

CATEDRA DE FARMACOGNOSIA Y FARMACODINAMIA

FACULTAD DE FARMACIA

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

" UNION DE LA SILIMAPINA A LAS PROTEINAS PLASMATICAS "

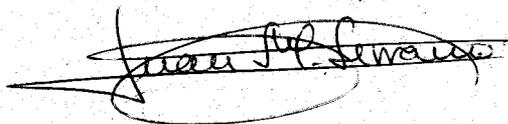
Trabajo para aspirar al grado
de licenciatura que presenta

M^a LOURDES DE LA PEÑA CARRETERO

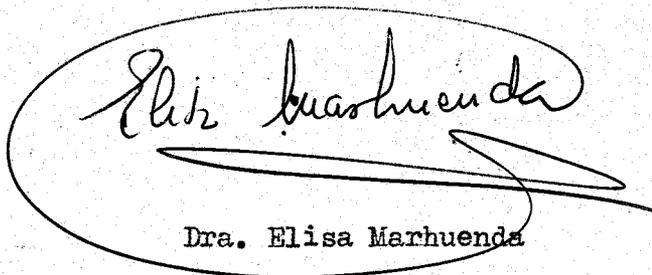
M^a Lourdes de la Peña

La realización material de este trabajo ha tenido lugar en el Departamento de FARMACOLOGÍA Y TOXICOLOGÍA de la FACULTAD DE VETERINARIA de la universidad de CORDOBA, bajo la dirección del Prof. Dr. Juan Manuel Serrano Caballero, y en el Departamento de FARMACOGNOSIA Y FARMACODINAMIA de la FACULTAD DE FARMACIA de la Universidad de SEVILLA, bajo la dirección de la Prof. Dra. Elisa Marhuenda Requena.

Los directores del trabajo:



Dr. Juan Manuel Serrano
Caballero



Dra. Elisa Marhuenda
Requena

Quiero expresar mi agradecimiento al Prof. Dr. Félix Infante Miranda, Catedrático de Farmacología, Terapéutica y Toxicología y Veterinaria Legal de la Facultad de Veterinaria de Córdoba, en cuyo Departamento hemos realizado la presente tesina, por habernos brindado su colaboración y por haber puesto a nuestra disposición todos los medios materiales y humanos que han hecho posible la realización de este trabajo.

A los profesores Dra. Elisa Marhuenda Requena del Departamento de Farmacognosia y Farmacodinamia de la Facultad de Farmacia de Sevilla y Dr. Juan Manuel Serrano Caballero del Departamento de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Veterinaria de Córdoba, directores de esta tesina.

A mis compañeros del Departamento y a todos los que de alguna forma han hecho posible la realización del trabajo.

A mis padres

INDICE

	<u>págs</u>
I. - <u>OBJETO</u>	1
II. - <u>PARTE TEORICA</u>	2
II. 1. - UNION DE FARMACOS A PROTEINAS PLASMATICAS	3
II. 1. 1. - <u>Fijación fármacos a las proteínas plas- máticas.</u>	3
II. 1. 2. - <u>Características de la albúmina.</u>	9
II. 1. 3. - <u>Estudio cuantitativo de la interacción fármaco-proteína.</u>	11
II. 2. - BREVE ESTUDIO MONOGRAFICO DE LA SILIMARINA	16
II. 2. 1. - <u>Química de la sili - marina.</u>	16
II. 2. 2. - <u>Acciones y efectos farmacológicos</u>	18
II. 2. 2. 1. - Acción de la silimarina a	18

nivel de las
membranas.

II. 2. 2. 2. - Acción de la 20
silimarina so-
bre el metabo-
lismo lipídico.

II. 2. 2. 3. - Acción de la 21
silimarina so-
bre el metabo-
lismo proteico.

II. 2. 2. 4. - Efecto de la si- 22
limarina en la
intoxicación por
CCl₄.

II. 2. 2. 5. - Efecto de la si- 25
limarina en la
intoxicación por
etanol.

II. 2. 2. 6. - Efecto de la si- 26
limarina en la
intoxicación con
etionina.

II. 2. 2. 7. - Efecto de la si- 27
limarina en la

	<u>págs</u>
intoxicación con tioaceta- mida.	
II. 2. 2. 8. - Efecto de la si- limarina en la intoxicación com galactosamina.	28
II. 2. 2. 9. - Efecto de la si- limarina en la intoxicación com principios de la "Amanita phaloi- des".	29
II. 2. 3. - <u>Toxicología de la silimarina.</u>	32
II. 2. 4. - <u>Farmacocinética de la sili- marina.</u>	32
<u>III. - P A R T E E X P E R I M E N T A L</u>	36
III. 1. - MATERIAL Y METODOS	37
III. 1. 1. - <u>Muestras.</u>	37
III. 1. 2. - <u>Métodos.</u>	38
III. 1. 2. 1. - Diálisis al	38

equilibrio.

III. 1. 2. 2. - Preparación de las bol- sas de diá- lisis.	39
III. 1. 2. 3. - Determinación de silimarina.	40
III. 1. 3. - <u>Resultados.</u>	42
III. 1. 3. 1. - Unión silima - rina-albúmina.	42
III. 1. 3. 2. - Discusión de re- sultados.	56
III. 1. 3. 3. - Unión silimari- na-suero humano.	57
III. 1. 3. 3. 1. - Suero humano di- luído.	57
III. 1. 3. 3. 2. - Suero humano sin diluir.	58

	<u>págs</u>
III. 1. 3. 3. 3. - Discusión de re- sultados.	68
IV. - <u>CONCLUSIONES</u>	70
V. - <u>BIBLIOGRAFIA</u>	72

I. - O B J E T O

La absorción de fármacos por el organismo, su distribución y almacenamiento así como la capacidad de atravesar las membranas y su excrección dependen fundamentalmente de su capacidad de unión a las proteínas plasmáticas, siendo la fracción albúmina, que constituye el 50 por ciento del total de las proteínas del plasma, la que contribuye especialmente en la fijación y transporte de fármacos.

Dada la aplicación terapéutica de la silymarina como antihepatotóxico y regenerador del tejido hepático y habiendo comprobado en bibliografía la ausencia de datos experimentales sobre la unión de dicho fármaco a las proteínas plasmáticas, hemos creído interesante iniciar este estudio con el fin de poder aportar algún nuevo dato sobre dicho proceso.

II. - PARTE TEORICA

II. - P A R T E T E O R I C A

II. 1. - UNION DE FARMACOS A LAS PROTEINAS PLASMATICAS

II. 1. 1. - Fijación de los fármacos a las proteínas plasmáticas

El proceso de fijación de los fármacos a las proteínas plasmáticas origina una mayor concentración de los mismos en la sangre que en el líquido extracelular.

Cuando se trata de fármacos poco solubles esta combinación con las proteínas los mantiene disueltos en el plasma sanguíneo. (1)

La duración de la acción de un fármaco se modifica por la fracción fijada a las proteínas plasmáticas debido a que dicha fracción (' complejo fármaco - proteína) se comporta como un órgano de depósito, es decir, como un reservorio del que el medicamento se libera para ejercer su acción y que se encuentra en equilibrio con la forma libre. (1)

A medida que la fracción no fijada es eliminada o metabolizada se van liberando cantidades adicionales de la fracción unida a las proteínas. (2)

El aumento de la fracción no unida a las proteínas plasmáticas origina una elevación de la concentración efectiva del producto activo y generalmente también el refuerzo de la acción farmacológica. Por el contrario, el aumento de la unión proteica de un fármaco A por la supresión de un producto B, transportado también por proteínas plasmáticas, ori-

gina un descenso de la concentración del producto activo y una disminución de la actividad. (3)

El complejo fármaco - proteína es incapaz de atravesar la membrana celular por lo que sólo la fracción libre puede difundir hacia los tejidos, aunque algunos fármacos con gran afinidad por los tejidos pueden ser eliminados del plasma con un único paso a través de dichos tejidos, tanto si están en forma libre como unida a las proteínas. Los fármacos con una elevada depuración hepática, pueden ser eliminados de la sangre en un solo paso a través del hígado, tanto si se encuentran unidos a las proteínas como si no lo están. Asimismo, en estos casos el metabolismo de los fármacos puede aumentar debido a que la unión a las proteínas plasmáticas origina un aumento de sus niveles en sangre, y como consecuencia, su aporte a los lugares de metabolización. (1)

Generalmente, la cantidad de cualquier fármaco presente en los tejidos donde actúa no es sino una parte muy pequeña del total del fármaco que hay en el organismo. La mayor parte se retiene en solución en los distintos compartimentos líquidos o bien se localiza mediante procesos de adsorción o partición en partículas subcelulares, superficies macromoleculares o bien en depósitos de grasa. (1)

El producto de interacción fármaco - proteína, como ocurre en la mayoría de los complejos, se disocia por dilución, con lo cual queda una mayor fracción de medicamento activo no unido. (4)

Debido a la fijación proteínica se favorece la absorción, disminuye la difusión y se prolonga la vida media del fármaco en la economía porque se retarda la eliminación, lo que prolonga el efecto farmacológico del mismo.

En la fijación reversible de un medicamento a las proteínas plasmáticas o tisulares, la manifestación más claramente objetivable es la variación experimentada por su concentración eficaz y su vida media biológica. Así Anton (5) y Kunin (6), estudiando la relación entre combinación de fármacos antiinfecciosos con albúmina y su eficacia terapéutica, concluyen que, agentes antibacterianos de igual potencial, cuando se ensayan "in vitro" en un medio libre de proteínas, pueden tener distinta efectividad clínica si sus afinidades por proteínas plasmáticas difieren de manera significativa.

La administración intravenosa de ciertos medicamentos ácidos se permite por la fijación proteica, que en caso contrario sería peligroso, siendo posible obtener concentraciones de medicamentos relativamente insolubles que de otro modo serían imposibles, ya que se favorece el gradiente de concentración para su absorción. (7)

Cuando el fármaco está ligado en una proporción grande, el desplazamiento de solamente una pequeña porción unida a las proteínas, puede aumentar de forma manifiesta su concentración libre en su punto de acción y por consiguiente incrementar su efecto terapéutico dando una toxicidad inesperada o aumentando su velocidad de metabolismo

o excrección. La capacidad de fijación de las proteínas no es ilimitada y cuando se saturan se origina un aumento brusco de la acción si se administra mayor cantidad de algunos fármacos.

La intensidad de la acción de un fármaco se modifica por la fijación a las proteínas plasmáticas, pues la fracción no unida es la única activa farmacológicamente y, por ello, la concentración total de fármaco en el plasma puede no tener mayor importancia, por lo que el nivel sanguíneo no puede servir como medida exacta de la concentración de producto activo en los lugares de acción a no ser que se considere este hecho y, en algunos casos, dicho coeficiente puede modificarse cuando se añade un segundo medicamento sin ser afectado el nivel sanguíneo. (8)

Dependiendo de la naturaleza del fármaco, el grado de fijación puede alcanzar niveles muy altos, bajos o prácticamente nulos (9). Asimismo depende de su capacidad intrínseca de fijación, y de su concentración en el plasma, no existiendo, por el contrario, prácticamente relación alguna entre estructura química y grado de intensidad de fijación a la albúmina ya que, indistintamente, lo presentan medicamentos aromáticos o heterocíclicos, aniones o cationes y aquellos que poseen grupos polares o neutros. Asimismo, aparece de igual forma en compuestos hidrosolubles y liposolubles pero, no obstante, la liposolubilidad favorece enormemente la fijación, la cual también puede aumentar si se sustituye en el compuesto orgánico un hidrógeno por un radical alquilo, arilo, o por un halógeno, etc. Sin embargo, la introducción de un grupo hidrófilo origina una disminución de

la fijación (10) . De igual manera debemos considerar que el fármaco puede tener carácter ácido o básico y que la albúmina tiene una elevada especificidad para los fármacos de carácter ácido y además los lugares de fijación son distintos para los ácidos que para las bases.

La unión fármaco - proteína, se postula que es semejante a la interacción fármaco - receptor, pues las proteínas pueden considerarse receptores silenciosos (11) . Este concepto fármaco - receptor fue introducido hace un siglo por Langley (1906)), aunque fue modificado por Ehrlich (1909) unos años más tarde.

McDougal (12) de acuerdo con Yu et al. (13) admite que en los medicamentos acídicos, como la aspirina, los lugares receptores provienen de funciones amino de grupos lisina de la albúmina ; sin embargo Swaney y Klotz (14) atribuyen a los enlaces hidrofóbicos, en los que estarían implicados los electrones "pi", o a un efecto entrópico, la naturaleza de la unión. Según estos autores la seroalbúmina posee una secuencia de péptidos formando una cavidad en cuyo fondo existe un residuo de triptófano; los bordes de esta cavidad presentan cargas positivas por lo que se adaptan a ella los fármacos electronegativos los cuales, posteriormente, formarían con el triptófano enlaces hidrofóbicos mediante fuerzas de Van der Waals.

La orientación y disposición de la nube electrónica inducida por la presencia de un sustituyente polar sobre grupos funcionales colindantes influye más en la interacción

medicamento - seroalbúmina que las estructuras o sustituyentes en una molécula dada. Así de otra forma sería más difícil comprender el hecho de que un simple cambio de posición de un grupo -- OH en carbonos contiguos (6 -5)) de moléculas de fármacos modifique altamente el porcentaje de unión a la seroalbúmina.

Según Karush (15)), la seroalbúmina presenta una adaptabilidad configuracional para una gran variedad de moléculas pequeñas, de tal modo que los puntos de unión se van formando o configurando durante el proceso de interacción con el fármaco.

La mayoría de los fármacos se fijan de forma reversible de tal manera que los enlaces físico - químicos responsables de esta unión son, en orden de intensidad, el covalente, iónico, puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals.

Uno cualquiera de los tres últimos tipos de enlace señalados sería suficiente, aisladamente, para la fijación del medicamento a la proteína; pero sin embargo, si un fármaco reacciona con la proteína en una serie de puntos a través de los enlaces mencionados anteriormente, la combinación de todos ellos, es la que, en general, establece la formación de un complejo fármaco - proteína reversible. (10)

II. 1. 2. - Características de la albúmina

Una proteína plasmática que ha sido muy bien estudiada con respecto a la unión con fármacos y que fácilmente puede obtenerse en forma pura es la albúmina.

El peso molecular de la albúmina humana es aproximadamente 69000, mientras que los valores para las albúminas bovina, equina y porcina son alrededor de 67000, 70000 y 72000, respectivamente. (16)

La molécula de albúmina es un elipsoide, cuyas dimensiones son 150 \AA por 38 \AA ; es una cadena polipeptídica simple con una estructura terciaria estabilizada por los enlaces disulfuro internos así como por los de hidrógeno. A pH fisiológico, su superficie posee numerosos grupos cargados responsables de su solubilidad en agua, a pesar de la alta proporción de grupos hidrofóbicos. Así presenta, 83 aniones carboxilato procedentes de los ácidos aspártico y glutámico, 83 átomos de nitrógeno protonados de lisina y arginina y 16 átomos de nitrógeno parcialmente protonados de histidina; además existen 49 grupos -OH de serina y treonina y 18 de tirosina, así como cuatro grupos sulfhidrilo de cisteína. Existen grandes "regiones hidrofóbicas" compuestas de cadenas laterales alifáticas y aromáticas procedentes de adenina, leucina, isoleucina, valina, prolina, metionina, fenilalanina y también tirosina. (17)

A valores de pH por debajo de 4 y por encima de 9, ocurren cambios de conformación en los que interviene la expansión molecular en la albúmina, lo que parece guardar re -

lación con su capacidad, única, de combinarse con iones, particularmente con aniones. (16)

El hígado es el lugar de formación de la mayoría de la albúmina a partir de las proteínas contenidas en la dieta alimenticia; por variación de la dieta y determinación de la cantidad de proteínas plasmáticas que han de descartarse para mantener el nivel basal, es posible estimar la eficacia de diversas dietas para la formación de proteínas del plasma. (18). Los bajos niveles de proteínas en plasma (hipoproteïnemia) vistos en casos de cirrosis hepática, aportan una prueba clínica de la importancia de este órgano en la formación de las proteínas plasmáticas.

Estos mismos autores, han mostrado que el cuerpo animal contiene reservas de proteínas que pueden ser utilizadas para la formación de proteínas del plasma, pero asimismo, las proteínas plasmáticas sirven para la formación y mantenimiento de proteínas de los tejidos, existiendo por tanto, un estado dinámico entre proteínas tisulares y proteínas del plasma. (18)

El 80 por ciento de la presión osmótica efectiva del plasma, es contribuido normalmente por la fracción albúmina; se ha mostrado que cada gramo de albúmina retiene alrededor de 18 ml de líquido en la corriente sanguínea debido a su efecto osmótico.

La albúmina, debido a su elevado peso molecular, no pasa a través del filtro renal a la orina a no ser que

éste se encuentre alterado profundamente. De acuerdo con esto, un medicamento que es eliminado esencialmente por filtración glomerular, tendrá una larga vida media biológica si está sometido al enlace proteínico. Se ha establecido una correlación entre el aclaramiento renal y el enlace proteínico para varios fármacos excretados por filtración glomerular casi exclusivamente. (6)

II. 1. 3. - Estudio cuantitativo de la interacción fármaco - proteína

Las concentraciones plasmáticas de un fármaco dependen de los procesos de absorción, distribución, biotransformación y eliminación. Podemos estudiar la cinética de un fármaco en órganos y sangre conjuntamente, pero el estudio de las medidas de distribución por órganos del fármaco que posee dificultad de medida en sangre debido a su fácil metabolismo, facilita su análisis cuantitativo. (19)

Si para cada molécula de proteína, un fármaco es capaz de combinarse con un cierto número de sitios "n" los cuales poseen la misma afinidad para el fármaco no existiendo efectos cooperativos sobre la afinidad, entonces la ley de acción de masas nos dá una ecuación descriptiva entre la unión y la concentración del fármaco libre en el equilibrio.

$$\frac{(PX)}{nP} = \frac{(X)}{K_d + (X)}$$

donde (X) = concentración de fármaco libre.

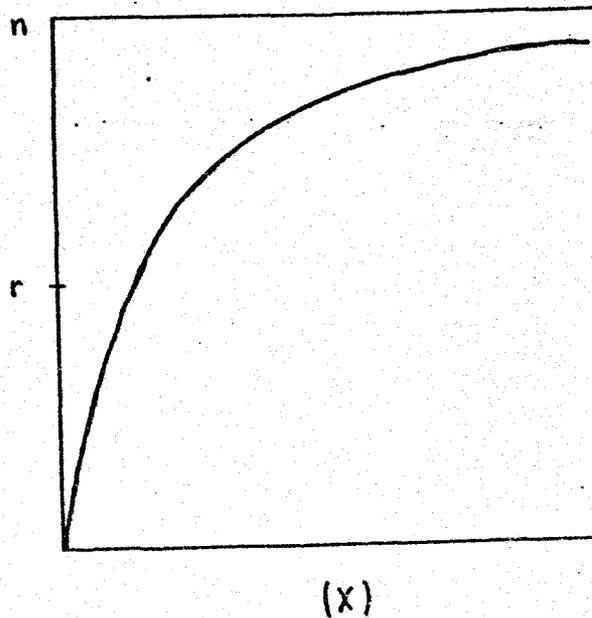
(PX) = concentración de complejo fármaco - proteína.

K_d = constante de disociación.

Si consideramos a "n" como los moles de fármaco unido por mol de proteína, o sea, la relación (PX)/P entonces tendremos la siguiente igualdad:

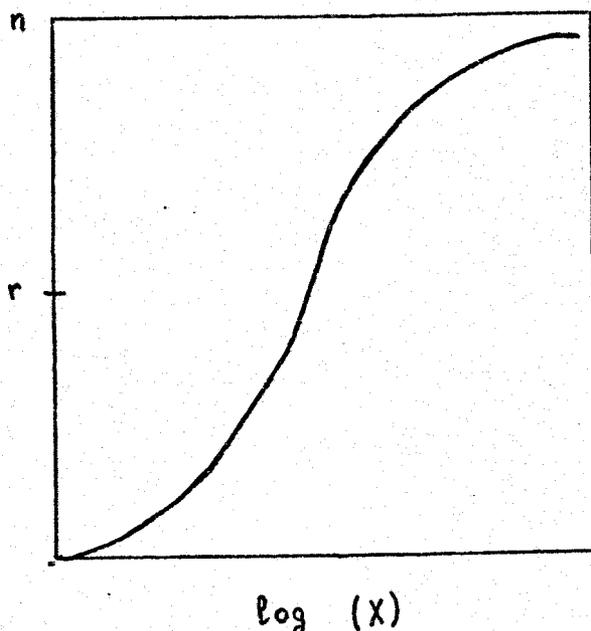
$$n = \frac{n(X)}{K_d + (X)}$$

Quando representamos en abscisas la concentración del fármaco libre y en ordenadas los moles de fármaco unido por mol de proteína, obtenemos una curva hiperbólica típica idéntica a la isoterma de adsorción de Langmuir como se aprecia en la figura:



Si en abscisas representamos el logaritmo de la concentración de fármaco y en ordenadas "n", resulta la curva característica logaritmo dosis-respuesta según ob-

servamos en la figura siguiente:



El valor de "n" puede estimarse por aproximación a un valor máximo siendo la posición de la curva en el eje horizontal la afinidad y el valor del logaritmo (X) a saturación media el logaritmo K. En el caso de que $n = 1$ esta curva es análoga a la obtenida con la ecuación de Henderson - Hanselbach.

Cuando existen múltiples lugares de unión ($n > 1$) con diferentes afinidades hacia el fármaco, la curva podría asumir una forma bastante compleja.

La ecuación de acción de masas puede reorganizarse de tal forma que se puedan obtener gráficas lineales con diferentes intercepciones y pendientes correspondientes a los parámetros de la ecuación.

Una transformación lineal muy útil es la siguiente :

$$K_d + r(X) = n(X)$$

$$\frac{r}{(X)} = \frac{-r}{K_d} + \frac{n}{K_d}$$

La representación $r / (X)$ contra r nos debe dar una línea recta con dos intercepciones, " n " en el eje X y n / K_d en el eje Y donde se obtiene " K " de esta manera.

Este tipo de gráficas poseen una característica útil y es que si hay distintos grupos específicos de lugares de unión con diferentes afinidades pueden distinguirse dos o más segmentos lineales. (20)

La fracción unida (θ) varía con la concentración de proteína, la constante de afinidad y el máximo de sitios de unión.

Por definición :

$$\theta = \frac{(PX)}{(PX) + (X)} = \frac{1}{1 + (X) / (PX)}$$

Según la ecuación anterior

$$\frac{(X)}{(PX)} = \frac{K_d + (X)}{n P}$$

Por tanto

$$p = \frac{1}{1 + K_d / nP + (X) / nP}$$

Esta ecuación nos indica que para una concentración dada de proteínas y para un número dado de sitios de unión por molécula de proteína, si la afinidad de la unión es muy alta, o sea, " K " muy baja y la concentración de proteínas muy baja, prácticamente (p) se aproxima a la unidad si el fármaco presente estuviese prácticamente unido.

Cuando se reduce el número total de lugares de unión una mayor fracción del total del fármaco tenderá a liberarse.

A medida que se reduce progresivamente la concentración del fármaco (por los mecanismos de eliminación del organismo)) la fracción unida tiende a aumentar aunque el grado de aumento puede ser muy pequeño ya que algunos fármacos poseen una afinidad demasiado baja para unirse de manera importante aún a pequeñas concentraciones.

En los casos en que la fracción unida aumenta a estas concentraciones bajas, siempre se aproxima a un máximo de la fracción unida. Si la afinidad es lo suficientemente alta, o si suceden ambas cosas, el máximo de la fracción unida puede acercarse a la unidad, o sea, que prácticamente todo el fármaco estará unido.

II. 2. - BREVE ESTUDIO MONOGRAFICO DE LA SILIMARINA

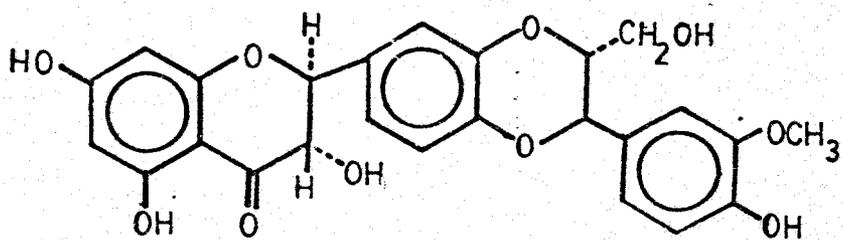
II. 2. 1. - Química de la silimarina

La silimarina comprende un grupo de sustancias de naturaleza flavonoide que se encuentran en el *Silybum marianum* Gaertner perteneciente a la Familia de las Compuestas . (21)

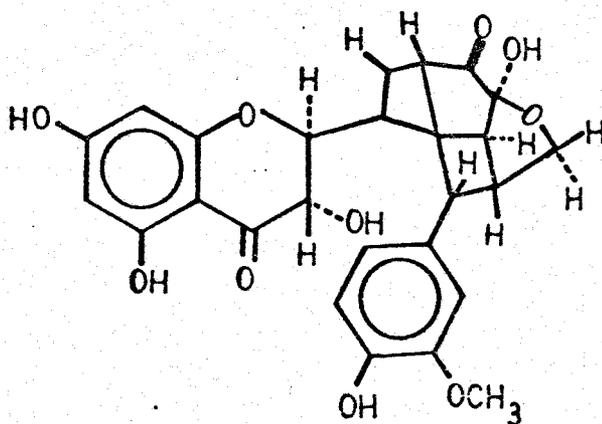
Janiak y Hansel (22) en 1968 propusieron una estructura química a la que denominaron "silibina" y que en general fue aceptada. Más tarde se aislaron otras dos sustancias, la silidianina y silicristina cuyo peso molecular es el mismo que el de la silibina y los tres compuestos isómeros constituyen el grupo conocido como silimarina. (figura 1)

El estudio de la estructura de estas sustancias fue completado por Wagner et al. (23) utilizando la descomposición y espectroscopía U.V., I.R. y resonancia magnética nuclear; la dosificación colorimétrica del producto obtenido por adición de la 2,4 dinitrofenilhidrazina en solución alcalina fue realizada por Wagner et al. en otro trabajo posterior. (24)

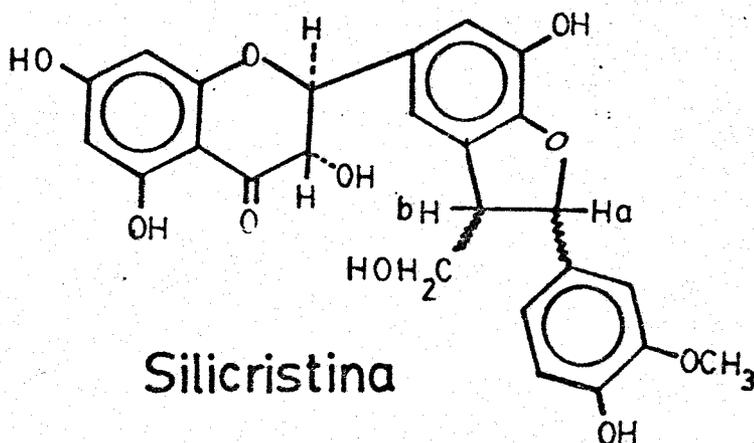
Estructuralmente la silimarina puede considerarse un flavonoide derivado de la condensación del polihidroxí-2-fenilcromanona con alcohol coniferílico y que puede denominarse 7 cromanolol-3'-metil taxifolina. Su fórmula estructural es :



Silibina

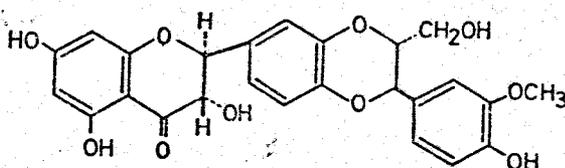


Silidianina



Silicristina

Figura 1. - Fórmulas estructurales de los tres isómeros que componen la silimarina



La silimarina es una sustancia pulverulenta con un punto de fusión comprendido entre 167 y 180° C ; insoluble en agua pero muy soluble en disolventes orgánicos. Cuando se disuelve en metanol posee un máximo de absorción en el espectro ultravioleta próximo, concretamente entre 288 y 322 nm de longitud de onda. Las características colorimétricas y cromatográficas son en general, las de una sustancia con estructura flavónica. (25)

II. 2. 2. - Acciones y efectos farmacológicos

III. 2. 2. 1. - Acción de la silimarina a nivel de las membranas

Este tipo de interacción de la silimarina con las membranas ha sido estudiada por diversos autores siendo quizás su función más importante.

Ramellini y Meldolesi (26) en una experiencia muy interesante, observaron que la silimarina actúa estabilizando la membrana e impidiendo la acción del detergente desoxicolato sódico; este tipo de detergente actúa lisando la célula hepática y es capaz de solubilizar la membrana de diversos tipos de células comprendidas en el hígado.

En definitiva, la silimarina actúa así a nivel de la biomembrana, obstaculizando la acción hepatotóxica de varios tóxicos y agentes patógenos permitiendo el funcionamiento normal del proceso enzimático de la célula y favoreciendo la reparación y reestructuración de la zona lesionada.

En unos estudios posteriores los mismos autores (27) indican que cuando las células se suspenden en soluciones de sacarosa cuya hipotonicidad aumenta, éstas resisten grados de hipotonía, al ser tratadas previamente con silimarina, mientras que las células no tratadas si son lisadas.

Los estudios farmacológicos en animales han puesto en evidencia el papel estabilizador de la silimarina sobre las funciones de las estructuras celulares y sobre las biomembranas. Asimismo ejerce una acción protectora y reparadora específica del hepatocito. (28). Según estos mismos autores, la alteración de la permeabilidad membranaria, que es uno de los primeros signos de insuficiencia hepatocitaria, resulta de la actividad de la adenilciclasa, enzima intramembranaria que origina un aumento de la concentración del $3'5'AMP_c$ intrahepatocitario. Esta ruptura del equilibrio bioquímico produce una estimulación de la fosforilasa hepática, una modificación de la concentración iónica celular, así como un aumento de la permeabilidad de la membrana hacia el agua.

Las primeras estructuras subcelulares destruidas son los lisosomas de los cuales difunden hacia el espacio intracelular numerosos enzimas proteolíticos que originan una desintegración profunda de las mitocondrias y microsomas. Por

ello se comprende el valor de todo medicamento protector de la membrana de la célula hepática, es decir, aquella sustancia capaz de oponerse a las modificaciones de la permeabilidad del hepatocito. (28)

La silimarina es posible que actúe estabilizando la membrana de los mastocitos, evitando la salida de las aminas; así ninguno de los efectos reconocidos clásicamente en el caso de la rata, imputables a las sustancias aminoliberadoras que lesionan los mastocitos, se encuentran cuando se realiza un pretratamiento con silimarina. (29)

Asimismo la silimarina "in vitro" se opone al poder histamino-liberador del 48 / 80 y este efecto protector se le ha adjudicado a una disminución de la permeabilidad celular que impediría la citólisis.

III. 2. 2. 2. - Acción de la silimarina sobre el metabolismo lipídico

La silimarina a nivel de las membranas, parece ser que inhibe la síntesis y catabolismo de la lecitina y la fosfatidiletanolamina lo cual indica una modificación del ciclo de las membranas, además de una alteración en el metabolismo proteico, con lo que contribuye de esta manera a diversos mecanismos para la estabilización de las mismas. (30)

El estudio del efecto de la silibina sobre el metabolismo lipídico lo estudia Schriewer (31), adminis -

trando ácido acético marcado (C^{14}) por diversas vías, observando el aumento de la radiactividad producido en las diversas fracciones lipídicas, aunque este aumento puede ser mayor o menor según sea la vía de administración, intravenosa o intraperitoneal y según sea el tiempo transcurrido.

En una publicación similar, Schriewer y su colaborador Rauert (32) pudieron detectar radiactividad específica, más marcada en los grupos tratados con silimarina que en los controles, en lípidos totales y en las fracciones de triglicéridos, fosfolípidos totales y fosfatidilcolina, así como una menor radiactividad específica en el colesterol libre hepático.

II. 2. 2. 3. - Acción de la silimarina sobre el metabolismo proteico

Schriewer y Rauert (33), a nivel enzimático, ponen de manifiesto que la silimarina no altera el metabolismo de la ciclofosfamida, y por ello se supone que no actúa sobre los sistemas enzimáticos encargados del metabolismo de sustancias extrañas al organismo, o sea, no es activo como inductor enzimático.

De igual forma, Down et al (34) indican que la silibina no ejerce acción general sobre los enzimas microsomales ya que no modifica el paso del hígado, no altera la vida media plasmática de la antipirina, ni actúa sobre el citocromo P-450, ni altera las actividades de la N-demetilasa, oxidasa y glucuroniltransferasa, apareciendo solamente

un aumento de la actividad de la O - demetilasa.

A nivel de los ácidos nucleicos, la silibina produce un aumento significativo de la síntesis del ARN en células hepáticas " in vivo " e " in vitro " y de los núcleos " in vitro " debido a que se incorpora con gran rapidez al interior del hepatocito, encontrándose una cierta cantidad de ella y sus metabolitos en los núcleos. (35))

III. 2. 2. 4. - Efecto de la silimarina en la intoxicación por CCl_4

Hahn et al (36) afirman que el tóxico hepático por excelencia es el CCl_4 y en casi todos los casos en que se estudia el hígado es una de las sustancias empleadas debido a que produce unas alteraciones fisiopatológicas así como lesiones anatomopatológicas que están estudiadas perfectamente. Por ello se ha usado en ensayos donde se ha demostrado el papel hepatoprotector de la silimarina, así como de sus componentes, sobre todo la silibina.

La lesión hepática con CCl_4 reduce ligeramente la actividad diaminoxidasa del órgano, siendo este fenómeno especialmente significativo en animales pretratados con histamina exógena. La terapéutica profiláctica con silimarina no impide este efecto del tóxico; el CCl_4 induce una ligera reducción de la actividad enzimática que no impide el tratamiento previo con silimarina, con lo cual se confirma que el efecto hepatoprotector lo ejerce la silimarina sobre estructuras microsómicas fundamentalmente. (37))

Estos mismos autores indicaron que la administración de un barbitúrico después del CCl_4 origina una considerable prolongación del sueño del barbitúrico; tres grupos de animales se sometieron a una lesión hepática con CCl_4 , estudiando la duración del sueño por hexobarbital (75 mg / Kg i.p.). Uno de los grupos recibió silimarina desde cuatro días antes del tóxico y los otros dos grupos sirvieron de control: uno como testigo y el otro como control del fármaco. (38)

La duración del sueño en los dos grupos de control fue similar y en los animales lesionados fue de un 40 por ciento superior al de los testigos. En cambio, en los animales protegidos con silimarina y lesionados con CCl_4 sólo llegó a un 50 por ciento del valor del grupo testigo.

Aznar López et al (39) indican que la perfusión continua de pentagastrina va seguida de un descenso constante y progresivo del pH gástrico que guarda una relación dosis-efecto. Cuando se intoxican los animales previamente con CCl_4 , la acción excitosecretora de la pentagastrina se ve potenciada significativamente.

El tratamiento previo con silimarina no sólo impide este descenso del pH sino que reduce también el efecto de la pentagastrina, puesto que el descenso del pH es menos acusado que el aparecido en los animales testigos. (39)

En las ratas lesionadas con CCl_4 se observa una disminución de la peroxidación de los lípidos microsoma-

les. (40)

Schriewer et al. (41) estudiaron la evolución en el tiempo de las actividades de la GOT, GPT y GLDH tras la administración de silimarina por vía intraperitoneal, confirmando su acción antihepatotóxica.

Asimismo tienden a ser normalizadas en las ratas las alteraciones producidas por el CCl_4 como son el incremento de la concentración de las fracciones de ácidos grasos libres, triglicéridos, isolecitina, fosfolípidos, ésteres del colesterol. (41))

Janiak et al. (42) observaron que la silimarina actúa produciendo una inhibición reversible de las actividades de los enzimas microsomales ya que sobre el modelo de lesión hepática producida por el CCl_4 impide la actividad de la demetilasa en la rata así como la reducción de la tasa de enzimas metabolizantes en el ratón.

Williams y Priestly (43) observan que, cuando administran silimarina como profilaxis antes de provocar la lesión con CCl_4 , ésta no contrarresta el incremento de la bilirrubina total, GPT, triglicéridos, ni el incremento de la peroxidasa lipídica. Asimismo tampoco contrarresta la disminución de la actividad metabolizante de fármacos con los citocromos P-450 y b-5, aunque eso sí, aprecian una cierta tendencia protectora en algunos casos aunque no la estiman significativa.

Tras la lesión con CCl_4 y administrando silimarina, se produce un notable aumento de la síntesis del ADN en los animales intoxicados y tratados, lo cual se observa mediante la determinación de timidina marcada con C^{14} que se administra previamente. (44)

III. 2. 2. 5. - Efecto de la silimarina en la intoxicación por etanol

Tras la administración durante 14 días de etanol al 16 por ciento se observa un descenso en la cantidad de albúmina y fibrinógeno en la sangre junto a un aumento de la fracción beta globulínica.

Sin embargo esto no ocurre al administrar silimarina, con lo cual se mejora el rendimiento metabólico de la célula hepática en los animales intoxicados con etanol y tratados con silimarina. (45)

Para Brown (46) e Isselbacker (47) la intoxicación etílica produce una infiltración grasa similar a la producida en el alcoholismo crónico.

La intoxicación alcohólica aguda, al igual que la crónica, causa en las ratas, un sorprendente aumento de la actividad de la enzima gamma-aminolevulínico sintetasa y también una elevación notable de la actividad de otras enzimas microsomales. (48) . Este mismo autor observa que en ratas tratadas con una dosis de etanol de 5 ó 7 g / Kg de peso y mantenidas en ayunas un determinado tiempo, se pro -

duce una acumulación en el hígado de lípidos totales con aumento del nivel de triglicéridos. Cuando las ratas reciben la misma dosis de alcohol y además, una inyección de silimarina (100 mg / Kg de peso vivo) las alteraciones lipídicas hepáticas inducidas por el alcohol son de bastante menor intensidad.

II. 2. 2. 6. - Efecto de la silimarina en la intoxicación con etionina

García Pravía et al (49)) observaron que la etionina es capaz de producir hígado graso, inhibir las actividades fosforilásica y triptófanopirrolásica, bloquear la síntesis proteica así como causar un notable descenso de los niveles de glucógeno y ATP hepáticos.

Estos mismos autores estudiaron diversos cortes de hígado de ratas tratadas con silimarina más etionina, en los que el consumo de oxígeno es casi normal mientras que en ratas tratadas sólo con etionina la actividad respiratoria se muestra inhibida fuertemente.

El hecho de que la etionina bloquee la síntesis proteica, quizás a través de la formación de algún complejo de adenosil-etionina podría servir de base del mecanismo responsable de la potente inhibición de la actividad respiratoria. (49))

En los animales tratados con etionina más silimarina las actividades enzimáticas mitocondriales no di-

fieren muy significativamente de los que poseen los controles, lo que hace pensar que la silimarina interfiere en los mecanismos de acción de la etionina, evitando o disminuyendo el alcance de las lesiones hepáticas producidas por la etionina. (50)

III. 2. 2. 7. - Efecto de la silimarina en la intoxicación con tioacetamida

La actividad antihepatotóxica de la silimarina es excelente en la intoxicación por tioacetamida donde la estructura subcelular suministra alteraciones superponibles a las que caracteriza la cirrosis humana. (51)

Hahn et al (36) indican que la tioacetamida es también un tóxico de elección para producir alteraciones hepáticas, similares a la cirrosis, en la que estos autores indican el efecto protector de la silimarina.

La silimarina presenta una acción significativa antihepatotóxica mediante la determinación de actividades enzimáticas, cuando se provoca una alteración hepática por administración de una dosis única de tioacetamida. (52))

Rauen et al (53)) en unos estudios realizados demostraron que la tioacetamida reduce la proporción molar fosfatidilcolina/fosfatidiletanolamina sobre los microsomas de rata indicando que esta acción no parece ser provocada por la S-adenosil-metionina-fosfatidiletanolamina-metil-

transferasa. En las ratas intoxicadas con tioacetamida la mayor acumulación de metil-S-adenosilmetionina marcada (metil C^{14}), "in vitro", a la fracción microsomal de fosfatidilcolina, indica una compensación de la reducción de la neosíntesis de fosfatidilcolina por una mayor metilación de la fosfatidiletanolamina.

En cambio, cuando se tratan "in vivo" con silimarina los animales, bajo la forma de N-metilglucamina disuelta en polivinilpirrolidona (PVP) al 4 por ciento y a la dosis de 400 mg / Kg de peso vivo, manifiestan una mayor metilación de la fosfatidiletanolamina en comparación con los controles, lo cual ocurre además "in vitro". Parece que el factor limitante de la velocidad de metilación de la fosfatidiletanolamina es la síntesis de S-adenosil-metionina en lugar de la actividad de la S-adenosil-metionina-fosfatidiletanolamina metil-transferasa microsomal. (53))

II. 2. 2. 8. - Efecto de la silimarina en la intoxicación con galactosamina

Meyer - Burg (54)) indica que la silimarina posee un efecto beneficioso al administrarse por vía intraperitoneal disuelta en propilenglicol, tanto desde el punto de vista curativo como profiláctico. Sin embargo, postula que este efecto se debe al solvente y no a la propia silimarina.

Asímismo, la acción antihepatotóxica de la

silimarina se pone en evidencia cuando se administra parenteralmente en la hepatopatía por D-galactosamina, en la que se origina una normalización de las actividades de las enzimas GOT, GPT y LDH. (55))

II. 2. 2. 9. - Efecto de la silimarina en la intoxicación con principios de la "Amanita phalloides"

Según Schriewer y Rauen (56)) cuando se administra silimarina como medicamento profiláctico se previene la alteración de ciertas fracciones fosfolipídicas incrementadas por acción de la faloidina en el hígado y suero de ratas intoxicadas, así como algunas actividades enzimáticas alteradas.

La actividad antihepatotóxica de la silimarina en el modelo experimental de intoxicación por faloidina y alfa amanitina se mantiene debido a la existencia en la molécula del ciclo de la gamma-pirona. La silibina antagonizó totalmente la intoxicación por la alfa amanitina "in vivo" conociéndose que la alfa amanitina inhibe la actividad polimerásica y reduce la síntesis de proteínas. (57))

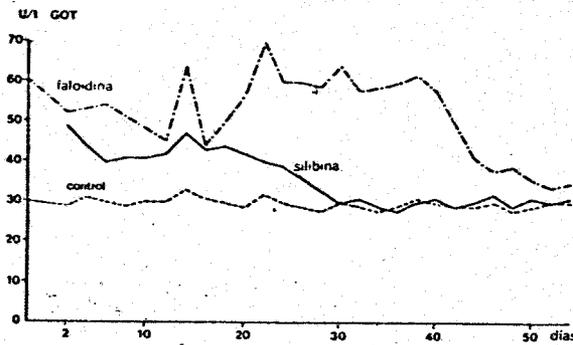
Frimmer y Kroker (58) indican que la silibina así como la disilibina, inhiben los efectos primarios de la faloidina, sólo si se encuentran en el receptor antes que la toxina o al mismo tiempo. Para una inhibición total de la acción de la faloidina se necesita una concentración muy gran-

de de silibina. La disilibina es mucho más eficaz que el monómero y si la faloidina está unida a los receptores, no hay ningún agente protector capaz de eliminar la toxina de las células envenenadas. Los enlaces de la silibina y la disilibina parecen ser más débiles ya que, después de la incubación de hígados con silibina, puede eliminarse la mayor parte de la potencia protectora del medio de perfusión cambiando dicho medio. (58)

El examen microscópico del hígado de ratas que murieron 1-3 horas después de inyectar faloidina puso de manifiesto una vacuolización citoplasmática de los hepatocitos, dilatación de los sinusoides y una importante pérdida de glucógeno. Los núcleos celulares eran normales y en algunos lugares aparecían espacios vasculares dilatados que formaban grandes lagos de sangre, comprimiendo los hepatocitos circundantes, muchos de los cuales contenían glóbulos rojos en el citoplasma. La estructura del hígado de los animales tratados previamente con silimarina era casi normal del todo y al igual que con la faloidina, la silimarina evitó totalmente la letalidad producida por la alfa amanitina. (59)

Braatz et al (60), determinaron el grado de intoxicación por faloidina midiendo la actividad de la LDH, GOT, GPT y GLDH en suero. El nivel de estas enzimas en ratones tratados con silibina se normaliza aproximadamente a partir del día 30 desde la última intoxicación con faloidina mientras que en los ratones tratados solamente con faloidina necesitan unos 50 días desde la última intoxicación para normalizar sus niveles enzimáticos.

La evolución de la actividad de la GOT se observa en la figura siguiente:



El nivel de las enzimas de ambos grupos desciende durante los 10 primeros días siguientes a la interrupción de la aplicación de faloidina. Sorprendentemente, alcanzan una mayor cima a los 14 días aproximadamente y los niveles de enzimas de los ratones tratados con silibina siguen descendiendo, mientras que en los animales tratados sólo con faloidina aparecen nuevas cimas cada 6-7 días hasta el día 40. (60)

Según Desplaces y Choppin (61) el estudio histoquímico e histoenzimológico muestra que, de igual manera que tras la intoxicación de ratones con faloidina, la silimarina inhibe la acción del tóxico y regulariza las funciones del hepatocito cuando se administra, ya sea 60 minutos antes ó 10 minutos después de la intoxicación.

II. 2. 3. - Toxicología de la silimarina

En los mamíferos la tolerancia de la silimarina es buena y así la DL - 50 en ratones y ratas es de 400 mg / Kg de peso vivo por vía endovenosa; sin embargo dependiendo de la especie pueden ser letales dosis de 100 a 200 mg / Kg de peso vivo. (62)

En ratones y ratas estos mismos autores han estudiado la DL - 50 administrando por vía intravenosa dihemisuccinato sódico de silimarina siendo los valores obtenidos, dados en mg / Kg de peso vivo, los siguientes:

ratón hembra	-----	1050
ratón macho	-----	910
rata hembra	-----	825
rata macho	-----	920

En el caso del perro una dosis de 142 mg / Kg de peso vivo administrada intravenosamente puede ocasionar su muerte debido a una bradicardia e hipotensión que puede prevenirse administrando 4,5 mg / Kg de peso vivo de atropina. (63))

II. 2. 4. - Farmacocinética de la silimarina

El estudio de la cinética de la silimarina ha sido realizado por diversos autores, como Meyer - Burg (64), Mennicke (65), Büllers et al. (66) y Braatz (67).

La absorción y excrección de la silimarina fue estudiada por Meyer - Burg (64) con resultados inciertos.

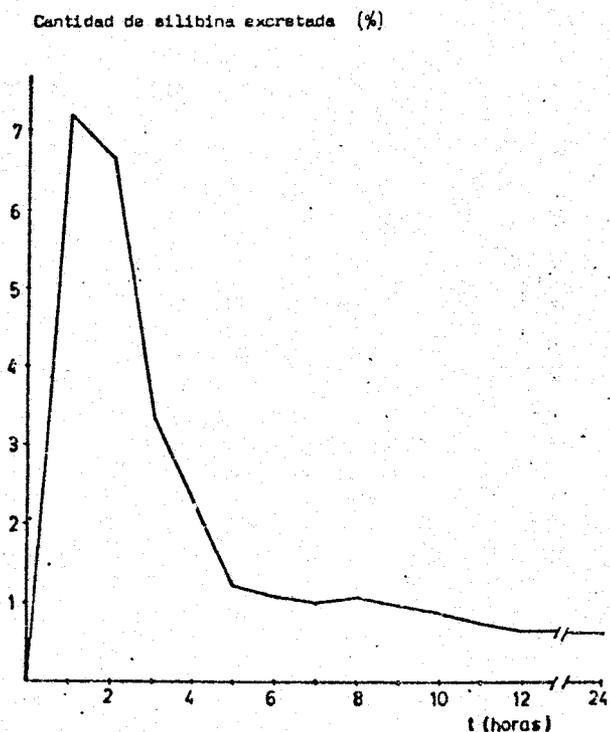
Trabajó suministrando fuertes dosis de silimarina a ratones y, empleando el método colorimétrico de Wagner et al (24)), investiga la presencia del fármaco en suero, plasma, orina, homogeneizado hepático y heces, encontrando una gran cantidad de silimarina en estas últimas, concretamente en una proporción aproximada del 73 por ciento, por lo que postula la existencia de un ciclo enterohepático.

Mennicke (65)), administrando a ratas diemisuccinato sódico por vía intravenosa, observa que éste no se encuentra disociado en el plasma, pero sí en la bilis, ya que además de este producto se encuentra silibina libre y otros metabolitos; asimismo en la orina también aparecen aunque en menor proporción.

Cuando administran la sal de N-metilglucamina de silibina se observa que la mayor parte del producto eliminado por bilis se encuentra en forma de metabolitos y que la eliminación se produce en forma de sulfato y glucurónido conjugados, como se produce en la mayoría de las sustancias de estructura fenólica, ya que, al tratar estos metabolitos con anilsulfatasa y beta glucuronidasa, se obtiene silibina y en menor proporción otro producto identificado como dehidrosilibina.

Mediante una serie de estudios realizados en el Huntingdon Research Centre se comprobó que cuando se administra el producto por vía oral, el tiempo de excrección máxima es de una hora aproximadamente como podemos observar en la figura . Esto nos indica una absorción muy rápida del

producto ya que la concentración máxima en el plasma, se alcanzó a las 0,5 horas, tras la administración oral a ratas, momento en el que se tomó la primera muestra de sangre, observándose que, a partir de aquí, se producía un descenso continuo de las concentraciones.



Coincidiendo con los resultados de Mennicke (65) Bulles et al (66) ponen de manifiesto que, después de administrar por vía oral o intravenosa el fármaco, la mayor parte del mismo se elimina por la bilis en forma de metabolitos, los cuales al tratarlos con arilsulfatasa y beta glucuronidasa nos dan silibina y dehidrosilibina, además de producto sin biotransformar. Asimismo en la orina también se elimina una pequeña proporción, pero de silibina sin conjugar, libre.

Finalmente Braatz (67) observa que, cuando se administra silibina por vía intravenosa a ratas, se elimina por la bilis, en las primeras 24 horas alrededor del 80 por ciento

en forma de sulfato y glucurónido y en la circulación ente -
rohepática está incluida una proporción del 10 por ciento a-
proximadamente. La eliminación biliar máxima ocurre una hora
después de la administración oral y aproximadamente el 8 por
ciento se elimina sin modificar en la orina al cabo de 48 ho-
ras.

La silimarina se distribuye por el organis -
mo y se acumula, sobre todo, en el hígado y riñones sin que
se encuentre prácticamente en otros órganos.

En el hombre la eliminación del producto por
la orina es escasa y ha podido recogerse solamente el 6-7 por
ciento de la silibina administrada en las 24 horas siguientes
siendo su tiempo de vida media de aproximadamente 6 horas.

(67)

III. - PARTE EXPERIMENTAL

III. - P A R T E E X P E R I M E N T A L

III. 1. - MATERIAL Y METODOS

III. 1. 1. - Muestras

- Silimarina valorada como silibina con el 72 por ciento de riqueza por C.H. BOEHRINGER SOHN INGELHEIM S.A.E. La solución madre de silimarina se preparó a una concentración 10^{-2} M en etanol, dado que el fármaco es prácticamente insoluble en agua.

- Albúmina humana (BEHRINGWERKE AG Mar - gurg Lahn). La solución de albúmina la preparamos disolviendo 0,1725 g en 50 ml de un buffer fosfatos de sodio a pH 7,25 con lo que la concentración final era $5 \cdot 10^{-5}$ M.

- Suero humano procedente de una mezcla de sueros de donantes con una concentración de proteínas de 6,90 g en 100 ml.

- Buffer fosfatos de sodio 0,05 M a un pH de 7,25.

- Bolsas de diálisis (Visking dialysis tubing tipo 8 / 32 de Serva).

III. 1. 2. - Métodos

III. 1. 2. 1. - Diálisis al equilibrio

La diálisis al equilibrio ha sido el método utilizado por nosotros y consiste en colocar a ambos lados de una membrana permeable dos soluciones distintas y no recambiables entre las cuales difunden las moléculas pequeñas que pueden atravesar los poros.

Las soluciones de silimarina a dializar las preparábamos a partir de la solución madre de silimarina cuya concentración era 10^{-2} M y de la cual obteníamos unas soluciones hijas en etanol a unas concentraciones de $1 \cdot 10^{-3}$ M, $2 \cdot 10^{-3}$ M, $4 \cdot 10^{-3}$ M, $8 \cdot 10^{-3}$ M, $12 \cdot 10^{-3}$ M, $16 \cdot 10^{-3}$ M y por último $20 \cdot 10^{-3}$ M.

Tomamos 0,1 ml de cada una de estas soluciones y lo colocábamos en tubos de ensayo, dejándolos así durante 48 horas para que se evaporase el etanol. Una vez transcurrido este tiempo añadíamos 0,5 ml de una solución de carbonato de sodio conteniendo 11,5 g por litro del mismo y llevábamos a 10 ml con buffer fosfatos en el caso de las series de calibración, obteniéndose así unas concentraciones de $5 \cdot 10^{-6}$ M, $10 \cdot 10^{-6}$ M, $20 \cdot 10^{-6}$ M, $40 \cdot 10^{-6}$ M, $60 \cdot 10^{-6}$ M, $80 \cdot 10^{-6}$ M y $100 \cdot 10^{-6}$ M. En el resto de las series poníamos las mismas cantidades de silimarina pero llevábamos hasta 9 ml con buffer, de modo que tras colocar en los tubos las bolsas de diálisis, las concentraciones finales obtenidas, en el caso de que no hubiese unión de la silimarina a las bolsas de diálisis, ni a las proteínas, fuese la

misma que la de la serie de calibración.

En el caso de los blancos, los preparábamos de igual manera, pero sin poner silimarina, tanto para las series de calibración como para las de referencia, albúmina y suero respectivamente.

III. 1. 2. 2. - Preparación de las bolsas de diálisis

Las bolsas de diálisis, se preparaban hinchándolas durante 30 minutos cada vez, primero en una mezcla que contenía cuatro partes de una solución de bicarbonato sódico al uno por mil y una parte de etanol. Posteriormente, tres veces más en una mezcla de agua destilada : etanol (4:1). Por último en agua destilada, manteniéndose en refrigerador hasta su utilización.

Estas bolsas de diálisis las llenábamos con su contenido respectivo 48 horas antes de comenzar la diálisis y hasta entonces las manteníamos a 4° C en buffer fosfatos para eliminar así la presencia de sustancias contaminantes que interfieren en la lectura espectrofotométrica.

En las series de referencia las concentraciones de silimarina mencionadas anteriormente, las enfrenábamos a bolsas de diálisis conteniendo 1 ml de buffer en su interior. Con estos resultados calculábamos los porcentajes de recuperación de la silimarina y por consiguiente su unión a las bolsas.

Mediante las series de albúmina, en las cuales dializábamos las soluciones de silimarina frente a 1 ml de solución de albúmina $50 \cdot 10^{-6}$ M, calculábamos los puntos de unión de la silimarina a dicha proteína así como las constantes de afinidad.

De igual manera realizábamos las series de suero, pero colocando 1 ml de suero humano en el interior de la bolsa deduciendo de los datos obtenidos la proporción de silimarina unida a las proteínas.

Las series las repetíamos tres, cuatro o cinco veces para que los resultados fuesen más fiables.

Durante 20 a 22 horas manteníamos el proceso de diálisis a temperatura ambiente para asegurarnos que se alcanzaba el equilibrio. Evans et al. (68) señalan que al cabo de 18 horas se establece el equilibrio si dializan 5 ml frente a 10 ml, por lo que consideramos suficiente el tiempo empleado por nosotros, aunque, sea menor la superficie de la membrana de diálisis.

III. 1. 2. 3. - Determinación de la silimarina

Una vez establecido el equilibrio, la determinación de silimarina la realizamos espectrofotométricamente utilizando un Perkin-Elmer modelo 55B con accesorio de U.V. Seguimos el método descrito por Serrano en 1982, para cuyo desarrollo se va a basar precisamente en el carácter dé-

bilmente ácido de la silimarina, debido a la presencia del oxidrilo fenólico, y por consiguiente su capacidad para formar sales con los álcalis. En solución alcalina este producto presenta un máximo de absorción a los 320 nm, aunque también aparecen otros a los 248 y 208 nm que son desechados por Serrano (69) porque, en primer lugar, no están comprendidos en el margen señalado por Cavallini y Lucchetti (25)) y, en segundo lugar, porque conforme más nos alejamos en el espectro U.V. más interferencias pueden aparecer con otras sustancias; y si estamos próximos a los 200 nm, hemos de trabajar en atmósfera inerte, además de que entre 215 y 220 nm absorbe fuertemente el enlace peptídico por lo que representaría un grave problema al trabajar con suero y solución de albúmina.

Este mismo autor, utilizando la longitud de onda más próxima a la porción visible del espectro, o sea 320 nm, determina la absorptividad molar de la silimarina la cual es algo más baja que la que posee en solución metanólica a 290 nm, pero suficientemente alta. Esta absorptividad molar es superior a $2 \cdot 10^4$.

Una vez transcurridas las 20 a 22 horas de diálisis, y teniendo en cuenta lo que anteriormente habíamos citado, efectuábamos la lectura a 320 nm, diluyendo la silimarina existente en la solución externa de la bolsa a un medio, así como la de la serie de calibración. Las soluciones internas de las bolsas de diálisis, tanto las de las series de referencia como las de albúmina y suero, las leíamos diluyendo cinco veces en carbonato de so -

dio 0,1 M. Para ello mediante una jeringa de insulina tomábamos 0,5 ml del interior de la bolsa, los diluíamos con carbonato de sodio 0,1 M cinco veces después de lo cual agitamos en la cubeta y procedíamos a la lectura espectrofotométrica.

III. 1. 3. - Resultados

III. 1. 3. 1. - Unión silimarina-albúmina

Los valores medios de absorbancia obtenidos por nosotros tanto en las soluciones tamponadas externas a las bolsas de diálisis como en las soluciones de albúmina situadas en el interior de las mismas, aparecen en la Tabla I en la que indicamos además los productos de dichas absorbancias por los títulos de dilucción.

A partir de estos últimos valores, y utilizando la ecuación de regresión obtenida con las series de calibración y cuya expresión es : concentración = Absorbancia \cdot 39,6856 + 1,3458 , calculamos las concentraciones de silimarina en los buffer externos y en la solución de albúmina del interior de las bolsas de diálisis que aparecen en la Tabla II, junto con las concentraciones de silimarina unida a las proteínas; ya que la concentración en el interior de las bolsas equivale a la fracción total (en forma libre y conjugada) y la concentración en los buffer externos equivale a la fracción libre, siendo la fracción conjugada la diferencia entre ambas.

TABLA IA. - Valores medios de absorbancia medidos a 320 nm de los buffer externos así como del interior de las bolsas de diálisis correspondientes a las series de albúmina.

Concentración inicial	Absorbancias					\bar{x}	
5.10^{-6} M	dentro	0,116	0,116	0,107	0,113	0,117	0,113
	fuera	0,053	0,063	0,049	0,044	0,043	0,050
10.10^{-6} M	dentro	0,145	0,150	0,181	0,165	0,159	0,160
	fuera	0,081	0,084	0,073	0,080	0,085	0,081
20.10^{-6} M	dentro	0,317	0,290	0,305	0,301	0,299	0,302
	fuera	0,166	0,170	0,181	0,164	0,179	0,172
40.10^{-6} M	dentro	0,521	0,512	0,519	0,522	0,523	0,519
	fuera	0,381	0,386	0,375	0,382	0,376	0,380
60.10^{-6} M	dentro	0,762	0,707	0,636	0,690	0,691	0,697
	fuera	0,590	0,577	0,596	0,589	0,593	0,589
80.10^{-6} M	dentro	0,918	0,920	1,015	0,932	0,934	0,944
	fuera	0,760	0,766	0,758	0,761	0,759	0,761
100.10^{-6} M	dentro	1,158	1,115	1,116	1,117	1,123	1,126
	fuera	1,006	0,948	0,995	1,007	1,008	0,993

TABLA IB. - Valores de los productos de las absorbancias citadas en la Tabla anterior por sus correspondientes títulos de dilucción que son cinco en el caso del interior de las bolsas y dos en el exterior de las mismas.

Concentración inicial	Absorbancias					\bar{x}	
	dentro	fuera	dentro	fuera	dentro		
$5 \cdot 10^{-6} \text{ M}$	dentro	0,580	0,580	0,535	0,565	0,585	0,565
	fuera	0,106	0,126	0,098	0,088	0,086	0,100
$10 \cdot 10^{-6} \text{ M}$	dentro	0,725	0,750	0,905	0,825	0,795	0,800
	fuera	0,162	0,168	0,146	0,160	0,170	0,162
$20 \cdot 10^{-6} \text{ M}$	dentro	1,585	1,450	1,525	1,505	1,495	1,510
	fuera	0,332	0,340	0,362	0,328	0,358	0,344
$40 \cdot 10^{-6} \text{ M}$	dentro	2,605	2,560	2,595	2,610	2,615	2,595
	fuera	0,762	0,772	0,750	0,764	0,752	0,760
$60 \cdot 10^{-6} \text{ M}$	dentro	3,810	3,535	3,180	3,450	3,455	3,485
	fuera	1,180	1,154	1,190	1,178	1,186	1,178
$80 \cdot 10^{-6} \text{ M}$	dentro	4,590	4,600	5,075	4,660	4,670	4,720
	fuera	1,520	1,532	1,516	1,522	1,518	1,522
$100 \cdot 10^{-6} \text{ M}$	dentro	5,790	5,575	5,580	5,585	5,615	5,630
	fuera	2,012	1,896	1,990	2,014	2,016	1,986

TABLA II . - Concentraciones de silimanina libres, totales y unidas correspondientes a las series de albúmina.

Concentración inicial	Concentración libre	Concentración total	Concentración unida
5.10^{-6} M	$5,314.10^{-6} \text{ M}$	$23,768.10^{-6} \text{ M}$	$18,454.10^{-6} \text{ M}$
10.10^{-6} M	$7,775.10^{-6} \text{ M}$	$33,094.10^{-6} \text{ M}$	$25,319.10^{-6} \text{ M}$
20.10^{-6} M	$14,998.10^{-6} \text{ M}$	$61,271.10^{-6} \text{ M}$	$46,273.10^{-6} \text{ M}$
40.10^{-6} M	$31,507.10^{-6} \text{ M}$	$104,330.10^{-6} \text{ M}$	$72,823.10^{-6} \text{ M}$
60.10^{-6} M	$48,095.10^{-6} \text{ M}$	$139,650.10^{-6} \text{ M}$	$91,555.10^{-6} \text{ M}$
80.10^{-6} M	$61,747.10^{-6} \text{ M}$	$188,662.10^{-6} \text{ M}$	$126,915.10^{-6} \text{ M}$
100.10^{-6} M	$80,161.10^{-6} \text{ M}$	$224,776.10^{-6} \text{ M}$	$144,615.10^{-6} \text{ M}$

Cuando relacionamos la fracción unida con la fracción total y multiplicamos este producto por cien, obtenemos los porcentajes de unión de la silimarina a la albúmina cuando ésta se encuentra a una concentración igual a $5 \cdot 10^{-5}$ M. Estos valores que aparecen en la Tabla III nos muestran como los porcentajes de unión van disminuyendo conforme van aumentando las concentraciones de silimarina.

TABLA III . - Porcentajes de unión de la silimarina a la albúmina.

Concentración inicial	Porcentajes de unión
$5 \cdot 10^{-6}$ M	77,64 %
$10 \cdot 10^{-6}$ M	76,51 %
$20 \cdot 10^{-6}$ M	75,52 %
$40 \cdot 10^{-6}$ M	69,80 %
$60 \cdot 10^{-6}$ M	65,56 %
$80 \cdot 10^{-6}$ M	67,27 %
$100 \cdot 10^{-6}$ M	64,34 %
	<hr/> $\bar{x} = 70,95 \%$

La razón entre las concentraciones molares de silimarina unida a proteínas y a la albúmina (r) se puede relacionar con las concentraciones libres de silimarina mediante la expresión :

$$r = \frac{nK}{1/S + K}$$

basada en la ley de acción de masas y en la que "n" es el número total de puntos de unión por molécula de proteína ; "K" es la constante de asociación del complejo silimarina - albúmina y "S" es la concentración molar de silimarina.

Esta expresión puede transformarse en otras cuya representación es una línea recta facilitándose así los cálculos correspondientes.

Uno de los procedimientos de linearización es la transformación doble-recíproca que consiste en invertir la expresión anterior, por lo que la ecuación quedará:

$$\frac{1}{r} = \frac{1}{nK} \cdot \frac{1}{S} + \frac{1}{n}$$

Aplicando esta ecuación a nuestros datos, que aparecen en la Tabla IV, observamos que el ajuste a la línea recta es óptimo como lo demuestran unos valores del coeficiente de correlación y la "F" de Snedecor" de 0,9989 y de 2335,9246 respectivamente, que presentan unos niveles de significación superiores al 99,9 por ciento ($p < 0,001$) en ambos casos.

La constante de afinidad obtenida por este procedimiento nos da un valor de 16370,9976 y con 4,57 puntos de unión por molécula. La representación gráfica de los valores de la Tabla IV así como la recta de regresión obtenida para ellos aparecen en la figura 2.

Otro procedimiento de linearización se obtiene multiplicando la ecuación doble-recíproca por la concentración libre de silimarina, con lo que su expresión queda de la siguiente manera :

$$\frac{S}{x} = \frac{1}{nK} + \frac{S}{n}$$

Cuando aplicamos esta expresión a los datos que aparecen en la Tabla V observamos que, al igual que en el caso anterior, el ajuste a la línea recta es óptimo como lo demuestran unos valores del coeficiente de correlación y de la "F de Snedecor" de 0,9515 y 47,8601 respectivamente, que presentan también unos niveles de significación superiores al 99,9 por ciento ($p < 0,001$).

Mediante este tipo de representación el valor de "K" es algo inferior al del procedimiento anterior, concretamente 12739,4722 y el número de puntos de unión, con un valor de 5,48, es superior. La representación gráfica de los valores de la Tabla V aparecen en este caso en la figura 3, junto con su recta de regresión.

El tercer procedimiento de linearización utilizado por nosotros, tal vez el más empleado por los dis -

tintos autores, es el de Scatchard, que consiste en dividir la ecuación general que se basa en la ley de acción de masas por la concentración de silimarina y reordenar. Dicha ecuación es la siguiente :

$$\frac{r}{S} = nK - rK$$

En este caso al aplicar esta expresión a los datos de la Tabla VI obtenemos un valor de correlación de - 0,9328 y un valor de "F de Snedecor" de 33,4952 que a diferencia de los procedimientos de linealización anteriores sólo presentan unos niveles de significación superiores al 99 por ciento ($p < 0,01$) los cuales nos indican que también el ajuste de los datos a la línea recta es muy bueno, aunque algo inferior al de los otros procedimientos.

Los valores de "K" y "n" en este caso, son de 13307,4477 y 5,34 respectivamente. La representación gráfica de estos valores aparece en la figura 4 así como la recta de regresión obtenida a partir de ellos.

TABLA IV . - Valores de $1/A$ y $1/r$ para la silimarina a 320 nm

Concentración inicial	$1/A$	$1/r$
$5 \cdot 10^{-6}$ M	188182,1603	2,70944
$10 \cdot 10^{-6}$ M	128617,3633	1,97480
$20 \cdot 10^{-6}$ M	66675,5567	1,08054
$40 \cdot 10^{-6}$ M	31738,9786	0,68660
$60 \cdot 10^{-6}$ M	20792,1821	0,54612
$80 \cdot 10^{-6}$ M	16195,1188	0,39396
$100 \cdot 10^{-6}$ M	12474,8943	0,34574

$r = 0,998931475$
 $a = 1,3356755 \cdot 10^{-5}$
 $b = 0,218663415$
 $-b/a = -K_a = -16370,9976$
 $F = 2335,924604$
 $n = 4,573239$
 $K_a = 16370,9976$

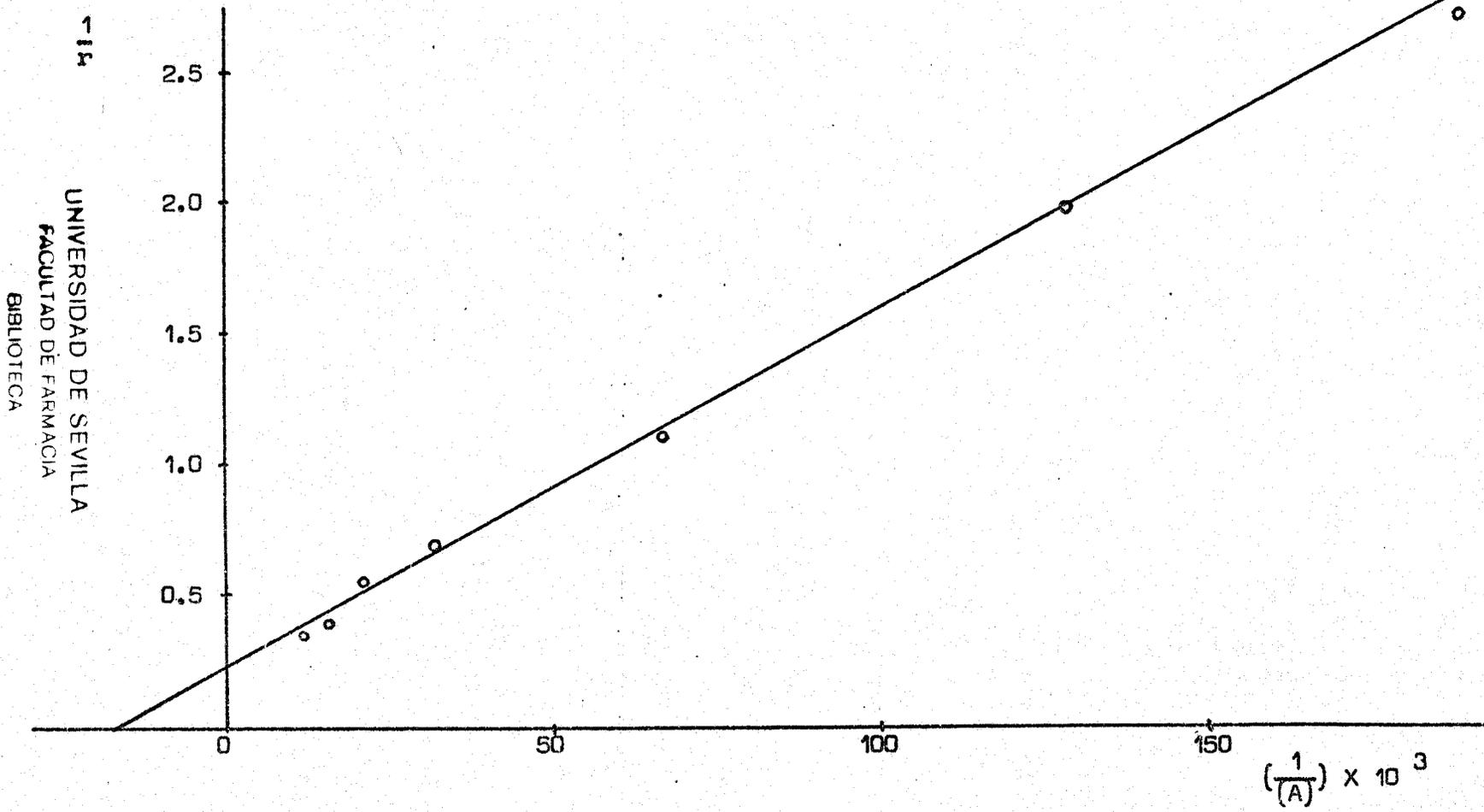


TABLA V . -- Valores de A y A/r para la silimarina a 320 nm.

Concentración inicial	A	A/r
$5 \cdot 10^{-6} \text{ M}$	$5,314 \cdot 10^{-6} \text{ M}$	$1,4398 \cdot 10^{-5}$
$10 \cdot 10^{-6} \text{ M}$	$7,775 \cdot 10^{-6} \text{ M}$	$1,5354 \cdot 10^{-5}$
$20 \cdot 10^{-6} \text{ M}$	$14,998 \cdot 10^{-6} \text{ M}$	$1,6206 \cdot 10^{-5}$
$40 \cdot 10^{-6} \text{ M}$	$31,507 \cdot 10^{-6} \text{ M}$	$2,1633 \cdot 10^{-5}$
$60 \cdot 10^{-6} \text{ M}$	$48,095 \cdot 10^{-6} \text{ M}$	$2,6266 \cdot 10^{-5}$
$80 \cdot 10^{-6} \text{ M}$	$61,747 \cdot 10^{-6} \text{ M}$	$2,4326 \cdot 10^{-5}$
$100 \cdot 10^{-6} \text{ M}$	$80,161 \cdot 10^{-6} \text{ M}$	$2,7715 \cdot 10^{-5}$

$r = 0,951530708$
 $a = 0,18258468$
 $b = 1,4332201 \cdot 10^{-5}$
 $-b/a = -7,8496187 \cdot 10^{-5}$
 $F = 47,8601$
 $n = 5,47691$
 $K_a = -12739,4722$

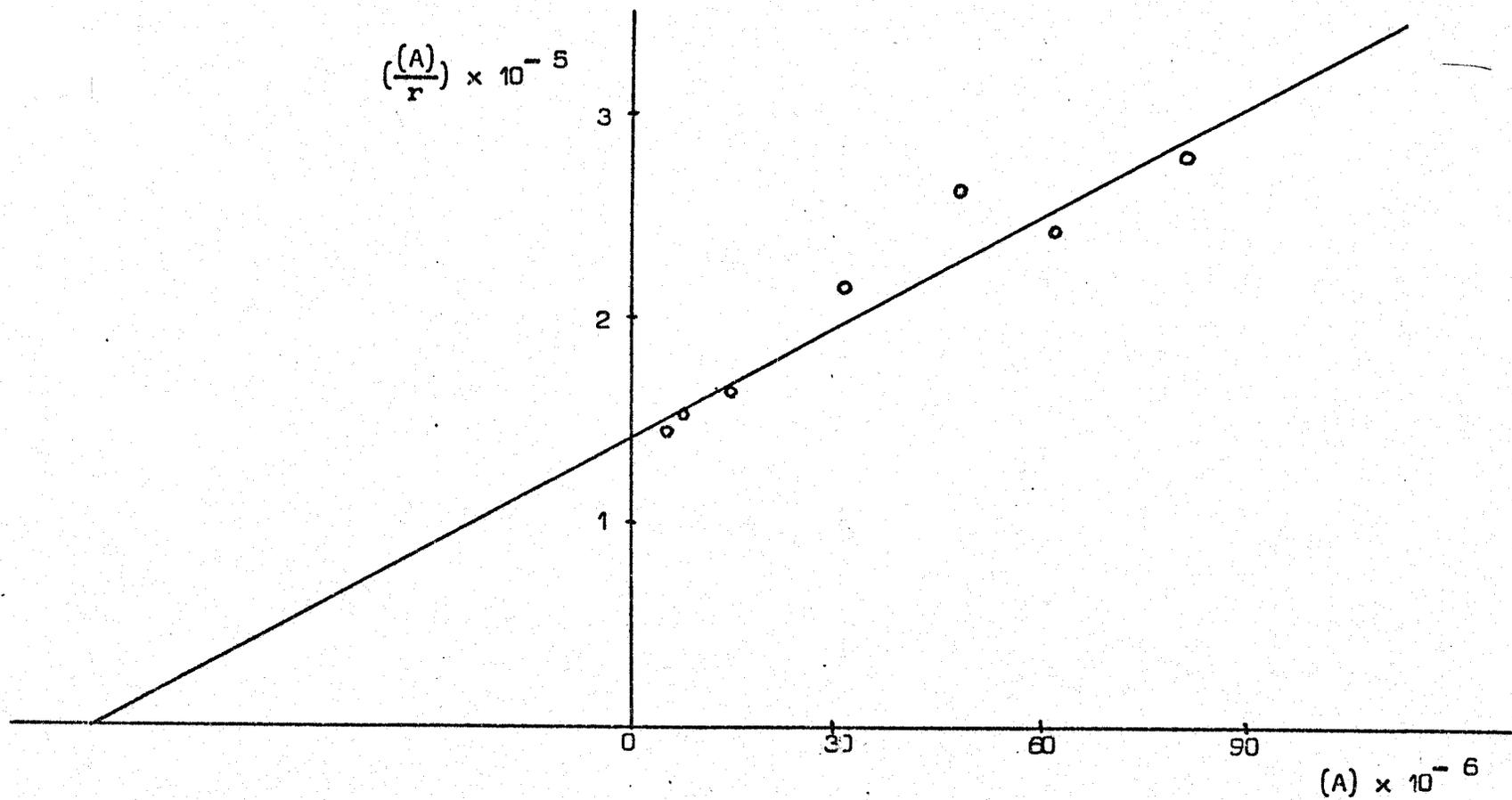


Figura 3.- Representación gráfica de la recta obtenida al enfrentar (A) en abscisas frente a $(A)/r$ en ordenadas

TABLA VI . - Valores de n y r/A para la silimarina a 320 nm.

Concentración inicial	n	r/A
$5 \cdot 10^{-6}$ M	0,36908	69454,27175
$10 \cdot 10^{-6}$ M	0,50638	65129,26045
$20 \cdot 10^{-6}$ M	0,92546	61705,56074
$40 \cdot 10^{-6}$ M	1,45646	46226,55282
$60 \cdot 10^{-6}$ M	1,83110	38072,56471
$80 \cdot 10^{-6}$ M	2,53830	41108,07002
$100 \cdot 10^{-6}$ M	2,89230	36081,13671
	$n = - 0,932798838$	
	$a = - 13307,44767$	
	$b = 71108,50338$	
	$b/a = 5,343511779$	
	$F = - 33,4952$	
	$n = - 5,34351$	
	$K_a = 13307,44767$	

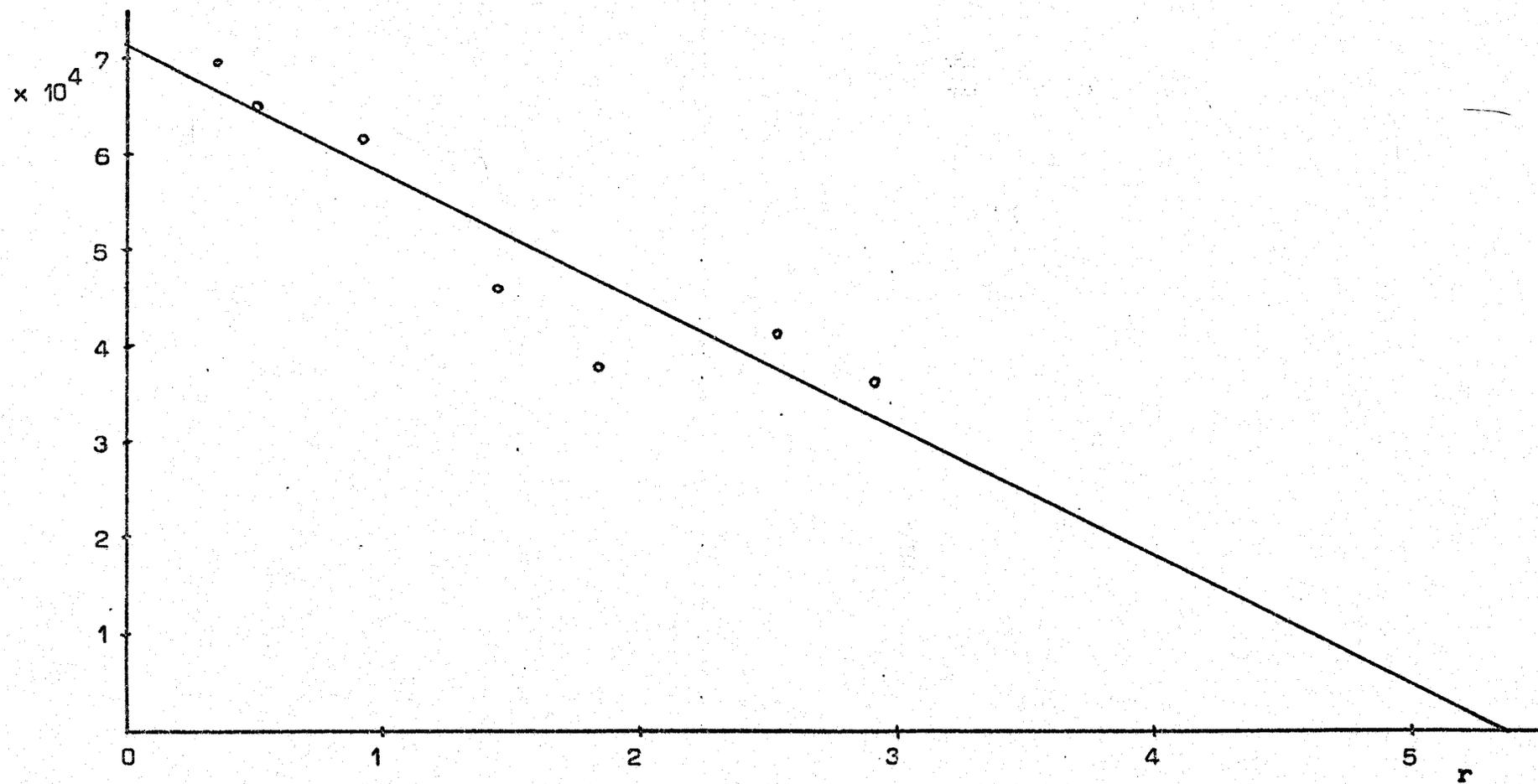


Figura 4.- Representación gráfica de la recta obtenida al enfrentar r en abscisas frente a $r/(A)$ en ordenadas

III. 1. 3. 2. - Discusión de resultados

Los porcentajes de unión de la silimarina a la albúmina que aparecen en la Tabla III tienden a disminuir conforme van aumentando las concentraciones de silimarina, lo que se debe a que al irse saturando la capacidad de fijación de la albúmina, la proporción de silimarina libre va a aumentar, aunque en valor absoluto, y a las concentraciones utilizadas por nosotros, vaya aumentando la cantidad de silimarina unida conforme aumenta la concentración libre de este fármaco.

Al aplicar los procedimientos de linealización de la ecuación general de la ley de acción de masas obtenemos un mejor conocimiento de la unión de la silimarina a la albúmina plasmática humana. Efectivamente, con estos procedimientos de linealización calculamos la constante de asociación y el número de lugares que presenta la albúmina y que son capaces de acoplar a moléculas de silimarina. Los valores de ambos parámetros físico-químicos varían, lógicamente, según el procedimiento de linealización que consideremos, aunque estas variaciones sean proporcionalmente muy pequeñas (coeficientes de variación de 7,76 y 11,28 por ciento respectivamente para "n" y "K").

El hecho de que nuestros valores se ajusten a sendas líneas rectas en los tres procedimientos de linealización descritos nos informa que existe una única constante de afinidad, es decir, que la afinidad de la silimarina por los distintos lugares de la molécula de albúmina a los

que puede fijarse es la misma, por lo que estos puntos de unión son también iguales entre sí.

El valor medio de "n" obtenido por los tres procedimientos es de 5,13, lo que nos indica que cada molécula de albúmina es capaz de copular hasta cinco moléculas de silimarina con una constante de afinidad superior a $1,4 \times 10^4$, concretamente de 14139,3058 como cifra media.

Comparando nuestros resultados con los obtenidos por Quiñonero (70) en albúmina bovina, observamos como este autor obtiene un total de 7 puntos con una constante de afinidad de 8134,2913, valores que difieren en cierta medida a los obtenidos por nosotros, hecho que debemos imputar a las diferentes especies objeto de ambos trabajos, ya que según Edsall y Wyman (71) las diferencias interespecíficas son una fuente de variabilidad importante en este tipo de ensayos.

III. 1. 3. 3. - Unión silimarina-suero humano

III. 1. 3. 3. 1. - Suero humano diluido

En la Tabla VII aparecen los valores medios de absorbancia obtenidos para las soluciones de silimarina en buffer en el exterior de las bolsas de diálisis, así como las concentraciones de esta sustancia en el suero diluido al 7 por ciento situado en el interior de las

mismas; igualmente aparecen en dicha Tabla los productos de las absorbancias obtenidas multiplicadas por los títulos de dilucción.

Las concentraciones de silimarina libre y total que se obtienen a partir de los valores de absorbancia externos e internos a las bolsas de diálisis respectivamente, así como la diferencia entre ambas concentraciones (silimarina unida a proteínas) se indican en la Tabla VIII.

Los porcentajes de unión de la silimarina a las proteínas plasmáticas cuando éstas se encuentran a una dilucción de 4,83 mg de proteína total por ml de solución, que aparecen en la Tabla IX, tienden a ir disminuyendo como ocurría al enfrentar este fármaco con una solución de albúmina.

III. 1. 3. 3. 2. - Suero humano sin diluir

Al igual que en los casos anteriores los valores medios de absorbancia en las soluciones externas a las bolsas de diálisis y en el suero del interior de ellas aparecen en la Tabla X junto con los productos de estas absorbancias por sus títulos de dilucción. A partir de ellas calculamos las concentraciones de silimarina libre, total y unida a proteínas que aparecen en la Tabla XI.

Por último, en la Tabla XII, aparecen los

porcentajes de unión de la silimarina a las proteínas plasmáticas en las que observamos unos porcentajes de unión muy similares, a las distintas concentraciones, y sin tendencia a ir disminuyendo.

TABLA VII . - Valores medios de absorbancias medidos a 320 nm de los buffer externos así como del interior de las bolsas de diálisis correspondientes a las series de suero diluido.

Concentración inicial	Absorbancias				
$5 \cdot 10^{-6}$ M	dentro	0,081	0,080	0,110	0,082
	fuera	0,062	0,058	0,059	0,060
$10 \cdot 10^{-6}$ M	dentro	0,152	0,138	0,136	0,134
	fuera	0,093	0,092	0,088	0,091
$20 \cdot 10^{-6}$ M	dentro	0,211	0,240	0,248	0,226
	fuera	0,181	0,184	0,188	0,184
$40 \cdot 10^{-6}$ M	dentro	0,342	0,367	0,363	0,363
	fuera	0,378	0,377	0,377	0,377
$60 \cdot 10^{-6}$ M	dentro	0,464	0,530	0,538	0,514
	fuera	0,562	0,586	0,623	0,590
$80 \cdot 10^{-6}$ M	dentro	0,649	0,647	—	0,666
	fuera	0,796	0,814	—	0,805
$100 \cdot 10^{-6}$ M	dentro	0,767	0,778	0,810	0,800
	fuera	1,008	1,078	1,016	1,034

TABLA VII . - Valores de los productos de las absorbancias citadas en la Tabla anterior por sus correspondientes títulos de dilucción que son cinco en el caso del interior de las bolsas de diálisis y dos en el exterior de las mismas.

Concentración inicial	Absorbancias				
5.10^{-6} M	dentro	0,405	0,400	0,550	0,410
	fuera	0,124	0,116	0,118	0,120
10.10^{-6} M	dentro	0,760	0,690	0,680	0,670
	fuera	0,186	0,185	0,176	0,182
20.10^{-6} M	dentro	1,055	1,200	1,240	1,130
	fuera	0,362	0,368	0,376	0,368
40.10^{-6} M	dentro	1,710	1,835	1,815	1,815
	fuera	0,756	0,754	0,754	0,754
60.10^{-6} M	dentro	2,320	2,650	2,690	2,570
	fuera	1,124	1,172	1,246	1,180
80.10^{-6} M	dentro	3,245	3,235	—	3,330
	fuera	1,592	1,628	—	1,610
100.10^{-6} M	dentro	3,835	3,890	4,050	4,000
	fuera	2,016	1,156	2,032	2,068

TABLA VIII . - Concentraciones de silimarina libres, totales y unidas correspondientes a las series de suero diluido al 7 por ciento y calculadas por la ecuación de regresión: concentración = 40,1964 . Abs - 0,158.

Concentración inicial	Concentración libre	Concentración total	Concentración unida
$5 \cdot 10^{-6} \text{ M}$	$4,639 \cdot 10^{-6} \text{ M}$	$17,579 \cdot 10^{-6} \text{ M}$	$12,940 \cdot 10^{-6} \text{ M}$
$10 \cdot 10^{-6} \text{ M}$	$7,131 \cdot 10^{-6} \text{ M}$	$27,979 \cdot 10^{-6} \text{ M}$	$20,842 \cdot 10^{-6} \text{ M}$
$20 \cdot 10^{-6} \text{ M}$	$14,601 \cdot 10^{-6} \text{ M}$	$46,319 \cdot 10^{-6} \text{ M}$	$31,658 \cdot 10^{-6} \text{ M}$
$40 \cdot 10^{-6} \text{ M}$	$30,177 \cdot 10^{-6} \text{ M}$	$71,944 \cdot 10^{-6} \text{ M}$	$41,767 \cdot 10^{-6} \text{ M}$
$60 \cdot 10^{-6} \text{ M}$	$47,300 \cdot 10^{-6} \text{ M}$	$102,644 \cdot 10^{-6} \text{ M}$	$55,344 \cdot 10^{-6} \text{ M}$
$80 \cdot 10^{-6} \text{ M}$	$64,558 \cdot 10^{-6} \text{ M}$	$131,284 \cdot 10^{-6} \text{ M}$	$66,726 \cdot 10^{-6} \text{ M}$
$100 \cdot 10^{-6} \text{ M}$	$82,968 \cdot 10^{-6} \text{ M}$	$158,366 \cdot 10^{-6} \text{ M}$	$75,398 \cdot 10^{-6} \text{ M}$

TABLA IX . - Porcentajes de unión de la silimarina a las proteínas plasmáticas en suero diluido.

Concentración inicial	Porcentajes de unión
$5 \cdot 10^{-6}$ M	73,54 %
$10 \cdot 10^{-6}$ M	74,51 %
$20 \cdot 10^{-6}$ M	68,35 %
$40 \cdot 10^{-6}$ M	58,05 %
$60 \cdot 10^{-6}$ M	53,92 %
$80 \cdot 10^{-6}$ M	50,82 %
$100 \cdot 10^{-6}$ M	47,61 %
	<hr/> $\bar{x} = 60,97$ %

TABLA X . - Valores medios de absorbancias medidos a 320 nm de los buffer externos asi como del interior de las bolsas de diálisis correspondientes a las series de suero sin diluir.

Concentración inicial	Absorbancias				\bar{x}
	dentro	fuera	dentro	fuera	
5.10^{-6} M	dentro	0,132	0,165	0,136	0,144
	fuera	0,036	0,049	0,046	0,044
10.10^{-6} M	dentro	0,235	0,224	0,245	0,235
	fuera	0,072	0,074	0,060	0,069
20.10^{-6} M	dentro	0,485	0,446	0,422	0,451
	fuera	0,109	0,101	0,118	0,109
40.10^{-6} M	dentro	0,928	0,946	1,088	0,987
	fuera	0,240	0,272	0,232	0,248
60.10^{-6} M	dentro	1,439	1,330	1,393	1,387
	fuera	0,388	0,420	0,380	0,396
80.10^{-6} M	dentro	1,581	1,737	2,089	1,802
	fuera	0,475	0,473	0,450	0,466
100.10^{-6} M	dentro	0,697*	0,644*	0,575*	0,639*
	fuera	0,626	0,636	0,666	0,643

* = multiplicamos por 15 debido a la dilucción realizada.

TABLA X . - Valores de los productos de las absorbancias citadas en la Tabla anterior por sus correspondientes títulos de diluición que son cinco en el caso del interior de las bolsas de diálisis y dos en el exterior de las mismas.

Concentración inicial	Absorbancias				\bar{x}
	dentro	fuera	dentro	fuera	
$5.10^{-6} M$	dentro	0,660	0,825	0,680	0,720
	fuera	0,072	0,098	0,092	0,088
$10.10^{-6} M$	dentro	1,175	1,120	1,225	1,175
	fuera	0,144	0,148	0,120	0,138
$20.10^{-6} M$	dentro	2,225	2,230	2,110	2,255
	fuera	0,218	0,202	0,236	0,218
$40.10^{-6} M$	dentro	4,640	4,730	5,440	4,935
	fuera	0,480	0,544	0,464	0,596
$60.10^{-6} M$	dentro	7,195	6,650	6,965	6,935
	fuera	0,776	0,840	0,760	0,793
$80.10^{-6} M$	dentro	7,905	8,685	10,445	9,010
	fuera	0,950	0,946	0,900	0,932
$100.10^{-6} M$	dentro	10,455*	9,660*	8,625*	9,585*
	fuera	1,252	1,272	1,332	1,286

* = multiplicamos por 15 debido a la diluición realizada.

TABLA XI . - Concentraciones de silimarina libres, totales y unidas correspondientes a las series de suero sin diluir.

Concentración inicial	Concentración libre	Concentración total	Concentración unida
$5 \cdot 10^{-6} \text{ M}$	$3,352 \cdot 10^{-6} \text{ M}$	$28,850 \cdot 10^{-6} \text{ M}$	$25,498 \cdot 10^{-6} \text{ M}$
$10 \cdot 10^{-6} \text{ M}$	$5,362 \cdot 10^{-6} \text{ M}$	$47,006 \cdot 10^{-6} \text{ M}$	$41,644 \cdot 10^{-6} \text{ M}$
$20 \cdot 10^{-6} \text{ M}$	$8,632 \cdot 10^{-6} \text{ M}$	$90,485 \cdot 10^{-6} \text{ M}$	$81,853 \cdot 10^{-6} \text{ M}$
$40 \cdot 10^{-6} \text{ M}$	$19,779 \cdot 10^{-6} \text{ M}$	$198,278 \cdot 10^{-6} \text{ M}$	$172,499 \cdot 10^{-6} \text{ M}$
$60 \cdot 10^{-6} \text{ M}$	$31,678 \cdot 10^{-6} \text{ M}$	$278,671 \cdot 10^{-6} \text{ M}$	$246,993 \cdot 10^{-6} \text{ M}$
$80 \cdot 10^{-6} \text{ M}$	$37,305 \cdot 10^{-6} \text{ M}$	$362,078 \cdot 10^{-6} \text{ M}$	$324,773 \cdot 10^{-6} \text{ M}$
$100 \cdot 10^{-6} \text{ M}$	$51,508 \cdot 10^{-6} \text{ M}$	$384,923 \cdot 10^{-6} \text{ M}$	$333,415 \cdot 10^{-6} \text{ M}$

TABLA XII . - Porcentajes de unión de la silimarina a las proteínas plasmáticas en suero sin diluir.

Concentración inicial	Porcentajes de unión
$5 \cdot 10^{-6}$ M	88,38 %
$10 \cdot 10^{-6}$ M	88,59 %
$20 \cdot 10^{-6}$ M	90,46 %
$40 \cdot 10^{-6}$ M	90,02 %
$60 \cdot 10^{-6}$ M	88,63 %
$80 \cdot 10^{-6}$ M	89,70 %
$100 \cdot 10^{-6}$ M	86,62 %
	<hr/> $\bar{x} = 88,91$ %

III. 1. 3. 3. 3. - Discusión de resultados

Al igual que ocurría con los porcentajes de unión de la silimarina a la albúmina indicados en la Tabla IX, correspondientes a los porcentajes de unión de silimarina a proteínas plasmáticas a una dilución de 4,83 mg por ml, la disminución proporcional de las tasas de unión conforme aumenta la concentración de fármaco, son imputables a que se van saturando las moléculas de proteína con moléculas de silimarina y va descendiendo, por tanto, la capacidad de fijación del fármaco.

Cuando utilizamos suero sin diluir en el interior de las bolsas de diálisis observamos como los porcentajes de unión de la silimarina a las proteínas plasmáticas no presentan esa tendencia general a disminuir que ocurría en los dos casos anteriores, sino que como observamos en la Tabla XII estos valores son muy similares encontrándose un porcentaje de unión medio de $88,91 \pm 1,192$ por ciento a las concentraciones utilizadas por nosotros. Esta falta de tendencia a la disminución creemos que es debida a la concentración de proteína la cual es muy alta y habría que utilizar concentraciones de silimarina impracticables, debido a la poca solubilidad de esta sustancia.

Estos altos porcentajes de unión nos indican que el volumen de distribución aparente en la especie humana ha de ser relativamente bajo, del orden de 0,2 a 0,4 litros por Kg de peso vivo o incluso inferior, ya que se -

rrano (69) encuentra en aves unos porcentajes de unión del 94 por ciento y unos volúmenes de distribución aparente próximos a 0,2 litros por Kg. Quiñonero (70) encuentra un porcentaje medio de unión de la silimarina a las proteínas plasmáticas de bovino de 86,86 por ciento, valor que es muy próximo al nuestro.

La importancia de estos altos porcentajes de unión es obvia, ya que la silimarina, como medicamento con carácter ácido, podría competir con otros fármacos de características similares que también se unen fuertemente a las proteínas plasmáticas y originar, en consecuencia, unas sobredosificaciones relativas que podrían, en algunos casos, ser peligrosas.

IV. - CONCLUSIONES

IV. - C O N C L U S I O N E S

1. - Los porcentajes de unión de la silimarina a las proteínas plasmáticas y a la albúmina, cuando éstas se encuentran a baja concentración, tienden en general a descender conforme aumenta la concentración de silimarina.
2. - La molécula de albúmina humana tiene la capacidad de fijar en su estructura hasta un total de cinco moléculas de silimarina.
3. - Los cinco lugares de unión citados son aparentemente iguales ya que sólo hemos obtenido una constante de afinidad cuyo valor es de $1,4 \times 10^4$.
4. - El porcentaje de unión medio de la silimarina a las proteínas séricas, cuando la tasa de éstas se encuentra entre los valores normales, es de $88,91 \pm 1,192$ por ciento.

Este alto porcentaje de unión podría originar competencias entre ella y otros fármacos por las proteínas y dar lugar, en algunos casos, a sobredosificaciones relativas que podrían ser peligrosas.

V. - BIBLIOGRAFIA

V. - B I B L I O G R A F I A

1. - LITTER, M. (1980). Farmacología. Ed. El Ateneo. Buenos Aires.
2. - DEL VILLAR RUIZ DE LA TORRE, A. (1977). Medicine, 36, - 3179.
3. - PETERMANN, M.L. (1961). M. Clin. 45, 537.
4. - BRODIE, B.B., y C.A.M. HOGBEN. (1957). J. Pharm. Pharmacol., 9, 346.
5. - ANTON, A.H.J. (1960). Pharmacol. Exp. Therap., 129, 282.
6. - KUNIN, C.M. y M. FINLAND. (1961). Clin. Pharmacol. Ther. 2, 51.
7. - VELASCO, A. (1976). Farmacocinética y biotransformación. (B. Lorenzo Velazquez, Farmacología y su

- proyección a la clínica). 13ª ed. Edit. Oteo. Madrid. España.
8. - FRIMMER, M. (1973). Farmacología y Toxicología Veterinaria. Ed. Acribia. Zaragoza.
9. - GOODMAN, L.S. y A. GILMAN. (1974). Bases farmacológicas de la terapéutica. 4ª ed. Ed. Interamericana. México.
10. - LAPORTE, J. (1975). Farmacocinética. (En Bases Farmacológicas de la terapéutica medicamentosa) Ed. Salvat. S.A. Barcelona. España.
11. - PATON, W.D.M. (1961). Proceedings of the Royal Society. (B), 154, 21.
12. - McDOUGAL, M.R. (1970). J.A.M.A., 2, 83.
13. - YU, T.F. et al. (1963). J. Clin. Inv. 42, 1330.
14. - SWANEY, J.B. y I.M. KLOTZ. (1970). Biochem., 2, 570.

15. - KARUSH, F. (1955). J. Amer. Soc., 72, 2705.

16. - WEST, E.S., W.R. TODD, H.S. MASON y J.T. VAN BRUGGEN. (1969). Bioquímica Médica. 4ª ed. Ed. Interamericana. México.

17. - GOLDSTEIN, A., L. ARONOW y S.M. KALMAN. (1978). Farmacología. 2ª ed. (1ª en castellano). Ed. Limusa. México.

18. - MADDEN, S.C. y G.H. WHIPPLE. (1940). Physiol. Rev. 20, 194.

19. - MARTINEZ LARRAÑAGA, M.R., R. JURADO, A. ANADON y F. SANZ. (1977). Arch. Farmacol. Toxicol. 3, 41.

20. - GOLDSTEIN, A., L. ARONOW y S.M. KALMAN. (1974). Principles of Drug Action; The basis of Pharmacology. 2ª ed. Ed. Biochemical Health. New York.

21. - FONT - QUER, P. (1969). Plantas medicinales. (El Dioscórides renovado). 5ª ed. Ed. Labor. Barcelona. España.

22. - JANIÁK, B. y R. HÄNSEL. (1968). Citado por Halbach, G. (1974) en " Química de la silimarina y de-

- rivados solubles en agua". Symp. sobre farmacodinamia de la silimarina. Colonia. Rep. Fed. Alemana.
23. - WAGNER, H., L. HORHAMMER y R. MUNSTER. (1968). Zur Chemie des Silymarins (Silybin), des Wirkprinzips der Früchte von *Silybum marianum* (L.) Gaertn. (*Carduus marianus* L.). *Arzneim. Forsch.* 18:6 , 688 - 696.
24. - WAGNER, H., L. HORHAMMER y R. SEITZ. (1968). Chemische Wertbestimmungeines Silymerinhaltigen Flavonoidkonzentrates aus *Silybum marianum* (L.) Gaertn. *Arzneim. Forsch.* 18:6 , 696 - 698.
25. - CAVALLINI, L. y G. LUCCHETTI. (1976). Considerazioni clinico - farmacologiche sulla silimarina. *Gazz. Med. Ital.* 135 : 7 - 8, 365 - 374.
26. - RAMELLINI, G. and J. MELDOLESI. (1974). Stabilization of isolated rat liver plasma membranes by treatment in vitro with silymarin. *Arzneim. Forsch.* 24:5, 806 - 808.
27. - RAMELLINI, G. and J. MELDOLESI. (1976). Liver protection by silymarin: in vitro effect on dissociated rat hepatocytes. *Arzneim. Forsch.* 26:1, 69-73.
28. - FLOMTEUX, G., P. DE FRANCE, M. DELFORGE ET R. CRISMER. (1974). Estudio terapéutico de un nuevo hepatoprotector: la coniferil-polihidroxi-2-fenilcromanona (silimarina). *Ann. Gastroentérol. hépatol.* 10:6, 533 - 541.

29. - LECOMTE, J. y J. DAMAS. (1974). Sur les actions de la silybine sur les mastocytes de rat. C.R. Soc. Biol. 168:10 - 11 - 12, 1449 - 1451.
30. - PORCELLATI, G., G. ARIENTI, I. MONTANINI, R. ROBERTI y A. GAITI. (1974). Efectos de la silimarina sobre el metabolismo de los fosfolípidos y proteínas del hígado de rata "in vitro". Symp. sobre farmacodinamia de la silimarina. Colonia. Rep. Fed. Alemana.
31. - SCHRIEWER, H. (1974). Efecto del dihemisuccinato de silibina sobre el metabolismo lipídico de rata intacta. Symp. sobre farmacodinamia de la silimarina. Colonia. Rep. Fed. Alemana.
32. - SCHRIEWER, H. y H.M. RAUEN. (1976). Die Wirkung von Silymarin - N - methylglukamin - Salz und Silybin - dihemisuccinat auf den Einbau von (^{14}C) - Acetat in die Lipide der Rattenleber. *Arzneim. Forsch.* 26:2, 235 - 238.
33. - SCHRIEWER, H. y H.M. RAUEN. (1973). Die Wirkung von Silymarin auf das fremdstoff - metabolisierende Enzymsystem der intaken Ratten. Kurze Mitteilung. *Arzneim. Forsch.* 23:1a, 155.
34. - DOWN, W.H., L.F. CHASSEAUD and R.K. GRUNDY. (1974) Effect of silybin on the hepatic microsomal drug-metabolising enzyme system in the rat. *Arzneim. Forsch.* 24:12, 1986-1988.
35. - SONNENBICHLER, J. (1974). Estimulo de la síntesis de R.N.A. por la distribución de silibina en forma de silibina radiactiva en el organismo

- de ratas. Symp. sobre farmacodinamia de la silimarina. Colonia. Rep. Fed. Alemana.
36. - HAHN, G., H.D. LEHMANN, M. KURTEN, H. UEBEL y G. VOGEL. (1968). Zur Pharmakologie und Toxikologie von Silymarin, des antihepatotoxischen Wirkprinzips aus *Silybum marianum* (L.) Gaertn. *Arzneim. Forsch.* 18:6, 698 - 704.
37. - MONFORT, R., J.R. ALEMANY, F. SANCHEZ DE LA CUESTA Y J. AZNAR. (1972). Estudio experimental de los efectos hepatotróficos de la silimarina en ratas hepatectomizadas. *Separata de medicina suiza* (sin referenciar).
38. - MONFORT, R., J. AZNAR y F. SANCHEZ DE LA CUESTA. (1972)) Influencia de una nueva sustancia hepatoprotectora sobre el sueño barbitúrico en ratas lesionadas con tetracloruro de carbono. *Rev. Med. Suiza* 1, 23-26.
39. - AZNAR, J., F. SANCHEZ DE LA CUESTA, R. MONFORT y J.R. ALEMANY. (1972)). Influencia de la lesión hepática experimental por tetracloruro de carbono sobre la secreción ácido-péptica estimulada por pentagastrina en la rata y efectos protectores de la silimarina. *Med. Esp.* 68, 278 - 286.
40. - RAUEN, H.M., H. SCHRIEWER, U. TEGBAUER y J.F. LASANA. (1973)). Silymarin verhindert die Lipidperoxidation bei der CCl_4 - Leberschädigung. *Experientia.* 29:11, 1372.
41. - SCHRIEWER, H., R. BADDE, G. ROTH y H.M. RAUEN. (1973)). Die Pharmakokinetik der antihepatotoxischen Wirkung des Silymarins bei der Leberschädigung dem

- Ratte durch CCl_4 und Desoxicholat. *Arzneim. Forsch.* 23:1a, 157-158.
42. - JANIÁK, B., B. KESSLER, W. KUNZ y B. SCHNEIDERS. (1973). Die Wirkung von Silymarin auf Gehalt und Funktion einiger durch Einwirkung von Tetrachlorkohlenstoff bzw. Halothan beeinflussten mikrosomalen Leberenzyme. *Arzneim. Forsch.* 23:9, 1322 - 1326.
43. - WILLIAMS, D.E. and B.G. PRIESTLY. (1973). Evaluation of prophylactic efficacy of silymarin in CCl_4 induced hepatotoxicity. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 6:1, 185 - 194.
44. - SIMEK, J., Z. CERVINKOVA e I. DVORACKOVA. (1976). La influencia del Legalón en la actividad regenerativa del hígado de rata lesionado por endotoxina de *E. coli* o tetracloruro de carbono. *Hepatología actual. Symp. Intern. Praga. Checoslovaquia.*
45. - MONFORT, R., F. SANCHEZ DE LA CUESTA, J.R. ALEMANY y J. AZNAR. (1972). Estudio de un nuevo hepatoterápico (silimarina) sobre la intoxicación alcohólica experimental en ratas. *Separata de Medicina suiza.* (sin referenciar.)
46. - BROWN, D.F. (1966). The effect of ethyl - alpha - p - chlorophenylethylisobutirate on ethanol induced hepatic steatosis in the rat. *Metabolism.* 16, 868.
47. - ISSELBACKER, K.J. y N.J. GREENBERGER. (1962). Metabolic effects of alcohol on the liver. *New*

Engl. J. Med. 270 - 351.

48. - VAZQUEZ DE PRADA, J.R. (1974). Estudios experimentales con silimarina. II. Efectos de la silimarina sobre el hígado graso producido en ratas por la intoxicación alcohólica aguda. Med. Clin. 62:2, 117 - 118.
49. - GARCIA - PRAVIA, F., M. SOPENA - DASI y J.R. VAZQUEZ DE PRADA. (1973). Prevención con silimarina de las alteraciones hepáticas inducidas con etionina en ratas. Rev. Esp. Fisiol. 29:3, 227-232.
50. - VAZQUEZ DE PRADA, J.R. (1974). Estudios experimentales con silimarina. I. Estudio comparado de actividades enzimáticas mitocondriales de hígado de ratas tratadas con etionina y con etionina más silimarina. Med. clin. 62:1, 28-30.
51. - RODRIGUEZ, A. (1968). Thioacetamide research in dogs
I) Hepatic cirrhosis. Scand. J. Gastroent. 3, 65.
52. - SCHRIEWER, H., R. BADDE, G. ROTH y H.M. RAUEN. (1973).
Die antihepatotoxische Wirkung des Silymarins bei der Leberschädigung durch Thioacetamid.
Arzneim. Forsch. 23:1a, 160-161.
53. - RAUEN, H.M., H. SCHRIEWER y J. LOHMANN. (1974). Efecto de la sal N-metilglucamínica de silimarina sobre ciertos trastornos del metabolismo de los fosfolípidos de los microsomas del hígado de rata después de una intoxicación con tioacetamida e influjo del hemisuccinato de silimarina sobre alteraciones semejantes después de un envenenamiento con D-galactosamina. Symp. sobre farmacodinamia de la silimarina. Colonia. Rep. Fed. Alemana.

54. - MEYER - BURG, J. (1972). Zur antihepatotoxischen Wirksamkeit von Silymarin bei der Galactosamin Hepatitis der Ratte. Klin. Wschr. 50:22, 1062 - 1063.
55. - SCHRIEWER, H. y H.M. RAUEN. (1973). Die antihepatotoxische Wirkung von parenteral verabreichtem Silymarin bei der Galaktosamin Hepatitis der Ratte. Kurze Mitteilung. Arzneim. Forsch. 23:1a, 159.
56. - SCHRIEWER, H. y H.M. RAUEN. (1973). Die antihepatotoxische Wirkung von Silymarin auf den durch Phalloidinintoxikation bei der Ratte gestörten Phospholipidstoffwechsel. Kurze Mitteilung. Arzneim. Forsch. 23:1a, 160.
57. - HALBACH, G. (1974). Química de la silimarina y derivados solubles en agua. Symp. sobre farmacodinamia de la silimarina. Colonia. Rep. Fed. Alemana.
58. - FRIMMER, M. y R. KROKER. (1975). Phalloidin - Antagonisten. T. Wirkung von Silybin - Derivaten an der isoliert perfundierten Ratten leber. Arzneim. Forsch. 25:3, 394 - 396.
59. - TUCHWEBER, B. (1974). Modificación del daño experimental en el hígado por la silimarina. Symp. sobre farmacodinamia de la silimarina. Colonia. Rep. Fed. Alemana.
60. - BRAATZ, R. (1974). Efecto de la silibina sobre ratones pretratados con faloidina. Symp. sobre farmacodinamia de la silimarina. Colonia. Rep. Fed. Alemana.

61. - DESPLACES, A. y J. CHOPPIN. (1974). Efecto de la silimarina sobre el cuadro histoquímico en células hepáticas normales y en células hepáticas intoxicadas con faloidina. Symp. sobre farmacodinamia de la silimarina. Colonia. Rep. Fed. Alemana.
62. - DESPLACES, A., J. CHOPPIN, G. VOGEL y W. TROST. (1975). The effects of silymarin on experimental phalloidine poisoning. *Arzneim. Forsch.* 25:1, 89 - 96.
63. - VOGEL, G., W. TROST, R. BRAATZ, P. ODENTHAL, G. BRUSEWITZ, H. ANTWEILLER y R. SEEGER. (1975). Untersuchungen zu Pharmakodynamik, Angriffspunkt und Wirkungsmechanismus von Silymarin, dem antihepatotoxischen Prinzip aus *Silybum marianum*(L.) Gaertn. I. Akute Toxikologie bzw. Verträglichkeit, Allgemeine und specielle (Leber) Pharmakologie. *Arzneim. Forsch.* 25:1, 82 - 89.
64. - MEYER - BURC, J. (1972). Zur Frage der Resorption von Silymarin bei der Ratte. *Klin. Wschr.* 50:22, 1060 - 1061.
65. - MENNICKE, W. (1974). ¿ Que se conoce acerca del metabolismo y farmacocinética de la silimarina?. Symp. sobre farmacodinamia de la silimarina. Colonia. Rep. Fed. Alemana.
66. - BULLES, H., J. BULLES, G. KRUMBIEGEL, W.H. MENNICKE y D. NITZ. (1975). Untersuchungen zur Verstoffwechslung und zur Ausscheidung von

- Silybin bei der Ratte. *Arzneim. Forsch.* 25:6, 902 - 905.
67. - BRAATZ, R. (1976). Farmacodinamia y farmacocinética de la silimarina. *Hepatología actual. Symp. Intern. Praga. Checoslovaquia.*
68. - EVANS, G.H., A.S. NIES and D.G. SHAND. (1973). The disposition of propranolol. III. Decreased half life and volumen of distribution as a result of plasma binding in man, monkey, dog and rat. *J. Pharmacol. Exper. Ther.* 186, 114 - 122.
69. - SERRANO, J.M. (1982). Estudio farmacocinético de la silimarina en Gallina (*Gallus domesticus* L.). Tesis doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad de Córdoba.
70. - QUINONERO, M. (1982). Unión de silimarina a proteínas plasmáticas de bovino. Tesina de licenciatura. Facultad de Veterinaria. Universidad de Córdoba.
71. - EDSALL, J.T. y J. WYMAN. (1958). *Biophysical Chemistry*. Vol I. Academic. Press. New York. USA.