen (70) estudia la asociación de la bilirrubina a la - Albúmina, los resultados están en general de acuerdo con los obtenidos por el método de la peroxidasa y confirman que la inhibición - conduce a los verdaderos parámetros de unión para la bilirrubina - (71', 72 , 73) .

Levine (65) , estudia también esta asociación y aplica su estudio a la unión de bilirrubina a la albúmina en el suero.

Evrain y colaboradores (74) han estudiado las interacciones - de la seroalbúmina y la alfa - fetoproteína de rata con la alfatoxi - na B , por inhibición de la fluorescencia y determinan los parámetros de unión demostrando que no hay especificidad estricta en tales uniones .

Attallah y colaboradores (75) estudian también por inhibición de la fluorescencia las interacciones entre diversos esteroides y - proteínas, y la influencia que sobre estas interacciones tiene la - urea en concentraciones que van de 2 a 8 Molar , y comparan sus resultados con los de Abelson y colaboradores (76) que estudian por un método de solubilidad la interacción de la testosterona con

el triptófano y con el ester etílico de la tirosina. Attallah y colaboradores concluyen que el método de inhibición de la fluorescencia es preferible para los estudios de interacción, al método de reparto .

Ya otros autores (77) han utilizado la técnica de inhibición de la fluorescencia para la unión de la tiroxina a la albúmina, y Lehrer (78) utiliza esta misma técnica en la inhibición de la fluorescencia del triptófano con sistema de lisocima.

M. Bourdeaux - Pontier y colaboradores (79) estudian la formación del complejo furosamida - SAH por inhibición de la fluorescencia.

PARTE EXPERIMENTAL.

MÉTODOS DE VALORACION

Reactivos

- Dicloxacilina sódica monohidrato, compactada Pot^a 895 mcg/ mg,

Pm = 513,3

- Solución tampón

Composición del tampón de pH = 7'4

Cl Na. . . 5'84 grs

Cl NH₄. . . 0'54 grs

Fosfato dipotásico hidratado (PO₄ H K₂ 3H₂ O) 7'57 grs

Agua destilada hasta 1.000 cc

Se comprobó el pH con un pHmetro Coleman, modelo 39

- Seroalbúmina humana (S.A.H.), fracción V, marca Sigma (Chemical Company). Pm = 55.600

- Vitamina B₁₂, rhone - poulenc - chimie fine

APARATOS

El barrido se ha realizado en

- Espectrofotómetro automático Perkin - Elmer, modelo 402

Las valoraciones se han realizado en

- Espectrofotómetro Shimadzu - Q V modelo 50
- Espectrofluorímetro Perkin - Elmer, M P F modelo 44 A

A - La solución de dicloxacilina en agua destilada después de filtrada por un crisol de Gooch presenta el espectro de absorción que se puede observar en la figura número 14 .

B - Solución de dicloxacilina en líquido tampón, se lleva directamente al espectrofotómetro, utilizando como blanco primero agua destilada y a continuación líquido tampón. Observamos salen curvas practicamente iguales (gráfica número 15) .

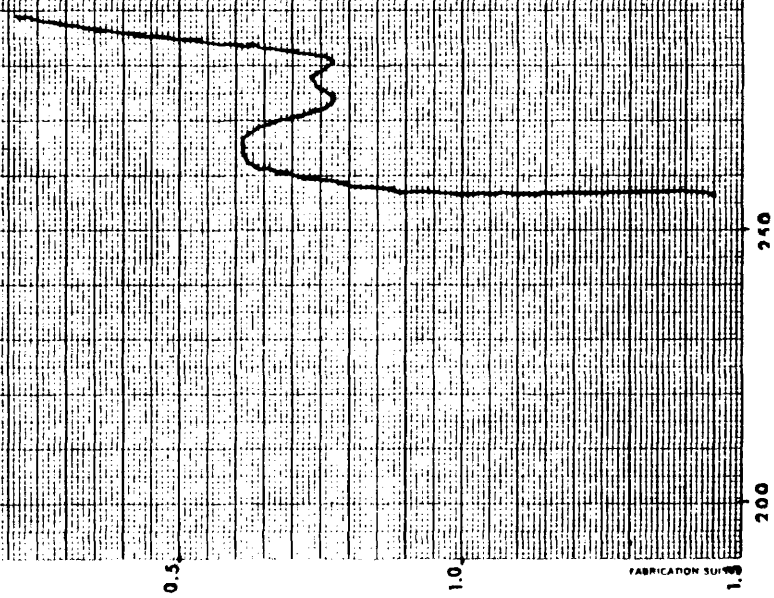
C - Solución de seroalbúmina humana en líquido tampón. Nos da el espectro de la gráfica número 16 . En espectrofotómetro Perkin - Elmer

D - El espectro de absorción de la vitamina B₁₂ en líquido tampón se puede observar en la gráfica número 17

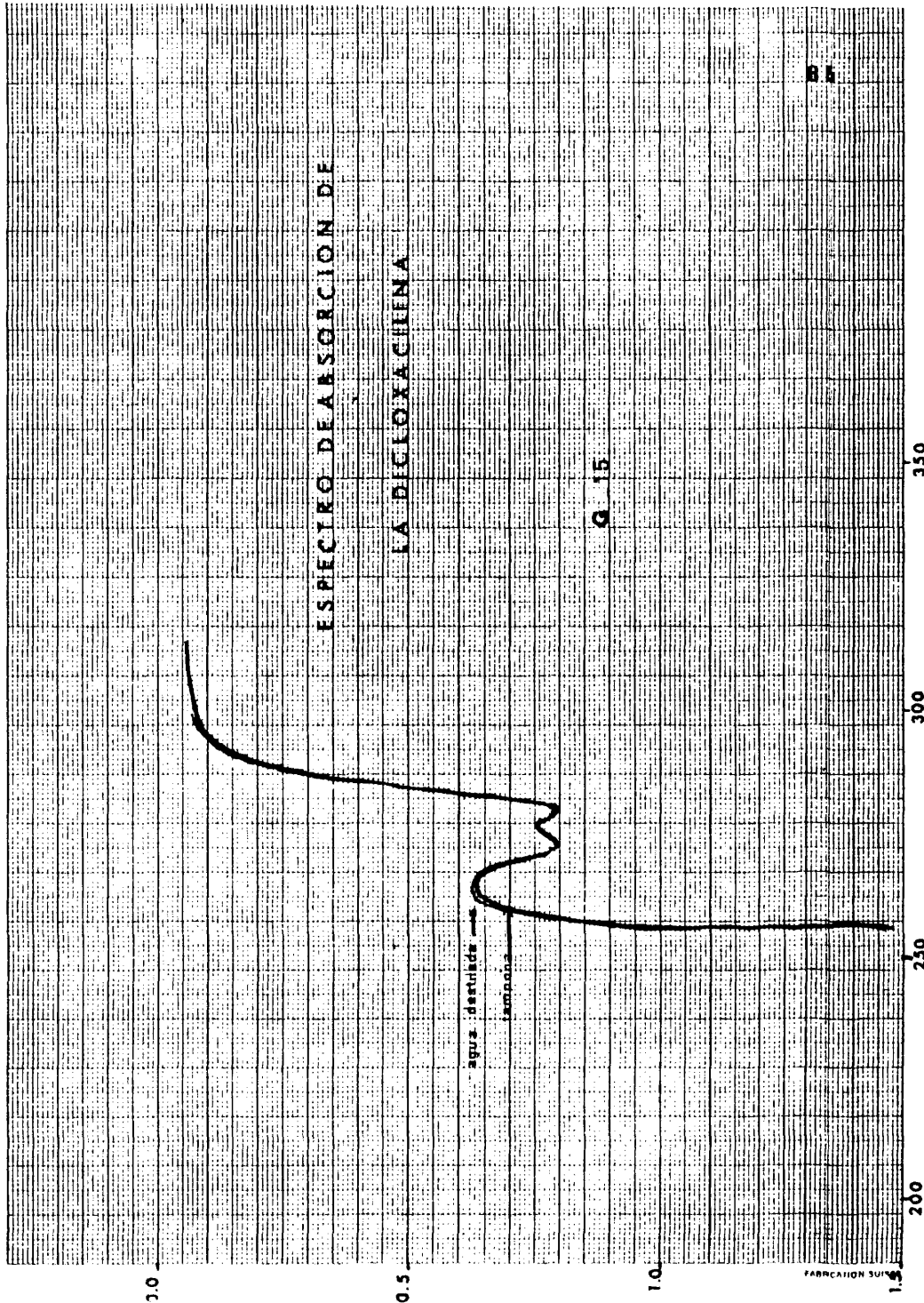
E - El espectro de absorción de la mezcla proteína - dicloxacilina lo observamos en la gráfica número 18

ESPECTRO DE ABSORCIÓN DE
LA PICLOXACINA

Gráfica nº 14

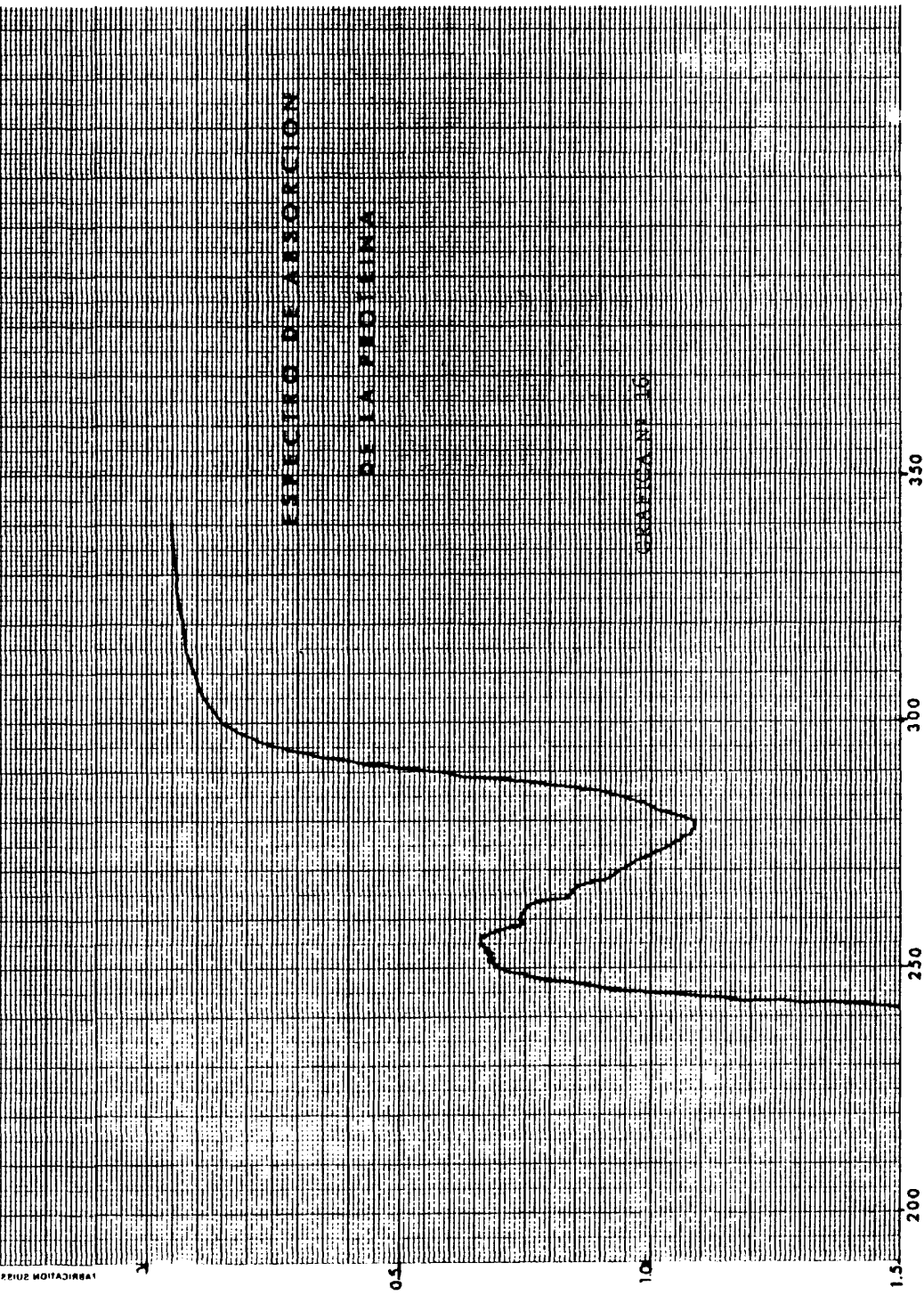


B4



ESPECTRO DE ABSORCIÓN
DE LA PROTEINA

GRÁFICO N.º 10

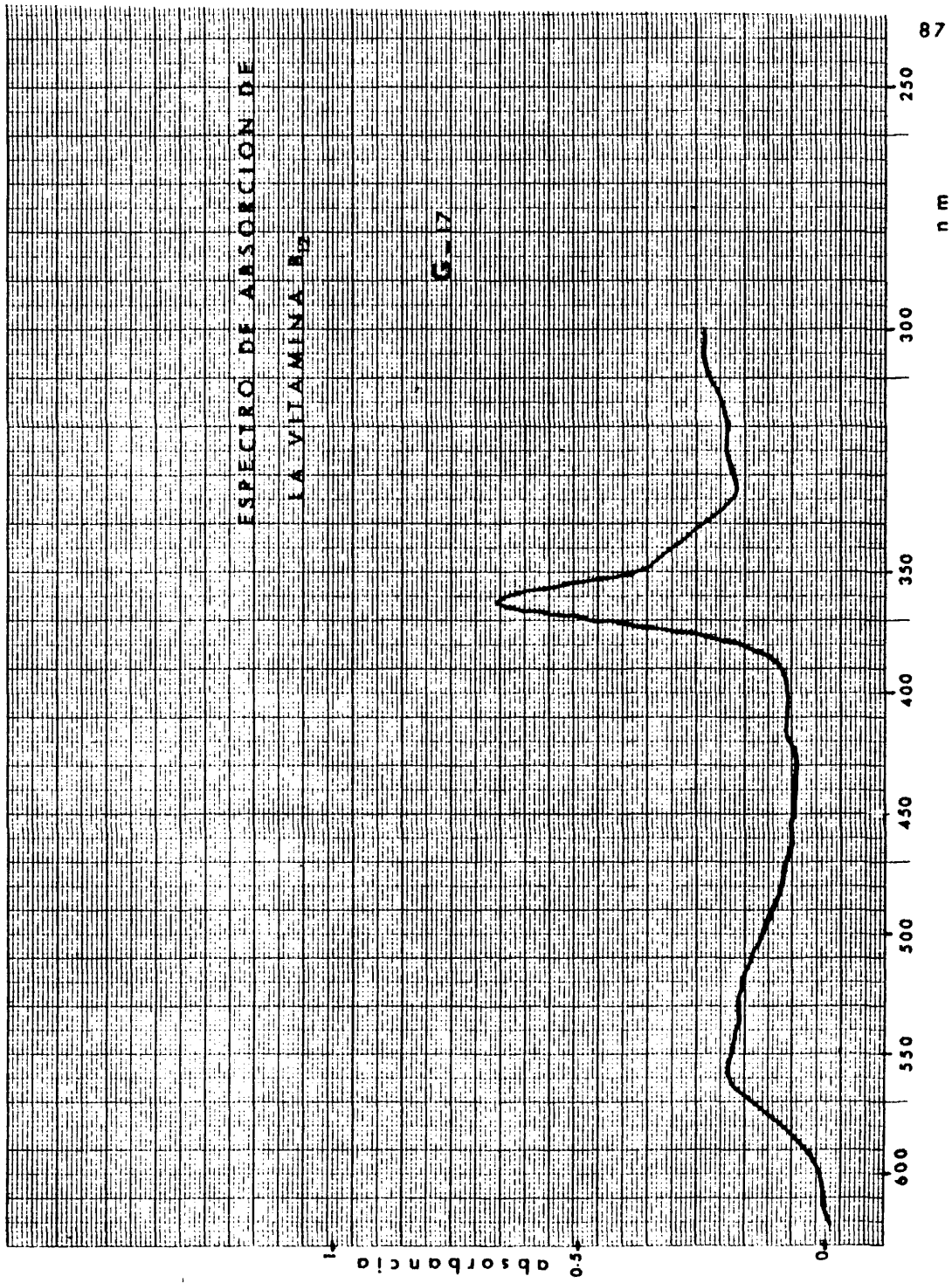


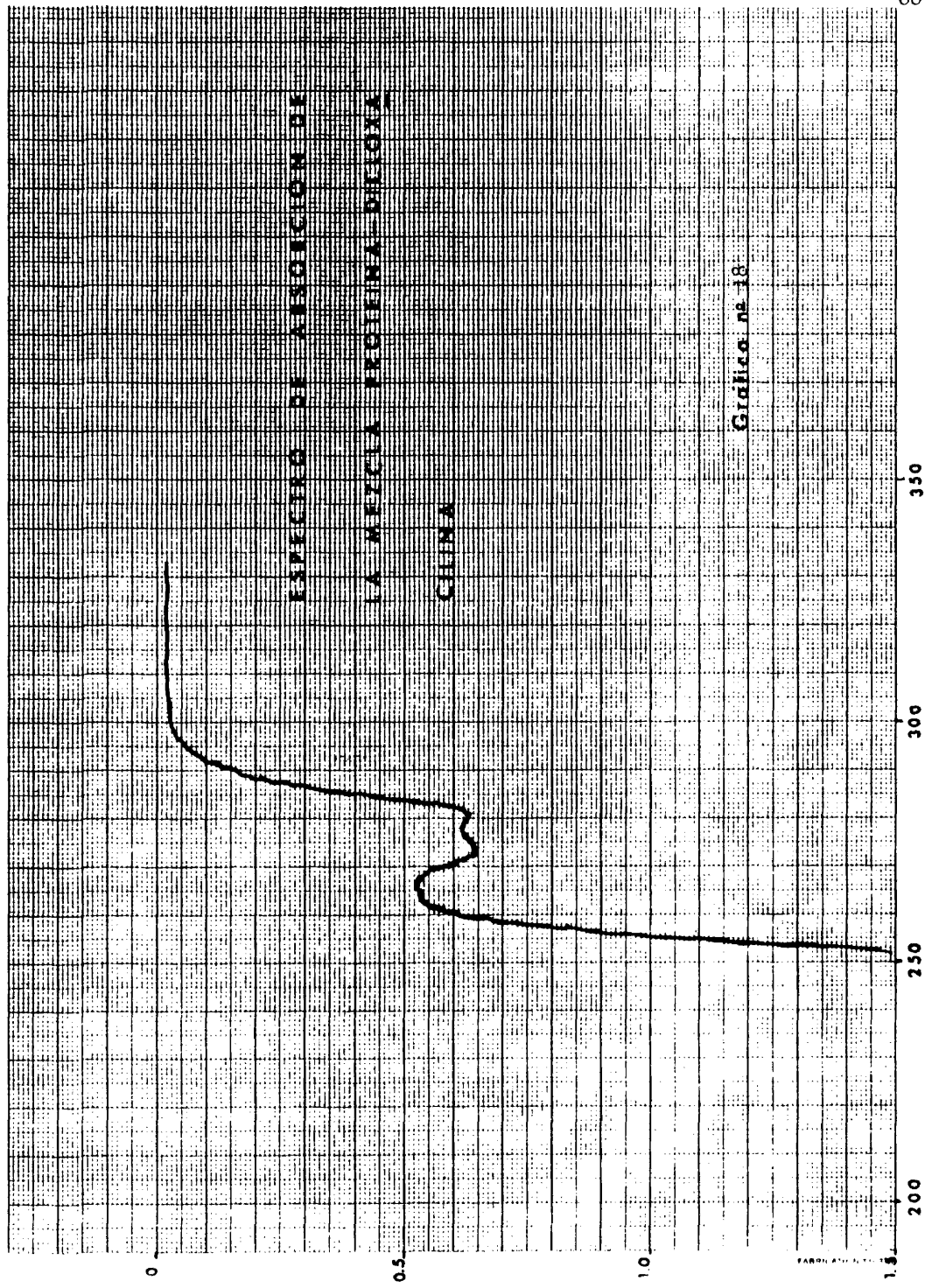
87

ESPECTRO DE ABSORCIÓN DE

LA VITAMINA B₁₂

G-17





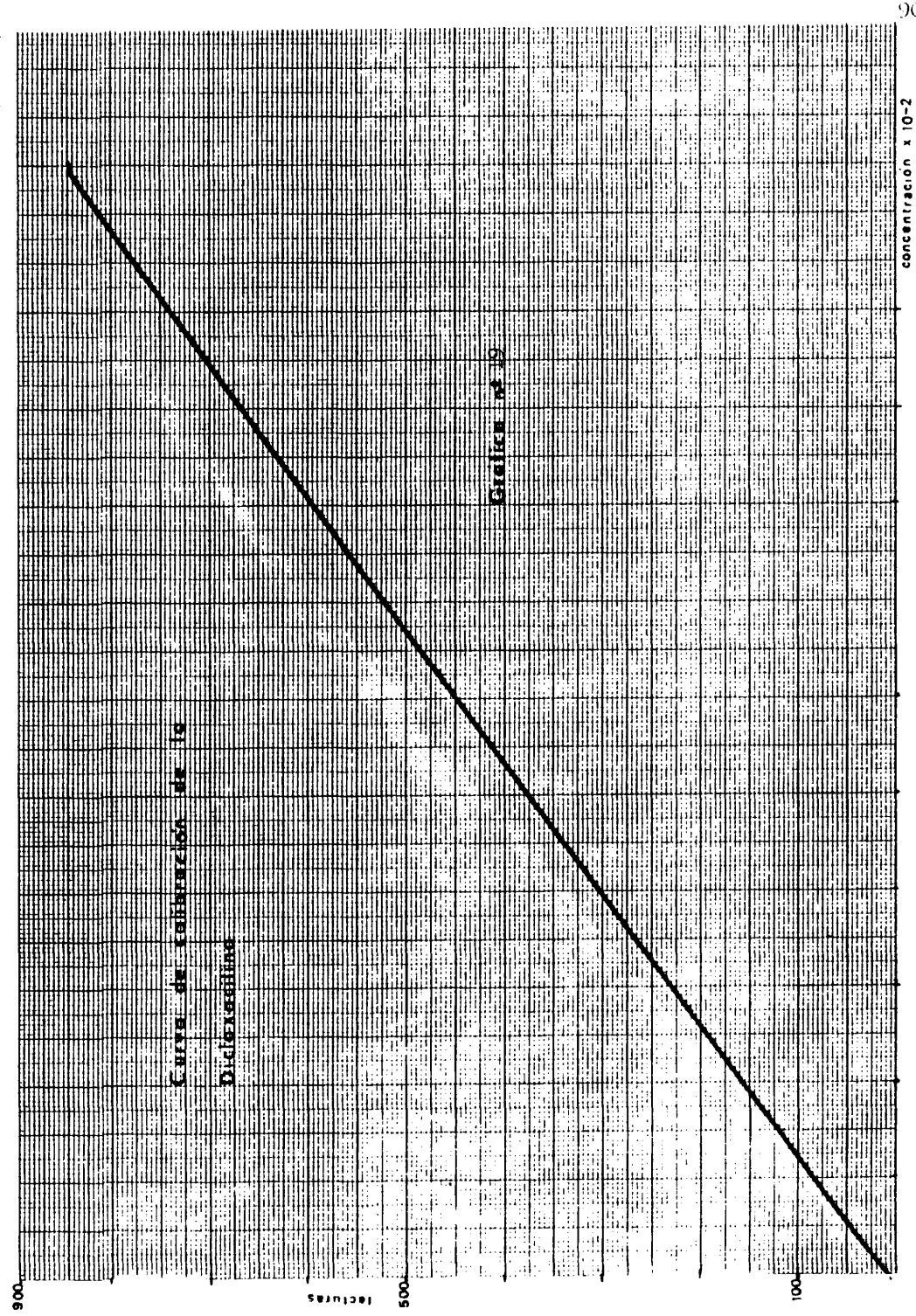
Curva de calibración de la dicloxacilina

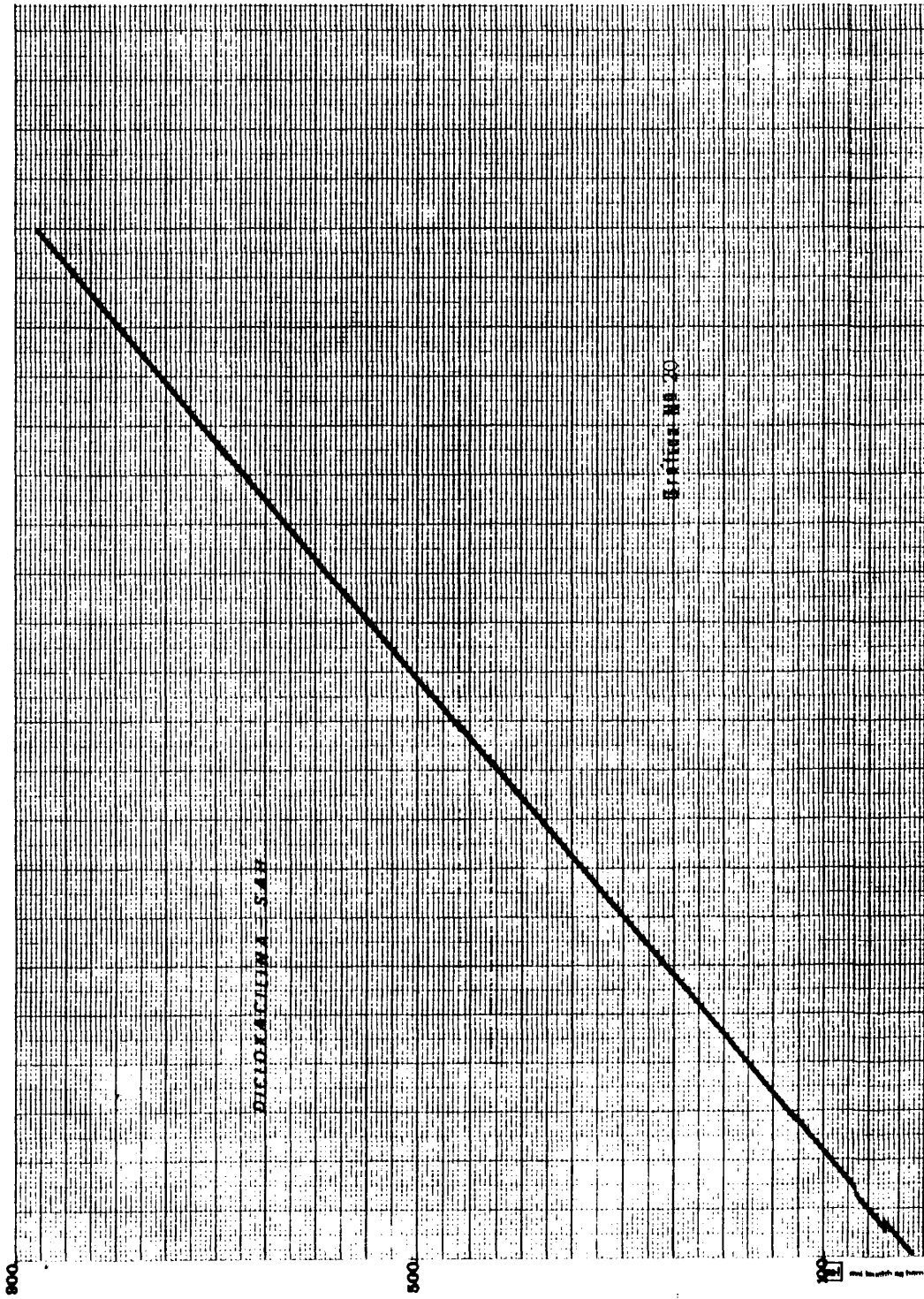
Partiendo de la solución madre de dicloxacilina hacemos las siguientes diluciones: 4/5, 3/4, 3/5, 1/2, 2/5, 1/4, 1/5, 1/10, en líquido tampón, procediéndose a su lectura en el espectrofotómetro Shimadzu - Q V - 50 a 280 nm, rendija 0'2, utilizando como blanco solución tampón. Los resultados se registran sobre papel milimetrado dando como resultado la gráfica número 19

Para valorar el antibiótico total en presencia de S A II, hemos preparado una curva patrón a diferentes concentraciones del antibiótico, y todas, con igual concentración de la proteína. Gráfica número .20

Curva de calibración de la vitamina B₁₂

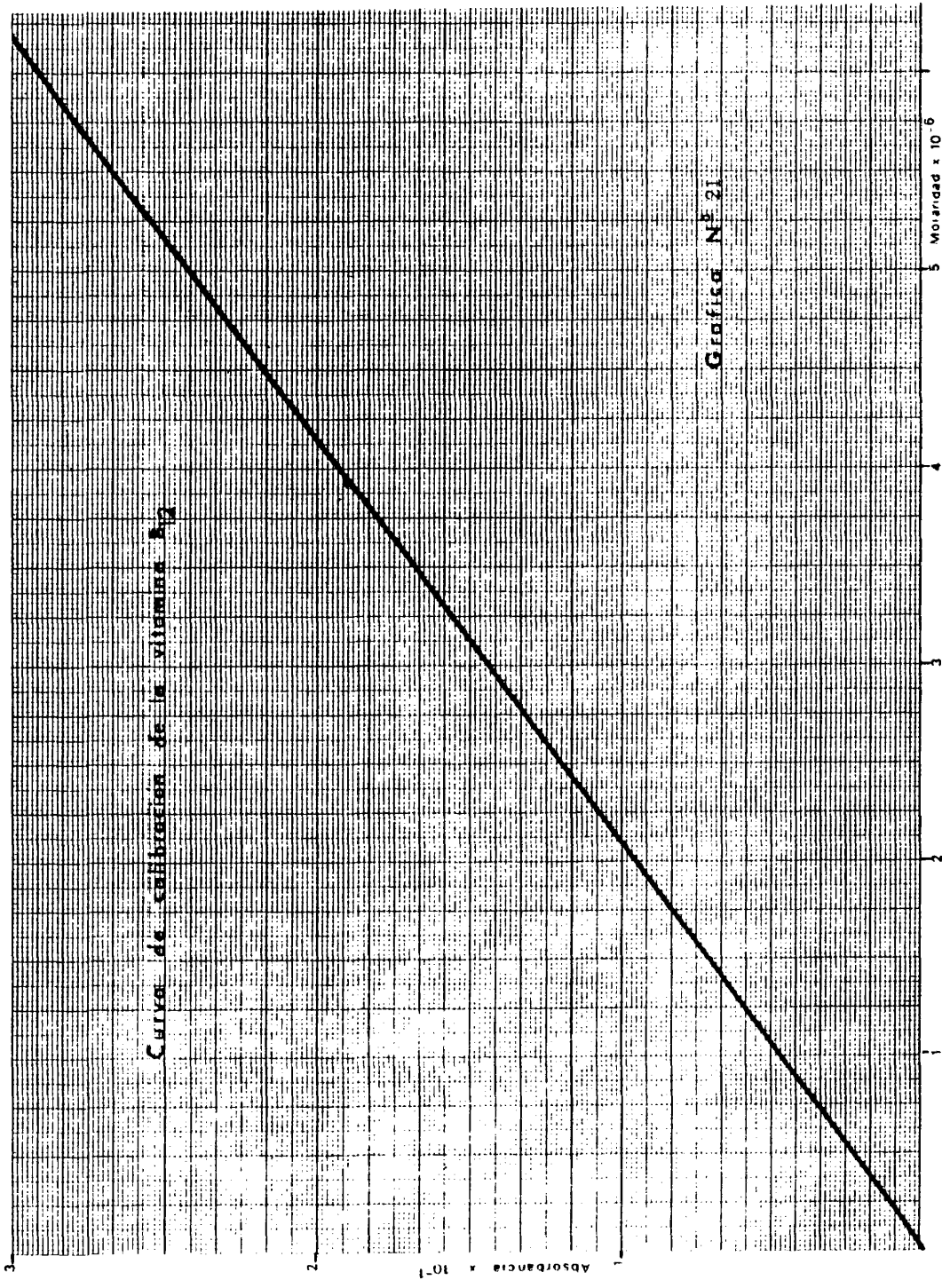
A partir de la solución madre de vitamina B₁₂ se hacen diluciones en líquido tampón. Estas soluciones se valoran en espectrofotómetro Shimadzu Q V - 50 a 360 nm y 0'3 de rendija. Los resultados se representan en papel gráfico milimetrado, poniendo las absorbancias en las ordenadas y las concentraciones en las abscisas. Gráfica número 21





concentración M 2

Curva de calibración de la vitamina B12



Grafica N° 21

DIALISIS DE EQUILIBRIO

Se realiza según el método de Aussel y colaboradores (51), y se utiliza el dispositivo de la figura número 22

En los tubos de diálisis (Colodión S M 13.200 de Sartorius), previamente equilibrados en el tampón de fosfatos de pH = 7'4, se colocan 3 ml de la solución de S A H. Estos tubos se introducen en un frasco de cristal transparente que contiene 11 ml de solución de antibiótico (dicloxacilina). La razón de las cantidades 3 ml y 11 ml respectivamente es para igualar el nivel dentro y fuera del tubo de diálisis y paliar en lo posible los efectos osmóticos.

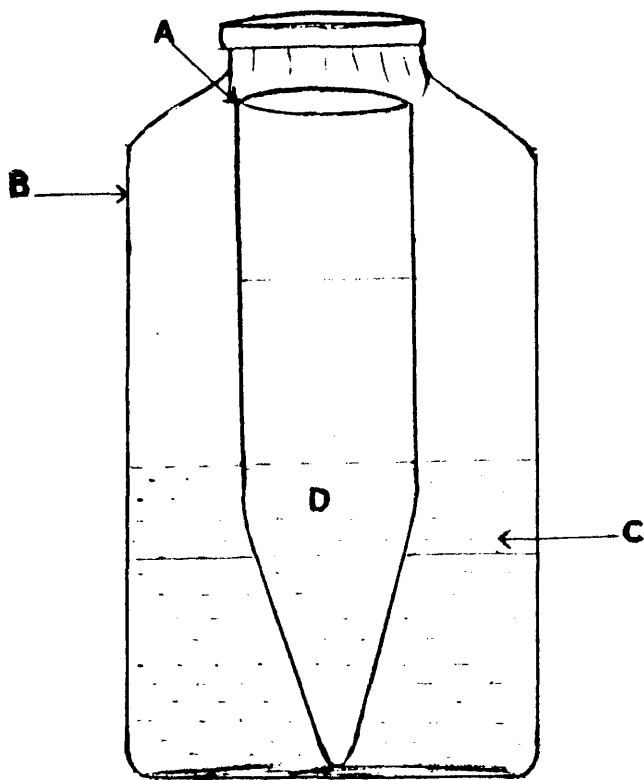
El conjunto se coloca a 4° C y se mantiene a esta temperatura durante sesenta horas (tiempo necesario para equilibrar la diálisis).

Pasado este tiempo el tubo de diálisis se extrae, se enjuga ligeramente y se pesa para calcular la variación de volumen y conocer exactamente la concentración de albúmina de la solución.

El antibiótico se valora en la solución interior y en la exterior del tubo por espectrofotometría.

La relación de la concentración de dicloxacilina dentro del tu-

DISPOSITIVO PARA DETERMINAR LA DIALISIS



- A.- Tubo de colodión para diálisis
- B.- Frasco de cristal transparente
- C.- Solución de medicamento
- D.- Solución de proteína

FIG. 22

bo frente a la concentración de la misma en el recinto externo, permiten calcular el porcentaje de antibiótico combinado. Los resultados obtenidos para la dicloxacilina - seroalbúmina humana, se pueden observar en la tabla número 1

T A B L A N° I

CALCULO DE LOS PARAMETROS DE INTERACCION " IN VITRO " DE LA DICLOXACILINA
SODICA CON ALBUMINA HUMANA, POR LA TECNICA DE "DIALISIS DE EQUILIBRIO "

Expe - riencia N°	Conc. Molar Soluc. Proteina Cp . 10 ⁻⁵	Conc. Total de Medicamento CT . 10 ⁻⁵	Relación R		Conc. Molar Medic. Ligado CL . 10 ⁻⁵
				R	
1	1'18	76'59	64'90		2'19
2	1'18	62'47	52'94		2'14
3	1'28	45'46	35'51		2'21
4	1'18	36'26	30'73		1'98
5	1'18	30'98	26'25		1'89
6	1'18	23'66	20'05		1'81
7	2'05	22'92	11'18		3'06

T A B L A N.º I

CALCULO DE LOS PARAMETROS DE INTERACCION "IN VITRO" DE LA DICLOXACILINA
SODICA CON ALBUMINA HUMANA; POR LA TECNICA DE "DIALISIS DE EQUILIBRIO"

Expe - riencia Nº	Conc. Molar Med. Libre $C_c \cdot 10^{-5}$	r	$\frac{r}{C_c} \cdot 10^5$	Log. C_c
1	74'4	1'86	0'025	- 3'13
2	60'3	1'81	0'030	- 3'22
3	43'25	1'73	0'040	- 3'36
4	34'28	1'68	0'049	- 3'40
5	29'09	1'60	0'055	- 3'54
6	21'85	1'53	0'070	- 3'60
7	19'86	1'49	0'075	- 3'70

T A B L A N º I

CALCULO DE LOS PARAMETROS DE INTERACCION " IN VITRO " DE LA DICLOXACILINA
SODICA CON ALBUMINA HUMANA, POR LA TECNICA DE "DIALISIS DE EQUILIBRIO "

Expe - riencia	Conc. Molar Soluc. Proteina		Conc. Total de Medicamento	Relación	Conc. Molar Medic. Ligado
	$C_p \cdot 10^{-5}$	$C_t \cdot 10^{-5}$			
8	2'05	11'76	5'73	2'76	
9	2'05	8'58	4'18	2'58	
10	2'39	7'67	3'21	2'87	
11	2'39	6'34	2'65	2'70	
12	2'05	5'03	2'45	2'17	
13	2'05	4'33	2'11	2'03	
14	2'39	3'76	1'57	2'10	
15	2'39	3'45	1'45	2'00	

T A B L A N° I

CALCULO DE LOS PARAMETROS DE INTERACCION "IN VITRO" DE LA DICLOXACILINA
SODICA CON ALBUMINA HUMANA, POR LA TECNICA DE DIALISIS DE EQUILIBRIO"

Expe - riencia Nº	Conc. Molar Med. Libre $C_c \cdot 10^{-5}$	r	$\frac{r}{C_c} \cdot 10^5$	Log. C_c
8	9'00	1'35	0'15	- 4'04
9	6'00	1'26	0'21	- 4'22
10	4'80	1'20	0'25	- 4'32
11	3'64	1'13	0'31	- 4'44
12	2'86	1'06	0'37	- 4'54
13	2'30	0'99	0'43	- 4'64
14	1'66	0'88	0'53	- 4'78
15	1'45	0'84	0'58	- 4'84

T A B L A N°1

CALCULO DE LOS PARAMETROS DE INTERACCION " IN VITRO " DE LA DICLOXACILINA
SODICA CON ALBUMINA HUMANA, POR LA TECNICA DE "DIALISIS DE EQUILIBRIO "

Expe - riencia N°	Conc. Molar Soluc Proteina	Conc. Total de Medicamento	Relación	Conc. Molar Medic. Ligado
	$C_p \cdot 10^{-5}$	$C_T \cdot 10^{-5}$	R	$C_L \cdot 10^{-5}$
16	2'39	3'09	1'29	1'88
17	2'24	2'60	1'16	1'57
18	2'05	2'04	1'00	1'31
19	2'05	1'80	0'88	1'20
20	2'39	1'73	0'72	1'24
21	1'75	1'11	0'63	0'77
22	1'17	0'70	0'60	0'45
23	1'40	0'66	0'47	0'47

T A B L A N.º I

CALCULO DE LOS PARAMETROS DE INTERACCION "IN VITRO" DE LA DICLOXACILINA
SODICA CON ALBUMINA HUMANA, POR LA TECNICA DE "DIALISIS DE EQUILIBRIO"

Expe - rtencia N.º	Conc. Molar Med. Libre $C_c \cdot 10^{-5}$	r	$\frac{r}{C_c} \cdot 10^5$	Log. C_c
10	1'21	0'79	0'65	- 4'92
17	1'03	0'70	0'68	- 4'99
18	0'73	0'64	0'87	- 5'14
19	0'60	0'58	0'97	- 5'22
20	0'49	0'52	1'07	- 5'31
21	0'34	0'44	1'30	- 5'47
22	0'25	0'38	1'53	- 5'60
23	0'19	0'34	1'75	- 5'72

T A B L A N° I

CALCULO DE LOS PARAMETROS DE INTERACCION "IN VITRO" DE LA DICLOXACILINA
SODICA CON ALBUMINA HUMANA, POR LA TECNICA DE "DIALISIS DE EQUILIBRIO"

Expe - riencia N°	Coc. Molar Soluc. Proteina $C_p \cdot 10^{-5}$	Conc. Total de Medicamento $C_T \cdot 10^{-5}$	Relación R	Conc. Molar Med. Ligado $C_L \cdot 10^{-5}$
24	1'18	0'49	0'42	0'34
25	1'16	0'41	0'35	0'29
26	2'39	0'59	0'25	0'50
27	2'39	0'46	1'19	0'40
28	2'39	0'41	0'17	0'36
29	9'00	1'22	0'14	1'174
30	2'05	0'26	1'13	0'228
31	9'63	86'69	0'09	86'67

T A B L A N° I

CALCULO DE LOS PARAMETROS DE INTERACCION "IN VITRO" DE LA DICLOXACILINA
SODICA CON ALBUMINA HUMANA, POR LA TECNICA DE "DIALISIS DE EQUILIBRIO"

Expe - riencia Nº	Conc. Molar Med. Libre $C_c \cdot 10^{-5}$	r	$\frac{r}{C_c} \cdot 10^5$	Log. C_c
24	0'15	0'29	2'00	-5'82
25	0'12	0'25	2'15	-5'92
26	0'086	0'21	2'44	-6'06
27	0'065	0'17	2'63	-6'19
28	0'052	0'15	2'89	-6'28
29	0'042	0'13	3'08	-6'38
30	0'032	0'11	3'44	-6'49
31	0'02	0'09	4'5	-6'70

La curva de saturación que representa r frente a R , o sea, la fracción de sitios ocupados frente a la relación $C_T / [P]_T$ se puede observar en la gráfica número 23

El número de sitios viene dado por la intersección de las tangentes a baja concentración y la asíntota. Por este procedimiento se encuentran 2'25 puntos de unión para la dicloxacilina con la SAH por diálisis de equilibrio.

Para calcular la constante de asociación se traza la gráfica de Scatchard r / C_C frente a r (gráfica número 24)

Si la gráfica fuera una línea recta, indicaría una sola clase de sitios de unión y la pendiente sería la constante de asociación. Pero, esta isoterma de asociación no es lineal por lo que hay que suponer que existe más de una clase de sitios de unión. Para comprobar esto y obtener una idea de la naturaleza de esa unión, seguimos el procedimiento de Weber y Anderson (1965) 63, que permite distinguir los diferentes tipos de unión, se trata de representar el logaritmo de la concentración del ligando libre frente al parámetro r , análoga a la representación que se utiliza para una va-

loración plométrica (gráfica número 25 y 26)

El fundamento es el siguiente:

Si S es la fracción de saturación, o sea, la relación de sitios ocupados a sitios posibles

$$S = \frac{[P \bar{C}]}{[P] + [P \bar{C}]} = \frac{C_L}{P_0}$$

La constante de asociación sería:

$$K_a = \frac{[P \bar{C}]}{[P][C_c]} = \frac{C_L / P_0}{[P][C_c] / P_0} = \frac{S}{1 - S} \cdot \frac{1}{C_c}$$

entonces $K_a \cdot C_c = \frac{S}{1 - S}$

y tomando logaritmos

$$\text{Log} \frac{S}{1 - S} = \text{Log} K_a + \text{Log} C_c$$

pero el caso general será

$$\text{Log} \frac{S}{1 - S} = \log K_a + j \log C_c$$

Esta ecuación describe la unión simple, la múltiple y la cooperativa en base a los valores de j .

Si definimos el Span como la longitud del eje logarítmico entre $S = 0'1$ y $S = 0'9$ (lo que supone la unión del 10 al 90%), para $j = 1$, el logaritmo de C_c variará desde $\text{Log } 0'9 / 0'1$ a $\text{Log } 0'1 / 0'9$ lo que supone 1'908 unidades logarítmicas. Pero $j = 1$ es solo en la unión simple.

Para la unión múltiple el Span será j veces el de la unión simple, y para la unión cooperativa será j veces menor.

Como representamos r en lugar de S , dado que

$$r = \frac{n^{\circ} \text{ moles ligando unido}}{n^{\circ} \text{ moles de proteina}}$$

$$y, S = \frac{n^{\circ} \text{ de moléculas ligadas}}{n^{\circ} \text{ de sitios presentes}}$$

la relación entre S y r será

$$r = S \times \text{valor estequiométrico}$$

y para $S = 0'1$, r vale $2'25 \cdot 0'1$,

para $S = 0.9$, r vale $2.25 \cdot 0.9$

Estos valores 0.225 y 2.025 de r corresponden en la gráfica número 26 aproximadamente a 4 unidades logarítmicas lo que significa una unión múltiple.

En la gráfica de Scatchard (gráfica número 24), la forma de la curva es semejante a la que Aussel, Andran y Gallegran (50) consideran debida a dos clases de puntos de unión

n_1 sitios fuertes de constante de asociación K_1

y, n_2 sitios débiles de constante de asociación K_2

O sea que la ordenada en el origen

$$\left(\frac{r}{C_c} \right)_{r=0} = K_1 n_1 + K_2 n_2$$

y la abscisa en el origen

$$\left(r \right)_{r/C_c=0} = n_1 + n_2$$

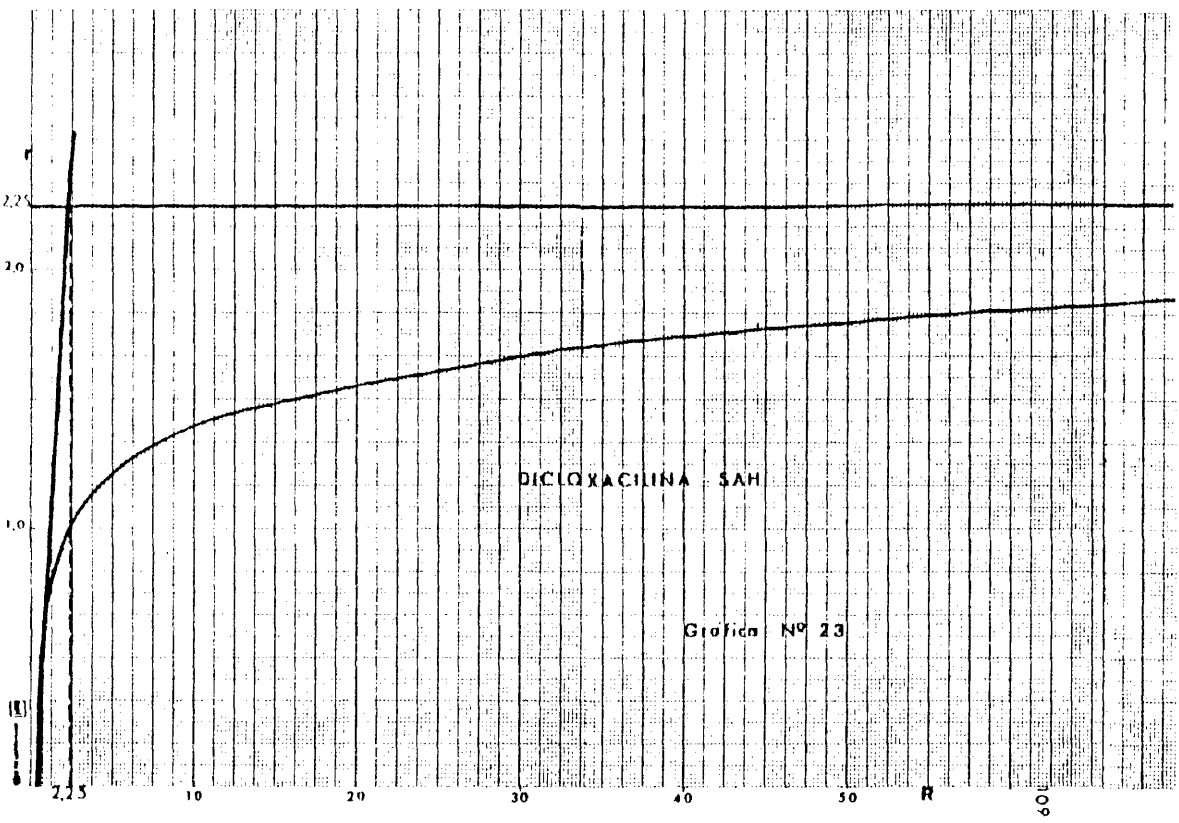
Al existir una gran imprecisión en estas extrapolaciones, para

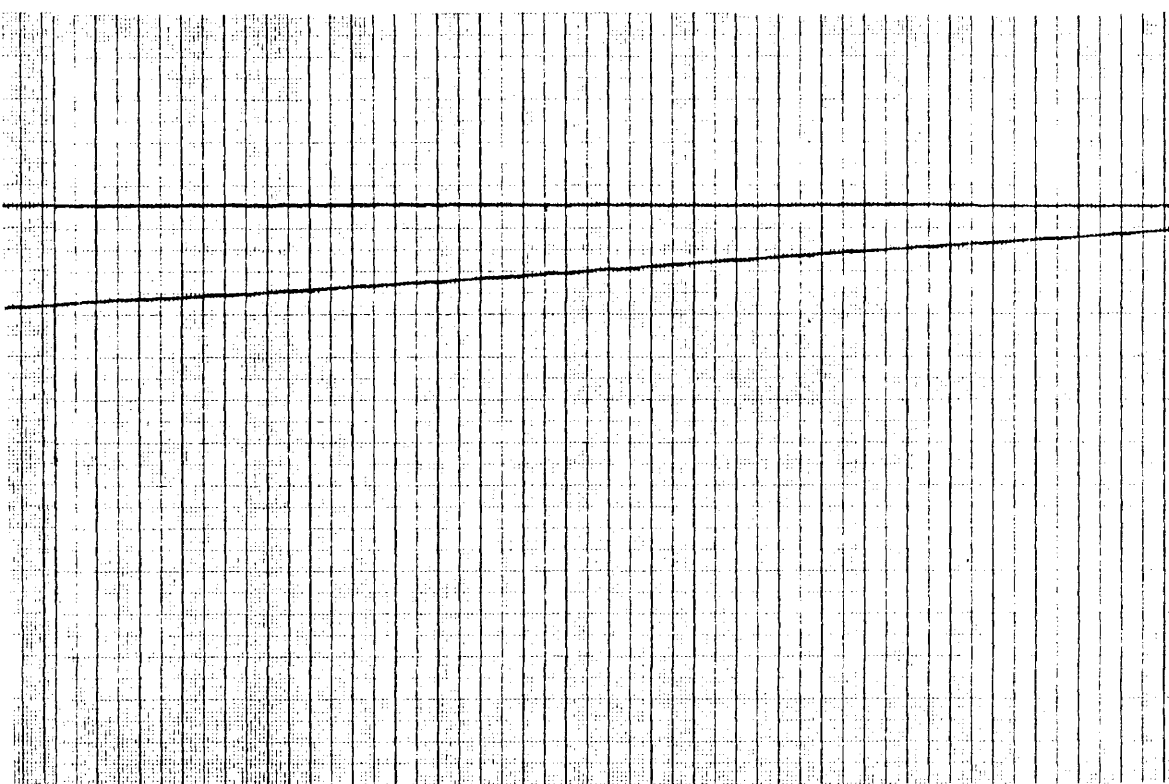
conocer la ordenada y la abscisa en el origen llevamos los puntos a una computadora, que nos da una serie de soluciones cuyas gráficas se comparan con la isoterma experimental.

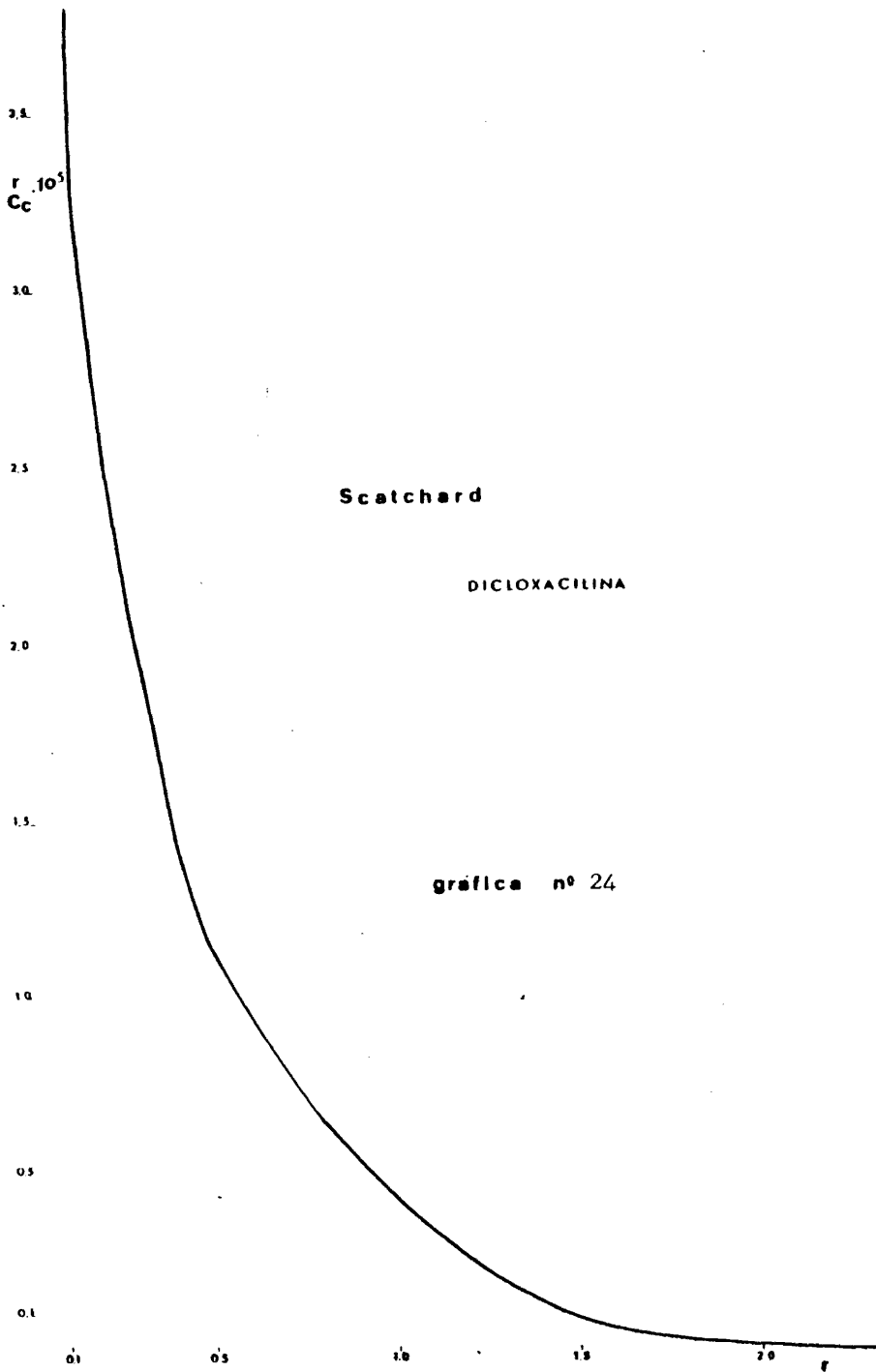
La ecuación de la gráfica más acorde con esta es :

$$y = 5'93 - 24'76x + 49'53 x^2 - 49'60 x^3 + 23'59 x^4 - 4'24 x^5$$

coeficiente de regresión = 0'95827







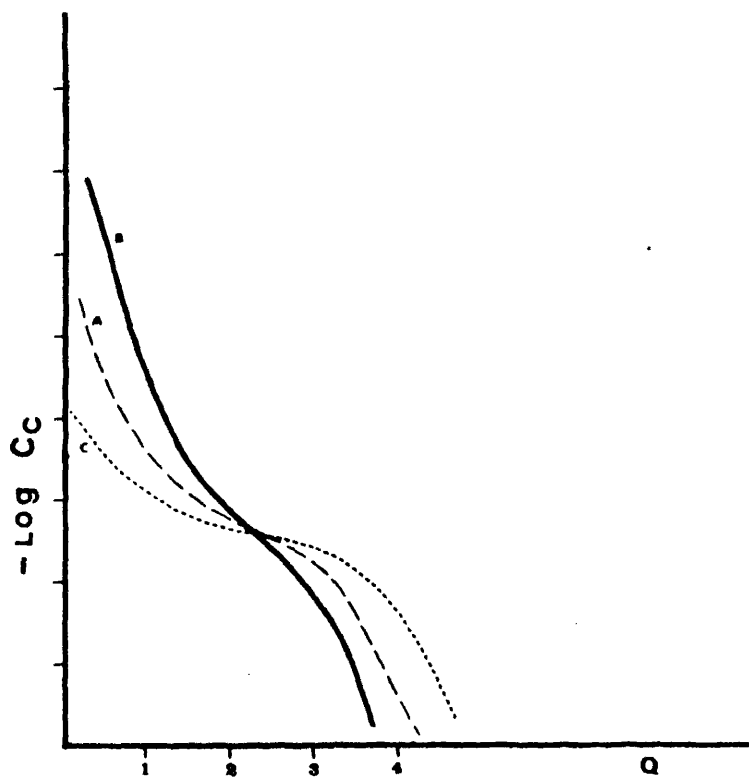
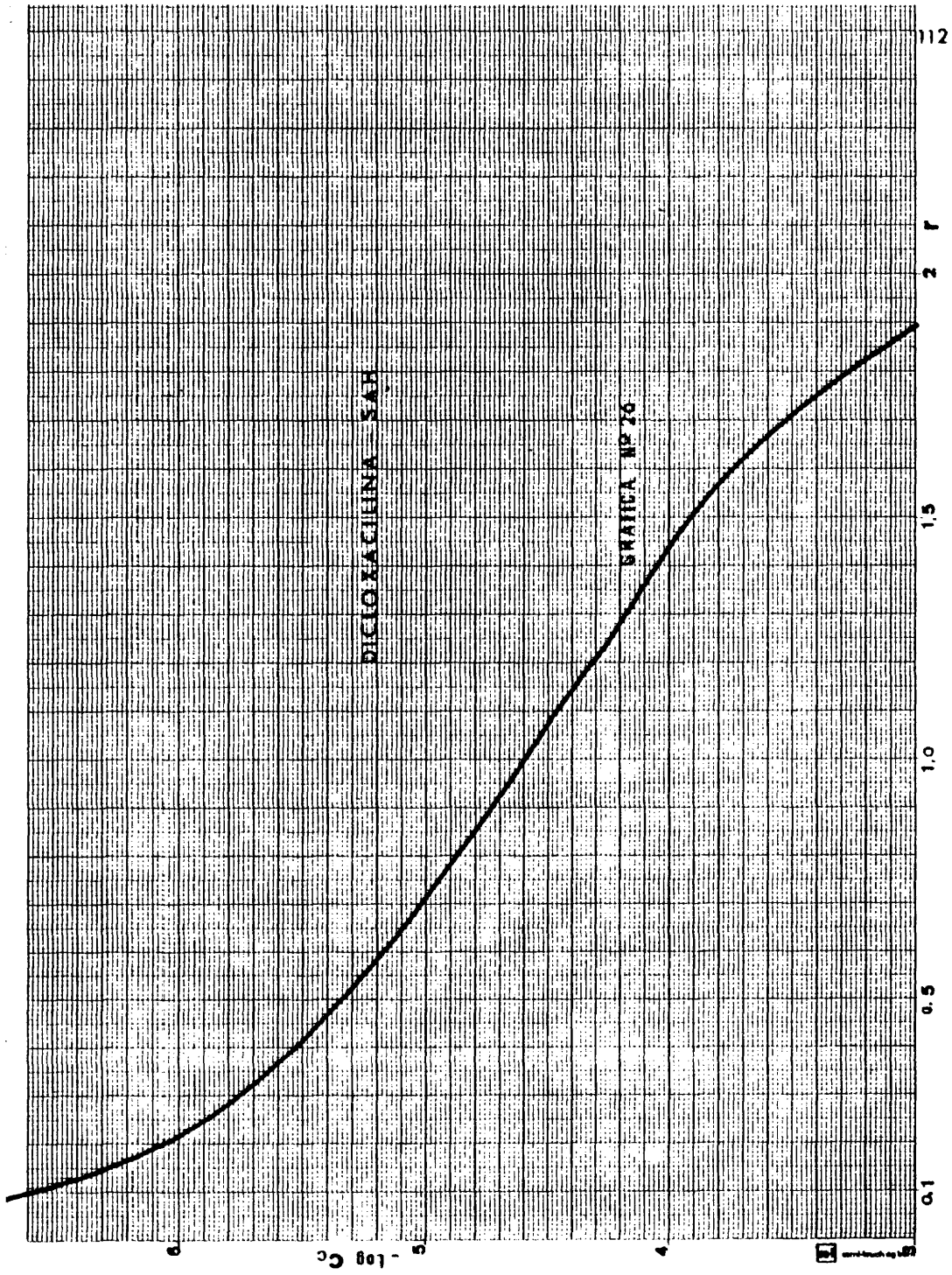


FIG Nº 25

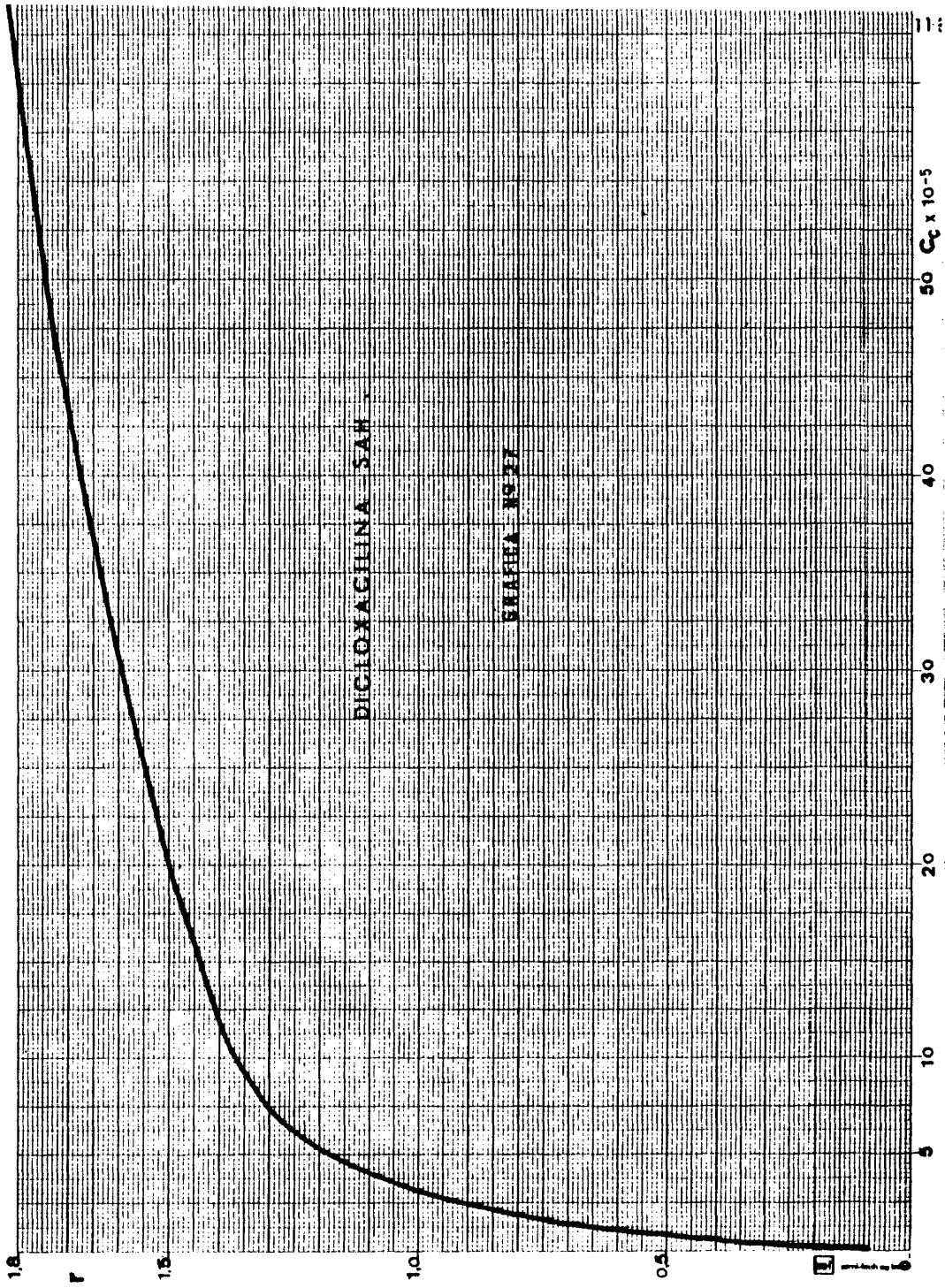


BIBLIOTECA



DICLOXACINA SAH

STATICA NP 26



Hemos estudiado también por diálisis de equilibrio, la asociación de la vitamina B_{12} a la seroalbúmina humana, los resultados se registran en las tablas número II y gráficas número 28,29,30 y 31.

T A B L A N° II

CALCULO DE LOS PARAMETROS DE INTERACCION, IN VITRO " DE LA VITAMINA B₁₂

CON ALBUMINA HUMANA, POR LA TECNICA DE "DIALISIS DE EQUILIBRIO"

Expe- riencia N°	Conc. Molar Soluc Proteina $C_p \cdot 10^{-5}$	Conc. Total de Medicamento $C_T \cdot 10^{-5}$	Relación R	Conc. Molar Med. Ligado $C_L \cdot 10^{-5}$
1	9'98	0'093	0'0093	0'093
2	11'0	0'204	0'0185	0'187
3	9'98	0'301	0'030	0'300
4	5'45	0'220	0'040	0'218
5	11'2	0'675	0'06	0'672
6	5'45	0'49	0'09	0'491
7	9'71	1'13	0'12	1'068
8	4'08	0'54	0'13	0'530

T A B L A N° II

CALCULO DE LOS PARAMETROS DE INTERACCION "IN VITRO" DE LA VITAMINA B₁₂
CON ALBUMINA HUMANA, POR LA TECNICA DE "DIALISIS DE EQUILIBRIO"

Expe- riencia N°	Conc. Molar Med. Libre $C_c \cdot 10^{-5}$	r	$\frac{r}{C_c} \cdot 10^5$	Log. C_c
1	0'0004	0'0093	23'25	-8'40
2	0'0008	0'017	21'05	-8'10
3	0'0015	0'030	19'06	-7'82
4	0'0022	0'04	18'55	-7'66
5	0'0034	0'06	17'5	-7'47
6	0'0053	0'09	17'0	-7'27
7	0'0066	0'11	16'6	-7'18
8	0'0081	0'13	16'0	-7'09

T A B L A N° II

CALCULO DE LOS PARAMETROS DE INTERACCION "IN VITRO" DE LA VITAMINA B₁₂
 CON ALBUMINA HUMANA, POR LA TECNICA DE "DIALISIS DE EQUILIBRIO"

Expe- riencia N°	Conc. Molar Soluc Proteina	Conc. Total de Medicamento	Relación R	Conc. Molar Med. Ligado
	$C_p \cdot 10^{-5}$	$C_T \cdot 10^{-5}$	R	$C_L \cdot 10^{-5}$
9	11'7	1'76	0'15	1'55
10	9'2	1'48	0'16	1'42
11	12'8	2'19	0'17	2'176
12	12'0	2'17	0'18	2'160
13	5'99	1'15	0'19	1'138
14	8'36	1'69	0'20	1'672
15	9'46	2'10	0'22	2'081
16	4'99	1'16	0'23	1'148

T A B L A N° II

CALCULO DE LOS PARAMETROS DE INTERACCION "IN VITRO" DE LA VITAMINA B₁₂
CON ALBUMINA HUMANA, POR LA TECNICA DE "DIALISIS DE EQUILIBRIO"

Expe- riencia	Conc. Molar Med. Libre $C_c \cdot 10^{-5}$	r	$\frac{r}{C_c} \cdot 10^5$	Log. C_c
9	0'0095	0'15	15'8	-7'02
10	0'010	0'16	15'5	-7'00
11	0'011	0'17	15'2	-6'95
12	0'012	0'18	15'0	-6'92
13	0'012	0'19	14'9	-6'92
14	0'014	0'20	14'8	-6'85
15	0'015	0'22	14'6	-6'92
16	0'016	0'23	14'4	-6'80

I A B L A N° II

CALCULO DE LOS PARAMETROS DE INTERACCION "IN VITRO" DE LA VITAMINA B₁₂

CON ALBUMINA HUMANA, POR LA TECNICA DE "DIALISIS DE EQUILIBRIO"

Expe- riencia Nº	Conc. Molar Soluc. Proteína	Conc. Total de Medicamento	Relacion R	Conc. Molar Med. Ligado
	$C_p \cdot 10^{-5}$	$C_T \cdot 10^{-5}$	R	$C_L \cdot 10^{-5}$
17	9'98	2'61	0'26	2'595
18	9'71	2'74	0'28	2'719
19	8'99	2'63	0'29	2'607
20	10'8	3'37	0'31	3'350
21	4'28	1'44	0'33	1'412
22	5'12	1'82	0'35	1'79
23	5'28	2'03	0'38	2'00
24	5'62	2'33	0'42	2'30

T A B L A N º II

CALCULO DE LOS PARAMETROS DE INTERACCION "IN VITRO" DE LA VITAMINA B₁₂
CON ALBUMINA HUMANA, POR LA TECNICA DE "DIALISIS DE EQUILIBRIO"

Expe- riencia Nº	Conc. Molar Med. Libre $C_c \cdot 10^{-5}$	r	$\frac{r}{C_c} \cdot 10^5$	Log. C _c
17	0'018	0'26	14'1	-6'74
18	0'020	0'28	13'8	-6'70
19	0'021	0'29	13'6	-6'68
20	0'023	0'31	13'3	-6'64
21	0'025	0'33	13'2	-6'60
22	0'027	0'35	12'9	-6'57
23	0'030	0'38	12'5	-6'52
24	0'034	0'41	12'1	-6'47

T A B L A N° II

CALCULO DE LOS PARAMETROS DE INTERACCION "IN VITRO" DE LA VITAMINA B₁₂

CON ALBUMINA HUMANA, POR LA TECNICA DE "DIALISIS DE EQUILIBRIO"

Expe- riencia N°	Conc. Molar Soluc. Proteina	Conc. Total de Medicamento	Relación R	Conc. Molar Med. Ligado
	$C_p \cdot 10^{-5}$	$C_T \cdot 10^{-5}$	R	$C_L \cdot 10^{-5}$
25	8'75	3'70	0'42	3'67
26	4'99	2'23	0'45	2'19
27	5'99	2'91	0'49	2'87
28	4'99	2'54	0'51	2'49
29	5'12	2'86	0'56	2'81
30	1'8	1'10	0'61	1'04
31	4'28	2'81	0'66	2'74

T A B L A N° II

CALCULO DE LOS PARAMETROS DE INTERACCION "IN VITRO" DE LA VITAMINA B₁₂
 CON ALBUMINA HUMANA, POR LA TECNICA DE "DIALISIS DE EQUILIBRIO"

Expe- riencia N°	Conc. Molar Med. Libre $C_c \cdot 10^{-5}$	r	$\frac{r}{C_c} \cdot 10^5$	Log. C _c
25	0'035	0'42	11'9	-6'46
26	0'038	0'44	11'7	-6'46
27	0'042	0'48	11'3	-6'37
28	0'045	0'50	11'0	-6'35
29	0'052	0'55	10'6	-6'28
30	0'056	0'58	10'3	-6'25
31	0'066	0'64	9'7	-6'18

T A B L A N.º II

CALCULO DE LOS PARAMETROS DE INTERACCION "IN VITRO" DE LA VITAMINA B₁₂

CON ALBUMINA HUMANA, POR LA TECNICA DE "DIALISIS DE EQUILIBRIO"

Expe- riencia Nº	Conc. Molar Soluc. Proteína	Conc. Total de Medicamento	Relación R	Conc. Molar Med. Ligado
	$C_p \cdot 10^{-5}$	$C_T \cdot 10^{-5}$	R	$C_L \cdot 10^{-5}$
32	1'23	0'90	0'73	0'83
33	5'28	3'77	0'71	3'69
34	1'33	1'05	0'79	0'97
35	3'18	2'61	0'82	2'51
36	3'00	2'56	0'85	2'46
37	5'13	4'47	0'87	4'36
38	5'80	5'40	0'93	5'28

T A B L A N° II

CALCULO DE LOS PARAMETROS DE INTERACCION "IN VITRO" DE LA VITAMINA B₁₂
CON ALBUMINA HUMANA , POR LA TECNICA DE "DIALISIS DE EQUILIBRIO"

Expe- riencia N°	Conc. Molar Med. Libre $C_c \cdot 10^{-5}$	r	$\frac{r}{C_c} \cdot 10^5$	Log. C_c
32	0'073	0'68	9'3	-6'14
33	0'078	0'70	9'0	-6'11
34	0'083	0'73	8'8	-6'08
35	0'096	0'79	8'2	-6'02
36	0'103	0'82	8'0	-5'99
37	0'110	0'85	7'7	-5'96
38	0'123	0'91	7'4	-5'91

T A B L A N° II

CALCULO DE LOS PARAMETROS DE INTERACCION "IN VITRO" DE LA VITAMINA B₁₂
 CON ALBUMINA HUMANA, POR LA TECNICA DE "DIALISIS DE EQUILIBRIO"

Expe- riencia N°	Conc. Molar Soluc. Proteina	Conc. Total de Medicamento	Relación R	Conc. Molar Med. Ligado
	$C_p \cdot 10^{-5}$	$C_T \cdot 10^{-5}$	R	$C_L \cdot 10^{-5}$
39	1'23	1'29	1'05	1'16
40	2'4	2'49	1'04	2'35
41	2'65	2'91	1'10	2'76
42	5'44	6'27	1'15	6'09
43	1'80	2'35	1'31	2'14
44	1'53	2'10	1'37	1'87
45	1'02	1'57	1'54	1'31

T A B L A N° II

CALCULO DE LOS PARAMETROS DE INTERACCION "IN VITRO" DE LA VITAMINA B₁₂
CON ALBUMINA HUMANA, POR LA TECNICA DE DIALISIS DE EQUILIBRIO"

Expe- riencia N°	Conc. Molar Med. Libre $C_c \cdot 10^{-5}$	r	$\frac{r}{C_c} \cdot 10^5$	Log. C_c
39	0'133	0'95	7'1	-5'88
40	0'144	0'98	6'8	-5'84
41	0'155	1'04	6'7	-5'81
42	0'18	1'12	6'2	-5'74
43	0'21	1'19	5'6	-5'68
44	0'23	1'22	5'4	-5'64
45	0'26	1'28	5'0	-5'58

T A B L A N° II

CALCULO DE LOS PARAMETROS DE INTERACCION "IN VITRO" DE LA VITAMINA B₁₂
 CON ALBUMINA HUMANA, POR LA TECNICA DE "DIALISIS DE EQUILIBRIO"

Expe- riencia N°	Conc. Molar Soluc. Proteína	Conc. Total de Medicamento	Relación R	Conc. Molar Med. Ligado
	$C_p \cdot 10^{-5}$	$C_T \cdot 10^{-5}$	R	$C_L \cdot 10^{-5}$
46	1'2	2'00	1'67	1'68
47	1'12	2'16	1'93	1'73
48	1'02	2'2	2'16	1'67
49	1'19	2'80	2'36	2'14
50	0'6	2'07	3'44	1'18
51	1'19	4'46	3'75	2'86
52	0'98	10'43	10'64	3'19

T A B L A N° II

CALCULO DE LOS PARAMETROS DE INTERACCION "IN VITRO" DE LA VITAMINA B₁₂

CON ALBUMINA HUMANA, POR LA TECNICA DE DIALISIS DE EQUILIBRIO*

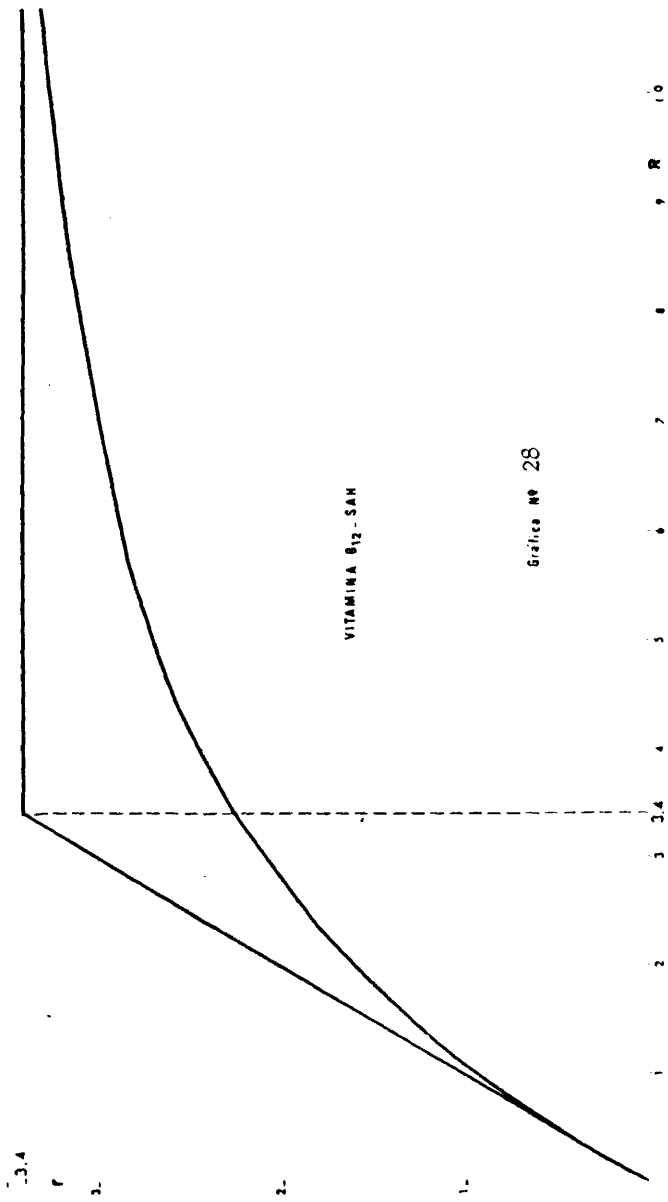
Expe- riencia N°	Conc. Molar Med. Libre $C_c \cdot 10^{-5}$	r	$\frac{r}{C_c} \cdot 10^5$	Log. C_c
46	0'32	1'40	4'4	-5'49
47	0'42	1'55	3'7	-5'38
48	0'53	1'70	3'2	-5'27
49	0'67	1'8	2'7	-5'18
50	0'89	1'96	2'2	-5'05
51	1'6	2'4	1'5	-4'80
52	7'24	3'26	0'45	-4'14

128 bis

Para las extrapolaciones de Scatchard en la computadora, obtenemos la siguiente ecuación :

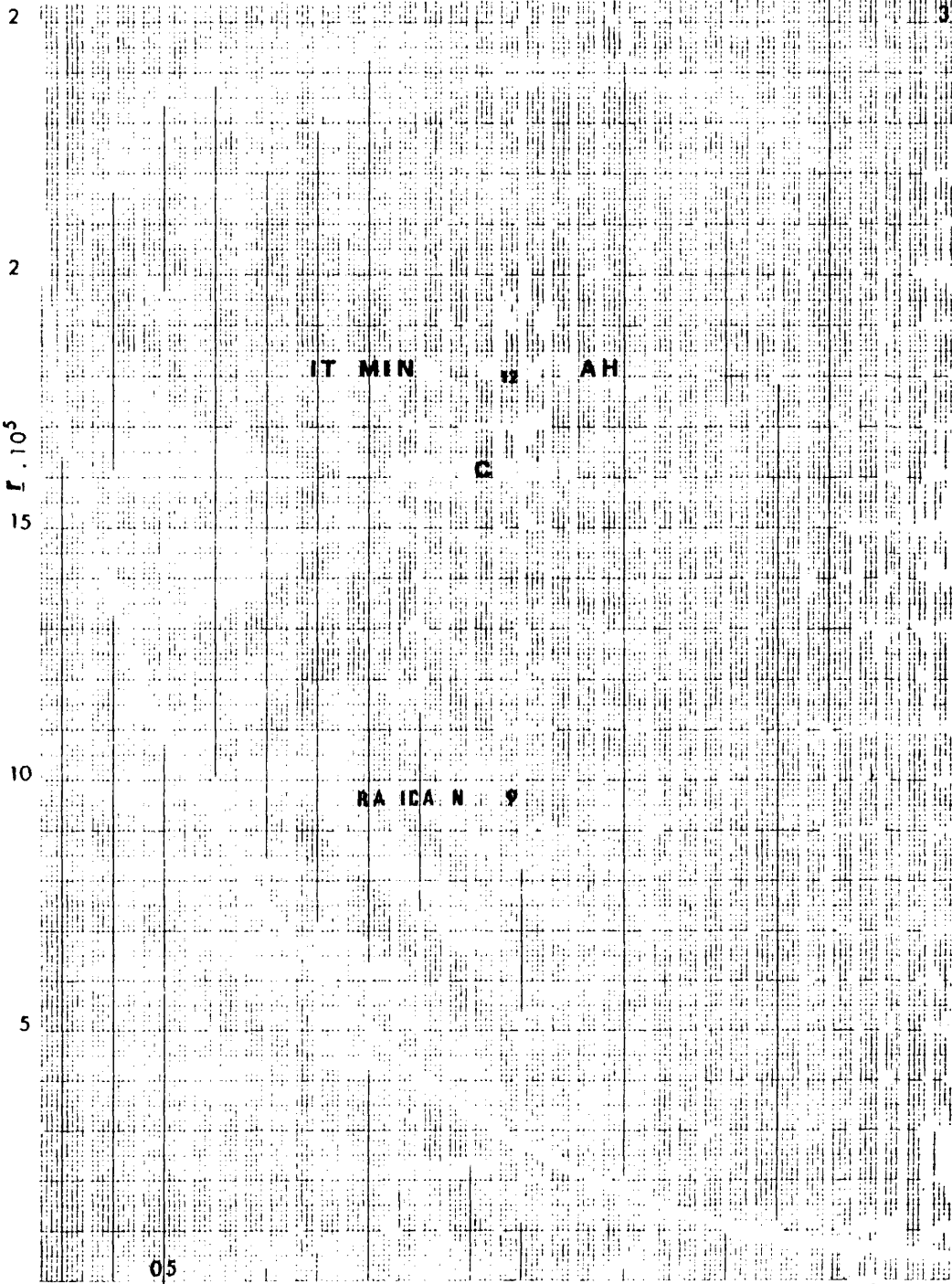
$$y = 20'91 - 37'00 X + 46'60 X^2 - 33'23 X^3 + 11'09 X^4 - 1'35 X^5$$

$$\text{coeficiente de regresión} = 0'98539$$



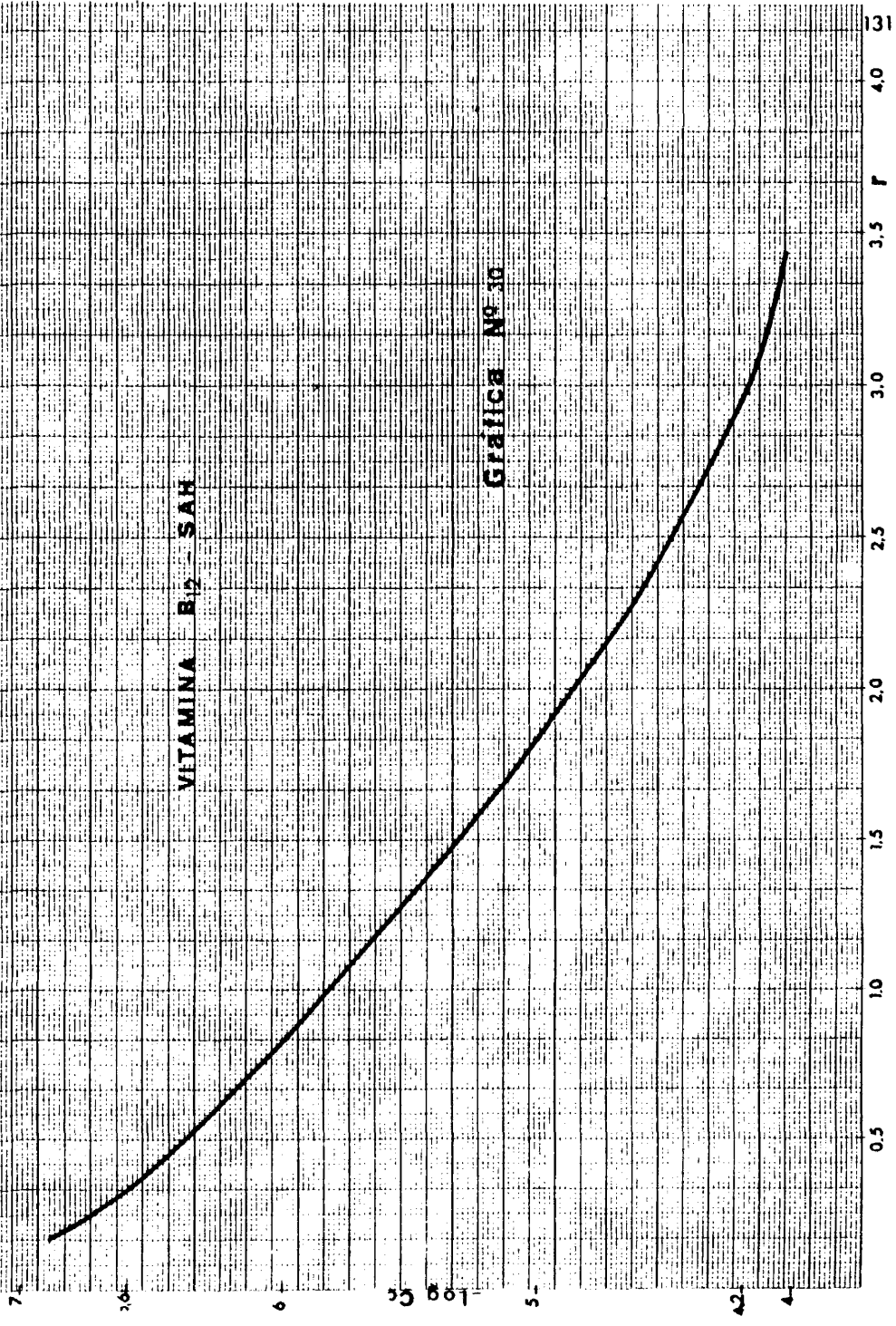
VITAMINA B₁₂ SAN

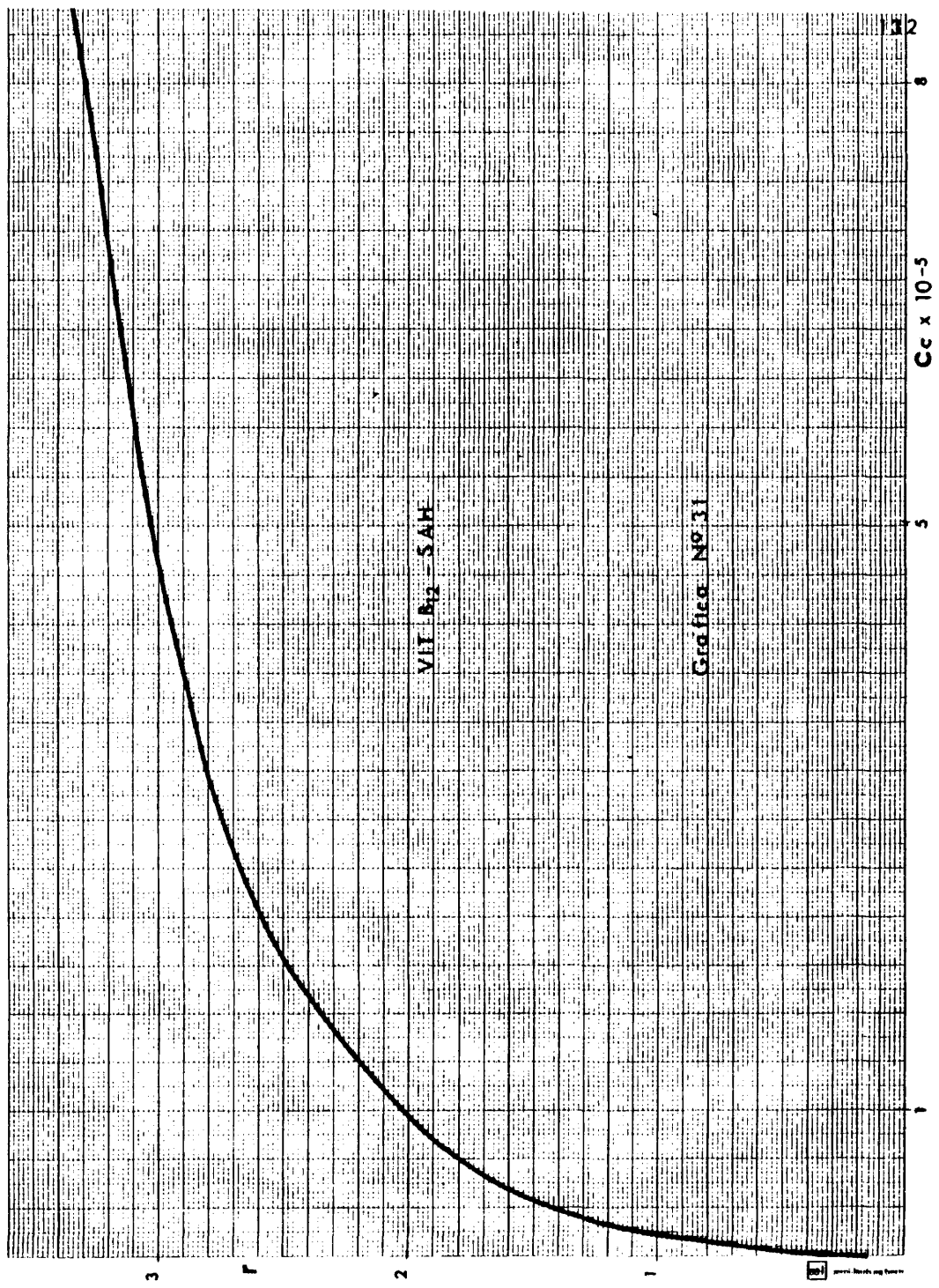
Grafico NO 28



VITAMINA B₁₂ - SAH

Grafica N° 30





VIT B₁₂ - SAH

Gráfica Nº 31

La influencia de la vitamina B₁₂ en la asociación de dicloxacilina-seroalbúmina humana, se expresa en las tablas número III y gráficas números 32, 33, 34 y 35

T A B L A N° III

CALCULO DE LOS PARAMETROS DE INTERACCION EN VITRO DE LA DICLOXACILINA -
-S A H, EN PRESENCIA DE VITAMINA B₁₂ POR LA TECNICA DE "DIALISIS DE EQUILIBRIO"

Expe- riencia N°	Conc. Molar Soluc Proteína	Conc. Molar Vit. B ₁₂	Conc. Total de Antibiótico	Relación	Conc. Molar Med. Ligado
	C _p · 10 ⁻⁵	C · 10 ⁻⁵	C _T · 10 ⁻⁵	R	C _L · 10 ⁻⁵
1	1'05	2'00	11'5	10'95	2'00
2	1'08	"	9'4	8'70	1'99
3	1'18	"	7'06	5'98	2'06
4	1'25	"	3'45	4'31	2'01
5	1'25	"	3'24	2'59	1'87
6	2'05	"	3'60	1'75	2'80
7	2'05	"	3'05	1'49	2'52
8	1'25	"	1'69	1'35	1'35

T A B L A N° III

CALCULO DE LOS PARAMETROS DE INTERACCION "IN VITRO" DE LA DICLOXACILINA-
-SAH, EN PRESENCIA DE VITAMINA B₁₂ POR LA TECNICA DE "DIALISIS DE EQUILIBRIO"

Expe- riencia N°	Conc. Molar Med. Libre $C_c \cdot 10^{-5}$	r	$\frac{r}{C_c} \cdot 10^5$	Log. C _c
1	9'50	1'9	0'20	-4'02
2	7'40	1'85	0'25	-4'13
3	5'00	1'75	0'35	-4'30
4	2'30	1'61	0'70	-4'64
5	1'365	1'50	1'10	-4'86
6	0'80	1'37	1'70	-5'10
7	0'53	1'23	2'30	-5'28
8	0'34	1'08	3'20	-5'47

T A B L A N° III

CALCULO DE LOS PARAMETROS DE INTERACCION "IN VITRO" de LA DICLOXACILINA -
 -S A H, EN PRESENCIA DE VITAMINA B₁₂ POR LA TECNICA DE "DIALISIS DE EQUILIBRIO"

Expe- riencia N°	Conc. Molar Soluc Proteina	Conc. Molar Vit. B ₁₂	Conc. Total de Antibiótico	Relación	Conc. Molar Med. Ligado
	C _p · 10 ⁻⁵	2 · 10 ⁻⁵	C _T · 10 ⁻⁵	R	C _L · 10 ⁻⁵
9	1'19	2 · 10 ⁻⁵	1'4	1'17	1'16
10	1'08	2 · 10 ⁻⁵	1'15	1'07	0'97
11	1'80	2 · 10 ⁻⁵	1'66	0'92	1'51
12	2'05	2 · 10 ⁻⁵	1'74	0'85	1'60
13	1'08	2 · 10 ⁻⁵	0'88	0'81	0'78
14	1'25	2 · 10 ⁻⁵	0'92	0'74	0'84
15	1'50	2 · 10 ⁻⁵	1'02	0'68	0'94
16	1'51	2 · 10 ⁻⁵	0'82	0'55	0'77

T A B L A N° III

CALCULO DE LOS PARAMETROS DE INTERACCION "IN VITRO" DE LA DICLOXACILINA-
-SAH, EN PRESENCIA DE VITAMINA B₁₂ POR LA TECNICA DE "DIALISIS DE EQUILIBRIO"

Expe- riencia Nº	Conc. Molar Med. Libre $C_c \cdot 10^{-5}$	r	$\frac{r}{C_c} \cdot 10^5$	Log. C_c
9	0'24	0'98	4'10	-5'62
10	0'18	0'90	5'00	-5'74
11	0'15	0'84	5'70	-5'82
12	0'14	0'78	6'57	-5'85
13	0'099	0'72	7'27	-6'00
14	0'084	0'67	7'97	-6'07
15	0'072	0'63	9'75	-6'14
16	0'048	0'51	10'62	-6'32

T A B L A N ° III

CALCULO DE LOS PARAMETROS DE INTERACCION "N. VITRO" de LA DICLOXACILINA -
 EN PRESENCIA DE VITAMINA B₁₂ POR LA TECNICA DE "DIALISIS DE EQUILIBRIO"

Expe- riencia Nº	Conc. Molar Soluc Proteína	Conc. Molar Vit. B ₁₂	Conc. Total de Antibiótico	Relación	Conc. Molar Med. Líquido
	C _p · 10 ⁻⁵	C · 10 ⁻⁵	C _T · 10 ⁻⁵	R	C _L · 10 ⁻⁵
17	1'8	2'00	0'890	0'49	0'85
18	1'88	"	0'800	0'43	0'77
19	1'75	"	0'680	0'39	0'65
20	1'88	"	0'680	0'35	0'639
21	2'18	"	0'627	0'29	0'61
22	3'60	"	0'951	0'26	0'936
23	1'80	"	0'445	0'25	0'432
24	2'05	"	0'484	0'24	0'471
25	1'80	"	0'389	0'22	0'378

T A B L A N^o III

CALCULO DE LOS PARAMETROS DE INTERACCION "IN VITRO" DE LA DICLOXACILINA-
-SAH, EN PRESENCIA DE VITAMINA B₁₂ POR LA TECNICA DE "DIALISIS DE EQUILIBRIO"

Expe- riencia N ^o	Conc. Molar Med. Libre C _c · 10 ⁻⁵	r	$\frac{r}{C_c} \cdot 10^5$	Log. C _c
17	0'041	0'47	11'46	-6'39
18	0'032	0'41	12'8	-6'49
19	0'025	0'37	14'8	-6'60
20	0'023	0'34	14'7	-6'64
21	0'017	0'28	16'5	-6'77
22	0'015	0'26	17'3	-6'82
23	0'0132	0'24	18'2	-6'88
24	0'0124	0'23	18'5	-6'90
25	0'0108	0'21	19'4	-6'97

T A B L A N.º III

CALCULO DE LOS PARAMETROS DE INTERACCION "N-VITRO" de LA DICLOXACILINA -
 S.A.H. EN PRESENCIA DE VITAMINA B₁₂ POR LA TECNICA DE "DIALISIS DE EQUILIBRIO"

Expe- riencia Nº	Conc. Molar Soluc. Proteína		Conc. Molar Vit. B ₁₂		Conc. Total de Antibiótico		Relación		Conc. Molar Med. Ligado	
	C _p · 10 ⁻⁵	C · 10 ⁻⁵	C · 10 ⁻⁵	C · 10 ⁻⁵	C _T · 10 ⁻⁵	C _T · 10 ⁻⁵	R	R	C _L · 10 ⁻⁵	C _L · 10 ⁻⁵
26	1'53	2'00			0'316	0'316	0'21		0'306	0'306
27	1'88	"			0'367	0'367	0'19		0'357	0'357
28	1'18	"			0'209	0'209	0'18		0'200	0'200
29	3'60	"			0'547	0'547	0'15		0'540	0'540
30	3'60	"			0'510	0'510	0'14		0'504	0'504
31	3'60	"			0'437	0'437	0'12		0'432	0'432
32	3'60	"			0'346	0'346	0'10		0'342	0'342
33	4'75	"			0'43	0'43	0'09		0'41	0'41

T A B L A N° III

CALCULO DE LOS PARAMETROS DE INTERACCION "IN VITRO" DE LA DICLOXACILINA-SAH, EN PRESENCIA DE VITAMINA B₁₂ POR LA TECNICA DE "DIALISIS DE EQUILIBRIO"

Expe- riencia N°	Conc. Molar Med. Libre $C_c \cdot 10^{-5}$	r	$\frac{r}{C_c} \cdot 10^5$	Log. C_c
26	0'0102	0'20	19'6	-6'99
27	0'0095	0'19	20'0	-7'02
28	0'0083	0'17	20'5	-7'08
29	0'0069	0'15	21'9	-7'16
30	0'0063	0'12	22'2	-7'20
31	0'0052	0'12	23'1	-7'28
32	0'0039	0'095	22'4	-7'40
33	0'0033	0'087	26'36	-7'48

141 bis

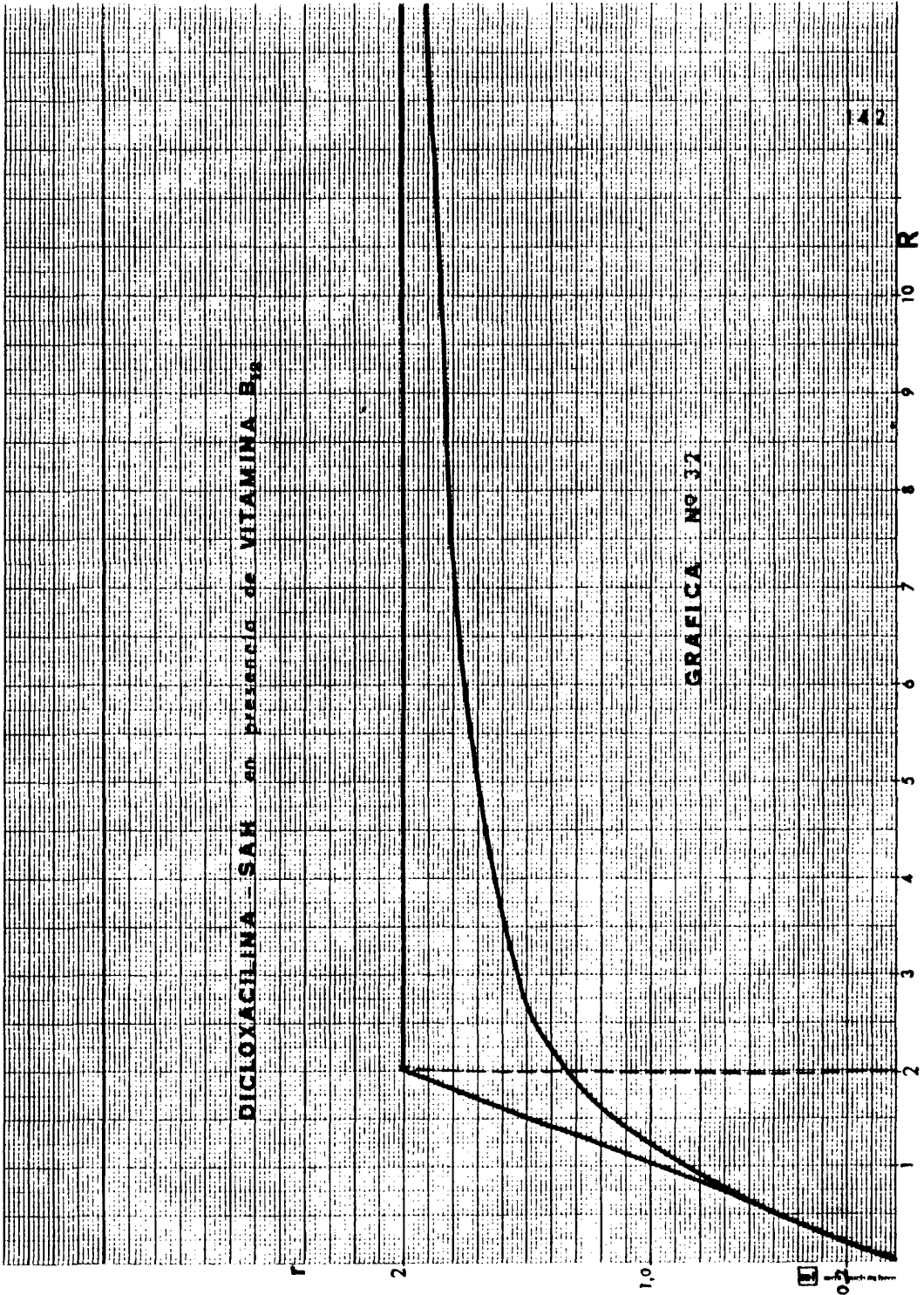
Para las estrapolaciones de Scatchard en la computadora obtenemos la siguiente ecuación :

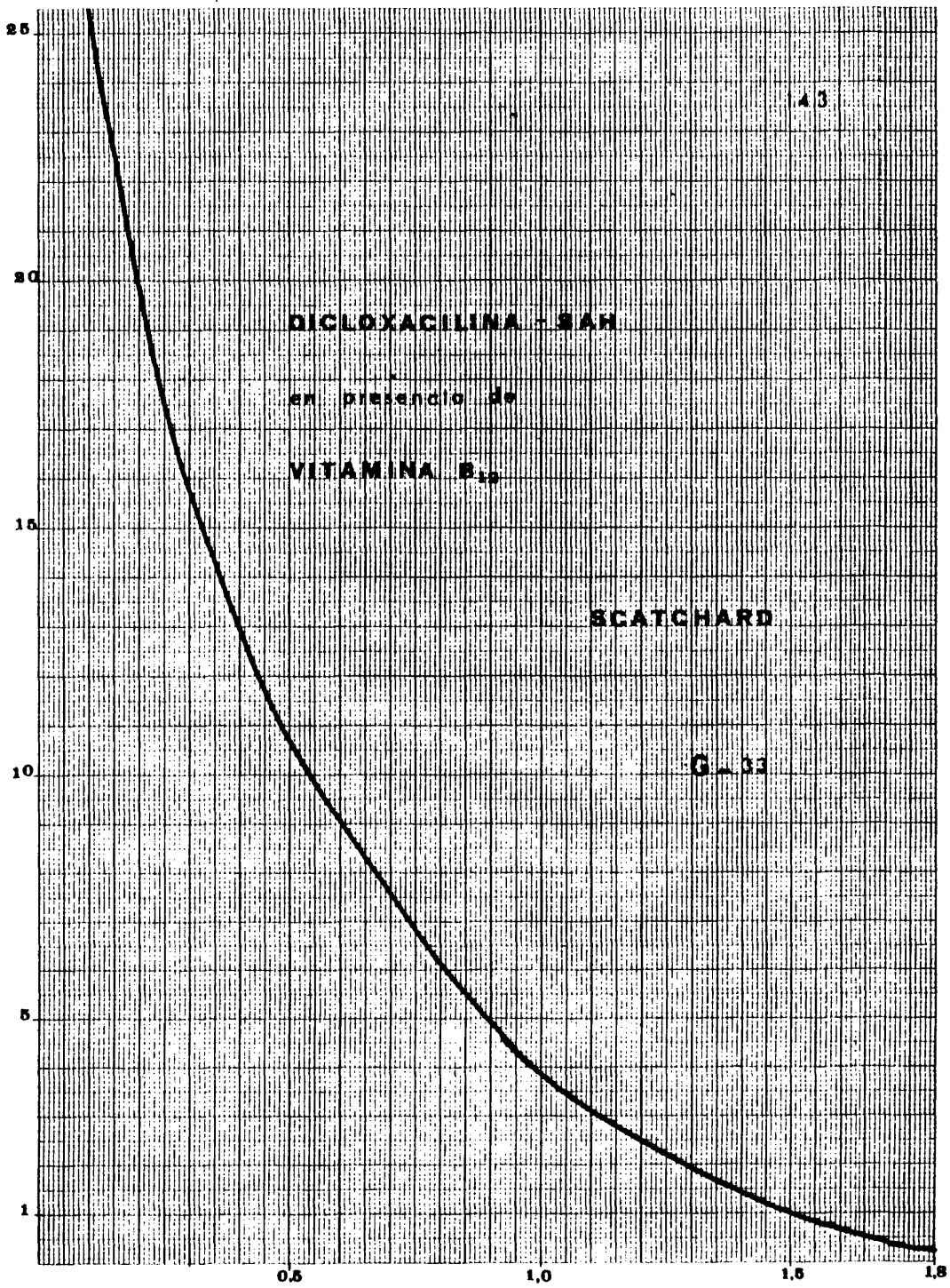
$$y = 31'14 - 75'08 X + 106'85 X^2 - 94'49 X^3 + 43'38 X^4 - 7'73 X^5$$

coeficiente de regresión = 0'99819

DICLOXACILINA - SAH en presencia de VITAMINA B₁₂

GRAFICA Nº 37





DICLOXACILINA-SAH en presencia de

VITAMINA B₁₂

Fracción NF 34

7

$9 - \log C_c$

5

$\log \frac{1}{1-C}$

0.1

0.5

1.0

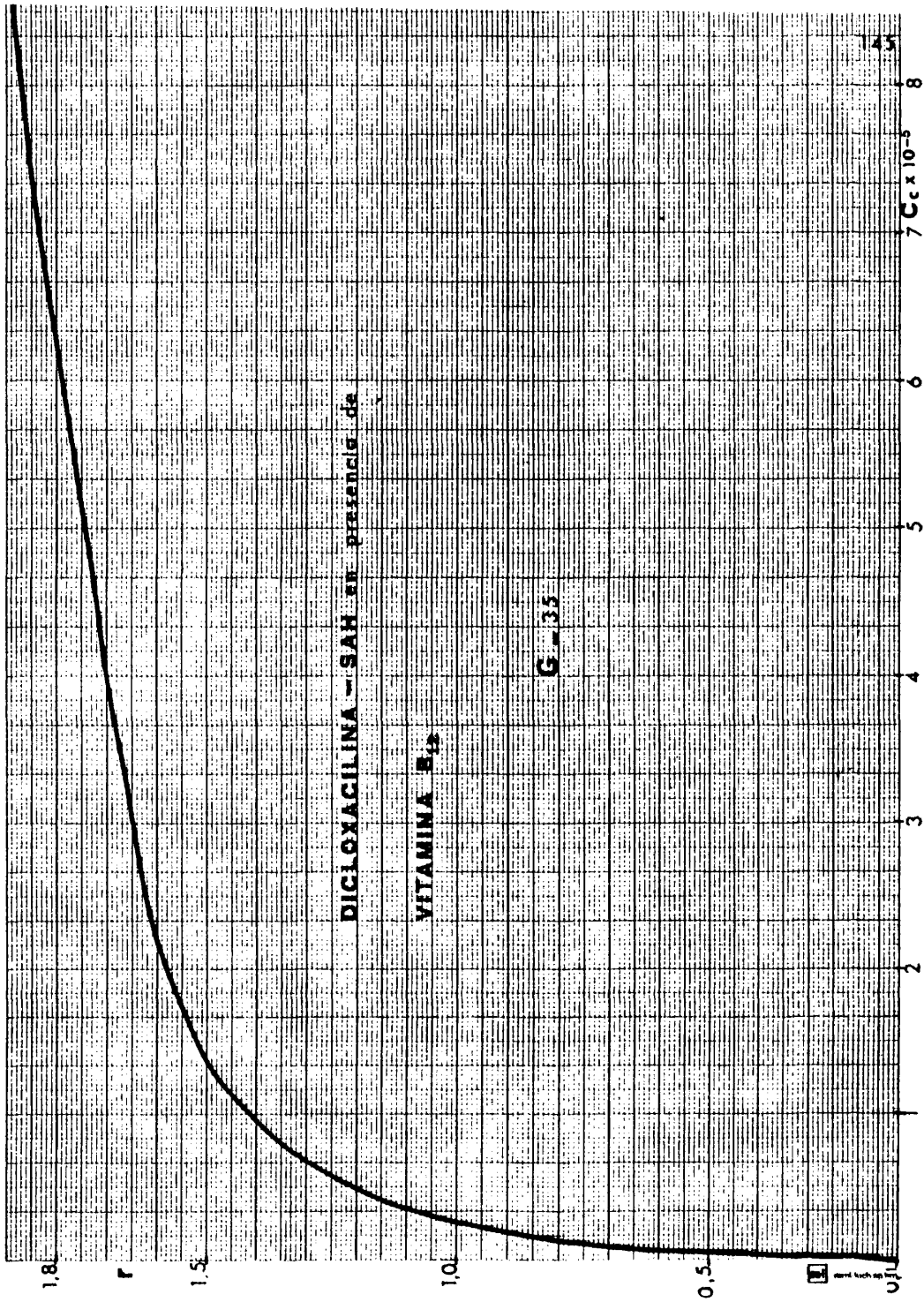
1.5

2.0

r

▲

▲



ENSAYOS DE

FLUORESCENCIA

Los ensayos de amortiguación de fluorescencia los hemos realizado con el espectrofluorímetro Perkin - Elmer, M P F modelo 44 A , trabajando en " modo ratio " , con cubetas cuadradas de 1 cm. de paso óptico .

Siendo la longitud de onda :

de excitación 292 nm

de emisión 334 nm

Valores de rendija 10 y 10

Sensibilidad - grueso - 0'3

fino - 0

Todos los ensayos se realizaron a temperatura ambiente.

Seguimos la técnica de adición que consiste en añadir partes alícuotas de ligando a la solución de proteína y medir la amortiguación de la fluorescencia de la proteína tras cada adición. En la mayoría de los casos la región de interés se encuentra en la relación molar de medicamento / SAH de 0 a 5'0. Se han obtenido 28 puntos para la interacción de dicloxacilina- SAH .

La titulación requiere tres cubetas: una llena de tampón y usada como blanco y las otras dos llena cada una con 3'0 ml de solución de albúmina. Una de ellas designada arbitrariamente como la cubeta de valoración y la otra como la cubeta de referencia.

La fluorescencia de la cubeta de valoración se colocó a 1, el tampón a 0 y se anota la fluorescencia de la cubeta de referencia que se ajusta siempre a 1'0.

Antes de cada lectura de la cubeta de valoración, el tampón y la cubeta de referencia se leen y si es necesario el instrumento se reajusta a la lectura inicial, esto corrige la desviación en la respuesta fluorimétrica.

5 - 10 - 20 - 40^{/80} microlitros de solución de dicloxacilina se añaden a la cubeta de valoración. La solución se mezcla y se mide de nuevo la fluorescencia. Al final de la valoración, la absorción de la solución de valoración se determina a 292 y 334 nm frente a la solución de referencia, con lo que se comprueba que el efecto de filtro interno es despreciable.

La concentración molar de SAH era de $3'6 \cdot 10^{-5}$

La concentración molar de dicloxacilina era de $1'1 \cdot 10^{-3}$, y esta solución contiene una concentración de SAH igual a la solución a valorar ($3,6 \times 10^{-5} \text{ M}$), para evitar el efecto de dilución de la concentración inicial de albúmina al añadir la solución del antibiótico.

Partimos de una longitud de onda de excitación y se hace un barrido de emisión, de seroalbumina, dicloxacilina y vitamina B₁₂.

La solución vitamina B₁₂ a una longitud de onda de excitación a 360 nm, no tiene fluorescencia.

Colocamos la solución de proteína en la cubeta del fluorómetro fotoeléctrico, ajustamos el instrumento para hacer un barrido empezando la excitación a 230 nm y observamos un máximo de emisión a 338 nm (gráfica número 36) - primera figura.

Siendo las condiciones del aparato:

Sensibilidad 0'3

Fino 0

Rendijas 10 y 10

Lectura de la emisión 338

Gráfica número, 2ª figura (36)

Excitación - 292 nm

Emisión - A partir de 295 nm el máximo de emisión es a 338 nm

Condiciones del aparato - Las mismas

Concentración molar de seroalbúmina = $3'6 \cdot 10^{-4}$

Espectro de excitación y emisión en fluorescencia de la S.A.H. cuando se excita

a 230 mμ

Gráfico No. 34

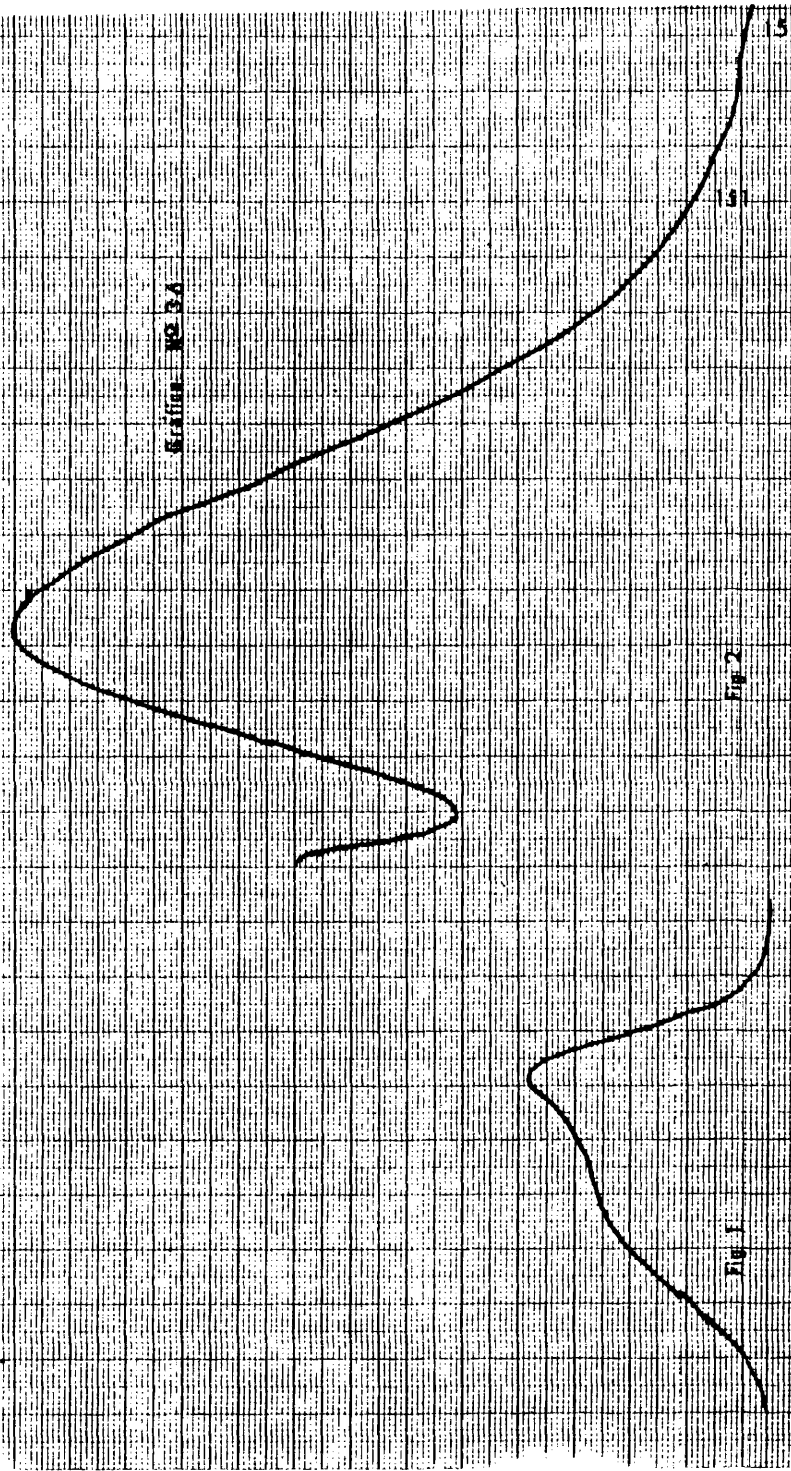


Fig. 1

Fig. 2

151

141

Se coloca la solución de dicloxacilina en la cubeta del fluorómetro fotoeléctrico y empezamos a excitar a 260 nm observando el máximo de excitación a 280 nm, recogiendo la emisión a 310 nm (gráfica número 37 - primera figura).

Condiciones del aparato:

Sensibilidad- 30

Fino - 0

Rendijas - 10 y 10

Gráfica número 37 segunda figura

Se comienza a excitar a partir de 283 nm, observando que el máximo de emisión es a 312

Condiciones del aparato las mismas

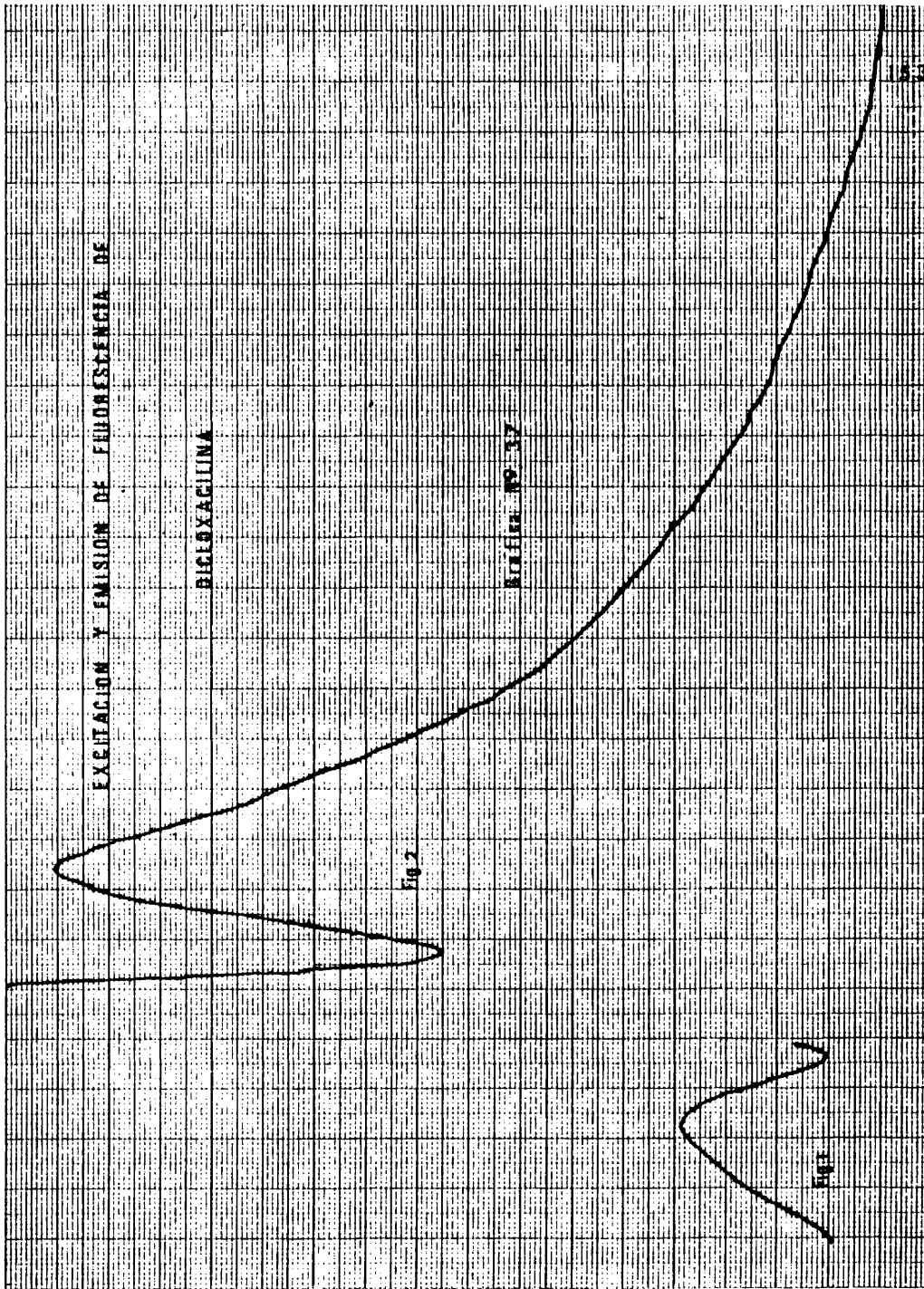
Concentración molar de dicloxacilina = $1'1 \cdot 10^{-3}$

EXCITACION Y EMISION DE FLUORESCENCIA DE

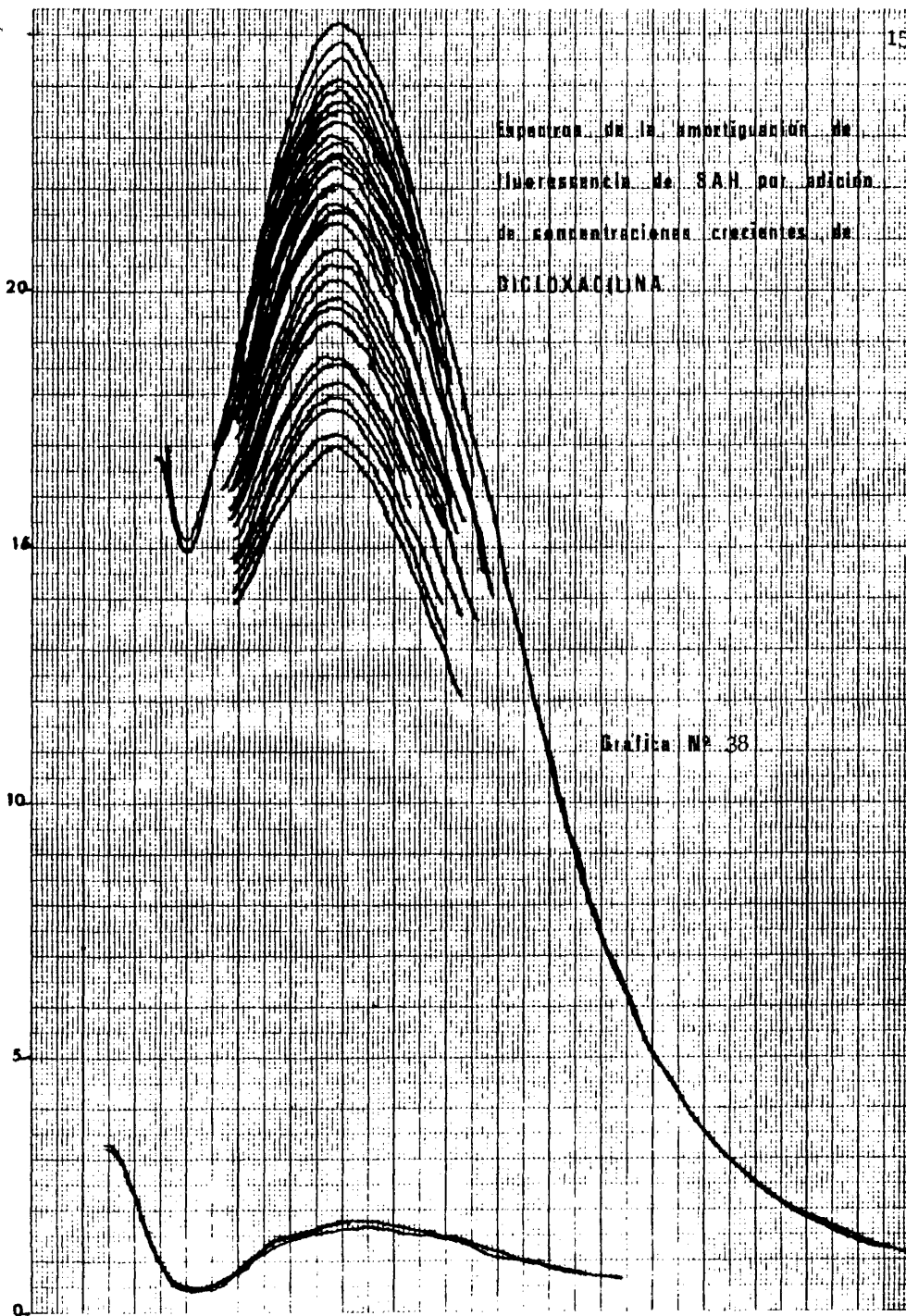
BICLOXACILINA

Gráfica Nº 37

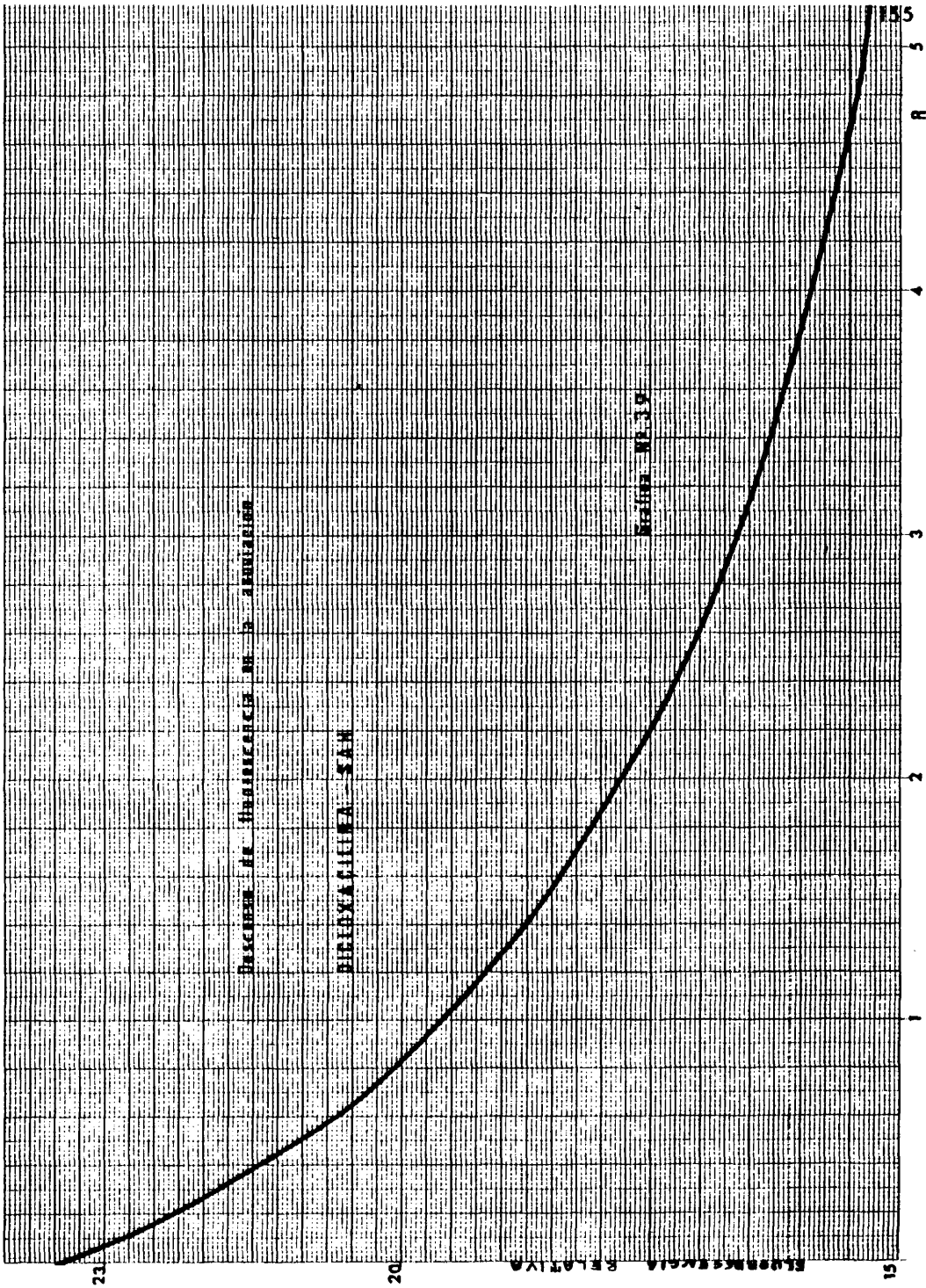
Fig. 7



Espectros de la amortiguación de
fluorescencia de SAH por adición
de concentraciones crecientes de
BICLOXACILINA.



Gráfica Nº 38



$$\frac{[P C_c]}{[P]_t} = \frac{c_L}{[P]_t} = Q$$

La concentración de antibiótico libre vendrá dada por

$$[C_c] = [C_t] - [C_L] = c_t - Q [P]_t$$

La concentración de la proteína libre

$$[P] = [P]_t - [P C_c] = [P]_t - [C_L] = [P]_t - Q [P]_t$$

y entonces

$$K = \frac{[P C_c]}{[P][C_c]} = \frac{Q [P]_t}{[P]_t - Q [P]_t [c_t - Q [P]_t]}$$

y simplificando y teniendo en cuenta que

$$R = \frac{[C_t]}{[P]_t}$$

llegamos a

$$K = \frac{Q}{(1 - Q) (R - Q) [P]_t}$$

y para utilizar el método de Scatchard, si n = número de puntos de unión

$$nK - K Q = \frac{Q}{[C_c]} = \frac{Q}{[R - Q] [P]_t}$$

y representando $\frac{Q}{[R - Q] [P]_t}$ frente a Q da una línea cuya intersección con el eje de abscisas da el número total de puntos de unión y la intersección con el de ordenadas, el producto de este número por la constante de afinidad.

En el caso de dicloxacilina - SAH, la representación de la fluorescencia relativa frente a R nos da la gráfica número 39 en la que se ajustan los diez primeros puntos a una línea recta por el método de los mínimos cuadrados.

La ecuación de la recta ajustada es

$$F = 23'3 - 4'41 R$$

y se calcula el parámetro Q para todos los puntos que se encuentran por encima de la línea ajustada

$$Q_i = \frac{F_0 - F_i}{m_i} = \frac{23'3 - F_i}{4'41}$$

los valores obtenidos se observan en la tabla nº IV

T A B L A N° IV

AMORTIGUACION DE LA FLUORESCENCIA EN LA ASOCIACION DE DICLOXACILINA

A. LA SEROALBUMINA

Expe- riencia N°	Conc. Molar S. A. H.	Conc. Molar Dicloxacilina	Relación R $R = x \cdot 10^{-2}$
1	$3'6 \cdot 10^{-5}$	$1'83 \cdot 10^{-6}$	5
2	"	$3'66 \cdot 10^{-6}$	10'16
3	"	$5'5 \cdot 10^{-6}$	15'27
4	"	$7'28 \cdot 10^{-6}$	20'23
5	"	$9'09 \cdot 10^{-6}$	25'25
6	"	$10'89 \cdot 10^{-6}$	30'25
7	"	$12'68 \cdot 10^{-6}$	35'23

T A B L A N°IV

ANOPTIGUACION DE LA FLUORESCENCIA EN LA ASOCIACION DE DICLOXACILINA

A LA SEROALBUMINA

Expe- riencia Nº	Q_1	$A_T \frac{Q_1}{(R_1 - Q_1)}$ Album t	Conc. Molar Medicamento Libre C_c	Log. C_c
1	0'0113	negativo	negativo	negativo
2	0'0793	"	"	"
3	0'1700	"	"	"
4	0'2154	"	"	"
5	0'2607	"	"	"
6	0'3061	"	"	"
7	0'3514	"	"	"

T A B L A N° IV

AMORTIGUACION DE LA FLUORESCENCIA EN LA ASOCIACION DE DICLOXACILINA

A LA SEROALBUMINA

Expe- riencia	Nº	Conc. Molar S.A.H.	Conc. Molar Dicloxacilina	Relación R $R = x \cdot 10^{-2}$
	8	$3'6 \cdot 10^{-5}$	$14'47 \cdot 10^{-6}$	40'20
	9	$3'6 \cdot 10^{-5}$	$16'25 \cdot 10^{-6}$	45'15
	10	$3'6 \cdot 10^{-5}$	$18'03 \cdot 10^{-6}$	50'09
	11	$3'6 \cdot 10^{-5}$	$21'56 \cdot 10^{-6}$	59'88
	12	$3'6 \cdot 10^{-5}$	$25'08 \cdot 10^{-6}$	69'66
	13	$3'6 \cdot 10^{-5}$	$28'57 \cdot 10^{-6}$	79'36
	14	$3'6 \cdot 10^{-5}$	$32'03 \cdot 10^{-6}$	88'99

T A B L A. N° IV

AMORTIGUACION DE LA FLUORESCENCIA EN LA ASOCIACION DE DICLOXACILINA

A LA SEROALBUMINA

Expe- riencia N°	Q_i	$A_T \frac{Q_i}{(R_i - Q_i)}$ Album t	Conc. Molar Medicamento Libre C_c	Log. C_c
8	0'4195	negativo	negativo	negativo
9	0'4648	"	"	"
10	0'5102	"	"	"
11	0'5555	$3'47 \cdot 10^5$	$0'16 \cdot 10^{-5}$	-5'8
12	0'6235	$2'4 \cdot 10^5$	$0'26 \cdot 10^{-5}$	-5'58
13	0'7142	$2'5 \cdot 10^5$	$0'28 \cdot 10^{-5}$	-5'54
14	0'7596	$1'6 \cdot 10^5$	$0'46 \cdot 10^{-5}$	-

T A B L A N°IV

AMORTIGUACION DE LA FLUORESCENCIA EN LA ASOCIACION DE DICLOXACILINA

A LA SEROALBUMINA

Expe- riencia Nº	Conc. Molar S. A. H.	Conc. Molar Dicloxacilina	Relación R $R = x \cdot 10^{-2}$
15	$3'6 \cdot 10^{-5}$	$35'48 \cdot 10^{-6}$	98'56
16	$3'6 \cdot 10^{-5}$	$42'30 \cdot 10^{-6}$	117'5
17	$3'6 \cdot 10^{-5}$	$49'04 \cdot 10^{-6}$	136'23
18	$3'6 \cdot 10^{-5}$	$55'69 \cdot 10^{-6}$	154'71
19	$3'6 \cdot 10^{-5}$	$62'26 \cdot 10^{-6}$	172'95
20	$3'6 \cdot 10^{-5}$	$68'75 \cdot 10^{-6}$	190'97
21	$3'6 \cdot 10^{-5}$	$75'15 \cdot 10^{-6}$	208'76

T A B L A N° IV

AMORTIGUACION DE LA FLUORESCENCIA EN LA ASOCIACION DE DICLOXACILINA

A LA SEROALBUMINA

Expe- riencia N°	Q_i	A_T	$\frac{Q_i}{(R_i - Q_i) \text{ Albun } t}$	Conc. Molar Medicamento Libre C_c	Log. C_c
15	0'8049		$1'24 \cdot 10^5$	$0'65 \cdot 10^{-5}$	-5'18
16	0'9183		$0'98 \cdot 10^5$	$0'94 \cdot 10^{-5}$	-5'02
17	0'9863		$0'74 \cdot 10^5$	$1'33 \cdot 10^{-5}$	-4'88
18	1'0544		$0'6 \cdot 10^5$	$1'76 \cdot 10^{-5}$	-4'75
19	1'1224		$0'51 \cdot 10^5$	$2'2 \cdot 10^{-5}$	-4'65
20	1'1678		$0'44 \cdot 10^5$	$2'66 \cdot 10^{-5}$	-4'57
21	1'2358		$0'40 \cdot 10^5$	$3'06 \cdot 10^{-5}$	-4'51

T A B L A N.º IV

AMORTIGUACION DE LA FLUORESCENCIA EN LA ASOCIACION DE DICLOXACILINA

A LA SEROALBUMINA

Expe- riencia N.º	Conc. Molar S.A.H.	Conc. Molar Dicloxacilina	Relación R $R = x \cdot 10^{-2}$
22	$3'6 \cdot 10^{-5}$	$87'73 \cdot 10^{-6}$	243'69
23	$3'6 \cdot 10^{-5}$	$100'0 \cdot 10^{-6}$	277'77
24	$3'6 \cdot 10^{-5}$	$111'97 \cdot 10^{-6}$	311'02
25	$3'6 \cdot 10^{-5}$	$123'66 \cdot 10^{-6}$	343'5
26	$3'6 \cdot 10^{-5}$	$135'08 \cdot 10^{-6}$	375'22
27	$3'6 \cdot 10^{-5}$	$157'14 \cdot 10^{-6}$	436'5
28	$3'6 \cdot 10^{-5}$	$178'21 \cdot 10^{-6}$	495'02

T A B L A N° IV

AMORTIGUACION DE LA FLUORESCENCIA EN LA ASOCIACION DE DICLOXACILINA

A LA SEROALBUMINA

Expe- riencia N°	Q_i	$A_T \frac{Q_i}{(R_i - Q_i)}$ Album t	Conc. Molar Medicamento Libre C_c	Log. C_c
22	1'3945	$0.37 \cdot 10^5$	$3.77 \cdot 10^{-5}$	-4'42
23	1'4399	$0.3 \cdot 10^5$	$4.9 \cdot 10^{-5}$	-4'30
24	1'5079	$0.26 \cdot 10^5$	$5.76 \cdot 10^{-5}$	-4'24
25	1'5759	$0.23 \cdot 10^5$	$6.69 \cdot 10^{-5}$	-4'17
26	1'6213	$0.21 \cdot 10^5$	$7.67 \cdot 10^{-5}$	-4'11
27	1'7346	$0.18 \cdot 10^5$	$9.36 \cdot 10^{-5}$	-4'03
28	1'8027	$0.16 \cdot 10^5$	$11.34 \cdot 10^{-5}$	-3'95

La curva de saturación que representa Q frente a R , o sea, la fracción de sitios ocupados frente a la relación $C_T / [P]_T$ se puede observar en la gráfica número 40

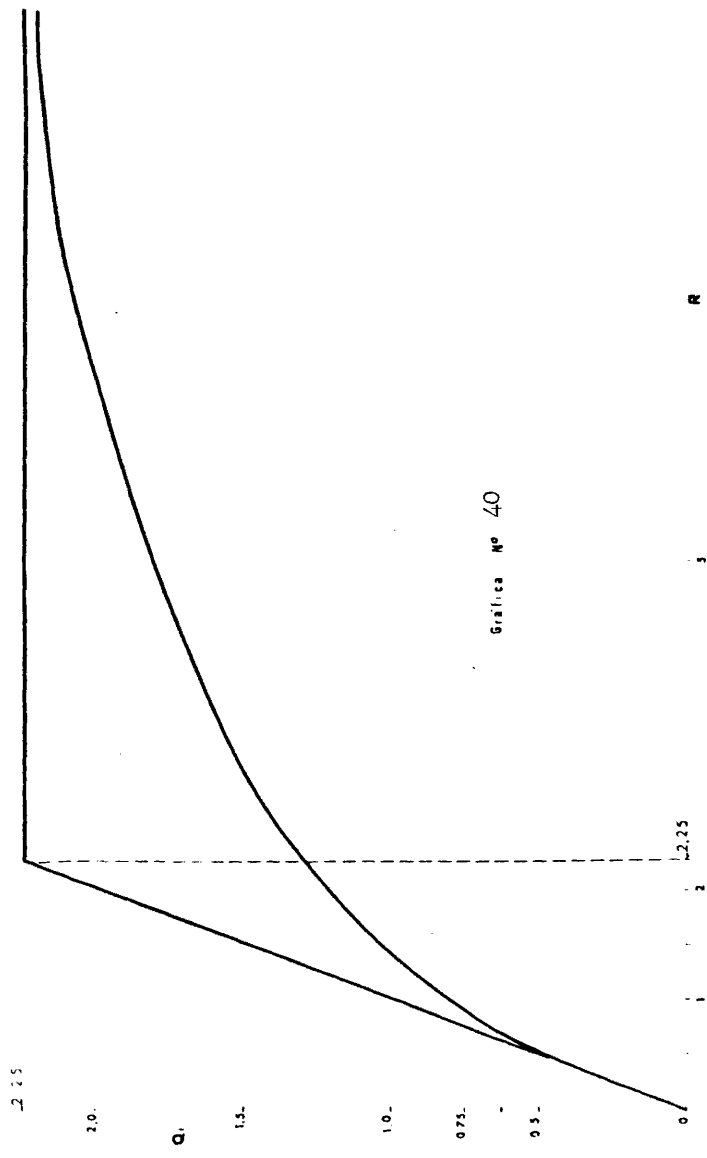
El número de sitios viene dado por la intersección de las tangentes a baja concentración y la asíntota. Por este procedimiento se encuentran 2'25 puntos de unión, para la dicloxacilina con la SAH por el método de amortiguación de fluorescencia.

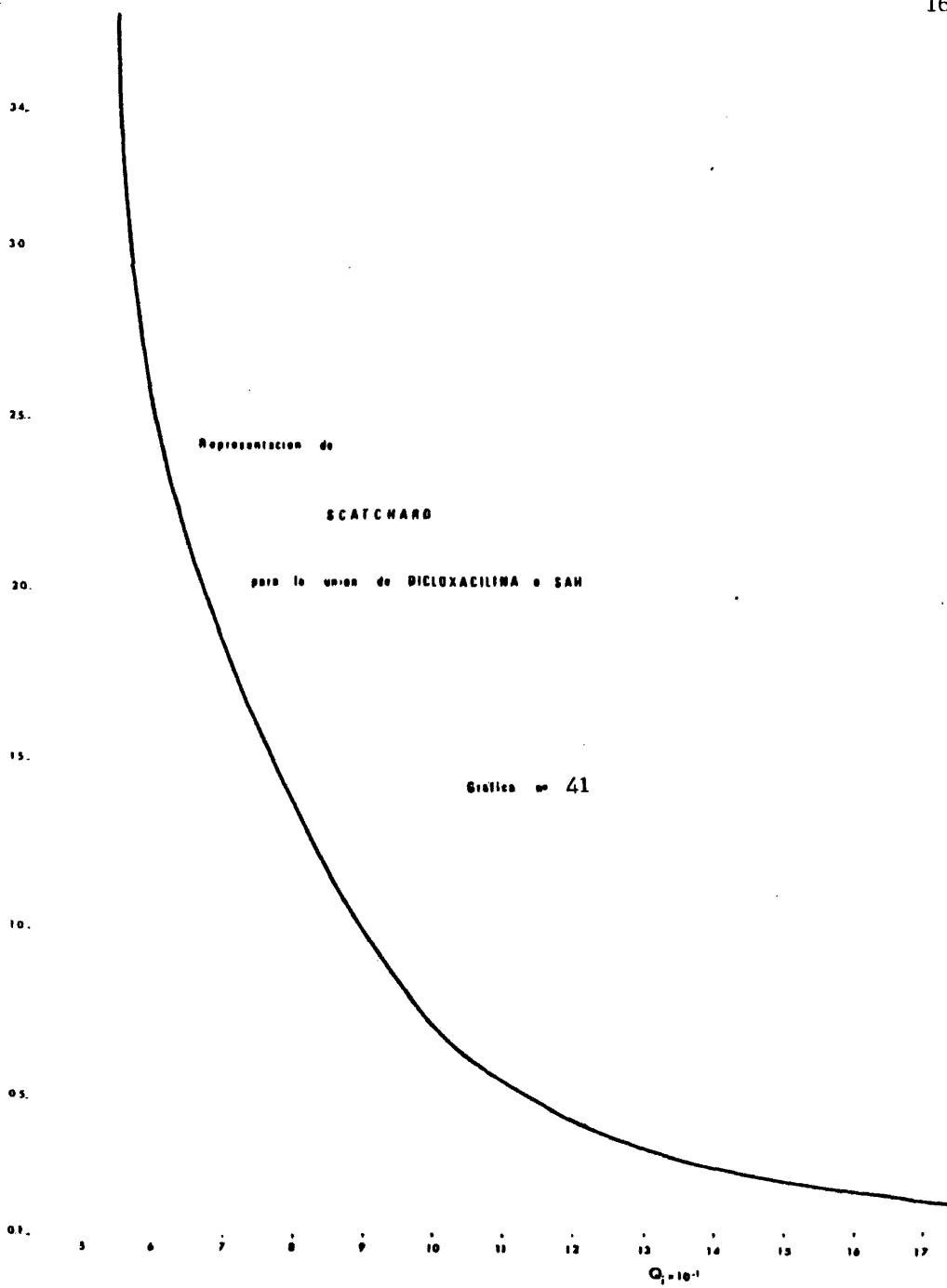
Para calcular la constante de asociación se traza la gráfica de Scatchard Λ_T frente a Q (gráfica número 41), que no es una línea recta al igual que en el caso de diálisis, por lo que hay que suponer que existe más de una clase de sitios de unión. Para comprobar esto y obtener una idea de la naturaleza de esta unión, seguimos el procedimiento de Weber y Anderson (1.965) (40), de representar el logaritmo de la concentración de ligando libre frente al parámetro Q (Gráfica n° 42) .

Llevados los valores de Q y Λ_T a la computadora, nos da la siguiente ecuación :

$$y = 36'43 - 136'82 X + 215'77 X^2 - 172'74 X^3 + 69'04 X^4 - 10'92 X^5$$

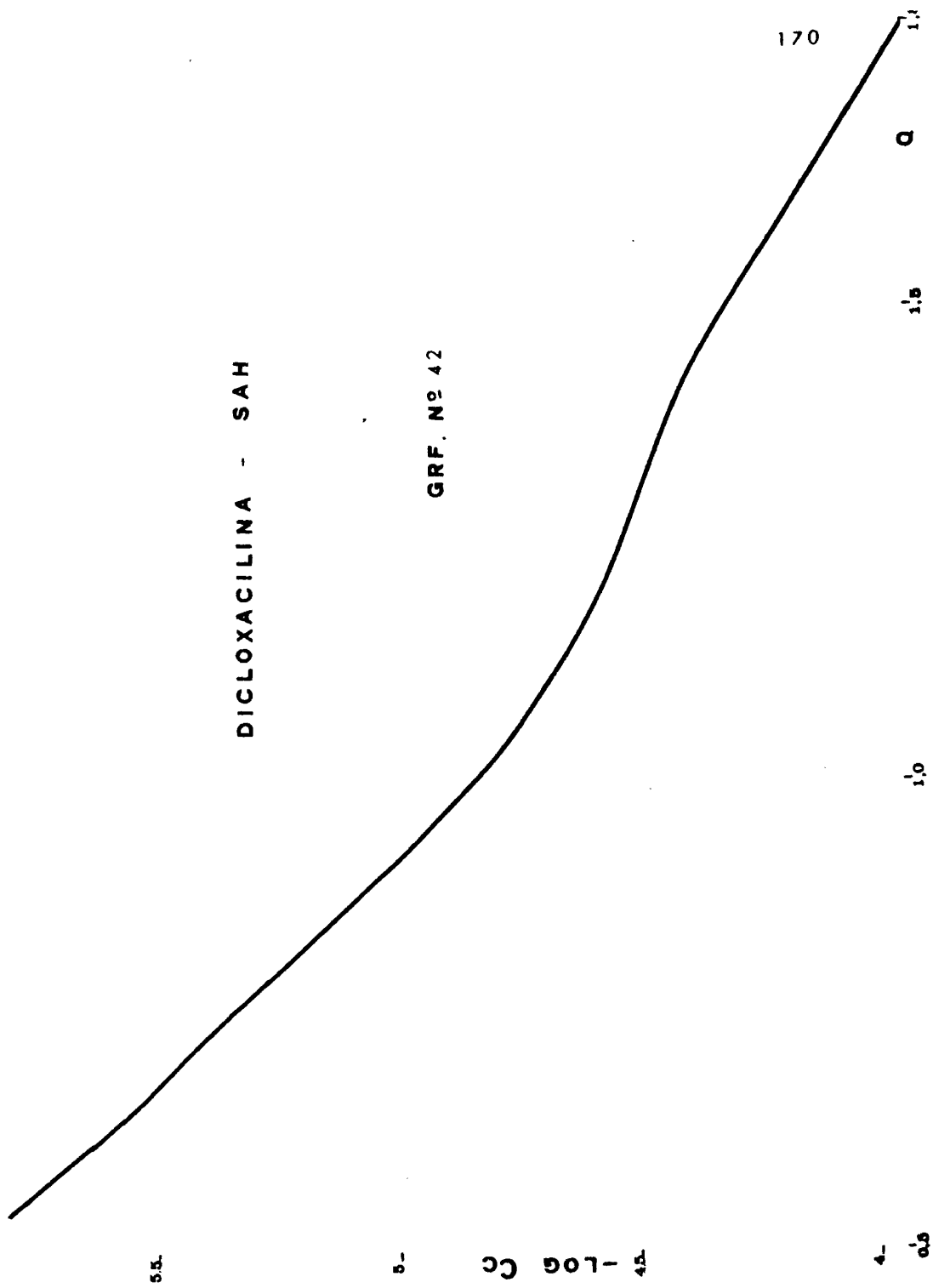
$$\text{coeficiente de regresión} = 0'99635$$

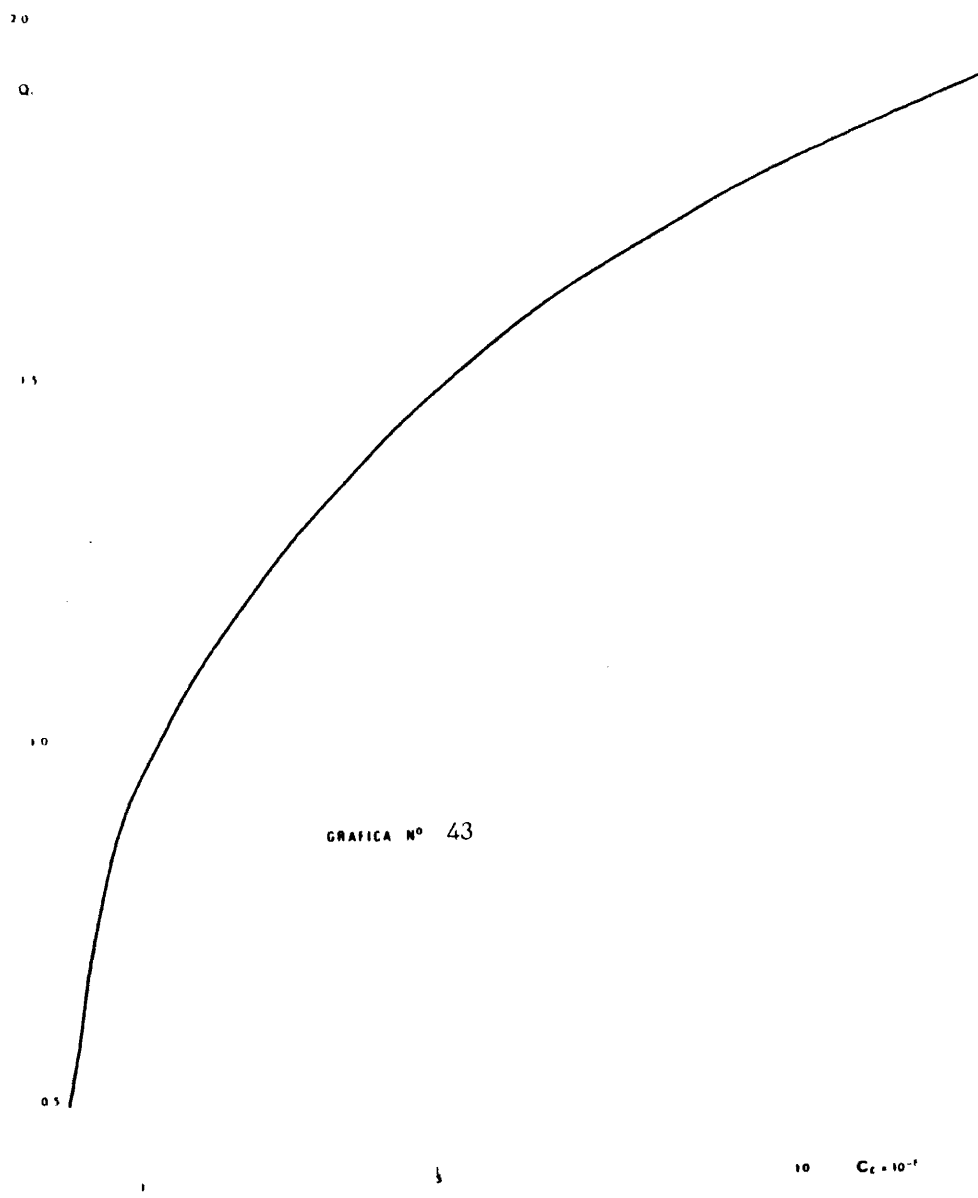




DICLOXACILINA - SAH

GRF. Nº 42





GRAFICA Nº 43

10 $C_c = 10^{-1}$

INFLUENCIA DE LA VITAMINA B₁₂
EN LA FLUORESCENCIA DE LA
SEROALBUMINA

Las diez primeras determinaciones se hicieron añadiendo a 3 cc. de seroalbúmina, partes alcuotas de vitamina B₁₂ de 1'8 mg % observando un descenso de la fluorescencia de 100 a 68 (Tabla V).

Como este descenso es pequeño, se repite la experiencia con solución de vitamina B₁₂ a una concentración diez veces mayor (18 mg %) descendiendo la fluorescencia de 100 a 30 (Tabla VI).

Para realizar la curva de descenso de la fluorescencia, se colocan en abscisas la relación molar medicamento - albúmina y en ordenadas la fluorescencia (Gráfica 44).

Los primeros puntos de esta gráfica, se ajustan a una línea recta por el método de los mínimos cuadrados con el fin de calcular F_0 y m_1

para obtener el parámetro Q_i .

Los valores obtenidos se reseñan en la tabla VI, donde se puede observar que las diferencias $R - Q_i$ y por tanto $(R - Q_i) A_t = \text{Conc. libre}$, salen negativos, lo que muestra que la vitamina B_{12} se une mucho a la albúmina; y a las concentraciones de nuestras experiencias permanece totalmente unida. Pero, teniendo en cuenta que las dosis de esta vitamina que se administran al organismo son muy pequeñas, y que lo que estudiamos es su posible influencia en la asociación del antibiótico, no hemos considerado oportuno seguir aumentando la proporción.

T A B L A N º VINFLUENCIA DE LA VITAMINA B₁₂ EN LA FLUORESCENCIA
DE LA SEROALBUMINA

<u>Experiencia</u>	<u>Relación de Moles R</u>	<u>Fluorescencia</u>
1	0'24 . 10 ⁻⁴	100
2	1'39 . 10 ⁻⁴	95
3	2'47 . 10 ⁻⁴	92
4	3'48 . 10 ⁻⁴	90
5	4'43 . 10 ⁻⁴	88
6	5'33 . 10 ⁻⁴	86
7	6'18 . 10 ⁻⁴	83
8	7'75 . 10 ⁻⁴	76
9	9'16 . 10 ⁻⁴	72
10	10'44 . 10 ⁻⁴	68

T A B L A N°VI

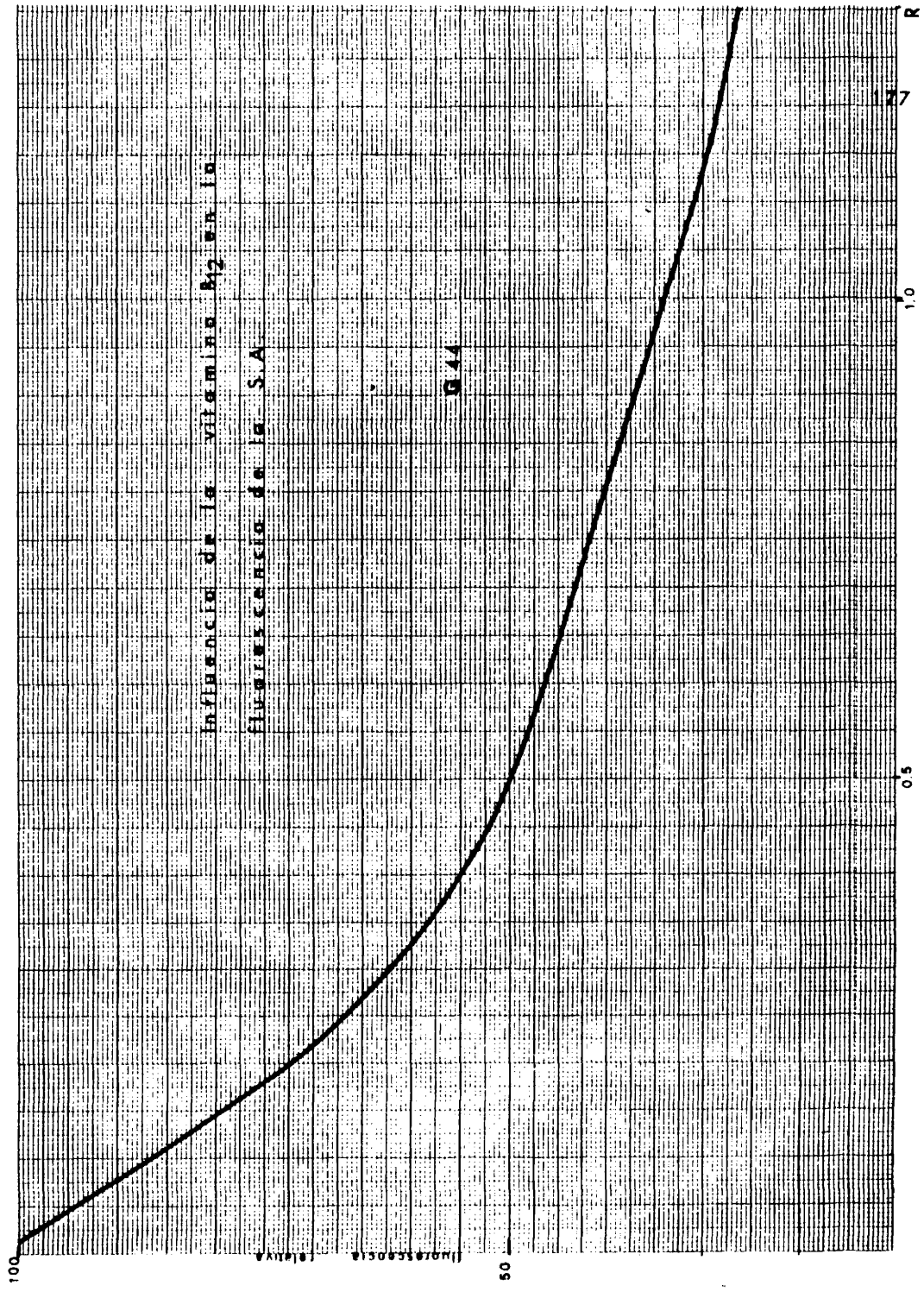
INFLUENCIA DE LA VITAMINA B₁₂ EN LA FLUORESCENCIA DE LA SEROALBUMINA

<u>Expe - riencia</u>	<u>Conc. Molar S. A.</u>	<u>Conc. Molar Vit. B₁₂</u>	<u>Relación R R = x . 10⁻²</u>	<u>Q₁</u>	<u>R - Q₁</u>
11	3'6 . 10 ⁻⁵	8'807 . 10 ⁻⁷	2'44 . 10 ⁻²	0'347	Salte negativo
12	3'6 . 10 ⁻⁵	19'65 . 10 ⁻⁷	5'46 . 10 ⁻²	0'429	"
13	3'6 . 10 ⁻⁵	30'32 . 10 ⁻⁷	8'42 . 10 ⁻²	0'837	"
14	3'6 . 10 ⁻⁵	40'82 . 10 ⁻⁷	11'34 . 10 ⁻²	1'127	"
15	3'6 . 10 ⁻⁵	51'15 . 10 ⁻⁷	14'21 . 10 ⁻²	1'301	"
16	3'6 . 10 ⁻⁵	71'32 . 10 ⁻⁷	19'81 . 10 ⁻²	2'057	"

T A B L A N°VI

INFLUENCIA DE LA VITAMINA B₁₂ EN LA FLUORESCENCIA DE LA SEROALBUMINA

Expe - riencia	Conc. Molar		Conc. Molar Vit. B ₁₂	Relación R R = x . 10 ⁻²	Q _i	R - Q _i
	S. A.					
17	3'6 . 10 ⁻⁵		90'87 . 10 ⁻⁷	25'24 . 10 ⁻²	2'521	sale negativo
18	3'6 . 10 ⁻⁵		128'19 . 10 ⁻⁷	35'61 . 10 ⁻²	2'632	"
19	3'6 . 10 ⁻⁵		196'48 . 10 ⁻⁷	54'60 . 10 ⁻²	2'812	"
20	3'6 . 10 ⁻⁵		257'40 . 10 ⁻⁷	71'50 . 10 ⁻²	3'93	"
21	3'6 . 10 ⁻⁵		337'46 . 10 ⁻⁷	93'74 . 10 ⁻²	3'684	"
22	3'6 . 10 ⁻⁵		406'39 . 10 ⁻⁷	112'90 . 10 ⁻²	4'265	"



AMORTIGUACION DE LA FLUORESCENCIA EN LA
ASOCIACION DE DICLOXACILINA A LA SEROALBU
MINA EN PRESENCIA DE VITAMINA B₁₂

En la gráfica nº 45 observamos el espectro de amortiguación de la fluorescencia al añadir a la seroalbúmina además de la dicloxacilina , - partes alcuotas del otro ligando, solución de vitamina B₁₂ .

La curva de saturación que representa Q frente a R , se puede - observar en la gráfica nº 47 . El número de sitios viene dado por la intersección de las tangentes a baja concentración y la asíntota . Por este procedimiento se encuentran 1'3 puntos de unión, para la dicloxacilina - SAH - vitamina B₁₂ por el método de omortiguación de la fluorescencia.

La gráfica número 48, es la representación de Scatchard para cal - culas la constante de asociación y representa A_T frente a Q , como en los casos anteriores, no es una línea recta por lo que se supone tam - bien que existen mas de una clase de sitios de unión. Esto se comprue - ba por el procedimiento de Weber y Anderson (1.965) (40) , re - presenta el logaritmo de la concentración de ligando libre, frente al -

parámetro Q , dondonos una idea de la naturaleza de esta unión (gráfica número 46) .

T A B L A N° VII

AMORTIGUACION DE LA FLUORESCENCIA EN LA ASOCIACION DE DICLOXACILINA
A LA SEROALBUMINA EN PRESENCIA DE VITAMINA B₁₂

<u>Expe- riencia N°</u>	<u>Conc. Molar S.A.H.</u>	<u>Conc. Molar Vit. B₁₂</u>	<u>Conc. Molar Dicloxacilina</u>	<u>Relación R</u>
1	3'6 . 10 ⁻⁵	2'21 . 10 ⁻⁵	7'28 . 10 ⁻⁶	0'2023
2	3'6 . 10 ⁻⁵	2'21 . 10 ⁻⁵	21'56 . 10 ⁻⁶	0'5990
3	3'6 . 10 ⁻⁵	2'21 . 10 ⁻⁵	35'5 . 10 ⁻⁶	0'9856
4	3'6 . 10 ⁻⁵	2'21 . 10 ⁻⁵	55'7 . 10 ⁻⁶	1'5470
5	3'6 . 10 ⁻⁵	2'21 . 10 ⁻⁵	75'1 . 10 ⁻⁶	2'0870

T A B L A N.º VII

AMORTIGUACION DE LA FLUORESCENCIA EN LA ASOCIACION DE DICLOXACILINA
A LA SEROALBUMINA EN PRESENCIA DE VITAMINA B₁₂

Expe- riencia N.º	Q_1	$A_T \frac{Q_1}{(R_1 - Q_1) \text{ Albumin t}}$	Conc. Molar Medicamento Libre C_c	Log. C_c
1	-	-	-	-
2	-	-	-	-
3	0'69	0'6495	$1'064 \cdot 10^{-5}$	- 4'973
4	0'903	0'2998	$2'678 \cdot 10^{-5}$	- 4'572
5	0'890	0'2060	$4'309 \cdot 10^{-5}$	- 4'365

T A B L A N°VII

AMORTIGUACION DE LA FLUORESCENCIA EN LA ASOCIACION DE DICLOXACILINA
A LA SEROALBUMINA EN PRESENCIA DE VITAMINA B₁₂

Expe- riencia N°	Conc. Molar S.A.H.	Conc. Molar Vit. B ₁₂	Conc. Molar Dicloxacilina	Relación R
6	$3'6 \cdot 10^{-5}$	$2'21 \cdot 10^{-5}$	$100'0 \cdot 10^{-6}$	2'7800
7	$3'6 \cdot 10^{-5}$	$2'21 \cdot 10^{-5}$	$123'6 \cdot 10^{-6}$	3'4350
8	$3'6 \cdot 10^{-5}$	$2'21 \cdot 10^{-5}$	$151'7 \cdot 10^{-6}$	4'2100
9	$3'6 \cdot 10^{-5}$	$2'21 \cdot 10^{-5}$	$178'2 \cdot 10^{-6}$	4'9500

T A B L A N°VII

AMORTIGUACION DE LA FLUORESCENCIA EN LA ASOCIACION DE DICLOXACILINA
A LA SEROALBUMINA EN PRESENCIA DE VITAMINA B₁₂

Expe- riencia Nº	Q_1	$A_T \frac{Q_1}{(R_1 - Q_1) \text{ Albun } t}$	Conc. Molar Medicamento Libre C_c	Log. C_c
6	0'970	0'1488	$6'516 \cdot 10^{-5}$	- 4'186
7	1'04	0'1200	$8'622 \cdot 10^{-5}$	- 4'064
8	1'09	0'0970	$11'232 \cdot 10^{-5}$	- 3'949
9	1'19	0'0880	$13'536 \cdot 10^{-5}$	- 3'868

Ajustando la primera porción a una línea recta por el método de los mínimos cuadrados

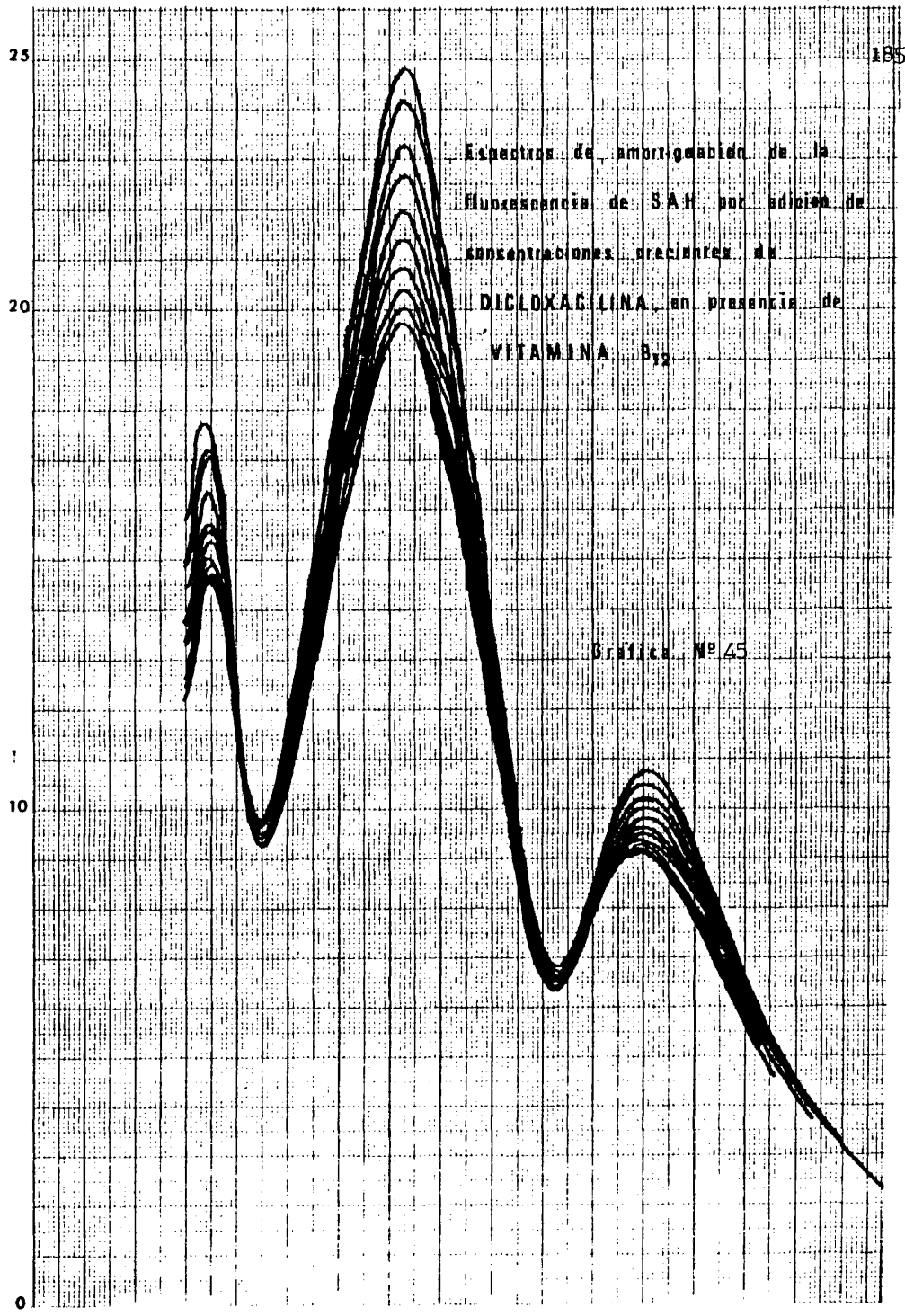
$$F = F_0 - m_1 R$$

$$F = 5'26 - 1'98 R$$

Obtenidos los parámetros de Scatchard y llevados a la computadora nos dan la siguiente ecuación de la gráfica :

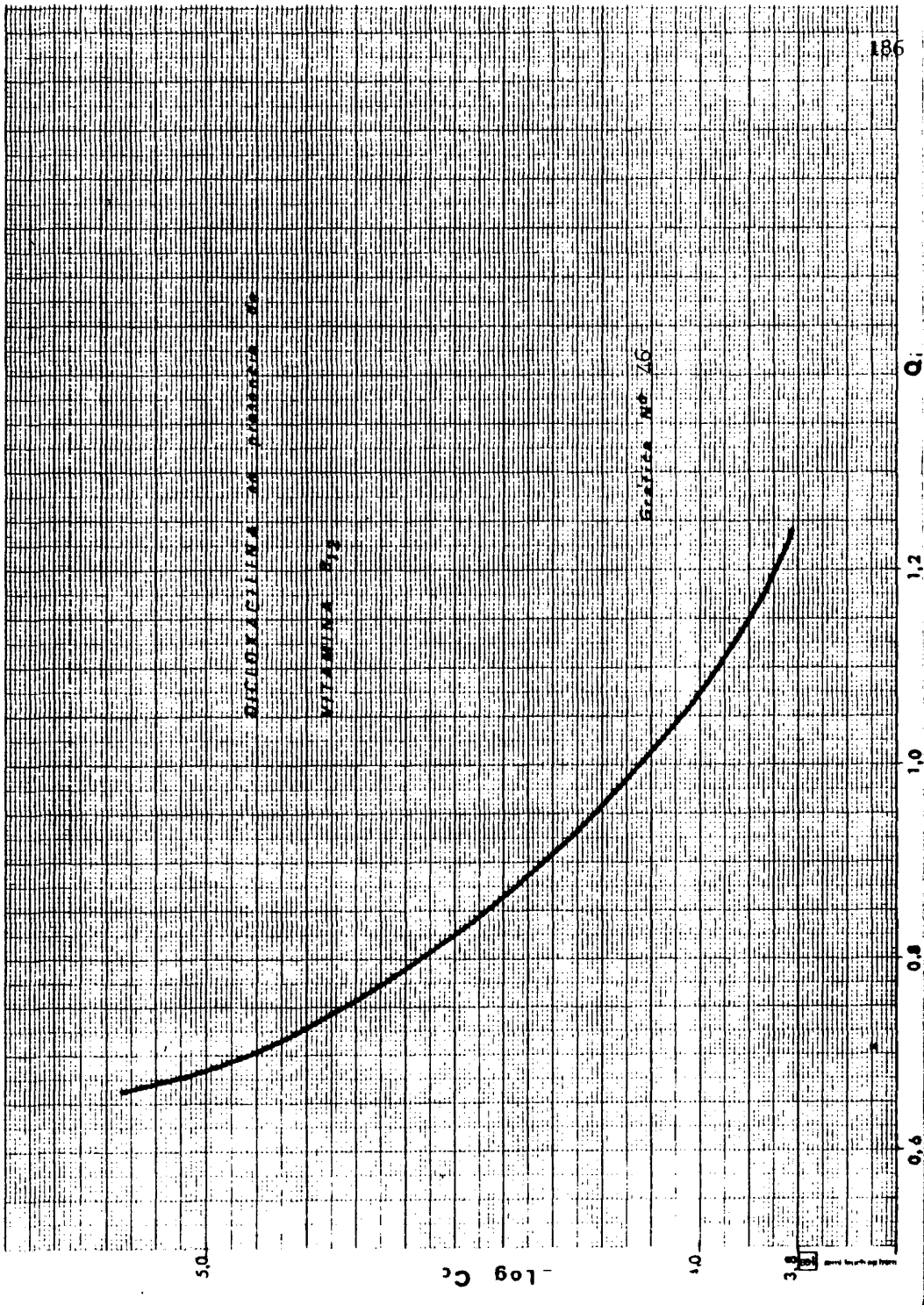
$$y = 35'08 - 136'92 X + 202'80 X^2 - 13'41 X^3 + 33'29 X^4$$

$$\text{coeficiente de regresión} = 0'99980$$

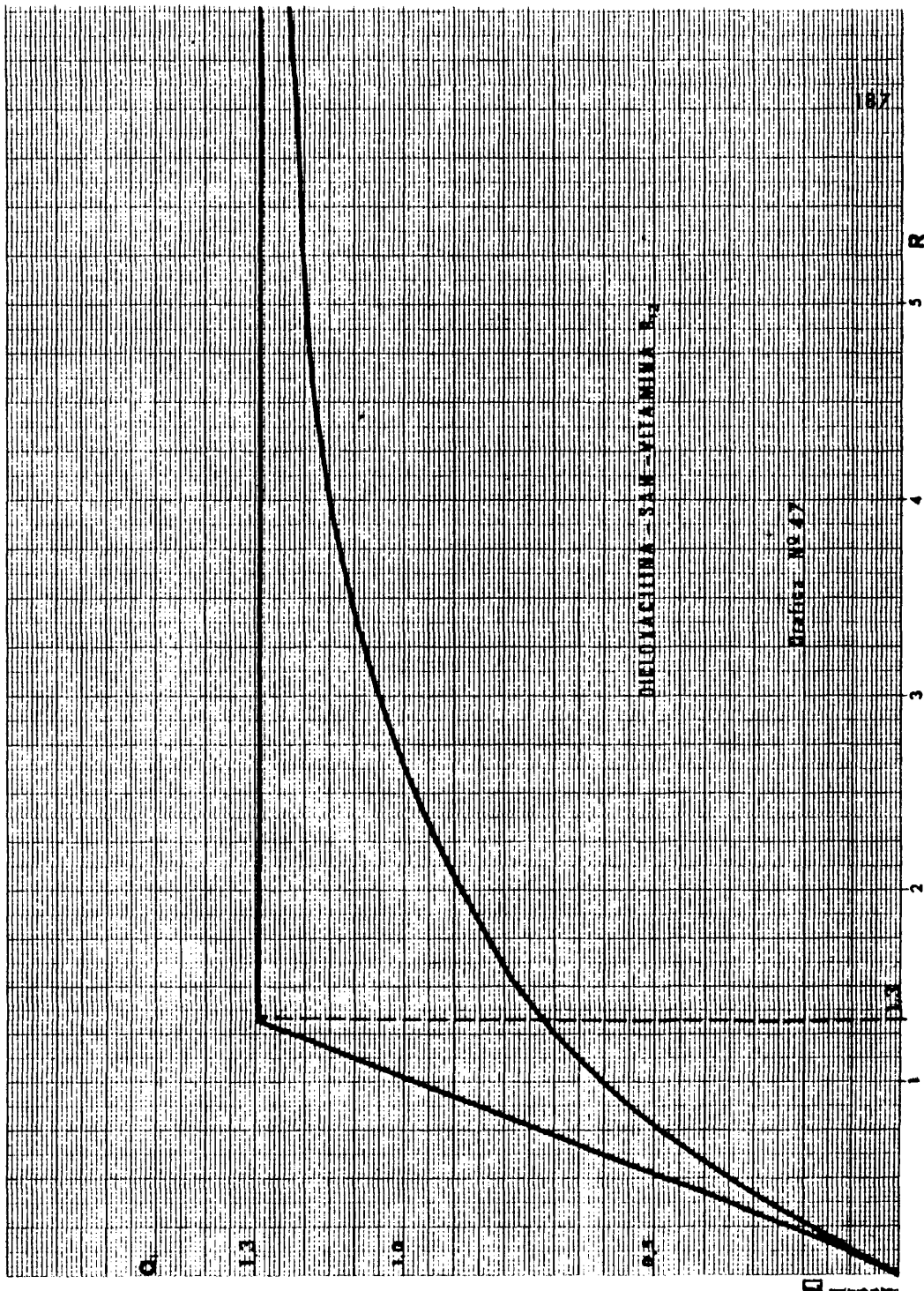


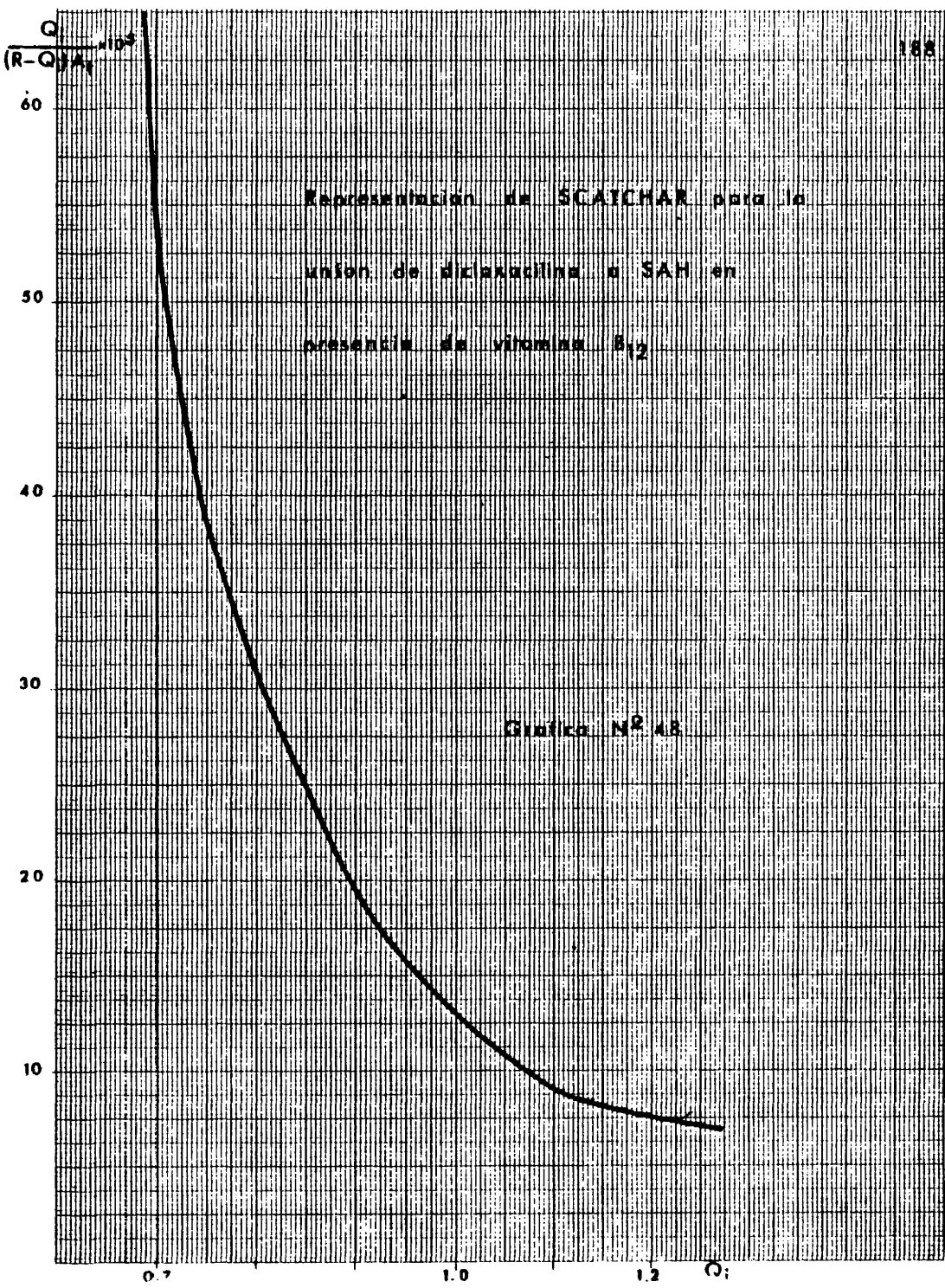
Espectros de amortiguación de la
fluorescencia de SAH por adición de
concentraciones crecientes de
DICLOXACILINA en presencia de
VITAMINA B₁₂

Gráfica Nº 45

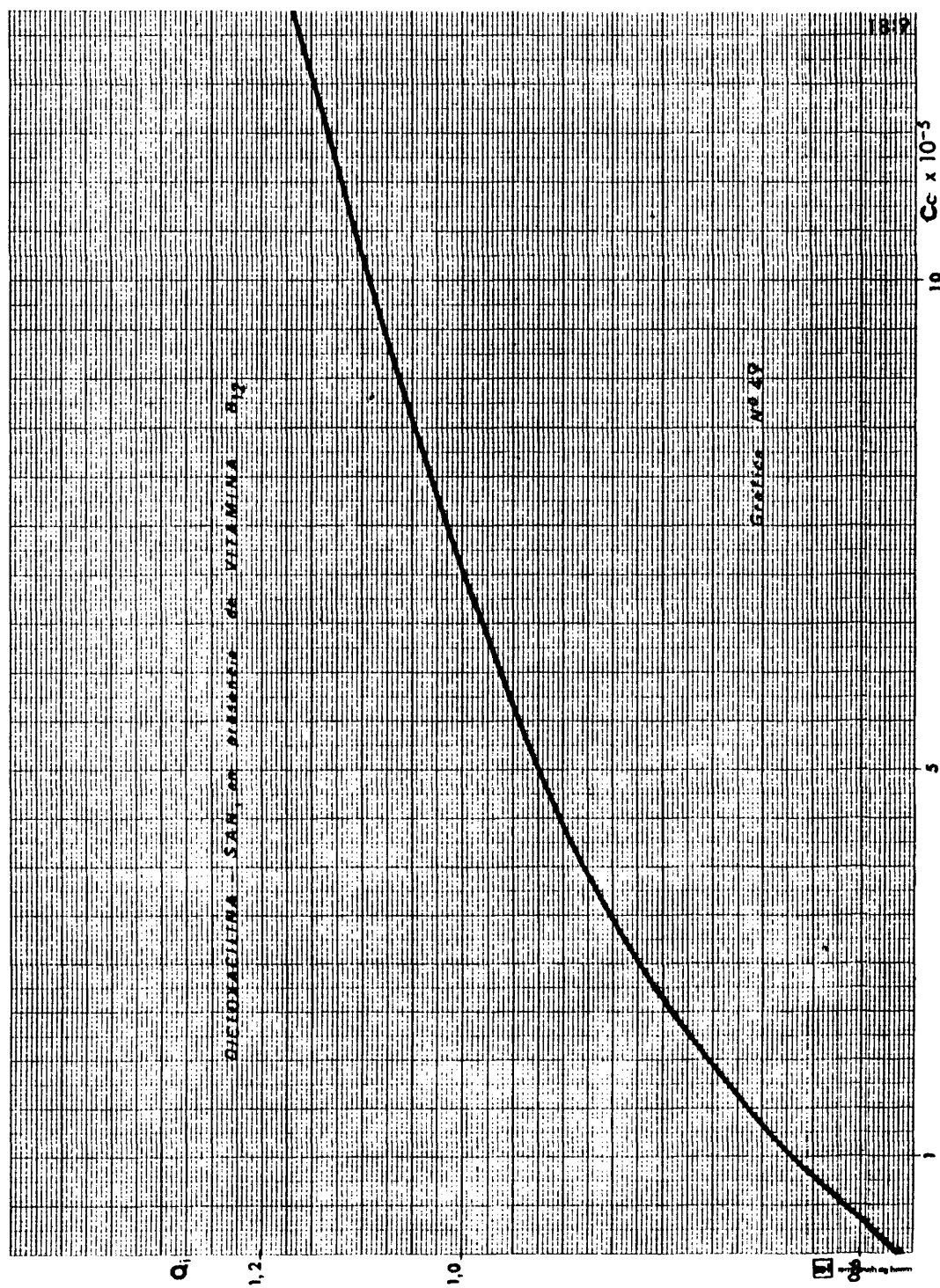


2





69



RESULTADOS Y DISCUSION

En primer lugar se ha calculado la estequiometría, mediante las gráficas en que se representan el número de moléculas de ligando unido por mol de proteína (r), frente a la relación concentración de ligando/ concentración de proteína (R). (Gráficas 23,28, 32,40 y 47).

Los resultados son:

	<u>Diálisis de equilibrio</u>	<u>Fluorescencia</u>
Dicloxacilina-SAH	$n = 2,25$	$n = 2'25$
Diclox.-Vit B ₁₂ -SAH	$n = 2'00$	$n = 1'3$
Vit. B ₁₂ - SAH	$n = 3'40$	-

En los que se puede observar, que para el caso de la unión de dicloxacilina a la SAH, se obtiene la misma relación de estequiometría, por ambos métodos, el de diálisis de equilibrio y el de inhibición de la fluorescencia.

No ocurre igual en lo que respecta a la influencia de la vitamina B_{12} , que por diálisis da un valor de 2'00 y por el método de la fluorescencia proporciona un valor de 1'3. Esta diferencia entre los métodos la han apuntado ya algunos autores y lo atribuyen al elevado valor de las constantes de asociación de estas sustancias, que suponen errores en el primer método.

Al obtener un número de sitios mayor que la unidad, hemos estudiado la naturaleza de esta unión, siguiendo las directrices de Weber y Anderson (40) (ya indicado antes):

Representando $-\log C_c$ frente a r , se deduce si la unión es simple, múltiple o cooperativa. Los resultados obtenidos, nos conducen a suponer que se trata de una unión múltiple, no cooperativa, tanto para la unión dicloxacilina - SAH, como en el caso de la presencia de vitamina B_{12} , y en la unión de esta última sustancia a la SAH.

Al hacer la representación de Scatchard de r / C_c frente a r , nos encontramos con una curva que indica también distintas clases de sitios de unión. Dada la asimetría de la gráfica podemos suponer que existen uniones fuertes, correspondientes a los valores elevados de r / C_c , y uniones débiles correspondientes a la

parte baja de la curva.

Reduciremos el problema a dos constantes de unión, ambas tendrán los valores medios ponderados correspondientes a las dos clases de puntos de unión, fuertes y débiles.

La ecuación de Scatchard será entonces:

$$\frac{r}{C_c} = \frac{n_1 k_1}{1 + k_1 C_c} + \frac{n_2 k_2}{1 + k_2 C_c}$$

Se han propuesto muchos métodos para la determinación de los valores de k_1 , k_2 , n_1 y n_2 a partir de los diagramas experimentales, que incluyen la utilización de ordenadores para obtener la ecuación de la gráfica.

Nosotros hemos obtenido ecuaciones polinómicas hasta de grado 5 con coeficientes de regresión muy aceptables :

DIALISIS DE EQUILIBRIO

Dicloxacilina - SAH $y = 5'93 - 24'76 X + 49'53 X^2 - 49'60 X^3 + 23'59 X^4 - 4'24 X^5$

coeficiente de regresión = 0'95827

Vitamina B₁₂ - SAH $y = 20'91 - 37'00 X + 46'60 X^2 - 33'23 X^3 + 11'09 X^4 - 1'35 X^5$

coeficiente de regresión = 0'98539

Dicloox- SAH-Vit B₁₂ $y = 31'14 - 75'08 X + 106'85 X^2 - 94'49 X^3 + 43'38 X^4 - 7'73 X^5$

coeficiente de regresión = 0'99819

AMORTIGUACION DE LA FLUORESCENCIA

Dicloxacilina- SAH $y = 36'43 - 136'82 X + 215'77 X^2 - 172'74 X^3 + 69'04 X^4 - 10'92 X^5$

coeficiente de regresión = 0'99635

Vitamina B₁₂ SAH - - - - -

Dicloxacilina-SAH-Vit. B₁₂ $y = 35'08 - 136'92 X + 202'80 X^2 - 13'41 X^3 + 33'29 X^4$

coeficiente de regresión = 0'99980

Las extrapolaciones sobre los 2 ejes llevan a los valores :

$$\frac{r}{C_c} \Big|_{r=0} = n_1 k_1 + n_2 k_2$$

$$y \quad r \Big|_{r/C_c=0} = n_1 + n_2$$

con lo que tenemos cuatro incógnitas .

Si utilizamos dos puntos de la gráfica, obtendremos cuatro ecuaciones para estas cuatro incógnitas .

Desarrollando la ecuación:

$$\frac{r}{C_c} = n_1 k_1 + n_2 k_2 + (n_1 + n_2) k_1 \cdot k_2 C_c - (K_1 + K_2 + K_1 K_2 C) r$$

y si para simplificar hacemos :

$$L = r / C_c; \quad T = C_c; \quad S = k_1 + k_2; \quad P = k_1 k_2; \quad AK = n_1 k_1 + n_2 k_2$$

$$y \quad AN = n_1 + n_2$$

sustituyendo, resulta la ecuación:

$$L T S + L T^2 P - A N T \cdot P = A K - L$$

que, aplicada a dos puntos de la gráfica nos permite obtener el valor de las dos incógnitas :

$$S = k_1 + k_2 \quad \text{y} \quad P = k_1 \cdot k_2$$

de las que los valores de las constantes k_1 y k_2 serán las raíces de la ecuación de segundo grado:

$$K^2 - S K + P = 0$$

y conocidos los valores de k , otras dos ecuaciones con dos incógnitas nos darán los valores de n_1 y n_2

$$A K = n_1 k_1 + n_2 k_2$$

$$A N = n_1 + n_2$$

El problema se encuentra en la enorme imprecisión de las extrapolaciones para obtener los valores de $A K$ y AN .

Siguiendo las indicaciones de Galleyrand (80) hemos construido un programa de cálculo al que se le proporcionan tres va -

lores numéricos de extrapolaciones sobre cada eje y se calcula la isoterma teórica que corresponde a las nueve combinaciones posibles de estos tres valores.

Estas isotermas se comparan con la isoterma experimental con el fin de elegir la más acorde con ella.

Este programa lleva dos subprogramas:

- 1º) - El subprograma RESOLP para la resolución de sistemas lineales y
- 2º) - El programa RACINE que nos calcula las constantes de interacción.

Tenemos que darle al ordenador:

- 1º) - Los coeficientes de las incógnitas en el sistema de ecuaciones obtenidos de la isoterma experimental (dos tarjetas de datos).
- 2º) - Los valores de las extrapolaciones de A_N en una tarjeta los tres.
- 3º) - Los valores de las tres extrapolaciones de $r/C_c = A_K$ en otra tarjeta.
- 4º) - Treinta y dos valores de concentración de medicamento libre

que nos servirán para calcular las curvas teóricas, a razón de diez valores en cada tarjeta.

El programa nos da nueve resultados y en cada uno de ellos, los valores de k_1 y k_2 , n_1 y n_2 y tres columnas de 32 puntos cada una, con los valores de C_c , r / C_c y r .

Para cada uno de nuestros cinco casos hemos de comprobar, cual de las nueve isothermas teóricas presenta mayor concordancia con la curva de Scatchard experimental.

Los resultados teóricos más acordes con las isothermas experimentales se pueden observar en la siguiente tabla:

METODO DE DIALISIS DE EQUILIBRIO

	n	n_1	n_2	$K_1 M^{-1}$	$K_2 M^{-1}$	$G \text{ Kcal / mol}$
Diclo-x-SAH	2'04	0'90	1'14	$5'6 \cdot 10^6$	$1'18 \cdot 10^4$	8'64 Kcal / mol
Diclo-x-SAH con vit B ₁₂	3'50	0'40	3'10	$5'6 \cdot 10^6$	$1'21 \cdot 10^4$	8'61 Kcal / mol
Vit B ₁₂ -SAH	3'90	1'00	2'90	$2'95 \cdot 10^6$	$5'9 \cdot 10^4$	8'10 Kcal / mol

METODO DE AMORTIGUACION DE FLUORESCENCIA

Diclo-x-SAH	2'5	0'70	1'80	$5'16 \cdot 10^6$	$1'34 \cdot 10^4$	9'21 Kcal / mol
Diclo-x-SAH con Vit B ₁₂	2'36	0'68	1'68	$5'17 \cdot 10^6$	$0'31 \cdot 10^4$	9'21 Kcal / mol

RESUMEN Y CONCLUSIONES

- 1º) - Se ha estudiado la asociación de la dicloxacilina con la SAlI y la influencia de la presencia de vitamina B₁₂ en esta asociación, por dos métodos: diálisis de equilibrio y amortiguación de la fluorescencia de los restos del triptófano.
- 2º) - En los estudios de diálisis se pone de manifiesto la existencia de al menos dos clases de sitios de unión sobre la proteína a los que puede ligarse el antibiótico.
- 3º) - Se comprueba que la naturaleza de esta unión no supone ningún efecto cooperativo, sino que corresponde a unión múltiple e independiente.
- 4º) - La estequiometría total oscila entre 2 - 2'25 según el método aplicado para su cálculo y los valores individuales de cada clase, son 0'9 y 1'2 calculados según el método de Scatchard.

5º - Las constantes de asociación son:

$$K_1 = 5'6 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$$

$$K_2 = 1'18 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$$

6º - La presencia de la vitamina B₁₂ en esta asociación afecta a la estequiometría que calculada por el método de Scatchard nos da 3'5 puntos totales que en valores individuales son 0'4 y 3'1. En cambio no se modifican las constantes de asociación apreciablemente.

7º) - Por el método de diálisis de equilibrio se ha estudiado también la asociación vitamina B₁₂ - SAll, y esta asociación resulta de naturaleza múltiple y los valores obtenidos según el método de Scatchard son :

$$n = 3'9; \quad n_1 = 1'00; \quad n_2 = 2'90$$

$$K_1 = 2'95 \cdot 10^6 \text{ y } K_2 = 5'9 \cdot 10^4$$

8º) - En los estudios de fluorescencia de dicloxacilina- SAll se pone también de manifiesto la existencia de al menos dos clases de puntos de unión, no cooperativos, cuya estequiometría total oscila entre 2'25 y 2'5 y que proporciona valores individuales

calculados por el método de Scatchard de 0'70 y 1'8, siendo las constantes respectivas:

$$K_1 = 5'16 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ y}$$

$$K_2 = 1'34 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$$

9º) - Por la técnica de fluorescencia la presencia de vitamina B₁₂, no altera significativamente la estequiometría total y parcial, si bien la constante de asociación de los puntos de 2ª clase, aparece notablemente disminuida.

10)- De la comparación de los resultados obtenidos por ambos métodos, se puede concluir que en ausencia de vitamina B₁₂ son absolutamente comparables. En presencia de vitamina B₁₂, los resultados son sistemáticamente superiores por el método de diálisis. Esto se puede atribuir al enorme efecto de amortiguación de la fluorescencia del triptófano que presenta la vitamina B₁₂, que puede enmascarar los resultados debidos a la dicloxacilina, y que nos ha impedido realizar los cálculos de unión a las concentraciones que empleamos en este trabajo.

BIBLIOGRAFIA

- 1) - Thompson WL: Rational use of albumin and plasma substitutes. Jons Hopkins Med J 136:220, 1.975.
- 2) - Howland SW et al : Colloid oncotic pressure and levels of albumin and total protein during major surgical procedures. Surg Gynecol Obstet 143 : 592, 1.976.
- 3) - Tullis JL:Albumin I Background and use. J Am Med Assoc 237: 355, 1.977.
- 4) - Goldstein. A., Pharmacol. Rev., 1, 102, 1.949
- 5) - Scatchard, N.Y. Acad of, Sci., 51-660, 1.949.
- 6) - Van Os, G.A.J., Ariens, E.J. and Simonis, A.M., in " Molecular Pharmacology", vol. I. Ariens, E. J., ed, Academic Press Inc, Newyork, N.Y. 1.964 pp 29-32.
- 7) - Brodie, B.B. and Hogben, C.A. J., Pharm, Pharmacol, 9, 345, 1.957.
- 8) - Michael Geisow - National Institute for Medical Research, London - Nature Vol. 270 - 8 - Diciembre 1.977.
- 9) - Karush (40). F - J. Amer. Scoc- 73- 2.705, 1.955
- 10)- M.C.Dougal, M.R., - J, A, M, A. 2-83, 1.970

- 12) - Cho, M.M., y Col - J. Pharm. Sci - 60-196, 1.971.
- 13) - Tullis JI.: Albumin. 2. Guidelines for clinical use. J Am Med Assoc 237:460, 1.977.
- 14) - White JAM: Rational use of plasma expanders. S Afr Med J 137: 1675, 1.976.
- 15) -Howland SW et al: Colloid oncotic pressure and levels of albumin and total protein during major surgical procedures. Surg Gynecol Obstet 143:592, 1976.
- 16) -Turner, M. y Rulme, Pitman Medical and Scientific Publishing Co. London
- 17)- American Hospital Formulary Service, American Society of Hospital Pharmacists., vol I, Washington DC 1.978, 16: 00.
- 18)- Physicians' Desk Reference, 31 th ed, ch E Baker JR (ed) , Medical Economics Company, Oradell New Jersey 1.977, p 1198
- 19) - The United States Dispensatory, 27 th ed Osol A and Pratt R (eds), J. B.Lippincott Company, Philadelphia, USA 1.973, p.36
- 20)- J. T. Heyl, J. G. Gibson and C.A. Janewoy: Studies on the plasma proteins. J. Clin. Investig. 22: 723, 1.943.
- 21)- N.S. Gunble and C. Riegel: Metabolism of serum albumin in man during brief Starvation. Am. Jour. Clinc. Nutrition 6: 142,1958

- 22)-Jonhn. S. Glasby - Encilopedia de Antibióticos-Editorial- A - C
- 23)-Bergoglio - Antibióticos Panamericana- 1.978
- 24)-José Ximenes, Ph. D. and Jairo Perche de Menezes, M.D.
- 25)-Charles F. Graven Kemper, Md, John V. Bennett, MD; Jean L. Brodie, BS; and Wilian M. M Kirby Md Seattle- Archives Internal Medicine Sep 1965-116-340.
- 26)-Dr. Rafael Rorger - Vademecun " Farmacología 79" Cofares.
- 27)-Dr. F Diéguez Igea- Valoraciones químicas de Antibióticos- Profesión farmaceutica, vol,4-nº 6-Pag XII.
- 28)-Dr. F Regné de Otal-Diccionario de Medicamentos-Pag 581-Medicamenta-Tomo 3º, 1069:
- 29)-Dr. A. Santos Ruiz-Vitaminas- Pag 98- Medicamneto-Tomo 1º-1969
- 30)-Roff- Strohecker-Heinz M. Henning-Pag 185-Análisis de Vitaminas - 1967.
- 31)-Dr. F. Regné de Otal-Diccionario de Medicamentos-Pag 1520-Medicamenta-Tomo 3º-1969.
- 32)-Charles E. King, Md, John Leibach, MD and Phillip P. Toskes, MD.-Clinically Significant Vitamin B₁₂ Deficiency Secondary to

Malabsorption of Protein-Bound Vitamin B₁₂- From the Veterans Administration Hospital and Department of Medicine, University of Florida College of Medicine, Gaines-Ville, Florida- pag 397-Digestive Diseases and Sciences, Vol. 24.No.5 (May 1979).

33)-P Ausel, Andrau, y J.L. Chanal.Laboratorio de Física. Dr.Mari - quen - Travaux de la Societe de Pharmacie de Montpellier- 1975-35 fere-2 pag-175-180.

34)-I.M. Klotz. Physicochemical aspet of drug-protein interactions A general perspective. Ann. N.Y. Acad Sci,226,1973, 18-135 .

35)-P. Aussel, M. Andrau, J L. Chanal y R. Manguen-Anales de Farmacia Francesa 31,7-8,489, 1979.

36)-G. Scatchard, I. Scheinberg, y S Armstrong. Physical Chemystin of proteins Solutions. The combination of human, Serum albumin Withe chloride ion. J. Amer Cgen-Soc 72,1950,535.

37)-M. LE Cureuil. G Crouzat-Reyne y B. Lejeune. Journal francais de Biophysique el Medicine Nucleare 1, 1978, 21-33.

38)-Walter D. Wosilait and Martin P. Ryan- Departmen of Pharmacology, School of Medicine-University of Missouri, Columbia, Missouri 65212 vol. 25, NO.3 , 1979. Research Communications in Chemical Patholc

gy and Pharmacology.

- 39)-A. M. Carrancio de La Plaza. Influencia del Benzoato Sódico en la Interacción Acido Salicílico-Seroalbúmina- Tesis 1978.
- 40)-Weber y Anderson-Biochemistry 4, 1942 (1965)
- 41)-Wyman . J. Aduane Protein Chen, 19,223, 1964.
- 42)-Anderson. SR., and Weber, G- 1965 Biochemistri,4.1948.
- 43)-Chignell. C.F. Methods Pharmacoly-2,23, 1972.
- 44)-Velick, SF. ight and Life (Edit Mc Elroy y Glass) John Hopkins Baltimore p 108, 1961.
- 45)-Steiner. R. F. y Adelhoch, H. Chen Rev.62,457, 1962.
- 46)-Chen. R. F. Arch. Brochem, Bioplut,120,609, 1967.
- 47)-Parker, C. W Biochemistry 6, 3408 y 3417, 1967.
- 48)-Edelman, GM, y Mc Clure, W, O. Acct Chen , Res l. 65, 1968
- 49)-Stryer. L. Science 162,526, 1968.
- 50)-Aussel, P, Audran, Chanal et Marignan-Ana Pharm France,1973 31,489

- 51)-Aussel.P. Audran et Chanal-Trav. Soc Pharm Motpellier,1975
35-175,
- 52)-Estern O. et Volmer M- Phys. Z., 1919,20 183.
- 53)-Parker. C.A.-Photoluminescence of solutions, Elsevier pub.
Comp., Amsterdam,1968 .
- 54)-Chignell C.F. — Methods in Pharmacology, A.C.C., New - Yerk,
1.972, vol. 2 .
- 55)-Ma J.K.H., Jun H.W. et Luzzi L.A. — J. Pharm. Sci., 1.973
62, 1.261.
- 56)-Chignell C.F. — Ann. N. Y. Acad. Sci., 1.973, 226, 44.
- 57)-Scatchard G. — Ann. N. Y. Acad. Sci., 1.949, 51, 660.
- 58)-Deranleau. D.A. (1.964). J. Chem. Phys., 40,2134.
- 59)-Chun. P.W., and Fried. M. (1.967). Biochemistry. 6,3094 (1.967)
- 60)-Nichol. L. W., Jackson. W.J.H., and Winzor, D.J. (1.967). Bio -
chemistry, 8, 2449.
- 61)-Adams, E.T. Jr., and Lewis, M.S. (1.968). Biochemistry, 7,1044
- 62)-Klapper. M.H., and Klotz, I. (1.968). Biochemistry, 7, 223.

- 63) - Amadeo J Pesce - Carl - Gustaf Rosin - Terry L. Pasby (19) -
rescence Spectroscopy pag 238 - 1965 .
- 64) - M - Audran - Tesis - Faculté de Pharmacie - Université de
Montpellier - 1.978
- 65) - Rodney L. Levine , clinical chem, 23 , 2292 - 1.977.
- 66) - C. Evrain , N. Cittanova y M. F. Jayle Broch. Biophys -
Acta 533 , 408 - 414 - 1.978.
- 67) - Parker C. A. - Phofoluminiscence of solutions , Elsevier
Pub Comp , Amsterdam - 1.968 .
- 68) - J. C. Galleyrand , M. T. Vié et R. Marignan - Trav. Soc .
Pharm de Montpellier - 38 , 349 , 1.978.
- 69) - J. C. Galleyrand, M. T. Vié et R. Marignan - Trav. Soc.
Pharm de Montpellier - 38 , 357 , 1.978 .
- 70) - Chen R F. Fluorescen Teching in Cell Biologgy Springer
Verlag ed N Y - 1.973 pag 273 - 282 .
- 71) - Jacobsen. J. Febs Lett 5 , 112 , - 1.969 .
- 72) - Jacobsen. J. y Wemberg R. P. Clin Chem 20 , 783 - 1974
- 73) - Nelson , T. , Jacobson , J. , y Wemberg , R. P. Pediatr,
Res 8 , 963 - 1.974 .
- 74) - Evrain, C. , Cittanova , N. y Jayle , M. F. Biochim -
Biophys Acta 533 , 408 - 1.978 .
- 75) - Attallah , N. A. , and Lata, G. F. , Steroid - protein -

- interactions studied by fluorescence quenching. *Biochim ,
Biophys . Acta* 168 , 321 - 1.968 .
- 76) - Abelson , D. Depatie , C y Craddock , V. *Archiv Biochem
Biophys.* 91 , 71 , - 1.960 .
- 77) - Steiner , R. F. , Roth , J. y Robbins . *J. Jom , Bioph -
Chem . ,* 241 , 560 - 1.966 .
- 78) - Lenner , S. S. *Biochem Biophys . Res. Commun.* 29 , -
767 - 1.967 .
- 79) - M. Bourdeaux - Pontier , M. Chauvet - Derou - Dhile , M.
Sarrazin y C. Briand *I. de Chim Phys.* 75 , 973 - 1.978 .
- 80) - Galleyrand, J.C., Aussel. P. y R. Marignan- *Trav. Soc.
de Pharm. Montpellier* 39, 25, 1979.

BIBLIOGRAFIA NO COMENTADA

William B. Pratt M.D - Chemotherapy of infection-New - York - Oxford University Press- 1977.

H.W. Florey: Antibiotics, Vol.1 (ed. H.W Florey et al. New-York) - Oxford University Press, 1949.

D.J. Hipper and J.L. Strominger : Mechanism of action of penicillins. A proposal based on their structural similarity to acyl-D-alanyl-D-alanine. Proc. Natl. Acad. Sci U.S. 54:1133 (1965).

P.M. Blumberg and J.L. Strominger: Interaction of penicillin with the bacterial cell: Penicillin-binding proteins and penicillin-sensitive enzymes. Bact. Rev 38: 291 (1974) .

Chignell . C. F. Methods Pharmacol 2 , 33 - 1.972 .

Martin B. K. Nature 1.965 , 207 , 274 .

Colin F. Chignell - Mol - Pharmacol . 1.969 , 5 , 244 - 252.

La Du , B. N. , Mendel H. G. , Way , E. L. - Fundamental of , drug. metabolism . and drug Disposition , - 1.972.

Yoshioka et al , J. Antibiotic - (Japon) 20, B.34. 1.967.

Fomina et al . Antibiotic 16 , 153 , - 1.971

- De Azebedo e Silva et al . Univ. Fed. Pernambuco . Inst Biocienc-
- Pub Avulsa 9 - 1.973 .
- Suda et al , J. Antibiotics (Japón) 26. 504 - 1.973 .
- Ambrosioli , Menzzi - Mandras - Ig. Mod - 66 , 339 - 1.973 .
- Ito , et al Antibiotics (Japón) 27 , 490 - 1.974 ,.
- Anderson, S.R. , and Weber. G. (1965). Biochemistry, 4. 1.948
- Anderson, S. R. , and Weber. G. (1.966) Arch. Biochem. -
- Biophys. , 116 . 207 .
- Anderson. S. R. , and Weber. G. (1969). Biochemistry. 8. 371
- Antonini. E. , and Gibson. Q. H. (1964). Acta Biol. et Med. Germ
- Suppl. III. 76 .
- Attalah. N. A. , and Lata. G. F. (1968). Biochem. Biophys. -
- Acta . 168. 321 .
- Bjerrum. J. (1957). Metal Ammine Formation in Aqueous Solution.
- P. Haase & Son. Copenhagen .
- Boyer. P. D: , and Theorell. H. (1956). Acta Chem. Scand.10 . -
- 477.
- Brand. L. , and Gohlke. J. R. (1966). Fed. Proc. , 25. 406 .
- Brand. L. , Gohlke. J.R. , and Rao. D.S.(1967). Biochemistry -
- 6. 3510 .

- Chen. R. F. (1967a). Arch. Biochem. Biophys. , 120. 609 .
- Chen. R. F. , (1967b) in Fluorescence: Theory, Instrumentation,
- and Practice (G. C. Guibault ed). Marcel Dekker. Inc. New York
- p. 443 .
- Churchich. J. E. (1967). J. Biol. Chem. 242: 4414 (1967).
- Dandiker. W.B. , Schapiro. H. C. and Medeiski. J. W. (1964)
- Immunochem. 1. 165 .
- Daniel. E. , and Weber. G. (1966). Biochemistry. 5. 1413 .
- Day. L. A. , Sturtevant. J. M. , and Singer. J. J. (1963)-
- Ann. N. Y. Acad. Sci. , 103. 611 .
- Deranleau. D. A. , and Neurath. H. (1966). Biochemistry , -
- 5. 1413 .
- Edelman. G. M. , and McClure. W.O. (1968). , Acct. Chem.-
- Res. , 1 . 65 .
- Edsall. J. T. , and Wyman. J. (1958). Biophysical Chemistry.-
- Vol 1. , Academic. New York.-Chapters 8 - 11.
- Eisen. H. N. , and Siskind. G. W. (1964). Biochemistry.3.996.
- Ferdinand. W. (1964). Biochem. J. , 92. 578.
- Eromm. H. J. , J. Biol. Chem. , 238. 2938 .
- Gally. J. A. , and Edelman. G. M. (1965). Biochem. Biophys. -
- Acta. 94. 175.

- Haugland, R. P. , and Stryer, L. (1967). in Conformation of-
- Biopolymers (G.N. Ramaschandran, ed). Academic. London.-
- Vol. 1. , p. 321 .
- Hsu, R. Y. , and Lardy, H.A. (1967). J. Biol. Chem.242. 527.
- Jaffe, H. H. , and Orchin, M. (1962). Theory and Applications-
- of Ultraviolet Spectroscopy. Wiley. New York. Chapter 20.
- Klotz, I. (1953). In The Proteins (H. Neurath and K. Bailey,edg).
- Vol 1. Part B. Academic. New York. p. 727 .
- Labeyrie, F. , diFranco, A. , Iwatsubo, M. , and Baudras. A. -
- (1967). Biochemistry. 6. 1791 .
- Laurence, D. J. R. (1952). Biochem. J. , 51. 168 .
- Lehrer, S. J. Biol. Chem. , (1969). 244. 3613 .
- McClure, W. O. , and Edelman, G. M. (1966). Biochemistry. -
- 5. 1908 .
- McClure, W.O. , and Edelman, G. M. (1967). Biochemistry . -
- 6. 559 and 567 .
- Mckay, R. H. , and Kaplan, N. O. (1964). Biochem. Biophys. -
- acta. 79. 273 .
- Millar, D. Minzghar, K. , and Steiner, R. (1962). Biochem. -
Biophys. Acta. 65. 153 .
- Parker, C. W. (1967). Biochemistry. 6. 3408 and 3417 .

- Parker. C. W. , and Osterland. C. K. (1966). Clin. Res., 14. 438.
- Perkins. J. P. , and Bertino. J. R. (1966). Biochem., 5. 1005
- Rawitch. A. , and Weber. G (1969. Fed. Proc. 28. 413 (Abstract).
- Steiner. R.F. , and Edelhc. H. (1962). Chem. Rev. 62. 457 .
- Steiner. R. F. , Roth. J. , and Robbins. J. (1966). J. Biol. Chem. - 241. 560 .
- Stryer. L. (1965). J. Mol. Biol. , 13. 482 .
- Stryer. L. (1968). Science. 162. 526 .
- Tanford. C. (1961). Physical Chemistry of Macromolecules. Wiley- - New York. Chapter 8 .
- Teale. F. W. J. (1959). Biochem. J. , 25. 289 .
- Theorell. H. , and McKinley. McKee. J.S. (1961). Acta Chem. - - Scand. , 15. 1811 .
- Velick. S. F. (1958). J. Biol. Chem. , 233. 1455 .
- Velck. S. F. (1961). In Light and Life (W.D. McElroy and B. - - Glass. eds.). Johns Hopkins Baltimore. p. 108 .
- Velick. S. F. , Parker. L. W. , and Eisen. H. N. (1960). Proc- - Natl. Acad. Sci. , U. S. , 46. 1470 .
- Vesting. C. (1963). Methods of Biochemical Analysis. 10. 137 .
- Weber. G. (1965). In Molecular Biophys. (A. Pullman and M.- Weissbluth, eds). Academic. New York. p. 369 .

- Weber. G. (1968). In *Molecular Associations in Biology*. Academic,
- New York, p. 499 .
- Weber. G. , and Anderson, S. R. (1965). *Biochemistry*, 4. 1942
Weber. G. , and Anderson, S. R. (1969). *Biochemistry*, 8. 361 .
- Weber. G. , and Daniel, E. (1966). *Biochemistry*, 5. 1900 .
- Weber. G. , and Laurence. D. J. R. (1959). *Biochem. J.*, 56. 23P.
- Weber. G. , and Teale. F. W. J. (1959). *Faraday Soc. Discu -*
- ssions, 27. 134 .
- Weber. G. , and Teale, F. W. J. (1965). In *The Proteins* (H. -
- Neurath. ed). and ed., Vol. 111, Academic, New York, p 445.
- Weber, G., and Young. L.B. (1964). *J. Biol. Chem.*, 239. 1415.
- Winer. A.D., Schwert. G. W., and Millar. P. B.S. (1.959) . -
- J. Biol. Chem., 234, 1149.
- Winer, A.D., and Schwert. G.W. (1.959). *J. Biol. Chem.* , -
- 234, 115 .
- Winkler, M. (1.962). *J. Mol. Biol.* , 4, 118 .
- Yoo, T. J., Ruholt, A.O. , and Pressman. D. (1.967). *Scien -*
- ce, 157, 707 .

