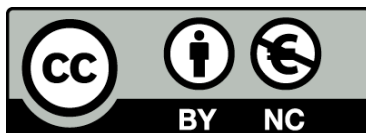




UNIVERSITAT_{DE}
BARCELONA

**Estudio in vitro e in vivo
de la interacción polifenol-proteína: aspectos
farmacocinéticos y farmacodinámicos del ácido cafeico**

Elena Escubedo Rafa



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial 4.0. Espanya de Creative Commons**.

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial 4.0. España de Creative Commons**.

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0. Spain License**.

UNIVERSIDAD DE BARCELONA

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE FARMACOGNOSIA Y FARMACODINAMIA

ESTUDIO in vitro E in vivo DE LA INTERACCION POLIFENOL-
-PROTEINA. ASPECTOS FARMACOCINETICOS Y FARMACODINAMICOS
DEL ACIDO CAFEICO.

Memoria que presenta D^a.
Elena Escubedo Rafa y dirigida
por el Dr. D. Tomás Ad-
zet y la Dra. D^a. Esther
Marín, para la colación
del grado de Doctor en
Farmacia.

Barcelona, Diciembre 1.985

BIBLIOTECA DE LA UNIVERSITAT DE BARCELONA



0700084022



FACULTAD DE FARMACIA

Cátedra de Farmacognosia y Farmacodinamia

Núcleo Universitario de Pedralbes
08028 BARCELONA

Prof. Dr. Tomás Adzet Porredón

D. TOMAS ADZET PORREDON, Catedrático de Farmacognosia y Farmacodinamia y Da. ESTHER MARIN PARES, Profesora Titular de las mismas disciplinas en la Facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona,

CERTIFICAN : Que la Tesis Doctoral titulada "Estudio in vitro e in vivo de la interacción polifenol-proteína. Aspectos farmacocinéticos y farmacodinámicos del ácido cafeico" presentada por Da. Elena Escubedo Rafa, ha sido realizada bajo nuestra dirección y reúne los requisitos necesarios para su presentación y posterior defensa ante el Tribunal correspondiente.

Barcelona, 28 de Noviembre de 1985



Fdo.: Dra. E. Marín



Fdo.: Dr. T. Adzet

ALS MEUS PARES

AL MEU MARIT

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi profundo agradecimiento al Dr. TO
MAS ADZET, Director del Departamento de Farmacognosia y
Farmacodinamia de la Facultad de Farmacia de Barcelona y
codirector de este trabajo, por haber puesto a mi dispo-
sición los medios científicos y el ambiente humano sin
los cuales no habría sido posible su realización.

A la Dra. ESTHER MARIN, por haber aceptado la codi-
rección de la presente Memoria, a la vez que ha estimula-
do en todo momento mi interés , aportando acertadas
sugerencias.

Al Dr. JOSE IGLESIAS, Catedrático de Farmacognosia
y Farmacodinamia de Barcelona, quien con su experiencia
y sus consejos me ha orientado en el transcurso de estos
años.

Al Dr. CHRISTIAN JACQUOT, Director del Laboratorio
de Pharmacodynamie et Pharmacocinétique de la Faculté de
Pharmacie de Paris-Sud, por haberme permitido realizar
en su Departamento las experiencias de eliminación renal.

Al Dr. JACQUES PEYROUX del Laboratorio de Pharmaco-
logie de la Faculté de Pharmacie de l'Université René-
-Descartes de Paris, donde se llevaron a cabo parte de
las experiencias farmacológicas.

Al Dr. J. ORIOL BULBENA del Departamento de Neuro-
química del C.S.I.C., por el interés que ha demostrado
en este trabajo.

Al Dr. LUIS MARTINEZ y D^a CARMEN PALOS de Laboratorios Esteve S.A., por su ayuda en el ajustado de los modelos farmacocinéticos.

Al Dr. JEROME BARRE del Servicio de Biochimie 1 et de Pharmacologie de l'Hôpital Intercommunal de Créteil, por sus acertados comentarios sobre las experiencias de unión a proteínas.

A mi esposo, el Dr. JORGE CAMARASA, quien desde el principio de la presente Memoria me ha ofrecido su decidido y constante apoyo en la labor diaria.

A todo el personal del Departamento de Farmacognosia y Farmacodinamia de Barcelona, y a todos aquellos que aun no siendo citados me han ofrecido su colaboración desinteresada.

PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA PRESENTE MEMORIA

- "Estudio "in vitro" de la interacción polifenol-proteína".
Proc. 2nd Eur. Cong. Biopharm. Pharmacokin. (1984), 2,
86-94.
- "Rat tissue binding of caffeic acid".
J. Pharm. Clin. (1985). En prensa.
- "Acción del ácido cafeico sobre la musculatura lisa vascular".
Rev. Farmacol. Clin. Exp. (1985), 3, 245.

Comunicaciones enviadas al 5th Symposium on Biopharmaceutics and Pharmacokinetics. Piestany, 1986. (Checoslovaquia):

- "A model fitting the Pharmacokinetic behaviour of caffeic acid after I.V. administration in rats".
- "Bioavailability of caffeic acid in rats".

INDICE

INTRODUCCION	1
1. LOS ACIDOS FENOLES	5
1.1. Derivados del ácido benzoico	7
1.2. Derivados del ácido cinámico	8
2. CARACTERISTICAS FISICO-QUIMICAS DE LOS COMPUESTOS POLIFENOLICOS	12
2.1. El ácido cafeico	16
2.1.1. Estudios de solubilidad	17
2.1.2. Estudios de estabilidad	19
2.1.3. Determinación del pKa de los grupos funcionales	23
2.1.4. Liposolubilidad	24
3. UNION A LAS PROTEINAS PLASMATICAS	27
3.1. Consecuencias de la inter- acción fármaco-proteína	29
3.2. Proteínas plasmáticas: Albúmina	31
3.3. Metodología experimental aplicada al ácido cafeico	40
3.3.1. Ensayos previos de incubación	40
3.3.2. Determinación de la fijación del ácido cafeico a la Seroalbúmina bovina	42
3.3.2.1. Gel-Filtración	43
3.3.2.2. Ultrafiltración	47
3.3.2.3. Diálisis de Equilibrio	51
3.3.2.4. Precipitación Ácida	56
3.3.2.5. Comparación de los resul- tados de fijación según los métodos empleados	60
3.3.3. Factores experimentales que modi- fican la fijación del ácido cafeico	62

3.3.4.	Determinación de las constantes y el número de puntos de unión	72
3.3.5.	Desplazamiento por el ácido salicílico	94
3.3.6.	Caracterización del enlace	99
3.3.7.	Estudio de la interacción de la SAB con otros ácidos cinámicos	101
4.	UNION A TEJIDOS	109
4.1.	Metodología Experimental	114
4.2.	Resultados	118
5.	COMPORTAMIENTO FARMACOCINETICO	121
5.1.	Vía intravenosa	123
5.1.1.	Cinética plasmática e interpre- tación matemática	125
5.1.2.	Elección del modelo farmacoci- nético óptimo	128
5.1.3.	Cálculo de los parámetros farmacocinéticos	134
5.1.4.	Cinética plasmática del ácido cafeico tras administración intravenosa	137
5.2.	Vía oral	157
5.2.1.	Absorción	157
5.2.2.	Cinética plasmática de la absorción e interpretación matemática	159
5.2.3.	Cálculo de los parámetros far- macocinéticos tras la adminis- tración oral	162
5.2.4.	Biodisponibilidad absoluta	164
5.2.5.	Cinética plasmática del ácido cafeico tras administración oral	166

5.2.6. Otros métodos de deter-	
minación de la Ka	192
5.2.6.1. Determinación "in situ"	
de la Ka del ácido ca-	
feico	195
6. ELIMINACION	206
6.1. Metabolismo	207
6.2. Antecedentes en el estudio de la	
eliminación del ácido cafeico	208
6.2.1. Biotransformación	208
6.2.2. Excreción hepatobiliar	213
6.3. Eliminación renal	215
6.3.1. Determinación del aclaramiento	
renal y extrarrenal del ácido	
cafeico	221
7. FARMACOLOGIA DE LOS ACIDOS FENOLES	230
7.1. Antecedentes en el estudio de las	
acciones farmacológicas del ácido	
cafeico	235
7.2. Farmacología experimental del	
ácido cafeico	240
7.2.1. Efectos a nivel subcelular	242
7.2.2. Acción sobre la musculatura	
lisa vascular	255
CONCLUSIONES	290
BIBLIOGRAFIA	294

INTRODUCCION

INTRODUCCION

El metabolismo secundario propio de los vegetales, produce numerosas sustancias con la función fenol, siendo las más representativas los antocianos, los flavonoides, los taninos y los ácidos fenoles. Es en este último grupo donde ha centrado sus investigaciones el Departamento de Farmacognosia y Farmacodinamia de la Facultad de Farmacia de Barcelona, consolidándose en unos Proyectos de Investigación referentes a la actividad hepatoprotectora de estos compuestos fenólicos.

De la gran cantidad de sustancias comprendidas en este grupo, han llamado nuestra atención, por su estructura química particular, los ácidos cinámicos y en especial el ácido cafeico, debido a la presencia de un grupo catecol libre que le confiere una singular similitud estructural con determinados autacoides de importante actividad farmacológica, como son las catecolaminas.

Se ha descrito el efecto de este ácido fenol sobre la secreción biliar (CZOK 1973), la motilidad intestinal (CZOK 1971), La Dopa-decarboxilasa (DE ROPP 1969), la permeabilidad de membrana (GLASS 1974), y otras.

Cualquier actividad farmacológica depende de la dosificación, y por tanto de los niveles plasmáticos alcanzados, estando estos últimos en función de numerosos parámetros. En la bibliografía no se encuentra ningún trabajo sobre el ácido cafeico en este sentido, por lo que se inició la presente Memoria con el fin de determinar los procesos farmacocinéticos de este ácido fenol y los factores que les influyen, haciendo especial hincapié en la fija-

ción a las proteínas plasmáticas.

Se ha realizado un estudio previo de los parámetros físico-químicos, no descritos hasta el presente, para contribuir a un mejor conocimiento de esta sustancia y de los procesos que pueda sufrir en el organismo.

Seguidamente se ha determinado el porcentaje de fijación del ácido cafeico a la Seroalbúmina bovina. Al no existir una técnica universalmente aceptada para este ensayo, se han estudiado comparativamente las diversas metodologías.

El porcentaje de unión de una sustancia a las proteínas condiciona el resto de los procesos farmacocinéticos. Se ha estudiado extensamente este parámetro, calculándose las constantes y puntos de fijación, así como los factores experimentales que influyen en esta interacción. Se ha calculado también el porcentaje de unión de otros ácidos cinámicos a la Seroalbúmina bovina, para establecer una posible correlación estructural.

Se ha determinado el % de fijación del ácido cafeico a distintos órganos, estableciendo un método más selectivo de detección de este ácido, que el utilizado precedentemente.

Se han caracterizado los procesos puramente farmacocinéticos, como son los niveles plasmáticos tras administración i.v. y oral. Ello supone no sólo lograr una dosificación adecuada, sino conseguir también una frecuencia de extracción sanguínea indicativa y un método cromatográfico de detección altamente sensible.

Los procesos metabólicos que sufre el ácido cafeico fueron descritos por BOOTH en 1957. Para completar su estudio farmacocinético se ha verificado su eliminación renal, después de la administración i.v. y oral.

Su elevado porcentaje de fijación a las proteínas plasmáticas, sugirió la posibilidad de que este ácido fenol produjera cierto efecto sobre determinadas actividades enzimáticas, debido a su unión a estas proteínas. Por ello se ha estudiado su efecto sobre los citocromos P-450 y b-5. Se realizó "in vitro", debido a la elevada tasa de metabolismo y a la baja absorción por vía oral que presenta el ácido cafeico.

HARTMAN (1955), LAPARRA (1967), DE ROPP (1969) y ANDARY (1980), citan la acción inhibidora competitiva de este ácido fenol sobre la Dopa-decarboxilasa. Este tipo de inhibición se debe normalmente a una similitud estructural con el sustrato, que en este caso residiría en el grupo catecol y la disposición C_6-C_3 . Estos mismos requisitos los presentan las catecolaminas con actividad alfa - adrenérgica. Se pensó por ello, que era posible que el ácido cafeico interaccionara de algún modo con el receptor alfa - adrenérgico, centrándose el último capítulo de esta Memoria en la valoración de esta actividad.

LOS ACIDOS FENOLES

1. LOS ACIDOS FENOLES

Los ácidos fenóles constituyen un conjunto de sustancias dentro de la familia de los compuestos fenólicos muy difundidos en el reino vegetal. Están presentes tanto en las hojas como en las raíces, flores y frutos, de modo que habitualmente se encuentran en las dietas animales.

A diferencia de otros compuestos polifenólicos, como los flavonoides, los ácidos fenóles no son productos finales del metabolismo secundario vegetal. El contenido va renovándose continuamente durante los distintos procesos fisiológicos, siendo el resultado del equilibrio de diversos fenómenos de síntesis y catabolismo (NAGELS 1973, 1982).

Los ácidos fenóles desarrollan en el vegetal diversas funciones nutritivas y fisiológicas. GUPTA y DAVIDSON (1981) indican que probablemente constituyen un mecanismo de autodefensa frente a infecciones, depredadores y parásitos. LATTANZIO (1979) los señala como reguladores del crecimiento vegetal y HARBONE (1975) atribuye a los ácidos cinámicos un papel importante en la biosíntesis de flavonoides, lignanos y taninos.

Dentro de los ácidos fenóles se pueden distinguir:

- Los derivados del ácido benzoico ($C_6 - C_1$).
- Los derivados del ácido cinámico o 3-fenilpropenoico ($C_6 - C_3$).

1.1. DERIVADOS DEL ACIDO BENZOICO

Los derivados de este ácido, comunes tanto en Angiospermas como en Gimnospermas, comprenden el ácido p-hidroxibenzoico, el protocatéquico, el vaníllico, gálico, sirínico, salicílico y gentísico. Este último posee un grupo hidroxilo en orto, el cual no se encuentra en los flavonoides más frecuentes.

Los tres primeros son constituyentes de los lignanos, pudiéndose obtener tras hidrólisis alcalina de éstos. En general, las plantas que no contienen lignanos no suelen contener estos tres ácidos.

El ácido protocatéquico y el gálico tienen probablemente un origen y función distinta en el vegetal. El primero es muy frecuente; no así el segundo, que se encuentra en la naturaleza como dímero: el ácido elágico. Los ácidos gálico y elágico tienen un importante papel en la estructura de ciertos taninos de los cuales se liberan por hidrólisis ácida.

Otros ácidos benzoicos, los cuales se pueden encontrar sólo de forma ocasional, son los completamente metoxilados como el ácido p-metoxibenzoico (ácido anísico), el 3,4-dimetoxibenzoico (ácido verátrico) y el 3,4,5-trimetoxibenzoico (ácido trimetilgálico).

1.2. DERIVADOS DEL ACIDO CINAMICO

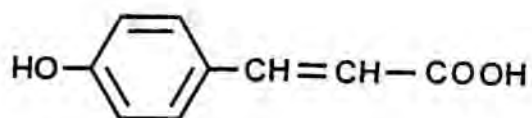
Tanto el ácido cinámico, como sus derivados, se hallan presentes en la mayoría de las especies vegetales. Su denominación proviene de la canela, especie conocida desde hace 4000 años, en la que son particularmente abundantes. Estos compuestos pueden ser el constituyente mayoritario de ciertos aceites y resinas naturales (HOSKINS 1984).

Los derivados más importantes del ácido cinámico son el ácido p-cumárico, el cafeico, el ferúlico y el sinápico (RIBEREAU-GAYON 1968), resultantes de una o varias sustituciones sobre el núcleo aromático (Fig. 1).

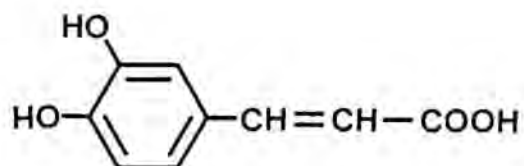
Al poseer todos ellos un doble enlace en la cadena lateral, pueden existir bajo dos formas isoméricas: los ácidos cis-cinámicos y los trans-cinámicos. Las formas cis son susceptibles de ciclarse para dar las correspondientes cumarinas.

A su vez, ambos isómeros pueden transformarse en su homólogo, por acción de la luz, hasta alcanzarse el equilibrio. Su separación puede llevarse a cabo por cromatografía en capa fina mediante ciertos solventes acuosos, como por ejemplo el ácido acético diluido.

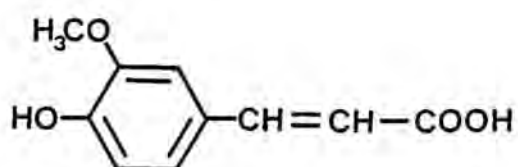
En la naturaleza predominan las formas trans-, que son las más estables, generalmente esterificadas. De estos ésteres, los más importantes son los formados por el ácido cafeico. Su estudio en el café dio origen al nombre de este ácido (BARNES 1950, SCARPATI 1964, HARBONE 1966). Como principales se citan:



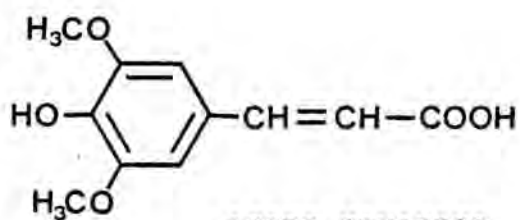
ACIDO p-CUMARICO



ACIDO CAFEICO



ACIDO FERULICO



ACIDO SINAPICO

Fig. 1.- Estructuras de los principales ácidos cinámicos.

- Ácido clorogénico (3-cafeilquínico).
- Ácido neoclorogénico (5-cafeilquínico).
- Ácido criptoclorogénico (4-cafeilquínico).
- Ácido pseudoclorogénico (1-cafeilquínico).
- Cinarina (1,5-dicafeilquínico).
- Ácido 1,3-dicafeilquínico).

Existen también ésteres del ácido p-cumárico y del ferúlico con el ácido quínico, y no sólo con este ácido-alcohol cíclico sino que se conocen también esterificaciones de ácidos cinámicos con el ácido shikímico, 3,4-dihroxifenil-láctico, tartárico, málico, glutámico, glicina y glucosa. La cinamoilglicina es un constituyente habitual de los vegetales e incluso se cita como producto del metabolismo animal (DAKIN 1909, HOSKINS 1984).

Es de destacar por su singularidad, la presencia del ácido cinámico en las glándulas odoríferas del castor canadiense (LEDERER 1949, HOSKINS 1984). Estas glándulas contienen además ácido β -fenilpropiónico, acetofenona y otros compuestos relacionados.

La presencia en estas glándulas de este grupo de compuestos es debida probablemente a la dieta, ya que no se ha demostrado síntesis "de novo" en ninguno de ellos.

Origen biogenético

No existe un criterio unánime para explicar la biogénesis de los ácidos fenoles.

LAPARRA en 1967 propuso que los ácidos cinámicos derivan de la D-eritrosa-4-fosfato procedente del ciclo de

Calvin. Esta, con el ácido fosfoenolpirúvico, origina una cadena de 7 carbonos que se cicla espontáneamente dando lugar al ácido dehidroquinico, el cual, tras varias etapas se transforma en ácido fosfoshikímico. Su unión con el fosfoenolpirúvico dará lugar a una molécula fundamental, precursora de los ciclos aromáticos, el ácido prefénico. Este ácido, así formado, se descarboxila y pierde una molécula de agua dando lugar al ácido fenilpirúvico, apareciendo de este modo el ciclo bencénico. Tras posterior reducción y pérdida de otra molécula de agua, se forma el ácido cinámico.

La hidroxilación y metilación del núcleo aromático dará lugar a los correspondientes derivados cinámicos.

Por otra parte HOSKINS (1984), en su reciente revisión sobre los ácidos cinámicos, explica su formación a partir de la desaminación de la fenilalanina mediante el enzima PAL (fenilalanina-amonio-liasa), de amplia distribución entre las plantas superiores, los hongos y las levaduras.

Esta segunda posibilidad no es en modo alguno excluyente con la propuesta por LAPARRA, sino que incluso puede ser una alternativa biosintética en determinadas circunstancias.

CARACTERISTICAS FISICO-QUIMICAS
DE LOS COMPUESTOS POLIFENOLICOS

2. CARACTERISTICAS FISICO-QUIMICAS DE LOS COMPUESTOS POLIFENOLICOS

Antes de iniciar el estudio de la interacción de los ácidos fenoles con las proteínas plasmáticas y su comportamiento farmacocinético y farmacológico, es preciso conocer previamente las propiedades físico-químicas de estos compuestos, por lo que en primer lugar se describirán las características generales derivadas principalmente de la función fenol, para a continuación detallar las experiencias llevadas a cabo a fin de profundizar en el estudio del comportamiento del ácido cafeico en un medio fisiológico que será el habitual en posteriores experiencias.

Caracter ácido de la función fenol

En el grupo fenol libre, las formas cargadas contribuyen mucho menos al híbrido de resonancia que las formas de Kekulé, ya que la separación de cargas consume energía. En cambio, cuando el fenol se ioniza dando el ión fenóxido, las formas de resonancia de este ión con la carga en el anillo, no requieren separación de cargas, simplemente éstas se deslocalizan.

Como consecuencia se estabiliza el anión, adquiriendo la función fenol carácter de ácido débil ($pK_a = 10$). Esta acidez se modifica según la naturaleza de los sustituyentes.

Formación de puentes de hidrógeno

Los fenoles pueden asociarse tanto intra como intermolecularmente por enlaces por puente de hidrógeno, modificándose así muchas propiedades físicas.

Los enlaces que dan lugar a ciclo de 6 miembros son más fuertes que los que conducen a un ciclo de 5. En general, los fenoles tienden a formar estructuras hexagonales formadas por 6 grupos fenólicos unidos por puentes de hidrógeno, dando lugar a complejos de inclusión con gran número de moléculas orgánicas.

Formación de complejos con los metales

La formación por parte de los compuestos fenólicos de complejos con los metales por quelación (principalmente con hierro y aluminio), ha sido utilizada para el revelado de cromatogramas y la cuantificación de este grupo de sustancias. Dan lugar a espectros de absorción característicos que ayudan a su identificación (MABRY 1970). Estos complejos están presentes en la naturaleza, participando en la coloración de las flores.

En general, las agrupaciones susceptibles de formar complejos son los o-dihidroxifenoles (catecoles) y los o-hidroxicarbonilos, siendo más estables los complejos con estos últimos. Estos complejos se forman fundamentalmente a pH alcalino, existiendo una relación entre la formación del complejo y la ionización de al menos una función fenol.

Oxidación

Las transformaciones oxidativas, por vía química o enzimática, de los compuestos fenólicos dan lugar a fenómenos de pardeamiento de los tejidos vegetales (THEWLIS 1967). Su elevada capacidad de oxidación explica su utilización como antioxidantes.

La primera etapa en la oxidación de un fenol consiste en la pérdida de un átomo de hidrógeno y la formación de un

radical libre. Este radical es inestable y reacciona rápidamente con un átomo de carbono trivalente y con un electrón desapareado en posición orto o para del átomo de oxígeno. El radical así formado puede dimerizarse o reaccionar con otro radical, formando enlaces C-C, C-O u O-O. Parece ser que tanto la oxidación química como la enzimática siguen este mismo mecanismo (ESKIN 1971). Oxidaciones posteriores pueden conducir a productos de polimerización complejos de color marrón-negro, como por ejemplo en el pardeamiento de los alimentos y en la formación de la lignina.

Las fenolasas o fenol-oxidasas catalizan estas reacciones. Se han descrito dos clases: las de tipo lacasa y las de tipo tirosinasa. Estas últimas tienen dos actividades diferentes, convierten los monofenoles en difenoles (actividad creolasa) y oxidan a los difenoles (actividad catecolasa). También son responsables de la oxidación de la tirosina para dar lugar a las melaninas (RIBEREAU GAYON 1968).

2.1. ACIDO CAFEICO

Se conoce con el nombre de ácido cafeico el ácido 3,4-dihidroxicinámico, de fórmula empírica $C_9H_8O_4$ (C:60%, H:4.48%, O:35.52%) y peso molecular 180.15.

Se obtiene de soluciones acuosas concentradas en forma de cristales amarillos. Su punto de fusión se localiza entre 223-225°C. Su espectro de absorción en solución etanólica presenta tres máximos a 244, 299 y 326nm. Es poco soluble en agua fría, ligeramente soluble en éter y soluble en agua caliente, soluciones alcalinas y etanol, siendo éste último el solvente de elección (The Merck Index 10ª ed. 1983).

2.1.1. ESTUDIOS DE SOLUBILIDAD

Para el estudio de la fijación del ácido cafeico a las proteínas y de su comportamiento farmacocinético, se requiere la solubilización de este ácido fenol en tampón fosfato 0.05M pH:7.4 isotónico (KURZ 1977), cuya composición fue la siguiente:

Fosfato disódico dodecahidrato	14.397 g
Fosfato monopotásico	1.334 g
Cloruro sódico	5.570 g
Agua bidestilada c.s.p.....	1000 ml

El pH de la solución resultante se comprobó (pHmetro Corning modelo 125), corrigiéndolo si fuese preciso con solución de hidróxido sódico 3N o con ácido fosfórico concentrado.

A continuación se filtró la solución a través de membrana de celulosa Millipore (0.45 μ m Ø poro). Una vez preparado, el tampón se conservó a 4°C.

Para lograr una perfecta solubilización del ácido cafeico (Fluka AG) en el tampón fosfato, se observó que ésta se veía favorecida por inmersión en un baño de ultrasonidos (Selecta mod. 510) durante 10 minutos, ya que permite una mejor separación de las partículas del soluto, aumentando así la superficie expuesta al tampón. Además se consigue una buena agitación y un aumento discreto de la temperatura. También resulta útil llevar la solución resultante a pH final 7.4 con hidróxido sódico 3N, ya que al aumentar el pH aumenta el grado de ionización del ácido cafeico y, por tanto, su solubilidad en solventes acuosos. De este modo se logra solubilizar hasta 25 mg/ml.

Dado que los datos bibliográficos sólo refieren el espectro de absorción del ácido cafeico en soluciones alcohólicas, se procedió a la determinación de dicho espectro en solución de tampón fosfato pH 7.4, así como de la recta de calibrado para posteriores estudios cuantitativos.

El espectro U.V. (espectrofotómetro Perkin-Elmer 550S) muestra la presencia de 3 máximos de absorción a 215, 282 y 310 nm (ver espectro página número 21), escogiéndose este último para el calibrado por su mayor reproductibilidad.

El ácido cafeico disuelto en tampón sigue la ley de Beer en el intervalo de concentraciones estudiado. La ecuación de la recta, aplicando el método de los mínimos cuadrados, es la siguiente:

$$A = 80.0306C - 0.0025 \quad r = 0.9999$$

siendo "A" la absorbancia y "C" la concentración de cafeico en mg/ml. Con estos valores es posible conocer la concentración real de cafeico en solución tampón. Por ello, todas las determinaciones efectuadas se refirieron a la concentración real de las soluciones madre de ácido cafeico, medidas antes de su empleo y no a la concentración teórica. Con ello se minimizan los errores por pesada, dilución y alteración del ácido cafeico.

2.1.2. ESTUDIOS DE ESTABILIDAD

El ácido cafeico, como todos los polifenoles, es susceptible de oxidarse en solución acuosa (ver apartado 2), dando coloraciones que van del amarillo fuerte al pardo oscuro. Esta oxidación e incluso posterior polimerización se ve favorecida por el pH alcalino, la luz, la temperatura, la presencia de metales pesados o las radiaciones ionizantes.

Por tanto se creyó preciso estudiar la estabilidad de las soluciones de ácido cafeico en tampón fosfato pH 7.4. Ello se concretó en cinco apartados:

A. Estabilidad de soluciones de distinta concentración conservadas en la oscuridad a 4°C.

Las soluciones de ácido cafeico conservadas a 4°C en la oscuridad son relativamente inestables, apareciendo ligeras coloraciones a partir del segundo día. La medición espectrofotométrica en el máximo de 310 nm indica un descenso de la concentración del ácido de un 10% a los tres días. La estabilidad de las soluciones concentradas (1mg/ml) es superior a la de las diluídas (0.005 mg/ml). Concentraciones superiores a 1mg/ml deben prepararse de modo extemporáneo, pues la conservación a 4°C da lugar a cierta turbidez debida a fenómenos de precipitación.

B. Estabilidad de soluciones de distinta concentración a 37°C en la oscuridad y en agitación (condiciones de incubación para la determinación de la fijación a proteínas).

La alteración del ácido cafeico se ve efectivamente favorecida por el incremento de temperatura, resultando una disminución de la lectura a 310 nm de un 15% a las 24 horas. Por ello se optó por añadir un antioxidante a las soluciones

de ácido cafeico, tal como se indica en el apartado D. Debe añadirse que las proteínas ejercen un papel protector en la oxidación de los polifenoles por lo que, en las condiciones del incubado, la alteración será presumiblemente menor (RODRIGUEZ FARRE 1970).

C. Estabilidad en soluciones de tricloroacético 10% - tampón fosfato pH 7.4, 4:1 v/v (solvente en el caso del método de precipitación ácida empleado para la determinación de la unión a proteínas).

El ácido cafeico es estable a la concentración de 0.5 mg/ml en ácido tricloroacético (TCA) 10% - tampón fosfato pH 7.4, 4:1, al menos durante 24 horas.

D. Si la estabilidad no resultase satisfactoria, búsqueda de un antioxidante adecuado, el cual debe cumplir las siguientes condiciones:

- no interferir en la posterior lectura espectrofotométrica del ácido cafeico.
- no modificar la afinidad del ácido cafeico por la proteína.
- no influir en la acción farmacológica.

Se ensayaron dos antioxidantes, el bisulfito sódico y el ácido ascórbico. Ambos se emplearon a la concentración final de 0.1% p/v, y resultaron útiles para prevenir la alteración del ácido cafeico tanto a 4°C como a 37°C, tal como se aprecia en la figura 2.

En cuanto a las dos condiciones antes mencionadas, el ácido ascórbico produce un desplazamiento del máximo de 282 nm a 272 nm, pero no modifica la lectura a 310 nm. El bisulfito sódico no modifica la lectura en ninguno de los dos máximos anteriores.

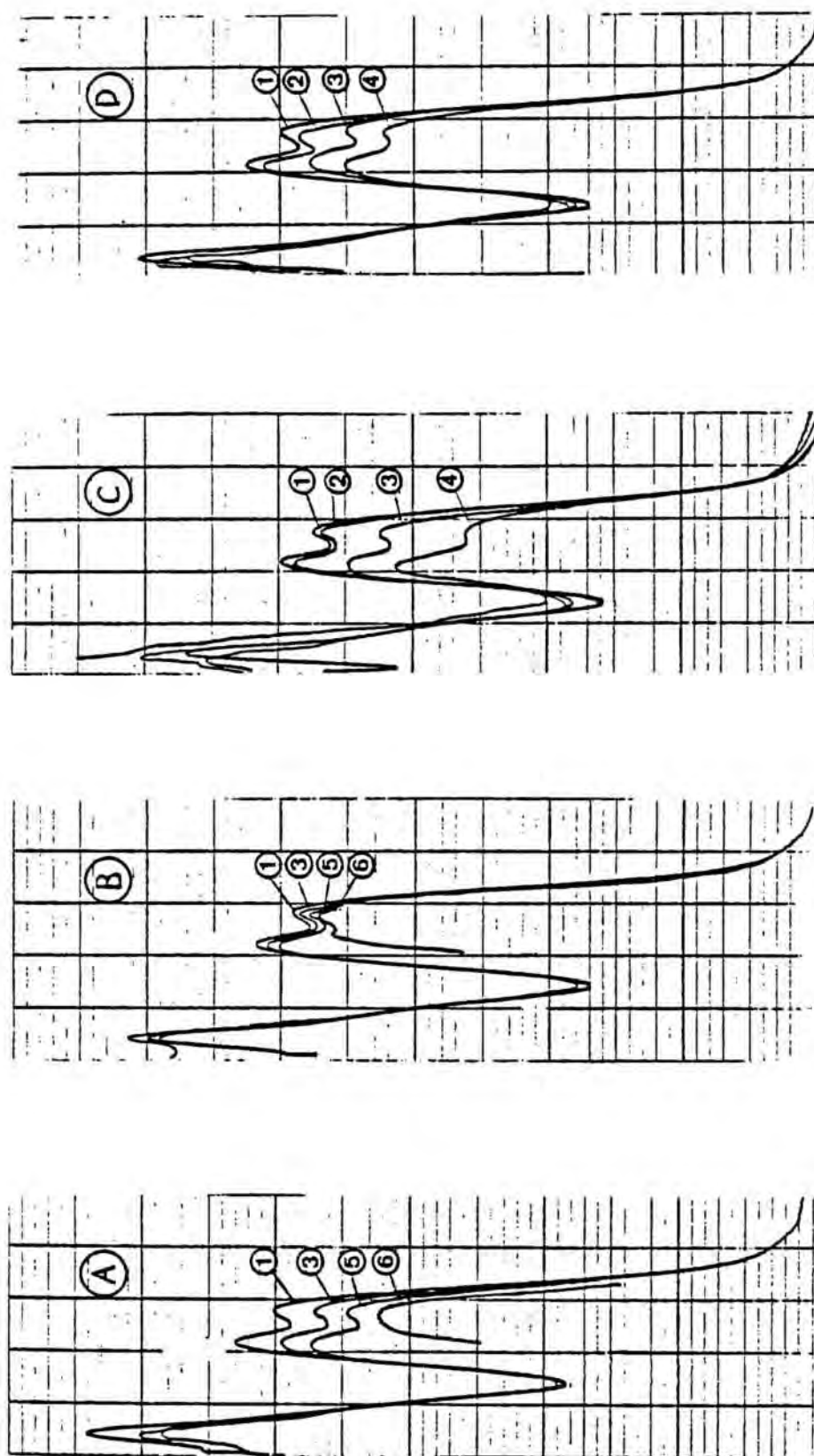


Figura 2.- Estabilidad del ácido cafeico en tampón fosfato pH 7.4

- | | | |
|---------------------------------|---------|-----------|
| A) 4°C | 1) 0 h | 5) 72 h |
| B) 4°C + Bisulfito sódico 0.1% | 2) 6 h | 6) 7 días |
| C) 37°C | 3) 24 h | |
| D) 37°C + Bisulfito sódico 0.1% | 4) 48 h | |

Se comprobó que el ácido ascórbico disminuye la afinidad del ácido cafeico por la proteína en el método de la precipitación ácida, posiblemente debido a fenómenos de competitividad. El bisulfito sódico no produjo variaciones significativas en el porcentaje de unión del ácido cafeico, por lo que se decidió su utilización como antioxidante en las experiencias posteriores.

En los estudios farmacológicos en órgano aislado, se cita una actividad contracturante del ácido ascórbico a concentraciones superiores a 25 $\mu\text{g/ml}$, lo que interfiere en la cuantificación de las respuestas (KITCHEN 1984).

A pesar de la adición de bisulfito sódico no se emplearon en ningún caso soluciones de ácido cafeico de preparación anterior a las 48 horas.

E. Estabilidad a nivel de cromatografía en capa fina.

Se realizó una cromatografía en capa fina sobre soporte de celulosa (MN - 300) del ácido cafeico libre procedente de un incubado dializado y del ácido cafeico patrón, utilizando como eluyente ácido acético al 2%. Este solvente es capaz de resolver los isómeros cis y trans de los ácidos cinnámicos.

Todo el proceso se llevó a cabo en la oscuridad. Una vez desarrollada la cromatografía, la observación de la placa a la luz U.V. (254 nm) indicó que tanto el ácido cafeico patrón como el procedente del incubado carecían de cantidades detectables a ese nivel del isómero cis-cafeico.

2.1.3. DETERMINACION DEL pKa DE LOS GRUPOS FUNCIONALES

Para conocer el grado de ionización de los grupos funcionales del ácido cafeico a los distintos valores de pH, es preciso conocer sus respectivos pKa. Dado que estos valores no aparecen en la bibliografía se procedió a su determinación experimental.

Se utilizó el método propuesto por PARKE y DAVIS (1954). Para ello se disolvieron 25 mg de ácido cafeico en 15 ml de agua destilada. Se adicionó, mediante microburetas, HCl 2N o KOH 2N, determinando el pH después de cada adición de un volumen concreto de solución valorante.

Representando gráficamente los ml añadidos frente al pH resultante, tanto para la solución de ácido cafeico como para el agua destilada, y restando la curva del solvente a la correspondiente del cafeico, se obtiene una tercera curva. Esta última curva representa la capacidad de la sustancia para ceder protones en función del pH. El punto medio de cada inflexión representa el pKa de un grupo ionizable.

Tras estos cálculos se obtuvieron los siguientes valores:

$pK_{a1} = 4.7 \pm 0.1$ para el grupo carboxílico.

$pK_{a2} = 9.2 \pm 0.1$ para el grupo p-hidroxilo.

$pK_{a3} > 10$ para el grupo m-hidroxilo.

De estos resultados se desprende que, en el intervalo de pH utilizado en todas las experiencias, el principal grupo ionizado es el carboxílico.

2.1.4. LIPOSOLUBILIDAD

La liposolubilidad de las moléculas condiciona el paso a través de las membranas biológicas por difusión pasiva. Adicionalmente, es un factor a tener en cuenta en los estudios de la interacción de los fármacos con las proteínas y plasmáticas y los tejidos en general, pudiendo dar lugar a fenómenos de acumulación.

La solubilidad en lípidos está determinada por la presencia de grupos lipofílicos o apolares en la estructura de la molécula. Los grupos alquilo son apolares, y esta propiedad es mayor al aumentar la longitud de la cadena carbonada. También contribuyen a ella los grupos aromáticos, la presencia de radicales halógeno y la sustitución de átomos de oxígeno por azufre. Cuando la sustancia contiene grupos capaces de formar puentes de hidrógeno con el agua, las propiedades lipofílicas disminuyen y aumentan las hidrofílicas. Muchos grupos funcionales incrementan las propiedades hidrofílicas, por ejemplo el grupo -OH (COHN 1971).

La solubilidad en lípidos se determina experimentalmente midiendo el coeficiente de partición de la sustancia entre una fase acuosa y un disolvente orgánico inmiscible con ella: cloroformo, ciclohexano, aceite de oliva, octanol, benceno, etc.

En el concepto de coeficiente de partición deben distinguirse dos términos, K_p y K_d , siendo K_p la relación de concentraciones de la misma especie molecular entre las dos fases líquidas en el estado de equilibrio, y siendo K_d el coeficiente de partición observado a un determinado pH, o coeficiente de partición efectivo (TAYLOR 1984). Por tanto K_p puede calcularse a partir de K_d según la siguiente

relación (TAYLOR 1984):

$$\log K_p = \log K_d + \log [1 + \text{antilog} (pK_a - pH)]$$

Si no se conoce el pK_a de la sustancia se determina el coeficiente de partición a dos pHs distintos, estableciéndose un sistema de dos ecuaciones con dos incógnitas, K_p y pK_a .

Para el ácido cafeico se determinó el coeficiente de partición efectivo octanol/tampón fosfato, pH 7.4. A partir de este valor puede calcularse K_p para cualquier pH.

Para ello se disolvió el ácido cafeico en tampón fosfato pH 7.4 a una concentración de 0.5 mg/ml. Se ajustó el pH final a 7.4 con hidróxido sódico 3N. La solución tamponada se agitó en igual volumen de octanol en embudo de decantación, hasta alcanzar el equilibrio entre ambas fases. Se determinó la concentración final en la fase acuosa, calculándose la concentración del ácido fenol en la fase orgánica por diferencia. Como término de comparación, se realizaron experiencias análogas con el ácido ferúlico y con otros solventes orgánicos como el ciclohexano y el alcohol terc-amílico, obteniéndose los siguientes resultados:

<u>Acido cafeico</u>	<u>K_d</u>
- octanol/tampón	0.0622 ± 0.0323
- ciclohexano/tampón	0.0515 ± 0.0208
- terc-amílico/tampón	0.1024 ± 0.0193
 <u>Acido ferúlico</u>	 <u>K_d</u>
- octanol/tampón	0.0555 ± 0.0051

Los valores indican una baja liposolubilidad tanto del ácido cafeico como del ácido ferúlico. Ello es debido a que a pH 7.4 ambos están ionizados. Por ello cabe esperar que las interacciones que suponen una naturaleza lipofílica de la sustancia, como son las de tipo hidrofóbico, tengan escasa importancia.

UNION A LAS

PROTEINAS PLASMATICAS

3. UNION A LAS PROTEINAS

PLASMATICAS

La capacidad de fijación a las proteínas de distintos tipos de moléculas es un fenómeno generalizado, tanto a nivel extracelular (proteínas plasmáticas), celular (membrana citoplasmática) o intracelular (estructuras intracelulares, enzimas, etc.) (GOLDSTEIN 1949).

La unión de un fármaco a las proteínas plasmáticas implica la interacción de grupos ionizados polares o no polares de la sustancia en cuestión con los grupos correspondientes de la proteína. Generalmente se trata de enlaces de tipo reversible y de energía débil, raramente covalentes (WAGNER 1983).

De este modo, las proteínas circulantes actúan como reservorio de los fármacos, cediéndolos a medida que la forma libre va desapareciendo del plasma por biotransformación o excreción. Ello se concreta en un efecto importante desde el punto de vista farmacológico, puesto que sólo se distribuye la fracción de fármaco no fijada a las proteínas, y por otro lado es origen de fenómenos de interacción. Por consiguiente, la concentración del fármaco en la biofase suele ser menor cuando éste posee una elevada afinidad por las proteínas que cuando carece de ella (PLA-DELFINA 1974).

3.1. Consecuencias de la interacción fármaco-proteína

A. DISMINUCION DE LA CONCENTRACION ACTIVA DEL FARMACO

Sólo la fracción libre de un fármaco queda disponible para su distribución tisular y posterior actividad. ANTON (1961), al estudiar la relación entre la combinación de sulfamidas con la albúmina y KUNIN (1973) en estudios análogos sobre penicilinas, indican que agentes antibacterianos de igual potencia cuando se ensayan "in vitro" en medio libre de proteínas, pueden tener distinta actividad clínica si sus afinidades por las proteínas plasmáticas difieren significativamente. Asimismo SELLERS (1973) observa que un fármaco que tenga gran afinidad por las proteínas plasmáticas, como es el caso del diazóxido, es más efectivo tras inyección intravenosa rápida que tras inyección intravenosa lenta, ya que en el primer supuesto disminuye la unión a proteínas por fenómenos de saturación.

B. MODIFICACION DE LA VIDA MEDIA DEL FARMACO

En primer lugar, la fracción de fármaco unida se comporta como un depósito, ya que no se biotransforma, constituyendo una reserva movilizable a medida que desaparece el fármaco libre (WOO 1979).

Por otra parte, la fracción fijada limita los procesos de filtración en el glomérulo renal, ya que las sustancias unidas a proteínas plasmáticas no pueden atravesar las membranas celulares (BRYSON 1982). En cambio, no limita necesariamente la secreción tubular, ya que la disociación del complejo fármaco-proteína puede ser muy rápida (DAVISON 1971).

Asimismo, la influencia sobre la velocidad de biotransformación es nula cuando los fármacos poseen una captación hepática muy elevada, mientras que ésta se ve limitada cuando dicha captación es baja (BRECKENRIDGE 1981). Este efecto sobre la prolongación de la semivida plasmática sólo adquiere importancia real cuando el porcentaje de unión a las proteínas plasmáticas es del 90% o superior (GILLETTE 1971).

C. AUMENTO DE LA SOLUBILIDAD DE LOS FARMACOS

Un fármaco muy poco soluble en agua puede disolverse bien en el plasma si se une a proteínas en una proporción elevada. Las sustancias muy lipófilas, tales como los hidrocarburos, pueden vehicularse en forma unida a las lipoproteínas plasmáticas (ESPLUGUES 1982).

D. FENOMENOS DE COMPETICION

La administración simultánea de dos fármacos con idéntico sitio de fijación puede dar lugar a fenómenos de competición, pudiendo así aumentar la fracción libre de uno de los dos o de ambos, conduciendo por tanto a un aumento de sus efectos farmacológicos (GOODMAN 1981), como es el caso de los anticoagulantes o hipoglucemiantes orales al ser administrados conjuntamente con el ácido salicílico, sulfonamidas o fenilbutazona (SOLOMON 1968, TILLEMENT 1973 y CROOKS 1973).

Las consecuencias del desplazamiento dependen del porcentaje de unión del fármaco a las proteínas plasmáticas (aparte de su mayor o menor índice terapéutico).

La competición también puede tener lugar entre un fármaco y una sustancia endógena. Un ejemplo de la importancia práctica de este fenómeno es el desplazamiento de la bilirrubina no conjugada por las sulfonamidas y salicilatos (STERN 1972).

3.2. PROTEINAS PLASMATICAS: ALBUMINA

El plasma sanguíneo es una solución concentrada de proteínas que tienen por misión: el mantenimiento de la presión oncótica, transporte de sustancias, defensa del organismo, coagulación, fibrinólisis y el ser precursores enzimáticos.

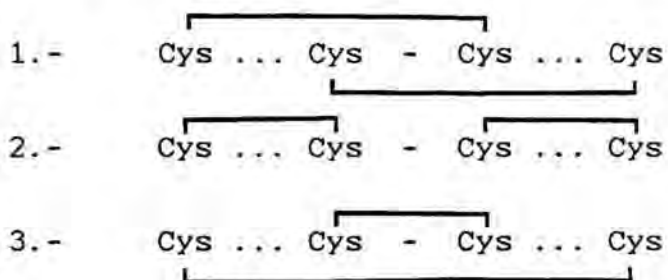
Seroalbúmina

La albúmina es la más homogénea, soluble y estable así como la de mayor velocidad electroforética de todas las fracciones de las proteínas plasmáticas. Está constituida por una sola cadena polipeptídica, insoluble en soluciones de hiposulfito sódico superiores a 44 g% o de sulfato sódico superiores a 27 g%. Su punto isoeléctrico es de 4.9, por lo que a pH fisiológico presenta una carga negativa neta. Su peso molecular es de 69,000. Posee escasa disimetría molecular, siendo su eje longitudinal de $150 \text{ \AA}$ y el transversal de $38 \text{ \AA}$ (GRAS 1967).

Constituye el 60-65% de las proteínas plasmáticas en un individuo sano, en el cual la relación albúmina/globulinas es siempre mayor de 1.3. Su concentración normal en el plasma oscila entre 35 y 50g/l, siendo ligeramente superior en el hombre que en la mujer. Su biosíntesis es totalmente hepática, mientras que su catabolismo puede producirse en la mayor parte de los tejidos. Su semivida plasmática es de 10-18 horas, calculándose una tasa de recambio del orden de un 7% diario. A pesar de su tamaño, no está exclusivamente presente en el plasma, sino que puede encontrarse también en el hígado, bazo, intestino, músculo y piel (JUSKO 1976).

La secuencia aminoacídica de la seroalbúmina humana (SAH) fue dilucidada simultáneamente por BROWN y MELOUN en 1975. Ambos encontraron que constaba de 585 aminoácidos y,

La estructura tridimensional de la albúmina viene influenciada y estabilizada, en gran medida, por 17 puentes disulfuro. Un rasgo característico es la presencia de dos grupos cisteinil vecinos a lo largo de toda la secuencia. SABER y col. (1977) estudiaron la distribución de los puentes disulfuro y concluyeron que se encontraban dispuestos en grupos de dos puentes adyacentes distribuidos uniformemente por toda la molécula, excepto en la parte más cercana al N-terminal, que poseía únicamente un puente disulfuro. Este modelo es análogo al propuesto para la seroalbúmina bovina. Los grupos de dos puentes disulfuro pueden disponerse de tres modos:



Actualmente se descarta la posibilidad 3. Sin embargo, la distinción entre 1 y 2 no se ha llevado a cabo aún. BROWN construyó su modelo de acuerdo con la posibilidad 1.

Seroalbúmina bovina

La estructura de la seroalbúmina bovina (SAB) ha sido estudiada por BROWN (1975), quien determinó la secuencia aminoacídica de la cadena, de 582 restos aminoacídicos y cuya representación aparece en la página siguiente.

Posee un grupo sulfhidrilo aislado en la misma posición que la SAH (34). Por otra parte, difiere de ésta última al poseer dos restos triptófano en las posiciones 134 y 212. La SAB tiene asimismo, ocho pares de puentes disulfuro y uno

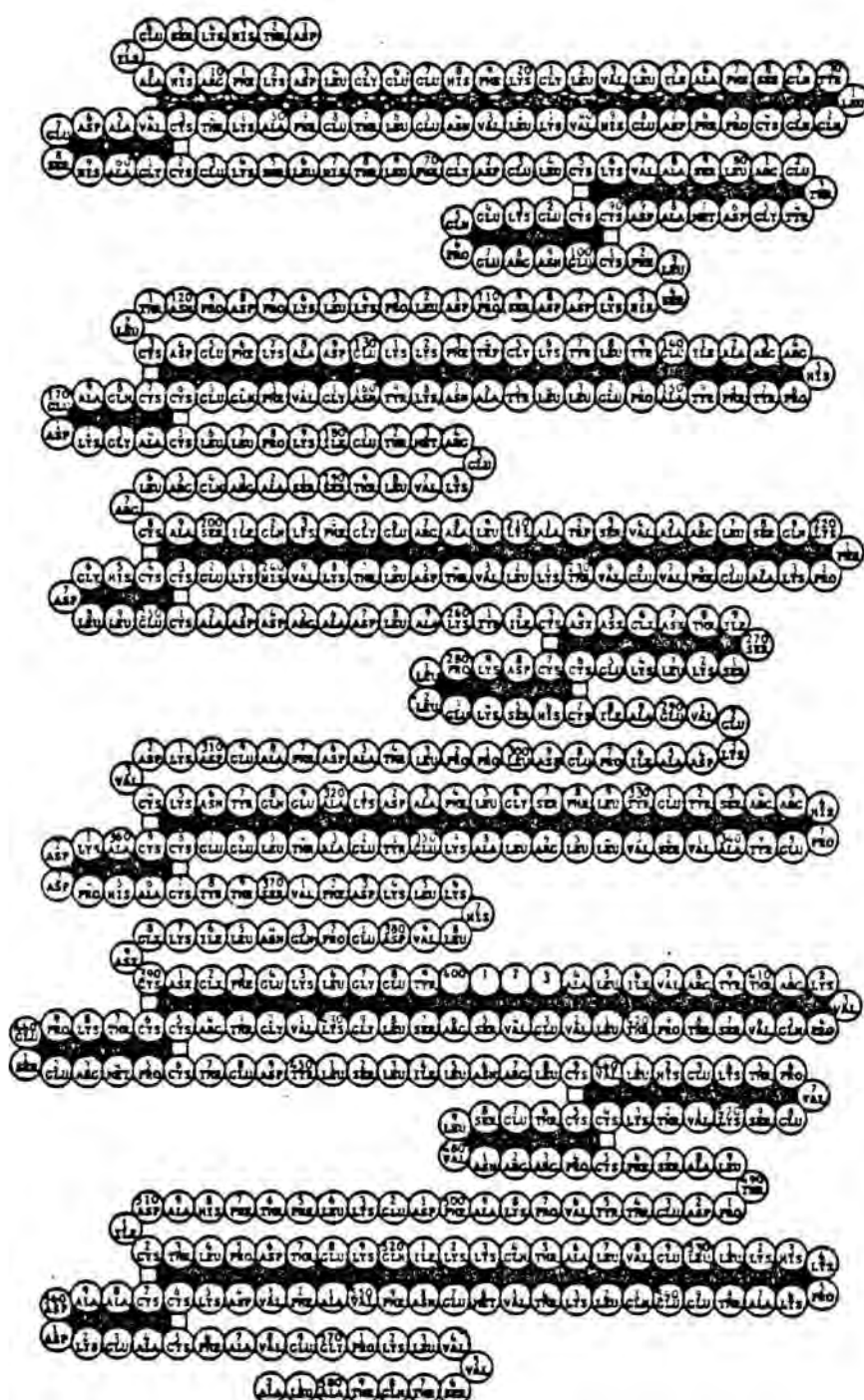


Figura 4.- Secuencia de la Seroalbúmina bovina, según BROWN (1975).

aislado, dispuestos de forma análoga a la proteína humana. En ambas especies se ha perdido el residuo cisteína próximo al N-terminal. BROWN comparó las secuencias de ambos tipos y las diferencias observadas son de naturaleza estructuralmente conservadora. Así por ejemplo, un aminoácido hidrofóbico se ve sustituido por otro de la misma naturaleza y no por uno de carácter polar.

Según la distribución de los puentes disulfuro y la secuencia aminoacídica, la SAB puede dividirse en tres dominios homólogos. Cada dominio se subdivide a su vez en dos subdominios (A-B y C), cada uno de los cuales está constituido por tres hélices (x, y, z), tal como aparece a continuación:

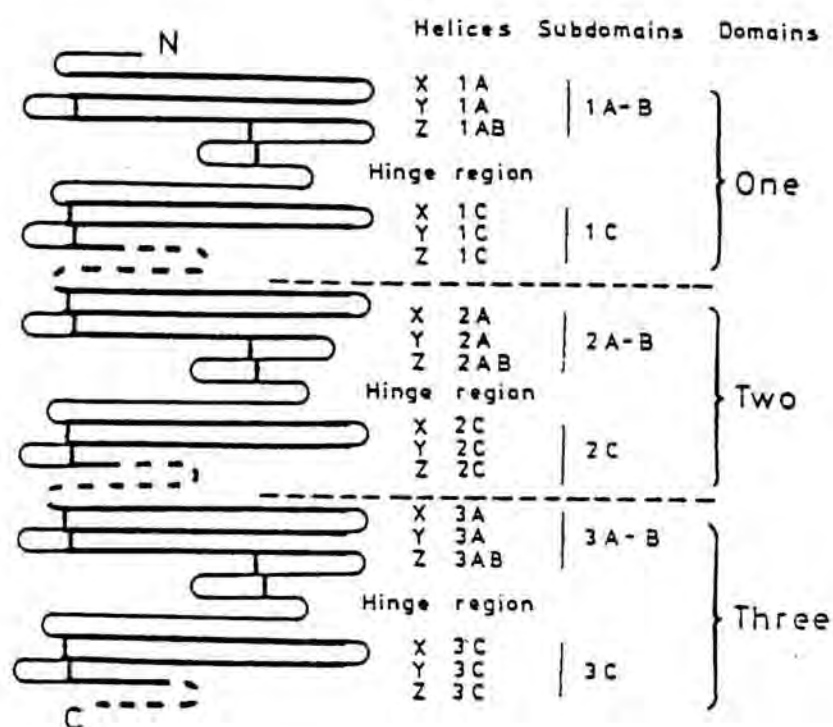


Figura 5.- Organización estructural de la Seroalbúmina, propuesta por Brown (1977).

La SAH tiene una estructura similar. Existen homologías importantes entre la secuencia de los dominios 1 y 2 y no tan marcadas si se comparan 1-3 y 2-3. La mayoría de los péptidos que conectan dos dominios están constituidos por hélices en alfa, mientras que los fragmentos que conectan dos subdominios son principalmente no helicoidales. La flexibilidad de la albúmina se debe probablemente a cambios conformacionales en las zonas que unen dos dominios o subdominios. Según este esquema, se han construido modelos espaciales de la seroalbúmina, en los cuales se contempla la presencia de aminoácidos polares en las zonas más externas e hidrofóbicos en las internas.

Especificidad de unión

Dado que la albúmina puede unirse a una gran cantidad de compuestos muy distintos entre sí, tradicionalmente se ha creído que su capacidad de unión era de tipo inespecífico. Sin embargo, hay evidencias de la existencia de al menos seis regiones de unión diferentes (KRAGH-HANSEN 1981). Las regiones 1,4 y 5 parecen tener una mayor especificidad de unión que las restantes. Únicamente los ácidos grasos de cadena larga se unen a la región 1 con una elevada afinidad, pero las características de la unión varían al sustituir el grupo carboxilo por otros como sulfato o sulfonato (RAY 1966). Los iones metálicos y hemina se unen con preferencia a las regiones 4 y 5 respectivamente. Las regiones 3 y 6 parecen intervenir en la interacción con distintos compuestos aromáticos, mientras que las moléculas alifáticas e inorgánicas se unen con una menor afinidad. Al parecer, la región 2 es la que muestra una especificidad menor en sus asociaciones con los compuestos aromáticos, alifáticos de cadena corta e inorgánicos, además de ser, probablemente, un lugar de unión secundario para los ácidos grasos de cadena larga.

Pequeños cambios en la estructura de los ligandos provocan grandes variaciones en la interacción con la proteína. Incluso existen diferencias en la unión de distintos isómeros (LAVIE 1979).

Unión covalente a la albúmina

Como se ha indicado, tanto la SAH como la SAB poseen un grupo sulfhidrilo en posición 34, que únicamente se muestra reactivo en el 60% del total de los grupos sulfhidrilo en una solución de proteína no desengrasada y en el 40% en albúmina desengrasada. El resto se halla bloqueado por unión covalente a cisteína o glutatión. También puede unirse mediante enlace covalente, formando puentes disulfuro, con otras sustancias o incluso con los cationes Ag^+ y Hg^+ .

La D-glucosa, a concentraciones de orden milimolar y durante horas o días de incubación con SAH produce la glucosilación de la proteína al reaccionar, probablemente, con los grupos amino de los restos lisina. Se ha encontrado albúmina glucosilada como constituyente normal del suero (DAY 1979).

Existen otros ejemplos de unión covalente a la seroalbúmina como son la de la prostaglandina H_2 o la del tromboxano A_2 (MACLOUF 1980). El ácido acetilsalicílico se une covalentemente al resto lisina 199, así como muchas penicilinas acetilan grupos ϵ -amino de la lisina y grupos imidazol de la histidina por reacción con el anillo β -lactámico.

Cambios conformacionales

La interacción entre la albúmina y distintos ligandos se acompaña a menudo de cambios conformacionales de la pro-

teína. Una consecuencia de ello es la estabilización de la albúmina, la cual se traduce en una mayor resistencia frente a la digestión enzimática y a los agentes desnaturalizantes como son el calor y la urea (MARKUS 1967).

La cooperatividad y el antagonismo son otras de las manifestaciones de los cambios conformacionales inducidos por ligandos. La cooperatividad puede ser homotrópica (unión de ligandos idénticos) o heterotrópica.

No se conoce qué porción de la albúmina está implicada en estos cambios conformacionales. La unión de ligandos aniónicos da lugar a una estructura más compacta y/o a la restricción de los grados de libertad de los grupos de la molécula de la albúmina, especialmente, en la vecindad de los lugares de unión. Ello puede ser la causa de la menor tendencia al ataque proteolítico. La unión de ligandos catiónicos, por el contrario, parece conferir al complejo una estructura más laxa (KRAGH-HANSEN 1981).

Se han propuesto dos teorías sobre la influencia de la unión de los ligandos en la conformación de la albúmina:

- a) La albúmina en solución no sería una agrupación de moléculas idénticas, sino un conjunto de proteínas isoméricas de aproximadamente igual energía y en equilibrio termodinámico entre ellas. Al añadir un ligando, éste interaccionaría con la forma isomérica que dé lugar a un complejo más estable.
- b) La flexibilidad de la molécula de la albúmina es muy pronunciada, por lo que el ligando sería capaz de modificar la conformación de la región de unión durante el proceso de fijación ("adaptabilidad" de la albúmina).

Parece ser que esta segunda teoría es la que presenta una mayor concordancia con los conocimientos actuales sobre el proceso de fijación (KRAGH-HANSEN 1981).

Pero los cambios conformacionales de una proteína en solución no tienen lugar únicamente por efectos de un ligando, sino que también pueden ser causados por variaciones de pH. La habilidad de los átomos de hidrógeno de los enlaces peptídicos de intercambiarse con deuterio o tritio es una demostración de las continuas fluctuaciones que sufre esta molécula. BENSON y col. (1964) estudiaron los intercambios hidrógeno-deuterio de la SAB a diferentes valores de pH. Observaron la existencia de cuatro clases distintas de átomos de hidrógeno en la proteína: una de átomos que se intercambian con tal rapidez que es imposible seguir la reacción con técnicas como la espectroscopía de infrarrojos, otros dos de átomos de intercambio lento ($K = 10^{-3} \text{ seg}^{-1}$ y $3 \times 10 \text{ seg}^{-1}$, respectivamente) y una cuarta de átomos de intercambio muy lento. A pH 5, el número de átomos de hidrógeno no intercambiados es mayor, y éste se mantiene constante entre pH 5.0 y 6.4. Parece ser, pues, que la albúmina es más compacta y estable en ese intervalo de pH. A valores de pH superiores a 6.4 e inferiores a 5.0, la reducción del número de átomos de hidrógeno de intercambio muy lento va acompañado de un incremento del número de átomos de intercambio muy rápido.

3.3. METODOLOGIA EXPERIMENTAL APLICADA AL ACIDO CAFEICO

Se ha realizado el estudio "in vitro" de la fijación del ácido cafeico y otros ácidos cinámicos a la SAB (MERCK). Este estudio requiere la incubación de los distintos ligandos con la proteína.

3.3.1. ENSAYOS PREVIOS DE INCUBACION

Para la preparación de la solución de SAB, se añadió ésta al tampón fosfato 0.05M, pH 7.4, isotónico, a una concentración final del 8%. La completa disolución de la proteína se obtuvo manteniendo la mezcla en un baño a 37°C.

Paralelamente se disolvió en ácido cafeico en el mismo tampón a fin de obtener una concentración doble a la sujeta a estudio. Para favorecer la solubilización, se emplearon ultrasonidos durante 10 minutos. A esta solución se añadió bisulfito sódico como antioxidante a una concentración del 0.1%. Como el pH de la solución es ligeramente ácido a pesar de estar tamponada, se ajustó éste a 7.4 con NaOH 3N. Las soluciones así preparadas se conservaron a 4°C, en frascos tapados, antes de su uso.

Los incubados se realizaron añadiendo cantidades iguales de la solución proteica y de la del ácido fenol en tubos de vidrio cerrados, obteniendo una concentración final de albúmina del 4% (concentración fisiológica). La mezcla se mantuvo a 37°C, en la oscuridad y con agitación moderada y constante.

Con la finalidad de determinar el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio en la fijación del ácido cafeico a la SAB, se determinó el % de ácido cafeico unido según el tiempo de incubación.

Se preparó un incubado con una concentración final de ácido cafeico y de SAB de 0.5 mg/ml ($2.77 \times 10^{-3}M$) y 4% respectivamente. Se extrajeron 0.5 ml a los tiempos siguientes: 0, 0.5, 1, 2, 4, 6, 16, 23, 24 y 30 horas. Las muestras se procesaron por el método de precipitación ácida tal como se indica en el Apartado 3.3.2.4.

Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente gráfica. En ella puede apreciarse que el equilibrio se alcanza prácticamente a las 24 horas. Cada punto corresponde a la media de tres resultados.

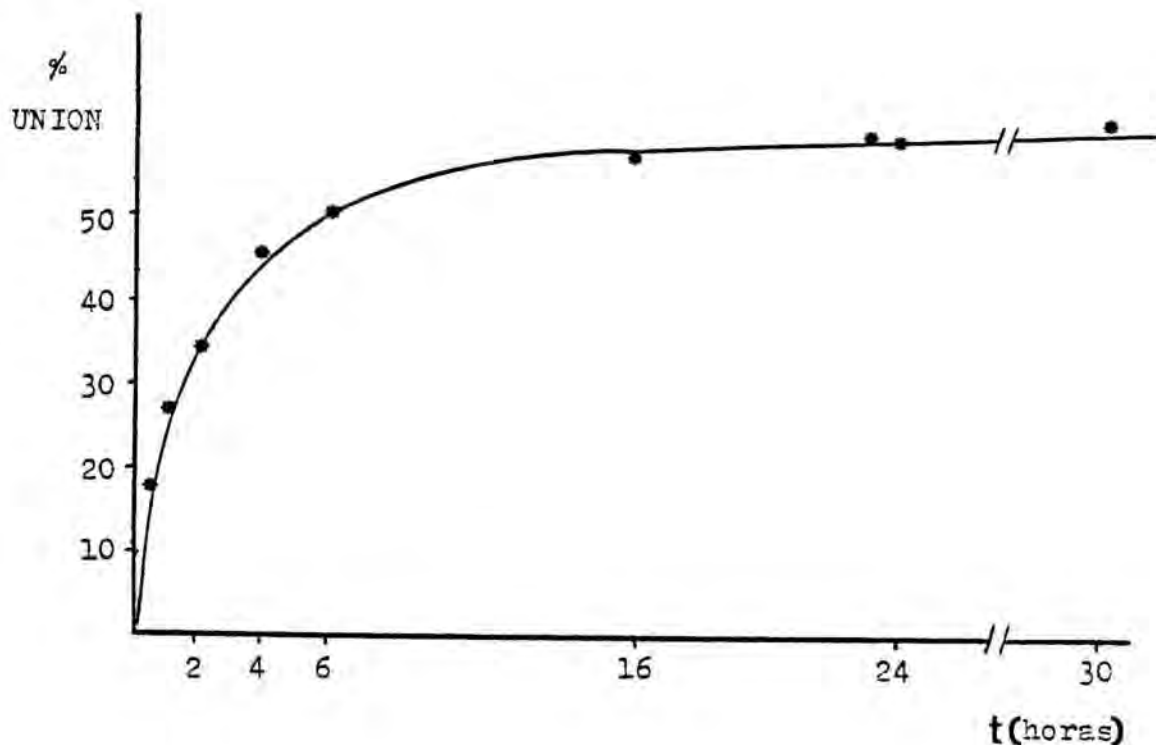


Figura 6.- Curva de fijación del ácido cafeico a la SAB en función del tiempo.

3.3.2. DETERMINACION DE LA FIJACION DEL ACIDO CAFEICO A LA SEROALBUMINA BOVINA

Las técnicas empleadas en el estudio de la interacción fármaco-proteína pueden resumirse en dos grandes grupos:

- a) Métodos de equilibrio: Se basan en la medición de cambios en la concentración de ligando como resultado del establecimiento de un equilibrio de unión. Este grupo incluye:
- Diálisis de equilibrio.
 - Ultrafiltración; dialfiltración.
 - Gel-filtración.
 - Precipitación ácida.
 - Electroforesis.
 - Bioensayo.
- b) Métodos directos: En éstos se miden los cambios de una propiedad del fármaco, de la proteína o del complejo, durante el proceso de unión. Entre ellos pueden citarse:
- Espectrofotometría diferencial.
 - Cambios en las propiedades físicas de las soluciones.
 - Dispersión óptica rotatoria.
 - Dicroísmo circular.
 - Cambios de fluorescencia.
 - Resonancia magnética nuclear.

En el caso del ácido cafeico, se han utilizado los métodos de equilibrio, que se exponen a continuación.

3.3.2.1. GEL-FILTRACION

La Gel-filtración es un método de fraccionamiento en el cual la separación está basada, en su mayor parte, en las diferencias del tamaño molecular. Las partículas integrantes del gel, embebidas en el solvente, forman unos retículos en los cuales pueden penetrar los solutos de menor tamaño, mientras que las moléculas de mayor diámetro, quedan en el solvente extragranular, apareciendo antes en el eluato. Así el fármaco unido a la proteína eluirá antes que el fármaco libre (HUMMEL 1962).

La naturaleza química de la matriz del gel tiene importancia, únicamente, en cuanto determina la imbibición y, con ello, indirectamente la penetrabilidad. El tipo de gel más comúnmente usado es el conocido por Sephadex G. Se trata de polímeros de dextrano unidos por epiclorhidrina. Son fuertemente hidrófilos, por lo que se utilizan en medios acuosos. Otros geles empleados son los de poliacrilamida, agarosa y mixtos (FRERE 1981).

Para el ácido cafeico se utilizó Sephadex G-25 (Pharmacia Fine Chemicals) en una columna de 70 x 2.6 cm. Previamente al empaquetado de ésta, se desengrasó con etanol durante 48 horas. El Sephadex G-25 debe hincharse en presencia de agua o de tampón. Para ello, se vierte el polvo sin agitar sobre el eluyente en exceso. El tiempo de hinchamiento es de 1 hora a 100°C o 3 horas a 20°C. Se realizó en caliente para evitar la contaminación microbiana. Se lava con el tampón que se utilizará como eluyente, y se decanta el exceso una o dos veces. Se deja enfriar hasta la temperatura en que se realizará la experiencia, y se derrama la suspensión por las paredes de la columna. El lecho se estabiliza, eluyendo con un volumen de tampón fosfato equivalente al de 2 o 3 columnas. El flujo se reguló a 3 ml/min. El correcto empaquetado de la columna se comprobó con Blue-Dex-

tran 2000 (Pharmacia Fine Chemicals) al 0.2% (FLODIN 1961).

Para la aplicación de la muestra resultante del incubado, se drena la superficie del lecho y se coloca ésta sobre el aplicador. Se deja embeber por el gel, lavándose con una pequeña alícuota de tampón fosfato, antes de empezar la elución.

Calibrado de la columna

Para conocer el volumen de elución, tanto de la albúmina como del ácido cafeico, se procesó una muestra constituida por 1.5 ml de la solución de SAB (8%) y 1.5ml de solución de ácido cafeico (1mg/ml). Con ello se comprueba además si la separación de los eluatos es suficiente. Se empleó un flujo constante de tampón fosfato pH 7.4 de 3 ml/min. Se recogieron fracciones del eluato de 20ml cada una en un colector de fracciones. El proceso tuvo lugar a 20°C. La determinación de la presencia de albúmina en el eluato se hizo por lectura espectrofotométrica a 280nm. El ácido cafeico se leyó en el máximo de 310nm. Los resultados obtenidos se representan en la figura de la página siguiente. Se calculó la recuperación del ácido cafeico midiendo la cantidad recogida entre los 600 y 860ml, resultando ser del 95.23% Este dato debe ser tenido en cuenta en el cálculo de la fracción libre.

Procesado de las muestras

Se aplicaron 3ml del incubado a la columna, como ya se ha descrito, eluyendo a continuación con tampón fosfato pH 7.4. Se recogió el eluato entre los 600 y 860ml, determinándose la concentración del ácido cafeico libre en el máximo de 310nm.

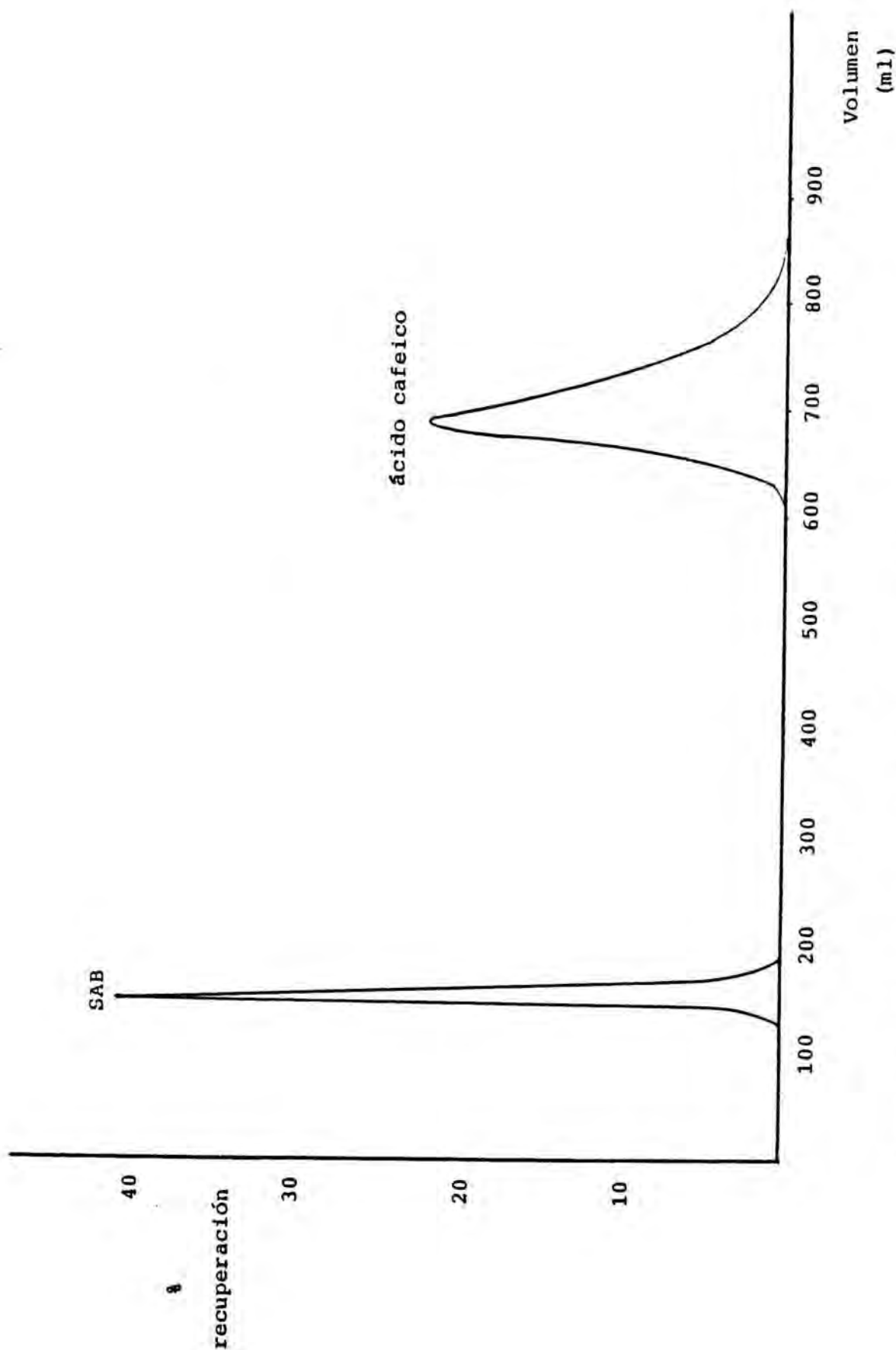


Figura 7.- Elución del ácido cafeico y la SAB por Gel-Filtración en Sephadex G-25.

Valoración del método

A pesar de ser un método tradicionalmente utilizado en los estudios de fijación a proteínas, éste presenta diversos inconvenientes:

- Uno de ellos es la elevada dilución del ligando libre en el eluato, por lo que se requiere una técnica de detección lo suficientemente sensible.
- En segundo lugar, este método sólo permite procesar una muestra cada vez.
- Por último, la separación del ligando libre del complejo fármaco-proteína, desplaza el equilibrio alcanzado en el proceso de incubado, liberándose de este complejo las uniones no específicas durante la filtración.

3.3.2.2. ULTRAFILTRACION

Consiste en la separación de las moléculas de soluto libre de las del complejo fármaco-proteína por filtración, a través de una membrana semipermeable, haciendo uso del vacío, de la presión o de la fuerza centrífuga. Las moléculas del complejo quedan retenidas por la membrana. Conociendo la concentración del fármaco a t_0 y la presente en el ultrafiltrado a t_1 , se puede calcular el porcentaje de unión (SPECTOR 1972).

Los dispositivos de ultrafiltración varían según el tipo de membrana utilizada (plana, cónica, etc.) y las condiciones de vacío, centrifugación o presión (generalmente nitrógeno a razón de 1-4 Kg/cm²).

En la ultrafiltración normal, al igual que en la gel-filtración, la solución proteica se concentra al filtrarse la fracción no proteica, lo cual modifica el equilibrio de unión. Para evitarlo se ha desarrollado la técnica de la dialfiltración. En ella la solución proteica se coloca en la célula de filtración, mientras que la solución del ligando se dispone en un reservorio aparte conectado a la célula. Al aplicar presión sobre el reservorio, por cada gota de la solución de ligando que entra en la célula sale una gota de ultrafiltrado de ella, manteniendo así el volumen constante.

Otra variante consiste en colocar en la célula la solución de fármaco-proteína y en el reservorio el solvente.

Si se utiliza el primer sistema, la concentración del ligando en el ultrafiltrado aumenta con el volumen hasta llegar a un máximo, en el cual se estabiliza. Una vez al-

canzado este punto, el cálculo de la fracción unida corres
ponde a la relación:

Fracción unida = fármaco total -(fármaco en el ultrafil-
trado + fármaco libre en la célula).

$$\text{Fracción unida} = V_f C_r - V_f C_f - V_m C_n$$

siendo,

V_f = volumen total del ultrafiltrado.

V_m = volumen de la muestra en la célula (constante).

C_r = concentración de fármaco en el reservorio.

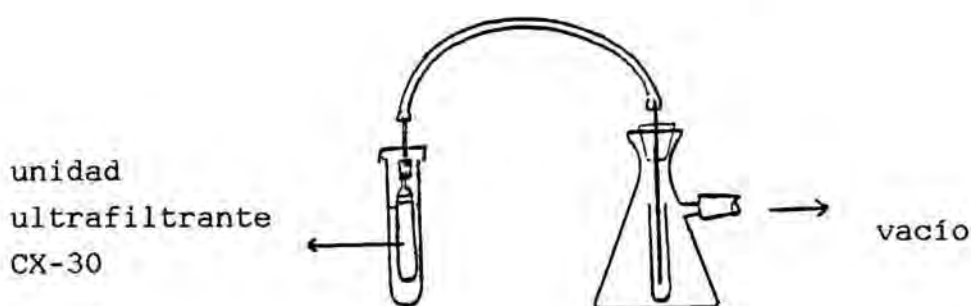
C_n = concentración de fármaco en la última fracción
recogida del filtrado.

C_f = concentración media de las distintas fracciones
del filtrado.

Ya que posteriormente se llevó a cabo con el ácido
cafeico el método de la diálisis de equilibrio, en el caso
de la ultrafiltración se siguió el sistema normal de fil-
tración por vacío.

Procesado de las muestras

Se colocaron 3 ml de incubado en un tubo de vidrio en
el que se sumergió una unidad ultrafiltrante Millipore CX-
-30, conectada a un sistema de vacío (bomba de vacío tipo
Torricelli) según el esquema siguiente:



Una vez puesta en marcha la bomba, el incubado se dejó ultrafiltrar durante 2 horas, tiempo suficiente para recoger en el tubo colector 200 μ l. La disminución del volumen del incubado no fue nunca superior al 20%, por lo que el efecto de concentración de la proteína no induce a error (KURZ 1977). El ultrafiltrado se leyó espectrofotométricamente a 310 nm. Todas las experiencias se llevaron a cabo a temperatura ambiente.

Rendimiento del método

Cuando se ultrafiltra una solución libre de proteínas, la concentración de ciertas sustancias puede ser menor en el ultrafiltrado que en la solución inicial. Ello se debe a fenómenos de adsorción o retención. Estos últimos afectan fundamentalmente a fármacos de elevado peso molecular, dado que su tamaño dificulta su paso a través de los poros de la membrana (WANG 1969).

Por todo ello se estudió la recuperación del ácido cafeico a partir de soluciones libres de proteína, en las mismas condiciones del procesado de los incubados. Para una concentración de ácido cafeico de 0.5 mg/ml se obtiene

una recuperación del 98%, dato que ha sido tenido en cuenta en todos los cálculos de la fracción libre por este método.

Valoración del método

VENTAJAS:

- A. Es una técnica rápida, ya que permite el procesado de la muestra en un tiempo no superior a 2 horas. Ello es de especial interés en sustancias que se alteran fácilmente en solución.
- B. Es el método de mayor rendimiento en las condiciones experimentales utilizadas.
- C. Los resultados muestran poca dispersión.

INCONVENIENTES:

- A. La concentración de proteína aumenta durante la filtración, por lo que podría existir un desplazamiento en el equilibrio de unión. Sin embargo, tal como se han realizado las experiencias, si el ultrafiltrado supone un volumen relativamente pequeño con respecto al total, este efecto se minimiza. Ello puede evitarse utilizando la dialfiltración, aunque con este método se diluye notablemente el ultrafiltrado, por lo que la sensibilidad de la lectura del ácido cafeico se convierte en un factor limitante.
- B. El fármaco ultrafiltrado deja de estar en contacto con la solución proteica, con todas las consecuencias que ello representa en el equilibrio de fijación.

3.3.2.3. DIALISIS DE EQUILIBRIO

Las proteínas globulares en solución, o bien los complejos que forman éstas con los fármacos, pueden separarse fácilmente de los solutos de bajo peso molecular por diálisis, en la que se utiliza una membrana semipermeable que retiene las moléculas de proteína y de complejo, permitiendo que las moléculas pequeñas de soluto y de agua la atraviesen libremente.

Este método es probablemente el más utilizado en los estudios de fijación de fármacos a proteínas. Se basa en la obtención de un equilibrio entre un volumen dado de solución proteica dentro de un saco de diálisis y una solución de volumen y concentración conocida del fármaco fuera de él, o bien entre la solución fármaco-proteína en el interior del saco y el solvente libre de fármaco en el exterior. Una vez alcanzado el equilibrio, la medida de la concentración de fármaco libre fuera del saco de diálisis permite calcular la cantidad libre y, por diferencia, la unida a la proteína (McMENAMY 1968).

Las membranas de diálisis suelen ser de tipo celofán, con un diámetro de poro de alrededor de 2.4 nm. Inicialmente contienen glicerina, trazas de compuestos sulfurados e iones metálicos, por lo que precisan de un acondicionamiento previo a su utilización (FRERE 1981).

Procesado de la muestra

En el caso del ácido cafeico se utilizaron tubos de celofán (tipo Visking) nº 8/32, tratados previamente con solución acuosa de EDTA disódico, lavando posteriormente con solución agua-cloroformo, y equilibrando finalmente

con tampón fosfato 0.05M, pH 7.4, isotónico, a 4°C, durante un período no inferior a 2 horas. Las membranas fueron manipuladas en todo momento con guantes de tipo quirúrgico.

Las experiencias se realizaron colocando 2 ml del incubado dentro del saco de diálisis, frente a 5 ml de tampón fosfato, en tubos de vidrio con tapón de rosca. Se dejó dializar la solución a 4°C en la oscuridad, hasta la obtención del equilibrio.

Las lecturas se realizaron a partir del líquido exterior del saco de diálisis en el máximo de 310 nm. También se midió en cada caso el incremento de volumen del interior del saco, que resultó ser de un 20%, por término medio, debido al efecto Donnan.

Curva de salida del saco de diálisis

A fin de conocer el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio de dialización, se realizó una curva de salida del saco de diálisis. Para ello se preparó un incubado de una concentración de cafeico de 5 mg/ml, del cual se dializaron 2 ml. Se utilizó una solución de cafeico de concentración elevada, para que la retirada de pequeños volúmenes a distintos tiempos modificara mínimamente la concentración total. Del compartimento exterior se fueron extrayendo cantidades alícuotas a las 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10 y 72 horas, no excediendo su suma el 2% del volumen exterior, para no modificar significativamente el equilibrio entre ambos compartimentos. Los resultados obtenidos aparecen en la figura de la página siguiente.

Puede observarse que se ha alcanzado el equilibrio aproximadamente a las 5 horas, tiempo al que se realizaron las posteriores determinaciones.

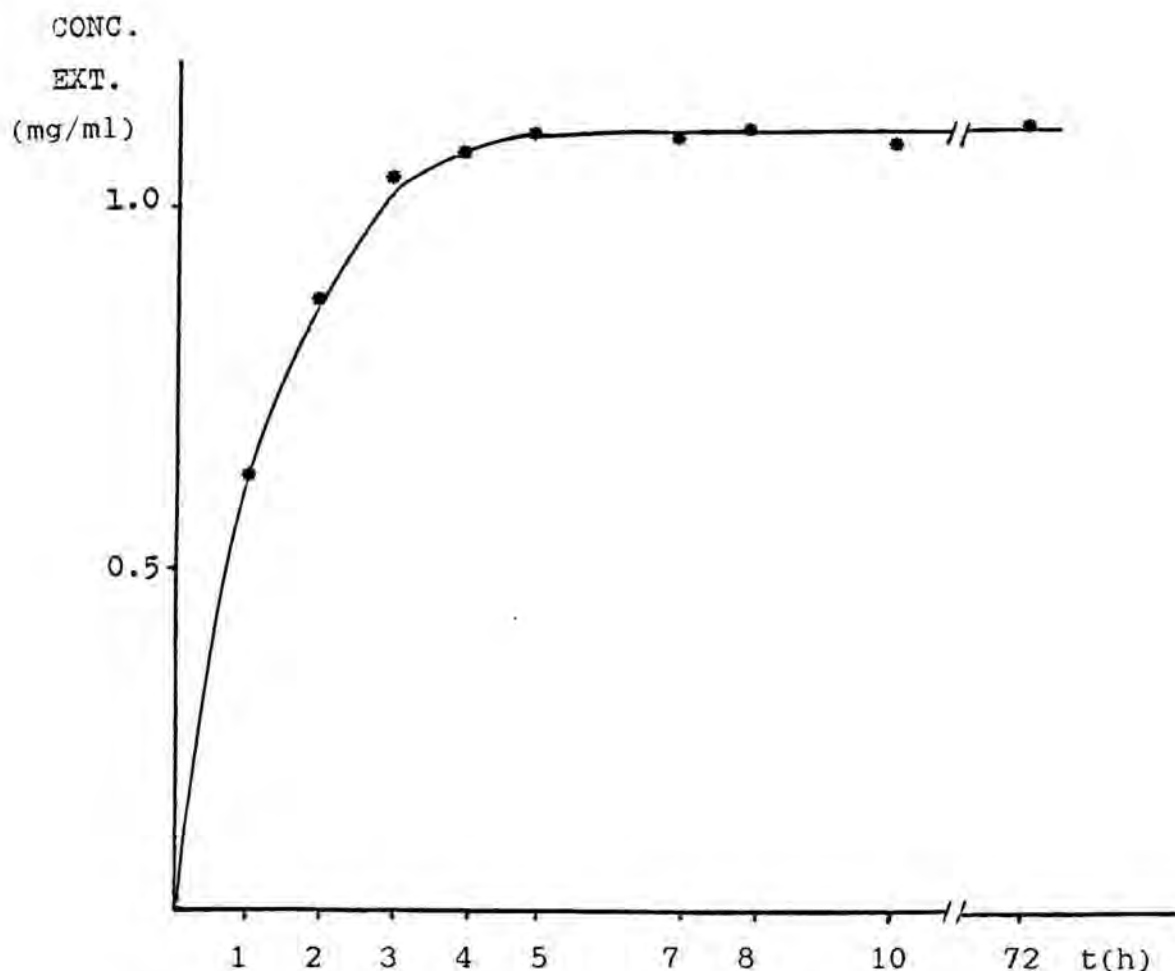


Figura 8.- Curva de salida del ácido cafeico del saco de diálisis, en función del tiempo.

Rendimiento de la dialización

Se asume que la concentración de fármaco libre en el compartimento exterior y en el interior del saco de diálisis son iguales cuando se ha alcanzado el equilibrio. Sin embargo, muchos fármacos pueden unirse a las membranas semipermeables o a los aparatos de dialización, reduciendo la concentración aparente del fármaco libre. Incluso pueden existir variaciones según el método de preparación y las condiciones de almacenaje de las membranas. Esta adsorción

inespecífica suele ser inferior al 10%, pero en algunos casos puede aumentar, constituyendo una importante fuente de error. Por ello es preciso llevar a cabo estudios preliminares para generar un factor de corrección aplicable a los posteriores resultados obtenidos con las soluciones proteicas (BRIGGS 1983).

Se dializaron soluciones de ácido cafeico, libres de proteína, de concentraciones entre $4.16 \times 10^{-5} \text{M}$ y $6.94 \times 10^{-2} \text{M}$, las mismas que posteriormente se emplearon en el Apartado 3.3.4.. Para ello se dispusieron 2ml de cada solución dentro del saco de diálisis frente a 5ml de tampón fosfato. Al cabo de 5 horas se determinó la concentración de ácido cafeico en el compartimento exterior, calculándose el porcentaje que suponía respecto a la concentración teórica si ésta fuese igual en ambos compartimentos. Este porcentaje (rendimiento de dialización) osciló entre el 66% y el 90%, según la concentración. Midiendo las concentraciones dentro y fuera del saco de diálisis, se concluyó que la causa principal de la disminución del rendimiento era la adsorción del ácido cafeico a la membrana de diálisis. Por ello, todas las determinaciones posteriores por el método de la diálisis de equilibrio, se realizaron frente a blancos (por duplicado) de la concentración de ácido cafeico estudiada, corrigiendo el valor de la concentración de la fracción libre según el rendimiento de dialización.

Valoración del método

VENTAJAS:

- A. El fármaco libre no se separa del unido a la albúmina durante el proceso de dialización, por lo que el equilibrio no se ve afectado.

- B. Es una técnica sencilla y fiable, que permite procesar muchas muestras al mismo tiempo.

INCONVENIENTES:

- A. Adsorción a la membrana de diálisis. Sin embargo este problema se soluciona con el cálculo de los factores de corrección.
- B. Se produce un aumento del volumen del contenido del saco de diálisis debido al efecto Donnan; lo cual puede alterar la fijación.

3.3.2.4. PRECIPITACION ACIDA

Se basa en la precipitación de las proteínas al variar las condiciones del medio, por adición de un ácido a la solución proteica. Al desnaturalizar la proteína, sólo será aplicable en aquellas sustancias cuya fracción unida precipite conjuntamente con la proteína, indicando la existencia de un enlace fuerte entre ambas.

Procesado de las muestras

A 0.5 ml del incubado se le añade 1 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 10%, a fin de precipitar la albúmina (RODRIGUEZ FARRE 1978). La mezcla se agita suavemente y se deja 30 minutos a 4°C, ya que a esta temperatura se minimizan la adsorción de la fracción libre a la proteína floculada (BULBENA 1979). A continuación se centrifuga a 3000 r.p.m. durante 20 minutos. Se separa el sobrenadante y mantiene a 4°C. Para extraer el ácido cafeico libre ocluído en el agua del gel proteico, se añade al tubo de centrifuga 1 ml de TCA 10%, resuspendiendo el precipitado y repitiendo las operaciones antes descritas.

Se reúnen los sobrenadantes obtenidos y se leen en el máximo de 322 nm frente a un blanco constituido por TCA 10% - tampón fosfato pH = 7.4 (4:1 v/v).

Recta de calibrado

Para conocer la concentración de ácido cafeico en los sobrenadantes a partir de la lectura espectrofotométrica, se realizó una recta de calibrado, utilizando como

solvente la mezcla TCA 10% - tampón fosfato pH 7.4 (4:1 v/v). El espectro U.V. del ácido cafeico en este último mostró la presencia de dos máximos de absorción a 245 y 322 nm, como puede verse a continuación.

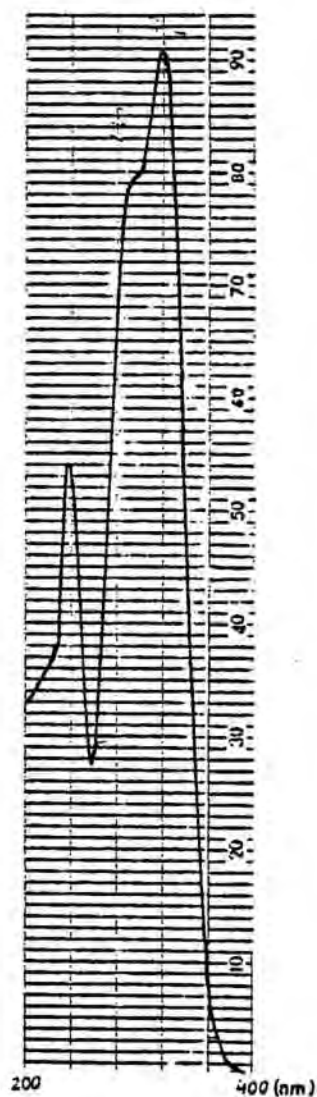


Figura 9.- Espectro U.V. del ácido cafeico.

Se escogió el máximo a 322 nm para el calibrado y las lecturas posteriores.

La recta obtenida, aplicando el método de los mínimos cuadrados, tiene por ecuación:

$$A = 90.1194 C + 0.0144$$

$$r = 0.9994$$

siendo C la concentración de ácido cafeico en mg/ml.

Ensayos de adsorción al precipitado

A fin de corregir los resultados por la posible existencia de fenómenos de adsorción de la fracción libre al precipitado, en nuestras condiciones experimentales, se procedió a un ensayo a tiempo 0 de todas las concentraciones estudiadas. Para ello se colocaron en tubos de centrifuga 0.25 ml de SAB al 8%, sobre la cual se añadió simultáneamente 0.25 ml de la solución de ácido cafeico en tampón fosfato y 1 ml de TCA 10%. Cada muestra se procesó según la pauta descrita anteriormente. Los resultados obtenidos indican que la adsorción es despreciable en las concentraciones inferiores, mientras que a partir de $2.77 \times 10^{-3} M$ su valor se incrementa, quizá debido a la formación de algún "artefacto". Se asume que la unión del ácido cafeico a la proteína desnaturalizada y en tan corto espacio de tiempo, es despreciable. Los valores de adsorción al precipitado obtenidos para cada concentración, se tuvieron en cuenta en el cálculo de la fracción libre.

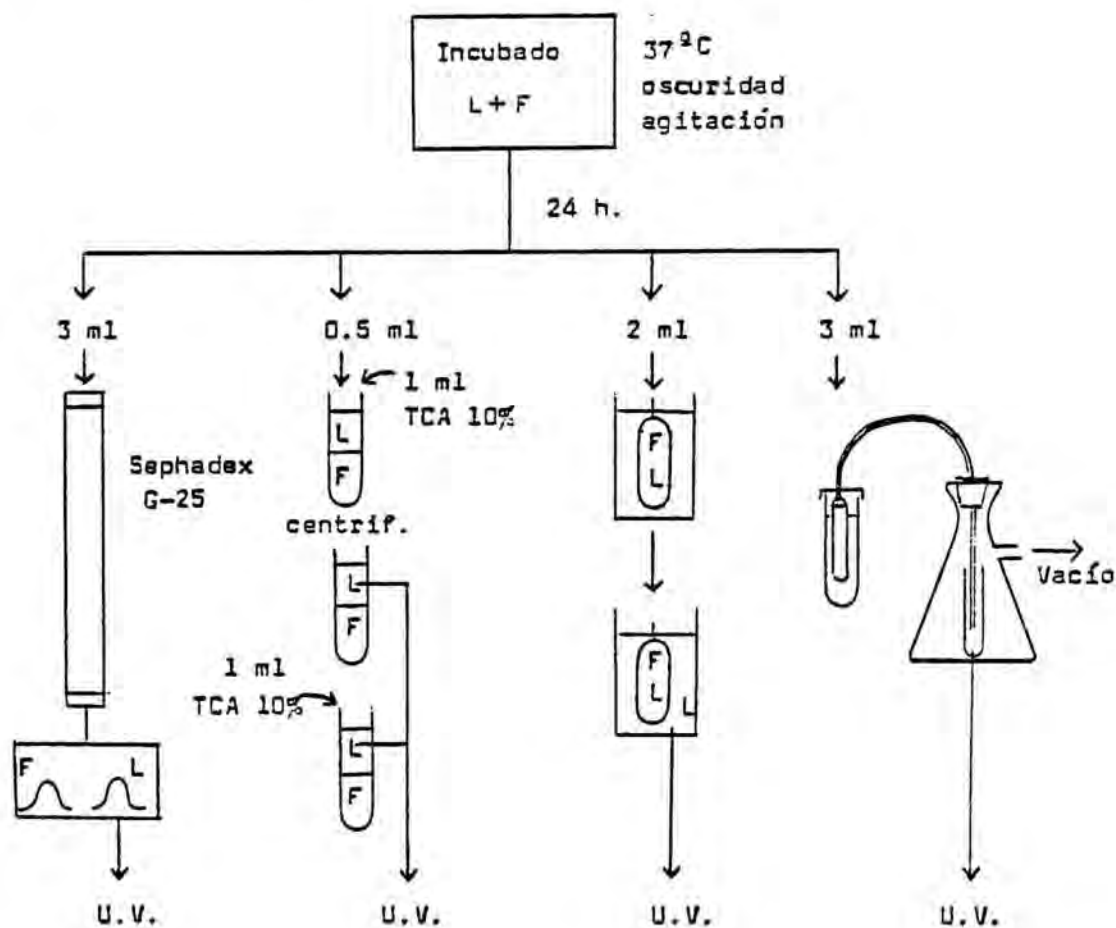
Valoración del método

Este método sólo está indicado en el caso de que existan uniones fuertes entre el ligando y la proteína, ya que la desnaturalización comporta la pérdida de las estructuras secundaria y terciaria proteicas. Si es posible, pues, su utilización, presenta indudables ventajas:

- A. Economía de tiempo y de reactivos.
- B. Posibilidad de procesar muchas muestras al mismo tiempo.

3.3.2.5. COMPARACION DE LOS RESULTADOS DE FIJACION SEGUN LOS METODOS EMPLEADOS

El esquema seguido para estudiar la unión del ácido cafeico, por los cuatro métodos descritos anteriormente, se muestra a continuación:



F : Ácido cafeico fijado a la proteína.

L : Ácido cafeico libre.

U.V.: lectura espectrofotométrica.

Los incubados se prepararon a una concentración de SAB del 4% y de ácido cafeico de 0.5 mg/ml ($2.77 \times 10^{-3}M$). Seguidamente se muestran los resultados obtenidos:

<u>METODO</u> <u>ANALITICO</u>	<u>% UNION</u>	<u>RENDIMIENTO</u> <u>DEL METODO</u>
Diálisis	79.18 $\pm$ 1.40	83.38 %
Gel-Filt.	94.79 $\pm$ 1.59	95.23 %
Ultrafil.	87.60 $\pm$ 0.90	98.00 %
Precipit. ácida	60.73 $\pm$ 1.96	91.15 %

Mediante la precipitación ácida se obtiene el menor porcentaje de fijación. Ello se debe a que por este método sólo valoramos los enlaces de naturaleza irreversible, como se verá en el apartado 3.3.6.. Por otra parte, por esta técnica se obtiene la mayor dispersión de resultados y el menor rendimiento.

En cuanto a los otros tres métodos, se calculó un porcentaje de unión que varía entre el 80 y el 95%, consiguiéndose el máximo rendimiento y la menor dispersión de resultados con la ultrafiltración.

En posteriores experiencias se utilizó el método de la diálisis de equilibrio y el de la precipitación ácida. El primero se escogió por su sencillez, porque el equilibrio de fijación no varía en todo el proceso, porque la separación entre la molécula libre y el complejo mantiene los enlaces inespecíficos y por la posibilidad de procesar varias muestras a la vez. La precipitación ácida sirvió para la determinación de los enlaces irreversibles.

3.3.3. FACTORES EXPERIMENTALES QUE MODIFICAN LA

FIJACION DEL ACIDO CAFEICO

El porcentaje de unión del ácido cafeico a la SAB, se ve afectado por diversos factores, tales como la concentración de proteína, la conformación de la misma, el pH del medio, la fuerza iónica del solvente y la concentración de ligando. La modificación que experimenta el grado de unión debida a este último factor, permite la determinación de las constantes de afinidad y del número de puntos de unión.

Efecto de la concentración de SAB en el porcentaje de fijación

En todas las determinaciones descritas anteriormente, se ha utilizado una concentración de SAB del 4%, a fin de aproximarse lo más posible a las condiciones fisiológicas (TILLEMENT 1974). Sin embargo, al ser la concentración proteica uno de los factores que condicionan la unión de los fármacos a las proteínas plasmáticas, se creyó conveniente el estudio del comportamiento del ácido cafeico frente a distintas concentraciones de SAB. Ello es de esencial relevancia en patologías que cursan con hipoalbuminemia, por cuanto pueden dar lugar a un aumento de la fracción libre del fármaco y, por tanto, de la actividad farmacológica.

Las soluciones de SAB se prepararon a una concentración doble de la final. Se añadió a cada una de ellas un volumen igual de ácido cafeico (1mg/ml), incubándose durante 24 horas. Cada muestra se procesó por los métodos de diálisis de equilibrio y de precipitación ácida, corrigiéndose la concentración del ácido cafeico libre según los

blancos respectivos, realizados para cada concentración de SAB.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Conc. SAB (%)	Diálisis de equilib. (%)	Precipitación ácida (%)
2	67.39 $\pm$ 1.69	48.77 $\pm$ 1.76
3	80.04 $\pm$ 0.57	61.37 $\pm$ 0.39
4	81.26 $\pm$ 0.37	62.12 $\pm$ 0.64
5	91.90 $\pm$ 0.23	85.82 $\pm$ 2.30
6	93.72 $\pm$ 0.16	81.08 $\pm$ 0.23
8	91.38 $\pm$ 1.21	71.19 $\pm$ 0.75

Cada valor corresponde a la media de 6 determinaciones, afectada por el error standard de la media (ESM), para $p = 0.05$.

Su representación gráfica se muestra en la página siguiente.

Se observa un incremento de la fijación al aumentar la concentración de proteína entre el 2 y el 5%, llegando-se a la saturación a concentraciones entre el 5 y 6%.

Este hecho se debe, probablemente, a la polimerización de la SAB, sobre todo a elevadas concentraciones, ya que ello comporta una disminución de la cantidad relativa de lugares de unión por cada molécula de proteína (SAIFER 1960).

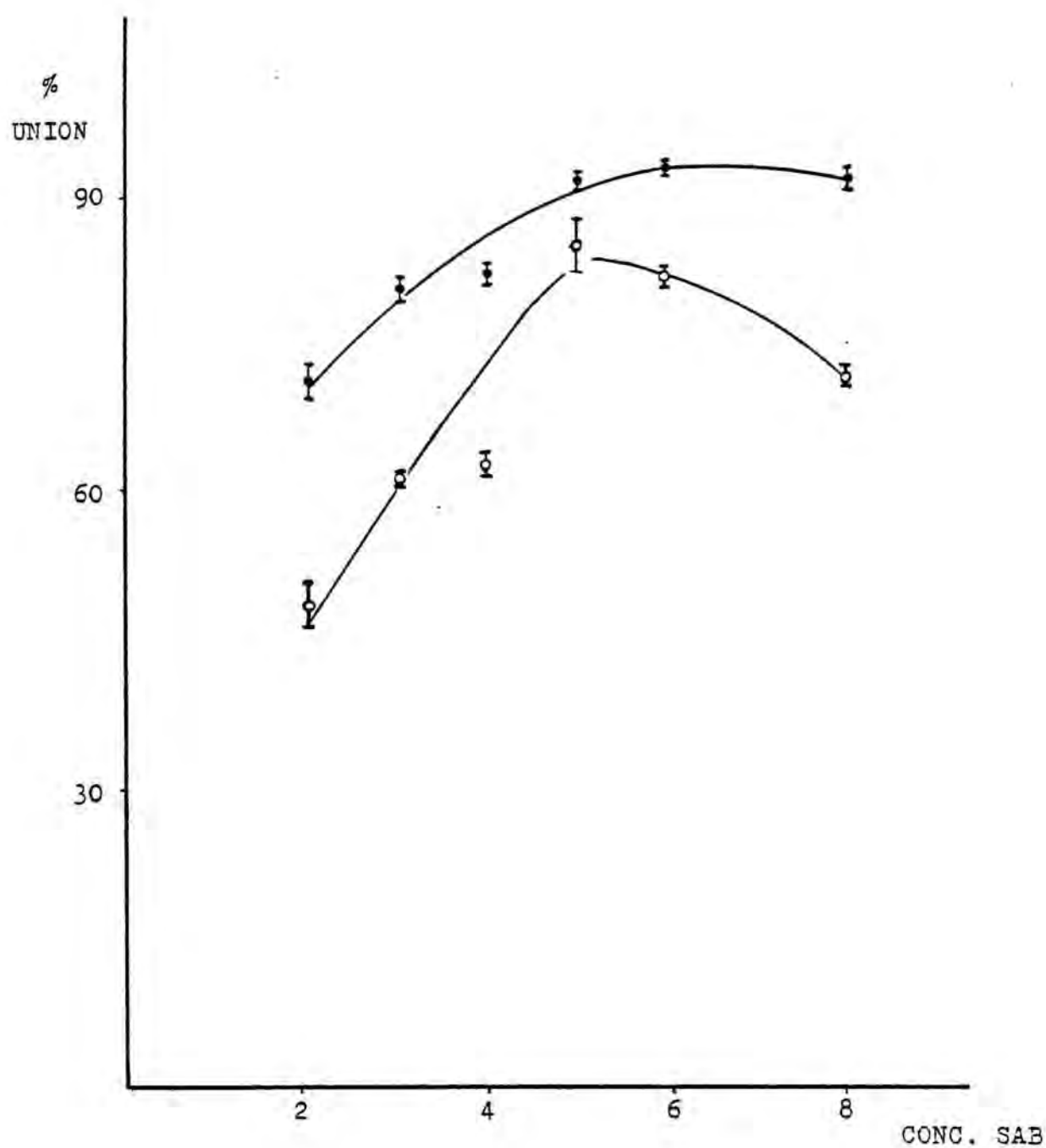


Figura 10.- Porcentaje de unión del ácido cafeico a distintas concentraciones de SAB por diálisis de equilibrio (●—●) y precipitación ácida (○—○).

Influencia de la desnaturalización de la proteína

La desnaturalización proteica es un proceso que conlleva la alteración de la disposición espacial de las cadenas polipeptídicas dentro de la molécula, transformándose la estructura típica de la proteína nativa en otra más desordenada (MAHLER 1971).

Existen numerosos agentes desnaturalizantes de las proteínas; entre ellos cabe incluir el calor, los disolventes orgánicos, las radiaciones ultravioletas, el cloruro de guanidio, el bromuro de litio, la urea, los detergentes y las condiciones extremas de pH. Ya que la mayoría de estos agentes alteran el ácido cafeico, se prefirió la utilización de la urea, desnaturalizante de uso frecuente (KATZ 1967).

La desnaturalización con urea es un proceso reversible y, según KATZ (1969), pH dependiente, caracterizado por una primera fase rápida, en la que aparece una albúmina conformacionalmente alterada y de radio de Stokes aumentado (6.3 nm en vez de los 3.6 nm de la forma nativa), la cual, se convierte, a través de un proceso más lento y dependiente del tiempo, de la temperatura y de la concentración de urea, en numerosas formas de albúminas desnaturalizadas.

Mediante la desnaturalización de la SAB con urea se puede saber si las estructuras secundaria y terciaria intervienen en el fenómeno de la fijación (VERA 1977).

Se preparó SAB al 16%, así como ácido cafeico a la concentración de 2 mg/ml, ambos en tampón fosfato. En un tubo de incubación se colocaron 0.5 ml de una solución pro

teica con 1 ml de urea 8M, manteniéndose 45 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron 0.5 ml de la solución de ácido cafeico. La mezcla se incubó a 37°C durante 24 horas, en la oscuridad y en agitación continua.

Los incubados se procesaron por los métodos de precipitación ácida y diálisis de equilibrio.

El efecto desnaturalizante de la urea sobre la proteína se observó al añadir el TCA 10%, ya que esta adición no produjo una precipitación notoria, tal como ocurre con la proteína nativa. Se precisó una centrifugación prolongada para conseguir una separación de fases.

Las medias de los valores obtenidos, afectadas por el ESM para $p = 0.05$ y $n = 3$, fueron las siguientes:

Conc. ác. cafeico	Diálisis de equilib. (%)	Precipitación ácida (%)
$2.77 \times 10^{-3} M$	79.18 ± 1.40	60.73 ± 1.96
$2.77 \times 10^{-3} M$ + urea 8M	17.26 ± 2.54	8.90 ± 4.64

Como puede apreciarse, el porcentaje de unión en los dos métodos disminuye notablemente cuando la incubación se realiza en presencia de urea. Ello indica que las estructuras secundaria y terciaria de la proteína ejercen un papel primordial en la interacción del ácido cafeico con la SAB.

Influencia de la variación del valor de pH

Para estudiar la influencia del pH en la fijación del ácido cafeico a la SAB, se prepararon tampones fosfato 0.05M, isotónicos, de valores de pH entre 6 y 8. La incubación se llevó a cabo con SAB y ácido cafeico disueltos en los distintos tampones, para obtener una concentración final del 4% y 0.5 mg/ml respectivamente. Las soluciones de ácido cafeico se ajustaron a cada pH con hidróxido sódico 3N. Las muestras se procesaron por los métodos de precipitación ácida y diálisis de equilibrio, obteniéndose los resultados indicados a continuación.

pH	Diálisis de equilib. (%)	Precipitación ácida (%)
6.0	71.07 $\pm$ 2.80	30.86 $\pm$ 2.09
6.8	78.39 $\pm$ 0.92	42.59 $\pm$ 1.29
7.2	78.69 $\pm$ 1.69	47.57 $\pm$ 1.76
7.4	79.18 $\pm$ 1.40	60.73 $\pm$ 1.96
7.6	81.07 $\pm$ 0.84	52.54 $\pm$ 2.28
8.0	91.57 $\pm$ 0.75	88.31 $\pm$ 0.77

Cada dato corresponde a la media de 6 experiencias, afectada por el ESM para $p = 0.05$. Su representación gráfica se muestra en la página siguiente.

Puede apreciarse que la afinidad de la SAB por el ácido cafeico se incrementa al aumentar el valor del pH, tanto por el método de la diálisis de equilibrio como por el de la precipitación ácida, aunque para este último la va-

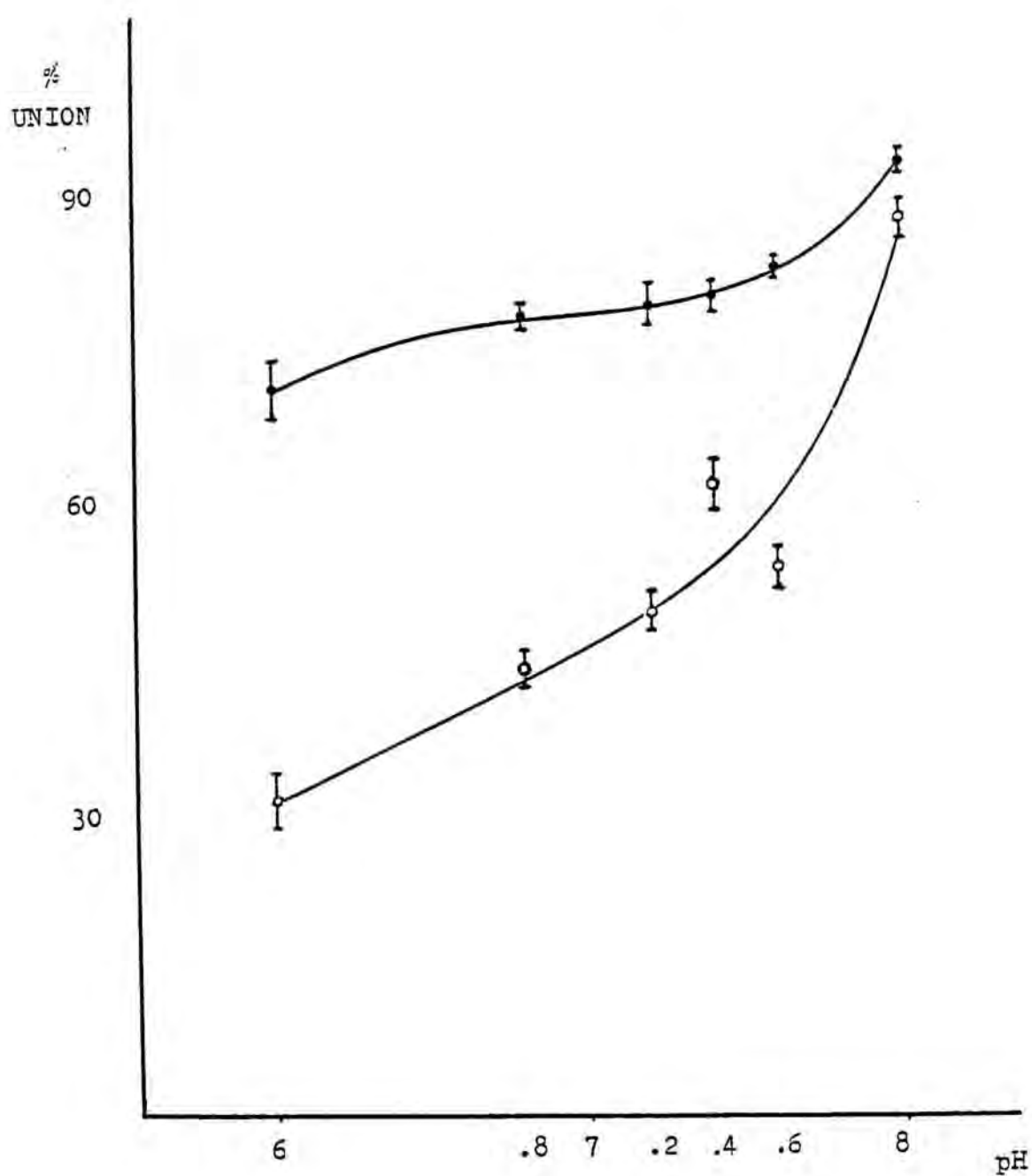


Figura 11.- % de unión del ácido cafeico a la SAB a distintos valores de pH por diálisis de equilibrio (●—●) y precipitación ácida (○—○).

riación del pH parece ser un factor más influyente. Este incremento de fijación proporcional al pH, indica que las interacciones entre el ácido cafeico y la SAB son, principalmente de tipo iónico (WADA 1969). El elevado porcentaje de fijación observado a pH 8 se debe, probablemente a la forma oxidada del ácido fenol.

No se ha creído oportuno determinar la fijación a pH superiores a 8, ya que ello conllevaría una mayor alteración del ácido cafeico y la posible aparición de "artefactos".

Según el valor de pKa de los tres grupos funcionales de la molécula de cafeico, calculados anteriormente (ver apartado 2.1.3.), se desprende que en el intervalo de pH utilizado, el principal grupo ionizado es el carboxílico. Por tanto, la variación, en lo que a unión se refiere, está determinada por el diferente grado de ionización de la molécula de SAB, que conlleva a su vez cambios conformacionales de esta proteína. Esta modificación de la disposición estérica de la SAB favorece o impide el acceso a los lugares de unión.

Influencia de la fuerza iónica

La fuerza iónica constituye una medida de la concentración y del número de cargas eléctricas, aportadas por los distintos iones en solución. Se expresa como:

$$I = 1/2 \sum C_i Z_i^2$$

donde C_i es la concentración iónica total, en moles por litro de solución, y Z_i la carga eléctrica de los distintos iones. La fuerza iónica influye en la actividad de los elec

trolitos en solución, ya que el factor de actividad f (actividad = $f \times$ concentración molar) disminuye al aumentar la concentración iónica del medio.

Se ha estudiado la fijación del ácido cafeico a la SAB frente a la variación de la fuerza iónica, a fin de determinar la influencia de las cargas del medio en el porcentaje de unión. Para ello se han preparado diversos tampones foafato, pH 7.4, isotónicos, de fuerza iónica distinta, cuya composición en g/l fue la siguiente:

Tampón	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	KH_2PO_4	NaCl	I
0.02 M	5.670	0.533	7.629	0.18
0.05 M	14.397	1.334	5.570	0.23
0.08 M	23.035	2.134	3.518	0.27
0.12 M	34.553	3.202	0.777	0.33

Se realizaron incubados con cada uno de los tampones, con una concentración final de SAB del 4% y de ácido cafeico de 0.5 mg/ml. Las muestras se procesaron por el método de la diálisis de equilibrio y de precipitación ácida. La representación gráfica de los resultados aparece en la página siguiente. La no discrepancia entre éstos permite deducir, que la fuerza iónica del medio no influye en la fijación del ácido cafeico a la SAB, por lo menos en el intervalo estudiado.

En el transcurso de esta experiencia, se ha observado que la estabilidad de las soluciones de ácido cafeico disminuye al aumentar la fuerza iónica, ya que se apreciaba un incremento de la coloración de las soluciones madres con el tiempo, progresivamente mayor a medida que aumenta la molaridad del tampón fosfato desde 0.02 a 0.12. Ello puede atribuirse al descenso de la concentración de cloruro sódico, que parece ejercer un efecto estabilizador en las soluciones de polifenoles (NICHIFORESCO 1967).

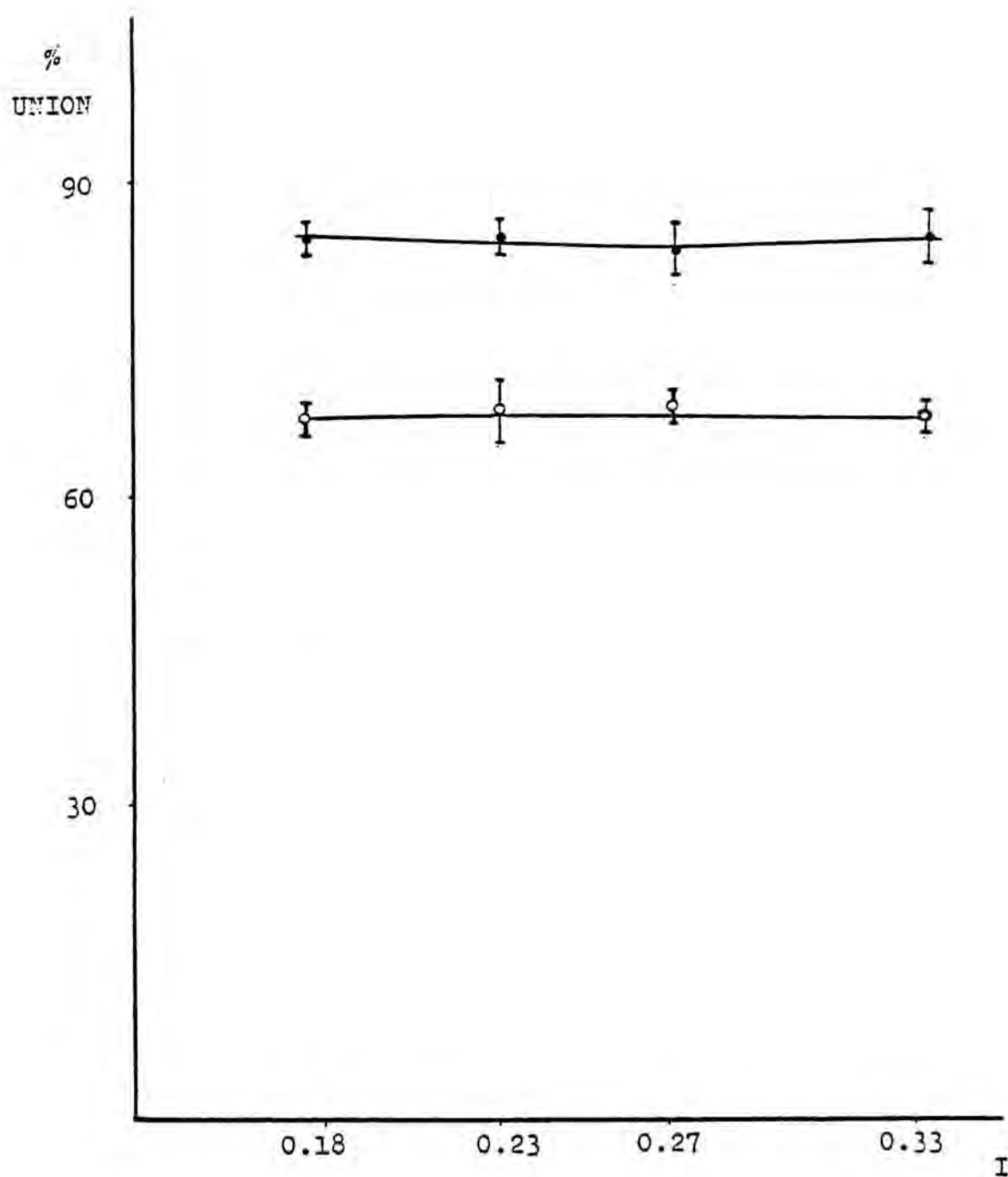


Figura 12.- Variación de la fijación del ácido cafeico a la SAB según la fuerza iónica, por diálisis de equilibrio (●—●) y precipitación ácida (○—○).

3.3.4. DETERMINACION DE LAS CONSTANTES Y EL NUMERO DE PUNTOS DE UNION

La interacción entre un fármaco que está en forma libre (D) con una proteína (P), para formar un complejo fármaco-proteína (D-P), obedece a la ley de acción de masas (LA DU 1971):



$$V_1 = K_1 (D) (P)$$

$$V_2 = K_2 (D-P)$$

K_1 y K_2 son las constantes de velocidad de primer orden para las reacciones en uno u otro sentido. En el equilibrio se cumple:

$$K_1 (D) (P) = K_2 (D-P)$$

$$\frac{K_1}{K_2} = \frac{(D-P)}{(D) (P)} = K \quad (\text{Ec. 2})$$

donde K representa la constante de asociación intrínseca para la unión, mientras que $1/K$ es la constante de disociación.

La concentración total de proteína (P_t) será la suma de la proteína libre (P) más la proteína unida con el fármaco (D-P). La sustitución en la ecuación 2 de (P) por su valor, y reordenando la igualdad se obtiene:

$$\frac{(D-P)}{(P_t)} = \frac{K (D)}{1 + K (D)} \quad (\text{Ec. 3})$$

(D-P) representa la concentración del fármaco unido a proteína, mientras que (D) es la concentración del fármaco libre una vez alcanzado el equilibrio, no la concentración inicial de fármaco añadido al sistema. A la relación $(D-P)/(P_t)$ se le denomina r. Si hay un número n de sitios de unión idénticos, se daría una serie de ecuaciones iguales de forma:

$$r_1 + r_2 + \dots + r_n = r = \frac{n K (D)}{1 + K (D)} \quad (\text{Ec. 4})$$

Los valores de r y (D) se pueden determinar experimentalmente, mientras que los de n y K se obtienen a partir de las correspondientes gráficas, construidas de acuerdo con la ecuación 4. Así, si se representa en abscisas concentración de fármaco total y en ordenadas el porcentaje de fármaco unido a proteína, se observa que a medida que aumenta la cantidad total de fármaco disminuye progresivamente la proporción de fracción unida. Ello es debido a que se saturan los puntos de unión a nivel de las proteínas.

Otra representación se obtiene colocando en abscisas las concentraciones de fármaco libre (D) y en ordenadas el valor de r. La curva resultante se aproxima asintóticamente al valor máximo de r a medida que (D) tiende a infinito.

Estas curvas no son prácticas ni manejables, y por ello se han aplicado representaciones logarítmicas que proporcionan una senoide, o bien se suele convertirlas en rectas, mediante transformaciones de la ecuación 4. Entre ellas se citan como más importantes:

- Ecuación de tipo doble inverso (Klotz)

Partiendo de la ecuación 4, e invirtiendo los dos miembros de la ecuación se obtiene:

$$\frac{1}{r} = \frac{1}{n} + \frac{1}{nK} \frac{1}{(D)} \quad (\text{ Ec. 5 })$$

que constituye la ecuación de una recta, si se representa $1/r$ frente a $1/(D)$, siendo, por tanto, la ordenada en el origen $1/n$ y la pendiente $1/nK$ (KLOTZ 1946).

- Ecuación de Scatchard

Es la forma más frecuente de representar los resultados experimentales. Fue propuesta por el mismo autor que da nombre a la ecuación en 1949 (SCATCHARD 1949).

Se parte de la ecuación 4, de donde despejando r y dividiendo por (D) se obtiene:

$$\frac{r}{(D)} = nK - rK \quad (\text{ Ec. 6 })$$

La representación de $r/(D)$ en función de r determina una recta que permite calcular los distintos parámetros con facilidad. Así, la ordenada en el origen es igual a nK y la pendiente de la recta es $-K$. La abscisa en el origen es igual a n .

Cuando sólo existe una clase de puntos de unión, los dos tipos de trazado, basados en las ecuaciones 5 y 6, serán rectos. Si hay dos o más clases de unión, la represen-

tación gráfica de los resultados experimentales da lugar a trazados curvilíneos. En ciertas ocasiones es difícil observar la curvatura, habiéndose demostrado que la gráfica de Scatchard es el método más sensible para detectarla (WALKER 1974).

Cuando hay más de una clase de puntos de unión la ecuación 4 adopta la forma siguiente (MEYER 1968):

$$r = \frac{n}{i=1} \frac{n_i K_i (D)}{1 + K_i (D)}$$

siendo n_i el número de lugares de unión en los puntos de i ésima clase, y K_i la constante de asociación intrínseca para los puntos de i ésima clase.

La gráfica de Scatchard para los casos en que existe más de una clase de puntos de unión es curvilínea, pero las tangentes a la curva, extrapoladas, permiten estimar n_i y K_i de cada clase de puntos de unión. Ello puede interpretarse como que existen dos o más tipos de puntos de unión a la molécula de la albúmina, y la curva obtenida es la resultante de la recta correspondiente a cada tipo de punto de unión (ESPLUGUES 1982).

- Simplificación en determinadas condiciones

Reordenando la ecuación 4, se obtiene:

$$D_b = \frac{n (P_t) (D)}{1/K + (D)}$$

siendo D_b la concentración del fármaco unido a la proteína y $1/K = K_2/K_1$ (constante de disociación del complejo fármaco-proteína. Si $1/K$ es mucho mayor que (D) , entonces:

$$D_b = n K (P_t) (D)$$

Como la concentración total de fármaco, D_t , es igual a $D_b + (D)$, se obtiene la ecuación:

$$\% \text{ unido} = \frac{D_b}{D_t} \times 100 = \frac{n K (P_t)}{1 + n K (P_t)} \times 100$$

Para un individuo determinado K y (P_t) son constantes en un momento dado y, por tanto si $1/K$ es mucho mayor que (D) , el porcentaje unido y la fracción libre serán constantes. Por ello, según sean el valor de K y la cantidad de fármaco libre, puede ocurrir que en el rango de concentraciones terapéuticas, el porcentaje unido sea constante. Esta simplificación es aplicable a determinados fármacos como el sulfametoxazol, y será tanto más cierta cuanto menor sea K y mayor la unión del fármaco a las proteínas plasmáticas (WAGNER 1983).

Aplicación al ácido cafeico

El estudio de la fijación a la SAB de distintas concentraciones de ácido cafeico, permite determinar la afinidad y capacidad de interacción entre las dos moléculas.

Las experiencias se han llevado a cabo incubando SAB, a la concentración final del 4% en tampón fosfato, junto con soluciones de ácido cafeico de diferentes concentraciones. A fin de comprobar que el rango de concentraciones de ligando es lo suficientemente amplio para detectar todas

las clases de puntos de unión, se representan gráficamente los moles de ácido cafeico unido, frente al valor del logaritmo de los moles de la forma libre. Se considera que se abarcan todas las clases de puntos de unión, si esta representación gráfica describe una sigmoidea (BARRE comunicación personal).

Se han escogido, así, 11 concentraciones del ácido fenol comprendidas entre 12.5 mg/ml ($6.94 \times 10^{-2} \text{M}$) y 0.0075 mg/ml ($4.16 \times 10^{-5} \text{M}$).

La separación del ácido cafeico libre de la fracción fijada se ha efectuado por los métodos de diálisis de equilibrio y de precipitación ácida.

DIALISIS DE EQUILIBRIO

Los resultados obtenidos, correspondientes a la media de 6 determinaciones, afectada por el ESM para $p = 0.05$, se muestran a continuación:

CONC. AC. CAF.	% UNION	r	r/D
$4.16 \times 10^{-5} \text{ M}$	95.00 ± 3.24	0.07	34562.70
$6.90 \times 10^{-5} \text{ M}$	93.84 ± 1.88	0.12	29452.16
$1.39 \times 10^{-4} \text{ M}$	82.72 ± 3.13	0.22	9175.46
$2.77 \times 10^{-4} \text{ M}$	81.37 ± 2.61	0.43	8347.83
$5.50 \times 10^{-4} \text{ M}$	77.84 ± 2.52	0.82	6720.42
$1.39 \times 10^{-3} \text{ M}$	75.99 ± 1.24	2.04	6138.56
$2.77 \times 10^{-3} \text{ M}$	79.18 ± 1.40	4.25	7381.43
$5.50 \times 10^{-3} \text{ M}$	75.16 ± 1.59	8.02	5868.76
$1.39 \times 10^{-2} \text{ M}$	75.89 ± 0.62	20.71	6192.48
$2.77 \times 10^{-2} \text{ M}$	67.07 ± 0.53	37.59	4119.75
$6.94 \times 10^{-2} \text{ M}$	55.19 ± 3.96	80.66	2595.65

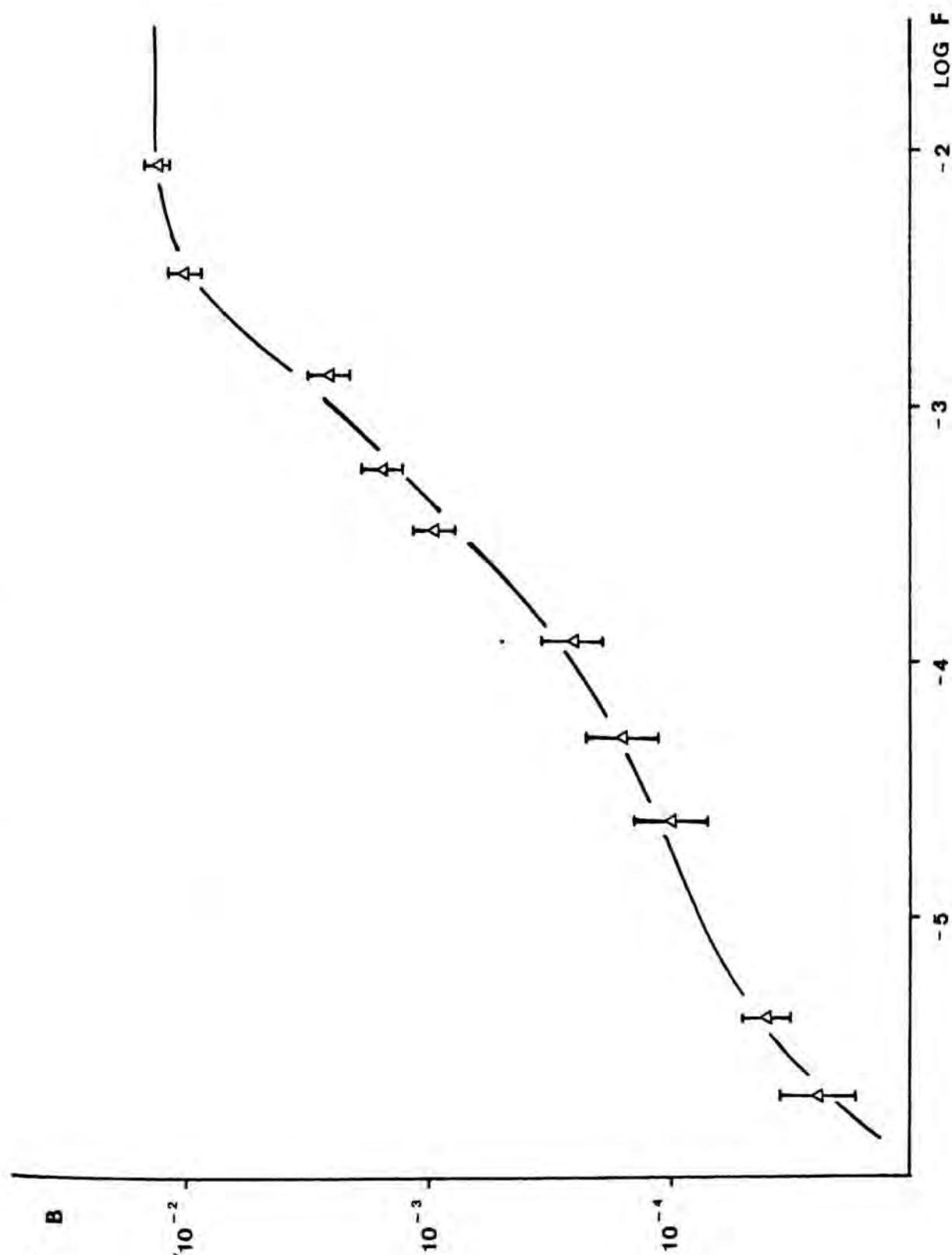


Figura 13.- Representación semilogarítmica de la relación molar de ácido cafeico unido (B)/libre (F) por Diálisis de Equilibrio.

siendo, en este caso, r los moles de ácido cafeico unidos por mol de proteína (considerando el peso molecular de la SAB igual a 66500 daltons), y D los moles de ácido cafeico libres a cada concentración.

Puede observarse que el porcentaje de unión varía entre el 95% para la concentración inferior y el 55% para la superior.

Se ha utilizado el método gráfico de Scatchard para la determinación del número de lugares de unión y la constante de asociación de los mismos. En la figura de la página siguiente se muestra esta representación, colocando en ordenadas los valores correspondientes de r/D y en abscisas los del parámetro r .

Puede observarse que la gráfica no corresponde a una sola línea recta, sino que se compone de dos tramos bien diferenciados. En el primero de ellos, junto al eje de ordenadas, pequeñas oscilaciones del parámetro r implican grandes variaciones de r/D , mientras que en el otro, a grandes variaciones de r corresponden pequeñas modificaciones de r/D . Por tanto, la forma hiperbólica se descompone en dos rectas, cada una correspondiente a una clase distinta de puntos de unión. La ecuación representativa de la fijación para el caso de dos clases de lugares de unión es:

$$r = \frac{n_1 K_1 (D)}{1 + K_1 (D)} + \frac{n_2 K_2 (D)}{1 + K_2 (D)}$$

siendo n_1 el número de lugares de unión de la primera clase y K_1 su constante de asociación intrínseca, mientras que n_2 y K_2 corresponden al número de lugares de unión y

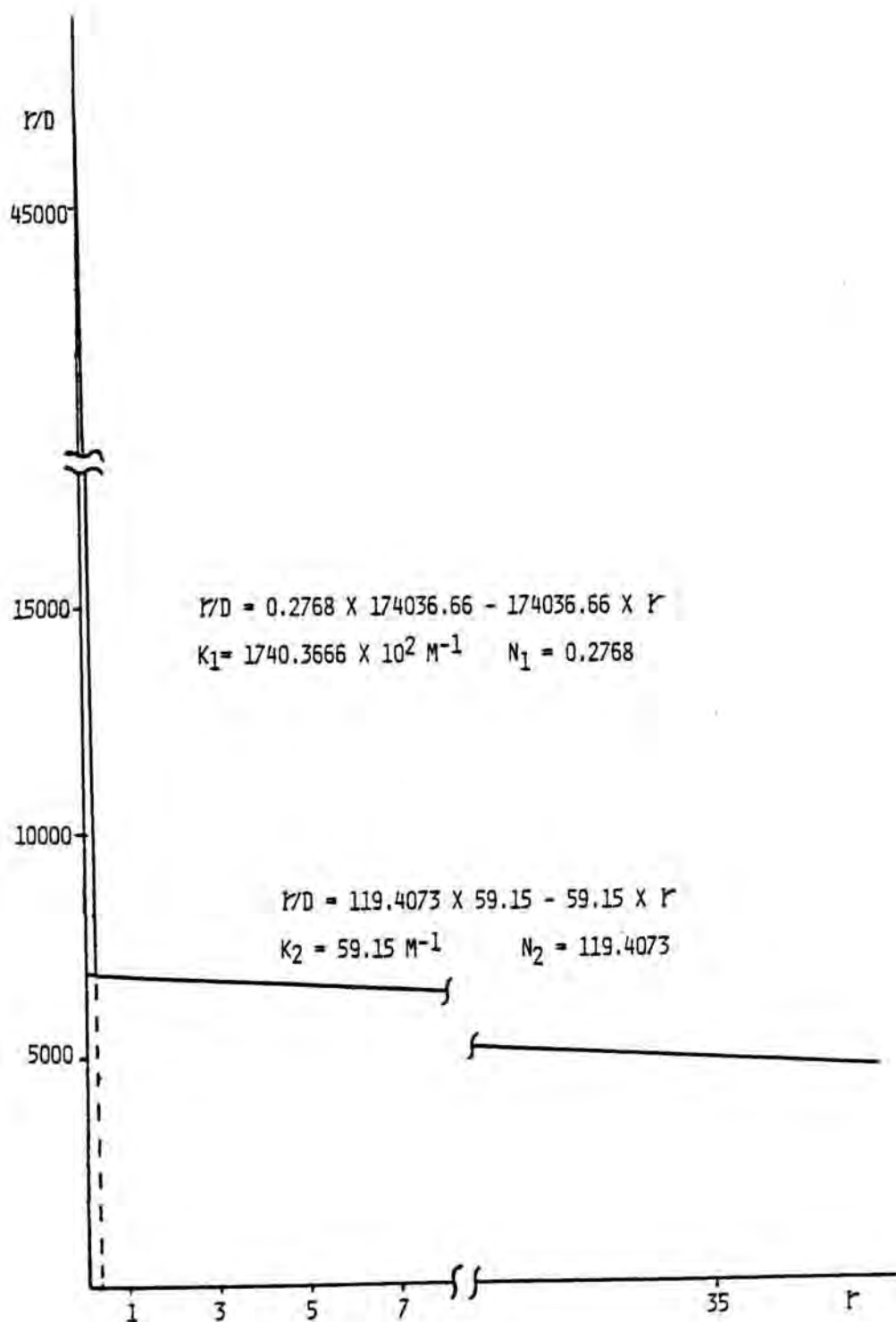


Figura 14.- Representación de Scatchard de los resultados obtenidos por diálisis de equilibrio.

constante de asociación de la segunda clase. Aplicando la transformación lineal de Scatchard $r/D = nK - rK$ al primer tramo, y mediante el método de regresión por mínimos cuadrados, se obtiene:

$$K_1 = 1.7404 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$$

$$n_1 = 0.2768$$

lo que indica una fijación de alta afinidad y baja capacidad.

Para el segundo tramo:

$$K_2 = 59.1500 \text{ M}^{-1}$$

$$n_2 = 119.4073$$

correspondiente a una fijación de poca afinidad y gran capacidad.

Otra transformación lineal utilizada para evaluar el número de lugares de unión y su constante de afinidad es el método del doble inverso. Representando $1/r$ frente a $1/D$ se obtiene la gráfica que aparece en la página siguiente.

El trazado es hiperbólico, pudiéndose desdoblar también en dos tramos rectilíneos. Aplicando la ecuación $1/r = 1/n + (1/nK)(1/D)$ a cada uno de los tramos, y por regresión lineal por mínimos cuadrados, se obtienen los siguientes valores:

$$K_1 = 1.6435 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$$

$$n_1 = 0.2851$$

$$K_2 = 426.0965 \text{ M}^{-1}$$

$$n_2 = 19.3443$$

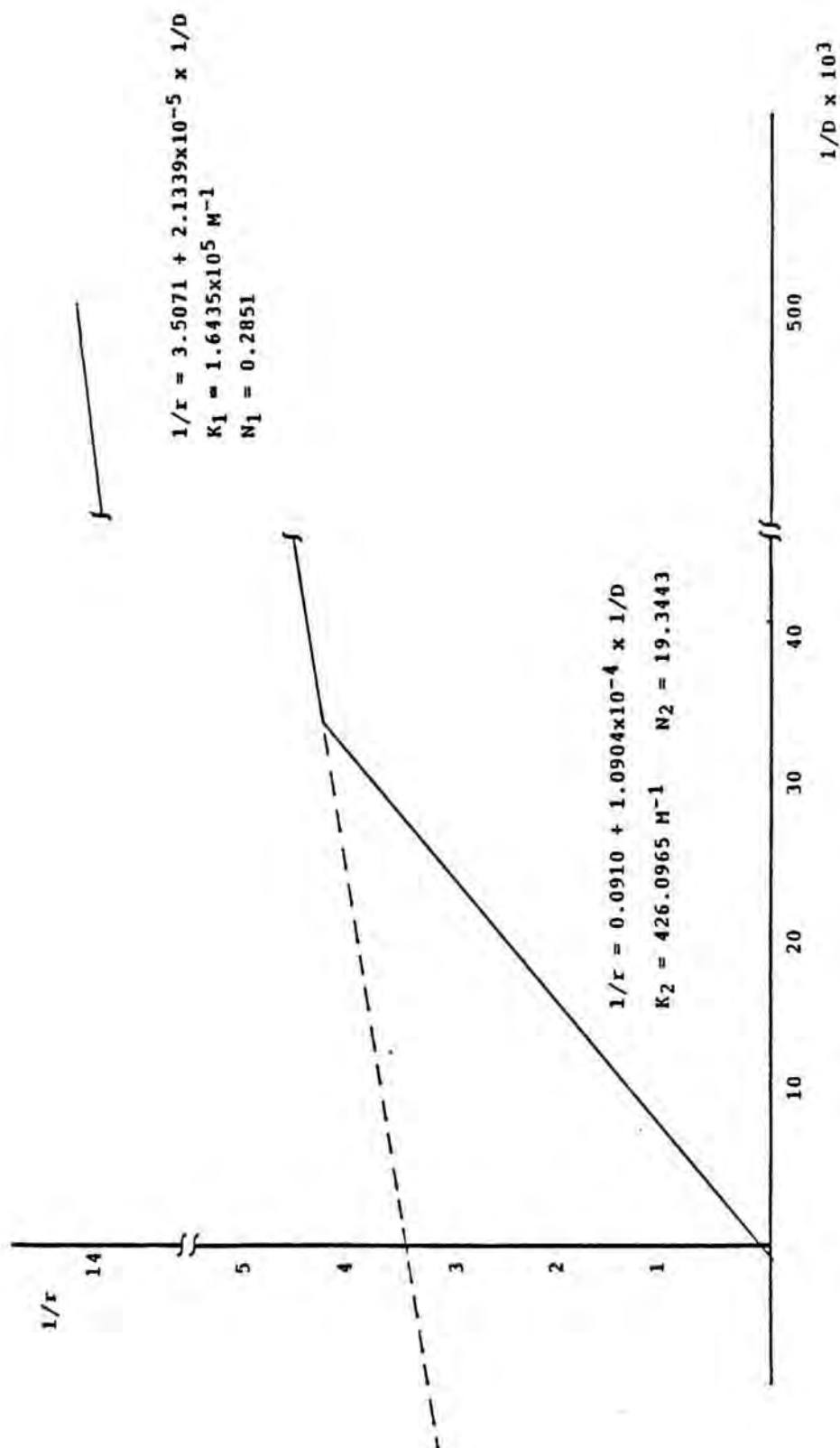


Figura 15.- Representación del doble inverso de los resultados obtenidos por Diálisis de Equilibrio.

PRECIPITACION ACIDA

Los valores obtenidos por el método de la precipitación ácida, correspondientes a la media de 6 determinaciones, afectada por el ESM para $p = 0.05$, se indican a continuación:

CONC. AC. CAF.	% UNION	r	r/D
4.16×10^{-5} M	81.25 ± 9.90	0.06	7204.21
6.90×10^{-5} M	76.55 ± 2.08	0.09	5454.22
1.39×10^{-4} M	72.34 ± 2.13	0.17	4347.87
2.77×10^{-4} M	68.66 ± 7.53	0.32	3641.05
5.50×10^{-4} M	67.76 ± 0.99	0.62	3493.16
1.39×10^{-3} M	63.56 ± 1.05	1.46	2899.69
2.77×10^{-3} M	60.73 ± 1.96	2.80	2571.18
5.50×10^{-3} M	44.19 ± 9.58	4.04	1316.36
8.32×10^{-3} M	28.64 ± 2.13	3.96	667.24
1.39×10^{-2} M	22.09 ± 7.15	5.09	471.22
6.94×10^{-2} M	12.50 ± 4.35	14.42	237.50

Como puede apreciarse, el porcentaje de fijación varía entre el 81 y el 12% en las concentraciones estudiadas. La representación gráfica de estos resultados se muestra en la página siguiente.

El tratamiento de los resultados según el método gráfico de Scatchard muestra, al igual que en la diálisis de equilibrio, la existencia de dos pendientes diferenciadas, correspondientes a puntos de fijación de alta afinidad y baja capacidad, y otros de baja afinidad y gran capacidad.

En el cálculo de n_1 , n_2 , K_1 y K_2 sólo se utilizaron concentraciones entre 4.16×10^{-5} M y 5.50×10^{-3} M, ya

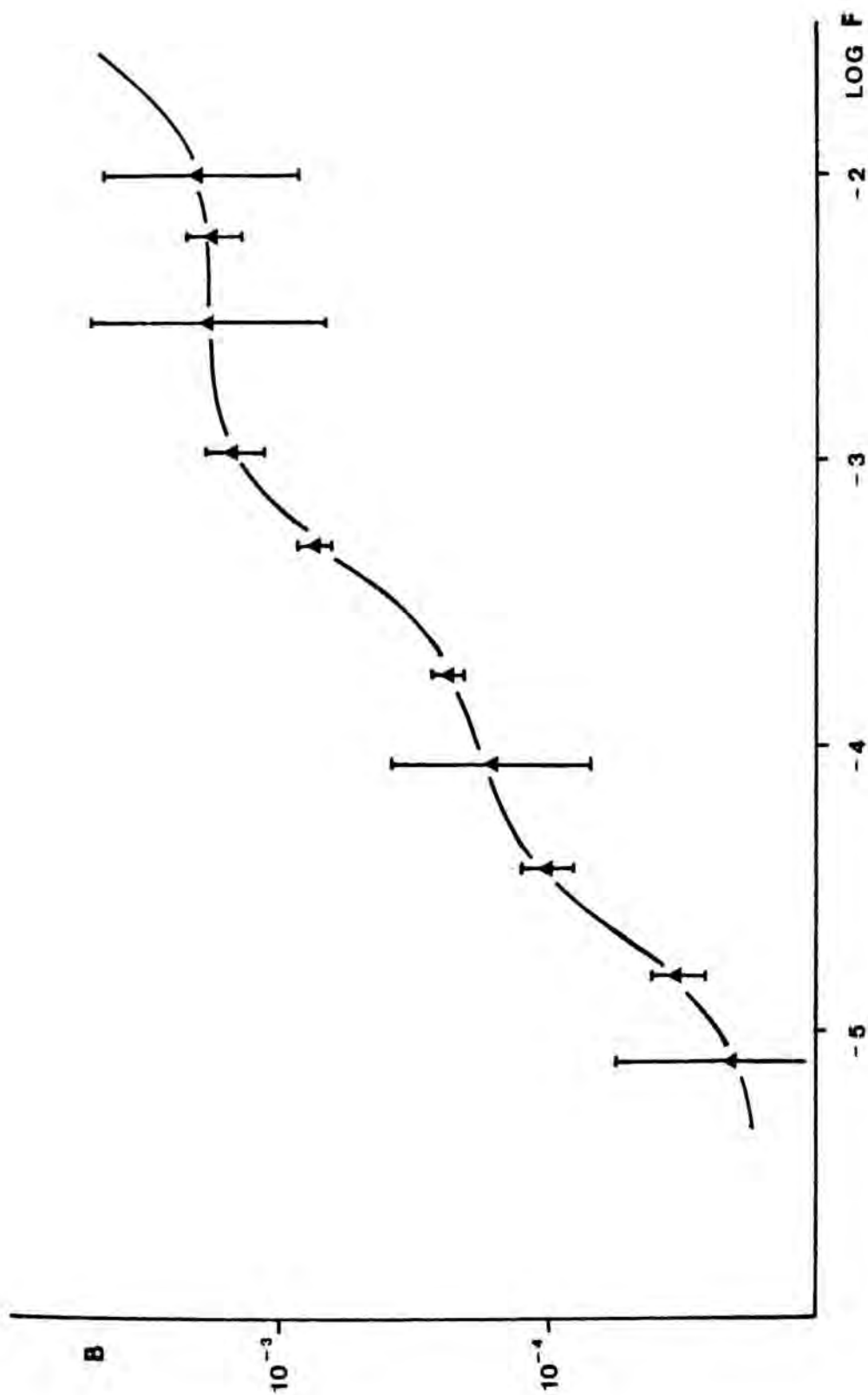


Figura 16.- Representación semilogarítmica de la relación molar de ácido cafeico unido (B)/libre (F) por Precipitación Ácida.

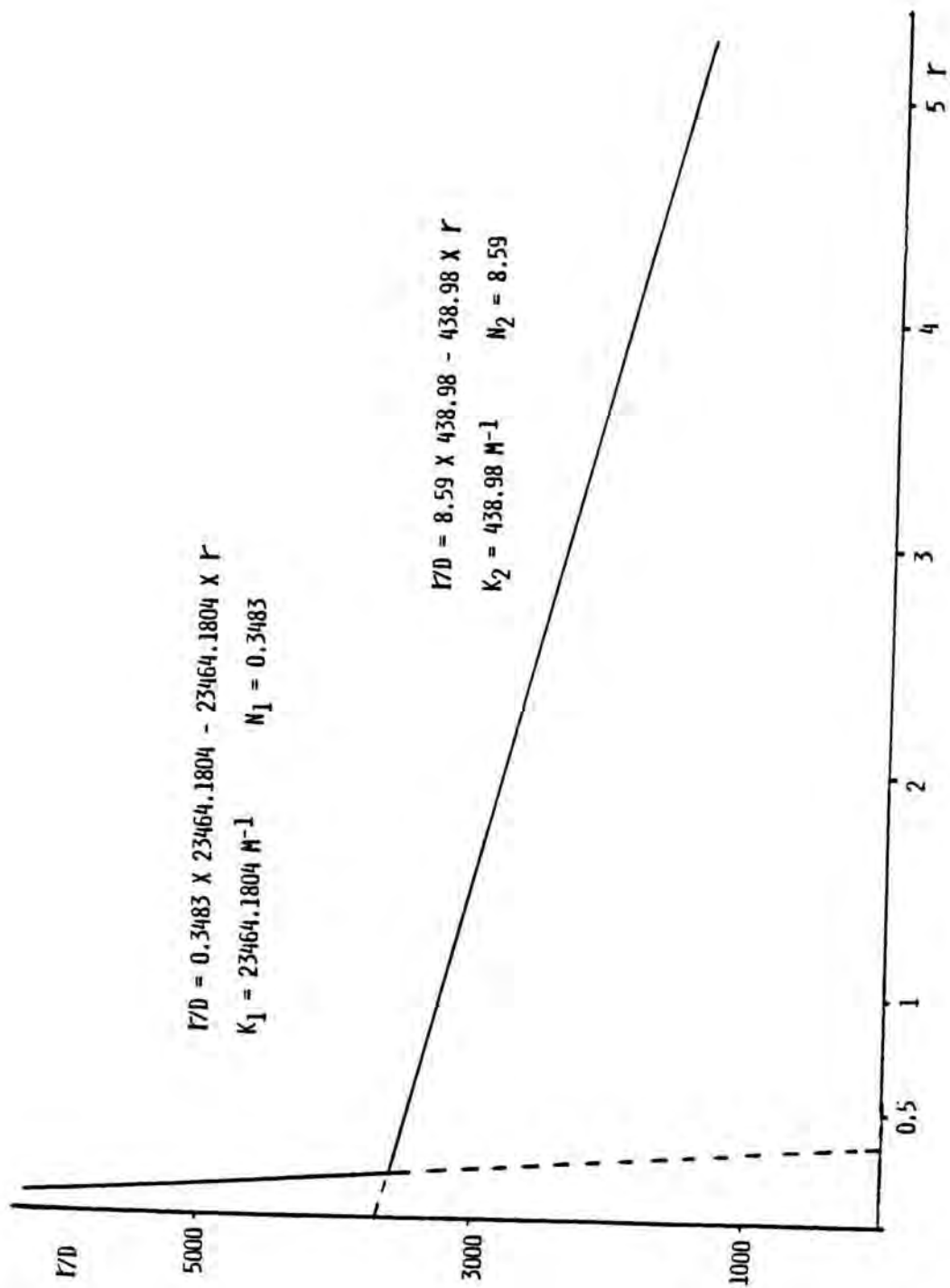


Figura 17.- Representación de Scatchard de los resultados obtenidos por Precipitación Ácida.

que a concentraciones superiores la formación de artefactos en el precipitado impide la correcta interpretación de los resultados.

De este modo, se obtuvieron los siguientes valores de los parámetros de unión:

$$K_1 = 2.3464 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$$

$$n_1 = 0.3483$$

$$K_2 = 438.9800 \text{ M}^{-1}$$

$$n_2 = 8.5900$$

La representación de los resultados utilizando el método del doble inverso se muestra en la página siguiente, obteniéndose los siguientes valores:

$$K_1 = 3.6829 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$$

$$n_1 = 0.2637$$

$$K_2 = 563.6911 \text{ M}^{-1}$$

$$n_2 = 6.8486$$

DISCUSION

El porcentaje de unión en el rango de concentraciones estudiadas, varía entre un 55 y un 95% por el método de diálisis de equilibrio, y de un 12 a un 81% por el método de precipitación ácida.

Aplicando el método gráfico de Scatchard o el del doble inverso a los resultados experimentales, se observa por ambos métodos la presencia de dos clases de lugares

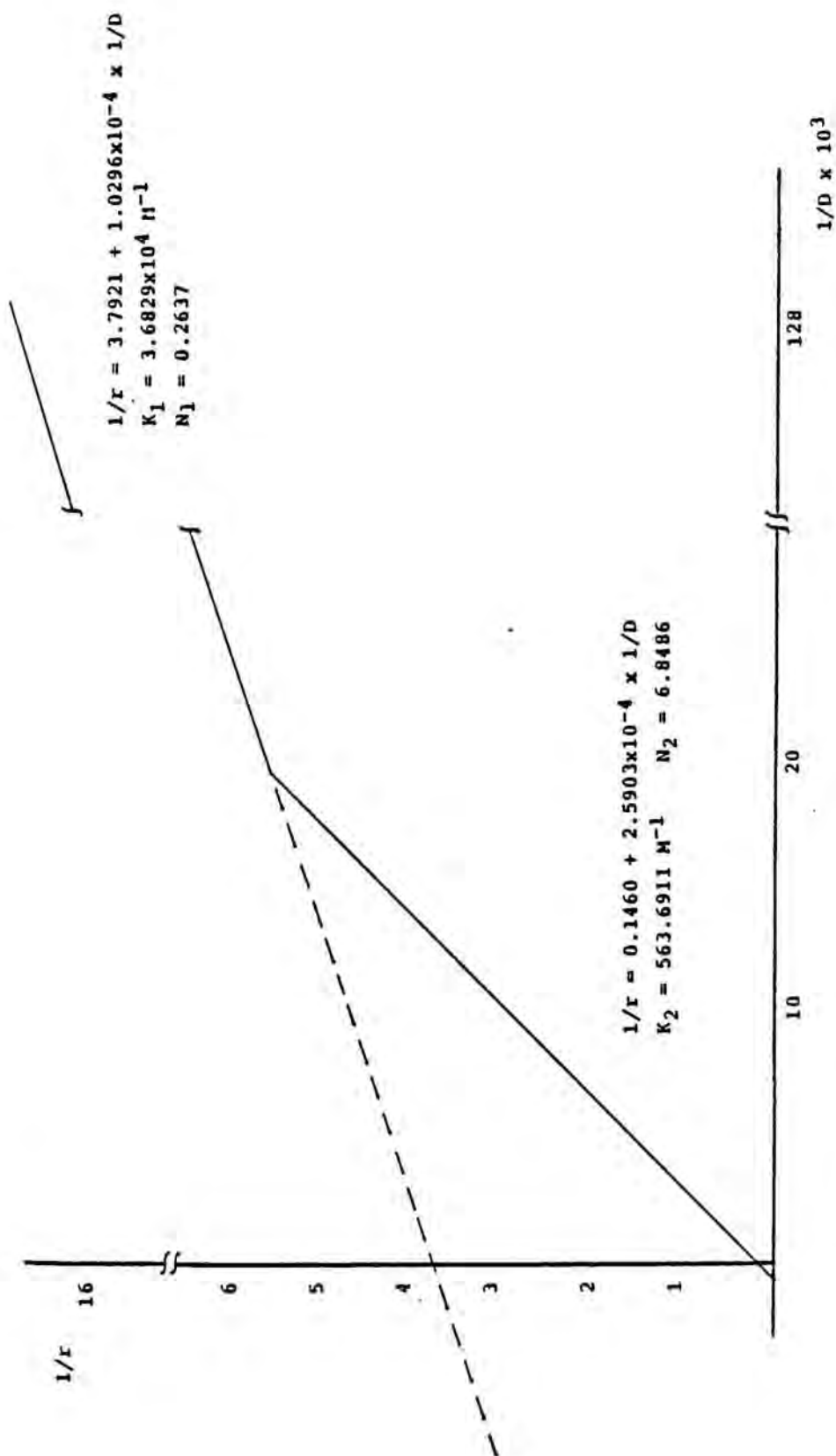


Figura 18.- Representación del doble inverso de los resultados obtenidos por Precipitación Ácida.

de unión, una de alta afinidad y baja capacidad, y otra de baja afinidad y alta capacidad.

En cuanto a la primera clase existen diferencias en el valor de la constante de asociación K_1 , unas siete veces mayor en la diálisis de equilibrio que en la precipitación ácida. Ello se debe, como ya se ha dicho, a que con este segundo método se detectan sólo las uniones irreversibles, mientras que con el primero se tienen en cuenta todos los tipos de fijación. El valor de n oscila entre 0.27 y 0.35.

Los resultados para la segunda clase de lugares de unión mostraron una mayor heterogeneidad. El valor de K_2 para el método de diálisis de equilibrio, osciló entre 59.15 M^{-1} , aplicando la ecuación de Scatchard y 426.1 M^{-1} , según el método del doble inverso. Ello se atribuye a limitaciones propias del análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados, siendo, no obstante, el producto $K_2 n_2$ del mismo orden en ambos casos. Los resultados para el método de la precipitación ácida muestran una K_2 del mismo orden que la obtenida por diálisis, aplicando la ecuación del doble inverso; sin embargo, el número de lugares de unión n_2 disminuye de 19.34 a 8.59.

Pero para que un modelo de unión sea teóricamente válido, los valores de n deben ser enteros. Por ello se aplicó un nuevo tratamiento matemático según el método de Feldman (FELDMAN 1972). Este método consiste en representar gráficamente la relación $(D-P)/(D)$ frente a $(D-P)$. Se obtiene así, una hipérbola de ecuación:

$$AX^2 + BXY + CY^2 + DX + EY = 0$$

siendo:

$$A = K_1 \times K_2$$

$$B = K_1 + K_2$$

$$C = 1$$

$$D = -K_1 \times K_2 (n_1 + n_2)$$

$$E = -K_1 n_1 - K_2 n_2$$

El cálculo de la ecuación de la hipérbola que más se ajusta a los valores experimentales se realizó mediante el programa "Marquardt's Least Squares", que se llevó a cabo en un ordenador Tektronix 4051.

Como resultado se obtuvieron los siguientes valores:

- Diálisis de equilibrio

$$K_1 = 30581.87$$

$$n_1 = 1$$

$$K_2 = 68.05$$

$$n_2 = 108$$

- Precipitación ácida

$$K_1 = 8097.49$$

$$n_1 = 1$$

$$K_2 = 551.45$$

$$n_2 = 7$$

La diferencia entre los valores de K obtenidos de este modo, con los calculados por el método de Scatchard se debe, también, a la propia limitación del análisis por regresión lineal.

Cuando por el método de Scatchard se ajustan los datos experimentales a dos rectas, esta disposición se rea-

liza según el valor del coeficiente de correlación para cada recta. De este modo se obtienen, tanto en los resultados de la diálisis de equilibrio como en los de la precipitación ácida, dos ecuaciones; una integrada por los datos experimentales correspondientes a las 3 primeras concentraciones, y otra por los 8 restantes.

Cuando estos valores se introducen en el programa antes mencionado, el ajuste al trazado hiperbólico se lleva a cabo descomponiendo la curva en dos tramos que abarcan, en el caso de la diálisis de equilibrio, los 5 primeros puntos y los 8 últimos respectivamente, considerando el 4º y 5º punto común a ambos. En la curva obtenida por precipitación ácida, se consigue con los 4 iniciales y los 7 finales, desechando en 11º punto y tomando el 4º común. Las gráficas correspondientes aparecen en las páginas siguientes.

De este modo la suma de cuadrados se reduce de 401.34 a 12.91 para la diálisis de equilibrio, y de 8338.14 a 38.93 para la precipitación ácida.

Por otro lado se han calculado las constantes estequiométricas K_i , a partir de las constantes de afinidad derivadas del método de la diálisis (FLETCHER 1976), resultando:

$$* K_1 = 33924.60$$

$$* K_2 = 2302248.80$$

Se ha constatado la existencia de cooperatividad negativa, tanto a partir de la gráfica de afinidad de las constantes de unión normalizadas (iK_i) frente a i (KLOTZ

1979), como por cumplimiento de la premisa establecida por FLETCHER (1976):

$$\frac{i}{i+1} K_i > \frac{N-i+1}{N-i} K_i + 1$$

siendo i el número de clases de unión, y N el número de puntos de unión.

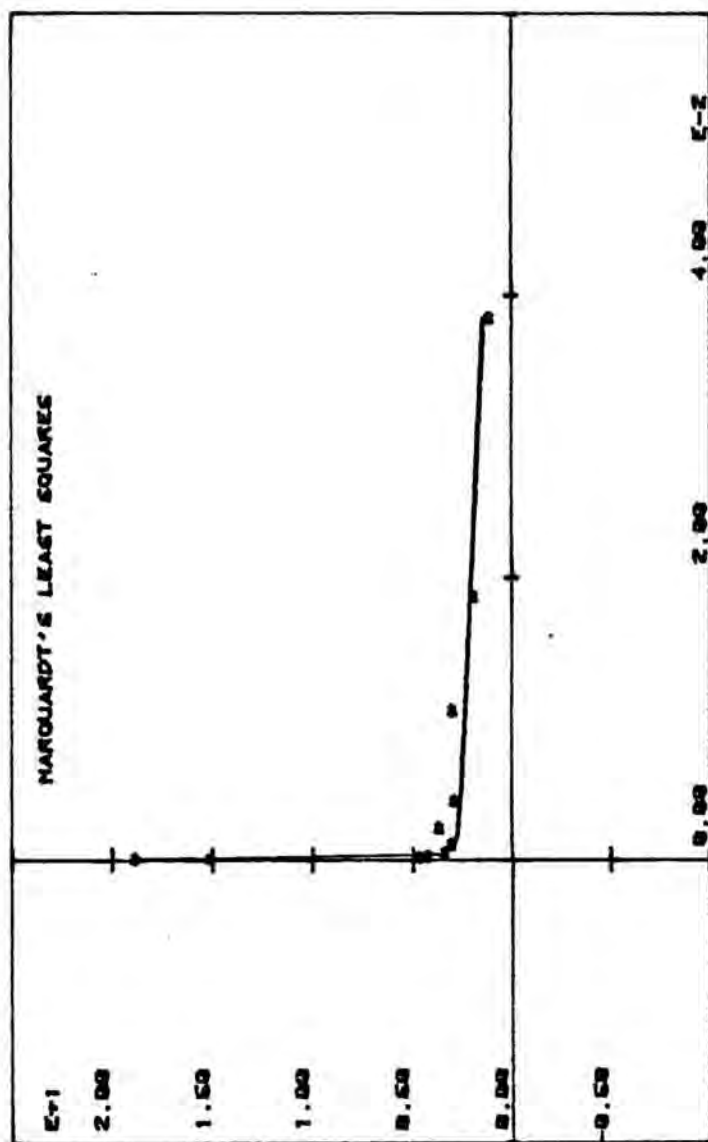


Figura 19.- Ajustado de los resultados de la Diálisis de Equilibrio a una hipérbola.

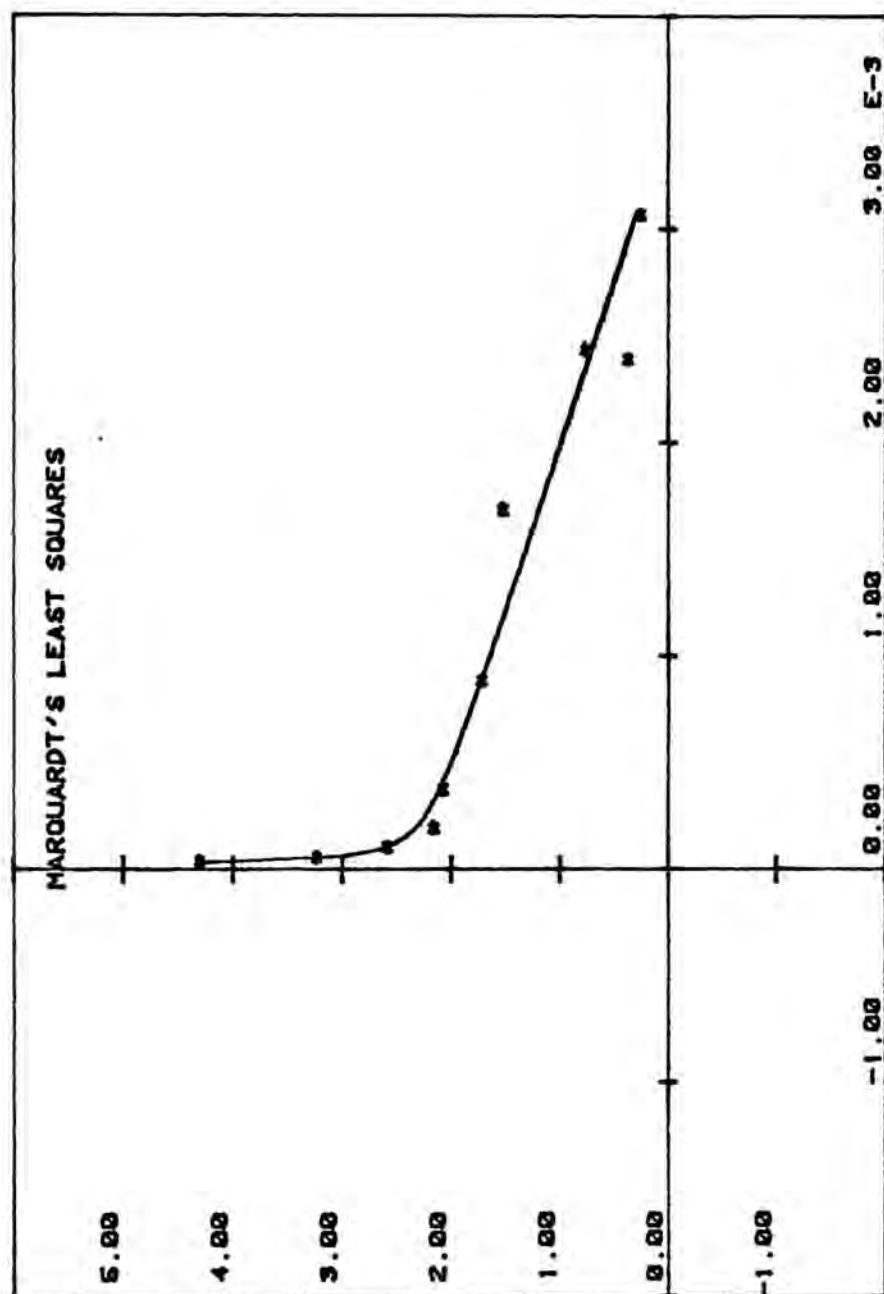


Figura 20.- Ajustado de los resultados obtenidos por Precipitación
Acida a una hipérbola.

3.3.5. DESPLAZAMIENTO POR EL ACIDO SALICILICO

Se ha estudiado el desplazamiento que podría producir el ácido salicílico, a fin de aportar nuevos datos acerca de la naturaleza y reversibilidad de la interacción entre el ácido cafeico y la SAB. Se escogió esta sustancia por ser también un ácido fenol, por tener unas características de fijación a proteínas muy estudiadas (DAVISON 1961, SPECTOR 1972) y por ser responsable del desplazamiento de muchos fármacos, generalmente de naturaleza acídica (DUNN 1973).

Al establecerse probablemente una competencia entre el ácido salicílico y el ácido cafeico en su unión a la albúmina, la presencia de ácido salicílico libre en la fracción libre podría suponer una interferencia importante en la lectura espectrofotométrica del ácido cafeico. Para evitarlo se utilizó el reactivo de Arnow para la detección de éste último (NICHIFORESCO 1965). La bibliografía cita esta reacción como una nitrosación altamente específica para los derivados o-dihidroxifenólicos. Su sensibilidad alcanza hasta 1 $\mu\text{g/ml}$ en el caso del ácido cafeico (NICHIFORESCO 1970).

El reactivo de Arnow se preparó de acuerdo con la siguiente fórmula:

Molibdato sódico	1 g
Nitrito sódico	1 g
Agua destilada c.s.p.	10 ml

Este reactivo forma un compuesto coloreado con el ácido cafeico, con un máximo de absorción entre 500 y 505 nm. Se establecieron las condiciones idóneas para lograr

una reacción cuantitativa, ya que la pauta citada por la bibliografía se basa en un solvente alcohólico y sólo permite determinaciones en un rango estrecho de concentraciones. La pauta final utilizada fue la siguiente:

0.5 ml de la solución problema se acidifican con 0.4 ml de ácido clorhídrico 1N. A continuación se añaden 0.8 ml del reactivo de Arnow. Se esperan 2 minutos y se añaden 0.8 ml de hidróxido sódico 1N. Al cabo de 10 minutos se procede a la lectura colorimétrica en el máximo de 500-505 nm, frente a un blanco sin ácido cafeico.

Para realizar la recta de calibrado se prepararon soluciones de ácido cafeico en tampón fosfato, pH 7.4, de concentraciones comprendidas entre 0.04 y 0.0025 mg/ml (concentración final tras la dilución que se produce al añadir los reactivos). Se determinó su absorbancia en el máximo de 500-505 nm, en las condiciones descritas anteriormente. Se obtuvo una recta de ecuación:

$$A = 24.5303 c + 0.0434$$

$$r = 0.9992$$

Las mediciones se llevaron a cabo en el rango de absorbancias de 0.080 a 1.000, ya que para concentraciones superiores de ácido cafeico la reacción no es lineal.

A fin de determinar en qué medida la presencia de ácido salicílico podía afectar la lectura del ácido cafeico según la reacción de Arnow, se realizó el espectro de absorción entre 600 y 400 nm de las siguientes soluciones, procesadas según la pauta descrita anteriormente:

- ácido cafeico 5.5×10^{-4} M

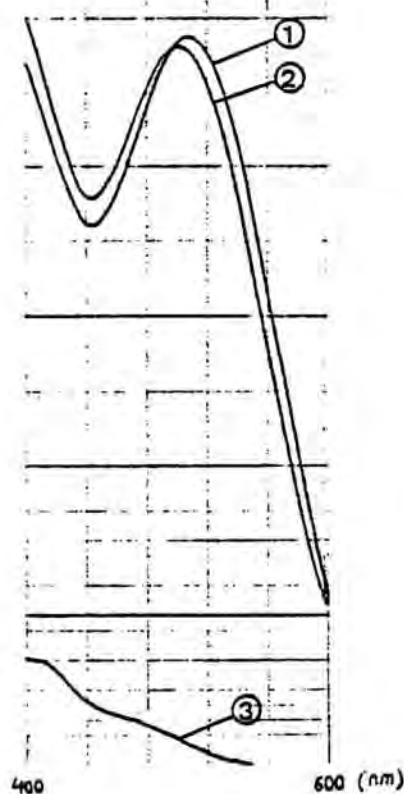


Figura 21.- Espectro de absorción de:

- 1) Acido cafeico $5.5 \times 10^{-4} \text{ M}$
- 2) Acido cafeico $5.5 \times 10^{-4} \text{ M}$
+ Acido salicílico
 $8.9 \times 10^{-3} \text{ M}$
- 3) Acido salicílico $8.9 \times 10^{-3} \text{ M}$

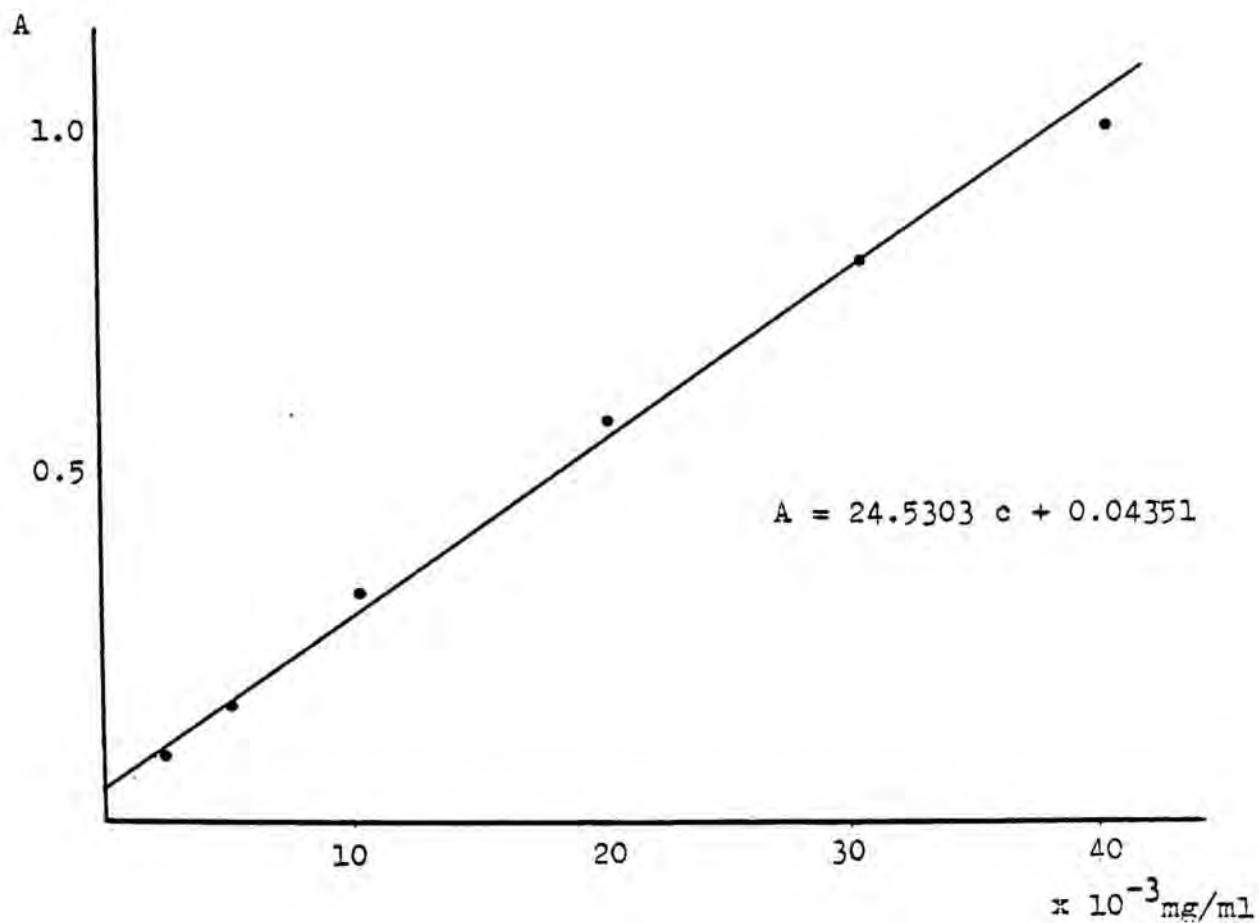


Figura 22.- Recta de calibración del ácido cafeico según la reacción de Arnow.

- ácido cafeico 5.5×10^{-4} M + ácido salicílico 8.9×10^{-3} M (relación molar 1:16)
- ácido salicílico 8.9×10^{-3} M

Aún con esta relación molar extrema, la presencia de ácido salicílico se ha comprobado que prácticamente no interfiere en la lectura colorimétrica del ácido cafeico con el reactivo de Arnow.

Posteriormente se procedió a incubar conjuntamente una solución de SAB al 8% con otras dos de ácido cafeico y ácido salicílico. Se ensayó una relación molar ácido salicílico/ácido cafeico desde 0 a 16. Las concentraciones finales de SAB y ácido cafeico fueron del 4% y 0.5 mg/ml (2.77×10^{-3} M) respectivamente. La mezcla se sometió 24 horas a 37°C, en la oscuridad y en agitación moderada y constante. Las muestras resultantes se procesaron por el método de la diálisis de equilibrio.

En la página siguiente se representan los valores de unión del ácido cafeico, obtenidos para cada relación molar. Los resultados permiten deducir que el ácido salicílico protagoniza un fenómeno de desplazamiento de la unión del ácido cafeico a la SAB, de carácter saturable, y que éste probablemente afecta a las uniones lábiles y no a las irreversibles.

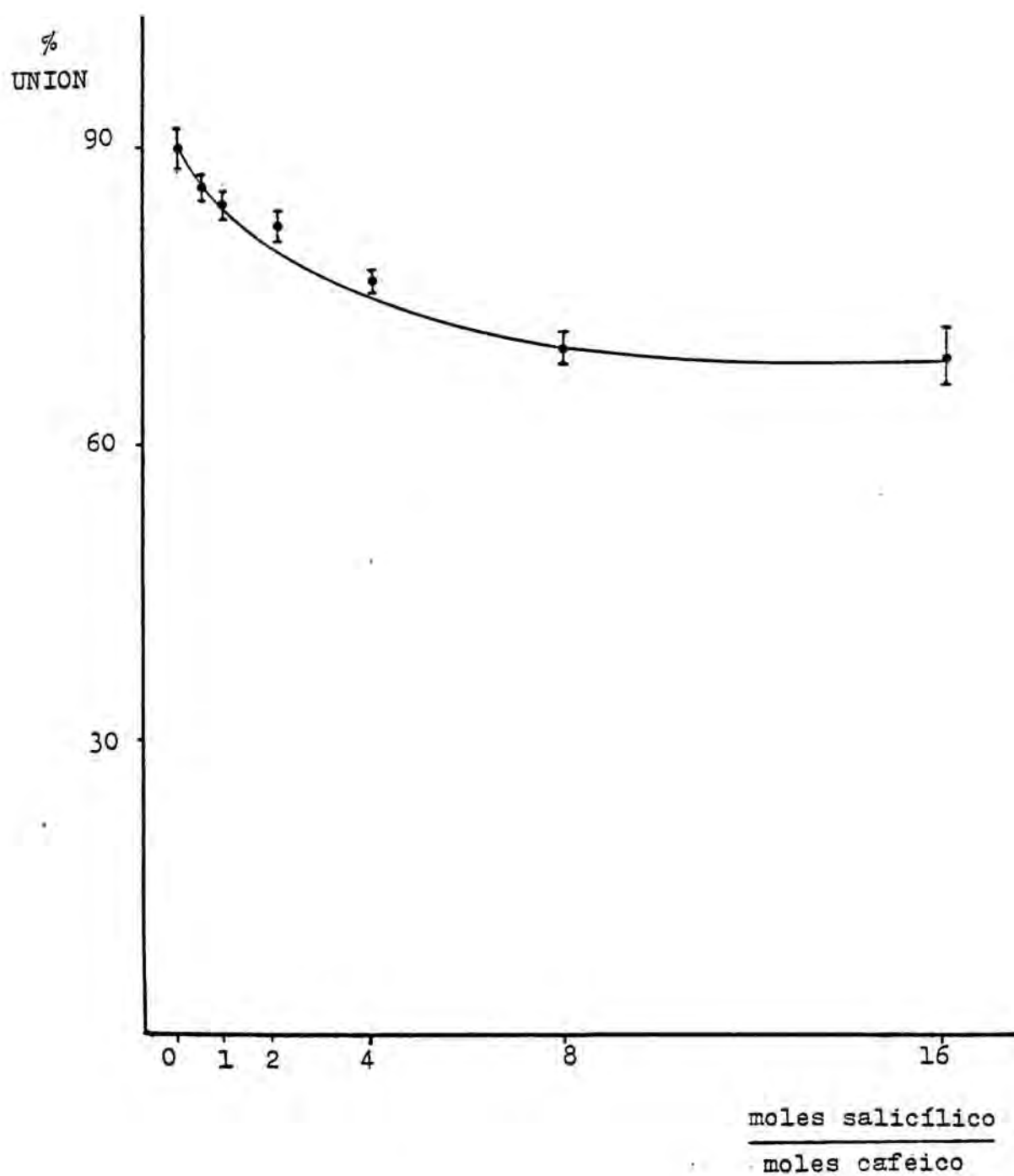


Figura 23.- Efecto del ácido salicílico en el porcentaje de unión del ácido cafeico a la SAB.

3.3.6. CARACTERIZACION DEL ENLACE

Se han llevado a cabo diversas experiencias para determinar la naturaleza de la interacción ácido cafeico-SAB, y comprobar a la vez si el ácido fenol unido a la proteína puede disociarse sin degradación de la molécula.

Irreversibilidad de la unión

Se realizó una diálisis de equilibrio con una solución que contenía SAB al 4% y ácido cafeico 0.5 mg/ml. Al finalizar el proceso, la solución del interior del saco de diálisis se procesó mediante:

- A. TCA 10%.
- B. Acido clorhídrico 2N durante 30 minutos a temperatura ambiente. El producto resultante se sometió a la acción de los ultrasonidos durante periodos de 20 minutos a 1 hora y/o calentamiento a 100°C durante 20 minutos. Al final se precipitó la proteína con TCA 10% y se lavó el precipitado con metanol.
- C. Metanol, agente que, al igual que el TCA 10%, se utiliza para la precipitación de proteínas, y que a la vez es el solvente de elección del ácido cafeico.

Por ninguno de los tres métodos se consiguió disociar totalmente el complejo, obteniéndose una recuperación del ácido fenol similar, excepto cuando se realizó el calentamiento a 100°C, que condujo a la degradación del ácido.

La utilización prolongada de ultrasonidos no aumentó la disociación del complejo. Todo ello indica que existe

alguna interacción entre el ácido cafeico y la SAB de naturaleza irreversible o, al menos, no disociable por los procedimientos utilizados.

Reacción entre el complejo ácido cafeico-SAB
y el reactivo de Arnow

Se preparó un incubado con SAB al 4% y una solución de ácido cafeico de 0.5 mg/ml. Para separar completamente el complejo del ácido cafeico libre, se dializaron de forma exhaustiva 2 ml del incubado frente a 500 ml de tampón fosfato, pH 7.4, durante 24 horas a 4°C. Al cabo de este tiempo se renovó el tampón, dializando de nuevo durante el mismo periodo de tiempo. En estas condiciones, el ácido cafeico libre en el interior del saco de diálisis es inferior al 0.1%.

Se trataron 0.5 ml del complejo así obtenido con el reactivo de Arnow, tal como se indica en el apartado 3.3.5. Para que el ácido cafeico dé un complejo coloreado con el reactivo de Arnow, se precisa que los dos hidroxilos de su molécula se encuentren libres. Al no observarse ningún cambio de coloración en la reacción practicada, parece ser que al menos uno de los grupos hidroxilo está implicado en la interacción con la SAB.

3.3.7. ESTUDIO DE LA INTERACCION DE LA SAB CON OTROS ACIDOS CINAMICOS

Una vez conocida y caracterizada la unión del ácido cafeico a la SAB, se llevaron a cabo experiencias similares con ácidos cinámicos no o-difenólicos (ácido ferúlico, ácido p-cumárico y ácido m-cumárico), a fin de obtener más datos sobre la naturaleza de la interacción de aquél con la albúmina. Por otra parte, es interesante conocer la fijación de otras sustancias de naturaleza fenólica, también muy difundidas entre los vegetales y con conocidas acciones farmacológicas.

ACIDO FERULICO

El ácido ferúlico (ácido 4-hidroxí-3-metoxicinámico) es un sólido cristalino blanco-amarillento, poco soluble en agua, ligeramente soluble en éter y soluble en agua caliente, acetato de etilo, soluciones acuosas alcalinas y etanol (en CRC HANDBOOK OF CHEMISTRY AND PHYSICS 1980).

Solubilización y estabilidad

La solubilización del ácido ferúlico (Fluka AG) se llevó a cabo de igual manera que con el ácido cafeico (apartado 2.1.1.).

Se comprobó la estabilidad de las soluciones preparadas (a las que se añadió bisulfito sódico al 0.1%), a 4 y 37°C. No se detectó alteración alguna a los 7 días ni a las 48 horas respectivamente. Este ácido fenol, al tener un grupo metoxilo en posición 3, en vez del hidroxilo del ácido cafeico, es menos oxidable que éste. Tampoco se

observaron alteraciones en soluciones de ácido ferúlico en TCA 10%-tampón fosfato pH 7.4 (4:1), a las 72 horas.

Rectas de calibrado

Se realizaron las rectas de calibrado del ácido ferúlico en tampón fosfato, pH 7.4, y en TCA 10%-tampón fosfato (4:1). Las lecturas se llevaron a cabo en los máximos de 309 y 322 nm respectivamente.

Cuando el solvente es tampón fosfato, se obtiene una recta de ecuación:

$$A = 80.8108 C + 0.0347 \quad r = 0.9910$$

En el caso del TCA 10%-tampón fosfato:

$$A = 91.4404 C + 0.0072 \quad r = 0.9999$$

Preparación de los incubados

Se realizó de igual modo que con el ácido cafeico (apartado 3.3.1.). Se ensayaron concentraciones que oscilaron entre 5 mg/ml ($2.58 \times 10^{-2}M$) y 0.025 mg/ml ($1.29 \times 10^{-4}M$).

Procesado de las muestras

Se utilizaron los métodos de precipitación ácida y de diálisis de equilibrio. En el primero, los resultados experimentales se corrigieron por el factor de adsorción al precipitado, calculado a cada concentración (hasta un máximo de un 11%). En el caso de la diálisis de equilibrio, se tuvo en cuenta el rendimiento de dialización, cu

yo valor medio fue de 75.6%, con escasa dispersión dentro del rango de concentraciones estudiado. El rendimiento no mejoró al aumentar el tiempo de dialización.

Resultados

Los porcentajes de fijación observados por el método de la precipitación ácida fueron inferiores al 10%, en todas las concentraciones estudiadas. A ello se añadió una elevada dispersión de los resultados experimentales, lo cual impidió su correcto análisis.

Los valores de fijación según el método de la diálisis de equilibrio, correspondientes a la media de 6 determinaciones, afectada por el ESM para $p = 0.05$, fueron:

CONCENTRACION ACIDO FERULICO	% UNION	r	r/D
1.29×10^{-4} M	14.06 ± 2.29	0.031	280.35
2.58×10^{-4} M	13.49 ± 1.08	0.060	268.35
5.16×10^{-4} M	14.78 ± 2.45	0.131	297.57
1.29×10^{-3} M	12.84 ± 0.32	0.285	254.06
2.58×10^{-3} M	12.09 ± 1.87	0.537	237.10
5.16×10^{-3} M	7.79 ± 1.95	0.691	145.62
1.29×10^{-2} M	2.58 ± 1.73	0.574	45.66
2.58×10^{-2} M	1.93 ± 0.97	0.855	33.93

Aplicando el método gráfico de Scatchard a estos resultados se obtiene un trazado rectilíneo, tal como se aprecia en la gráfica de la página siguiente.

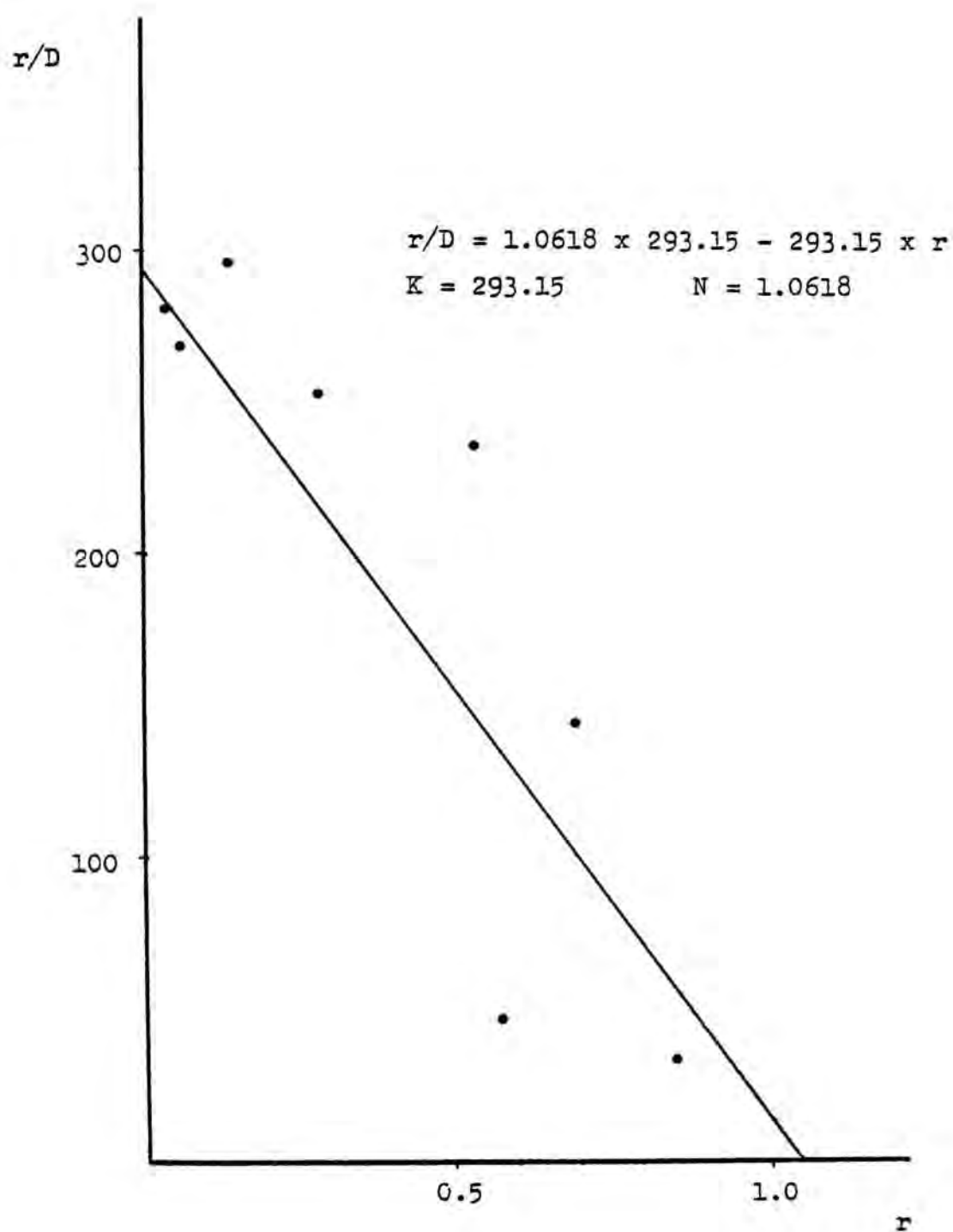


Figura 24.- Representación de Scatchard de los resultados obtenidos para el ácido ferúlico por diálisis de equilibrio.

Los valores de la constante de afinidad y número de lugares de unión son los siguientes:

$$K = 293.15 \text{ M}^{-1}$$

$$n = 1.0618$$

lo que indica un lugar de unión de baja afinidad.

Ello probablemente representa una visión parcial del comportamiento del ácido ferúlico en su fijación a la SAB, ya que la lectura espectrofotométrica a concentraciones inferiores se ve imposibilitada.

ACIDO p-CUMARICO

El ácido p-cumárico (ácido 4-hidroxicinámico) es un sólido cristalino blanco-amarillento, ligeramento soluble en agua y benceno y soluble en éter, etanol y soluciones acuosas alcalinas (en CRC HANDBOOK OF CHEMISTRY AND PHYSICS 1980).

Solubilidad y estabilidad

El ácido p-cumárico (Fluka AG) se solubilizó del mismo modo que el ácido cafeico (Apartado 2.1.1.), siendo la estabilidad análoga a la observada en las soluciones de ácido ferúlico, tanto a 4°C como a 37°C. Tampoco se detectaron alteraciones a las 72 horas en TCA 10%-tampón fosfato (4:1).

Rectas de calibrado

El ácido p-cumárico, disuelto en tampón fosfato pH 7.4, presenta un espectro U.V. con dos máximos a 208 y 285 nm, escogiéndose este último para el calibrado. La ecuación de la recta obtenida aplicando el método de los mínimos cuadrados fue:

$$A = 135.6372 C - 0.0045 \quad r = 0.9996$$

Para el ácido p-cumárico disuelto en TCA 10%-tampón fosfato (4:1), se observan dos máximos a 240 y 308 nm. La recta de calibrado se obtuvo en el máximo de 308 nm, siendo la ecuación:

$$A = 133.5024 C - 0.0016 \quad r = 0.9999$$

Preparación de los incubados y procesamiento de las muestras

Se realizó de igual manera a la descrita para el ácido cafeico. Se ensayaron concentraciones entre 5 mg/ml ($3.05 \times 10^{-2}M$) y 0.025 mg/ml ($1.52 \times 10^{-4}M$). Las muestras se procesaron por los métodos de precipitación ácida y de diálisis de equilibrio frente a sus respectivos blancos.

Resultados

Por ambos métodos se obtuvieron porcentajes de unión inferiores siempre al 10%.

ACIDO m-CUMARICO

El ácido m-cumárico (ácido 3-hidroxicinnámico) es un sólido cristalino blanco-amarillento, ligeramente soluble en agua y éter, y soluble en etanol y soluciones acuosas alcalinas (The Merck Index 1983). Al contrario que los otros ácidos fenoles, se trata de una sustancia únicamente disponible mediante síntesis química, no habiéndose detectado hasta el momento su presencia en organismos vegetales.

Las soluciones se prepararon tal como se describe en el Apartado 2.1.1. Su estabilidad fue similar a la observada para el ácido p-cumárico.

Recta de calibrado

El espectro U.V. del ácido m-cumárico en tampón fosfato, pH 7.4, presenta dos máximos de absorción a 210 y 285 nm, realizándose la calibración en este último. La ecuación de la recta fue:

$$A = 110.7223 C - 0.0109 \quad r = 0.9999$$

Procesado de los incubados

Se ensayaron concentraciones de ácido m-cumárico (Fluka AG) entre 5 mg/ml ($3.05 \times 10^{-2} M$) y 0.025 mg/ml ($1.52 \times 10^{-4} M$). Para el procesado de las muestras se utilizó el método de la diálisis de equilibrio, ya que en la técnica de la precipitación ácida, la unión queda enmascarada por la adsorción al precipitado.

Resultados

La fijación del ácido m-cumárico a la SAB es muy baja en el intervalo de concentraciones estudiado, siendo el porcentaje máximo de unión del 5%.

DISCUSION

De los resultados obtenidos se concluye que la presencia de los dos grupos hidroxilo es de capital importancia en la unión del ácido cafeico a la SAB, ya que el porcentaje de fijación de los ácidos cinámicos no orto-difenólicos es notablemente inferior.

La integridad del grupo catecol parece desempeñar un papel primordial tanto a nivel de la acción farmacológica como de la fijación a proteínas (CUATRECASAS 1974, MAY 1974). En otros compuestos naturales orto-difenólicos, como las catecolaminas, se ha especulado sobre si el grupo catecol o la cadena lateral son los que participan más activamente en la fijación, existiendo discrepancias entre diversos autores (ZIA 1971, DANON 1972).

UNION A TEJIDOS

4. UNION A TEJIDOS

La distribución tisular comprende todos aquellos procesos de reparto del fármaco en el conjunto de tejidos y órganos (LABAUNE 1984). Este fenómeno debe ser tenido en cuenta después de una administración intravenosa o después de la absorción tras una administración oral.

Al igual que la unión a las proteínas plasmáticas, estos procesos condicionan la cantidad de fármaco que después de la administración queda disponible.

Si bien en general cualquier fármaco puede distribuirse por todos los órganos, existen cuatro factores que modifican la intensidad y velocidad del reparto:

- Fijación a las proteínas plasmáticas y tisulares.
- Características físico-químicas del compuesto.
- Irrigación de los tejidos.
- Afinidad particular del tejido.

FIJACION A LAS PROTEINAS TISULARES

Existe sin duda, un fenómeno de competición entre la fijación de una molécula a las proteínas plasmáticas y la fijación a los distintos tejidos. En ocasiones esta segunda asume un papel más importante debido a:

- Elevada afinidad por las proteínas tisulares.
- Afinidad por los ácidos nucleicos.
- Afinidad lipídica, en el caso de sustancias liposolubles.

Según este criterio, FICHTL (1981) clasificó los fármacos en tres grupos, a saber:

- Grupo I: Incluye aquellas sustancias cuya unión a las proteínas plasmáticas es notablemente superior a la del tejido.
- Grupo II: Caracterizado por porcentajes del mismo orden de magnitud en plasma y tejidos.
- Grupo III: Fármacos que presentan una mayor tasa de fijación a los tejidos frente a las proteínas plasmáticas.

En consecuencia, una sustancia unida fuertemente a las proteínas plasmáticas, puede tener un volumen de distribución elevado, como es el caso de aquellas moléculas que se fijan a la α_1 -glicoproteína ácida, como por ejemplo la imipramina o el propranolol.

CARACTERISTICAS FISICO-QUIMICAS DEL PRODUCTO

Si la cantidad de sustancia susceptible de ser distribuida depende del efecto de primer paso y del coeficiente de absorción, y éste último está notablemente influido por el pKa y el Kp, estos mismos factores juegan un papel primordial en la distribución tisular.

En efecto, si bien se requiere una cierta hidrosolubilidad del compuesto para que éste pueda inmiscuirse en el medio acuoso intra y extracelular, la liposolubilidad es esencial para que sea efectivo el paso a través de las membranas celulares o barreras lipoproteicas.

Al mismo tiempo el pKa y el pH del medio determinan el grado de ionización de la molécula y por tanto influye en los procesos mencionados.

IRRIGACION DE LOS TEJIDOS

Este es el factor que justifica la diferente veloci-

dad de distribución entre los diversos tejidos en el caso de aquellas sustancias de peso molecular bajo o altamente liposolubles.

Según su irrigación pueden distinguirse dos grupos de órganos (LABAUNE 1984):

- Organos muy irrigados: Hígado, riñones, corazón, pulmones, cerebro.
- Organos poco irrigados: Piel, músculo esquelético, grasa.

La relación entre la velocidad de irrigación tisular y la de distribución en el mismo tejido fue establecida por ROWLAND en los siguientes términos:

La cantidad de sustancia en el tejido en el estado de equilibrio es igual a:

$$K_p \times V_t \times C_a$$

Siendo K_p : La relación entre las concentraciones tisular y sanguínea del fármaco en el equilibrio; V_t : El volumen tisular y C_a : La concentración arterial del fármaco.

El tiempo necesario para alcanzar el equilibrio se deduce de la expresión:

$$\frac{K_p}{Q/V_t}$$

Siendo Q : El débito sanguíneo del órgano.

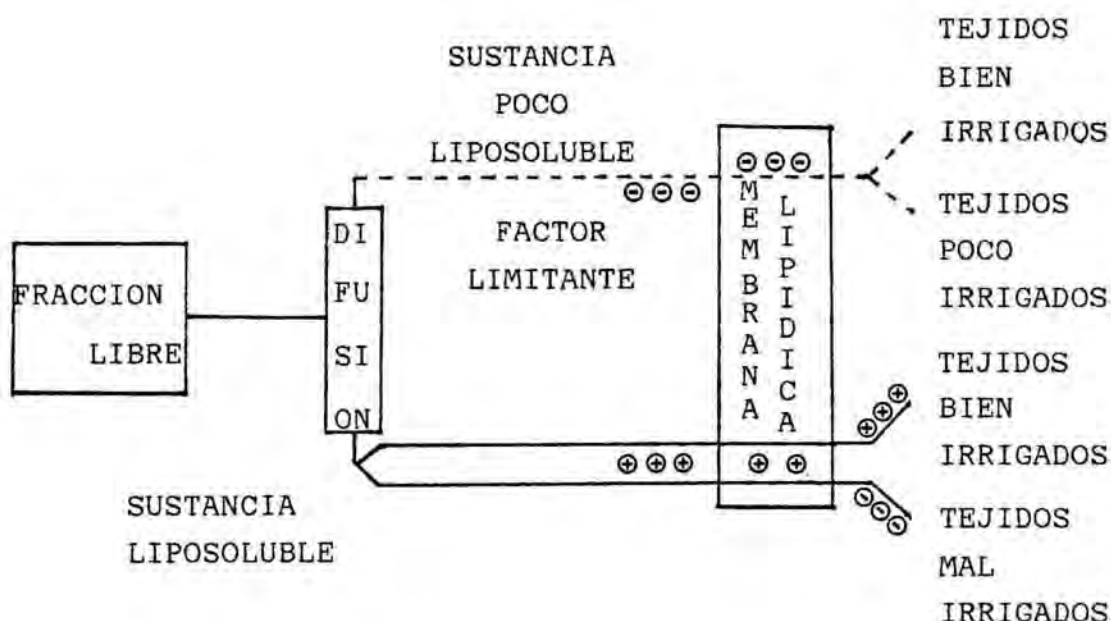
AFINIDAD PARTICULAR DEL TEJIDO

La diferencia entre la cantidad de un mismo fármaco fijada a determinados tejidos puede deberse a tres factores:

- A) Tropismo por el lugar de acción: Los fármacos se fijan preferentemente a nivel de aquellas regiones donde manifiestan su actividad.

- B) Actividad metabólica y excretora: La mayoría de los fármacos se concentran a nivel hepático y renal debido a la intensa actividad metabólica del hígado y a la función excretora del riñón.
- C) Reacciones químicas entre el fármaco y ciertos constituyentes del organismo: Tal es el caso de la fijación de las tetraciclinas al tejido óseo por fenómenos de quelación del calcio, la unión de sustancias liposolubles a las grasas o, por ejemplo, la reacción entre las fenotiacinas y los pigmentos melánicos oculares o cutáneos.

En resumen, podemos establecer que los principales factores limitantes de la distribución tisular son la difusión a través de las membranas lipídicas y la irrigación tisular.



En general, la fijación de una sustancia a los tejidos posee un carácter reversible. En caso contrario, la unión covalente o irreversible de un fármaco o sus metabolitos puede ser el origen de fenómenos tóxicos de gran importancia en el desarrollo de enfermedades yatrogénicas.

4.1. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

El método experimental seguido para la determinación de la fijación a diversos órganos y acumulación tisular, requiere la administración al animal del producto marcado radioactivamente. Se sacrifica el animal y se extraen los órganos, los cuales se homogenizan y se someten a centrifugación diferencial. La determinación de la radioactividad se lleva a cabo en el sobrenadante.

Si no se dispone de la molécula marcada, los homogenizados deben someterse a métodos de separación ya citados en la determinación de la unión a proteínas plasmáticas.

En este último caso, la valoración depende de los métodos analíticos que han de ser lo más específicos y sensibles, sin que interfieran otras moléculas presentes en el homogenado.

En muchos casos es difícil conseguir todos estos requisitos, por lo que es preferible la determinación "in vitro" tal como se ha hecho en el caso del ácido cafeico.

Se han utilizado ratas hembras Sprague-Dawley (180-220 g), mantenidas en ayuno 24 horas antes de la experiencia con agua "ad libitum".

Los animales se sacrificaron por traumatismo craneal y posterior exsanguinación por arteriotomía carotídea. El animal se coloca sobre una tabla en posición de decúbito supino. La vena femoral izquierda se perfunde con suero fisiológico frío (4°C) hasta la total exsanguinación a través de la arteria carótida común derecha, previamente cateterizada.

Se extirpan los órganos sujetos a estudio, que en es

te caso fueron: Hígado, Corazón, Riñón, Bazo y Cerebro to tal.

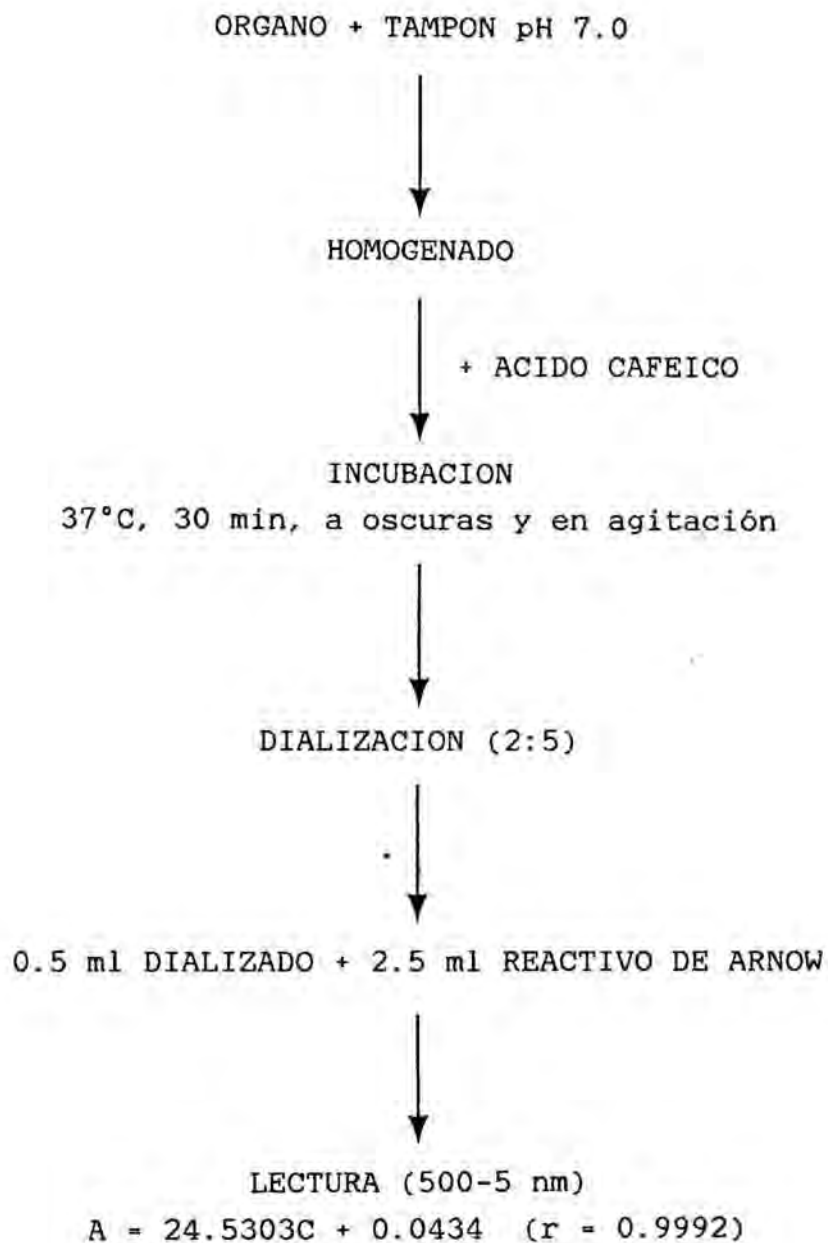
La obtención de este último requiere una cuidada téc nica. Tras incidir y separar la piel, se pone al descubierto la calota craneal, erinando los parietales en sentido caudo-craneal y visualizando la totalidad de la masa ence fálica, que es extirpada en su conjunto.

Una vez extirpados los órganos, se secan sobre papel de filtro y se pesa 1g de tejido o la totalidad del órgano si el peso es inferior. Se homogenizan con un Potter de vidrio y vástago de teflón (Heildolph) durante 2 minutos a 3000 rpm en un volumen adecuado de tampón fosfato 0.05 M, pH 7 e isotónico, para obtener una densidad similar en todos ellos. El valor de esta densidad se verificó experimentalmente.

A continuación se adiciona al homogenado un volumen igual de solución tamponada de ácido cafeico (1 mg/ml). Esta mezcla se incuba durante 30 minutos a 37°C, al abrigo de la luz y en agitación moderada.

2 ml de la solución de incubado se dializan en un tu bo de membrana de celofán tipo Visking de poro 8/32" frente a 5 ml de tampón fosfato a 4°C y en la oscuridad durante 8 horas (SCHUHMANN 1984).

Para evitar la interferencia de otras moléculas que absorben a 280-310 nm, es necesario utilizar una reacción específica con el reactivo de Arnow (ver apartado 3.3.5.). El ácido cafeico libre presente en 0.5 ml de la solución dializada exterior del saco, se valora a 500-505 nm. La diferencia entre el ácido cafeico adicionado al medio de incubación y el dializado, es la cantidad de ácido unido al tejido.



Esquema del protocolo seguido en la determinación del % de fijación tisular del ácido cafeico.

Verificación experimental de la densidad de los homogenados

El tampón fosfato se elabora a partir de agua bidestilada y filtrada (filtros de celulosa Millipore, poro 0.45) en la que se disuelven:

$\text{Na}_2\text{PO}_4\text{H} \cdot 12\text{H}_2\text{O}$		11.106 g
KPO_4H_2		2.584 g
NaCl		5.719 g
H_2O	c.s.p..	1,000 ml

para obtener un pH igual a 7. El peso exacto de 1 ml de tampón así elaborado es de 0.9929 g.

A continuación se pesa exactamente cada tejido previamente secado y se añade un volumen determinado de tampón según el órgano y adecuado para obtener un correcto homogenado en cada caso fue:

Hígado: X g + X ml de tampón.

Corazón: X g + (1+X) ml de tampón.

Riñón: X g + 2X ml de tampón.

Bazo: X g + 2X ml de tampón.

Cerebro: X g + X ml de tampón.

Se homogeniza la mezcla y se pesa 1 ml del homogenado resultante. A partir de este dato puede conocerse con exactitud la cantidad de tejido presente en 1 ml del homogenado.

Xg tejido + Yml tampón (0.9929 g/ml)

↓
Homogenado

↓
1ml homogenado → Z g

$$\frac{\text{Xg tejido} + \text{Yml tampón}}{\text{Vol. homog.}} = \frac{\text{Zg}}{1\text{ml}}$$

Siendo Xg tejido/Vol. homog. la densidad del homogenado.

4.2. RESULTADOS

Todos los resultados son los valores medios de 7 experiencias para cada órgano y su correspondiente desviación standard. Los resultados obtenidos figuran en la Tabla 1, así como el histograma correspondiente (Figura 25).

En todos los casos se representa como "B" los moles de ácido cafeico unido por gramo de tejido y "F" la concentración de ácido cafeico libre.

Por tanto puede establecerse el siguiente orden de afinidad:

Riñón > Corazón > Bazo > Cerebro > Hígado.

De la determinación de los P_{ka} s se deduce que la principal especie molecular presente en la solución acuosa a pH 7, es la resultante de la ionización del grupo carboxilo (ver apartado 2.1.3).

Conociendo el K_p a pH 7.4 del ácido cafeico en distintos solventes (ver apartado 2.1.4), el coeficiente de partición efectivo (K_d) a pH 7 no varía mucho del K_p calculado:

<u>Solventes</u>	<u>K_p(pH 7.4)</u>	<u>K_d(pH 7)</u>
Octanol/tampón	0.0622	0.0619
Ciclohexano/tampón	0.0515	0.0512
t-Amílico/tampón	0.1024	0.1019

Esta tabla muestra los valores más elevados para los solventes orgánicos más oxigenados, indicando la posibilidad de que los puentes de hidrógeno jueguen un papel primordial en la fijación del ácido cafeico a los tejidos corroborado por el hecho de que a pH fisiológico, el grupo

TEJIDO	Densidad Homog _e nada (mg/ml)	mg Caf. unido g tejido $\pm \sigma_{n-1}$	$B \times 10^{-6} \pm \sigma_{n-1}$	$B/F \pm \sigma_{n-1}$	Log B/F
BAZO	0.110	1.417 ± 0.163	7.865 ± 0.905	4.158 ± 0.717	0.619
CORAZON	0.167	1.331 ± 0.111	7.389 ± 0.616	4.847 ± 0.788	0.685
RIÑON	0.176	1.318 ± 0.157	7.315 ± 0.871	5.030 ± 1.147	0.701
CEREBRO	0.199	0.887 ± 0.156	4.925 ± 0.866	2.804 ± 0.719	0.448
HIGADO	0.262	0.789 ± 0.062	4.378 ± 0.344	2.703 ± 0.370	0.432

Tabla I.- Resultados obtenidos en las experiencias de la fijación tisular del ácido cafeico.

catecol del ácido fenol no está prácticamente ionizado como se desprende de los valores de los pK_a s calculados.

De los anteriores resultados puede establecerse que el hígado es el órgano por el cual el ácido cafeico posee una menor afinidad. Este dato se halla en concordancia con la bibliografía. PETRAKIS y col. (1959) estudiaron la distribución y el metabolismo de ciertos flavonoides. Observaron que 12 horas después de ser administrados se detectaban en el CO_2 expirado, en el riñón, en la orina, en sangre, etc., pero no en el hígado.

La fijación "in vitro" del ácido cafeico a la SAB a una concentración igualmente de 1 mg/ml es, como ya se ha expuesto de 0.580 (expresado como log de la concentración de sustancia unida frente a la concentración de sustancia libre) (Fig. 25). Este resultado no difiere notablemente de los valores obtenidos en la unión a los tejidos.

Por tanto, puede incluirse el ácido cafeico en el Grupo II, según la clasificación de FICHTL antes mencionada, y caracterizado por porcentajes de unión del mismo orden de magnitud tanto en plasma como en tejidos.

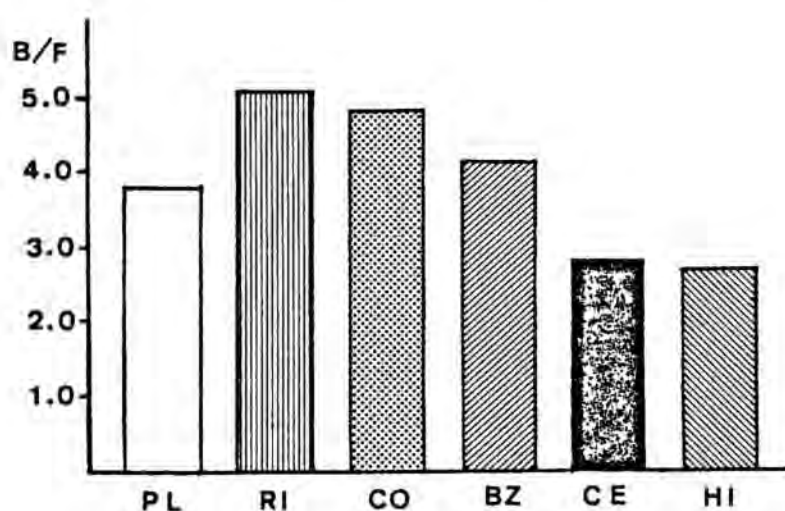


Figura 25.- Histograma correspondiente a la fijación tisular del ácido cafeico.

COMPORTAMIENTO

FARMACOCINETICO

5. COMPORTAMIENTO FARMACOCINETICO

Los cambios de concentración de un fármaco en función del tiempo pueden estudiarse en todos aquellos fluídos corporales y tejidos en que dicha concentración puede ser determinada. Tales estudios sólo son válidos en ciertas condiciones experimentales, muy específicas, ya que únicamente permiten sacar conclusiones cualitativas o generalizaciones respecto a la influencia de determinados factores. Si se precisa caracterizar el comportamiento de un fármaco en un determinado organismo, estudiar su modificación bajo ciertas condiciones experimentales o realizar determinadas predicciones como son por ejemplo, cálculos de régimen de dosificación, de curvas de concentración a dosis múltiples o evaluación del riesgo de toxicidad en cierta posología, es necesario realizar un análisis cinético de la relación dosis-concentración del fármaco, así como la descripción de los datos experimentales mediante parámetros adecuados.

Un análisis cinético completo de los datos experimentales incluye tres etapas:

- a) Elección de un modelo farmacocinético adecuado.
- b) Ajuste de la curva teórica a los datos experimentales.
- c) Utilización de parámetros adecuados para las predicciones.

Las tres son totalmente interdependientes y limitadas por la verosimilitud de los datos experimentales, la validez de los programas informatizados y el total de las predicciones.

Debe tenerse cuidado al informatizar las constantes.

Es inútil pues, intentar adecuar un trabajo experimental mediante un inadecuado método informático. Los mejores métodos son aquellos que hacen uso del mayor número de datos experimentales y consiguen límites reales de error en las constantes obtenidas. Por otra parte, los datos pueden interpretarse en términos del mínimo número de parámetros adecuados con la precisión de los resultados (ROSSOTTI 1961).

5.1. VIA INTRAVENOSA

El fármaco, tras su administración, se ve sometido a ciertos procesos que permiten su difusión a los tejidos y su excreción por vía renal, biliar, etc.

En general, estos fenómenos son de orden uno, y por tanto, la velocidad de un determinado proceso depende directamente de la concentración del fármaco a cierto nivel y varía con el tiempo. Matemáticamente, este fenómeno se expresa mediante la siguiente ecuación:

$$dC/dt = -KC \quad (1)$$

Siendo C: La concentración del fármaco; K: La constante de velocidad de primer orden y t: El tiempo.

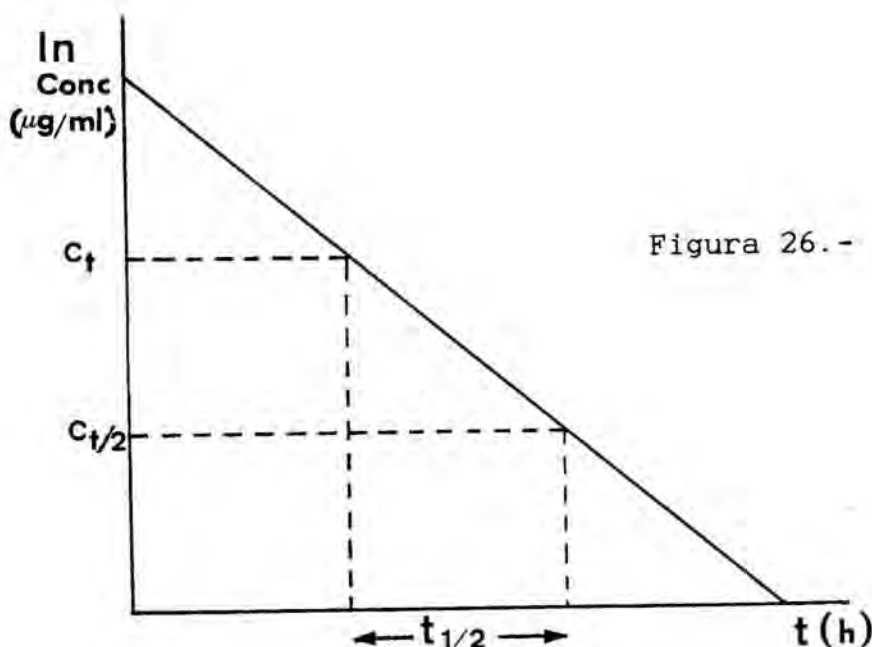
La velocidad de variación de la concentración de una sustancia por unidad de tiempo, corresponde pues, al producto de la concentración de la misma por la constante de velocidad de primer orden. De este proceso se derivan dos consecuencias.

- a) La velocidad de eliminación de una sustancia es directamente proporcional a su concentración.
- b) El logaritmo natural o decimal de la concentración varía linealmente en función del tiempo.

De la integración de la ecuación (1), se obtiene la expresión:

$$\ln C_t = \ln C_o - Kt \quad (2)$$

Siendo C_t : La concentración en cada instante t ; C_o : La concentración a $t = 0$; y K : La constante de velocidad de primer orden.



La ordenada en el origen representa la C_o . La pendiente de la recta corresponde al valor de K . La ecuación (2) puede expresarse también como:

$$\ln C_t / C_o = -Kt \quad (3) \quad \text{ó} \quad C_t = C_o \times e^{-Kt} \quad (4)$$

$$\text{ó} \quad \log C_t = \log C_o - K/2.303 \times t \quad (5)$$

El proceso de primer orden se caracteriza principalmente por su semivida ($t_{1/2}$) (ver Fig. 26), más que por su constante de velocidad K . Esta semivida corresponde al tiempo necesario para que una concentración C_t sea $C_{t/2}$.

Matemáticamente, este parámetro puede calcularse a partir de la ecuación (5), de la que se deduce:

$$K = 2.303/t \times \log Co/Ct \quad (6)$$

$$\text{Si } Ct = Co/2$$

$$K = 2.303/t_{1/2} \times \log Co/Co/2$$

$$K = 2.303/t_{1/2} \times \log 2$$

$$\text{Si } \log 2 = 0.301$$

$$K = 0.693/t_{1/2}$$

$$\text{y, } t_{1/2} = 0.693/K$$

Por tanto, en un proceso de primer orden, la semivida es constante e independiente de la concentración inicial y de la dosis administrada.

Todas estas consideraciones permiten expresar la evolución de las concentraciones plasmáticas de un fármaco según la ecuación exponencial:

$$C = A \times e^{-\alpha t}$$

Siendo $A = Co$ y $\alpha = K$. Esta ecuación es representativa de los fármacos monocompartimentales tras su administración intravenosa.

5.1.1. CINETICA PLASMATICA E INTERPRETACION MATEMATICA

La determinación de las características farmacocinéticas de un fármaco se realiza generalmente para estudiar la variación de las concentraciones plasmáticas en función del

tiempo. El análisis de los datos experimentales conduce a la expresión matemática ideal de la curva obtenida, según un modelo compartimental.

El primer paso consiste en representar los puntos experimentales en coordenadas semilogarítmicas. El segundo paso implica la descomposición de la curva obtenida en una o varias rectas representativas de uno o varios fenómenos exponenciales, unidos a uno o varios procesos de primer orden (comportamiento pluricompartimental). En general, la situación suele ser compleja, correspondiendo a un fenómeno pluriexponencial.

La explicación reside en que el fármaco en el organismo, inicialmente, se distribuye a nivel tisular siguiendo así un proceso de eliminación. Esta situación se traduce gráficamente en un primer segmento lineal.

Finalizada la distribución, interviene un único proceso de eliminación, y en consecuencia, la curva sigue una pendiente menos pronunciada, correspondiente a un segundo segmento lineal.

Este fenómeno puede expresarse matemáticamente como un proceso biexponencial (comportamiento bicompartimental), que se adecúa a la siguiente ecuación:

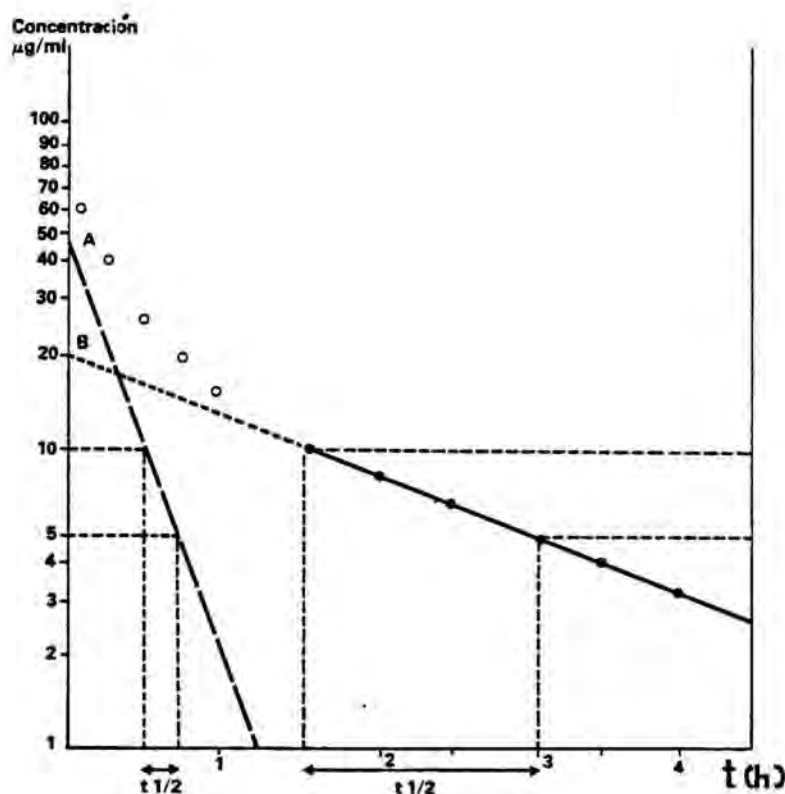
$$C = A \times e^{-\alpha t} + B \times e^{-\beta t}$$

Siendo C: La concentración plasmática instantánea (en $\mu\text{g/ml}$); A y B: Los valores de concentración constantes para cada exponencial (en $\mu\text{g/ml}$); y α y β : Las constantes de velocidad correspondientes a los dos procesos de primer orden expresadas en horas^{-1} .

Si consideramos la curva de la página 127, la descom-

posición de la curva se efectúa siempre desde los últimos valores de t hacia los iniciales.

La primera recta observada se prolonga hasta su intersección con el eje de ordenadas. La ordenada en el origen corresponde al coeficiente B de la curva exponencial terminal. Este segmento lineal tiene una pendiente $m = K/2.303$, denominada β .



Se representa semilogarítmicamente la diferencia entre los valores experimentales (C_e) y los extrapolados (C_d) para cada tiempo. La intersección de la recta obtenida con el eje de ordenadas corresponde al coeficiente A de la primera curva exponencial, caracterizada por la pendiente siguiente $K'/2.303 = \alpha$ (fase α o de distribución).

Gráficamente es posible determinar por este método de descomposición de la curva, llamado de los residuales o de

retroproyección, la semivida de cada uno de los dos procesos, de donde se puede deducir, dado el caso, sus constantes de velocidad respectivas.

- Fase β : $t_{1/2} = 0.693/\beta$

- Fase α : $t_{1/2} = 0.693/\alpha$

5.1.2. ELECCION DEL MODELO FARMACOCINETICO OPTIMO

El primer paso de un análisis cinético comporta una simplificación del organismo en compartimentos que permita la interpretación del paso del fármaco en el organismo desde un punto de vista matemático, a fin de establecer las ecuaciones que mejor expliquen este proceso. Se trata pues, de escoger el modelo compartimental pertinente (BERMAN 1962a y 1962b).

. Un modelo compartimental consiste básicamente en:

- a) Unos términos que describan el proceso.
- b) Unos símbolos de significado definido.
- c) Unas ecuaciones matemáticas.
- d) Unos análogos físicos.

La descripción verbal de una situación experimental es el inicio en la construcción de un modelo, pero no adquiere ninguna importancia si no se procede a un esquema de símbolos definidos, a las correspondientes ecuaciones matemáticas y/o a los análogos físicos.

En la medida que sea posible la construcción de un modelo debe empezar por la descripción de las fuerzas implicadas que son, o pueden ser, responsables de los cambios de concentración observados en el tiempo. La mayoría de los

procesos elementales, a partir de los cuales se elaboran los modelos farmacocinéticos, se describen mediante ecuaciones diferenciales.

Una relación dosis-concentración puede ser definida mediante la ecuación:

$$C = F(D, t, \pi_i) = D \times f(t, \pi_i)$$

Siendo C: La concentración terapéutica de un fármaco en el plasma; D: La dosis administrada y $f(t, \pi_i)$: La función del tiempo y otros parámetros (π_i) que describen las propiedades farmacocinéticas con respecto a la absorción, distribución, metabolismo y excreción.

Tal relación es lineal si la totalidad de la curva de las concentraciones del fármaco en el plasma con respecto al tiempo es directamente proporcional a la dosis administrada, D y por tanto, en una representación semilogarítmica, las curvas de concentración a dosis distintas tienen la misma pendiente. La linealidad cinética es pues, una proporcionalidad directa entre las velocidades de transferencia y las concentraciones o diferencias de concentración (WAGNER 1983).

La existencia de procesos no lineales en Farmacocinética data de la misma época en que se enunció la teoría lineal WAGNER (1971, 1973) en su trabajo "A new generalized Nonlinear Pharmacokinetic Model and its implications" expuso ciertas no linealidades observadas en la absorción de los fármacos, en su distribución, metabolismo, en la excreción renal y biliar de los mismos y sus metabolitos, y en la acción de éstos.

Las tres causas más frecuentes de una farmacocinética no lineal son:

- a) La existencia de una cinética de Michaelis-Menten u otra cinética no lineal de eliminación.
- b) La existencia de una unión saturable a los tejidos, siempre que una de las dosis administradas esté dentro de la zona no lineal de la unión.
- c) Administración de dosis suficientemente elevadas para que una de ellas alcance la región no lineal de la unión a proteínas del plasma.

Para la comprobación de no linealidad puede utilizarse cualquiera de los cinco métodos siguientes:

- 1) Administrar el fármaco a dos o más dosis. Dividir la concentración plasmática por la dosis y disponer los cocientes en función del tiempo. Si las curvas no son superponibles, puede suponerse algún tipo de no linealidad.
- 2) Administración del fármaco a dos o más dosis distintas. Tomar muestras a tiempos breves y calcular los valores de C_0 ajustando tan sólo los dos o tres primeros puntos a la ecuación $\ln C_t = \ln C_0 - Kt$. La relación C_t/C_0 para cada serie de concentraciones dispuestas frente el tiempo, deben definir su propia curva y ser todas superponibles. En caso contrario, puede esperarse algún tipo de no linealidad.
- 3) Ajustar cada serie de datos al que parece ser su modelo farmacocinético lineal. Si alguno o todos los parámetros varían con la dosis, es probable que la farmacocinética sea no lineal.
- 4) Cuando prevalece una cinética de Michaelis-Menten, el porcentaje de fármaco metabolizado disminuye al au-

mentar la dosis. El área bajo la curva aumenta de forma no proporcional a la dosis. y es función no lineal de la velocidad de absorción.

- 5) Administrar el fármaco por inyección intravenosa rápida y medir las concentraciones de fármaco libre y el unido a tejidos. Si la representación de ambas en un sistema cartesiano son una serie de curvas, puede suponerse una unión no lineal a los tejidos.

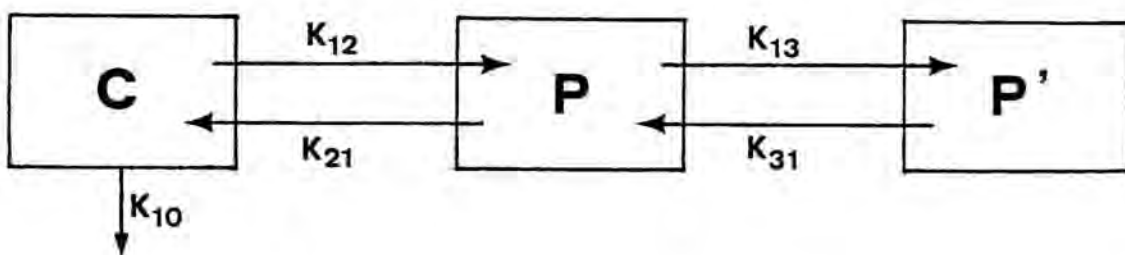
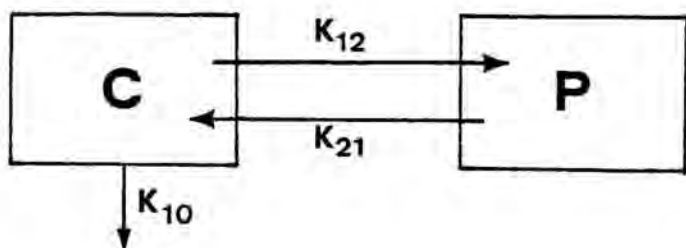
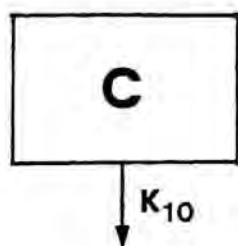
Los modelos farmacocinéticos son en gran parte lineales.

Las premisas en que se basan los cálculos de la relación lineal dosis-concentración se resumen en:

- La distribución del fármaco tiene lugar con gran rapidez respecto a la eliminación.
- La eliminación del fármaco puede ser descrita como un proceso de primer orden.
- La absorción puede adaptarse a un proceso de primer orden o puede despreciarse por su rapidez.

Una vez comprobada la linealidad del proceso en su conjunto, éste debe ajustarse a un modelo mono o pluricompartimental (en general bi o tricompartmental).

Para ello, se procede a la observación del trazado de la curva de niveles plasmáticos obtenida tras la administración intravenosa, única vía que permite determinar el comportamiento de un fármaco y se ajustan las ecuaciones representativas a los datos experimentales. En principio, se consideran los modelos mono, bi o tricompartmental que se muestran a continuación.



Siendo:

C: Compartimiento central.

P: Compartimiento periférico superficial.

P': Compartimiento periférico profundo.

K_{12}, K_{13} , etc. : Constantes de distribución.

K_{21}, K_{31} , etc. : Constantes de retorno.

K_{10} : Constante de eliminación.

Ya que "a priori" es imposible saber si la eliminación se realiza a partir del compartimiento central o de los periféricos, se toma como punto de partida el modelo de eliminación a partir del compartimiento central, ya que los princi-

pales sitios de biotransformación y excreción (hígado y riñones), poseen una buena irrigación y por tanto el fármaco que se halla en la circulación general accede fácilmente a ellos.

El ajustado de las ecuaciones a los datos experimentales se lleva a cabo mediante un programa informatizado, en el que la estima de los parámetros se logra mediante un sistema iterativo. Cualquier programa requiere unas estimas iniciales, lo más exactas posibles.

En la elección del modelo farmacocinético entran en juego dos consideraciones:

- La "bondad" del ajustado.
- El número de parámetros.

La bondad del ajustado se determina a partir de la suma ponderada de los cuadrados de los residuales SSQ:

$$SSQ = 1/w_t \sum (C_{exp} - C_{teor})^2$$

Siendo: w_i el factor de ponderación $(1/C_{exp}^2)$.

Se considera como mejor ajustado aquél que provea un menor valor de SSQ. Es preciso buscar otros criterios suplementarios de discriminación para elegir el modelo farmacocinético que realmente se ajuste con mayor probabilidad a los datos experimentales. Para ello puede utilizarse el ensayo F (BOXEMBAUM 1974) o la prueba de MAICE (YAMAOKA 1978).

La prueba de MAICE consiste en la estima del mínimo valor de AIC, expresado como:

$$AIC = n \times \ln(SSQ) + 2p$$

Siendo:

n: Número de pares de valores t/conc.

SSSQ: Suma ponderada de los cuadrados de los residuales.

p: Número de parámetros de la función de ajustado.

5.1.3. CALCULO DE LOS PARAMETROS FARMACOCINETICOS

El ajustado de la curva con un programa informatizado suministra los coeficientes y exponentes de la ecuación representativa.

Los otros parámetros farmacocinéticos se obtienen a partir de éstos por aplicación de las ecuaciones ya reseñadas en la bibliografía (GIBALDI 1982; WAGNER 1983 y LABAUNE 1984).

Si se considera el modelo bicompartimental, que es el que se ajusta al ácido cafeico, pueden deducirse los siguientes parámetros:

- Concentración inicial (C_0): Concentración plasmática del fármaco a $t = 0$; $C_0 = A_0 + B_0$ (en g/ml).
- Semivida de disposición en la fase α ; $t_{1/2} \alpha = \ln 2 / \alpha$ (en h o min).
- Semivida de disposición en la fase β ; $t_{1/2} \beta = \ln 2 / \beta$ (en h o min).
- Constante de retorno: Constante de velocidad del paso del fármaco del compartimento periférico al central (K_{21});
 $K_{21} = (A_0 \alpha + B_0 \beta) / C_0$ (en h^{-1}).
- Constante de eliminación: Constante de velocidad del proceso de eliminación del fármaco (K_{10}); $K_{10} = \alpha \beta / K_{21}$ (en h^{-1}).
- Constante de distribución: Constante de velocidad del paso del fármaco del compartimento central al periférico (K_{12});
 $K_{12} = \alpha + \beta - K_{21} - K_{10}$ (en h^{-1}).

- Volumen de distribución en el compartimento central (V_c): Relación entre la dosis administrada (D) y la concentración plasmática del fármaco a $t = 0$; $V_c = D/C_0$ (en ml).
- Volumen de distribución en el compartimento periférico (V_p): $V_p = (K_{12}/K_{21}) \times V_c$ (en ml).
- Volumen de distribución en estado de equilibrio estacionario ($V_{d\ tss}$): Volumen en que está disuelto el fármaco homogéneamente en el momento que la velocidad de entrada del fármaco es igual a la velocidad de eliminación (RIGGS 1963, EENET 1979); $V_{d\ tss} = V_c (1 + K_{12}/K_{21})$ (en ml).
- Area bajo la curva de nivel plasmático: Superficie limitada por los ejes de coordenadas y la curva resultante de la evolución de las concentraciones plasmáticas del fármaco en función del tiempo, ya sea a un tiempo limitado o extrapolada al infinito (AUC_0); $AUC_0 = A_0/\alpha + B_0/\beta = C_0/K_{10}$ (en $\mu g \times h/ml$).
- Aclaramiento plasmático total (Cl_t): Volumen de plasma depurado de fármaco por unidad de tiempo (ya sea por metabolismo o excreción); $Cl_t = D/AUC_0 = V_c \times K_{13}$ (en ml/h).
- Aclaramiento renal (Cl_r): Resultado del producto del Cl_t por la fracción de sustancia intacta presente en la orina (f_e); $Cl_r = f_e \times Cl_t$ (en ml/h).
- Aclaramiento metabólico (Cl_m): $Cl_m = Cl_t - Cl_r$ (en ml/h).

Entre los muchos factores que alteran el valor de los anteriores parámetros, es de interés el citar la influencia de la unión a proteínas.

En primer lugar, el volumen de distribución se ve falsamente disminuido cuando la fijación a proteínas plasmáticas es considerable.

La variación del aclaramiento es más compleja:

- En relación con el aclaramiento metabólico o concretamente hepático, éste es independiente de la unión a proteínas en aquellas sustancias de elevado coefi-

ciente de extracción. En caso contrario, cualquier variación de la fracción libre influye notablemente en él.

- Por lo que respecta al Cl_r , la filtración glomerular se incrementa al aumentar la fracción libre, pero al mismo tiempo el proceso de secreción tubular se modifica de forma muy variable. La influencia global sobre el Cl_r es pues difícil de preveer (LEVY 1969, ROCCI 1981 y HAUGHEY 1983).

Por todo ello, la semivida biológica dependiente de los dos parámetros precedentes, es función de su variación respectiva.

Si la dosis de fármaco es lo suficientemente elevada para alcanzar la saturación de los sitios de unión o si el número de puntos de unión en el plasma es pequeño, la unión de los fármacos a las proteínas plasmáticas puede ser también causa de no linealidad (COFFEY 1971).

5.1.4. CINETICA PLASMATICA DEL ACIDO CAFEICO TRAS ADMINISTRACION INTRAVENOSA

Para el estudio del comportamiento del ácido cafeico por vía intravenosa se han utilizado 14 ratas Sprague-Dawley hembras, provenientes del estabulario de la Facultad, con un peso comprendido entre 200-230 g, que se han mantenido en ayuno 20 horas antes de la administración y con libre acceso al agua de bebida.

Cada animal se anestesió con una solución de etiluretano (Merck) al 10% en agua. La dosis administrada fue de 1 ml/100 g por vía intraperitoneal.

El animal se coloca sobre una tabla quirúrgica en posición de decúbito supino y se sujetan las extremidades. La temperatura corporal se mantiene con ayuda de un foco luminoso.

Se practica una traqueotomía media para evitar posibles problemas respiratorios y se aborda la vena femoral izquierda que se cateteriza con una cánula de polietileno (0.3mm Ø).

Por esta vía se administran 100 U.I. de heparina (Heparina Leo) en suero fisiológico.

Para la toma de muestras se aborda y cateteriza la arteria carótida común derecha con el mismo tipo de catéter que el usado para la vena femoral.

Seguidamente, se administra por la vena femoral la solución de ácido cafeico. La dosis utilizada fue de 40 mg/Kg. Para ello se dispone de una solución de ácido cafeico en tampón fosfato 0.05M, pH 7.4, isotónico de 20 mg/ml que se administra a razón de 0.2 ml/100 g.

El volumen sanguíneo extraído para cada muestra fue de 0.5 ml. Las muestras se extrajeron a los 1, 2, 5, 15, 30, 60, 120 y 180 minutos tras la administración. A las 8 horas no se detecta ácido cafeico en plasma.

A fin de evitar que el descenso del volumen sanguíneo y del hematocrito influya en los resultados, se administró 0.5 ml de suero fisiológico a cada animal y tras cada una de las extracciones. Se tomó un máximo de 6 muestras por cada animal. De este modo el valor del hematocrito no desciende por debajo del 40%. Si se eleva a 8 el número de muestras por animal, el valor del hematocrito se reduce al 35%, tal como se comprobó en ensayos previos y que se exponen a continuación.

Variación del Hematocrito en función del nº de muestras extraídas:

<u>t (min)</u>	<u>Hematocrito (%)</u>
1	52.6
2	48.4
5	46.9
15	44.9
30	42.3
60	40.4
120	37.3
180	35.8

Tras el procesado de las muestras, que se detallará a continuación, se procedió al análisis de éstas por C.L.A.R.

Se ha comprobado la linealidad del proceso administrando el ácido cafeico a dos dosis distintas. Los niveles plasmáticos se dividen por la dosis. Las curvas de concentracio-

nes plasmáticas normalizadas frente al tiempo, son superponibles. Los datos obtenidos se exponen a continuación:

Concentraciones plasmáticas normalizadas(*)

<u>t (min)</u>	<u>Dosis A</u>	<u>Dosis B</u>
2	0.0348	0.0699
5	0.0376	0.0538
15	0.0160	0.0301
30	0.0128	0.0219
45	0.0116	0.0155

(*) Expresado en $\mu\text{g/ml}$.

Dosis A: 10 mg/Kg.

Dosis B: 40 mg/Kg.

Procesado de las muestras

Las muestras sanguíneas se centrifugan a $3,000 \times g$ durante 15 minutos y se separa el plasma. A 0.2 ml del plasma obtenido se añade un volumen triple de metanol para C.L.A.R. con lo que se consigue la precipitación de las proteínas. Se someten nuevamente a centrifugación con idéntico protocolo y el sobrenadante se conserva a -30°C hasta el momento de su análisis cromatográfico.

Antes de su inyección en el cromatógrafo, se añade a cada muestra o-cresol (Merck) como patrón interno a una concentración final de 0.05 mg/ml.

La Cromatografía Líquida de Alta Resolución se llevó a cabo en un cromatógrafo Perkin-Elmer, Series 2, conectado a:

- Procesador de datos: Sigma 15.
- Detector espectrofotométrico: LC-85B.
- Horno: LC-100.

Las condiciones cromatográficas fueron las siguientes:

- Eluyentes: A: Metanol (ác. acético 2.5%).
B: Agua (ác. acético 2.5%).
- % A/B + B: 23
- Flujo: 1.5 ml/min.
- Temperatura del horno: 35°C.
- Columna: C-18 de fase reversa. Perkin-Elmer HS-5.
Lichrosorb (5 μ de poro).
- Detección: 280 nm.
- Volumen de inyección: 3 μ l.
- Duración del cromatograma: 12 min.

En estas condiciones, el tiempo de retención para el ácido cafeico resultó ser de 3.74 minutos y de 8.46 minutos para el o-cresol.

A continuación se muestran algunos ejemplos de los cromatogramas obtenidos a los distintos tiempos.

- ① Pico correspondiente al ácido cafeico.
- ② Pico correspondiente al o-cresol (patrón interno).

METHOD 9

ANALYZER CONTROL

INS TEMP 25
 DET ZONE 1,2 65 25
 AUX TEMP 25
 FLOW A,B 5 5
 INIT QUEN TEMP, TIME 76 999

DATA PROC

STD WT, SMP WT 0.0356 1.0000 0
 FACTOR, SCALE 1 0
 TIMES 10.00 0.00 327.67 327.67 327.67 327.67
 SENS-DET RANGE 500 20 0.00 2 0 0
 UNK, AIR 1.000 0.00
 TOL 0.0000 0.050 1.0
 REF PK 1.000 7.96 8.96 8.46
 STD NAME 0-CRESOL

RT	RF	CONC	NAME
3.74	0.504	0.0000	CAFEICO
8.46	1.000	0.0356	0-CRESOL

EVENT CONTROL

ATTN-CHART-DELAY 3 4 0.10

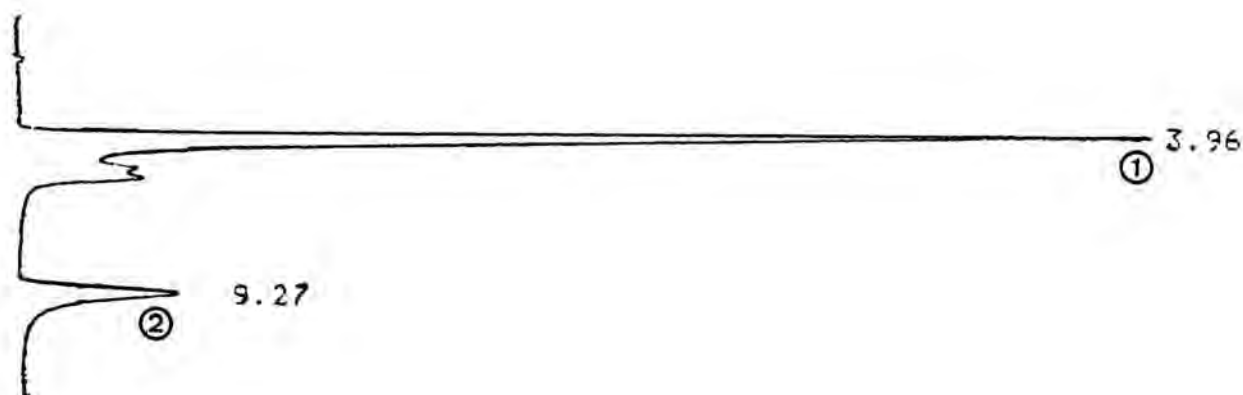


Figura 27.- Cromatograma de la mezcla utilizada en la calibración.

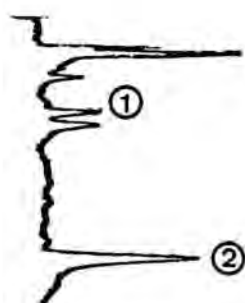


Figura 28.- Ensayo de Linealidad de la cinética plasmática (i.v.) del ácido cafeico (10mg/Kg) a los 2 minutos.

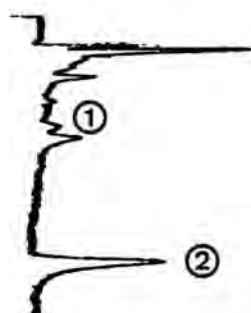


Figura 29.- Ensayo de Linealidad de la cinética plasmática (i.v.) del ácido cafeico (10mg/Kg) a los 60 minutos.

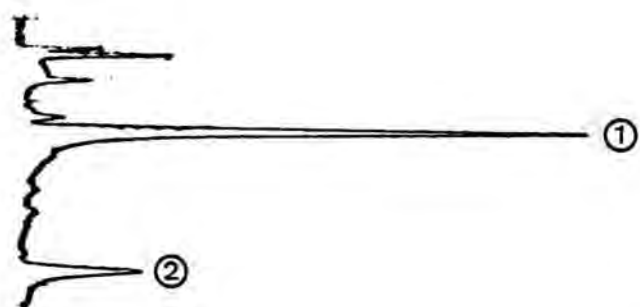


Figura 30.- Ejemplo de la cinética plasmática (i.v.) del ácido cafeico en el primer minuto.

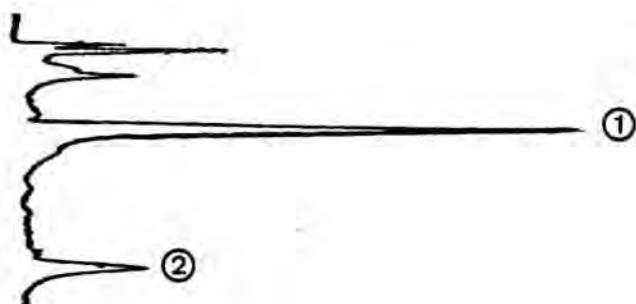


Figura 31.- Ejemplo de la cinética plasmática (i.v.) del ácido cafeico a los 2 minutos.

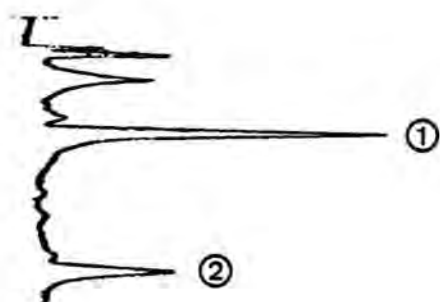


Figura 32.- Ejemplo de la cinética plasmática (i.v.) del ácido cafeico a los 5 minutos.

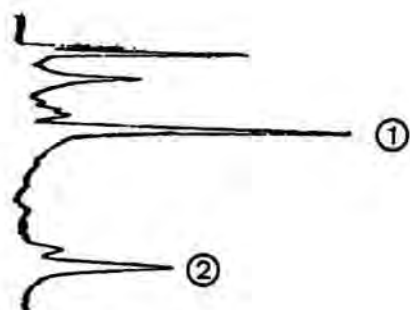


Figura 33.- Ejemplo de la cinética plasmática (i.v.) del ácido cafeico a los 15 minutos.

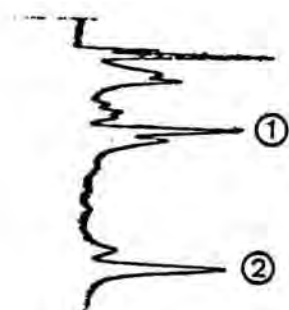


Figura 34.- Ejemplo de la cinética plasmática (i.v.) del ácido cafeico a los 30 minutos.

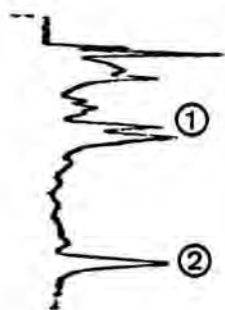


Figura 35.- Ejemplo de la cinética plasmática (i.v.) del ácido cafeico a los 60 minutos.

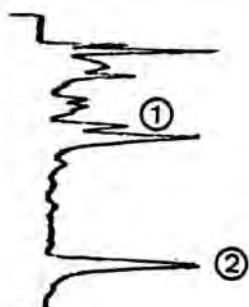


Figura 36.- Ejemplo de la cinética plasmática (i.v.) del ácido cafeico a los 120 minutos.

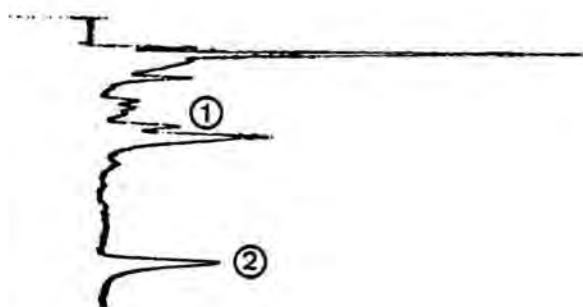


Figura 37.- Ejemplo de la cinética plasmática (i.v.) del ácido cafeico a los 180 minutos.

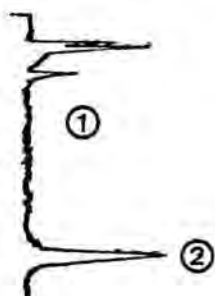


Figura 38.- Ejemplo de la cinética plasmática (i.v.)
del ácido cafeico a las 9 horas.

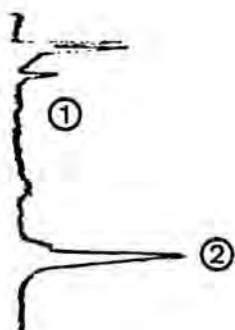


Figura 39.- Ejemplo de la cinética plasmática (i.v.)
del ácido cafeico a las 10 horas.

RESULTADOS:

Los valores experimentales obtenidos y corregidos por los correspondientes factores de dilución, amén de las desviaciones standard para $n = 14$, se detallan a continuación

<u>t (h)</u>	<u>Conc ($\mu\text{g/ml}$) $\pm \sigma_{n-1}$</u>
0.016	372.0 $\pm$ 71.0
0.033	349.5 $\pm$ 68.5
0.083	269.0 $\pm$ 70.5
0.250	150.5 $\pm$ 29.5
0.500	109.5 $\pm$ 31.0
1.000	77.5 $\pm$ 14.2
2.000	46.5 $\pm$ 4.2
3.000	49.5 $\pm$ 4.2

La representación semilogarítmica muestra un trazado claramente bifásico que se refleja en los índices de correlación al ajustar los puntos experimentales a una o dos rectas por el método de los mínimos cuadrados (ver Fig. 40).

Para la estima inicial de los coeficientes A_0 y B_0 , así como de los exponentes α y β , se aplicó el citado método de los residuales, obteniéndose los valores:

A_0 : 288.900 g/ml.

B_0 : 135.300 g/ml.

α : 9.267 h^{-1}

β : 0.403 h^{-1}

Estas estimas iniciales se introdujeron en el programa "Extended Least Squares, Nonlinear Regression" y se desarrolló en un ordenador Hewlett-Packard 85.

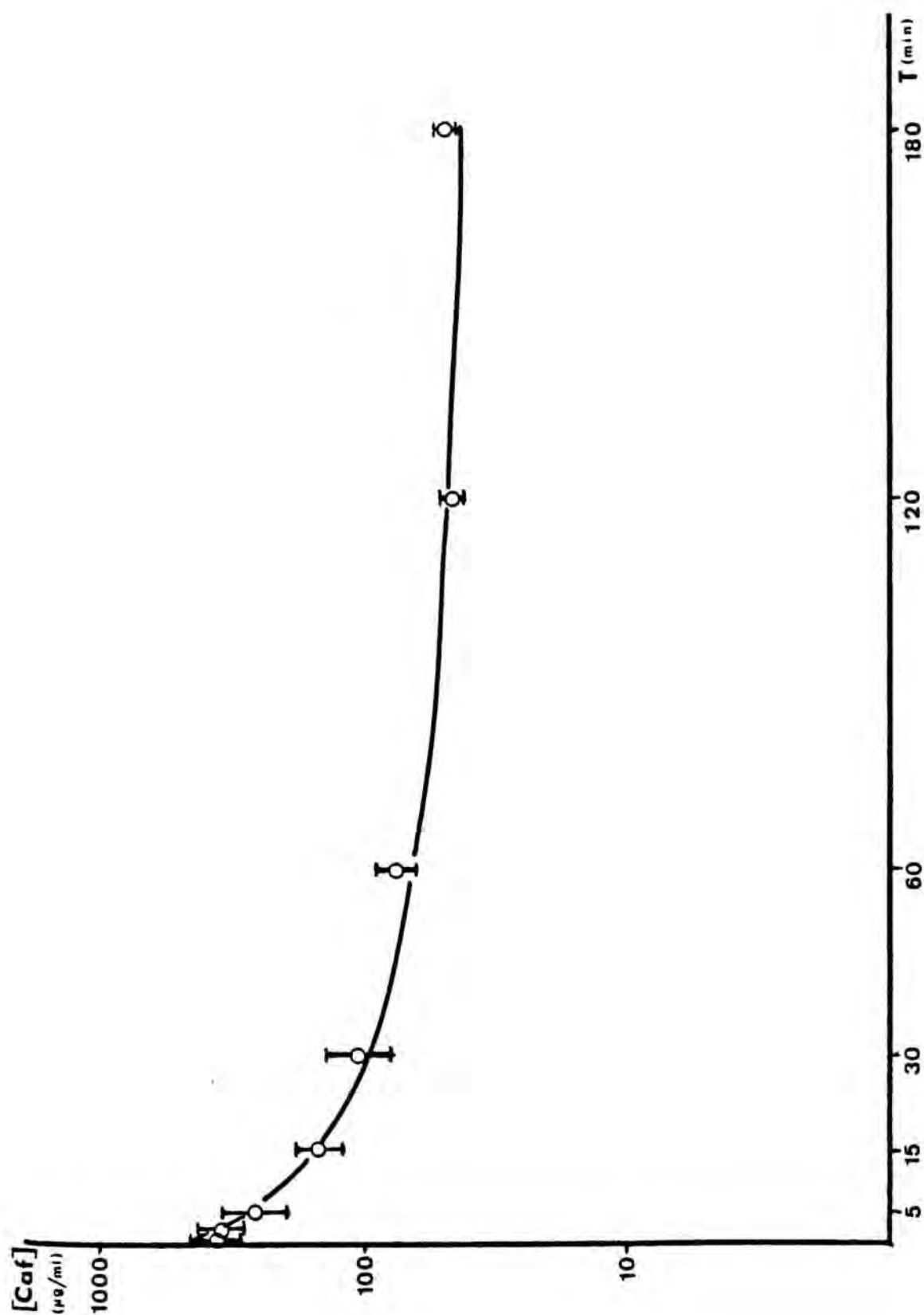


Figura 40.- Representación gráfica de la cinética plasmática del ácido cafeico tras administración i.v.

Se tomaron como criterios de bondad y seguridad del ajuste:

- Los mínimos valores de los errores standard y de los coeficientes de variación.
- La proximidad a 1 de los componentes de la matriz de covarianza y correlación.
- Los mínimos valores de EST - Y. y por tanto el hecho de que el 60% como mínimo, de los datos se hallaran en el campo de existencia de los residuales.

Los resultados finales ajustados a un modelo bicompartimental, se muestran a continuación.

```

***-*****
      EXTENDED LEAST SQUARES
      REGRESSION - PART TWO
*** *****

```

```

*** *****

```

STRUCTURAL MODEL CODE

```

3770 ! PUT STRUCTURAL MODEL HERE
3780 ! PARAMS ARE B(1:N2)
3790 ! DATA ARE X(),Y()
3800 ! TYPE OF Y IN X1()
3810 ! ELEMENT IS J
3820 ! OUTPUT Y-HAT(J) IN D1
3830 ! DUMMY VARS, USE F0-F9,
3840 ! G0-G9,H0-H9
4320 F1=B(1)
4321 F2=MIN(20,B(2)*X(J))
4322 F3=B(3)
4323 F4=MIN(20,B(4)*X(J))
4343 D1=F1*EXP(-F2)+F3*EXP(-F4)
4353 ! USER-DEFINED STRUCTURAL M
      ODEL CODE ENDS HERE

```

```

*** *****

```

```

*** *****

```

```

*** *****

```

FINAL RESULTS ARE AS FOLLOWS

```

-2*LOG LIKELIHOOD=-53.4842
-RALPHIKE VALUE=-21.7421
-SCWARZ VALUE=-21.5435
-LEONARD VALUE=-13.7681

```

FINAL PARAMETER ESTIMATES

NO	EST	SE	CV(%)	SEIF
1	.29286538	2E-2	6.049	2.018
2	9.0001158	1.540	17.11	2.305
3	.12554792	1.2	13.31	3.492
4	.39624059	.1024	25.86	1.810
5	.01085389	3E-3	24.95	1

UPF COV MATRIX OF ESTIMATES

DE-	-2E-3	-2E-4	-1E-3
0			
1.013	2E-2	9E-2	0
DE-	1E-3	0	
1E-	0		
TE-			

```

*** *****
      EXTENDED LEAST SQUARES
      NONLINEAR REGRESSION
*** *****

```

SYMBOLIC MODEL

```

Y(I) = F[B(1:4),X(I),X1(I)]
      + e(I)
E[e(I)] = 0
VAR[e(I)] = B(5)^2

```

```

*** *****

```

INITIAL PARAMETER ESTIMATES

NO.	EST	LOWBD	UPBD
1	.2889	.2	.3
2	9.263	9	10
3	.1353	.1	.2
4	.403	.35	.5
5	.3	0	3

```

*** *****

```

DATA ENTERED

NO	X	Y
1	.0165	.372
2	.033	.3495
3	.062	.262
4	.125	.1505
5	.5	.1095
6	1	.0775
7	2	.0455
8	3	.0435

```

*** *****

```

THE PROGRAM

```

* IF NOT CHANGING THE PROGRAM
* PRESS CONTINUE TO PROCEED

```

```

LISTS: 50.4350

```

```

320 F1=B(1)
321 F2=MIN(20,B(2)*X(J))
322 F3=B(3)
323 F4=MIN(20,B(4)*X(J))
324 F5=B(5)
325 F6=MIN(20,B(6)*X(J))
326 F7=F1*EXP(-F2)+F3*EXP(-F4)
327 D1=F7-F5*EXP(-F6)
328 ! USER-DEFINED STRUCTURAL M
329 CODE ENDS HERE

```

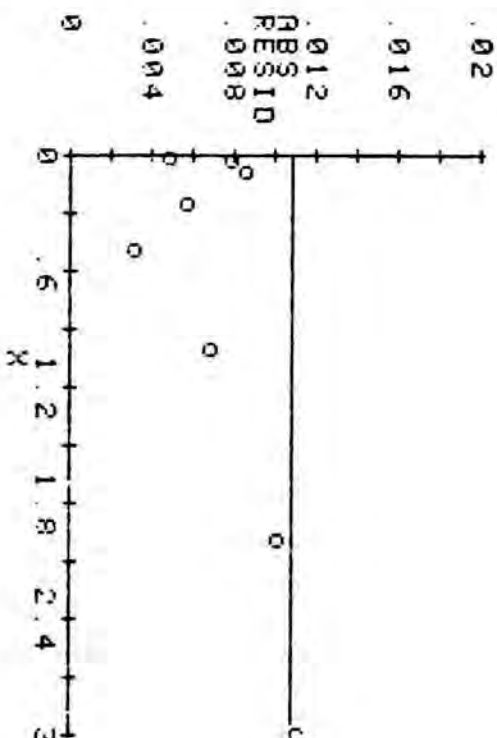
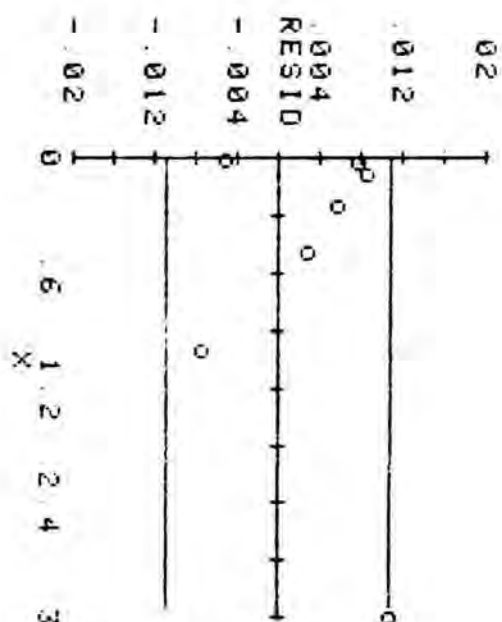
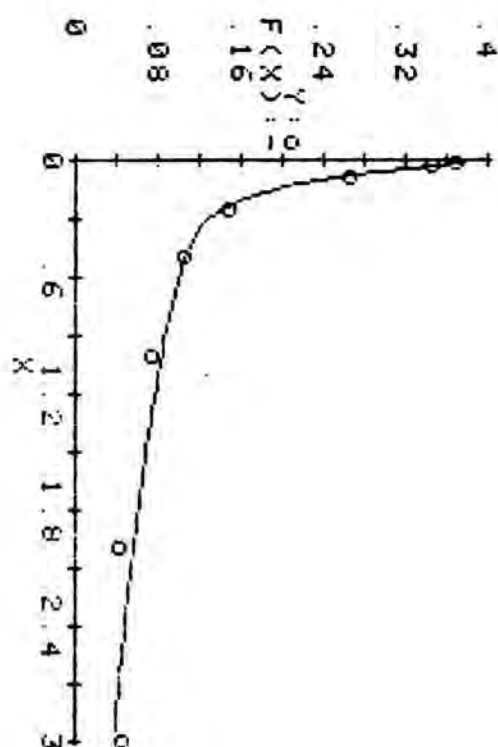
COF. MATRIX OF ESTIMATES

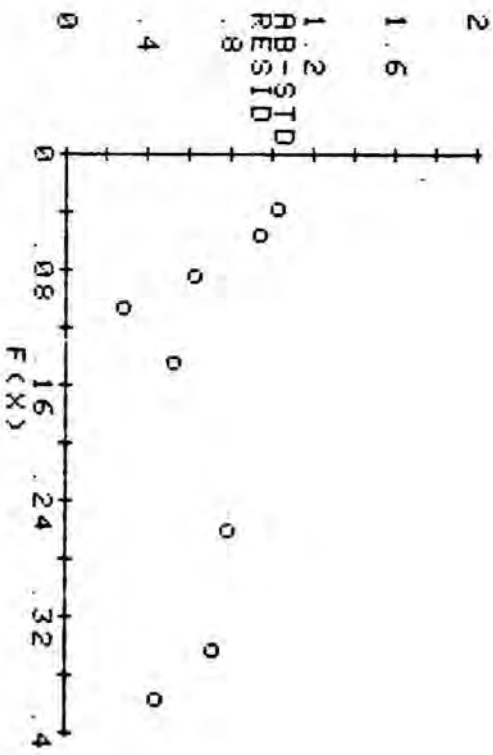
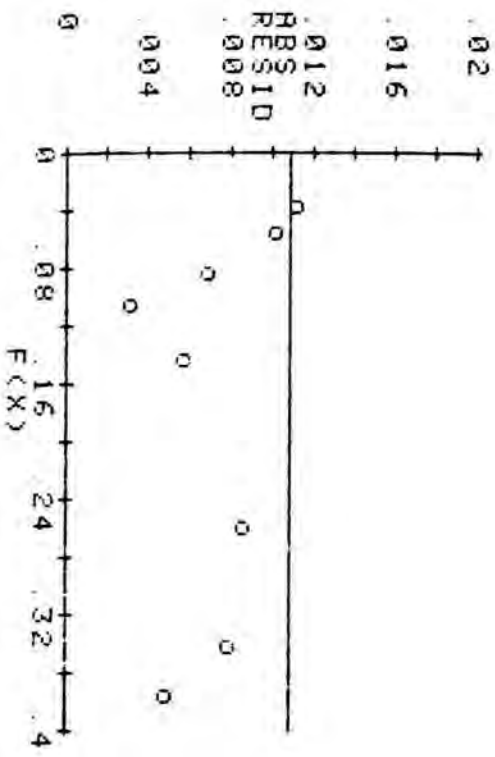
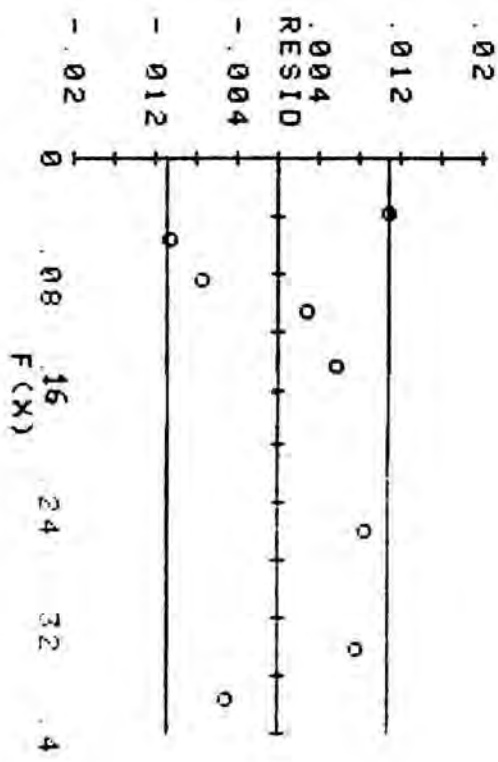
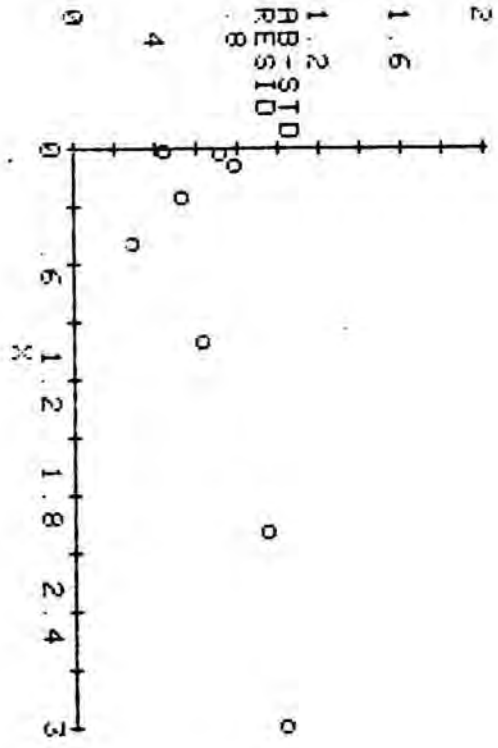
0	-9E-2	-.646	-.573
1	.7385	.5503	0
2	.8261	0	
3	0		

EST. MATES OF Y

NO.	X	X1	Y	EST-Y	S-RES
1	.0166	1	.372	.3769	-.457
2	.033	1	.3495	.3415	.7328
3	.083	1	.269	.2602	.8060
4	.205	1	.1505	.1445	.5457
5	.105	1	.1095	.1062	.3006
6	1	1	.0775	8E-2	-.645
7	2	1	.0465	6E-2	-.952
8	3	1	.0495	4E-2	1.037

PLOTS FOR DEPENDENT VAR TYPE 1





La ecuación representativa del comportamiento farmacocinético del ácido cafeico, tras administración intravenosa, es por tanto:

$$C_t = 292.9 \times e^{-9.0001t} + 125.5 \times e^{-0.3962t}$$

Los parámetros farmacocinéticos referidos, en su caso, a la dosis por Kg. son:

$$A_0 = 292.8893 \text{ g/ml.}$$

$$B_0 = 125.5479 \text{ g/ml.}$$

$$\alpha = 9.0001 \text{ h}^{-1}.$$

$$\beta = 0.3962 \text{ h}^{-1}$$

$$C_0 = 418.4372 \text{ g/ml.}$$

$$AUC_0 = 349.4230 \text{ g} \times \text{h/ml.}$$

$$K_{21} = 2.9770 \text{ h}^{-1}$$

$$K_{10} = 1.1978 \text{ h}^{-1}$$

$$K_{12} = 5.2215 \text{ h}^{-1}$$

$$t_{1/2}^{\alpha} = 0.0770 \text{ h}^{-1} \quad (4\text{min y } 37 \text{ seg}).$$

$$t_{1/2}^{\beta} = 1.7493 \text{ h}^{-1} \quad (1\text{h, } 44\text{min y } 58 \text{ seg}).$$

$$V_c = 95.6023 \text{ ml/Kg} \quad (9.5602 \text{ ml/100g})$$

$$V_p = 167.6760 \text{ ml/Kg} \quad (16.7676 \text{ ml/100g})$$

$$V_{d \text{ tss}} = 263.2788 \text{ ml/Kg} \quad (26.3279 \text{ ml/100g})$$

$$Cl_{\text{plasm}} \text{ i.v.} = 114.5150 \text{ ml/Kg/h}$$

El valor del cociente $\alpha/\beta = 22.7138$ corrobora el carácter bicompartimental.

La relación de constantes:

$$K_{12}/K_{10} = 4.3592$$

$$K_{12}/K_{21} = 1.7539$$

$$K_{21}/K_{10} = 2.4854$$

Esta relación de constantes manifiesta una tendencia del ácido cafeico hacia el compartimento periférico, ya que la constante de distribución K_{12} es notablemente superior a la de eliminación K_{10} .

Asimismo el valor del cociente K_{12}/K_{21} no es lo suficientemente elevado para pensar en una posible acumulación en el compartimento periférico.

Por último, el valor de la relación K_{21}/K_{10} nos indica que el retorno del compartimento periférico hacia el central no es un factor limitante de la eliminación.

En la rata, la distribución del agua corporal (DOMENECH, Comunicación personal) es la siguiente:

Agua plasmática: 4-5% del peso corporal.

Agua intersticial: 22-23% del peso corporal.

Agua intracelular: 33% del peso corporal.

El valor de $V_{d\ tss} = 26.3278$ ml/100g indica pues, una distribución del ácido cafeico a nivel extracelular, siendo poco probable el acceso de éste al interior de la célula como cabe esperar del bajo valor de su coeficiente de partición.

5.2. VIA ORAL

5.2.1. Absorción

Todas las consideraciones farmacocinéticas citadas anteriormente, son de aplicación cuando los fármacos son administrados por vía intravenosa ya que los procesos de metabolismo, excreción, distribución y unión a proteínas pueden estudiarse mejor si no están implicados los procesos de absorción.

Es innecesario, en el contenido de esta Memoria, el exponer de forma detallada los diversos conceptos involucrados en la absorción de los fármacos. Tan sólo resaltar que la cinética de la absorción está afectada por factores que pueden ser de origen galénico o fisiológico.

Cuando se administra oralmente una forma farmacéutica sólida, la absorción depende de la disgregación de la misma y/o de su disolución en los jugos gastrointestinales. Incluso la cantidad de líquido ingerida conjuntamente influye no sólo en el volumen de solvente disponible y en el pH del contenido gástrico, sino también en el vaciado del estómago (DOLUISIO 1965, BARR 1969, RIEGELMAN 1969 y GIBALDI 1971).

Aún en el caso de los fármacos administrados en solución, la absorción oral puede ser muy irregular. La proporción de fármaco absorbido y el propio lugar de absorción se ven afectados por el vaciado gástrico, el peristaltismo (segmentación rítmica, movimiento pendular), etc. Asimismo el líquido intersticial y los fluidos gastrointestinales modifican la concentración y el estado físico-químico del fármaco.

Transporte a través del tracto gastrointestinal

De acuerdo con la teoría del coeficiente de partición,

todos los compuestos que están altamente ionizados en el lumen gástrico, presentan una baja tasa de absorción a ese nivel (SCHANKER 1962 y 1964).

Así, el inicio de la absorción de un fármaco con tales características depende del vaciado del estómago, que sigue un proceso de orden uno (HUNT 1963), aunque algunos autores han cuestionado este concepto (NOGAMI 1962a y 1962b).

En realidad, el tiempo de vaciado gástrico depende de los alimentos y líquidos ingeridos con el fármaco, y varía generalmente entre 1 y 4 horas. Ya que en la mayoría de las experiencias farmacocinéticas, la toma de muestras inmediatamente después de la administración oral es limitada, se toma como sustituto del tiempo de vaciado gástrico, el valor de t_0 (tiempo transcurrido entre la administración oral del fármaco y su aparición a nivel sistémico (SCHLENDER 1965), obtenido por extrapolación de la curva de ajustado.

El intervalo de pH observado a nivel del tracto gastrointestinal se sitúa entre 1 y 8. Es posible pues, preveer el comportamiento de un fármaco según el valor de su pKa.

Para los ácidos débiles cuyo pKa está comprendido entre 2.5 y 7.5 (caso del ácido cafeico), la proporción de la forma no ionizada varía considerablemente con el pH, y por ende su absorción. Por ejemplo, el ácido salicílico cuyo pKa es igual a 3, se absorbe un 61% a nivel gástrico (pH = 1) y un 13% a nivel intestinal (pH = 8) en la rata (SCHANKER 1957, LABAUNE 1984).

En ocasiones, fármacos que por su naturaleza deberían ser absorbidos mayoritariamente a nivel gástrico, lo son a nivel duodenal, ya que la breve permanencia en el estómago y la superficie limitada de la mucosa gástrica, pueden contrarrestar el efecto del pH. Además, no sólo debe tenerse en

cuenta el valor del pK_a , sino que es preciso considerar también el valor del coeficiente de partición.

Asimismo, debe tenerse en cuenta que no hay un incremento brusco en el valor del pH del contenido gástrico cuando éste penetra en el intestino. El pH del contenido duodenal y del extremo proximal del yeyuno sigue siendo ácido.

Otro problema deriva de la absorción incompleta de ciertos fármacos en el tracto gastrointestinal. En estos casos, la velocidad de absorción es tan lenta, que el tiempo que tarda la sustancia en pasar por el tracto gastrointestinal es demasiado corto para conseguir una absorción completa.

DOST en 1958 definió ya un parámetro para cuantificar este proceso, al que denominó "fracción de dosis absorbida (f)" (GLADTKE 1964, DOST 1968), que se enmarca en el concepto de biodisponibilidad absoluta (ver Apartado 5.2.3.).

La fracción de dosis (1-F) se supone excretada por las heces e inerte respecto a la cinética de absorción a lo largo de su paso por el tracto gastrointestinal.

5.2.2. CINETICA PLASMATICA DE LA ABSORCION E INTERPRETACION MATEMATICA

En general se considera la absorción como un proceso de primer orden (DOST 1953), sea cual sea el factor limitante del fenómeno.

El único caso en que no puede aplicarse esta consideración es en aquellos procesos de absorción por transporte activo, que siguen una cinética de orden cero.

Este fenómeno de absorción de orden 1 se caracteriza

por su constante de velocidad y su semivida (semivida de absorción).

Después de una administración oral de un fármaco, se distinguen dos fases, a saber:

- Fase de absorción: Aquella en que la concentración plasmática aumenta progresivamente hasta alcanzar un máximo ($C_{\max}$).
- Fase de eliminación: Durante la cual se observa una progresiva disminución de las concentraciones plasmáticas.

Fisiológica y farmacocinéticamente, estas dos fases no se llevan a cabo de forma sucesiva sino que coexisten en el tiempo

Cada uno de estos procesos se caracteriza por su velocidad. Cuando la de absorción es superior a la de eliminación, la concentración plasmática aumenta. En el momento en que la velocidad de eliminación supera a la de absorción, la concentración plasmática del fármaco empieza a disminuir. Por tanto, el máximo de absorción se alcanza cuando la velocidad de absorción es igual a la de eliminación.

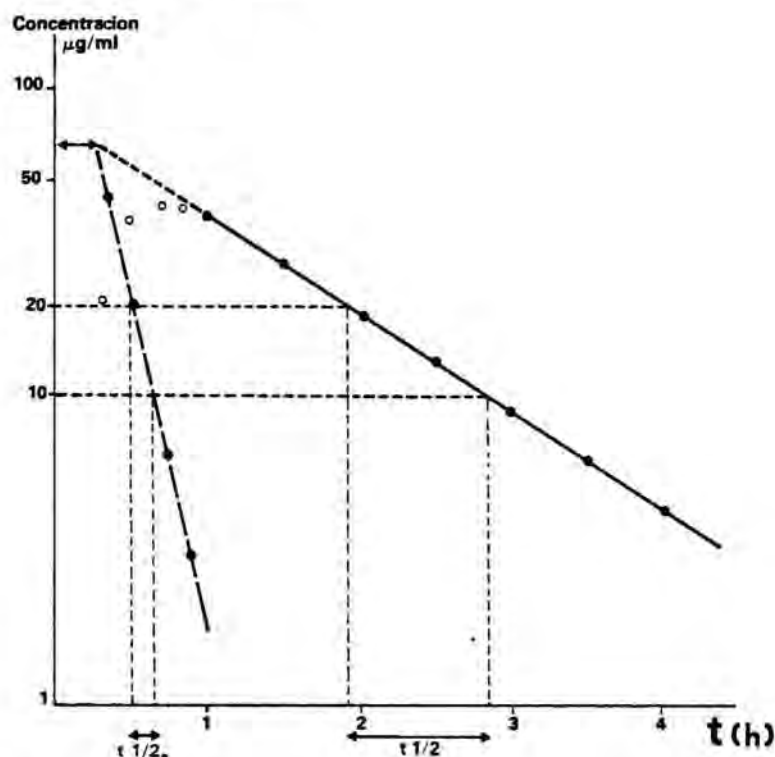
El tratamiento matemático de la curva, tras administración oral, es idéntico al descrito para la vía intravenosa (ver Apartado 5.1.1.).

El análisis matemático se realiza en varias etapas:

- Representación semilogarítmica de los resultados.
- Extrapolación de la fase de eliminación terminal lineal hasta su intersección con el eje de ordenadas.

- Establecimiento y representación gráfica semilogarítmica de las diferencias entre las concentraciones teóricas y las obtenidas experimentalmente a cada tiempo.

El proceso de absorción considerado éste de orden 1 resulta ser pues, una recta:



De la representación gráfica es posible deducir varios parámetros:

- Semivida de absorción ($t_{1/2a}$): Tiempo necesario para alcanzar la mitad de la absorción máxima (disminución a la mitad de la diferencia entre los valores teóricos extrapolados y los experimentales) (LABAUNE 1984).
- Constante de velocidad de absorción (K_a): Es igual a $\ln 2 / t_{1/2a}$.

- Período de latencia (t_0): Valor del tiempo en la intersección entre la recta extrapolada y la obtenida por diferencia con los valores experimentales.
- Semivida de eliminación: Ver Apartado 5.1.3.
- Constante de velocidad de eliminación: Ver Apartado 5.1.3.

Este sería el caso más simple, en el que la eliminación puede representarse como un proceso monofásico. Del mismo modo se procede en el caso de una eliminación de tipo polifásico.

Es posible pues, atribuir a esta cinética plasmática una representación matemática de tipo exponencial, según la ecuación:

$$C_t = A_0 \cdot e^{-\alpha t} - P_0 \cdot e^{-K_a t}$$

(Eliminación monoexponencial)

$$C_t = A_0 \cdot e^{-\alpha t} + B_0 \cdot e^{-\beta t} - P_0 \cdot e^{-K_a t}$$

(Eliminación biexponencial)

Este método descrito corresponde a una ampliación del método de los residuales. Pueden también aplicarse los métodos de Wagner-Nelson y de Loo-Riegelman, reseñados ampliamente en la bibliografía (WAGNER 1983).

5.2.3. CALCULO DE LOS PARAMETROS FARMACOCINETICOS TRAS LA ADMINISTRACION ORAL

La estima de los parámetros farmacocinéticos tras la administración oral, requiere necesariamente el conocimiento de la cinética plasmática por vía intravenosa.

Tras el cálculo de las estimas iniciales por cualquiera de los tres métodos mencionados, el correspondiente programa informatizado nos proporciona el ajuste más adecuado al comportamiento modelístico pertinente, que como ya se ha indicado, se elige mediante el criterio de MAICE (ver Apartado 5.1.2.).

A partir de los coeficientes y exponentes suministrados por el ordenador, se obtienen los otros parámetros farmacocinéticos.

Si se considera el modelo bicompartimental, aparte de los parámetros ya descritos para la vía intravenosa, se pueden citar los siguientes:

- Tiempo de absorción máxima ($t_{\max}$): Tiempo en el que el fármaco alcanza su máxima concentración plasmática.

- Semivida de absorción ($t_{1/2}^a$): $\ln 2 / K_a$ (en h^{-1}).

- Area bajo la curva (AUC_0): $Ao/ \alpha + Bo/\beta - Po/K_a$

Si existe período de latencia:

$$AUC_0 = Ao/(\alpha e^{-\alpha t_0}) + Bo/\beta(e^{-\beta t_0}) - Po/K_a(e^{-K_a t_0})$$

(en $g \times h/ml$).

- Aclaramiento plasmático total (Cl_t): $F \times D/AUC_{t_0}$
(en ml/h).

- Volumen de distribución en el compartimento central (V_c): $F \times D/C_0$ (en ml).

- Concentración de fármaco en el compartimento central a t_0 (C_0):

$$C_0 = \frac{Ao \cdot (K_a - \alpha) + Bo(K_a - \beta)}{K_a} \quad (\text{en } g/ml).$$

- Constante de retorno del compartimento periférico al central (K_{21}):

$$K_{21} = \frac{A_0 \cdot (K_a - \alpha) + B_0 \cdot (K_a - \beta)}{K_a} \quad (\text{en } h^{-1}).$$

5.2.4. BIODISPONIBILIDAD ABSOLUTA

Corresponde a la cantidad de fármaco que alcanza la biofase y la velocidad a la cual llega al lugar de acción. La llegada a la biofase es un proceso difícil de cuantificar. Por ello se considera generalmente como sinónimo de biodisponibilidad absoluta, la fracción de fármaco que después de ser administrado, alcanza la circulación general (LABAUNE 1984).

Este parámetro influye directamente en el valor posterior de la concentración plasmática, en especial de la $C_{\max}$, y en el tiempo necesario para alcanzarla ($t_{\max}$).

Si se considera que la actividad farmacológica está estrechamente relacionada con los niveles plasmáticos, se puede afirmar que el valor de la biodisponibilidad absoluta determinará que el fármaco alcance o sobrepase los límites terapéuticos.

La biodisponibilidad absoluta de un fármaco depende del coeficiente de absorción (f) y de la fracción de dosis eliminada por efecto de primer paso intestinal, hepático y pulmonar (E), lo que conllevará a una disminución de la cantidad de fármaco por metabolismo.

Tanto " f " como " E " pueden variar entre 0 y 1. El valor de " $1-E$ ", también denominado a veces " F ", es la fracción de dosis de fármaco que no sufre efecto de primer paso.

De este modo : $F = f \times F'$

El cálculo de "F" se realiza a partir de la relación de áreas bajo la curva tras administración oral e intravenosa, corregidas por el factor de dosis en el caso de que no exista identidad de ésta por las dos vías:

$$F = \frac{\text{AUC. oral}}{\text{AUC. i.v.}} \times \frac{\text{D i.v.}}{\text{D oral}}$$

La estima de la biodisponibilidad absoluta puede realizarse también a partir de los datos de excreción urinaria, comparando la cantidad global de producto excretado en forma intacta después de una administración oral e intravenosa, corregido por el factor de dosis en su caso:

$$F = \frac{\text{Ae oral}}{\text{Ae i.v.}} \times \frac{\text{D i.v.}}{\text{D oral}}$$

siendo Ae la cantidad total de fármaco excretado en forma intacta por la orina.

Los pulmones son un tejido muy irrigado y rico en enzimas, donde el fármaco puede ser transformado y sufrir un efecto de primer paso pulmonar.

Cuando una sustancia es administrada por vía intravenosa, debe pasar a través de los pulmones antes de alcanzar la circulación arterial. Por ello, la vía intravenosa no es una vía óptima de referencia, aunque sí la más utilizada por razones de orden práctico.

Si el fármaco se administra por vía oral, sufre efectos de primer paso a nivel de mucosa gástrica, lumen intestinal, hígado y pulmones.

5.2.5. CINETICA PLASMATICA DEL ACIDO 'CAFEICO TRAS ADMINIS- TRACION ORAL

Para el estudio del comportamiento farmacocinético del ácido cafeico por vía oral se han utilizado 24 ratas Sprague-Dawley hembras, provenientes igualmente del estabulario de la Facultad, de peso comprendido entre 200-230 g, que se han mantenido 15-20 horas en ayuno antes de la administración y con agua "ad libitum".

Según DOLUISIO (1969), no hay diferencias significativas en el proceso de absorción si el período de ayuno oscila entre 15 ó 20 horas. Si este período se prolonga, empieza un descenso significativo de la tasa de absorción, dependiente del período de ayuno, y debido a variaciones de tipo fisiológico y bioquímico.

La dosis de ácido cafeico administrada fue de 120 mg/Kg. Se dispuso a este fin de una solución de 20 mg/ml en tampón fosfato 0.05M, pH 7.4, isotónico, que se administró a razón de 0.6 ml/100 g.

Se ha procedido del mismo modo que para el estudio de la cinética plasmática tras administración intravenosa. Las muestras de sangre se extrajeron a los siguientes tiempos: 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 90, 120, 150 y 180 minutos.

Estas muestras fueron procesadas del mismo modo que en la cinética intravenosa y analizadas asimismo por C.L.A.R.

La media de los valores obtenidos a cada tiempo, corregida por los correspondientes factores de dilución y afectadas por sus desviaciones standard, se detallan a continuación.

<u>t (h).</u>	<u>Conc. $\bar{x}(\mu\text{g/ml}) \pm \sigma_{n-1}$</u>
0.083	22.5 $\pm$ 3.0
0.166	36.0 $\pm$ 12.0
0.250	56.5 $\pm$ 16.0
0.333	66.5 $\pm$ 20.5
0.416	74.0 $\pm$ 16.5
0.500	71.0 $\pm$ 19.5
0.583	73.5 $\pm$ 19.5
0.666	67.5 $\pm$ 21.0
0.750	62.5 $\pm$ 19.0
0.833	56.5 $\pm$ 9.0
1.000	50.0 $\pm$ 13.0
1.500	41.0 $\pm$ 11.0
2.000	35.5 $\pm$ 6.0
2.500	33.9 $\pm$ 5.5
3.000	34.4 $\pm$ 6.5

La desviación standard ha sido calculada para $n = 24$

La representación semilogarítmica de estos resultados, se muestra a continuación.

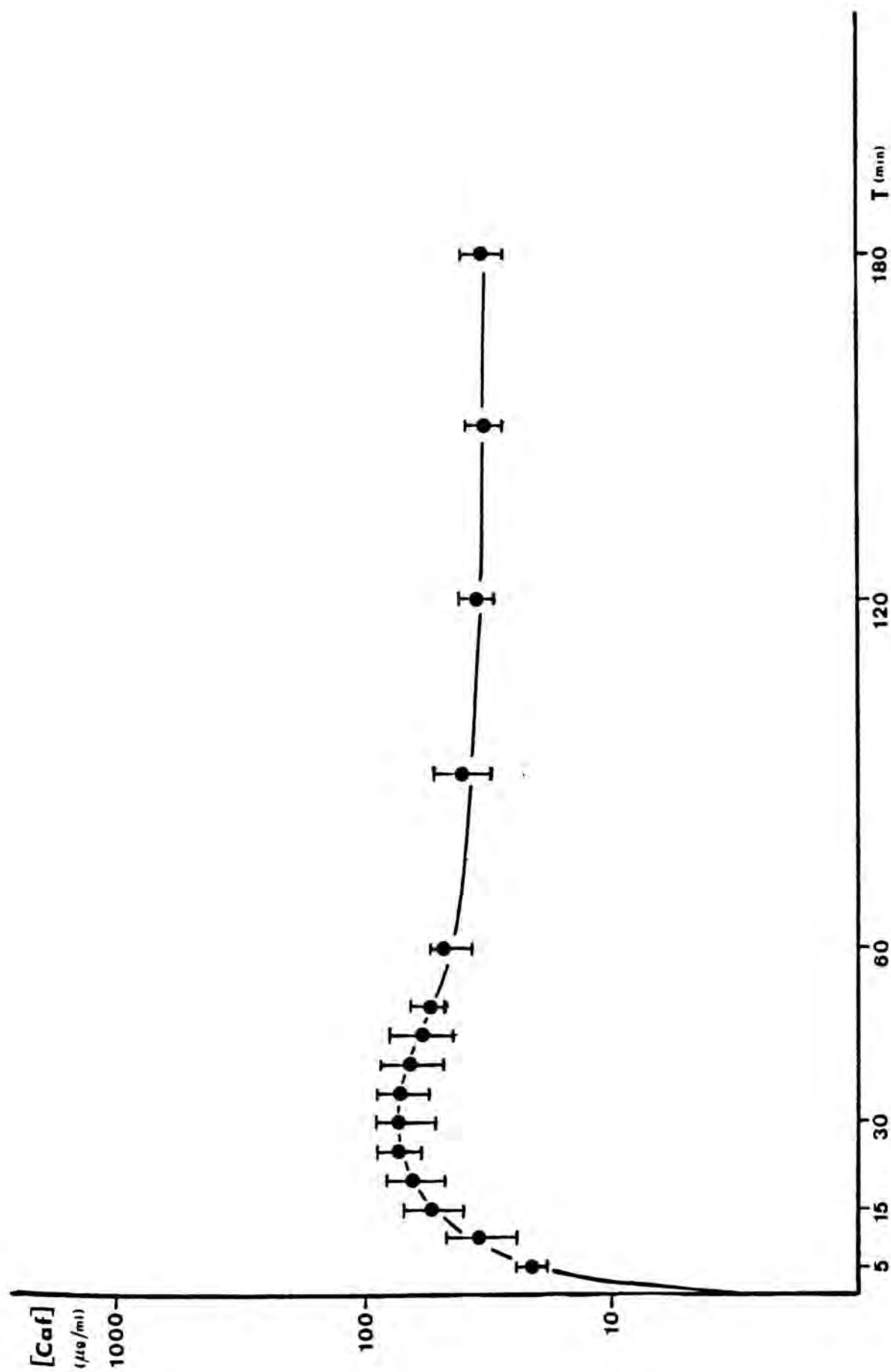


Figura 41.- Representación gráfica de la cinética plasmática del ácido cafeico tras administración oral.

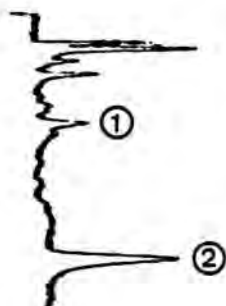


Figura 42.- Ejemplo de la cinética plasmática (oral) del ácido cafeico a los 5 minutos.

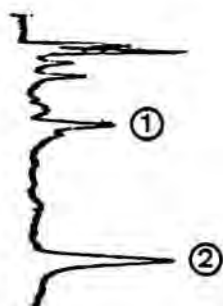


Figura 43.- Ejemplo de la cinética plasmática (oral) del ácido cafeico a los 10 minutos.

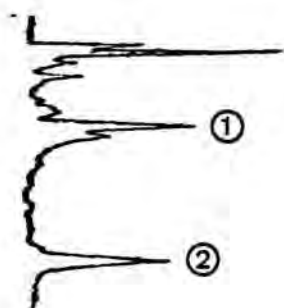


Figura 44.- Ejemplo de la cinética plasmática (oral) del ácido cafeico a los 15 minutos.

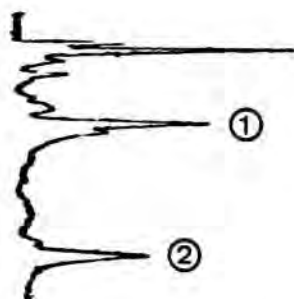


Figura 45.- Ejemplo de la cinética plasmática (oral) del ácido cafeico a los 20 minutos.

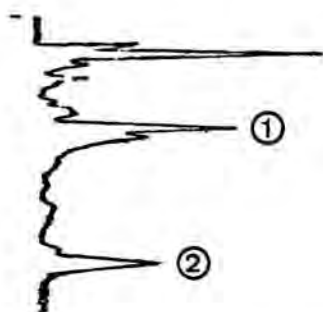


Figura 46.- Ejemplo de la cinética plasmática (oral) del ácido cafeico a los 25 minutos.

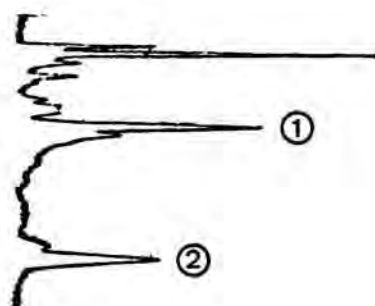


Figura 47.- Ejemplo de la cinética plasmática (oral) del ácido cafeico a los 30 minutos.

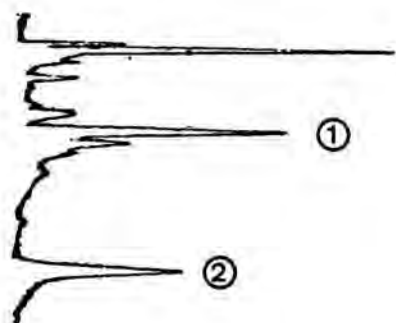


Figura 48.- Ejemplo de la cinética plasmática (oral) del ácido cafeico a los 35 minutos.

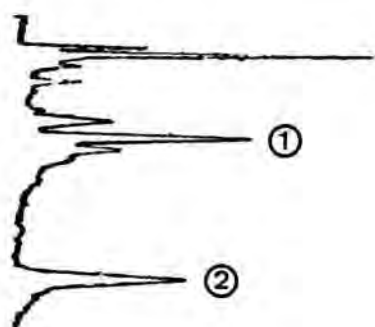


Figura 49.- Ejemplo de la cinética plasmática (oral) del ácido cafeico a los 40 minutos.

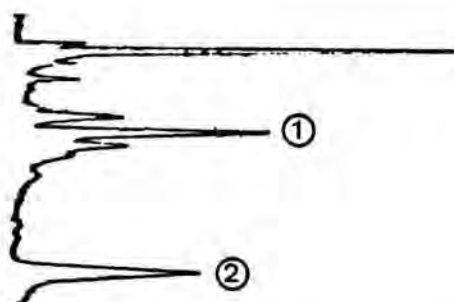


Figura 50.- Ejemplo de la cinética plasmática (oral) del ácido cafeico a los 45 minutos.

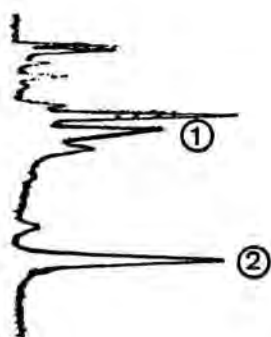


Figura 51.- Ejemplo de la cinética plasmática (oral) del ácido cafeico a los 50 minutos.

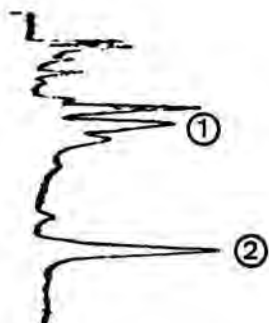


Figura 52.- Ejemplo de la cinética plasmática (oral) del ácido cafeico a los 60 minutos.

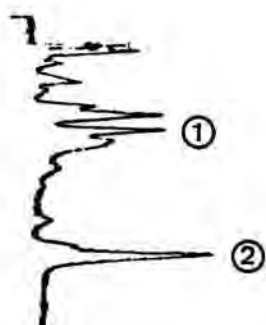


Figura 53.- Ejemplo de la cinética plasmática (oral) del ácido cafeico a los 90 minutos.

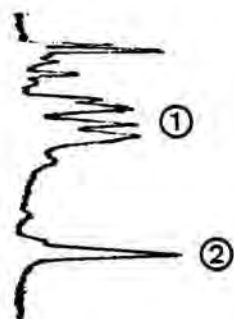


Figura 54.- Ejemplo de la cinética plasmática (oral) del ácido cafeico a los 120 minutos.

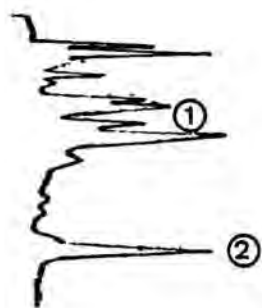


Figura 55.- Ejemplo de la cinética plasmática (oral) del ácido cafeico a los 150 minutos.

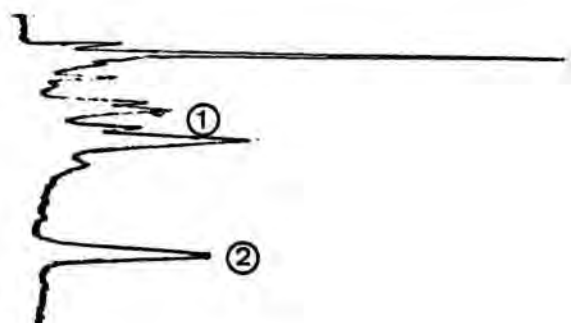


Figura 56.- Ejemplo de la cinética plasmática (oral) del ácido cafeico a los 180 minutos.

En la fase de eliminación, es difícil predecir a simple vista si el fármaco sigue un proceso mono o biexponencial. La diferencia entre los coeficientes de correlación al ajustar esta fase terminal a una o dos rectas por el método de los mínimos cuadrados, tampoco es un factor discriminatorio, ya que la mayor aproximación a $|1|$, obtenida en el caso del tratamiento monocompartimental no es significativamente superior a la obtenida para el tratamiento bicompartimental, y es debida únicamente a la diferencia de los grados de libertad.

Se procedió, por tanto, a la estima inicial de los parámetros correspondientes a una eliminación mono y biexponencial, por el método de los residuales. Estas estimas se introdujeron en el mismo programa que para la cinética intravenosa. Tras varias iteraciones, los modelos más ajustados, según el mencionado programa informatizado fueron:

A) Ajustado al modelo
monocompartimental

SYMBOLIC MODEL

Y(I) = F[B(1:4),X(I),X1(I)]
+ e(I)

EDe(I) = 0
VAR[e(I)] = B(5)^2

*** ****

INITIAL PARAMETER ESTIMATES

NO.	EST	LOWBD	UPBD
1	.08	.06	.1
2	.3	.2	.5
3	.1	.06	.2
4	.10	.8	.15
5	.3	0	3

*** ****

DATA ENTERED

NO.	X	Y
1	.0833	.0225
2	.166	.036
3	.25	.0565
4	.33	.0665
5	.416	.074
6	.5	.071
7	.583	.0735
8	.66	.0675
9	.75	.0625
10	.833	.0565
11	1	.05
12	1.5	.041
13	2	.0355
14	2.5	.0339
15	3	.0344

*** ****
*** BACKUP FILE NAME IS ***
*** 'ELS510' ***
*** ****

*** ****
*** EXTENDED LEAST SQUARES
*** REGRESSION - PART TWO
*** ****

STRUCTURAL MODEL CODE

```

3770 ! PUT STRUCTURAL MODEL HERE
3780 ! PARAMS ARE B(1:N2)
3790 ! DATA ARE X(),Y()
3800 ! TYPE OF Y IN X1()
3810 ! ELEMENT IS J
3820 ! OUTPUT Y-HAT(J) IN D1
3830 ! DUMMY VARS, USE F0-F9,
3840 ! G0-G9,H0-H9
4320 F1=B(1)
4320 F2=MIN(20,B(2)*X(J))
4320 F3=B(3)
4320 F4=MIN(20,B(4)*X(J))
4330 D1=F1*EXP(-F2)-F3*EXP(-F4)
4350 ! USER-DEFINED STRUCTURAL M
      ODEL CODE ENDS HERE

```

*** ****

SEARCH PREMATURELY TERMINATED

*** ****

*** ****

FINAL RESULTS ARE AS FOLLOWS

-2*LOG LIKELIHOOD=-31.5966
-AKAIKE VALUE=-10.7983
-SCHWARZ VALUE=-9.02819
-LEONARD VALUE=-16.5472

FINAL PARAMETER ESTIMATES

NO.	EST	SE	CV(%)	SEIF
1	.08268129	.1458	176.3	3.066
2	.36931382	1.462	395.9	2.085
3	.12445340	.5530	444.3	2.340
4	8.1607471	50.37	617.2	3.333
5	.13904676	3E-2	18.25	.9999

VAR-COV MATRIX OF ESTIMATES

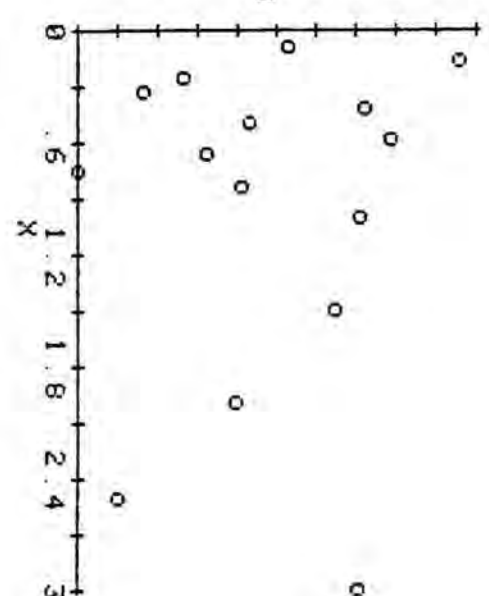
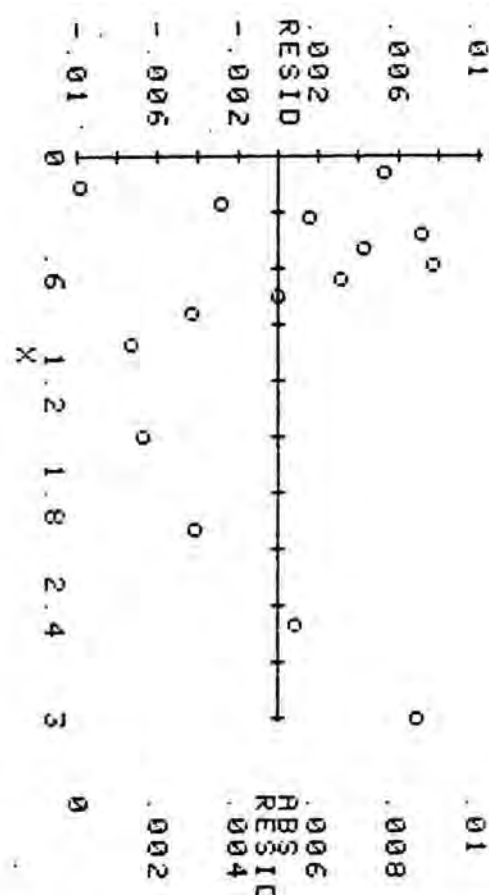
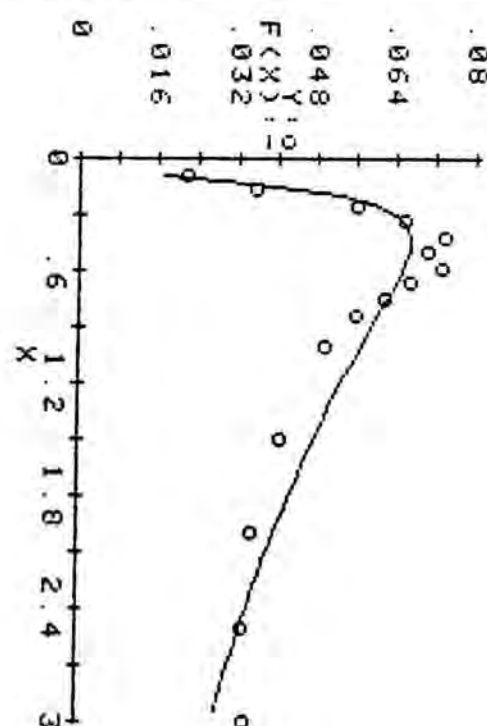
2E-2	.1847	-2E-2	-5.33
0			
2.138	-.120	-39.8	0
.3678	21.99	0	
253	0		
6E-4			

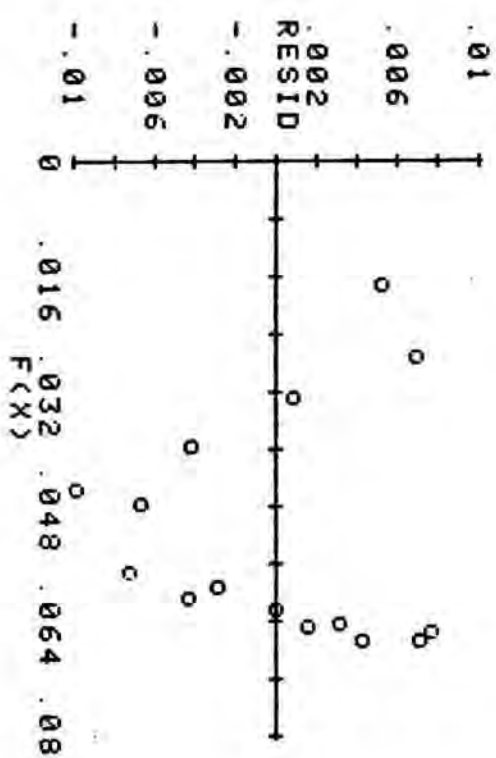
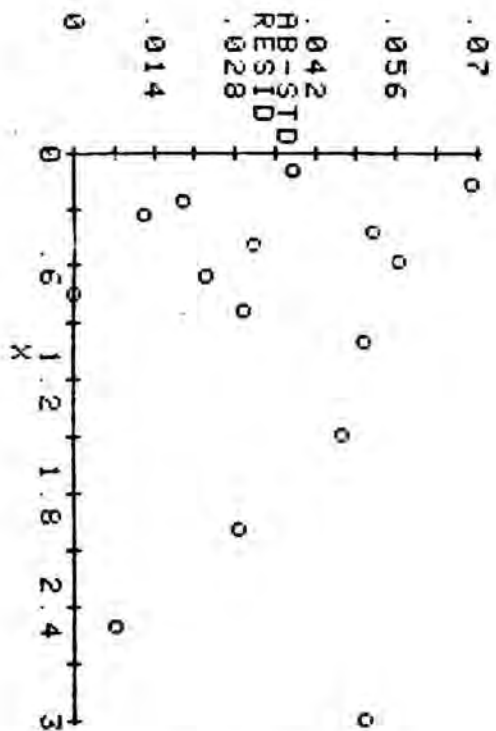
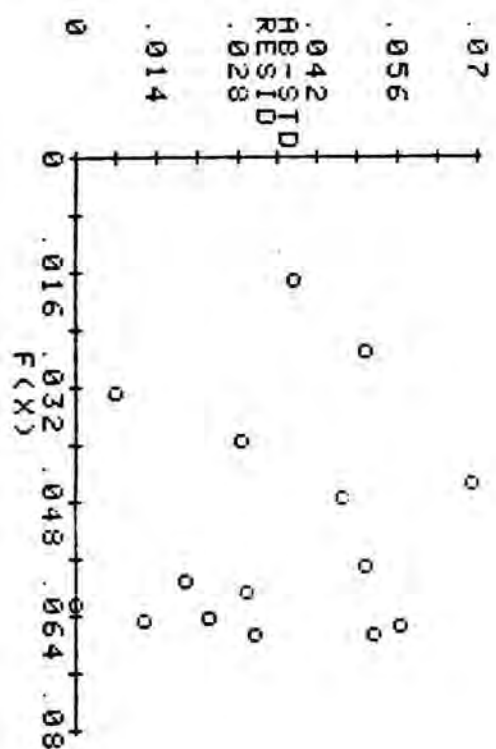
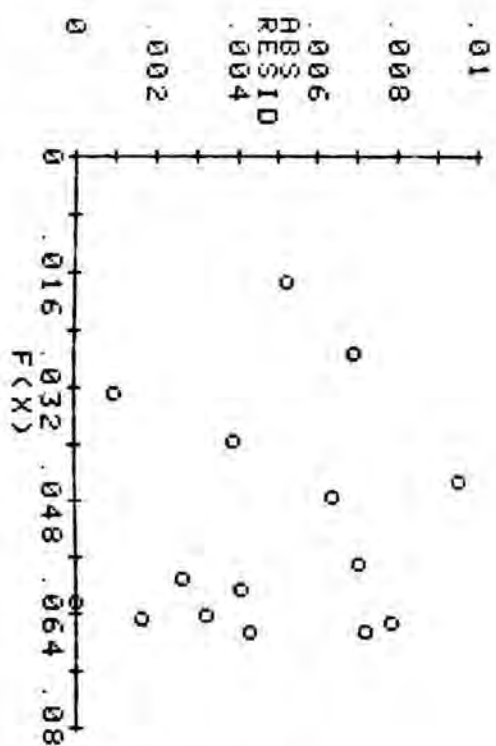
1	.8664	-.272	-.726
0			
1	-.149	-.541	0
1	.7894	0	
1	0		
1			

ESTIMATES OF Y

NO.	X	X1	Y	EST-Y	S-RES
1	.0833	1	.0225	2E-2	4E-2
2	.166	1	.036	5E-2	-.069
3	.25	1	.0565	6E-2	-2E-2
4	.33	1	.0665	6E-2	1E-2
5	.416	1	.074	7E-2	5E-2
6	.5	1	.071	7E-2	3E-2
7	.583	1	.0735	7E-2	6E-2
8	.66	1	.0675	6E-2	2E-2
9	.75	1	.0625	6E-2	7E-4
10	.833	1	.0565	6E-2	-3E-2
11	1	1	.05	6E-2	-5E-2
12	1.5	1	.041	5E-2	-5E-2
13	2	1	.0355	4E-2	-.028
14	2.5	1	.0339	3E-2	8E-3
15	3	1	.0344	.0273	5E-2

PLOTS FOR DEPENDENT VAR TYPE 1





B) Ajustado al modelo
bicompartimental

```
*** *****
EXTENDED LEAST SQUARES
NONLINEAR REGRESSION
*** *****
```

SYMBOLIC MODEL

```
Y(I)      =F[B(1:6),X(I),X1(I)]
           + e(I)
E[e(I)]    =0
VAR[e(I)]  =B(7)^2
```

```
*** *****
```

INITIAL PARAMETER ESTIMATES

```
NO.  EST  LOWBD  UPBD
```

```
1  .37  .35  .4
2  4.6  4.4  4.8
3  .06  .05  .065
4  .2  .15  .25
5  .8  .7  .9
6  8.5  8  9
7  3  0  3
```

```
*** *****
```

DATA ENTERED

```
NO.  X  Y
1  .0833  .0225
2  .166  .036
3  .25  .056
4  .33  .0665
5  .416  .074
6  .5  .071
7  .583  .0735
8  .66  .0675
9  .75  .0625
10  .833  .0565
11  .  .05
12  1.5  .041
13  2  .0355
14  2.5  .0339
15  3  .0344
```

```
*** *****
BACKUP FILE NAME IS ***
'EL829' ***
*** *****
```

```
*** *****
EXTENDED LEAST SQUARES
REGRESSION - PART TWO
*** *****
```

```
*** *****
```

FINAL RESULTS ARE AS FOLLOWS

```
- 2*LOG LIKELIHOOD=-75.7889
- AKAIKE VALUE=-30.8944
- SCHWARZ VALUE=-28.4163
- LEONARD VALUE=-31.5725
```

FINAL PARAMETER ESTIMATES

NO.	EST	SE	CV(%)	SEIF
1	.37304973	4.389	1176.	194.2
2	4.7999368	17.79	370.7	53.28
3	5.9318E-2	6E-2	106.9	9.996
4	.22114362	.4907	221.8	4.479
5	.70039709	4.241	605.6	112.3
6	8.9185298	22.01	246.8	48.67
7	2.0448E-2	4E-3	18.25	1

VAR COV MATRIX OF ESTIMATES

19.17	77.42	.2205	1.541
15.60	-95.6	0	
316.7	.9688	6.829	75.07
-377.	0		
4E-2	3E-2	.2171	-1.01
0			
24.7	1.520	-7.06	0
17.9	-91.8	0	
-84.5	0		
1E-2			

CORR MATRIX OF ESTIMATES

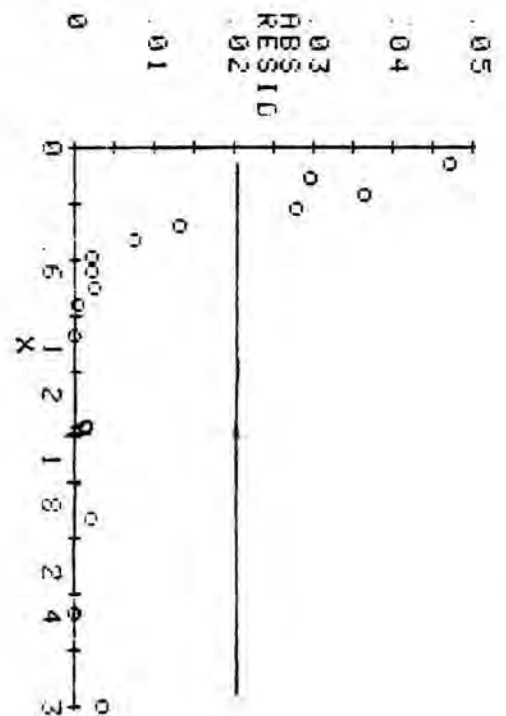
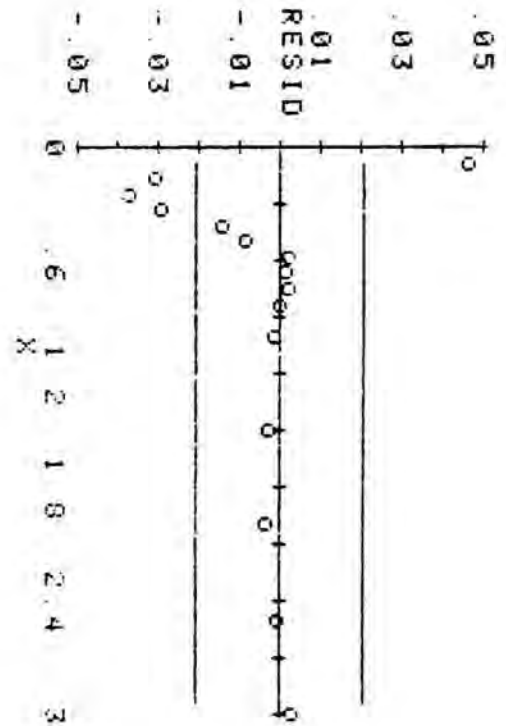
1	.9992	.9911	.7920	-.155
		-.989	0	
1	-.964	.8582	.7820	.9945
		0		
1	0	.9655	.8065	.726
1		.7303	-.653	0
1		-.963	0	
1		0		
1				

STRUCTURAL MODEL CODE

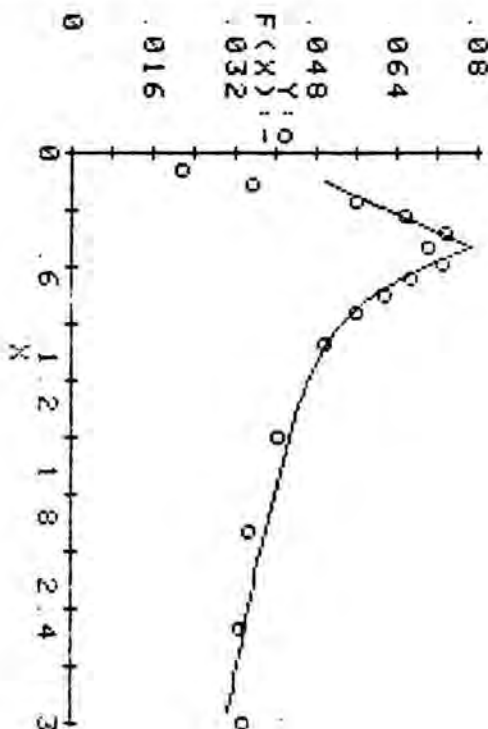
```

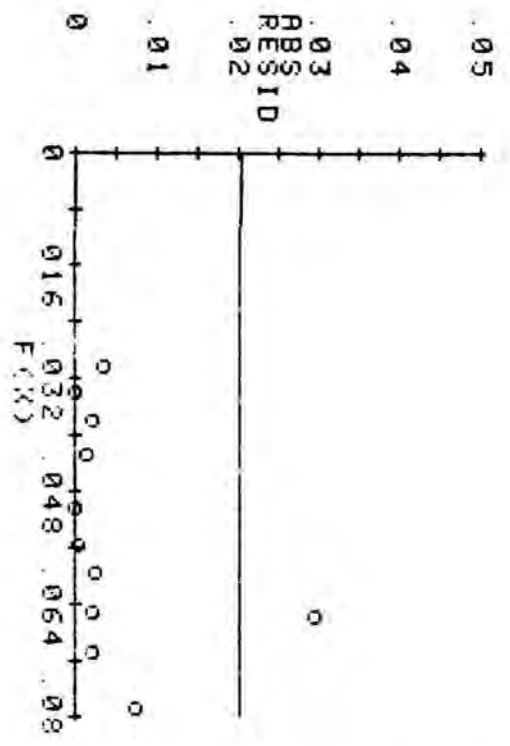
177  ! PUT STRUCTURAL MODEL HERE
178  ! PARAMS ARE B(1:N2)
179  ! DATA ARE X(),Y()
180  ! TYPE OF Y IN X1()
181  ! ELEMENT IS J
182  ! OUTPUT Y-HAT(J) IN D1
183  ! DUMMY VARS, USE F0-F9,
184  ! G0-G9,H0-H9
432  F1=B(1)
433  F2=MIN(20,B(2)*X(J))
432  F3=B(3)
433  F4=MIN(20,B(4)*X(J))
432  F5=B(5)
433  F6=MIN(20,B(6)*X(J))
433  F7=F1*EXP(-F2)+F3*EXP(-F4)
433  D1=F7-F5*EXP(-F6)
435  ! USER-DEFINED STRUCTURAL M
      ODEL CODE ENDS HERE

```



PLOTS FOR DEPENDENT VAR TYPE 1





c) Ajustado al modelo
bicompartimental

```
*** *****
EXTENDED LEAST SQUARES
NONLINEAR REGRESSION
*** *****
```

SYMBOLIC MODEL

```
Y(I)      =F(B(1:6),X(I),X1(I))
           + e(I)
EE[e(I)]  =0
VAR[e(I)] =B(7)^2
```

```
*** *****
```

INITIAL PARAMETER ESTIMATES

NO.	EST	LOWBD	UPBD
1	.7	.65	1
2	.18	.15	.25
3	.07	.065	.08
4	.3	.25	.35
5	.7	.65	1
6	12	10	20
7	.3	0	3

```
*** *****
```

DATA ENTERED

NO.	X	Y
1	.0833	.0225
2	.166	.036
3	.25	.0565
4	.33	.0665
5	.416	.074
6	.5	.071
7	.583	.0735
8	.66	.0675
9	.75	.0625
10	.833	.0565
11	1	.05
12	1.5	.041
13	2	.0355
14	2.5	.0339
15	3	.0344

```
*** *****
BACKUP FILE NAME IS      ***
'ELS663'                  ***
*** *****
```

STRUCTURAL MODEL CODE

```
777: ! PUT STRUCTURAL MODEL HERE
778: ! PARAMS ARE B(1:N2)
779: ! DATA ARE X(),Y()
780: ! TYPE OF Y IN X1()
781: ! ELEMENT IS J
782: ! OUTPUT Y-HAT(J) IN D1
783: ! DUMMY VARS, USE F0-F9,
784: ! G0-G9,H0-H9
432: F1=B(1)
433: F2=MIN(20,B(2)*X(J))
434: F3=B(3)
435: F4=MIN(20,B(4)*X(J))
436: F5=B(5)
437: F6=MIN(20,B(6)*X(J))
438: F7=F1*EXP(-F2)+F3*EXP(-F4)
439: D1=F7-F5*EXP(-F6)
439: ! USER-DEFINED STRUCTURAL M
ODEL CODE ENDS HERE
```

```
*** *****
```

```
*** *****
```

```
*** *****
```

FINAL RESULTS ARE AS FOLLOWS

```
-2*LOG LIKELIHOOD=-118.499
-AKAIKE VALUE=-52.2498
-SCHWARZ VALUE=-49.7716
-LEONARD VALUE=-50.7885
```

FINAL PARAMETER ESTIMATES

NO.	EST	SE	CV(%)	SEIF
1	.87117155	16.11	1849.	541.0
2	21.704872	1.5.5	716.7	394.5
3	8E-2	5E-3	6.677	3.192
4	.34965374	5E-2	15.15	2.124
5	.67747131	18.47	2727.	1158.
6	14.605360	59.46	407.1	240.4
7	4.9523E-3	9E-4	18.25	1

VAR COV MATRIX OF ESTIMATES

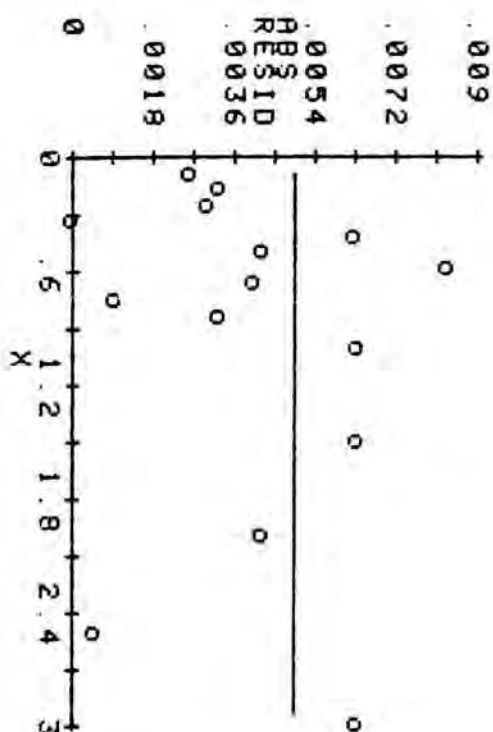
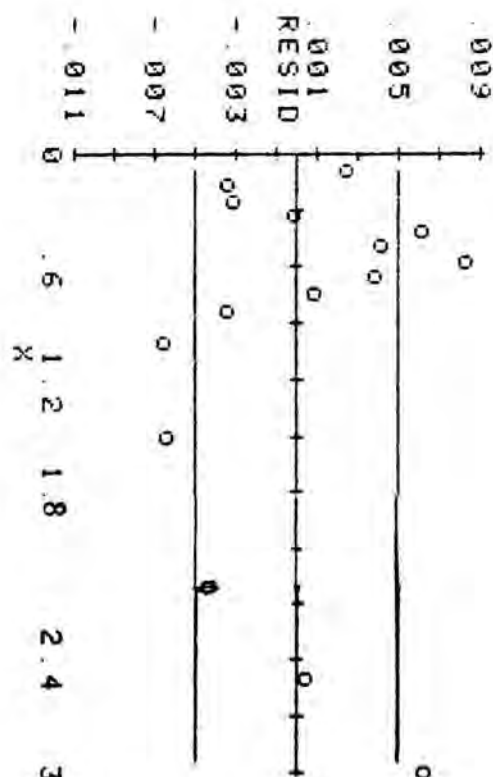
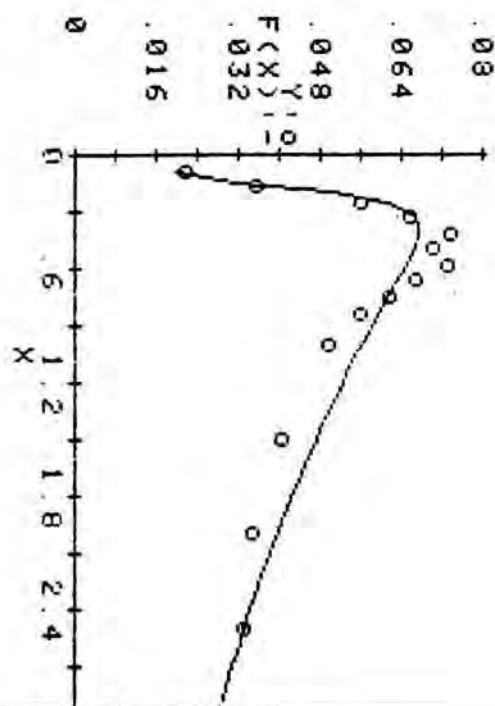
355.6	-2430	-5E-2	-.367
207.5	957.8	0	
14601	.4595	3.243	-2865
-9.68	0		
7E-5	2E-4	-6E-2	-.195
0			
7E-7	-.411	-1.35	0
341.4	1096.	0	
3570.	0		
6E-7			

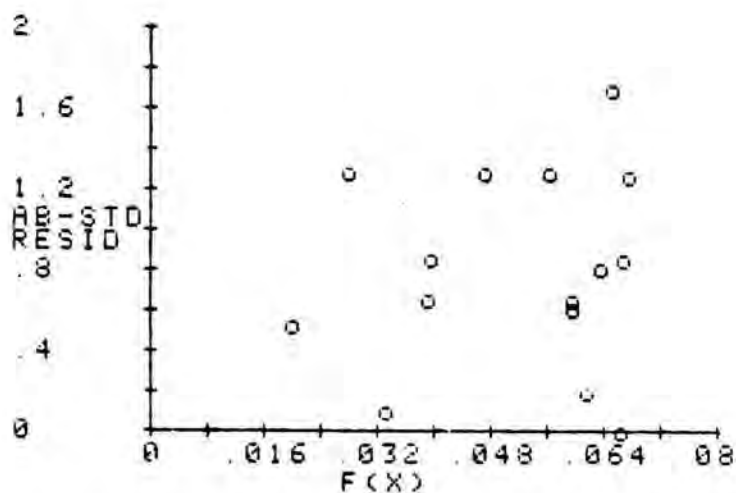
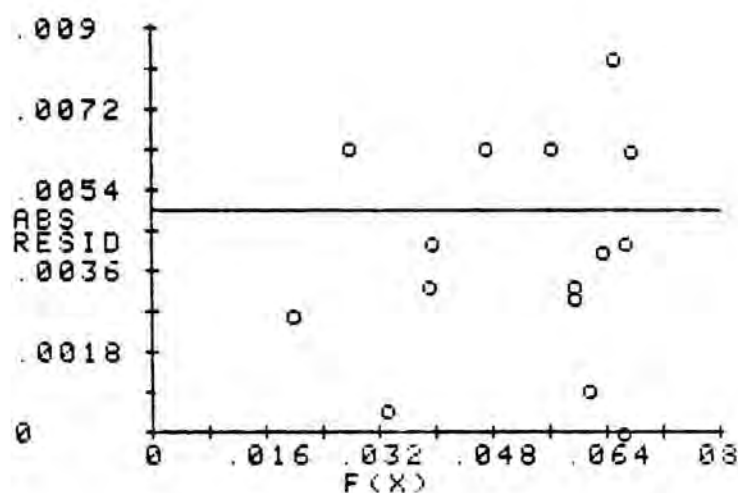
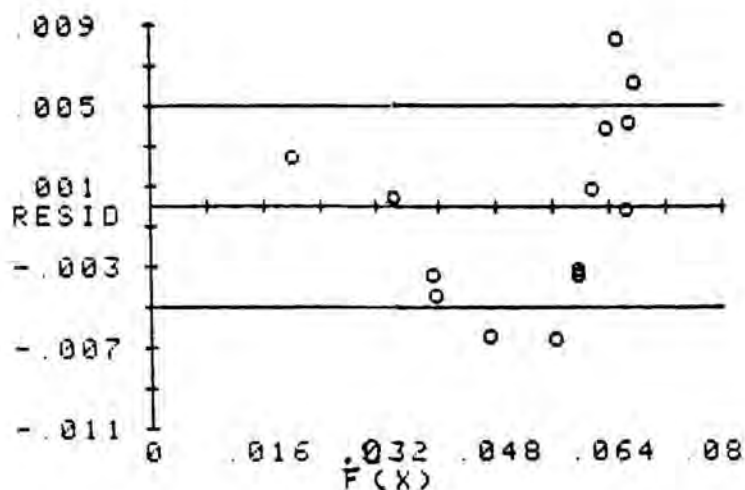
1				
	.9993	-.993	-.599	-.430
1		.9996	0	
		.5523	.3935	-.996
1		0		
		.8697	-.587	-.614
1		0		
		-.420	-.442	0
1		.9984	0	
1		0		
1				

EST MATES OF Y

NO.	X	X1	Y	EST-Y	S-RES
1	.0833	1	.0225	.0198	.5307
2	.166	1	.036	4E-2	-.656
3	.25	1	.0565	6E-2	-.616
4	.33	1	.0665	7E-2	2E-3
5	.416	1	.074	7E-2	1.268
6	.5	1	.071	7E-2	.8625
7	.583	1	.0735	7E-2	1.693
8	.66	1	.0675	6E-2	.8137
9	.75	1	.0625	6E-2	.1949
10	.833	1	.0565	6E-2	-.662
11	1	1	.05	6E-2	-1.29
12	1.5	1	.041	5E-2	-1.28
13	2	1	.0355	4E-2	-.859
14	2.5	1	.0339	3E-2	.1054
15	3	1	.0344	.0280	1.287

PLOTS FOR DEPENDENT VAR TYPE 1





END OF EXTENDED LEAST
SQUARES PROGRAM, ELSFIT, VER 1,
UCSF, LB SHEINER.

Tomando como criterios de bondad y seguridad del ajustado los ya mencionados en el Apartado 5.1.4., se pone de manifiesto que el modelo farmacocinético más probable es el B); único en el que más del 60% de los datos experimentales se encuentran en el campo de existencia de los residuales.

Este hecho se corrobora por la aplicación del criterio de MAICE.

Mientras para el modelo monocompartimental A) se obtiene un valor de AIC de 8.28597, en el modelo bicompartimental más probable B), éste es de -25.1895; por lo que se confirma éste último como el modelo farmacocinético óptimo para el ácido cafeico tras administración oral.

La ecuación representativa es por tanto:

$$C_t = 373.05 e^{-4.7999t} + 59.32 e^{-0.2211t} - 700.4 e^{-8.9185t}$$

Los parámetros farmacocinéticos deducidos a partir de los correspondientes coeficientes y exponentes, o bien por iteración, en el caso de t_0 , t_{max} y C_{max} son:

$$A_0 = 373.0497 \text{ } \mu\text{g/ml.}$$

$$B_0 = 59.3180 \text{ } \mu\text{g/ml.}$$

$$P_0 = 700.3971 \text{ } \mu\text{g/ml.}$$

$$\alpha = 4.7999 \text{ } h^{-1}.$$

$$\beta = 0.2211 \text{ } h^{-1}.$$

$$K_a = 8.9185 \text{ h}^{-1}.$$

$$t_{\max} = 0.2970 \text{ h}^{-1} \text{ (17 min y 49 seg).}$$

$$t_0 = 0.0988 \text{ h}^{-1} \text{ (5 min y 56 seg).}$$

$$C_{\max} = 95.6765 \text{ } \mu\text{g/ml.}$$

$$C_0 = 230.1254 \text{ } \mu\text{g/ml.}$$

$$AUC_{t_0} = 234.7928 \text{ g x h/ml.}$$

$$K_{21} = 1.2335 \text{ h}^{-1}$$

$$K_{10} = 0.8603 \text{ h}^{-1}.$$

$$K_{12} = 2.9271 \text{ h}^{-1}.$$

$$t_{1/2}^a = 0.0777 \text{ h (4 min y 40 seg).}$$

$$t_{1/2}^{\alpha} = 0.1444 \text{ h (8min y 40 seg).}$$

$$t_{1/2}^{\beta} = 3.1350 \text{ h (3 h, 8 min y 6 seg).}$$

$$V_c = 116.8580 \text{ ml/Kg (11.6858 ml/100g).}$$

$$V_p = 277.3000 \text{ ml/Kg (27.7300 ml/100g).}$$

$$V_{d \text{ tss}} = 394.1577 \text{ ml/Kg (39.4158 ml/100g).}$$

$$Cl_{\text{plasm}} = 114.5350 \text{ ml/Kg/h.}$$

$$F = 22.41\%.$$

El carácter bicompartimental del ácido cafeico tras administración oral se corrobora por el valor del cociente $\alpha/\beta = 21.71$.

Las relaciones entre las constantes de distribución, retorno y eliminación son las siguientes:

$$K_{12}/K_{10} = 3.4024$$

$$K_{12}/K_{21} = 2.3730$$

$$K_{21}/K_{10} = 1.4338$$

Estos valores reafirman la tendencia del ácido cafeico hacia el compartimento periférico, ya que la constante de distribución sigue siendo bastante mayor que la de eliminación.

Por otra parte, el valor de la relación K_{12}/K_{21} se ve incrementado con respecto a la vía intravenosa, aunque este valor no es muy elevado, si como cabe esperar, el fenómeno de retorno actúa como factor, en cierto modo limitante, de la eliminación, como se comprueba por la relación K_{21}/K_{10} que ha disminuído una unidad con respecto al valor correspondiente a la cinética intravenosa.

El incremento en el valor de V_c puede deberse a la diferencia entre las dosis administradas por las dos vías. Si se expresan los distintos volúmenes de distribución en función de la dosis/Kg, se obtienen los siguientes valores:

	<u>Vía I.V.</u>	<u>Vía ORAL</u>
V_c	D x 2.39	D x 0.97
V_p	D x 4.19	D x 5.43
$V_{d\ tss}$	D x 6.58	D x 9.85

El coeficiente por el que se ve afectada la dosis en el caso del Vc es menor en la cinética tras administración oral que en la intravenosa. La diferencia se debe, probablemente, al aumento del porcentaje de fijación a las proteínas plasmáticas (McQUEEN 1971, CURRY 1972, YACOBI 1975 y GUENTERT 1980).

Esta variación en la unión a proteínas es fácilmente explicable si se tiene en cuenta que la administración intravenosa se realiza mediante inyección rápida (20 seg), y en cambio, la administración oral, afectada por un valor de biodisponibilidad absoluta de 22.41%, supone una incorporación lenta y paulatina del fármaco a la circulación sistémica.

La velocidad de llegada de los fármacos que se unen altamente a las proteínas plasmáticas, a la circulación general, es de suma importancia. Según SELLERS (1973), si la administración del fármaco se realiza por inyección intravenosa rápida, la concentración plasmática del mismo en ciertos sitios del sistema circulatorio, es muy elevada en los momentos iniciales. Después, puede apreciarse un descenso de ésta, debido a la distribución en todo el resto del volumen sanguíneo, así como en el líquido extravasal. Durante esta fase inicial puede excederse la capacidad de unión de las proteínas plasmáticas, dando lugar a un incremento de la fracción libre de fármaco, responsable en muchos casos de los efectos tóxicos observados tras una administración intravenosa rápida.

Por otro lado, cuando la administración del fármaco se lleva a cabo por vía oral, y la biodisponibilidad absoluta del mismo es relativamente baja, la incorporación a la circulación sistémica se realiza lentamente, permitiendo así, una elevada fijación a las proteínas plasmáticas.

Asimismo, las concentraciones resultantes tras la administración intravenosa son mayores a las encontradas por la vía oral, a pesar de que la dosis es tres veces menor.

Si se tiene en cuenta que el porcentaje de fijación proteica es inversamente proporcional a la concentración de ácido cafeico (ver Apartado 3.3.4.), es lógico esperar pues, que la unión a proteínas sea mayor tras la administración oral que tras la intravenosa.

Al contrario se ven afectados el V_p y el $V_{d\ tss}$, hecho que se halla en relación con el incremento observado en el valor de K_{21} .

Aunque el Cl_{plasm} total presenta prácticamente el mismo valor en ambas cinéticas, es probable que haya variado la relación entre el aclaramiento metabólico y el renal, ya que mientras el Cl_{plasm} total es independiente del porcentaje de unión a las proteínas plasmáticas (GUENTERT 1980), no lo es así ni el aclaramiento metabólico o hepático ni el renal.

A su vez, se observa un incremento significativo de la semivida de eliminación respecto a la administración intravenosa, atribuible quizás, al hecho, ya mencionado, de que en la administración oral, el retorno del compartimento periférico al central actúe como factor limitante de la eliminación, y también, al descenso del valor de la velocidad de eliminación.

Según CURRY (1972), no puede asegurarse que haya una relación entre la velocidad de eliminación y el grado de unión a las proteínas plasmáticas y tejidos, sino que depende de la variación respectiva del volumen de distribución y del aclaramiento plasmático.

5.2.6. OTROS METODOS DE DETERMINACIÓN DE LA Ka

Durante muchos años, el estudio de la absorción en el tracto gastrointestinal se circunscribía a la observación de que un fármaco fuera efectivo o no cuando era administrado por vía oral. Más tarde, se procedió a comparar la respuesta farmacológica según la vía de administración. Cuando ya fue posible la utilización de métodos químicos específicos para la determinación de fármacos en el medio biológico, el estudio de la absorción adquirió sus actuales bases cuantitativas.

De acuerdo con lo que se entiende por absorción de un fármaco, el método más directo para demostrar tal absorción, consistiría en detectar ése en sangre, después de haber sido administrado oralmente. Pero este método, excepto en circunstancias especiales, no es todo lo cuantitativo que sería deseable.

En ocasiones, pueden obtenerse resultados más ajustados, si se llevan a cabo cinéticas detalladas y comparadas de los niveles plasmáticos y/o urinarios tras administración oral e intravenosa (WAGNER 1963) de moléculas marcadas.

Sin embargo, si la sustancia es metabolizada rápidamente por el hígado, los niveles plasmáticos difieren notablemente en ambas cinéticas, ya que la proporción de fármaco absorbido por el tracto gastrointestinal sufre el paso por el hígado antes de distribuirse por todo el organismo (SCHANKER 1971).

Un método alternativo para el estudio de la absorción consiste en la determinación de la cantidad de fármaco presente en la totalidad del organismo y en las excretas. Este método queda limitado a pequeños animales susceptibles de

ser homogenizados en su totalidad, y a su vez es sólo cuantitativo en el caso de que el fármaco no sea metabolizado. De otro modo, es preciso el uso de moléculas marcadas, y la medida de la radiactividad debe realizarse no sólo en el cuerpo y sus excretas sino también en el aire expirado.

Los métodos más cuantitativos para medir la absorción son métodos indirectos, consistentes en determinar la cantidad de fármaco que desaparece del tracto gastrointestinal durante un cierto período de tiempo. Como es de suponer, es necesario comprobar previamente que el fármaco no se degrada en el lumen gastrointestinal.

El ensayo más fisiológico, consiste en administrar el fármaco por vía oral a un lote de animales conscientes. Transcurrido un cierto tiempo, se sacrifican y se extirpa la totalidad del tubo digestivo, determinándose la cantidad de fármaco remanente. Debe comprobarse que el fármaco no ha desaparecido por efecto de unión o adsorción a las paredes gastrointestinales. A pesar de ser el método más adecuado desde el punto de vista fisiológico, adolece de una gran variabilidad debida a condiciones interindividuales en el vaciado gástrico, la motilidad intestinal, y la cantidad, clase y estado de digestión del pienso, aunque los animales hayan estado en ayuno.

Para evitar todas estas variables, se utilizan las denominadas técnicas "in vitro" e "in situ".

Entre las técnicas experimentales preconizadas para valorar las posibilidades de difusión gastrointestinal "in vitro" cabe citar:

- A) La utilización de modelos físico-químicos de difusión a través de una barrera constituida por una capa líquida y una película lipídica o un polímero lipófilo.

B) La difusión a través de membranas constituídas por segmentos gastrointestinales aislados.

Aunque los resultados que se obtienen presentan poca dispersión, si se toma como válida la hipótesis aceptada hasta el presente, concerniente a la absorción intestinal de fármacos ionizables, los estudios de transporte intestinal "in vitro", pueden conducir a conclusiones erróneas en lo que concierne al grado de absorción de sustancias ionizables "in vivo" (REVILLA 1973a, 1973b y 1973c).

En la mayoría de los estudios de absorción intestinal "in situ", las velocidades de absorción obtenidas son más bajas, en comparación con los valores obtenidos en el animal intacto y en el hombre. El método más preciso es el propuesto por DOLUISIO y col. (1969a, 1969b y 1970).

5.2.6.1. DETERMINACION "IN SITU" DE LA CONSTANTE DE ABSOR- CION DEL ACIDO CAFEICO

Esta técnica consiste en medir la desaparición del fármaco introducido directamente en el intestino delgado o en el estómago del animal.

Las principales ventajas de este método incluyen:

- Sencillez de la técnica experimental.
- Desarrollo del ensayo en un corto espacio de tiempo.
- Utillaje simple.
- Necesidad de pocos animales.
- Poca dispersión de los resultados.

Como todo método, adolece sin embargo, de una serie de inconvenientes que serán motivo de discusión posterior.

Se han utilizado un total de 30 ratas Sprague-Dawley hembra, de 190-250 g de peso, procedentes del estabulario de la Facultad, que se mantienen en ayuno durante 15-20 h antes de la experiencia, con libre acceso al agua de bebida (DOLUISIO 1969b). A fin de evitar la ingesta de viruta y la coprofagia, los animales han permanecido durante el ayuno en jaulas con suelo de rejilla metálica ancha.

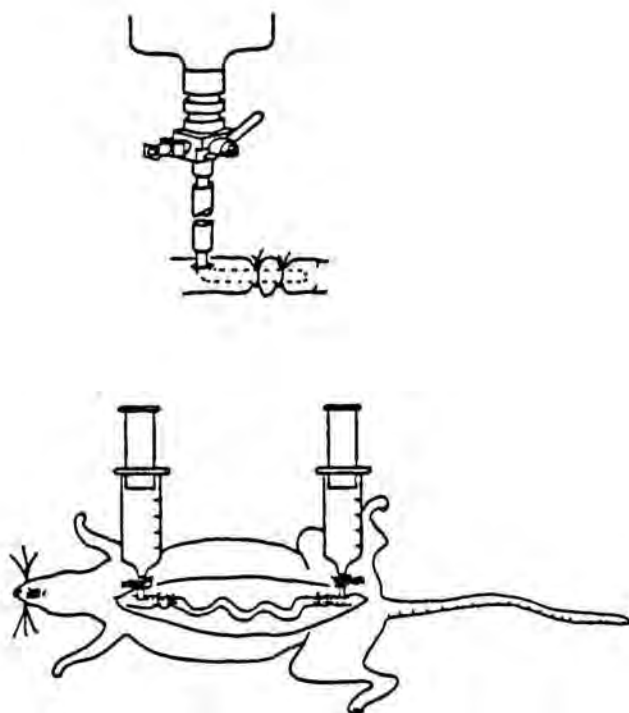
Cada animal se anestesia con una solución de etiluretano (Merck) al 10%, a razón de 1ml/100g.

Una vez anestesiada, la rata se fija a un tablero quirúrgico y se practica una traqueotomía media. Se realiza a continuación una laparotomía media desde el apéndice xifoideo hasta la región suprapélvica.

Se localiza el estómago y se pasa un hilo por debajo del duodeno a unos 2 cm del esfínter pilórico. Seguidamente

se efectúa un corte transversal en V en el duodeno y se introduce una cánula de polivinilo de 2mm de diámetro interno, fijándose a continuación.

Se localiza la porción terminal del íleon y se procede a la canulación a unos 2 cm del ciego, de igual forma que en la porción duodenal.



Debe tenerse cuidado en la manipulación del intestino para reducir las lesiones al mínimo, a fin de mantener intacto al aporte sanguíneo. Un buen método para seleccionar el lugar adecuado de la 2ª canulación, consiste en observar detenidamente la unión de las dos fracciones de intestino con el ciego, pues el íleon, zona de canulación, llega a aquél en sentido casi perpendicular, mientras el colon lo hace más oblicuamente (FORADADA 1974).

Una vez introducidas las 2 cánulas, se procede a suturar la incisión abdominal practicada, ya que el sistema así cerrado, conserva mejor las condiciones fisiológicas.

Para la determinación de la absorción a nivel gástrico, la canulación duodenal se practica del mismo modo, pero en dirección contraria. La segunda cánula de diámetro inferior a 1mm, se introduce por el esófago y se fija a nivel del cardias.

Una vez colocadas las cánulas, se acopla la primera a una jeringa de 20ml, a través de una llave de tres pasos, fijándose el conjunto a un soporte vertical, de forma que el brazo horizontal de la cánula se halle situado a una altura adecuada y no resulte forzada la posición natural del intestino.

En estas condiciones, con la llave de paso cerrada, se llena la jeringa con una solución de lavado, previamente calentada a 37°C, de composición:

NaCl	8.48 g
KCl	0.34 g
CaCl ₂ anh.	0.14 g
NaPO ₄ H ₂ . H ₂ O	0.69 g
H ₂ O c.s.p.	1,000 ml

Seguidamente se abre la llave y se deja fluir el líquido, presionando ligeramente, si es necesario, con el émbolo. El líquido arrastra la suciedad y fluye por la segunda cánula y se desecha. Esta operación se repite unas 6-8 veces, según la suciedad existente en el intestino.

Para el segundo lavado y para la preparación de la solución de ácido cafeico se ha utilizado tampón fosfato 0.05M isotónico y al pH deseado.

Se pasa esta solución tampón 2 veces. Cuando fluye incolora, se recoge una muestra de 0.1ml, que convenientemente diluída, se utilizará como blanco para la determinación espectrofotométrica.

A continuación se procede a expulsar el líquido de lavado remanente en el interior del intestino, mediante un bombeo suave de aire con el émbolo de la jeringa y se conecta la segunda cánula a otra jeringa, de igual modo que la primera.

Para el estudio de la absorción gástrica e intestinal del ácido cafeico, se han preparado las siguientes soluciones:

<u>Concentración</u>	<u>pH</u>
1.0 mg/ml	7.6
1.0 mg/ml	6.0
1.0 mg/ml	4.0
0.4 mg/ml	2.0

Para la posterior toma de muestras, se acopla una jeringa de 1ml a cada una de las llaves.

Se hace pasar al interior del compartimento intestinal o gástrico, según el caso, la solución correspondiente por la primera jeringa y se extrae por la segunda, aspirando con el émbolo, mientras se bombea suavemente aire con la otra. Cuando se ha aspirado toda la solución, se retira una muestra de 0.1ml a través de la jeringa acoplada. Esta muestra sirve de referencia de la concentración a $t = 0$, que varía de la inicial introducida, por dilución con el posible líquido remanente en el lumen y procedente del lavado anterior. Una vez retirada la muestra, se vuelve a hacer pasar al interior del estómago o intestino, la solución de ácido cafeico. Se crea así un compartimento estanco, y a partir de ese momento, se toman muestras cada 5 minutos (DOLUISIO 1969a).

Antes de analizar los resultados, debe tenerse en cuenta la variación del volumen de la solución introducida en el compartimento estanco, a lo largo de toda la experiencia.

DOLUISIO (1969a) estudió estos cambios de volumen utilizando una solución de rojo fenol, colorante que según SCHANKER (1957) no puede ser absorbido. Este colorante actúa como marcador para detectar las pérdidas de agua en el lumen. En ningún caso estudiado por este autor, el volumen disminuyó más de un 10%. Por tanto, el autor concluye que la posible absorción de agua durante toda la experiencia no influye en los resultados, siempre que el volumen introducido en el intestino sea de 8-12ml y el introducido en el estómago de 4-6ml.

PELZMANN (1972), empleando asimismo una solución de rojo fenol (10ml), observó una pérdida de volumen de 4ml en 60 minutos, pero a su vez, detectó rojo fenol en la bilis, hecho que invalida el método ya que la premisa de que se parte (la no absorción intestinal del colorante) es falsa.

KOJIMA (1972) determinó la diferencia de osmolaridad de la solución introducida en el compartimento estanco. La variación de volumen observada, adquiere importancia en el caso de soluciones hiper o hipotónicas. Si la solución introducida es isotónica, la diferencia de volumen hasta los 60 minutos es mínima, llegando a un 7-17% a las 3 horas.

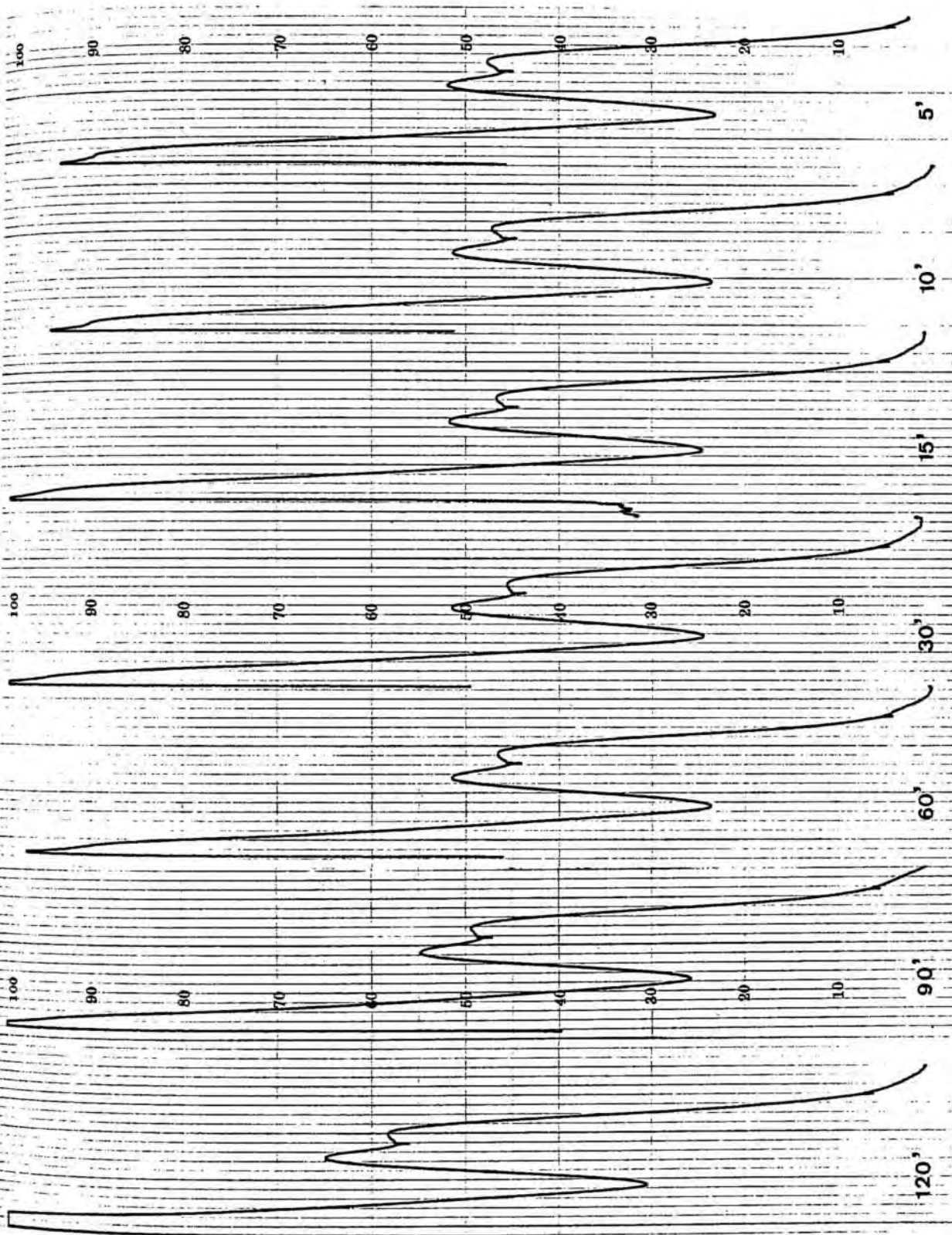
Por todo ello, en las experiencias con el ácido cafeico se utilizaron para el cálculo, los valores obtenidos hasta los 45 minutos.

Se determinó la absorción gástrica e intestinal a distintos valores de pH, para comprobar si era éste el factor limitante de la absorción. Para cada valor de pH se utilizaron 5 ratas, empleándose los volúmenes siguientes:

<u>Compartimento</u>	<u>Ac. Cafeico</u>	<u>pH</u>	<u>Vol.</u>
A) Int. delgado	1 mg/ml	7.6	9 ml
B) Int. delgado	1 mg/ml	6.0	9 ml
C) Int. delgado	1 mg/ml	4.0	9 ml
D) Int. delgado	0.4mg/ml	2.0	8 ml
E) Estómago	1 mg/ml	4.0	4 ml
F) Estómago	0.4mg/ml	2.0	4.5ml

En el caso A), la concentración remanente de ácido cafeico en el lumen intestinal no varió a lo largo de la experiencia, como muestran los espectros U.V. de la página siguiente.

Los resultados obtenidos se muestran a continuación.



Caso A).- Concentración remanente de ácido cafeico en el lumen intestinal a pH 7.6

t (min)	Concentración media remanente (mg/ml) $\pm \sigma_{n-1}$					
	B	C	D	E	F	
0	0.771 $\pm$ 0.072	0.673 $\pm$ 0.047	0.392 $\pm$ 0.031	0.763 $\pm$ 0.042	0.427 $\pm$ 0.010	
5	0.747 $\pm$ 0.092	0.563 $\pm$ 0.032	0.270 $\pm$ 0.011	0.750 $\pm$ 0.021	0.415 $\pm$ 0.010	
10	0.697 $\pm$ 0.141	0.483 $\pm$ 0.032	0.237 $\pm$ 0.010	0.747 $\pm$ 0.015	0.407 $\pm$ 0.010	
15	0.645 $\pm$ 0.163	0.453 $\pm$ 0.035	0.230 $\pm$ 0.008	0.720 $\pm$ 0.001	0.392 $\pm$ 0.009	
30	0.640 $\pm$ 0.099	0.393 $\pm$ 0.015	0.207 $\pm$ 0.017	0.730 $\pm$ 0.014	0.372 $\pm$ 0.009	
45	0.605 $\pm$ 0.148	0.377 $\pm$ 0.021	0.185 $\pm$ 0.024	0.693 $\pm$ 0.015	0.357 $\pm$ 0.006	
60	0.625 $\pm$ 0.021	0.380 $\pm$ 0.040	0.172 $\pm$ 0.027	0.673 $\pm$ 0.015	0.337 $\pm$ 0.006	
90	0.665 $\pm$ 0.078	0.383 $\pm$ 0.065	0.162 $\pm$ 0.042	0.643 $\pm$ 0.015	0.307 $\pm$ 0.021	
120	0.655 $\pm$ 0.149	0.417 $\pm$ 0.086	0.187 $\pm$ 0.086	0.623 $\pm$ 0.029	0.300 $\pm$ 0.039	
K_a (h ⁻¹)	0.213	0.555	0.509	0.227	0.107	
r	0.9088	0.9329	0.9715	0.8863	0.9905	

Tabla II.- Resultados del estudio de absorción "in situ" del ácido cafeico.

Por tanto, las ecuaciones representativas de la concentración absorbida a cada tiempo "t" y a los distintos valores de pH en cada compartimento estanco, son las siguientes:

B) Intestino delgado; pH = 6

$$C_t = \frac{D}{11.23} (1 - e^{-0.2127t})$$

C) Intestino delgado; pH = 4

$$C_t = \frac{D}{12.87} (1 - e^{-0.5554t})$$

D) Intestino delgado; pH = 2

$$C_t = \frac{D}{7.77} (1 - e^{-0.4514t})$$

E) Estómago; pH = 4

$$C_t = \frac{D}{5.46} (1 - e^{-0.1069t})$$

F) Estómago; pH = 2

$$C_t = \frac{D}{4.21} (1 - e^{-0.2275t})$$

Los valores de la constante de absorción que concuerdan más entre sí, corresponden a aquellas experiencias, cuyo valor de pH se acerca al fisiológico: B) y F) (ABAD 1984), pero en cualquier caso, difieren notablemente del valor de la Ka obtenido en la cinética plasmática tras administración oral. Tanto en el compartimento intestinal como en el

gástrico, el valor de la constante de absorción se incrementa, al disminuir el valor del pH. Ello indica que el pH es uno de los principales factores limitantes de la absorción del ácido cafeico. Valores bajos de pH, facilitan la absorción, al estar la molécula menos ionizada.

A igualdad de pH, la absorción gástrica es inferior a la intestinal, reflejándose así la diferencia entre la superficie de absorción y la organización fisiológica en ambas zonas, así como la relación superficie/volumen (DOLUISIO 1969a).

En las experiencias llevadas a cabo en el compartimento intestinal, puede apreciarse que en la mayoría de los casos, la cinética de eliminación varía a partir de los 45 minutos, obteniéndose algunos valores de concentración, superiores a los existentes a ese tiempo, lo que podría indicar un proceso de saturación. Este hecho puede deberse asimismo, a una disminución del volumen introducido en el intestino, por absorción de agua, o al retorno del fármaco absorbido desde la circulación general al intestino. Ya que la segunda hipótesis es difícil de demostrar, se procedió al estudio de la absorción de agua desde el lumen intestinal utilizando como marcador el polímero "Blue Dextran 2000" (Pharmacia Fine Chemicals) en solución isotónica.

Los resultados obtenidos mostraron una gran variabilidad, llegando incluso a valores del 40.67% a los 30 minutos. Este valor tan elevado, supone que los resultados deberían verse afectados por el correspondiente factor de dilución.

Aún teniendo en cuenta este factor, los resultados siguen difiriendo de los obtenidos en el comportamiento cinético tras administración oral e intravenosa.

La cantidad de agua absorbida en el transcurso de las experiencias presenta una gran variabilidad interindividual

y no parece, por tanto, muy indicado el aplicar un factor medio de corrección a los distintos lotes de animales sometidos a estudio. La cuantificación de pequeñas variaciones de la concentración remanente se vería, pues, afectada por factores de corrección en ocasiones muy elevados, lo que invalida de nuevo, el mencionado protocolo.

El hecho de la frecuente aparición de células de desecación en el líquido aspirado y la dificultad en demostrar un posible retorno del fármaco de la circulación general al tubo digestivo por este método, así como la discrepancia entre los diversos autores sobre la variación del volumen introducido en el compartimento estanco, suponen serios inconvenientes a la hora de la utilización de este método para calcular la constante de absorción.

ELIMINACION

6. ELIMINACION

La eliminación de un fármaco comprende tanto los procesos de metabolismo como los de excreción, ya sea hepática y/o renal.

6.1. METABOLISMO

El estudio detallado de las características biológicas y físico-químicas de los fármacos, así como de sus metabolitos, concluye que los efectos del metabolismo son extraordinariamente complejos. En general, los metabolitos de un fármaco son más solubles en agua que la sustancia original, pues éstos contienen un mayor número de grupos funcionales hidrofílicos o bien se conjugan con moléculas lipofóbicas, aunque existen ciertas excepciones. Además, los metabolitos presentan, casi siempre, valores inferiores de pK_a , por lo que, a pH fisiológico, están más ionizados.

La mayoría de los fármacos se metabolizan en la fracción soluble del hígado, mitocondrial o microsomal, aunque también pueden sufrir biotransformaciones a nivel del contenido y pared del tracto gastrointestinal, en los pulmones y en los riñones.

Generalmente, una misma sustancia sufre en el organismo varias reacciones competitivas y simultáneas. El grado de formación de los distintos metabolitos, dependerá de la proporción en que intervengan las diversas reacciones, o bien de la secuencia con que éstas tengan lugar (MANDEL 1972).

La velocidad de metabolización de los fármacos se rige por factores de tipo genético, ambiental y de ritmo circadiano (WAGNER 1983).

El metabolismo de los fármacos es un proceso de capacidad limitada, de ahí que su cinética sea no lineal cuando se considera toda la gama de concentraciones del sustrato.

6.2. ANTECEDENTES EN EL ESTUDIO DE LA ELIMINACION DEL ACIDO CAFEICO

6.2.1. BIOTRANSFORMACION

ARMSTRONG, WALL y PARKER en 1956, observaron la aparición de ácido m-hidroxihipúrico (m-HHA) en la orina humana tras la ingestión de hojas de café. BOOTH y col. en 1957 demostraron que el precursor del m-HHA era el ácido cafeico e identificaron 10 metabolitos del mismo.

BOOTH y col. (1957) administraron a un lote de ratas 100 mg de ácido cafeico, P.O. y recogieron la orina durante 48h. Tras extraer con éter cada muestra de orina y someterla a una cromatografía bidimensional, identificaron los ácidos fenoles y sus conjugados por comparación con patrones.

Para determinar la secuencia de metabolización, administraron a los animales cada uno de los metabolitos identificados. De esta forma, se obtiene el esquema de biotransformación que figura en la página siguiente.

La rata metaboliza principalmente, el ácido cafeico en compuestos con cadena lateral de 3C, aunque también se excretan pequeñas cantidades de m-HHA, ácido vaníllico y los glico y glucuronoconjugados.

En el hombre, todos estos metabolitos se hallan asimismo en el cromatograma de la muestra de orina de 0-8 horas,

con excepción del m-HHA, que no aparece hasta la muestra de 8-24 horas, estando prácticamente ausentes el resto de metabolitos.

En el aspecto cuantitativo, tras la ingestión de 1 g de ácido cafeico, BOOTH y col. detectan en la orina humana:

- 150mg de vanilloilglicina.
- 30-35mg de ácido m-hidroxibenzoico (m-HBA) procedente de la hidrólisis del m-HHA.
- 40mg de ácido ferúlico.
- 35mg de feruloilglicina.
- 15-20mg de ácido dehidroferúlico.
- 10-15mg de ácido vaníllico.

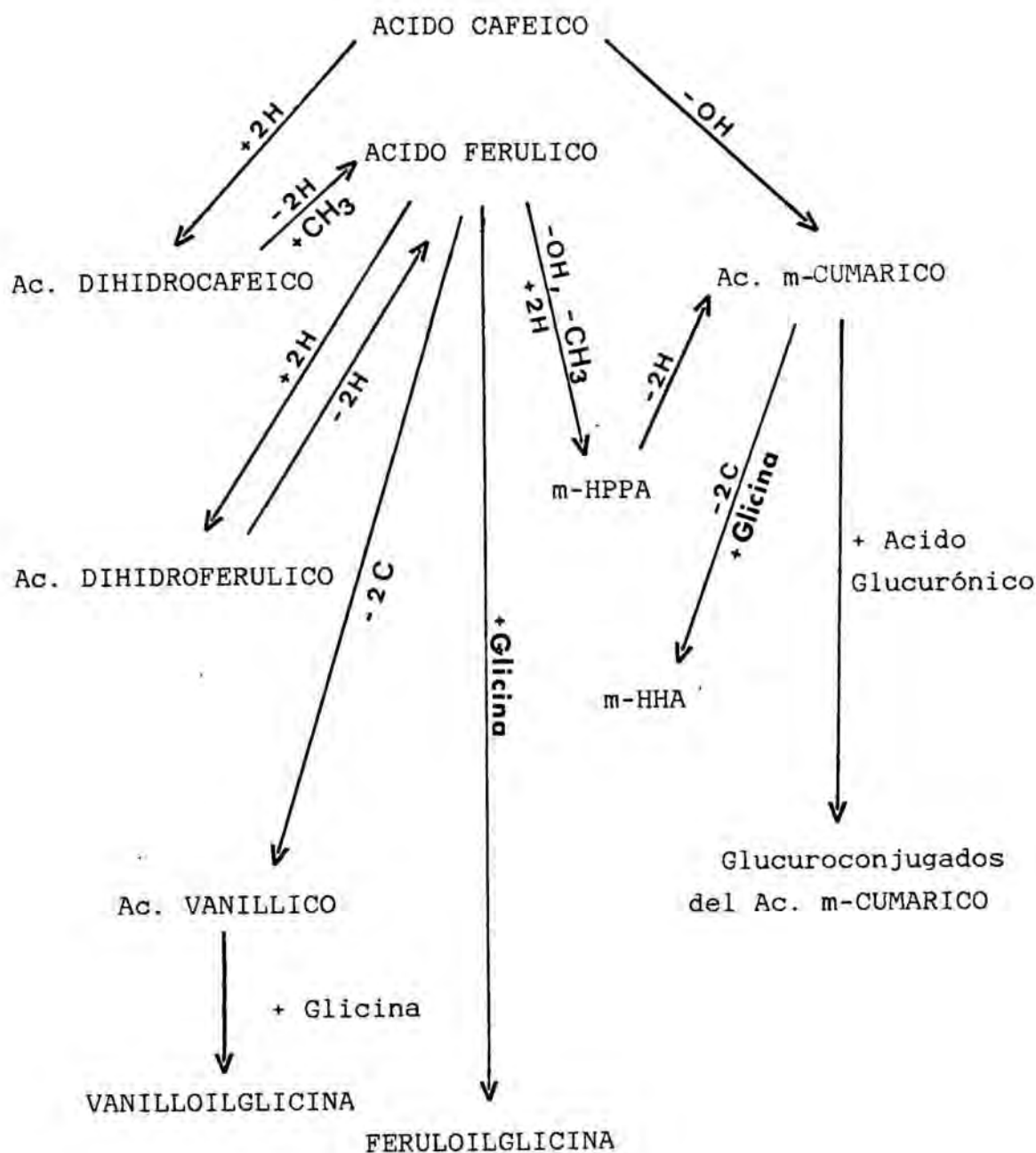
En la rata, tras la administración oral de 150mg de ácido cafeico, se excretan por la orina:

- 18mg de ácido m-hidroxifenilpropiónico (m-HPPA).
- 20-25mg de ácido ferúlico.
- 5mg de ácido vaníllico.

Por todo ello, se cree que el ácido cafeico puede actuar como sustrato de los enzimas capaces de llevar a cabo los procesos metabólicos de metilación, β -oxidación y conjugación hepáticos.

En la rata, la ruta preferente de biotransformación parece ser la que conduce a la formación de m-HPPA, mientras que en el hombre lo es la del m-HHA.

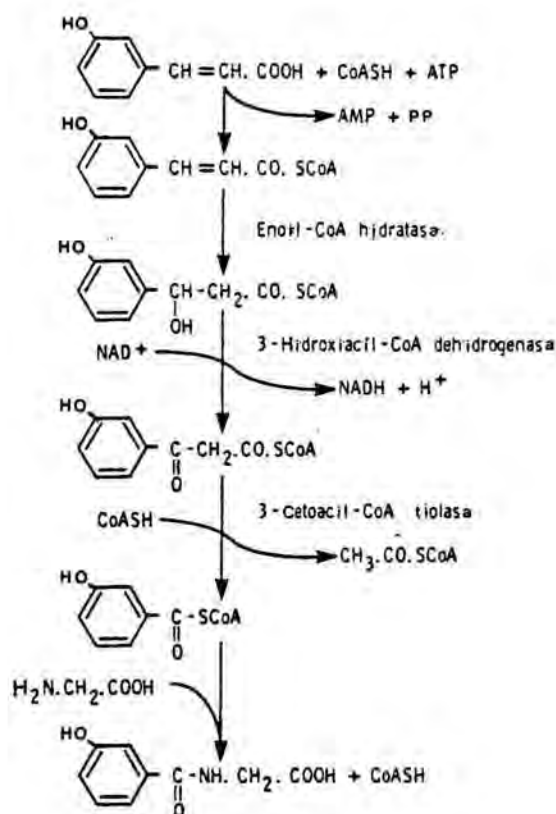
Los mismos autores demostraron también, que la hidrólisis del m-HHA produce m-HBA, pero no ácido m-cumárico, por lo que la β -oxidación hasta m-HBA parece ser irreversible y preferente a la formación del m-cumárico.



m-HPPA : Acido m-hidroxifenilpropiónico.

m-HHA : Acido m-hidroxihipúrico.

A este respecto, el esquema de la transformación del ácido m-cumárico (formado por dehidroxilación del ácido cafeico) en m-HHA, propuesto por HOSKINS (1984), es el siguiente:



Según RANGANATHAN y RAMASARMA (1971, 1974) los enzimas responsables de esta β -oxidación se localizan en el hígado.

Varios autores (HOSKIN 1984, HOLDER 1978 y BOOTH 1963a, 1963b), señalan a la flora intestinal como la responsable de la reducción de la cadena lateral para la formación de ácido dehidrocafeico, dehidroferúlico y m-HPPA. Sin embargo, SCHELIN (1968) demuestra que tal reducción puede tener lugar también en el propio organismo animal.

Según De EDS y col. (1957), la deshidroxilación en posición -para, puede llevarse a cabo en la rata y en el conejo. Pero más tarde, BOOTH (1963) y SCHELINE (1968), demuestran que la formación de m-HPPA depende de la excreción de ácido ferúlico o cafeico, en forma de conjugados por la bilis. Estos conjugados no son absorbidos, pero sí atacados por enzimas bacterianas del tipo β -glucuronidasa. El aglicón liberado, puede entonces ser metabolizado a m-HPPA por la flora intestinal.

SCHELINE (1966a, 1966b, 1967 y 1968) demuestra que la descarboxilación intestinal es otro paso importante en el metabolismo del ácido cafeico.

La capacidad de la microflora intestinal para descarboxilar los ácidos fenoles, se debe a la presencia de microorganismos (como por ejemplo Aerobacter) que tienen varias descarboxilasas específicas. Sin embargo, los derivados del ácido fenilacético o del fenilpropiónico no pueden ser descarboxilados.

HATHWAY en 1975, afirma que la mayoría de los metabolitos del ácido cafeico se producen por acción de la microflora intestinal, y que únicamente la O-metilación es la reacción que puede llevarse a cabo en el propio organismo animal. Este hecho fue demostrado también por PEPPERCORN (1972) al estudiar la biotransformación del ácido cafeico en ratas gnotobióticas.

6.2.2. EXCRECION HEPATOBILIAR

El parámetro representativo de la excreción hepática, el denominado aclaramiento hepático (Cl_h), corresponde al volumen de sangre que recorre el hígado totalmente depurada de fármaco por unidad de tiempo (LABAUNE 1984).

En la determinación de este parámetro, hay que tener en cuenta los dos fenómenos complementarios que intervienen a nivel del hígado:

- La actividad metabólica.
- La secreción biliar.

Cuando la fracción libre del fármaco llega a la célula hepática, la fracción total extraída (E_h), es el resultado de la fracción metabolizada (e_m) y la eliminada por la bilis (e_b).

Los únicos datos referentes a la eliminación del ácido cafeico, son los suministrados por WESTENDORF y CZOK (1983), que determinaron la excreción biliar del ácido cafeico y otros ácidos fenoles relacionados y su influencia en el flujo biliar.

Los ácidos fenoles fueron administrados intraduodenalmente a las dosis de 128, 256 y 384 mol/Kg.

Los resultados referentes al ácido cafeico y sus metabolitos excretados por la bilis a las 2 horas fueron:

<u>Dosis ($\mu\text{mol/Kg}$)</u>	<u>% Dosis excretada</u>
128	4.9 $\pm$ 0.4
256	4.7 $\pm$ 0.3
384	4.4 $\pm$ 0.7

El resto de los ácidos fenoles presentaron un porcentaje de excreción biliar similar (ácidos p- y m-cumárico) y en otros casos superior al del ácido cafeico (8% el ácido p-metoxicinámico y un 20% el ácido ferúlico, isoferúlico, di y trimetoxicinámico).

Es de destacar el hecho de que la excreción biliar máxima, ocurre en aquellos casos en los que existe un grupo metoxilado en la molécula. En cambio, aquellos ácidos fenoles que poseen tan sólo grupos fenólicos libres, presentan un menor porcentaje de excreción biliar.

En todos los ácidos fenoles estudiados por WESTENDORF y CZOK, los metabolitos que aparecen en la bilis son en su mayoría derivados glucurónicos.

6.3. ELIMINACION RENAL

Como ya se ha mencionado, la eliminación o desaparición de un fármaco de los fluidos corporales, tiene lugar mediante la biotransformación y la excreción a través de pulmones, hígado y riñones. Desde el punto de vista farmacocinético, el fármaco remanente en el tracto gastrointestinal se considera ya, fuera del organismo. Por tanto, un mecanismo de eliminación será cualquier proceso que contribuya sustancialmente a un cambio de concentración del fármaco en los líquidos biológicos (KRÜGER-THIEMER 1977).

Pero farmacocinéticamente hablando, el proceso más importante de eliminación es la excreción urinaria, ya que el riñón es la vía mayoritaria para la eliminación de muchos fármacos y sus metabolitos (WAGNER 1983). Además, a partir de los datos urinarios, pueden deducirse otros datos farmacocinéticos.

La variación en la tasa de eliminación renal de los fármacos depende de tres fenómenos:

- Filtración glomerular.
- Secreción tubular.
- Reabsorción tubular.

Filtración glomerular

La filtración glomerular (GFR) de solutos es un proceso de ultrafiltración del plasma a través de la pared capilar de los glomérulos renales. Este proceso no es selectivo ya que la membrana glomerular no impide el paso de fármacos de pequeño peso molecular. Sin embargo, el grado de filtración está limitado por la unión de la sustancia problema a las proteínas plasmáticas.

Es prácticamente imposible determinar en qué grado la unión a proteínas limita la filtración glomerular, puesto que la determinación de la fijación a proteínas no puede hacerse bajo condiciones equivalentes a las que existen en los capilares glomerulares.

Si un fármaco no se une a las proteínas plasmáticas, filtra libremente según el producto:

$C_p \times \text{GFR}$

Siendo C_p la concentración plasmática del fármaco.

Una cuarta o quinta parte del volumen de flujo plasmático renal (RPF) es filtrado hacia el lumen tubular. Así, la fracción de filtración puede calcularse según la relación:

$$\text{FF} = \text{GFR} / \text{RPF}$$

Esta relación tiene un valor de 0.2-0.25, excepto en el perro que llega a ser de 0.35 (CAFRUNY 1971).

Para el cálculo del GFR se utilizan sustancias endógenas o bien una perfusión de éstas de modo que se alcance una concentración estable en plasma (OPAVA 1978).

Las sustancias empleadas, deben cumplir ciertos requisitos:

- No unirse a las proteínas plasmáticas, y por tanto, ser filtradas en su totalidad.
- No ser secretadas ni reabsorbidas por el túbulo renal.
- No ser metabolizadas por el organismo.

Generalmente, se utilizan como sustancias de referencia la creatinina, la inulina, y últimamente THOMSEN (1984) preconiza el uso del litio.

De este modo, OPAVA y MARTINEZ-MALDONADO (1978) obtienen un valor de GFR para la rata de 2.0 ml/min.

Secreción tubular

Aunque el filtrado glomerular es un paso esencial en la formación de la orina, la composición final de ésta depende de la medida en que los solutos puedan ser transportados a través de la membrana de los túbulos renales.

La secreción tubular es un proceso de transporte activo que, por definición, requiere un aporte de energía y puede saturarse, así como sufrir fenómenos de competición.

Interviene a nivel del túbulo contorneado proximal y concierne únicamente a la fracción ionizada, hidrosoluble, del fármaco. Tiene lugar por mecanismos distintos, según se trate de ácidos o bases débiles.

Este proceso favorece la eliminación de la fracción de fármaco unido a las proteínas (LABAUNE 1984).

Reabsorción tubular

Este mecanismo afecta a las formas no ionizadas, liposolubles, del fármaco, e implica, un proceso de difusión pasiva a nivel de los túbulos proximal y distal.

En aquellas sustancias de estructura próxima a los autacoides, se efectúa por un mecanismo de transporte activo a nivel del túbulo proximal.

Toda sustancia cuyo aclaramiento renal es inferior al GFR, la fracción libre de la misma, sufre un proceso de reabsorción tubular.

El pH urinario y las propiedades físico-químicas del fármaco, son los principales factores que influyen en los procesos de reabsorción y secreción.

Estos factores son de gran importancia en el caso de aquellos ácidos débiles cuyo pKa se halla entre 3 y 7.5, como es el caso del ácido cafeico. El aclaramiento renal depende entonces, en gran medida, del pH del medio, pues determina la magnitud de la reabsorción tubular.

Aquellos compuestos cuya reabsorción varía con el pH, son igualmente sensibles a las modificaciones del flujo urinario (LABAUNE 1984).

Parámetros que definen la excreción renal

El principal parámetro que define la eliminación renal es el denominado Aclaramiento Renal o volumen sanguíneo o plasmático totalmente depurado de fármaco por unidad de tiempo a nivel renal (Cl_r). Se calcula a partir de la relación:

$$Cl_r = f_e \times Cl_{\text{plasm total}}$$

Siendo f_e la fracción de dosis de fármaco administrado eliminada por la orina.

El aclaramiento renal, también puede calcularse a partir de la ecuación:

$$Cl_r = \frac{Cu \times Vu}{Cp}$$

Siendo,

Cu: Concentración de fármaco en la orina.

Cp: Concentración de fármaco en el plasma.

Vu: Flujo de orina.

Si una sustancia es filtrada tan sólo a nivel glomerular y no sufre reabsorción ni secreción tubular, la velocidad de excreción es igual a la velocidad de filtración, y así

$$Cl_r = \frac{Cu \times GFR}{Cp}$$

Sin embargo, la membrana glomerular sólo filtra la fracción libre del fármaco. La concentración de esta sustancia en la orina recién filtrada es igual a la concentración de fármaco libre en el plasma.

$$Cu = f_1 \times Cp$$

Siendo f_1 la fracción de fármaco libre en plasma. Así puede calcularse el Cl_r de una sustancia que, a nivel renal, sólo presenta filtración glomerular, según la ecuación:

$$Cl_r = f_1 \times GFR$$

Si el fármaco sufre también, procesos de reabsorción y secreción tubular, la ecuación anterior se convierte en:

$$Cl_r = f_1 \times GFR + \frac{[S-R]}{Cp}$$

$$\text{o bien} \quad \frac{\text{Clr}}{f_1 \times \text{GFR}} = 1 + \frac{[\text{S-R}]}{\text{Cp}}$$

Siendo:

S: Velocidad de secreción.

R: Velocidad de reabsorción.

Si $[\text{S-R}]$ es constante, el Clr depende de la Cp; cuando ésta aumenta, el Clr aumenta paralelamente en el caso de un fenómeno de reabsorción, pero disminuye si existe fundamentalmente secreción.

Si $[\text{S-R}]$ aumenta de forma constante en función de Cp, se trata de un proceso de difusión pasiva. Por último, si $[\text{S-R}]$ alcanza un máximo, aunque la Cp aumente, existe un proceso de transporte activo (sobre todo a nivel de la secreción tubular).

Otro parámetro relacionado con la eliminación renal es el coeficiente de extracción renal "E", que se determina por la ecuación:

$$E = \frac{\text{GFR} \times \text{Cu}}{\text{Q} \times \text{Cp}}$$

Siendo Q el flujo sanguíneo renal. Si el valor de E es bajo, el Clr es muy sensible a cualquier variación de la fracción libre del fármaco; no siendo así, en el caso de un valor de E elevado.

6.3.1. DETERMINACION DEL ACLARAMIENTO RENAL Y EXTRARRENAL DEL ACIDO CAFEICO

Para el cálculo del aclaramiento renal del ácido cafeico, se emplearon 15 ratas Sprague-Dawley, hembras, de 165-185g, que se mantuvieron en ayuno durante 20 horas antes de la experiencia con agua "ad libitum".

Se preparó una solución de ácido cafeico de 20 mg/ml en tampón fosfato 0.05M, isotónico.

A 6 ratas se les administró el ácido fenol por vía oral mediante una sonda esofágica, a razón de 0.6 ml/100 g (dosis = 120 mg/Kg). A otros 6 animales se les inyectó en la vena caudal 0.2 ml/100 g de la solución de ácido cafeico (dosis = 40 mg/Kg). Los 3 animales restantes se utilizaron como control para calcular el rendimiento del método.

Inmediatamente después, se colocaron los animales en jaulas individuales de metabolismo (Tecniplast). Previamente se tararon los recipientes destinados a la recogida de orina.

Todos los animales se mantuvieron 24 horas en estas condiciones de ayuno y con libre acceso al agua de bebida que contenía glucosa al 3%, para evitar posibles modificaciones bioquímicas o fisiometabólicas a causa del ayuno prolongado.

Si se tiene en cuenta las semividas de eliminación calculadas para las vías intravenosa y oral, el ácido cafeico debe ser totalmente eliminado del organismo en un período de 24 horas.

Transcurrido ese tiempo, se recogieron los recipientes con las orinas y se pesaron. Por diferencia con la tara inicial, se calculó el volumen de orina formado por cada animal durante las 24 horas. Se tomó como 1 el valor promedio de la densidad de la orina. Los resultados obtenidos fueron:

Vía Intravenosa.-

<u>Animal</u>	<u>Peso corporal</u>	<u>Volumen de orina</u>
1	165 g	55.5 ml
2	173 g	84.1 ml
3	182 g	73 ml
4	180 g	43.6 ml
5	175 g	27.8 ml
6	178 g	24 ml

Vía Oral.-

<u>Animal</u>	<u>Peso corporal</u>	<u>Volumen de orina</u>
7	185 g	64 ml
8	165 g	65.2 ml
9	170 g	81.5 ml
10	170 g	67.4 ml
11	180 g	59 ml
12	185 g	17 ml

Si tenemos en cuenta que el volumen normal de orina formado por la rata durante 24 horas es del orden de 150-300 ml/Kg, podemos observar que en la mayoría de los casos, y especialmente en el grupo de animales que recibieron el ácido cafeico por vía oral, hubo un incremento del volumen urinario, dato que se halla en relación con lo expuesto por BARRE (1962) sobre la acción diurética del ácido cafeico.

Para la extracción del ácido cafeico presente en la orina, se siguió el método propuesto por BOOTH en 1957.

Se tomó una alícuota de 3 ml de orina de cada animal. A cada muestra se añadió NaCl hasta una concentración final del 20%, a fin de favorecer la posterior separación entre las fases orgánica y acuosa, y se llevó a un pH igual o inferior a 2 con HCl conc.

A estos 3 ml de orina así tratados, se añadieron 3 ml de éter etílico, y el conjunto se colocó en tubos de centrifuga de 15 ml con tapón de rosca. Se agitaron horizontalmente (Agitelec SL 201) durante 10 minutos, a un ritmo de 160 oscilaciones/minuto.

A continuación, se centrifugaron los tubos a 2,500 rpm durante 5 minutos para obtener una correcta separación de las dos fases.

Este protocolo extractivo se repitió 5 veces para cada muestra. Los extractos etéreos obtenidos y reunidos, se llevaron a sequedad en un evaporador analítico (Meyer N-Evap, Mod. 111), a temperatura ambiente y en atmósfera de nitrógeno.

Para la determinación de la cantidad de ácido cafeico excretado, se utilizó de nuevo la C.L.A.R. Para ello, el residuo seco obtenido se disolvió en 3 ml de metanol para C.L.A.R. y se añadió o-cresol como patrón interno. La técnica cromatográfica es la misma que la descrita en el Apartado 5.1.4. En la página siguiente se muestran los cromatogramas representativos de los obtenidos para cada lote de animales.

El rendimiento del método se calculó en los 3 animales restantes y se siguió el mismo protocolo para la reco-

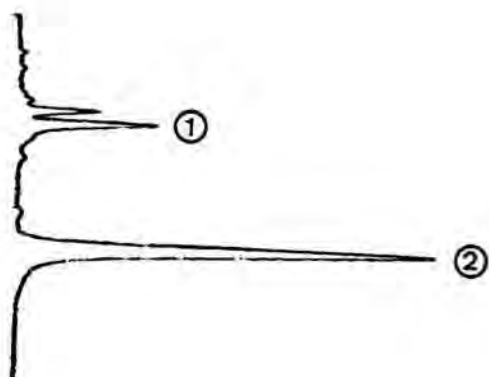


Figura 57.- Ejemplo del aclaramiento renal del ácido cafeico (i.v.). Orina de 24 horas.
Rata nº 1.

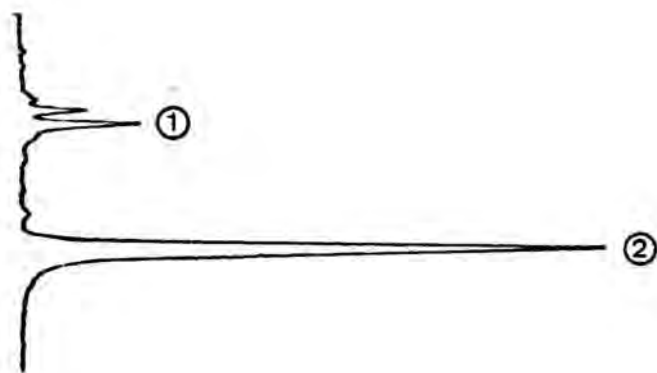


Figura 58.- Ejemplo del aclaramiento renal del ácido cafeico (i.v.). Orina de 24 horas.
Rata nº 3.

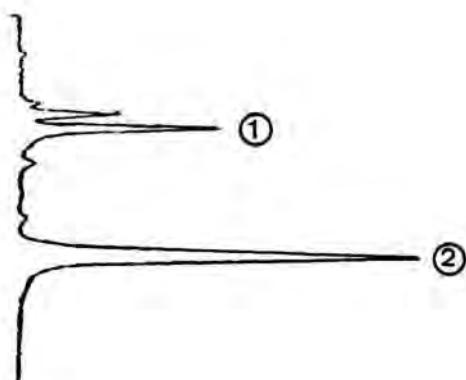


Figura 59.- Ejemplo del aclaramiento renal del ácido cafeico (oral). Orina de 24 horas.
Rata nº 1.

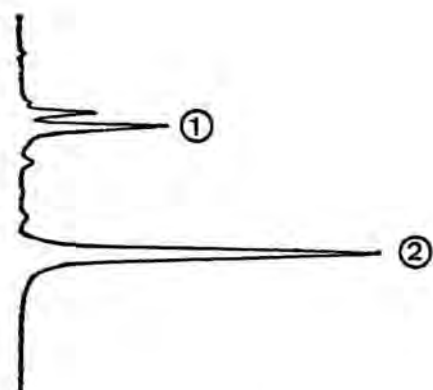


Figura 60.- Ejemplo del aclaramiento renal del ácido cafeico (oral). Orina de 24 horas.
Rata nº 2.

lección de la orina. . A 3 ml de orina, se añadió una solución de ácido cafeico a una concentración final de 0.10 mg/ml y se sometió a la misma técnica extractiva descrita obteniéndose un rendimiento del $87 \pm 4 \%$

Teniendo en cuenta este rendimiento, se calculó para cada animal, la fracción de dosis excretada por orina y a partir de este valor el Clr. Los resultados fueron:

Vía Intravenosa.-

<u>Animal</u>	<u>fe (%)</u>	<u>Clr (fe x Clplasmtot)</u>
1	40.50	4.6379
2	24.80	2.8411
3	28.70	3.2868
4	11.99	1.3732
5	31.33	3.5881
6	20.28	2.3226

$$f_e : \bar{x} = 26.27 \pm 9.75$$

$$Cl_r : \bar{x} = 5.0082 \pm 1.1172 \text{ ml/h/100g}$$

$$= 0.0501 \pm 0.0186 \text{ ml/min/100g}$$

Vía Oral.-

<u>Animal</u>	<u>fe (%)</u>	<u>Clr (fe x Clplasmtot)</u>
7	17.65	2.0223
8	16.54	1.8942
9	9.54	1.0921
10	14.85	1.7005
11	15.66	1.7931
12	7.83	0.8973

$$f_e : \bar{x} = 13.68 \pm 4.01$$

$$\begin{aligned} Cl_r : \bar{x} &= 1.5666 \pm 0.4598 \text{ ml/h/100g} \\ &= 0.0261 \pm 0.0076 \text{ ml/min/100g} \end{aligned}$$

Como era de esperar, el valor del aclaramiento renal es menor en el caso de la vía oral con respecto a la intravenosa. Este hecho apoya la hipótesis propuesta en el Apartado 5.2.5. en el que se argumentaba una mayor fijación a proteínas plasmáticas en el caso de la vía oral, para explicar el valor inferior del V_c .

En efecto, si por vía oral se produce una unión a proteínas plasmáticas más elevada que por vía intravenosa, el aclaramiento renal será menor como así ocurre, ya que la unión a proteínas plasmáticas es el factor limitante de la filtración glomerular (BRYSON 1982).

Unicamente se obtendría un aclaramiento renal más elevado por vía oral, si tuviera lugar un proceso activo de secreción tubular, ya que se favorecería la eliminación de fármaco unido a las proteínas plasmáticas. Pero no ocurre así, por lo que, si bien no se descarta la posibilidad de existencia de tal fenómeno, de ningún modo es el proceso determinante de la eliminación del ácido cafeico.

Para calcular el valor de $[S-R]$, es necesario disponer del valor de f_1 cuya determinación es prácticamente imposible. El valor de C_p , se refiere a la concentración plasmática del fármaco en la mitad del período considerado para el aclaramiento renal. Este valor, en ambos tipos de cinéticas, es:

$$C_p \text{ (i.v.)} = 1.0810 \text{ } \mu\text{g/ml.}$$

$$C_p \text{ (oral)} = 4.1776 \text{ } \mu\text{g/ml.}$$

A tan bajas concentraciones, al porcentaje de fijación a las proteínas plasmáticas, según los datos experimentales "in vitro", debe de ser muy elevado y prácticamente igual en ambos casos, aunque es difícil de precisar exactamente.

El valor de $[S-R]$ queda, pues, determinado por las siguientes ecuaciones:

Vía Intravenosa (Dosis 40mg/Kg):

$$[S-R] = 5.4158 \times 10^{-5} - 108.102 \times 10^{-5} \times f_1$$

Vía Oral (Dosis 120mg/Kg):

$$[S-R] = 10.9035 \times 10^{-5} - 417.760 \times 10^{-5} \times f_1$$

Por tanto, $[S-R]$ dependerá totalmente del valor de f_1 pero en todo caso, presenta un valor muy pequeño, indicando así, la circunstancia de que el único proceso que interviene en la eliminación renal del ácido cafeico es la filtración glomerular.

Se cumple pues, que

$$Cl_r = f_1 \times GFR$$

Si, según OPAVA y MARTINEZ-MALDONADO (1978), el valor de GFR es de 2ml/min en una rata de 200g, referido a 100g de peso corporal, el GFR será de 1ml/min.

En este caso, se puede calcular la fracción libre de fármaco en ambas formas de administración del ácido cafeico, obteniendo los siguientes valores:

$$f_1 \text{ (i.v.)} = 5.01\% \text{ (94.99\% de unión).}$$

$$f_1 \text{ (oral)} = 2.61\% \text{ (97.39\% de unión).}$$

que concuerdan notablemente con los valores obtenidos en los ensayos de fijación "in vitro" del ácido cafeico a la seroalbúmina bovina.

Por otra parte, si el valor del aclaramiento plasmático total es el resultado de la suma del aclaramiento renal y el extrarrenal o metabólico, para el ácido cafeico se obtienen los siguientes valores de aclaramiento extrarrenal:

$$Cl_m \text{ (i.v.)} = 0.1909 - 0.0501 = 0.1408 \text{ ml/min/100g}$$

$$Cl_m \text{ (oral)} = 0.1909 - 0.0261 = 0.1648 \text{ ml/min/100g}$$

Aunque el valor del Cl_m es superior en el caso de la vía oral, sigue siendo del mismo orden que para la vía intravenosa, deduciéndose así, la existencia de un efecto de primer paso, pero de escasa significación, por lo que al proceso general de eliminación se refiere.

A partir de los datos suministrados por ambas cinéticas, puede concluirse que la eliminación del ácido cafeico se lleva a cabo mayoritariamente por procesos de metabolismo, más que por una mera excreción renal, hecho observado en otros ácidos fenoles (JUNG 1983).

FARMACOLOGIA DE
LOS ACIDOS FENOLES

7. FARMACOLOGIA DE LOS ACIDOS

FENOLES

El estudio farmacológico de los ácidos fenoles, permite establecer una estrecha relación con los flavonoides, precursores o productos del metabolismo de los primeros, y que comparten algunas de sus acciones.

Entre los efectos farmacológicos de los flavonoides, pueden citarse:

- Inhibición del consumo de oxígeno inducido por la concanavalina A, en leucocitos polimorfonucleares (BERTON 1980).
- Inhibición de la liberación inducida de histamina por los basófilos, en las reacciones alérgicas humanas dependientes de la IgE (MIDDLETON 1982).
- Inhibición de la contracción de la musculatura lisa inducida por cloruro bórico, acetilcolina o histamina (MAKAROV 1968).
- Descenso de los niveles séricos de colesterol (LISEVITSKAYA 1968) y de lípidos (SHNYAKINO 1974).
- Inhibición de la adenosin-trifosfatasa ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$) (KURIKI 1976).
- Inhibición de la fosfodiesterasa de AMPc (NIKAIDO 1982).
- Inhibición de la aldosa reductasa (SEGELMAN 1977).

- Actividad antiinflamatoria (GUPTA 1971, PROKOPENKO 1972, AGARWAL 1982).
- Potenciación de la actividad catecolaminérgica a nivel de los esfínteres precapilares, por competición por la COMT (GAZAVE 1974).
- Aumento de la permeabilidad capilar (SZABO 1971, GAZAVE 1974).
- Actividad antioxidante, con un posible efecto sobre la peroxidación lipídica hepatocitaria (RAUEN 1973).
- Influencia sobre la actividad citocromo P-450, citocromo b-5, NADPH-citocromo c reductasa, NADH-citocromo c reductasa, aminopirina demetilasa y anilina hidroxilasa de rata (SIESS 1982).

En cuanto a los ácidos fenoles, existen muchos estudios sobre la actividad de los ácidos benzoicos (en concreto del ácido salicílico), pero no ocurre así con los cinámicos. La información de que se dispone sobre su acción, sin incluir al ácido cafeico, se cita a continuación.

Acciones a nivel hormonal

OKAMOTO (1976) observó que la administración intravenosa de ácido ferúlico producía inicialmente un incremento de la liberación por la pituitaria de FSH en la rata. Este aumento resultó ser pasajero, ya que tras diversas fluctuaciones, se restablecen los valores séricos normales a los 120 minutos. Paralelamente, este ácido fenol mostró un ligero efecto inhibitorio sobre la liberación de LH y PL.

GOREWIT (1983) evaluó los efectos de la administración intravenosa de ácido ferúlico en terneras, observando una

elevación prolongada de los niveles séricos de PL y un ligero aumento de los de GH. Sin embargo, no se vieron afectadas la LH o las hormonas tiroideas.

El ácido ferúlico antagoniza los efectos de la administración exógena de andrógenos, sobre la próstata ventral en ratas castradas, así como de los andrógenos endógenos en ratas normales. Sin embargo, no tiene ningún efecto sobre las vesículas seminales ni el "levator ani", estando también desprovisto de efectos estrogénicos (SAITO 1979).

Su mecanismo de acción, no es inhibiendo la unión de la testosterona a su receptor, ni su conversión a 5 -dihidrotestosterona, sino que NOHNO (1979), observó una ligera, pero significativa, reducción de la unión de la testosterona a las proteínas citosólicas de la próstata ventral y de las vesículas seminales, tras la administración de ácido ferúlico, debido a que este ácido fenol disminuye la reserva intracelular de aminoácidos libres. Efectos parecidos, observó PAKRASHI (1979) con el ácido p-cumárico.

Acciones a nivel enzimático

Los ácidos cinámicos y otros ácidos fenoles poseen una actividad inhibidora del metabolismo del mevalonato en el cerebro de rata. Esta inhibición, se produce, en concreto, sobre la mevalonato-5-pirofosfato decarboxilasa. También inhiben la mevalonato-5-fosfato kinasa tras incubación previa. El ácido p-cumárico y el isoferúlico compiten con los sustratos, mientras que el ácido cinámico, muestra un tipo de inhibición no competitiva (BHAT 1979).

Algunos, son inhibidores del transporte de piruvato e inhiben, al mismo tiempo, la actividad carnitina-acilcar-

nitina translocasa, como por ejemplo: el α -ciano-p-cumarato, el α -ciano-m-cumarato, el α -cianocinamato, el α -fluorocinamato, el transcinamato y el p-cumarato. De todos ellos, el más potente es el α -ciano-p-cumarato. En general, los derivados del α -cianocinamato inhiben el transporte de carnitina a concentraciones 100-5000 veces superiores a las necesarias para inhibir el transporte de piruvato. A concentraciones milimolares, el α -ciano-p-cumarato, inhibe el transporte mitocondrial de otras moléculas, así como la actividad carnitina-aciltransferasa.

Influencia en la recaptación de iones

Los derivados del ácido cinámico, disminuyen de forma significativa la recaptación de potasio. La constante de inhibición para este proceso está estrechamente relacionada con el coeficiente de partición octanol/agua de cada uno de los compuestos. En general, los ácidos fenoles ejercen un efecto inhibitor de la recaptación iónica por alteraciones reversibles de la permeabilidad de membrana (GLASS 1974).

Efectos en la nutrición

La inclusión en la dieta de las ratas de ácido ferúlico y p-cumárico, da lugar a una reducción de la ingesta alimentaria. Dicha reducción es directamente proporcional a la concentración de ácidos fenoles. Paralelamente, y como consecuencia, se observa un retraso en el crecimiento de los animales de experimentación (JUNG 1983).

7.1. ANTECEDENTES EN EL ESTUDIO DE LAS ACCIONES FARMACOLOGICAS DEL ACIDO CAFEICO

Ya en 1962, PREZIOSI, realizó un trabajo sobre la actividad de la cinarina (ácido 1,4-dicafeilquínico) relacionada con el ácido cafeico.

Entre las acciones más importantes del ácido cafeico, cabe citar, según este autor, su efecto antibacteriano y antineoplásico.

El ácido cafeico, a una concentración del 0.1% "in vitro", presenta un espectro antibacteriano del tipo:
Streptococcus aureus > Escherichia coli > Salmonella typhi > Salmonella paratyphi B = Staphylococcus aureus.

"In vivo", sin embargo, no es posible observar esta actividad, ya que el efecto antibacteriano del ácido cafeico se anula en presencia de material proteico.

En general, todas las sustancias polifenólicas están dotadas de una capacidad germicida inespecífica, que incluye una amplia gama de bacterias, hongos microscópicos, etc. (GREPPIN 1969).

Mas tarde, WATTENBERG (1981), expuso que los polifenoles, actuando como antioxidantes a nivel del sistema monooxigenasa microsomal, podrían desempeñar un papel detoxificante, y a través de este mecanismo, producir un determinado efecto antineoplásico.

En cuanto al éster del ácido cafeico, la cinarina, PREZIOSI, observó los siguientes efectos:

- a) Interferencia con el metabolismo del colesterol (dosis-dependiente).
- b) Aumento de la diuresis.
- c) Acción antibacteriana y antineoplásica.
- d) Efecto analgésico-antiinflamatorio-antipirético.
- e) Disminución de la glucemia.

Otro éster del ácido cafeico, el ácido clorogénico, según este mismo autor, se halla provisto de un poder antigénico, produciendo fenómenos de sensibilización.

Por último, y como el más importante de los hallazgos, se cita la actividad de la cinarina sobre la coleresis y los constituyentes de la bilis, y su efecto a nivel subcelular hepático.

A este respecto, varios autores publicaron en 1976 una revisión de los efectos de la cinarina y del ácido cafeico a nivel hepático, observando que:

- Ni la cinarina ni el ácido cafeico, muestran ningún efecto en cuanto al proceso de intercambio de la serina o la etanolamina con los fosfolípidos endógenos microsomales, por lo que probablemente, no poseen ningún efecto indeseable sobre la actividad enzimática de la membrana (GAITI 1976).
- Elevadas concentraciones de cinarina y ácido cafeico, inhiben las actividades fosfolipasa A1 y A2 en los microsomas y mitocondrias hepáticas de rata, debido probablemente a su efecto sobre la tasa de recambio fosfolipídico en las membranas hepáticas (GORACCI 1976).

- La cinarina y el ácido cafeico, a dosis elevadas, reducen la síntesis de fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina (BINAGLIA 1976).
- Ambas sustancias, estimulan la síntesis hepática de lecitina, actuando sobre la transmetilación (BINAGLIA 1976).

El ácido cafeico y la cinarina, a dosis intermedias, incrementan la síntesis de fosfatidiletanolamina y fosfatidilcolina en los microsomas hepáticos de rata, cuando se provoca un hígado graso mediante etanol; restableciéndose los niveles basales, si ambos fenoles se administran a dosis elevadas. En cambio, deprimen la metilación de la fosfatidiletanolamina y fosfatidilcolina (ROBERTI 1976).

El ácido cafeico y la cinarina son capaces de inhibir ligeramente la síntesis proteica hepática, a elevadas concentraciones y únicamente "in vitro" (MOZZI 1976).

En cortes de hígado de rata, ambas sustancias inhiben la síntesis del colesterol a bajas concentraciones (GAITI 1976).

LALUEZA (1985) observa que la administración de ácido cafeico y cinarina a ratas Sprague-Dawley, hembras, se produce una recuperación de la concentración hepática de proteínas y de GSH respecto al grupo intoxicado. Ello indica una posible acción hepatoprotectora, atribuible a su actividad antioxidante.

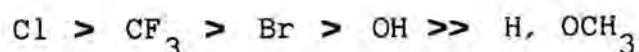
LAGUNA (1985), en experiencias "in vitro", estudia la acción hepatoprotectora del ácido cafeico y la cinarina en suspensión de hepatocitos aislados de rata, frente a la intoxicación con CCl_4 . Observa que mientras el ácido cafeico sólo disminuye la liberación conjunta de GPT y GOT a 1 y 3 mg/ml, la cinarina manifiesta acción entre 0.01-3 mg/ml.

Con respecto a la acción colerética del ácido cafeico y otros ácidos fenoles, WERSTENDORF (1983) observó que las moléculas coleréticamente activas, son los derivados cinámicos 3,4-disustituídos, bien con un grupo -OH o un -OCH₃. Las moléculas monosustituídas no presentan esta actividad. El aumento de la coleresis no es por efecto osmótico.

Otro efecto del ácido cafeico, objeto de numerosas controversias, es su actividad antitiamínica. SCHALLER (1976), evidenció un notable efecto antitiamínico del ácido cafeico. Posteriormente, HORMAN (1981, 1982), contradijo esta observación, señalando que la disminución de la concentración de tiamina en presencia de ácido cafeico, se debía a la existencia de oxígeno en la solución.

Por otra parte, WINTERHOFF (1981), afirma que el ácido cafeico, el ácido rosmarínico y sus productos de oxidación, son los responsables de la actividad antogonadotrópica de las especies Lithospermum y Lycopus. En efecto, este autor comprueba que estos compuestos son capaces de inhibir los efectos de la LH y FSH.

Adicionalmente, NOHNO (1981), observó que los derivados clorados del ácido cinámico presentan una acción sedante-hipnótica. Dosis elevadas de ácido p-cumárico y cafeico, provocan un descenso de la motilidad espontánea del ratón, mientras que no ocurre lo mismo en el caso de los ácidos cinámico y ferúlico. La potencia inhibidora, según los sustituyentes del núcleo aromático del ácido cinámico, sigue el siguiente orden:



Dos ésteres del ácido cafeico, el orobanósido y el verbascósido, fueron estudiados por ANDARY (1980), quien observó un efecto potenciador de la actividad antitremórica de

la levodopa, un efecto antihipertensivo, una ligera actividad psicoléptica, así como una potente actividad analgésica.

Respecto a la actividad analgésica y antiinflamatoria, BAUMANN (1978), señala el comportamiento del ácido dihidrocafeico como cofactor de la prostaglandín-sintetasa. KOSHIMURA (1984), indica que el ácido cafeico es un inhibidor selectivo de la 5-lipoxigenasa, y en consecuencia, de la biosíntesis de leucotrienos.

El efecto inhibidor de su éster metílico ($ID_{50} = 4.8 \times 10^{-7}M$) es superior al del propio ácido cafeico ($ID_{50} = 3.7 \times 10^{-6}M$). Esta inhibición no tiene carácter competitivo. Ambos compuestos, a dosis superiores a $5 \times 10^{-4}M$, estimulan la actividad de la prostaglandín-sintetasa.

El ácido cafeico, a concentraciones inferiores a $10^{-5}M$ presenta un ligero efecto sobre el metabolismo del ácido araquidónico plaquetar, pero a dosis más elevadas, presenta un claro efecto inhibidor. El ácido cafeico $10^{-4}M$ inhibe un 33% la síntesis de tromboxano A_2 , un 40% la de ácido 12(S)-hidroxi-5,8,10-heptadecatetraenoico, y un 80% la del ácido 12(S)-hidroxi-5,8,10,14-eicosatetraenoico. La agregación plaquetaria inducida por ácido araquidónico, también resulta inhibida con dosis elevadas de ácido cafeico, pero no ocurre lo mismo con la inducida por ADP.

Otros efectos citados en la bibliografía para el ácido cafeico, hacen referencia a su efecto diurético (LAPARRA 1967) y antiulceroso (BARNAULOV 1982).

Por último, merece especial atención la actividad del ácido cafeico, como inhibidor de la Dopa-decarboxilasa (HARTMAN 1955, LAPARRA 1967, De ROPP 1969 y ANDARY 1980). Entre los varios ácidos fenólicos estudiados, el ácido cafeico fue el que presentó una mayor eficacia, dando lugar a un 100% de inhibición a la dosis de $5 \times 10^{-3}M$, en cerebro de ratón.

7.2. FARMACOLOGIA EXPERIMENTAL DEL ACIDO CAFEICO

Este estudio se ha llevado a cabo, partiendo de las referencias bibliográficas y en base a dos hipótesis de trabajo.

En primer lugar, conociendo el efecto de los polifenoles (flavonoides, etc.) sobre los citocromos P-450 y b-5, se pensó que el ácido cafeico, que presenta una tasa elevada de fijación a las proteínas, podría también unirse y afectar a este complejo microsomal. Sobre esta hipótesis de trabajo, se realizó un estudio de la acción del ácido cafeico sobre los niveles de citocromo P-450 y b-5.

La segunda hipótesis se centra en la elevada actividad inhibitoria de este ácido fenol sobre la Dopa-decarboxilasa, que podría deberse a un efecto de competición por la levodopa, sustancia estructuralmente relacionada con el ácido cafeico. Si tal competitividad se producía con la levodopa, ésta debía residir en el grupo catecol y no en la cadena lateral, por lo que debería existir también frente a otras catecolaminas. A tal efecto, se estudió la actividad del ácido cafeico a nivel de la musculatura lisa vascular.

Antes de desarrollar estos estudios, es interesante citar dos efectos farmacológicos del ácido cafeico, citados en la bibliografía y que se han puesto de manifiesto a lo largo de las experiencias llevadas a cabo durante el estudio farmacocinético.

LAPARRÁ (1967), en su Tesis Doctoral sobre el ácido cafeico, cita su efecto diurético, con un aumento de la relación Na^+/K^+ , excretados por la orina.

Al recoger la orina para los estudios del aclaramiento renal del ácido cafeico, se observó que, tras la administración por vía oral (Dosis=120mg/Kg), los volúmenes de orina excretada, eran bastante elevados. Tomando la media de los cinco primeros animales empleados para esa experiencia, se obtiene un valor de 388.98 ± 58.89 ml/Kg/24h, superior a la media establecida de 150-300 ml/Kg/24h. En cambio, por vía intravenosa (Dosis=40mg/Kg), la media se halla dentro de los límites normales (293.25 ml/Kg/24h), si bien se acerca al superior y existe una amplia desviación standard (± 138.89), ya que los valores individuales oscilaron entre 158.86 y 486.13 ml/Kg/24h.

En cuanto a la actividad antiulcerosa, mencionada por BARNAULOV (1982), en los estudios del comportamiento farmacocinético del ácido cafeico por vía oral, y siguiendo el protocolo experimental expuesto en el Apartado 5.2.4., al cabo de 3 horas (término de la experiencia) y después de sacrificar el animal, se extirpó el estómago y se abrió éste por su curvatura mayor. Tras una limpieza del interior del estómago y posterior extensión, la observación a la lupa permitió apreciar zonas hiperémicas o incluso hemorrágicas, aunque no lesiones ulcerosas. El ácido cafeico produce pues, una irritación de la mucosa gástrica, que cuantificadas por el método de ADAMI (1964), merecería el valor de "1", lo cual se halla en contradicción con ciertos datos bibliográficos.

7.2.1. EFFECTOS A NIVEL SUBCELULAR

Numerosas experiencias han mostrado que los flavonoides naturales o sintéticos, afectan la actividad de las monoxigenasas dependientes del citocromo P-450. Estos compuestos ejercen acciones específicas y distintas en la regulación del sistema monoxigenasa; mientras los flavonoides que poseen un grupo hidroxilo lo inactivan, los que no lo poseen, lo aceleran.

Por todo ello, se procedió al estudio "in vitro" de la interacción del ácido cafeico con los citocromos P-450 y b-5. Ya que este ácido fenol posee una gran capacidad de fijación proteica, se pensó que cierta fracción de los citocromos P-450 y b-5, podría unirse al ácido cafeico, y por tanto, presentar un espectro de absorción distinto al del citocromo libre (REMMER 1966).

El primer paso, consiste en la obtención de los microsomas hepáticos, según el método de MAZEL (1971).

Se utilizaron ratas Wistar macho, de 150-200g de peso, procedentes del estabulario de la Facultad, que se mantuvieron en ayuno y con libre acceso al agua de bebida, 24 horas antes del sacrificio. El ayuno hace disminuir los niveles de glucógeno hepático, previniendo así, la pérdida de microsomas durante el posterior proceso de centrifugación (DALLNER 1966).

Los animales se sacrificaron mediante traumatismo cerebral y posterior exsanguinación. Veinte minutos antes, se les administró 0.15ml de una solución de heparina sódica al 5% (Leo) por vía subcutánea.

El animal se fija sobre una tabla de corcho en posición de decúbito supino. Se practica una laparatomía media, canula la vena porta y se secciona la vena cava a la salida del hígado.

Se perfunde el hígado con una solución fría (2-4°C) de NaCl 0.145M. El órgano debe quedar libre de hemoglobina y eritrocitos, adoptando un color marrón claro. Generalmente se utilizaron unos 40ml de la solución de NaCl.

Terminada la perfusión, se extirpa el hígado y se lava en una placa de Petri con la misma solución fría de NaCl. Se seca el hígado sobre un papel de filtro y se pesa. Con un bisturí se obtienen varios fragmentos del lóbulo mayor derecho de un peso de aproximadamente 1g.

Estos fragmentos, se trocean y homogenizan con tampón fosfato 0.1M, pH 7.4, con sacarosa 0.25M, en una proporción de 1:3 p/v. La homogenización se realiza a 4°C en un potter de vidrio con vástago de teflón (Heildolph). A fin de estandarizar el método, la homogenización duró en todas las experiencias realizadas, 3 minutos.

El homogenado, se vierte en tubos de policarbonato (Beckman), provistos de tapón de rosca, que se equilibran y se centrifugan a 10,000 x g, durante 30 minutos a 4°C (centrífuga preparativa Beckman J-21).

El sobrenadante se filtra a 4°C, a través de lana de vidrio, que se lava con 2ml de tampón sacarosa. El filtrado se recoge sobre tubos de policarbonato, desechándose el pellet.

El filtrado, se centrifuga a 105,000 x g, durante 2 horas a 4°C (Ultracentrífuga Beckman L8-55M, rotor 50Ti).

Transcurrido este tiempo, se aspira el sobrenadante con ayuda de una bomba de vacío. Se añaden al pellet, 4ml de tampón fosfato 0.1M, pH 7.4, con KCl al 1.15%. Se resuspende el pellet con ayuda de una varilla de vidrio y se homogeniza de nuevo, a 4°C, durante 1.5 minutos. El homogenado así obtenido, se centrifuga otra vez a 105,000 x g a 4°C, durante una hora.

Se vuelve a aspirar el sobrenadante que se desecha, y el pellet, constituido por la fracción microsomal, se mantiene a -30°C hasta su utilización. Este período nunca se prolongó más de 24 horas.

En el momento de su utilización, el pellet se resuspende con tampón fosfato, caso de la determinación de los citocromos P-450 y b-5, o con agua destilada, caso del cálculo de la concentración proteica.

Como norma general, no deben retardarse las determinaciones microsomales si no es absolutamente necesario. Para la valoración de los citocromos P-450 y b_5 , es siempre preferible utilizar microsomas recién obtenidos. En el caso de que sea imprescindible su almacenaje, deben tenerse en cuenta los posibles efectos de éste en los parámetros a determinar.

Existen varias modalidades para la conservación, almacenando ya sea el sobrenadante de 10,000 x g, el pellet microsomal o el hígado intacto a -15°C o -20°C.

MAZEL (1971) indica que el método más adecuado y que comporta una pérdida menor de la actividad enzimática, consiste en la conservación del pellet microsomal a -15°C con 1 ml de tampón.

Determinación del citocromo P-450

El citocromo P-450 es una hemoproteína que se encuentra en los microsomas hepáticos y en la fracción mitocondrial de la corteza adrenal. Actúa como una oxidasa terminal en el metabolismo microsomal de los fármacos.

La forma reducida de este pigmento, se combina fácilmente con el monóxido de carbono, para dar lugar a un complejo, que presenta un máximo de absorción a 450nm y un mínimo a 405nm.

Su presencia se detecta, pues, espectrofotométricamente, tras su conversión en el complejo con el CO.

Para su determinación, se ha seguido el método de OMURA (1964).

El pellet microsomal procedente de 500mg de hígado (peso húmedo), se resuspende en 6ml de tampón fosfato 0.05M, pH 7.6 con EDTA 0.001M y se homogeniza a 4°C. Esta dilución se realiza a fin de conseguir una suspensión que tenga una concentración final de proteínas, de aproximadamente 2mg/ml. Se utilizan 2ml de esta suspensión para la valoración espectrofotométrica.

Se realiza un barrido entre 510 y 400nm para fijar la línea base y se burbujea CO en la cubeta problema, durante 20 segundos. Se añade una punta de espátula de ditionita sódica (Merck) a ambas cubetas y se agita suavemente, volviendo a gasear con CO la cubeta problema, durante otros 20 segundos.

El espectro de absorción se registra entre 510 y 400nm, y se calcula la diferencia de absorbancia entre 450 y 480nm (Y).

Los nanomoles de citocromo P-450 por milígramo de proteína, se calculan a partir de la expresión:

$$\frac{Y \times 1000}{91 \times P}$$

$$91 \times P$$

Siendo:

P = mg de proteína/ml.

$$E_{1\text{cm}}^{1\text{mM}} (\text{citocromo P-450}) = 91$$

Determinación del citocromo b-5

El citocromo b-5, presente en el retículo endoplásmico, es el principal responsable del color rojo intenso del pellet microsomal.

La NADH-citocromo b-5 reductasa, es una flavoproteína específica que reduce el citocromo b-5. Este citocromo b-5 reducido puede, a su vez, reducir al citocromo c, por transferencia citocromo-citocromo. Sin embargo, la NADH-citocromo b-5 reductasa no puede reducir al citocromo c en ausencia de citocromo b-5.

Para la determinación del citocromo b-5, se sigue prácticamente el mismo proceso que para el citocromo P-450 (OMURA 1964).

Una vez colocados 2ml de la suspensión en las cubetas del espectrofotómetro, se registra la línea base de 500 a 400nm.

Se añade una punta de espátula de ditionita sódica únicamente a la cubeta problema y se agita suavemente.

Se registra el espectro de absorción entre 500 y 400nm, y se calcula la diferencia de absorbancia entre 423 y 500nm (Z).

Los nanomoles de citocromo b-5 por milígramo de proteína, se calculan a partir de la expresión:

$$\frac{Z \times 1000}{171 \times P}$$

Siendo:

$$E_{1\text{cm}}^{1\text{mM}} (\text{citocromo b-5}) = 171$$

Determinación de las proteínas microsomales

Se ha seguido el método colorimétrico de LOWRY (1951), modificado por MILLER (1959).

Se mide la absorbancia en el visible, del complejo formado por el reactivo cuproalcalino y los residuos Tyr y Trp de la proteína. La formación de este complejo es directamente proporcional a la concentración de proteína hasta los 200 g/ml.

Para la determinación proteica, el pellet microsomal procedente de 1g de hígado se resuspende y homogeniza con 20ml de agua destilada a 4°C.

A 0.5ml de esta suspensión, se añaden 0.5ml de NaOH 0.5N. Se agita y se deja en reposo 30 minutos a temperatura ambiente y en la oscuridad.

A la muestra alcalinizada, se añaden 5ml del reactivo cuproalcalino preparado extemporáneamente. El reactivo consta de:

CuSO ₄ al 1%	1ml
Tartrato sódico al 2%	1ml
Na ₂ CO ₃ al 2%	c.s.p. 100ml

La solución así tratada, se deja en reposo durante 10 minutos, a temperatura ambiente.

Transcurrido este tiempo, se añaden 0.5ml del reactivo de Folin-Ciocalteu (Merck) diluido a la mitad, mientras se mantienen los tubos en agitación.

Seguidamente, se llevan los tubos a un agitador mecánico, a 37°C, durante 30 minutos, tiempo suficiente para que se desarrolle el color, que se mide en el espectrofotómetro a 540nm.

Previamente, se ha realizado la recta de calibración, utilizando la seroalbúmina bovina (Merck), como patrón de proteína. La ecuación resultante fue:

$$Y = 7.9355 \times 10^{-4} X + 0.0052$$

$$r = 0.9998$$

Efecto del ácido cafeico sobre los niveles de citocromo P-450 y citocromo b-5

Para realizar este estudio, el ácido cafeico se incubó a 37°C, durante 20 minutos con la suspensión de microsomas

Como ya se ha dicho, el pellet microsomal debe suspenderse y homogenizarse con tampón fosfato y EDTA 0.001M. Sin embargo, no se consideró conveniente que la solución de ácido cafeico que se añade a la suspensión microsomal, se realizara con EDTA.

Para la determinación de cada citocromo, se dispuso de tres lotes de pellets microsomales:

Lote A: Control.

Lote B: Control, sometido a 37°C durante 20 minutos y corregido por el volumen equivalente de ácido cafeico a añadir en el tercer lote, con tampón fosfato, sin EDTA.

Lote C: Problema, incubado con ácido cafeico a diversas concentraciones, a 37°C durante 20 minutos.

En cuanto a los Lotes A y B, los resultados obtenidos fueron los siguientes:

	A				B			
	$\bar{x}$	n	σ_n	σ_{n-1}	$\bar{x}$	n	σ_n	σ_{n-1}
Cit. P-450	1.183	15	0.390	0.403	1.038	5	0.054	0.066
Cit. b ₅	0.319	14	0.113	0.117	0.298	5	0.026	0.032

Tabla III.- Resultados de la determinación de citocromos microsomales.

A) Lote control

B) Lote control sometido a 37°C durante 20 minutos.

Los valores para cada citocromo se expresan en nmol/mg de proteína.

Si se aplica el test de la "t" de Student para un número de muestras inferior a 30, no existe diferencia significativa entre ambos lotes, para $p = 0.1$, por lo que ni la incubación a 37°C durante 20 minutos, ni la adición de un pequeño volumen (1:12) de solución tampón sin EDTA, modifican los niveles de citocromo P-450 ó b-5.o

Establecida esta premisa, se realizaron las experiencias correspondientes al Lote C, incubando el homogenado microsomal con ácido cafeico a las concentraciones de 10^{-3}M , 10^{-4}M , 10^{-6}M , 10^{-8}M y 10^{-10}M , obteniéndose los resultados que aparecen en la página siguiente.

	10^{-3} M	10^{-4} M	10^{-6} M	10^{-8} M	10^{-10} M
Cit. P-450					
$\bar{X}$	0.979	0.952	0.954	1.014	1.145
n	3	3	3	3	3
σ_n	0.112	0.052	0.067	0.082	0.034
Cit. b_5					
$\bar{X}$	0.337	0.364	0.311	0.314	0.314
n	3	3	3	3	3
σ_n	0.018	0.023	0.009	0.013	0.005

Tabla IV.- Resultados obtenidos tras incubación de los pellets microsomales con ácido cafeico a distintas concentraciones.

Al igual que con los Lotes A y B, se aplicó el test de la "t" de Student entre el Lote A y cada una de las concentraciones de ácido cafeico, que constituyen el Lote C.

En ningún caso existe diferencia significativa para $p = 0.1$.

Paralelamente a estos resultados, se calculó la media del valor del peso de hígado por 100g de peso corporal, y de los miligramos de proteína por gramo de tejido, resultando los siguientes valores:

$$\begin{aligned} \text{g hígado/100g de peso corporal} &= 3.2179 \pm 0.3036 \\ \text{mg de proteína/g de tejido} &= 20.4114 \pm 2.7702 \end{aligned}$$

De todo ello, se deduce que, a pesar de que el ácido cafeico tiene una gran afinidad por la seroalbúmina bovina y las proteínas tisulares, no afecta de forma significativa al sistema citocromo P-450, ni al b-5, puesto que no se aprecian diferencias estadísticamente significativas en los niveles de ambos citocromos, cuando se incuban "in vitro" los microsomas hepáticos con este ácido fenol.

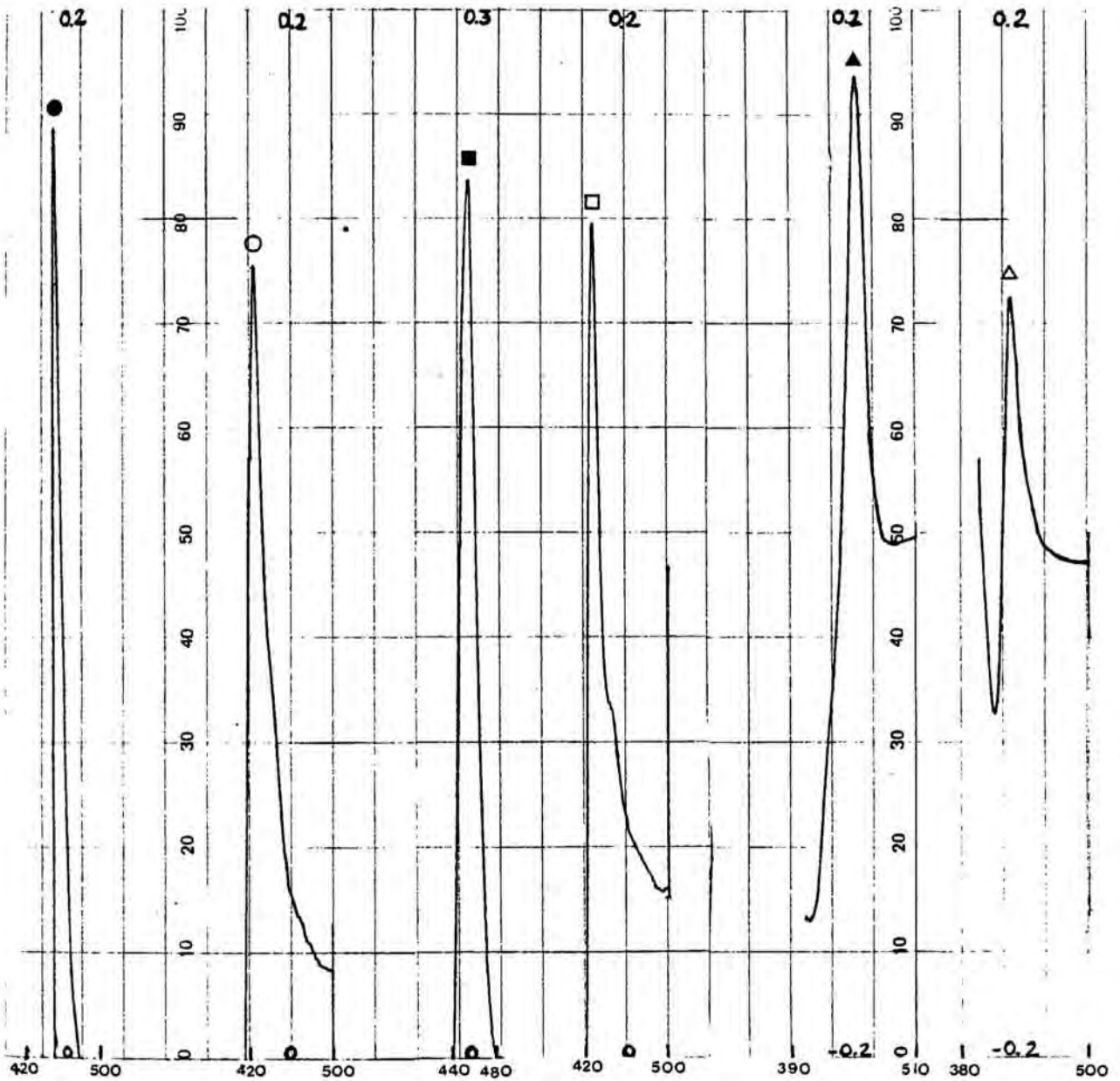


Figura 61.-

- △ Espectro del citocromo b_5 entre 500 y 380 nm.
- ▲ Espectro del citocromo P_{450} entre 510 y 390 nm.
- Espectro del citocromo b_5 entre 500 y 420 nm.
- Espectro del citocromo P_{450} entre 480 y 440 nm.
- Espectro del citocromo b_5 (500/420) tras incubación del pellet microsomal con ácido cafeico $10^{-8}M$
- Espectro del citocromo P_{450} (480/440) tras incubación del pellet microsomal con ácido cafeico $10^{-8}M$

7.2.2. ACCION SOBRE LA MUSCULATURA LISA VASCULAR

Varios autores han citado la acción inhibidora del ácido cafeico sobre la Dopa-decarboxilasa, utilizando diversos ensayos farmacológicos y bioquímicos.

HARTMAN (1955) describió esta actividad frente al enzima obtenido de la zona cortical de riñón de cerdo, encontrando una inhibición del 74%, esta inhibición era de tipo competitivo.

LAPARRA (1967) utilizó el test de potenciación del sueño por barbitúricos en el ratón. El autor, observó que la Dopa por sí misma tenía un efecto potenciador, que se incrementaba de forma notable si previamente, se administraba a los animales, ácido cafeico.

De ROPP (1969) evidenció esta actividad en el homogenado del cerebro de rata.

ANDARY (1980) en varios tests "in vivo" e "in vitro", que incluyen: la antagonización de los efectos de la oxotremorina, la inhibición del enzima obtenido del riñón de cerdo y la valoración de la levodopa sanguínea, demuestra la acción inhibidora del ácido cafeico sobre la Dopa-decarboxilasa. La inhibición es de tipo competitivo, si bien no existe dilucidación alguna, sobre el mecanismo intrínseco responsable de este efecto.

La inhibición de tipo competitivo, supone casi siempre, una similitud estructural con el sustrato, que en el caso de la levodopa y el ácido cafeico, reside en el grupo catecol.

Si se tiene en cuenta que el producto de la descarboxilación de la levodopa (la dopamina), es un precursor en la síntesis de noradrenalina y adrenalina, y que el grupo determinante de la actividad alfa de las catecolaminas es el grupo catecol, se pensó que era muy probable que el ácido cafeico, interaccionara con el receptor alfa adrenérgico.

Debido a que el estudio farmacocinético de este ácido fenol, revela una tasa de metabolismo muy elevada y una baja absorción por vía oral, se creyó más conveniente utilizar métodos "in vitro", para llevar a cabo este estudio. En concreto, se ha valorado la actividad del ácido cafeico, comparado con la noradrenalina, en la aorta torácica aislada de rata.

Para incluir un fármaco en un determinado grupo farmacológico, es necesario, en primer lugar, seguir una técnica farmacodinámica fácil y repetitiva, estableciendo una relación entre la concentración de ese fármaco y su efecto, con ayuda de la técnica de órgano aislado. Este tipo de experiencias es irremplazable, para la determinación de los parámetros que definirán al fármaco, como son su afinidad y su actividad intrínseca.

La ventaja de utilizar los órganos aislados reside, en la eliminación de variables, que posteriormente deben tenerse en cuenta. Además, pueden obtenerse respuestas muy precisas con varias preparaciones de un mismo animal (SWAMY 1971).

Pero, paralelamente, se plantea la cuestión de la relación existente entre la concentración del fármaco en las proximidades del receptor, y los cambios producidos en éste, o bien la relación entre la dosis administrada y los efectos producidos (VAN DEN BRINK 1977).

Las preparaciones de vasos aislados, se utilizan, casi exclusivamente, para estudiar los efectos sobre la rama simpática del S.N.V.

La distribución de los adrenoceptores en los terminales post-sinápticos de los nervios vasomotores, varía considerablemente de un tejido a otro. La acción de un agonista sobre los alfa-adrenoceptores, produce vasoconstricción, y predominan en aquellos vasos que irrigan la piel y las vísceras. Los beta-adrenoceptores dan lugar a vasodilatación, y predominan en los vasos que recorren los músculos estriados.

Algunos vasos, parecen estar también inervados por el sistema colinérgico, aunque en realidad se trata de terminaciones dopaminérgicas vasodilatadoras.

Las arterias poseen receptores muscarínicos aislados, pero carentes de inervación (KITCHEN 1984).

Para observar "in vitro", la contracción de los vasos en respuesta a un fármaco, se pueden utilizar segmentos arteriales, cortados en forma espiral, ya que la orientación del músculo liso vascular es espiral y circular. De este modo, la contracción muscular se traduce en un movimiento unidireccional, que puede ser medido fácilmente (FURCHGOTT 1955, PATIL 1980 y KITCHEN 1984).

Una de las preparaciones más frecuentes para el estudio "in vitro" de la acción de los fármacos sobre la musculatura lisa vascular es la aorta torácica aislada.

La técnica original descrita en 1953 por FURCHGOTT y BHADRAKOM, cita como reactivo biológico, la aorta de cone pero similar eficacia, puede obtenerse, empleando la aorta

aislada de rata, que presenta la ventaja de ser más delgada, permitiendo así, una rápida difusión del fármaco. El órgano pierde la inervación simpática por la propia técnica de preparación y montaje (PATIL 1980).

Es una preparación muy sensible a las catecolaminas. El efecto de los fármacos utilizados puede ser directo o indirecto. La interacción de un fármaco con su receptor específico da lugar a una respuesta directa, mientras que los efectos indirectos resultan de un acción sobre otros componentes celulares, que da lugar a una liberación o acumulación de un mediador, que es el que posee la acción directa (TALLARIDA 1979).

Esta preparación se basa en el método de FURCHGOTT, (1955), que hizo un estudio detallado de las acciones locales de los fármacos sobre la musculatura lisa vascular. Este autor, preconiza la existencia en la aorta de receptores alfa y beta-adrenérgicos, histaminérgicos y serotoninérgicos.

Se sabe que la adrenalina produce contracción y relajación del músculo liso vascular, y ambos efectos pueden observarse en la tira de aorta aislada. El efecto más general es la contracción, mediada por la interacción de la adrenalina con el receptor alfa. La relajación provocada por la adrenalina, se realiza a través del receptor beta-adrenérgico.

La noradrenalina actúa de modo similar; sin embargo, la potencia de la noradrenalina por los receptores beta es menor a la que presenta la adrenalina. Por otra parte, la noradrenalina produce vasoconstricción a dosis inferiores a las de adrenalina, indicando su mayor potencia por los receptores alfa-adrenérgicos (TALLARIDA 1979).

La histamina provoca constricción de la aorta aislada, a través de los receptores H-1. La dilatación mediada por los receptores H-2 se puede observar si se bloquean los H-1 con mepiramina (KITCHEN 1984).

La serotonina produce asimismo, vasoconstricción, actuando sobre su receptor específico (TALLARIDA 1979).

Para la preparación de la tira de aorta aislada, se han utilizado ratas Sprague-Dawley hembras, procedentes del estabulario de la Facultad, de peso comprendido entre 140-170g.

El animal se sacrifica mediante traumatismo cerebral y posterior exsanguinación. Se sujeta sobre una tabla de corcho en posición de decúbito supino y se abre la cavidad torácica, separando las costillas y seccionando el diafragma. Al separar los pulmones y el corazón, queda al descubierto la aorta, que "in situ", se libera de las adherencias y se seccionan los vasos que parten de ella. Después, se secciona la aorta lo más cerca posible del corazón hasta el diafragma.

El fragmento de aorta así obtenido, se traslada a una placa de Petri que contiene solución de Krebs a 37°C y en la que brubujea carbógeno (95% O₂, 5% CO₂).

La solución fisiológica de Krebs utilizada presentalla siguiente composición (KITCHEN 1984):

NaCl	13.2	g
KCl	0.7	g
KPO ₄ H ₂ (Sol. 10%)	3.24	ml
MgSO ₄ .7H ₂ O (Sol. 10%)	5.88	ml
CaCl ₂ .2H ₂ O (Sol. 10%)	5.6	ml
NaHCO ₃	4.2	g
Glucosa	4.2	g
Agua dest.	c.s.ø,000	ml

Esta solución se prepara siempre de forma extemporánea.

En la cápsula de Petri, se termina de separar el tejido conectivo y adiposo que recubre la aorta.

A continuación, se introduce por el interior del vaso un catéter metálico de punta roma y de diámetro adecuado. La aorta así dispuesta, se coloca sobre un papel de filtro empapado con solución de Krebs, y se corta en espiral con un bisturí, a fin de obtener una tira continua de unos 4mm de anchura por unos 3cm de longitud, que se vuelve a colocar en la cápsula de Petri, atándose un hilo a cada extremo.

Uno de los hilos se ata al oxigenador. La aorta junto con el oxigenador, se trasladan a un baño de 10ml conteniendo solución Krebs a 37°C. Se fija el oxigenador y el otro hilo se sujeta al transductor.

Cuando se trata de músculo liso, el registro isotónico es más fisiológico que el isométrico, pero en preparaciones en las que la respuesta es lenta (caso de la aorta), la recuperación del órgano tras una contracción supone un exceso de tiempo. Además, el registro isométrico no es tan sensible (PATON 1975).

Por todo ello, se ha utilizado un transductor bifuncional (Letica), que posibilita el registro tanto isotónico como isométrico, desplazando simplemente el punto de fijación del órgano.

De este modo, se ha adoptado un registro de tipo mixto, sujetando el hilo unido al transductor en un punto equidistante entre los dos extremos (isotónico e isométrico). Así se dispone de una preparación sensible y que se recupera más rápidamente. El transductor se conecta a un amplifi-

cador y registrador galvanométrico (Letica Unigraph 1000 PRS 205).

La tira se somete a una tensión de 2.5g y se deja en reposo 2 horas, lavando la preparación cada 20 minutos. Durante este período, la tira se relaja de un 2 a un 10%, por lo que debe restaurarse la tensión (DOMER 1971, TALLARIDA 1979 y KITCHEN 1984). La preparación así dispuesta, puede durar de 5 a 6 horas.

Ya que las respuestas son muy lentas y el órgano tarda en recuperarse, es necesario utilizar ciclos largos. El fármaco se deja en contacto con el órgano durante 5 minutos, Después deben esperarse 15 minutos o más, para conseguir una línea base estable.

Se aplica, en primer lugar, una dosis superior a la DE-50, o una submaximal del agonista total para sensibilizar el órgano.

No hay normas fijas en cuanto al método a seguir en el orden de adición de los fármacos. Pueden obtenerse respuestas individuales o acumulativas. Debido a la lentitud de la respuesta se ha seguido el método acumulativo. Este método ha sido criticado en algunos casos, porque el máximo obtenido es menor al conseguido con respuestas individuales. Esto es muy patente en los conductos deferentes, pero en la aorta, si se espera el tiempo necesario hasta la relajación total, pueden obtenerse varias curvas acumulativas de un mismo órgano, con un máximo igual al conseguido en las respuestas individuales (PATIL 1980).

El principal problema del baño de órganos, es que las respuestas absolutas varían de un órgano a otro. Por ello, las respuestas obtenidas es preferible expresarlas como por-

centaje de la contracción máxima de ese fármaco o del de referencia (SANDERS 1975).

Como sustancia agonista, cuyo efecto "in vitro" a nivel de la aorta aislada se traduce en una contracción dosis-dependiente, se ha utilizado Noradrenalina (Bitartrato de 1-Noradrenalina monohidrato, FLUKA A.G.) (FURCHGOTT 1955).

El rango de concentraciones, referidas siempre a la concentración final presente en el baño fue:

10^{-10} M, 10^{-9} M, 7.5×10^{-9} M, 10^{-8} M, 5×10^{-8} M, 10^{-7} M, 5×10^{-7} M, 10^{-6} M, 10^{-5} M y 2×10^{-5} M.

Para el estudio de la relación dosis-respuesta, se realizó, en el caso de la noradrenalina, una adición al baño de tipo acumulativo. En cada aorta se realizaron dos curvas dosis-respuesta acumulativas.

Los resultados obtenidos, para $n = 9$, fueron los que aparecen en la página siguiente, y a continuación un ejemplo de las curvas obtenidas, así como la representación gráfica semilogarítmica de la concentración de Noradrenalina frente al % Emax.

<u>Conc. (M)</u>	<u>% E_{max} ± σ_{n-1}</u>
10 ⁻¹⁰	0.17 ± 0.38
10 ⁻⁹	3.37 ± 1.26
7.5 x 10 ⁻⁹	21.07 ± 0.67
10 ⁻⁸	26.50 ± 3.34
5 x 10 ⁻⁸	62.82 ± 9.65
10 ⁻⁷	73.14 ± 3.46
5 x 10 ⁻⁷	89.20 ± 1.14
10 ⁻⁶	93.98 ± 2.01
10 ⁻⁵	98.06 ± 0.88
2 x 10 ⁻⁵	100

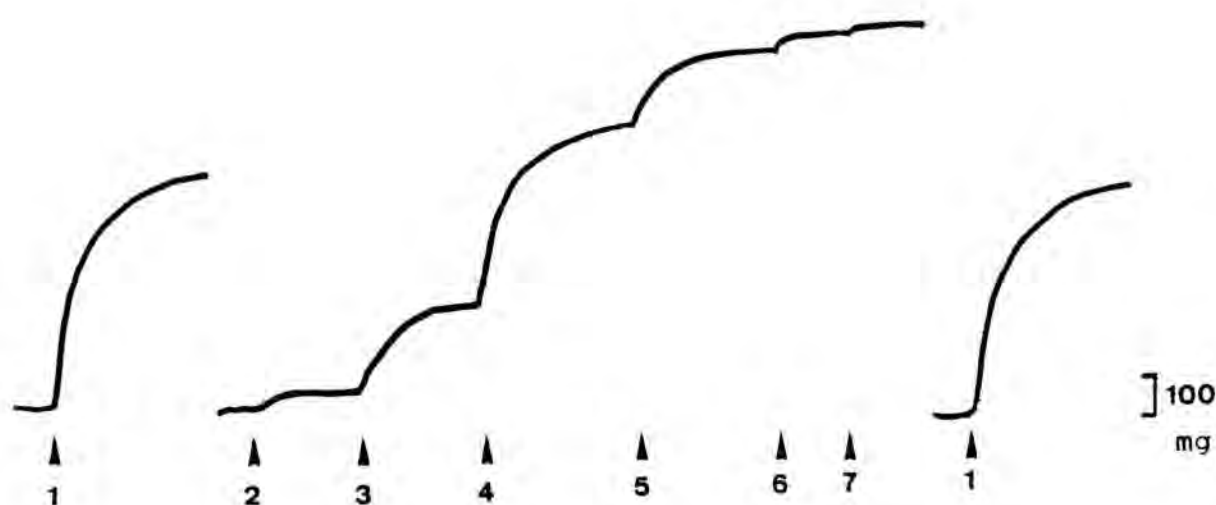


Figura 62.- Curva Dosis-Respuesta de la NA.

1.- NA 5 x 10⁻⁸M.

4.- NA 10⁻⁷M.

2.- NA 10⁻⁹M.

5.- NA 10⁻⁶M.

3.- NA 10⁻⁸M.

6.- NA 10⁻⁵M.

7.- NA 2 x 10⁻⁵M.

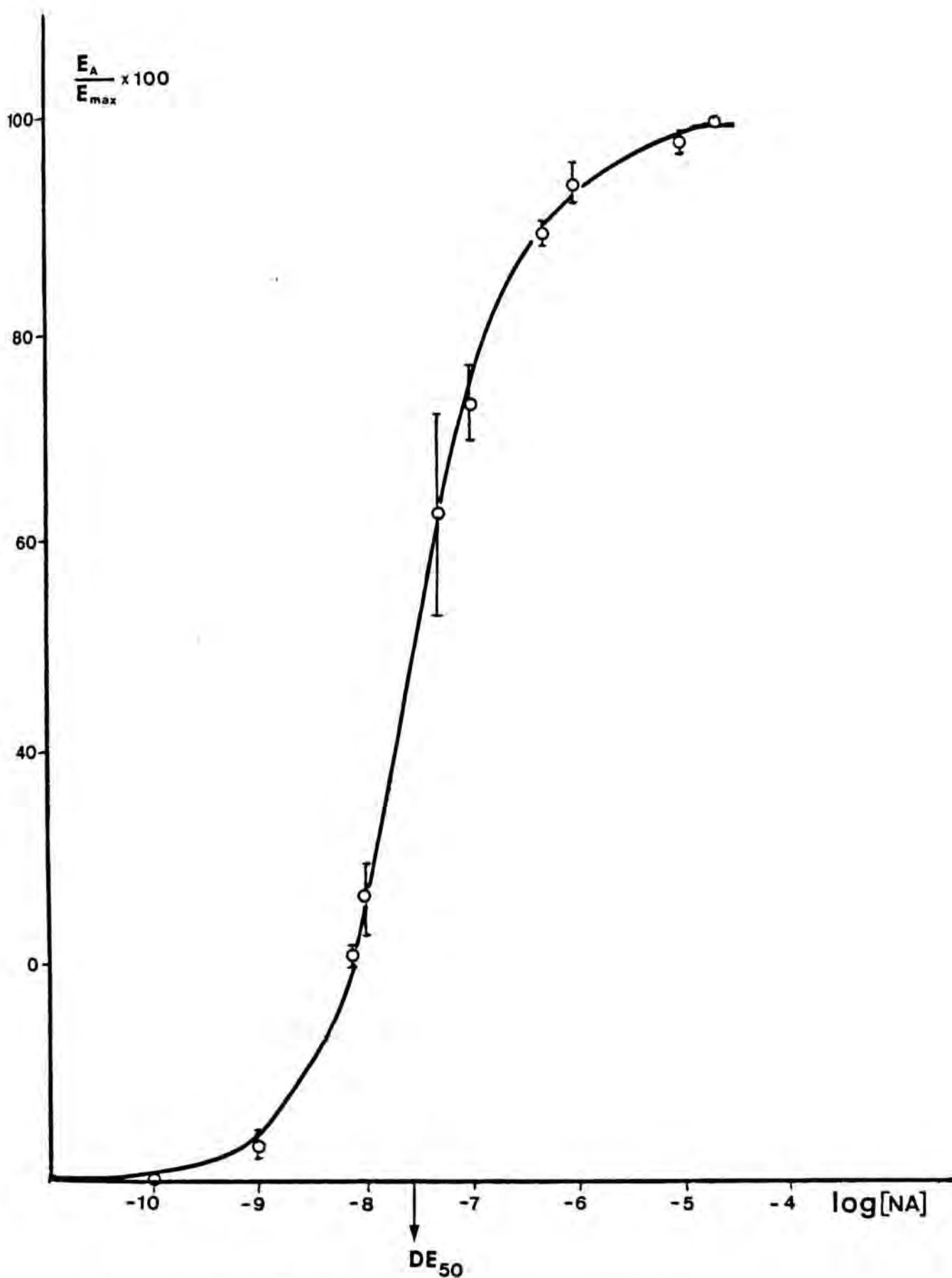


Figura 63.- Curva Dosis-Respuesta de la NA.

La primera teoría que relaciona el efecto biológico "E" con la concentración "X" del complejo fármaco-receptor es la de CLARK (1933) (teoría clásica), que ha sido modificada posteriormente.

Parte de dos premisas:

- La magnitud del efecto es directamente proporcional a la concentración del complejo:

$$E = \alpha X$$

- El efecto máximo tiene lugar cuando están todos los receptores ocupados ($X = r_t$):

$$E_{\max} = \alpha r_t$$

Siendo α la actividad intrínseca.

Si la cantidad de complejo formado al alcanzarse el equilibrio se calcula a partir de la fórmula (TALLARIDA, 1979);

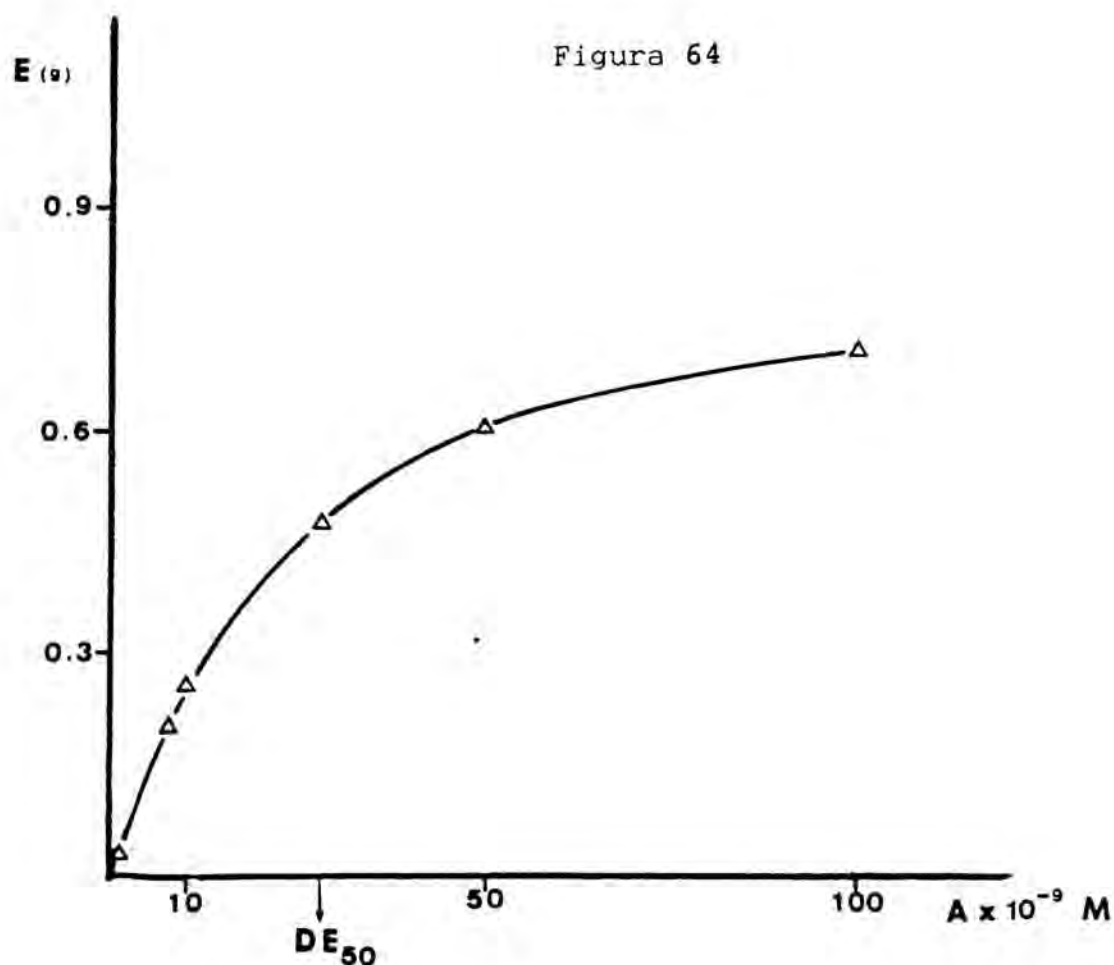
$$X = \frac{A \times r_t}{A + K} \quad \text{se deduce que,}$$

$$E = \frac{\alpha \times r_t \times A}{A + K} = \frac{E_{\max} \times A}{A + K}$$

Siendo "A" la concentración de fármaco y "K" la constante de disociación aparente del complejo, cuyo inverso es la Afinidad del fármaco en cuestión.

Sin embargo, puede conseguirse el $E_{\max}$ sin necesidad de que estén ocupados todos los receptores.

En primer lugar se representa la magnitud del efecto frente a la concentración de noradrenalina, en coordenadas rectangulares, apareciendo la correspondiente hipérbola:



Ya que en los últimos puntos se refieren a las concentraciones más elevadas y puede haber fenómenos de desensibilización, el efecto, en esos puntos, es más variable. Por ello, se prefiere para los cálculos posteriores, la utilización de los puntos que se hallan en la pendiente de la hipérbola, y se desechan los que se sitúan en la meseta (PATON 1975).

Por ello, STEPHENSON (1956) modificó esta teoría partiendo de 3 postulados:

- El efecto máximo puede ser producido por un fármaco agonista, sin necesidad de que estén ocupados todos los receptores.
- La magnitud del efecto es función desconocida del número de receptores ocupados.
- El complejo fármaco-receptor provoca un estímulo "S" al tejido, y éste es directamente proporcional a la fracción de receptores ocupados: $S = \epsilon Y$; siendo "Y" la fracción de receptores ocupados y ϵ la eficacia.

Así pues, el efecto es función desconocida del estímulo: $E = f(S)$.

Mientras que en la teoría clásica se asumía que $K = A_{50}$; siendo A_{50} la dosis molar de agonista que produce un efecto mitad del máximo, la teoría de STEPHENSON, contradice esta afirmación (TALLARIDA 1979).

Para la determinación de "K" existen diversos métodos:

FURCHGOTT (1967), propone la utilización de antagonistas competitivos irreversibles, relacionando las concentraciones del agonista necesarias para producir un determinado efecto antes y después del antagonismo (MacKAY 1977 y PATIL 1980).

Un segundo método, utiliza la representación de los inversos, que es el seguido en esta caso para la noradrenalina, y que se fundamenta en la teoría clásica.

Va que siempre es difícil hallar la ecuación de la hipérbola, que se ajusta a los puntos experimentales, y gráficamente, es difícil hallar el efecto máximo, se realiza la representación de los dobles recíprocos:

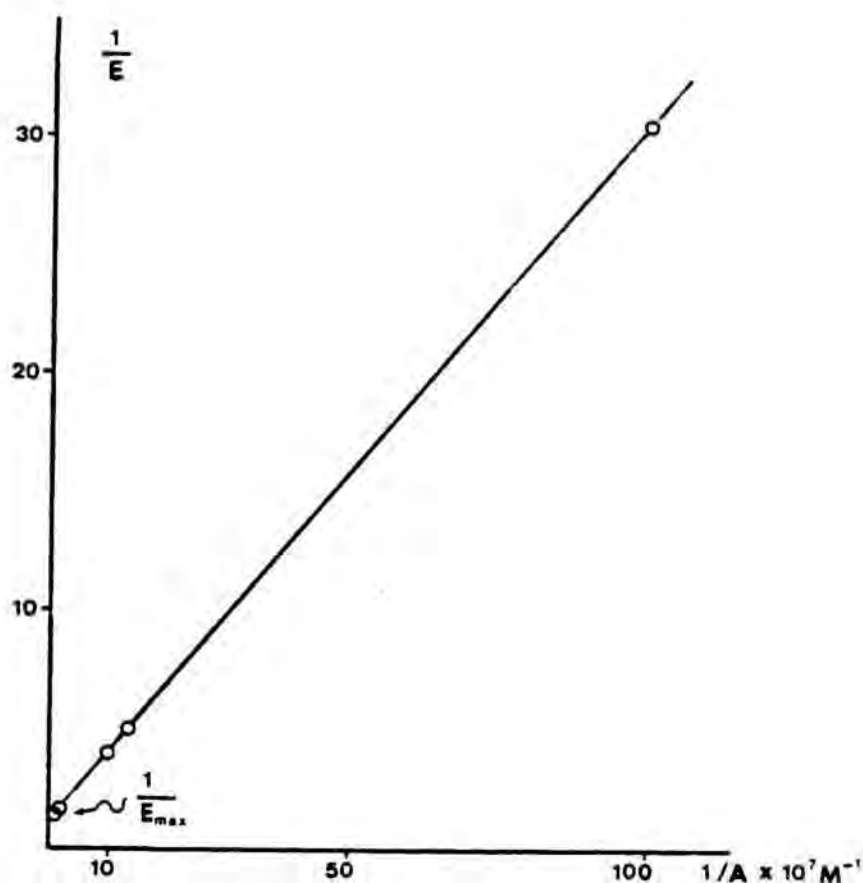


Figura 65 - Representación gráfica de los dobles recíprocos.

Esta representación da lugar a una línea recta, cuya ecuación es:

$$1/E = K/E_{\max} \times 1/A + 1/E_{\max} ;$$

cuya pendiente es $K/E_{\max}$ y $1/E_{\max}$ es la intersección con el eje de ordenadas (TALLARIDA 1979).

Para la noradrenalina, se obtiene la ecuación:

$$Y = 2.9637 \times 10^{-8} X + 1.0235$$

$$r = 0.9999$$

Del valor de la pendiente y la intersección, se obtienen los siguientes valores de "K" y "E_{max}":

$$K = 2.8956 \times 10^{-8} M$$

$$1/K = 3.4535 \times 10^7 \quad (\text{Afinidad})$$

$$E_{\max} = 0.9770 \text{ g}$$

De la representación gráfica sigmoidea e hiperbólica, se calcula la DE₅₀, resultando el valor de:

$$DE_{50} = 2.8 \times 10^{-8} M$$

El pD₂ (VAN DEN BRINK 1977), determinado para la noradrenalina en estas condiciones experimentales fue:

$$pD_2 = 7.55$$

Los fármacos difieren en su habilidad para producir un estímulo. Lo único que se sabe de la función que relaciona "S" y "E", es que a S = 0; E = 0.

STEPHENSON (1956), define la unidad de estímulo como aquella que produce una respuesta igual a la de la mitad del tejido (E = E_{max}/2; S = 1)

Si S = ε Y;

$$S = \frac{\epsilon_A \times A}{A + K_A} = 1 \quad ; \quad = \frac{A_{50} + K_A}{A_{50}}$$

El símbolo " A_{50} " se refiere a la concentración que produce una respuesta igual a la mitad del efecto máximo del tejido, no del fármaco.

En el caso de un agonista total, como la noradrenalina, el efecto máximo calculado se refiere a la del tejido.

De este modo, se puede determinar la ϵ_A , resultando un valor de:

$$\epsilon_A = 2.0341$$

Conociendo el valor de la constante de disociación y la eficacia, puede calcularse el valor del estímulo a cada concentración:

<u>Concentración (M)</u>	<u>Estímulo</u>
10^{-10}	0.0070
10^{-9}	0.0679
7.5×10^{-9}	0.4184
10^{-8}	0.5221
5×10^{-8}	1.2881
10^{-7}	1.5773
5×10^{-7}	1.9226
10^{-6}	1.9768
10^{-5}	2.0281
2×10^{-5}	2.0311

Si se representa el estímulo "S", frente el efecto "E", se obtiene la siguiente gráfica:

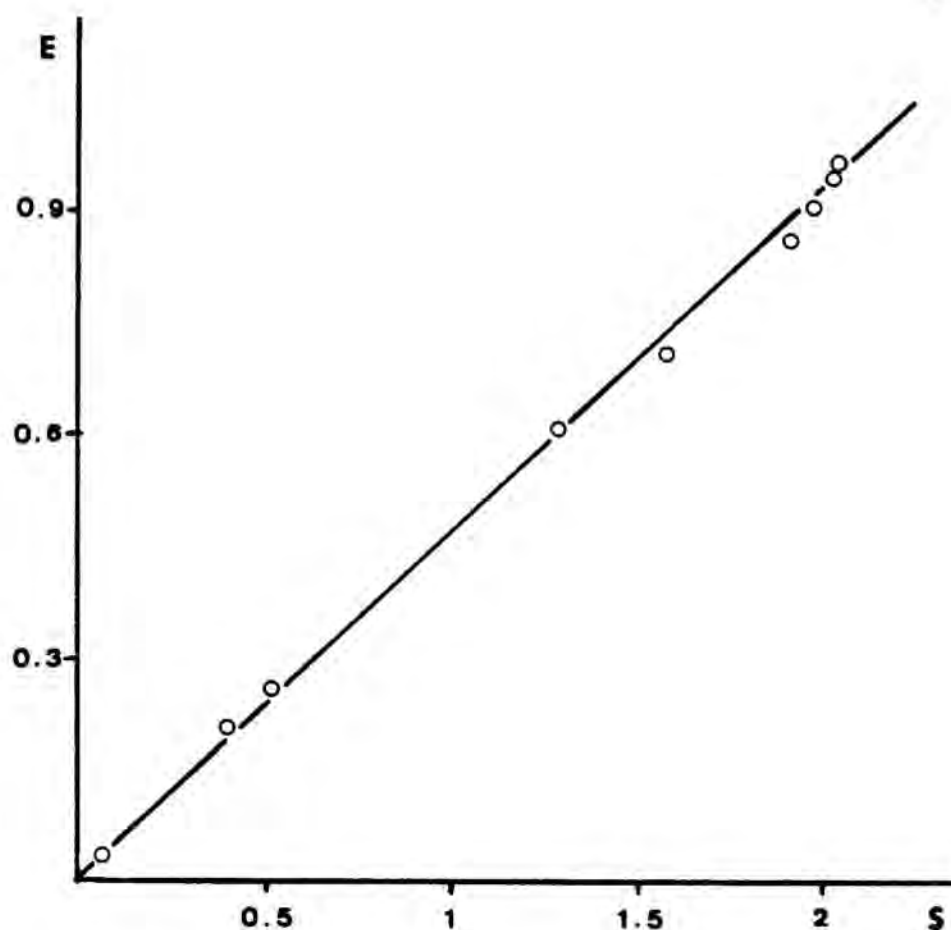


Figura 66.- Representación gráfica Estimulo-Efecto de la Noradrenalina.

Como era de suponer, al calcular la "K" según la teoría clásica, la relación E-S obtenida es lineal y corresponde a una recta de ecuación:

$$E = 0.4599 S + 0.0050$$

$$r = 0.9991$$

Para la obtención de la curva dosis-respuesta del ácido cafeico, la adición al baño de órganos, se realizó algunas veces de forma acumulativa, pero lo más frecuente fue la adición a dosis individuales, ya que la respuesta de la aorta al ácido fenol es menor y más fugaz. En cada ensayo se incluyó un registro de la contracción del órgano frente a una concentración determinada de noradrenalina, que se utilizó como referencia.

Para $n = 12$, se han obtenido los siguientes resultados:

<u>Conc (M)</u>	<u>$E/E_{\max} \times 100 \pm \sigma_{n-1}$</u>	<u>Tensión (g)</u>
5×10^{-5}	9.29 ± 3.43	0.0230
10^{-4}	28.60 ± 6.77	0.0720
5×10^{-4}	64.29 ± 3.74	0.1607
10^{-3}	94.84 ± 1.83	0.2377
2×10^{-3}	100	0.2506

Si estos resultados, se llevan a un sistema de coordenadas rectangulares o semilogarítmicas, se obtienen las curvas, sigmoidea e hiperbólica que aparecen a continuación.

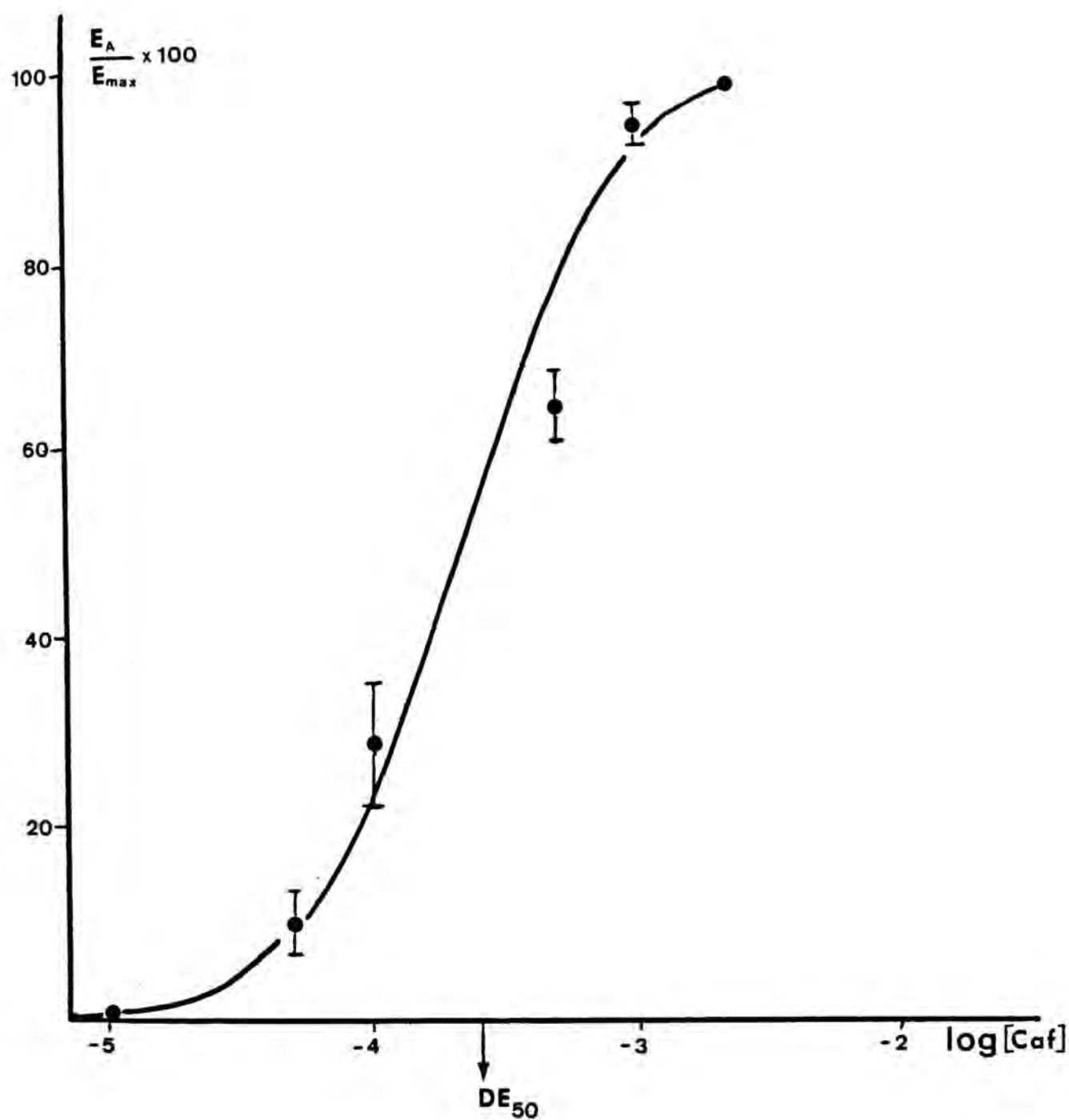


Figura 67.- Curva Dosis-Respuesta semilogarítmica del ácido cafeico.

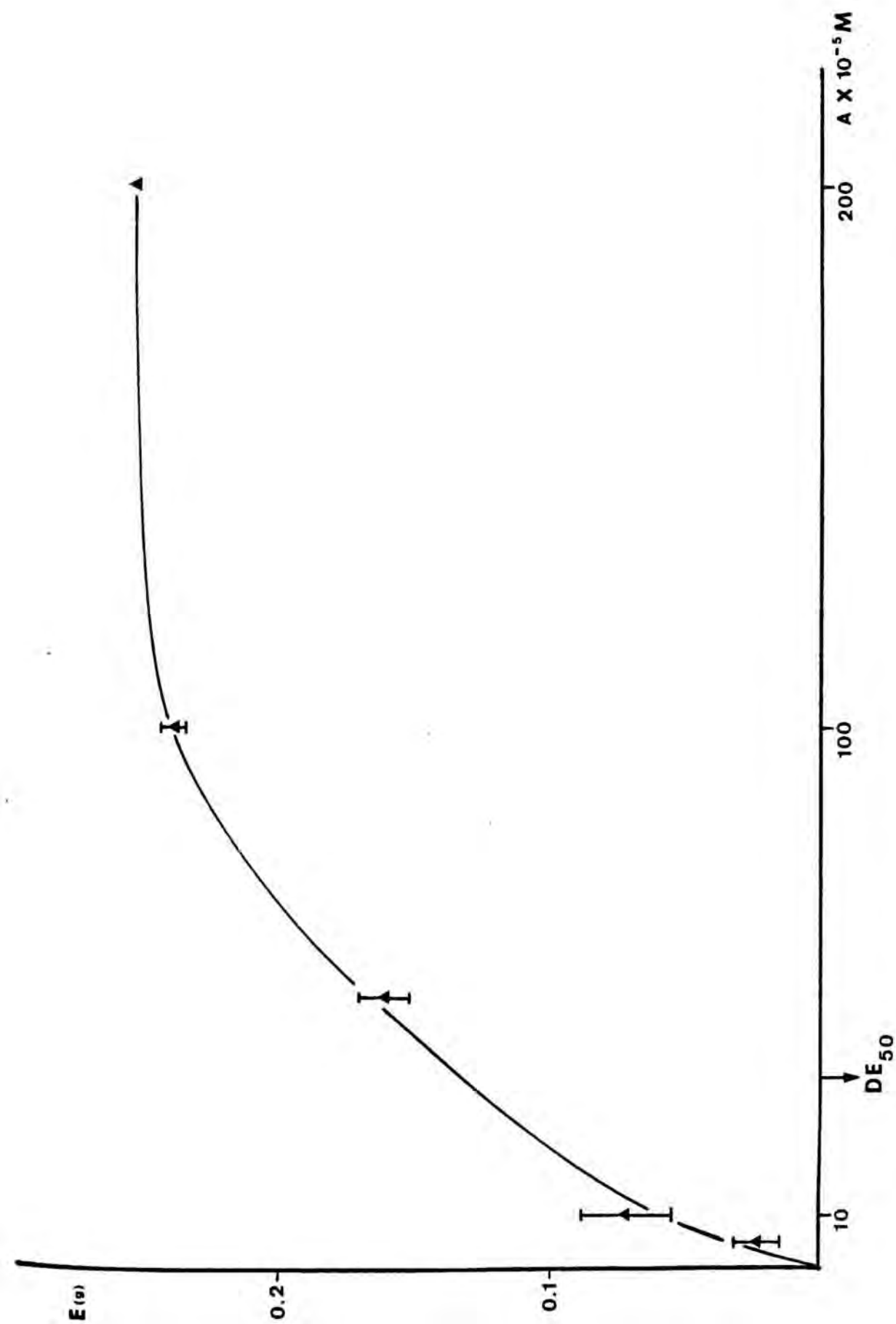


Figura 68.- Curva Dosis-Respuesta del ácido cafeico en escala lineal.

De ambas representaciones, se obtiene la DE_{50} para el ácido cafeico, referido al efecto máximo del ácido fenol, no al del tejido:

$$DE_{50} = 3.5 \times 10^{-4} M$$

$$pD_2 = 3.46$$

Para calcular el E_{max} , se realiza la representación gráfica de los inversos y se determina la intersección con el eje de ordenadas:

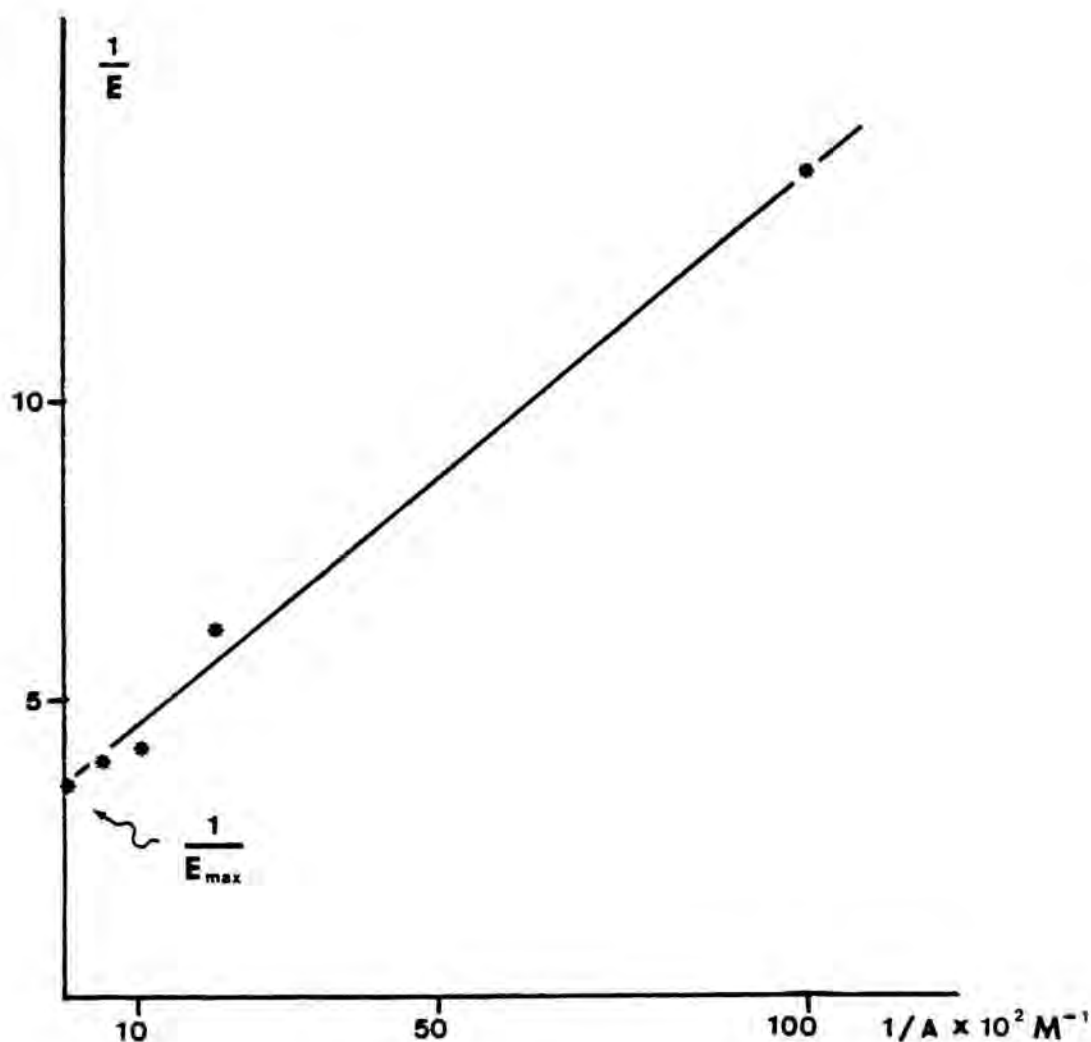


Figura 69.- Representación gráfica de los dobles inversos del ácido cafeico.

La recta de regresión que más se ajusta a los puntos experimentales, tiene por ecuación:

$$Y = 1.0387 \times 10^{-3} X + 3.5718$$

$$r = 0.9961$$

Por tanto, $E_{\max} = 0.2800$

El valor de este Efecto máximo, alejado del tisular, permite deducir el comportamiento del ácido cafeico como el de un AGONISTA PARCIAL en este sistema.

Si se conoce el efecto máximo del tejido, la actividad intrínseca de un agonista viene dada por la fórmula (MacKAY 1977):

$$\alpha_c = \frac{E_{\max}^c}{E_{\max}}$$

Así, la actividad intrínseca del ácido cafeico es:

$$\alpha = 0.2866$$

Para determinar la constante de disociación de un agonista parcial, se sigue el método de BARLOW (1967), teniendo en cuenta que un agonista parcial requiere la ocupación de gran cantidad de receptores y que en general no se alcanza nunca la respuesta máxima del tejido.

Este método requiere que el agonista total cumpla que $K_A > A$. Como esto no ocurre con la noradrenalina, se ha seguido el método alternativo propuesto por TALLARIDA (1979).

Siendo A la concentración del agonista total y P la

del agonista parcial, se obtienen pares (A_i, P_i), referidos a concentraciones de cada uno de los agonistas que producen respuestas iguales, y en especial, el valor de A_p , concerniente a la concentración de agonista total que produce el mismo efecto que el máximo del agonista parcial.

Si se denomina K_p la constante de disociación del agonista parcial, ésta viene determinada por la fórmula:

$$K_p = \frac{K_A (A_p - A_i) P_i}{(A_p + K_A) A_i}$$

De este modo, sabiendo que:

$$K_A = 2.8956 \times 10^{-8} M$$

$$A_p = 9.7 \times 10^{-9} M$$

$$A_i = 5 \times 10^{-9} M$$

$$P_i = 5 \times 10^{-4} M$$

Se obtiene una K_p :

$$K_p = 3.5206 \times 10^{-4} M$$

$$1/K_p = 2.8404 \times 10^3 \quad (\text{Afinidad})$$

Ya que el efecto máximo de P, se consigue con todos los receptores ocupados, de la fórmula $S = \epsilon Y$, se deduce que el estímulo máximo producido por P es ϵ_p , es decir su eficacia. El mismo estímulo lo consigue A con menos receptores ocupados y la concentración A_p . De ello se deduce

$$\epsilon_A / \epsilon_p = 1 + K_A / A_p$$

Por tanto,

$$\epsilon_p = 0.5105$$

A partir de la fórmula $S = \epsilon_p \times P/P + K_p$, se puede calcular el valor del estímulo, para cada concentración, obteniéndose los siguientes valores:

<u>Concentración (M)</u>	<u>Estímulo</u>
5×10^{-5}	0.0635
10^{-4}	0.1129
5×10^{-4}	0.2995
10^{-3}	0.3775
2×10^{-3}	0.4340

Estos valores, al ser representados gráficamente (Estímulo-Efecto), dan lugar a una recta:

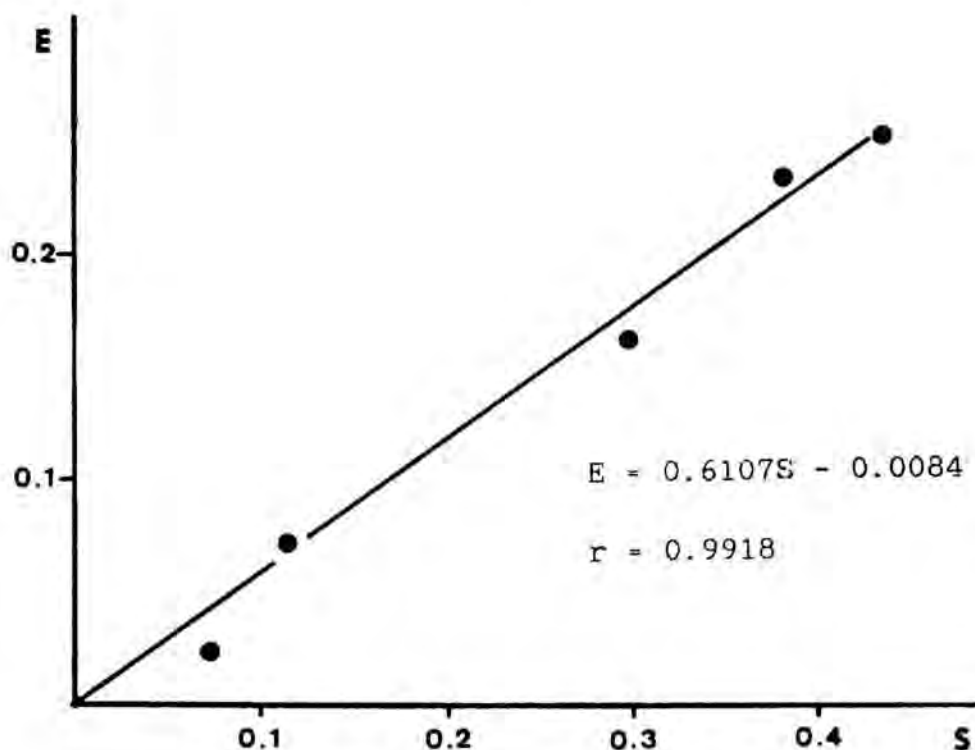


Figura 70.- Representación Estimulo-Efecto del ácido cafeico

De la relación $S = \epsilon Y$, se observa que el valor máximo del estímulo corresponde a una fracción de receptores ocupados, prácticamente igual a 1.

De forma resumida, los parámetros obtenidos para la noradrenalina y el ácido cafeico en la aorta torácica aislada de rata, se exponen a continuación de forma comparada:

	<u>NORADRENALINA (n=9)</u>	<u>ACIDO CAFEICO (n=12)</u>
DE_{50}	$2.8 \times 10^{-8} M$	$3.5 \times 10^{-4} M$
pD_2	7.55	3.46
E_{max}	0.9770 g	0.2800 g
α	1	0.2866
K	$2.9 \times 10^{-8} M$	$3.5 \times 10^{-4} M$
Afinidad	3.4×10^7	2.8×10^3
ϵ_A	2.0341	0.5105

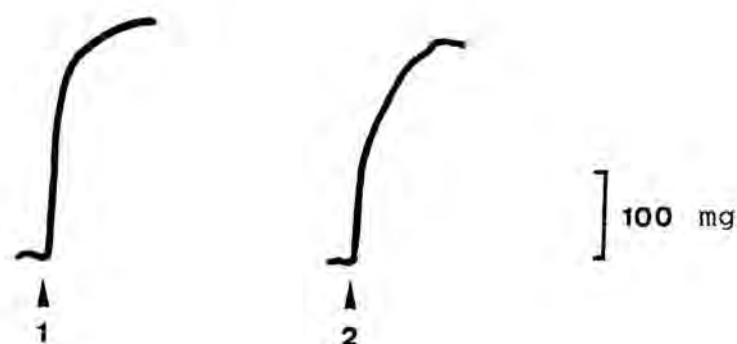


Figura 71.- Curvas comparativas del ácido cafeico y la NA.

- 1.- NA 10^{-8} M.
- 2.- Acido Cafeico 10^{-3} M.

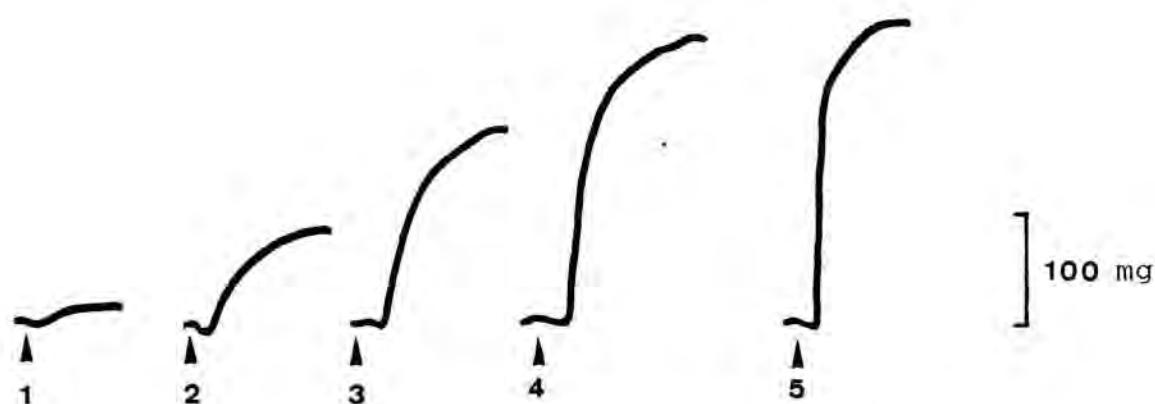


Figura 72.- Curvas Dosis-Respuesta del ácido cafeico.

- 1.- Acido Cafeico 5×10^{-5} M.
- 2.- Acido Cafeico 10^{-4} M.
- 3.- Acido Cafeico 5×10^{-4} M.
- 4.- Acido Cafeico 10^{-3} M.
- 5.- Acido Cafeico 2×10^{-3} M.

Determinación del pA_2 de diversos antagonistas

La determinación de la constante de disociación de un antagonista competitivo es fundamental para la clasificación de los receptores. Otra aplicación del valor de la constante de disociación (K) de un antagonista competitivo es para determinar si dos agonistas actúan sobre el mismo tipo de receptor. Si es así, los dos agonistas deben ser bloqueados de forma cuantitativamente similar por el mismo antagonista competitivo (TALLARIDA 1979).

El primer antagonista utilizado para demostrar que la actividad contracturante del ácido cafeico sobre la musculatura lisa vascular se debe a una acción alfa, determinada por el grupo catecol, ha sido la fentolamina (Fentolamina metan-sulfonato Ciba-Geigy).

Una vez obtenidas varias respuestas repetitivas para la NA y el ácido cafeico, se realiza una curva acumulativa con el ácido fenol. Cuando se recupera la línea base se añade una solución de fentolamina, que se deja en contacto con la aorta durante 15 minutos. Transcurrido este tiempo, y sin lavar el órgano, se añade el ácido cafeico y se lleva a cabo otra curva acumulativa.

La presencia de un antagonista competitivo a una concentración "B", produce un desplazamiento hacia la derecha de la curva dosis-respuesta del agonista. A mayor valor de B, más desplazamiento. En presencia de un antagonista, la concentración de agonista que produce el mismo efecto que una concentración "A" de agonista solo, es "A'", cumpliéndose siempre que $A' > A$.

Para un determinado valor de B se establece (WAUD 1975):

$$A'/A = 1 + B/K_B$$

Para calcular K_B se determina el valor de la relación A'/A a varias concentraciones de antagonista. Los valores $(A'/A - 1)$ a cada concentración de B se representan logarítmicamente. Se obtiene una gráfica lineal (representación de Schild) cuya ecuación es (SCHILD 1959, TALLARIDA 1981):

$$\begin{aligned}\log(A'/A - 1) &= \log B - \log K_B \\ &= \log B + pA_2\end{aligned}$$

Si el antagonismo es de tipo competitivo, la pendiente de la recta de regresión de los puntos experimentales debe ser prácticamente 1, y la intersección con los ejes corresponde al valor del pA_2 .

Si la pendiente difiere de 1, el pA_2 corresponde al valor de la intersección con el eje de abscisas.

Utilizando cuatro concentraciones de fentolamina se han obtenido los siguientes valores ($n = 12$):

<u>Fentolamina (M)</u>	<u>$A'/A - 1$</u>
2.1×10^{-8}	2.9216
3.3×10^{-8}	3.8780
4.2×10^{-8}	6.0175
5.0×10^{-8}	9.5263

El ajuste de los logaritmos de estos valores por el método de los mínimos cuadrados da una recta de pendiente 1.3031 ($r = 0.9479$). El pA_2 , pues, viene determinado por la intersección con el eje de abscisas. Esta intersección tiene por valor 8.00. Así $K_B = 1.0027 \times 10^{-8} \text{ M}$.

El pA_2 de la fentolamina frente a la NA es de 8-8.4 (SHEYS 1972) u 8.69 (SWAMY 1971). Si se compara este valor con el correspondiente al ácido cafeico, puede concluirse que la acción vasoconstrictora de este ácido fenol en aorta aislada de rata, se debe a un efecto producido por la interacción con el receptor alfa-adrenérgico.

Cuando se registran las curvas dosis-respuesta del ácido cafeico frente a la fentolamina, se observa que el desplazamiento respecto a la curva inicial no es totalmente paralelo. Aún incrementando la dosis de ácido cafeico, no se consigue alcanzar el mismo efecto máximo inicial. Tras sucesivos lavados del órgano, una vez eliminada la fentolamina, las respuestas recuperan el valor inicial, obteniéndose una curva dosis-respuesta idéntica a la obtenida previamente al antagonismo.

Según STEPHENSON (1956), el efecto máximo en un órgano puede conseguirse sin necesidad de ser ocupados todos los receptores. La sobresaturación implica el concepto de RECEPTOR DE RESERVA, lo que explica determinados comportamientos farmacológicos. Ciertos agonistas requieren la ocupación de la totalidad de los receptores para producir su efecto máximo. Estos receptores adicionales o de "reserva", son los que necesita ocupar también un agonista parcial (GINNEKEN 1977).

La fracción de receptores de reserva en la población total de receptores, viene dada por la ecuación:

$$(\epsilon - S^*)/\epsilon$$

Siendo S^* el producto del estímulo máximo por el número total de receptores (GOSSELIN 1977).

Una relación estímulo-efecto como la que se observa en el ácido cafeico, indica en muchos casos, la posibilidad de la ocupación de los receptores de reserva, con la siguiente particularidad: dentro de ciertos límites el efecto aumenta al incrementar el estímulo, pero un estímulo submaximal corresponde prácticamente al efecto máximo (NICKERSON 1956).

La afinidad por el receptor es menor en el agonista parcial que en el total. El ácido cafeico es menos efectivo que la NA para desplazar al antagonista que compite por el mismo receptor. Este desplazamiento no es total y varía con la concentración. De este modo, a pesar de aumentar considerablemente la dosis de ácido cafeico, no se logra desplazar la fentolamina de la totalidad de los receptores ocupados por la misma y no se consigue el mismo efecto máximo. A su vez, el desplazamiento de la curva pide un cierto grado de paralelismo.

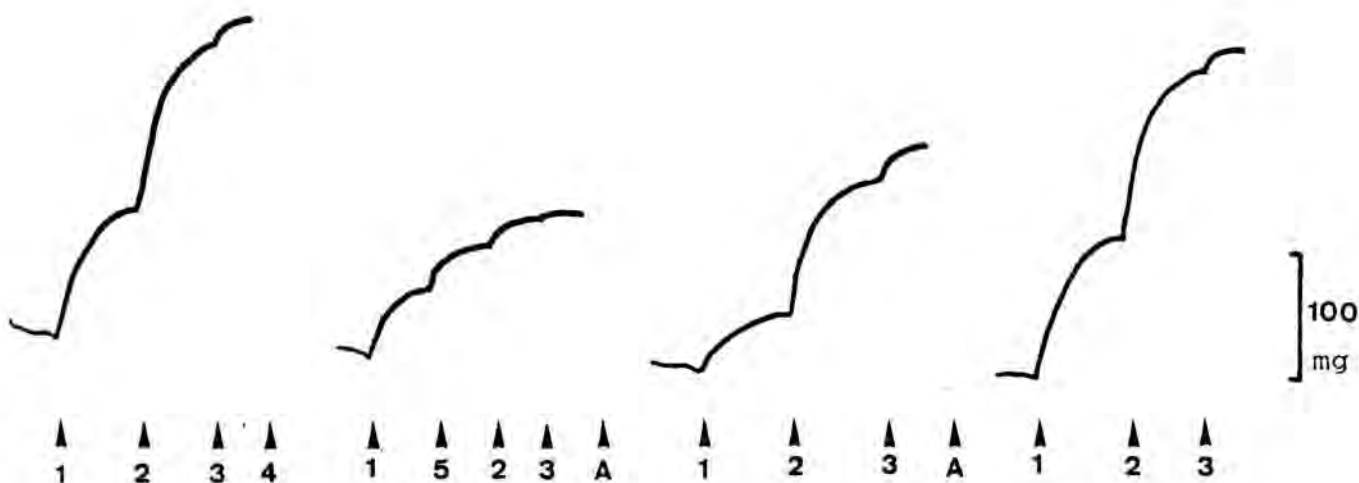


Figura 73.- Antagonismo por Fentolamina.

- | | |
|---|---|
| 1.- Acido Cafeico 10^{-4} M. | 4.- Fentolamina 2.1×10^{-8} M. |
| 2.- Acido Cafeico 10^{-3} M. | 5.- Acido Cafeico 5×10^{-4} M. |
| 3.- Acido Cafeico 2×10^{-3} M. | A.- Sucesivos lavados durante 30 minutos. |

Para confirmar la actividad alfa-adrenérgica del ácido cafeico, se ha estudiado el antagonismo con Prazosín (Prazosín clorhidrato, Pfizer).

El prazosín actúa preferentemente sobre el receptor alfa-adrenérgico post-sináptico. La diferencia entre la actividad a nivel pre y postsináptico es de unas 1,000 veces (DOXEY 1977). Este fármaco posee una acción periférica que se traduce en una relajación de la musculatura lisa vascular y un bloqueo adrenérgico (PFIZER 1970).

MASSINGHAM (Comunicación personal), señala que el bloqueo del receptor alfa-adrenérgico por prazosín varía notablemente, según el tiempo de contacto, y el tipo de antagonismo que se observa es no competitivo, ya que el órgano no logra alcanzar de nuevo la misma respuesta inicial.

DOXEY (1977) obtiene para el prazosín un $PA_2 < 6.62$ frente a un agonista parcial del receptor alfa presináptico, la clonidina. Sin embargo, este valor se eleva a 8.2 cuando se estudia el efecto antagonista sobre el receptor alfa postsináptico.

En el estudio del antagonismo del prazosín frente al ácido cafeico, se ha seguido el mismo protocolo experimental que con la fentolamina. En este caso el tiempo de contacto ha sido de 25 minutos.

En ningún caso, el desplazamiento observado ha sido paralelo, ni se consigue superar el antagonismo. Por tanto, cada ensayo realizado con prazosín requiere un nuevo órgano.

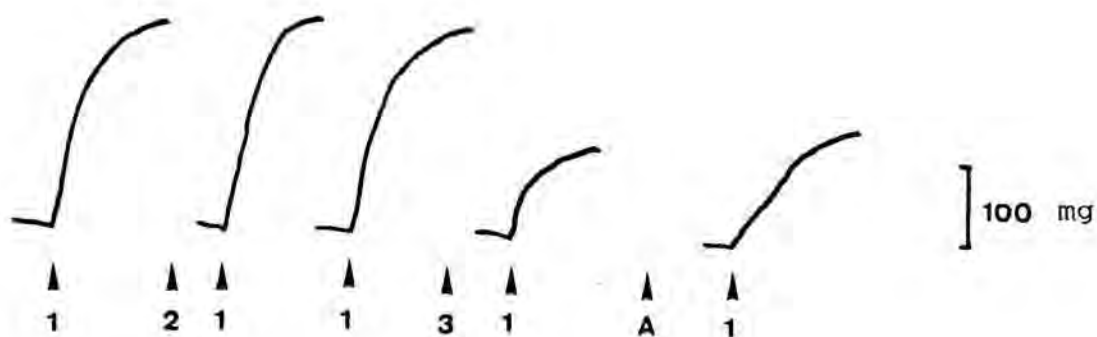


Figura 74.- Antagonismo por Prazosín.

1.- Acido Cafeico 10^{-3} M.

3.- Prazosín 10^{-5} M.

2.- Prazosín 10^{-6} M.

A.- Sucesivos lavados
durante 30 minutos.

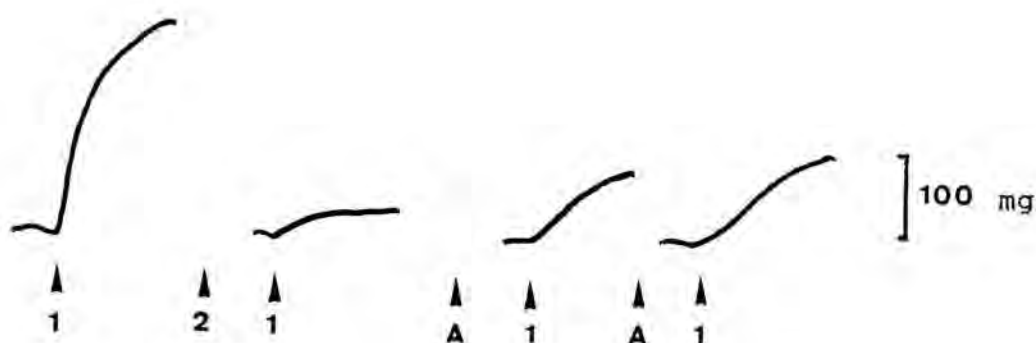


Figura 75.- Antagonismo por Prazosín.

1.- Acido Cafeico 10^{-3} M.

2.- Prazosín 10^{-4} M.

A.- Sucesivos lavados durante 30 minutos.

Unos ensayos previos, demostraron que a una concentración de prazosín 10^{-4} M se producía un 100% de inhibición del efecto máximo del ácido cafeico, y a 10^{-6} M un 0%, por lo que se ensayaron varias dosis entre estas dos concentraciones, siendo la de 10^{-5} M, la más significativa, ya que produce una inhibición del 56.52%.

Al aplicar la ecuación de SZEKERES:

$$\log (A'/A - 1) = \log B - \log K_B$$

se obtiene un valor de pA_2 de 5.63.

Este valor está en concordancia con el obtenido por DOXEY frente al agonista parcial (clonidina) en el receptor alfa presináptico. Podría pensarse, pues, que el efecto alfa del ácido cafeico se produce a ese nivel. Tal aseveración en el mecanismo de acción, requiere posteriores estudios en distintas preparaciones farmacológicas: conductos deferentes de rata estimulados eléctricamente, músculo ano-coccígeo aislado de rata y otros ensayos "in vivo", que incluyen registros cardiovasculares tras neurtomía selectiva.

Según STEPHENSON (1956), el agonismo parcial es un caso especial de antagonismo competitivo, ya que el agonista parcial ocupa el mismo receptor que el agonista total, compitiendo por éste, de tal modo, que el adicionarse conjuntamente ambas sustancias en un baño de órganos, el efecto del agonista total se ve disminuido.

Esta teoría se ve confirmada en el caso del ácido cafeico, lo que reafirma el carácter de agonista parcial del mismo.

A tal efecto, en las mismas condiciones experimentales en que se han obtenido las curvas dosis-respuesta para la NA y el ácido cafeico, se ha ensayado la administración conjunta de ambas sustancias.

En primer lugar, se sensibiliza el órgano con una dosis de NA 10^{-8} M. A continuación se ensaya varias veces una determinada concentración de NA. Se eligió la concentración de 7.5×10^{-9} M, cuyo efecto es prácticamente equivalente al efecto máximo del ácido cafeico. Una vez se han obtenido varias respuestas repetitivas, se ensaya el efecto del ácido cafeico a una concentración de 2×10^{-3} M durante 1 minuto, al cabo del cual, y sin lavar la preparación, se adiciona NA a la concentración citada anteriormente. Como puede observarse en la siguiente gráfica, la respuesta de la NA queda inhibida en un 31.58%.

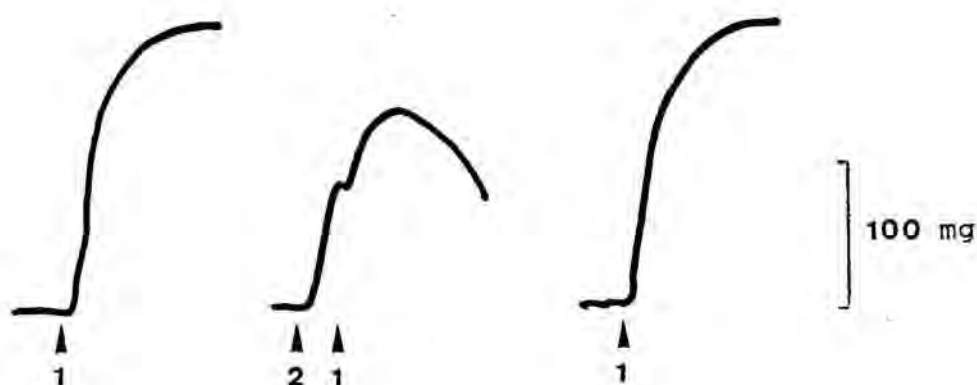


Figura 76.- Inhibición de la respuesta a la NA por el ácido cafeico.

- 1.- NA 10^{-8} M.
- 2.- Acido Cafeico 2×10^{-3} M.

Si bien la respuesta a la NA en general, alcanza el máximo a los 5-6 minutos, y éste se mantiene durante varios minutos más, en la administración conjunta de ambas sustancias, el máximo al ser menor, se alcanza transcurridos tan sólo 2 minutos tras la adición de NA. Este máximo no se mantiene y la preparación se relaja por sí misma.

En resumen, pues:

- La similitud estructural del ácido cafeico con las catecolaminas reside en el grupo catecol, determinante en éstas de la actividad alfa-adrenérgica.
- Se observa un efecto vasoconstrictor dosis-dependiente en aorta aislada de rata.
- El efecto máximo observado es inferior al de la NA.
- Para conseguir el efecto máximo el ácido cafeico, probablemente, precisa ocupar unos receptores de reserva.
- El efecto vasoconstrictor es antagonizado por la fentolamina y el prazosín.
- La adición conjunta de ácido cafeico y noradrenalina disminuye el efecto de ésta última.

Si a todo ello se añade que el valor de la actividad intrínseca del ácido cafeico es de 0.29, y según diversos autores (VAN DER BRINK y MACKAY 1977) un agonista parcial se caracteriza por tener una actividad intrínseca entre 0 y 1, puede concluirse que el ácido cafeico se comporta como un agonista parcial de los receptores alfa adrenérgicos, a nivel de la musculatura lisa vascular.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- 1.- El estudio de la fijación del ácido cafeico a la Seroalbúmina bovina se ha realizado por cuatro métodos distintos: Precipitación Ácida (60%), Diálisis de Equilibrio (79%), Gel-Filtración (95%) y Ultrafiltración (88%).
- 2.- Se han detectado dos clases de puntos de unión a la Seroalbúmina bovina, y se han determinado los valores de K_i y n_i de cada clase.
- 3.- El porcentaje de unión del ácido cafeico a la Seroalbúmina bovina se ve afectado por la concentración y disposición estructural de la proteína, así como por el valor del pH del medio, pero no por la fuerza iónica del mismo.
- 4.- El porcentaje de fijación del ácido ferúlico, p- y m-cumárico es notablemente inferior e indica la importancia del grupo o-difenol en el fenómeno de unión del ácido cafeico a la proteína.
- 5.- En los estudios de fijación del ácido cafeico a homogenizados de tejido, se obtienen porcentajes de unión del mismo orden de magnitud que en el plasma, siendo el hígado, el que presenta una menor tasa de fijación.
- 6.- Tras administración i.v. a la rata, el ácido cafeico sigue un proceso lineal de tipo bicompartimental, con una semivida de eliminación de 1 hora y 48 minutos.
- 7.- Por vía i.v., la relación de microconstantes, manifiesta una tendencia del ácido cafeico hacia el com-

partimento periférico, sin que sea el retorno de éste al central el factor limitante de la eliminación.

- 8.- El ácido cafeico, administrado por vía oral, presenta una cinética bicompartimental, con una semivida de absorción de 4 minutos y una biodisponibilidad del 22.41%.
- 9.- El aumento del % de fijación del ácido cafeico a las proteínas plasmáticas tras administración oral, se traduce en una reducción del valor del volumen de distribución en el compartimento central.
- 10.- En los estudios de absorción "in situ" del ácido cafeico, se observa que a igualdad de pH, la absorción gástrica es menor que la intestinal. En ambos casos, el valor de la constante de absorción se incrementa al disminuir el pH.
- 11.- De los resultados obtenidos en las experiencias de aclaramiento renal (i.v. y oral), se deduce que el único proceso que interviene en la eliminación renal del ácido cafeico es la filtración glomerular.
- 12.- A partir de los datos calculados por las cinéticas i.v. y oral, se concluye, que la eliminación del ácido cafeico se lleva a cabo mayoritariamente por procesos metabólicos.
- 13.- Los niveles microsomales hepáticos de los citocromos P-450 y b-5, no se ven afectados después de la incubación "in vitro" del pellet microsomal con ácido cafeico a distintas concentraciones.

14.- En aorta aislada de rata, el ácido cafeico se comporta como un agonista parcial del receptor alfa-adrenérgico, ya que:

- A) Se observa un efecto vasoconstrictor dosis-dependiente.
- B) El efecto máximo es menor que el de la noradrenalina.
- C) La acción vasoconstrictora se antagoniza con fenotolamina y Prazosín.
- D) La adición conjunta al baño de órganos de ácido cafeico y noradrenalina, disminuye el efecto de esta última.
- E) La actividad intrínseca del ácido cafeico es de 0.29.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- ABAD M.C., CADORNIGA R., PASTORIZA P.
 "Transferencia de medicamentos a través de membranas artificiales. III.- Absorción "in situ" de ácido salicílico. Correlaciones "in vitro"- "in vivo".
 Ciencia Ind. Farm. (1984), 3, 63-67.

- ADAMI F., MARAZZI-UBERTI F., TURBA C.
 "Pharmacological research on gefarnate, a new synthetic isoprenorol with an anti-ulcer action".
 Arch. Int. Pharmacodyn. (1964), 147, 113.

- AGARWAL O.P.
 "The antiinflammatory action of nepitrin, a flavonoid".
 Agents & Actions (1982), 12, 298-302.

- ANDARY C., PRIVAT G., CHEVALLET P., ORZALES H., SERRANO J.J., BOUCARD M.
 "Etude chimique et Pharmacodynamique d'esters hétérosidiques de l'acide cafeique, isolés d'Orobancha rapum-genistae".
 Il Farmaco (Ed. Sci.) (1980), XXXV, 1-30.

- ANTON A.H.
 "A drug-induced change in the distribution and renal excretion of sulphonamides".
 J. Pharmacol. Exp. Ther. (1961), 134, 291-303.

- ARMSTRONG M.D., WALL P.E., PARKER V.J.
 "The excretion of m-hydroxyhippuric acid by human beings".
 J. Biol. Chem. (1956), 218, 291-297.

- BARLOW R.B., SCOTT K.A., STEPHENSON R.P.
"The affinity and efficacy of onium salts on the frog rectus abdominis".
Brit. J. Pharmacol. (1967), 31, 188-196.
- BARNAULOV O.D., MANICHEVA O.A., ZAPESOCHNAYA G.G.
"Effect of some flavonoids on the ulcerogenic action of reserpine in mice".
Khim. Farm. (ZH) (1982), 3, 300-303.
- BARNES H.M., FELDMAN J.R., WHITE W.V.
"Isochlorogenic acid. Isolation from coffee and structure studies".
J. Am. Chem. Soc. (1950), 72, 4178.
- BARR W.H.
"Factors involved in the assessment of systemic or biologic availability of drug products".
Drug Inform. Bull. (1969), 3, 27-45.
- BAUMANN J., BRUCHHAUSEN F.V., WURM G., HAENSEN R.
"Di hydro caffeic-acid a metabolite of bioflavonoids as a cofactor of prostaglandin synthetase".
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. (West Germany) (1978), 302, R26.
- BENET L.Z., GALEAZZI R.L.
"Noncompartmental determination of the steady-state volume of distribution".
J. Pharm. Sci. (1979), 68, 1071-1074.
- BENSON E.S., HALLAWAY B.E., LUMRY R.W.
"Deuterium-hydrogen exchange analysis of pH-dependent transition in bovine plasma albumin".
J. Biol. Chem. (1964), 239, 122-129.

- BERMAN M., SHAHN E., WEISS M.F.
 "The routine fitting of kinetic data to models. A mathematical formalism for digital computers".
 Biophys. J. (1962), 2, 275-287 (a).
- BERMAN M., WEISS M.F., SHAHN E.
 "Some formal approaches to the analysis of the kinetic data in terms of linear compartmental systems".
 Biophys. J. (1962), 2, 289-316 (b).
- BERTON G., SCHNEIDER C., ROMEO D.
 "Inhibition by quercetin of activation of polymorphonuclear leucocyte functions. Stimulus-specific effects".
 Biochim. Biophys. Acta (1980), 595, 47-55.
- BHAT C., RAMASARMA T.
 "Effect of phenyl and phenolic acids on mevalonate-5-phosphate kinase and mevalonate-5-pyrophosphate decarboxylase of the rat brain".
 J. Neurochem. (1979), 32, 1531-1537.
- BINAGLIA L., ROBERTI R., FRANCESCAAGELI E., GORACCI G.
 "Influenza della cinarina e dell'acido caffeico sulle velocità di sintesi della fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina epatica "in vitro" ed "in vivo".
 En "Nuovi studi sul carciofo". Atti del 2º congresso internazionale sul carciofo. Minerva Medica. Turin.
 (1976), 145-152.
- BOOTH A.N., EMERSON O.H., JONES F.T., DeEDS F.
 "Urinary metabolites of caffeic and chlorogenic acids".
 J. Biol. Chem. (1957), 229, 51-59.
- BOOTH A.N., WILLIAMS R.T.
 "Dehydroxylation of caffeic acid by rat and rabbit cae-

- cal contents and sheep rumen liquor".
 Nature (London) (1963), 198, 684-685 (a).
- BOOTH A.N., WILLIAMS R.T.
 "Dehydroxylation of catechol acids by intestinal contents".
 Biochem. J. (1963), 88, 66-67 (b).
- BOXEMBAUM H.G., RIEGELMAN S., ELASHOFF R.M.
 "Statistical stimations in pharmacokinetics".
 J. Pharmacokin. Biopharm. (1974), 2, 123-148.
- BRECKENRIDGE A.
 "Effect of liver disease on pharmacokinetics".
 Proc. 1 Cong. Eur. Biopharm. Pharmacocin. Clermont-
 -Ferrand (1981), 3, 25.
- BRIGGS C.J., HUBBARD J.W., SAVAGE C., SMITH D.
 "Improved procedure for the determination of protein
 binding by conventional equilibrium dialysis".
 J. Pharm. Sci. (1983), 72, 918-921.
- BROWN J.R.
 "Structure of bovine serum albumin".
 Fed. Proc. (1975), 34, 591.
- BROWN J.R.
 "Serum albumin:amino acid sequence".
 En "Albumin structure, function and uses". Pergamon
 Press. Oxford. (1977), 27-51.
- BRYSON S.M., LAWRENCE J.R., STEELE W.H., CAMPBELL B.C.,
 ELLIOT H.L., SUMNER D.J.
 "The influence of protein binding on disopyramide clea-

rance".

Eur. J. Clin. Pharmacol. (1982), 23, 453-456.

- BULBENA J.O.

"Estudios sobre la fijación proteica y el equilibrio conformacional de catecolaminas".

Tesis Doctoral. Barcelona. (1979).

- CAFRUNY E.J.

"Renal excretion of drugs".

En "Fundamentals of drug metabolism and drug disposition". Ed. B.N. La Du, H.G. Mandel, E.L. Way. The Williams & Wilkins Company. Baltimore. (1971), 119-130.

- CLARK A.J.

"The mode of action of drugs on cells". Edward Arnold and Co. London. (1933).

- COFFEY J.J., BULLOCK F.J., SCHOENEMANN P.T.

"Numerical solution of nonlinear pharmacokinetic equations: Effects of plasma protein binding on drug distribution and elimination".

J. Pharm. Sci. (1971), 60, 1623-1628.

- COHN V.H.

"Transmembrane movement of drug molecules".

En "Fundamentals of drug metabolism and drug disposition". Ed. B.N. La Du, H.G. Mandel, E.L. Way. The Williams & Wilkins Co. Baltimore (1971), 3-21.

- CROOKS M.J., BROWN K.F.

"Binding of sulfonylureas to serum albumin".

J. Pharm. Sci. (1973), 62, 1904.

- CUATRECASAS P., TELL G.P.E., SICA V., PARIKH I., CHANG K.G.

"Noradrenaline binding and the search for catecholamine

receptors".

Nature (1974), 247, 92-97.

- CURRY S.H.

"Relation between binding to plasma protein, apparent volume of distribution, and rate constants of disposition and elimination for chlorpromazine in three species".
J. Pharm. Pharmacol. (1972), 24, 818-819.

- CZOK G., MIDANI, W., FINKE R.I.

"Effects of some phenols and hydroxyphenyl carboxy acids on biliary secretion and intestine motility".
C.R. Coll. Int. Chim. Cafes (1973), 5, 408-416.

- DAKIN H.D.

"The mode of oxidation in the animal organism of phenyl derivatives of fatty acids. Part VI. The fate of phenylalanine, phenyl- β -alanine, phenylserine, phenylglycerc acid and phenylacetaldehyde".
J. Biol. Chem. (1909), 6, 235-243.

- DALLNER G., SIEKEVITZ P., PALADE G.E.

"Biogenesis of endoplasmic reticulum membranes. I. Structural and chemical differentiation in developing rat hepatocyte".
J. Cell. Biol. (1966), 30, 73-96.

- DANON A., SAPIRA J.

"Binding of catecholamines to human serum albumin".
J. Pharmacol. Exp. Ther. (1972), 182, 295-303.

- DAVIDSON C.

"Protein binding".
En "Fundamentals of drug metabolism and drug disposition". Ed. B.N. La Du, H.G. Mandel, E.L. Way. The Williams & Wilkins Co. Baltimore (1971), 63-74.

- DAY J.F., THORPE S.R., BAYNES J.W.
 "Non-enzimatically glucosylated albumin. In vitro preparation and isolation from normal human serum".
 J. Biol. Chem. (1979), 254, 595-597.

- DeEDS F., BOOTH A.N., JONES F.T.
 "Methylation and dehydroxylation of phenolic compounds by rats and rabbits".
 J. Biol. Chem. (1957), 225, 615-621.

- DOLUISIO J.T., SWINTOSKY J.V.
 "Factors influencing drug distribution in the body".
 Am. J. Pharm. (1965), 137, 144-168.

- DOLUISIO J.T., BILLUPS N.F., DITTERT L.W., SUGITA E.T., SWINTOSKY J.V.
 "Drug absorption I: An in situ rat gut technique yielding realistic absorption rates".
 J. Pharm. Sci. (1969), 58, 1196-1200 (a).

- DOLUISIO J.T., TAN G.H., BILLUPS N.F., DIAMOND L.
 "Drug absorption II: Effect of fasting on intestinal drug absorption".
 J. Pharm. Sci. (1969), 58, 1200-1202 (b).

- DOLUISIO J.T., CROUTHAMEL W.G., TAN G.H., SWINTOSKY, J. V., DITTERT L.W.
 "Drug absorption III: Effect of membrane storage on the kinetics of drug absorption".
 J. Pharm. Sci. (1970), 59, 72-76.

- DOMER F.R.
 "Animal experiments in pharmacological analysis".
 Ch. C. Thomas. Springfield (1971), 186-188.

- DOST F.H.
"Der Blutspiegel. Kinetik der Konzentrationsabläufe in der Kreislaufflüssigkeit".
Thieme. Leipzig (1953).

- DOST F.H.
"Über ein einfaches statistisches dosis-umsatz-gesetz".
Klin. Wschr. (1958), 36, 655-657.

- DOST F.H.
"Grundlagen der pharmakokinetik".
Thieme. Stuttgart (1968).

- DOXEY J.C., SMITH C.F.C., WALKER J.M.
"selectivity of blocking agents for pre- and postsynaptic alfa-adrenoceptors".
Br. J. Pharmacol. (1977), 60, 91-96.

- DUNN W.J.
"Binding of certain non steroid antiinflammatory agents to human serum albumin".
J. Med. Chem. (1973), 16, 484-486.

- ESKIN N.A.M., HENDERSON H.M., TOWNSEND R.J.
"Biochemistry of foods"
Academics Press. New York. (1971).

- ESPLUGUES J.
"Perspectivas terapéuticas con su fundamento farmacológico. VII. Farmacología general".
Fund. García Muñoz. Valencia (1982).

- FELDMAN H. A.
"Mathematical theory of complex ligand-binding systems at equilibrium: some methods for parameter fitting".
Anal Biochem. (1972), 48, 317-338.

- FICHTL B., KURZ H.
"Tissue binding of drugs: interrelations between drug binding in different tissues and dependence on lipid solubility".
Proc. 1st Eur. Cong. Biopharm. Pharmacokin. (1981), 2, 187-194.

- FLETCHER J.E., SPECTOR A.A.
"Alternative models for the analysis of drug-protein binding".
Mol. Pharmacol. (1976), 13, 387-399.

- FLODIN P.
"A methodological aspects of gel filtration with special reference to desalting operations".
J. Chromatogr. (1961), 5, 103-115.

- FORADADA A., RIERA P., MARTIN A., PLA J.M.
"Absorción intestinal "in situ" de medicamentos".
Ciencia Ind. Farm. (1974), 6, 300-316.

- FRERE J.M., GERDAY C.
"Les méthodes de purification et d'analyse des protéines".
Masson. París. (1981).

- FURCHGOTT R.F., BHADRAKOM S.
"Reactions of strips of rabbit aorta to epinephrine, isopropylarterenol, sodium nitrite and other drugs".
J. Pharmacol. Exp. Ther. (1953), 108, 129-143.

- FURCHGOTT R.F.
 "The pharmacology of vascular smooth muscle".
 Pharmacol. Rev. (1955), 7, 183-265.

- FURCHGOTT R.F., BURSZTYN P.
 "Comparison of dissociation constants and of relative
 efficacies of selected agonists acting on parasympathe-
 tic receptors".
 Ann. N.Y. Acad. Sci. (1967), 144, 882-898.

- GAITI A., DE MEDIO G.E., BRUNETTI M.
 "L'effeto della cinarina e dell'acido caffeico sulle
 reazioni di scambio delle basi azotate fosfolipidiche
 in microsomi epatici di ratto "in vitro".
 En "Nuovi studi sul carciofo". Minerva Medica. Turin
 (1976), 97-100.

- GAITI A., BRUNETTI M., DE MEDIO G.E.
 "Sintesi del colesterolo, lanosterolo e squalene da ace-
 tato marcato, ed effeto della cinarina e dell'acido ca-
 ffeico su tale processo nel fegato di ratto in vitro".
 Ibid. (1976), 161-166.

- GAZAVE J.M., ROGER C., ACHARD M., PARROT J.L.
 "Polyphénols et résistance capillaire".
 C.R. Ass. Gén. Groupe Polyphénols. (1974).

- GIBALDI M., BOYES R.N., FELDMAN S.
 "Influence of first-pass effect on availability of drugs
 on oral administration".
 J. Pharm. Sci. (1971), 60, 1338.

- GIBALDI M., PERRIER D.
 "Farmacocinética".
 Reverté. Barcelona. (1982).

- GILLETTE J.R.
 "Factors affecting drug metabolism".
 Ann. N.Y. Acad. Sci. (1971), 179, 43-66.

- GLASS A.D.M.
 "Influence of phenolic acids upon ion uptake. III. Inhibition of potassium absorption".
 J. Exp. Bot. (1974), 25, 1104-1113.

- GLADTKE E.
 "Ermittlung der absorptionsrate von sulfonamiden bei dyspepsien nach dem gesetz der korrespondierenden flächen".
 Mschr. Kinderheilk. (1964), 112, 84-86.

- GOLDSTEIN A.
 "The interaction of drugs and plasma proteins".
 Pharmacol. Rev. (1949), 1, 102-165.

- GOODMAN A., GOODMAN L.S., GILMAN A.
 "Las bases farmacológicas de la terapéutica".
 Panamericana. 6ª ed. México. (1981).

- GORACCI G., DE MEDIO G.E., BINAGLIA L., ROBERTI R., WOELK H.
 "Attività fosfolipasiche A1 ed A2 in microsomi e mitocondri epatici di ratto, e concentrazioni dei fosfolipidi: effetto della cinarina ed acido caffeico".
 En "Nuovi studi sul carciofo".
 Minerva Medica. Turín. (1976), 101-104.

- GOREWIT R.C.
 "Pituitary and thyroid hormone responses of heifers after ferulic acid administration".
 J. Dairy Sci. (1983), 66, 624-629.

- GOSSELIN R.E.
 "Drug-receptor inactivation: a new kinetic model".
 En "Kinetics of drug action" Ed. J. Van Rossum. Springer-Verlag. Berlin (1977), 323-356.

- GRAS J.
 "Proteínas plasmáticas".
 JIMS. 3ª ed. Barcelona. (1967).

- GREPPIN H., HORN R.
 "Action of (+)catechol on *Pseudomonas fluorescens*".
 Experientia. (1969), 25, 429-430.

- GUENTERT T.W., ØIE S.
 "Effect of plasma protein binding on quinidine kinetics in the rabbit".
 J. Pharmacol. Exp. Ther. (1980), 215, 165-171.

- GUPTA M.B., BHORLLA T.N., GUPTA G.P., MITRA C.R., BHARGAWA K.
 "Antiinflammatory activity of taxifolin".
 Jap. J. Pharmacol. (1971), 21, 377-382.

- GUPTA J.K., HAMP S.G., BUSWELL J.A., ERIKSSON K.E.
 "Metabolism of trans-ferulic acid by the white-rot fungus *Sporotrichum pulverulentum*".
 Arch. Microbiol. (1981), 128, 349-354.

- HARBORNE J.B.
 "Caffeic acid ester distribution in higher plants".
 Notizen. Z. Naturforsch. (1966), 21b, 604-605.

- HARBORNE J.B., MABRY T.J., MABRY H.
 "The flavonoids".
 Chapman & Hall. London. (1975).

- HARTMAN W.J., AKAWIE R.I., CLARK W.G.
"Competitive inhibition of 3,4-dihydroxy-phenyl-alanine (DOPA)decarboxylase in vitro".
J. Biol. Chem. (1955), 216, 507-529.

- HATHWAY D.E.
"Foreign compound metabolism in mammals".
Thanet Press. Margate (1975), 578-579.

- HAUGHEY D.B., LIMA J.J.
"Influence of concentration-dependent protein binding on serum concentrations and urinary excretion of disopyramide and its metabolite following oral administration".
Biopharm. Drug Dispos. (1983), 4, 103-112.

- HOLDER G.M., PLUMMER J.L., RYAN A.J.
"The metabolism and excretion of curcumin (1,7-bis-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-diene) in the rat".
Xenobiotica. (1978), 8, 761-768.

- HORMAN I., BRAMBILLA E.
"The alleged antithiamine activity of o-diphenols: an artefact of oxygen in the thiochrome method?".
Int. J. Vit. Nutr. Res. (1982), 52, 134-142.

- HORMAN I., BRAMBILLA E., STADLER R.
"Evidence against the reported antithiamine effect of caffeic acid and chlorogenic acids".
Int. J. Vit. Nutr. Res. (1981), 51, 385-390.

- HOSKINS J.A.
"The occurrence metabolism and toxicity of cinnamic acid and related compounds".
J. Appl. Toxicol. (1984), 4, 283-292.

- HUMMEL J.P., DREYER W.J.
"Measurement of protein-binding phenomena by gel filtration".
Biochim. Biophys. Acta (1962), 63, 530-532.

- JUNG H.G., FAHEY G.C.
"Effects of phenolic monomers on rat performance and metabolism".
J. Nutr. (1983), 113, 546-555.

- JUSKO W.J., GRETCH M.
"Plasma and tissue protein binding of drugs in pharmacokinetics".
Drug Metab. Rev. (1976), 5, 43-140.

- KATZ S., DENIS J.
"Structural transformations in serum albumin as demonstrated by urea-perturbation technique".
Biochem. Biophys. Res. Commun. (1967), 28, 711-717.

- KATZ S., DENIS J.
"Mechanisms of denaturation of bovine serum albumin by urea and urea-type agents".
Biochim. Biophys. Acta (1969), 188, 247-254.

- KITCHEN I.
"Textbook of "in vitro" practical pharmacology".
Blackwell Sci. Publ. Oxford. (1984).

- KLOTZ I.M., WALKER F.M., PIVAN R.B.
"The binding of organic ions by proteins".
J. Am. Chem. Soc. (1946), 68, 1486-1490.

- KLOTZ I.M., HUNSTON D.L.
"Protein affinities for small molecules: conceptions and misconceptions".
Arch. Biochem. Biophys. (1979), 183, 314-328.

- KOJIMA S., SMITH R.B., GROUTHAMEL W.G., DOLUISIO J.T.
"Drug absorption VI: Water flux and drug absorption in an in situ rat gut preparation".
J. Pharm. Sci. (1972), 61, 1061-1064.

- KOSHIHARA Y., NEICHI T., MUROTA S.I., LAO A.N., FUJIMOTO Y. TATSUNO T.
"Caffeic acid is a selective inhibitor for leukotriene biosynthesis".
Biochim. Biophys. Acta (1984), 729, 92-97.

- KRAGH-HANSEN U.
"Molecular aspects of ligand binding to serum albumin".
Pharmacol. Rev. (1981), 33, 17-53.

- KRÜGER-THIEMER E.
"Pharmacokinetics".
En "Kinetics of drug action". Ed. J. Van Rossum. Springer-Verlag. Berlin. (1977), 63-123.

- KUNIN C.M., CRAIG W.A., KORNGUTH M., MONSON R.
"Influence of binding on the pharmacologic activity of antibiotics".
Ann. N.Y. Acad. Sci. (1973), 226, 214-224.

- KURIKI Y., RACKER E.
"Inhibition of (Na⁺,K⁺)adenosine triphosphatase and its partial reactions by quercetin".
Biochemistry. (1976), 15, 4951-4956.

- KURZ H., TRUNK H., WEITZ B.
"Evaluation of methods to determine protein-binding of drugs".
Arzneim. Forsch. (1977), 27, 1373-1380.

- LA DU B.N., MANDEL H.G., WAY E.I.
"Fundamentals of drug metabolism and drug disposition".
The Williams & Wilkins Co. Baltimore. (1971), 54.

- LABAUNE J.P.
"Pharmacocinétique. Principes fondamentaux".
Masson. Paris (1984).

- LAGUNA J.C., ADZET T., CAMARASA J.
"Acción hepatoprotectora de derivados cafeilquínicos en
hepatocitos aislados de rata"
Rev. Farmacol. Clin. Exp. (1985), 2, 283.

- LALUEZA P., ADZET T., LAGUNA J.C., CAMARASA J.
"Acción de la cinarina y del ácido cafeico en hígado in-
toxicado de rata".
Rev. Farmacol. Clin. Exp. (1985), 2, 306.

- LAPARRA J.
"Sur quelques propriétés nouvelles des inhibiteurs de la
dopa-décarboxylase".
Thèse en Pharmacie. Bordeaux. (1967).

- LATTANZIO V., MORONE I.
"Variations of the orthodiphenol content of Cynara sco-
lymus L. during the plant growing seasons".
Experientia. (1979), 35, 993-994.

- LAVIE E., BLAUER G.
"Circular dichroism and hydrodynamic measurements of
ternary protein-two ligands systems: serum albumin-bili-
rubin-drug or alcohol".
Arch. Biochem. Biophys. (1979), 193, 191-203.

- LEDERER E.
"Chemistry and biochemistry of some mammalian secretions and excretions".
J. Chem. Soc. (1949), 2115-2125.

- LEVY G., NAGASHIMA R.
"Comparative pharmacokinetics of coumarin antocoagulants. VI. Effect of plasma protein binding on the distribution and elimination of bishydroxycoumarin by rats".
J. Pharm. Sci. (1969), 58, 1001-1004.

- LISEVITSKAYA L.I., SHINKARENKO A.L., BRANDYNKOVA V.A. MAKAROV V.A.
"Flavanol substances during experimental atherosclerosis".
Aktual. Vop. Farm. (1968), 176-177.

- LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L., RANDALL R.J.
"Protein measurement with the Folin phenol reagent".
J. Biol. Chem. (1951), 193, 265-275.

- MABRY T.J., MARKHAM K.R., THOMAS M.B.
"The systematic identification of flavonoids".
Springer-Verlag. New York. (1970).

- MACKAY D.
"A critical survey of receptor theories of drug action".
En "Kinetics of drug action". Ed. J. Van Rossum. Springer-Verlag. Berlin. (1977), 255-321.

- MACLOUF J., KINDAHL H., GRANSTROM E., SAMUELSSON B.
"Interactions of prostaglandin H₂ and tromboxane A₂ with human serum albumin".
Eur. J. Biochem. (1980), 109, 561-566.

- MAHLER H.R., CORDES E.H.
"Química biológica".
Omega. Barcelona. (1971).

- MAKAROV V.A.
"Spasmolytic and antitonic action of Prunus spinosa flavonoids".
Aktual. Vop. Farm. (1968), 8, 378-380.

- MANDEL H.G.
"Pathways of drug biotransformation: biochemical conjugations".
En "Fundamentals of drug metabolism and drug disposition".
Ed. B.N. La Du, H.G. Mandel, E.L. Way. The Williams & Wilkins Co. Baltimore. (1971), 149-186.

- MARKUS G., McCLINTOCK D.K.; CASTELLANI B.A.
"Ligand-stabilized conformations in serum albumin".
J. Biol. Chem. (1967), 242, 4402-4408.

- MAY Ph., SANDERS F.J., DONABEDIAN R.K.
"Binding of catechol derivatives to human serum proteins".
Experientia. (1974), 30, 304-305.

- MAZEL P.
"general principles and procedures for drug metabolism in vitro".
En "Fundamentals of drug metabolism and drug disposition".
Ed. B.N. La Du, H.G. Mandel, E.L. Way. The williams & Wilkins Co. Baltimore. (1971), 527-545.

- McMENAMY R.H.
"Binding studies by dialysis equilibrium. A description of an accurate and rapid technique".
Anal. Biochem. (1968), 23, 122-128.

- McQUEEN E.G., WARDELL W.M.
 "Drug displacement from protein binding. Isolation of a redistributional drug interaction in vivo".
 Br. J. Pharmacol. (1971), 43, 312-324.

- MEYER M.C., GUTTMAN D.E.
 "The binding of drugs to plasma proteins".
 J. Pharm. Sci. (1968), 57, 895-918.

- MIDDLETON E., DRZEWIECKI G.
 "Effects of flavonoids and transitional metal cations on antigen-induced histamine release from human basophils".
 Biochem. Pharmacol. (1982), 21, 377-382.

- MILLER G.L.
 "Protein determination for large numbers of samples".
 Anal. Chem. (1959), 31, 964.

- MOZZI R., GORACCI G., ARIENTI G.
 "L'effeto prodotto dalla cinarina e dall'acido caffeico sulle sintesi proteiche nel fegato di ratto "in vitro" ed "in vivo"".
 En "Nuovi studi sul carciofo". Minerva Medica. Turín.
 (1976), 97-100.

- NAGELS L., PARMENTIER F.
 "On the metabolism of cinnamic acid in *Cestrum poepigii*".
 Arch. Int. Physiol. Biochem. (1973), 81, 733-736.

- NAGELS L., Van DONGEN W., PARMENTIER F.
 "Cestric acid, a caffeic acid from *Cestrum enanthes*".
 Phytochemistry. (1982), 21, 743-746.

- NICHIFORESCO E.
 "Considérations sur la stabilité des dérivés o-dihidro-

xyphénoliques des feuilles d'artichaut (*Cynara scolymus* L.)".
Ann. Pharm. Fr. (1967), 25, 285-290.

- NICHIFORESCO E.

"Composition of cafeylquinic acid derivatives of artichoke (*Cynara scolymus*) leaves".

Pl. méd et phyt. (1970), 4, 56-62.

- NICHIFORESCO E., COUCOU V.

"Sur le dosage des o-dihydrophénols de type acide caféique présents dans les feuilles d'artichaut (*Cynara scolymus* L.)".

Ann. Pharm. Fr. (1965), 23, 419-427.

- NICKERSON M.

"Receptor occupancy and tissue response".

Nature. (1956), 178, 697-698.

- NIKAIDO T., OHMOTO T., SANKAWA U., HAMANAKA T., TOTSUKA K.

"Inhibition of cyclic AMP phosphodiesterase by flavonoids".

Pl. Med. (1982), 46, 162-166.

- NOGAMI H., HANANO M., WATANABE J.

"Studies on absorption and excretion of drugs. III. Kinetics of penetration of sulfonamides through the intestinal barrier in vitro".

Chem. Pharm. Bull. (1962), 10, 1161-1170. (a).

- NOGAMI H., MATSUZAWA T.

"Studies on absorption and excretion of drugs. II. Kinetics of penetration of basic drug, amynopirine, through the intestinal barrier in vitro".

Chem. Pharm. Bull. (1962), 10, 1055-1060. (b).

- NOHNO T.
"Selective inhibition of androgen action by ferulic acid in the rat prostate".
Kawasaki Med. J. (1979), 5, 143-150.

- NOHNO T., SAITO T., WATANABE S.
"Sedative action of chlorinated derivatives of cinnamic acid in the mouse".
J. Pharm. Pharmacol. (1981), 33, 483-484.

- OKAMOTO R., SAKAMOTO S., NOGUCHI K., KOBAYASHI Y., SUZUKI T., TORII Y.
"Effects of ferulic acid on FSH, LH and prolactin levels in serum and pituitary tissue of male rats".
Proc. Jap. Acad. (1976), 52, 264-267.

- OMURA T., SATO R.
"The carbon monoxide binding pigment of liver microsomes".
J. Biol. Chem. (1964), 239, 2370-2378.

- OPAVA S., MARTINEZ-MALDONADO M.
"Clearance methods in the rat".
En "Methods in Pharmacology". Ed. M. Martinez-Maldonado. Plenum - Press. New York. (1978), Vol. 4B, 23-40.

- PAKRASHI A., KABIR S.N.
"Effect of p-coumaric acid on testosterone and prolactin treated adult orchietomized rats".
Int. Res. Commun. Sys. (1979), 7, 173.

- PARKE T.V., DAVIS W.W.
"Use of apparent dissociation constants in qualitative organic analysis".
Anal. Chem. (1954), 26, 642-645.

- PATIL P.N., RUFFOLO R.R.
"Evaluation of adrenergic alpha- and beta-receptor activators and adrenergic alpha- and beta-receptor blocking agents".
En "Adrenergic activators and inhibitors". Ed. L. Szekeres. Springer-Verlag. New York. (1980), 89-134.

- PATON W.D.H.
"Analysis of the time course action of drugs on smooth muscle".
En "Methods in Pharmacology. Vol. 3 Smooth muscle". Ed. E. Daniel, D. Paton. Plenum-Press. New York. (1975), 507-515.

- PELZMANN K.S., HAVEMEYER R.N.
"Concurrent water and drug absorption in the rat intestine".
J. Pharm. Sci. (1972), 61, 110-113.

- PEPPERCORN M.A., GOLDMAN P.
"Caffeic acid metabolism by gnotobiotic rats and their intestinal bacterial".
Proc. Natl. Acad. Sci. (1972), 69, 413-415.

- PETRAKIS P.L., KALLIANOS A.G., WENDER S.H., SHETLAR M.R.
"Metabolic disposition of flavonoids".
Arch. Biochem. Biophys. (1959), 85, 264.

- PFIZER INVESTIGATOR'S BROCHURE
Prazosin therapeutics research division. (1970).

- PLA-DELFINA J.M., DEL POZO A.
"Manual de iniciación a la biofarmacia".
Romargraf. Barcelona. (1974).

- PREZIOSI P.
"Dal Cynara scolymus all'acido 1,4-dicaffeilchinico".
Il Farmaco (Ed. Sci). (1962), 17, 701-745.

- PROKOPENKO O.P., SPIRIDONOV V.N., LITVINENKO V.I., CHORNOBAI V.T., OBOLENTSEVA G.V., KHADZHAI Y.I., TATARKO Z.I.
"Phenol components of Helichrysum and their biological activity".
Farm. Zh. (Kiev). (1972), 27, 3-7.

- RANGANATHAN S., RAMASARMA T.
"Enzymatic formation of p-hydroxybenzoate from p-hydroxycinnamate".
Biochem. J. (1971), 122, 487-493.

- RANGANATHAN S., RAMASARMA T.
"The metabolism of phenolic acids in the rat".
Biochem. J. (1974), 140, 517-522.

- RAUEN H.M., SCHRIEWER H., TEGTBAUER U., LASANA J.E.
"Sylimarin verhin dertdie lipid peroxidation bei der CCl₄-leberschädigung".
Experientia. (1973), 29, 1372.

- RAY A., REYNOLDS J.A., POLET H., STEINHARDT J.
"Binding of large organic anions and neutral molecules by native bovine serum albumin".
Biochemistry. (1966), 5, 2606-2616.

- REMMER H., SCHENKMAN J., ESTABROOK R.W.
"Drug interaction with hepatic microsomal cytochrome".
Mol. Pharmacol. (1966), 2, 187-190.

- REVILLA M.
"Métodos de laboratorio para apreciar la biodisponibilidad de medicamentos. I. Técnicas in vitro".
Ciencia Ind. Farm. (1973), 5, 135-146.

- REVILLA M.
"Métodos de laboratorio para apreciar la biodisponibilidad de medicamentos. II. Métodos sobre órganos aislados".
Ciencia Ind. Farm. (1973), 5, 167-172.

- REVILLA M.
"Métodos de laboratorio para apreciar la biodisponibilidad de medicamentos. III. Técnicas in vivo".
Ciencia Ind. Farm. (1973), 5, 210-214.

- RIBEREAU-GAYON P.
"Les composés phénoliques des vegetaux".
Dunod. París. (1968).

- RIEGELMAN S.
"Clinical evaluation of the effect of formulation variables on therapeutic performance of drugs".
Drug Inform. Bull. (1969), 3, 59-67.

- RIGGS D.S.
"The mathematical approach to physiological problems".
Williams & Wilkins Co. Baltimore. (1963).

- ROBERTI R., BINAGLIA L., GIOVAGNOLI E., FRANCESCANGELI E. CALIGIANA P.
"Influenza della cinarina e dell'acido caffeico sul metabolismo fosfolipidico durante fegato grasso da etanolo".
En "Nuovi studi sul carciofo". Minerva Medica. Turín.
(1976), 153-156.

- ROCCI M.L., JUSKO W.J.
"Dose-dependent protein binding and disposition of prednisolone in rabbits".
J. Pharm. Sci. (1981), 70, 1201-1204.

- RODRIGUEZ FARRE E.
"Mecanismos fisicoquímicos que regulan la interacción de diversas aminas adrenérgicas con las proteínas plasmáticas. Consideraciones e importancia físico-farmacológica".
Tesis Doctoral. Barcelona. (1970).

- RODRIGUEZ FARRE E., COHEN Y.
"Estudio de la fijación de la tiramina a las proteínas plasmáticas".
Arch. Farmacol. Toxicol. (1978), IV, 15-17.

- DE ROPP R.S., KASTL L., FURST A.
"Biochemical and behavioral effects of some substituted catechols".
Arch. Int. Pharmacodyn. Ther. (1969), 181, 127-132.

- ROSSOTTI F.J.C., ROSSOTTI H.
"The determination of stability constants and other equilibrium constants in solution".
McGraw-Hill. New York. (1961).

- SABER M.A., STOCKBAUER P., MORAVEK L., MELOUN B.
"Disulfide bounds in human serum albumin".
Collect. Czech. Chem. Commun. (1977), 42, 564-579.

- SAIFER A., ELDER A., VECSLER F.
"Electrophoretic mobility-ionic strength studies of proteins. IV.
J. Biol. Chem. (1960), 235, 1346-1353.

- SAITO T., NOHNO T., YOSHIDA H., YOKOYA H.
"Trans-4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid (ferulic acid) inhibits the effect of androgens on the rat prostate".
Experientia (1979), 35, 696-699.

- SANDER J., MILLER D.D., PATIL P.N.
 "Alpha adrenergic and histaminergic effects of tolazoline-like imidazolines".
 J. Pharmacol. Exp. Ther. (1975), 195, 362-371.

- SCARPATI M.L., GUIISO M.
 "Structure of the three dicaffeoyl-quinic acids of coffee (isochlorogenic acid)".
 Tetr. Lett. (1964), 39, 2851-2853.

- SCATCHARD G.
 "The attraction of proteins for small molecules and ions".
 Ann. N.Y. Acad. Sci. (1949), 51, 660-672.

- SCHALLER K., HÖLLER H.
 "Thiamine absorption in the rat. IV. Effects of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid) upon absorption and active transport of thiamine".
 Int. J. Vit. Nutr. Res. (1976), 46, 143-148.

- SCHANKER L.S.
 "Passage of drugs across body membranes".
 Pharmacol. Rev. (1962), 14, 501-530.

- SCHANKER L.S.
 "Physiological transport of drugs".
 Advanc. Drug Res. (1964), 1, 71-106.

- SCHANKER L.S.
 "Drug absorption".
 En "Fundamentals of drug metabolism and drug disposition".
 Ed. B.N. La Du, H.G. Mandel, E.L. Way, The Williams & Wilkins Co. Baltimore (1971), 22-43.

- SCHANKER L.S., SHORE P.A., BRODIE B.B., HOGBEN C.A.M.
"Absorption of drugs from the stomach. I. The rat".
J. Pharmacol. Exp. Ther. (1957), 120, 528-539.

- SCHELINE R.R.
"The decarboxylation of some phenolic acids by the rat".
Acta Pharmacol. Toxicol. (1966), 24, 275-285 (a).

- SCHELINE R.R.
"Decarboxylation and demethylation of some phenolic benzoic acid derivatives by rat caecal contents".
J. Pharm. Pharmacol. (1966), 18, 664-669 (b).

- SCHELINE R.R.
"4-Methylcatechol, a metabolite of homoprotocatechuic acid".
Experientia (1967), 23, 493-494.

- SCHELINE R.R.
"Metabolism of phenolic acids by the rat intestinal microflora".
Acta Pharmacol. Toxicol. (1968), 26, 189-205.

- SCHILD H.O., ARUNLAKSHANA O.
"Some quantitative uses of drug antagonists".
Brit. J. Pharmacol. (1959), 14, 48-58.

- SCHLENDER B., KRÜGER-THIEMER E.
"Rechenautomaten und pharmakotherapie".
Pharmakotherapie (1965), 2, 3-12.

- SCHUHMANN G.
"Interrelaciones cinéticas entre distribución tisular de fármacos "in vivo" y de su unión a tejidos "in vitro".
Proc. 2nd Eur. Cong. Biopharm. Pharmacokin. (1984), 2, 414-423.

- STEPHENSON R.P.
"A modification of receptor theory".
Br. J. Pharmacol. (1956), 11, 379-393.

- STERN L.
"Drug interactions. Part II: drugs, the newborn infant, and the binding of bilirubin to albumin".
Pediatrics (1972), 49, 916-917.

- SWAMY V.C.
"Alpha-adrenergic blocking agents".
En "Screening methods in pharmacology. Vol. II". Ed. R.A. Turner, P. Hebborn. Academic Press. New York. (1971), 1-13.

- SZABO R., ANTAL A., REDUIK A., LIPTAK K., GYORI L., GABOR M., BENKO S.
"Lipid content of the aorta and changes in its internal membrane in rats on a flavone-free diet during atherogenesis".
Kiserl. Orvostnol. (1971), 23, 154-163.

- TALLARIDA R.J., JACOB L.S.
"Manual of pharmacologic calculations with computer programs",
Springer-Verlag. New York. (1981).

- TALLARIDA R.J., JACOB L.S.
"The dose-response relation in pharmacology".
Springer-Verlag. New York. (1979).

- TAYLOR P.J., CRUICKSHANK J.M.
"Distribution coefficients for atenolol and sotalol".
J. Pharm. Pharmacol. (1984), 36, 118-119.

- SEGELMAN A.B., SEGELMAN F.P., VARINA S.D., WAGNER H., SELIGMAN O.
 "Cannabis sativa L. (marijuana) IX: lens aldose reductase inhibitory activity of marijuana flavone C-glycosides".
 J. Pharm. Sci. (1977), 66, 1358-1359.

- SELLERS E.M., KOCH-WESER J.
 "Influence of intravenous injection rate on protein binding and vascular activity of diazoxide".
 Ann. N.Y. Acad. Sci. (1973), 226, 319-322.

- SHEYS E.M., GREEN R.D.
 "A quantitative study of alpha adrenergic receptors in the spleen and aorta of the rabbit".
 J. Pharmacol. Exp. Ther. (1972), 180, 317-325.

- SHINYAKINO G.P., MURZINA N.B.
 "Phenol compounds of some Sedum species of the soviet far east and effects of their leaf extracts on the lipid metabolism of rats".
 Rastit. resur. (1974), 10, 351-362.

- SIESS M.H., VERNEVAUT M.F.
 "The influence of food flavonoids on the activity of some hepatic microsomal monooxygenases in rats".
 Food Chem. Toxicol. (1982), 20, 883-886.

- SOLOMON H.M., SCHROGIE J.J., WILLIAMS D.
 "The displacement of phenylbutazone-14C and warfarin-14C from human albumin by various drugs and fatty acids".
 Biochem. Pharmacol. (1968), 17, 143-151.

- SPECTOR R., KORKIN D.T., LORENZO A.V.
 "Rapid method for the determination of salicylate binding by the use of ultrafilters".
 J. Pharm. Pharmacol. (1972), 24, 786-789.

- THEWLIS B.H.
"New synthetic antioxidants based on caffeic acid".
J. Food Technol. (1967), 2, 83-87.

- THOMSEN K.
"Lithium clearance: a new method for determining proximal and distal tubular reabsorption of sodium and water".
Nephron (1984), 37, 217-223.

- TILLEMENT J.P., ZINI R., D'ATHIS P., VASSENT G.
"Binding of certain acidic drugs to human albumin: theoretical and practical estimation of fundamental parameters".
Eur. J. Clin. Pharmacol. (1974), 7, 307-313.

- TILLEMENT J.P., ZINI R., MATTEI C., SINGLAS E.
"Effect of phenylbutazone on the binding of vitamin K antagonists to albumin".
Eur. J. Clin. Pharmacol. (1973), 6, 15-18.

- VAN DER BRINK F.G.
"General theory of drug-receptor interactions".
En "Kinetics of drug action ". Ed. J. Van Rossum. Springer-Verlag. Berlín. (1977), 169-254.

- VAN GINNEKEN C.A.
"Kinetics of drug-receptor interaction".
En "Kinetics of drug action". Ed. J. Van Rossum. Springer-Verlag. Berlín. (1977), 357-411.

- VERA N., RODRIGUEZ FARRE E., VALDECASAS F.G.
"Parámetros que condicionan la interacción noradrenalina-seroalbúmina".
Arch. Farmacol. Toxicol. (1977), 3, 72-74.

- WADA S., TOMIOKA S., MORIGUCHI I.
"Protein bindings. VI. Binding of phenol to bovine serum albumin".
Chem. Pharm. Bull. (Tokyo). (1969), 17, 320-323.
- WAGNER J.G.
"A new generalized nonlinear pharmacokinetic model and its implications".
En "Biopharmaceutics and relevant pharmacokinetics". Drug Intelligence Publ. Hamilton. (1971), 302-317.
- WAGNER J.G.
"Modern view of pharmacokinetics".
J. Pharmacokin. Biopharm. (1973), 1, 363-401.
- WAGNER J.G.
"Farmacocinética clínica".
Reverté. Barcelona. (1983).
- WAGNER J.G., NELSON E.
"Per cent absorbed time plots derived from blood level and/or urinary excretion data".
J. Pharm. Sci. (1963), 52, 610-611.
- WALKER C.
"Graphical procedure for the detection of deviations from the classical model of enzyme kinetics".
J. Biol. Chem. (1974), 249, 699-703.
- WANG D.I.C., SINSKEY A.J., SONOYAMA T.
"Recovery of biological material through ultrafiltration".
Biotechnol. Bioeng. (1969), 11, 987-1003.
- WATTENBERG L.W., LAM K.T.
"Inhibition of chemical carcinogenesis by phenols, coumarins, aromatic isothiocyanates flavones and indoles".

En "Inhibition of tumor induction and development". Ed. E. Zedeck. New York. (1981).

- WAUD D.R.

"Analysis of dose-response curves".

En "Methods in pharmacology. Vol. 3. Smooth muscle". Ed. E.E. Daniel, D.M. Paton. Plenum Press. New York. (1975), 471-506.

- WESTENDORF J., CZOK G.

"Die biliäre ausscheidung choleretisch aktiver zimtsäure derivate durch die ratte".

Z. Ernährungswiss. (1983), 22, 255-270.

- WINTERHOFF H., SOSA R., WYLDE R., WINTERNITZ F.

"Inhibition of gonadotrophins of different origin by whole plant extracts and some of their constituents".

Naunyn-Schmied. Arch. Pharmacol. (1981), 316, 48.

- WOO E., GREENBLATT D.J.

"Pharmacokinetic and clinical implications of quinidine protein binding".

J. Pharm. Sci. (1979), 68, 466-469.

- YACOBI A., LEVY G.

"Comparative pharmacokinetics of coumarin anticoagulants. XIV Relationship between protein binding, distribution and elimination kinetics of warfarin in rats".

J. Pharm. Sci. (1975), 64, 1660.

- YAMAOKA K., NAKAGAWA T., UNO T.

"Application of Aikake's information criterion (AIC) in the evaluation of linear pharmacokinetic equation".

J. Pharmacokin. Biopharm. (1978), 6, 547-558.

- ZIA H., COX R.H., LUZZI L.A.

"In vitro binding study of epinephrine and bovine serum albumin".

J. Pharm. Sci. (1971), 60, 89-92.