

## FARMACOCINÉTICA DE LA SILIMARINA EN CONEJOS. ESTUDIO DE LA ABSORCIÓN DIGESTIVA Y DE LA UNIÓN A PROTEÍNAS PLASMÁTICAS

Cárceles, C.\*; Sanjuán, M. A.\*; Ponferrada, C.\*\* y Serrano, J. M.\*\*

\* «Departamento de Ciencias Socio-Sanitarias», Universidad de Murcia.

\*\* «Departamento de Farmacología y Toxicología», Universidad de Córdoba.

Recibido: 9 septiembre

Aceptado: 14 diciembre

### RESUMEN

Se ha estudiado la absorción digestiva de la silimarina en el conejo, hallándose la constante de absorción en duodeno ( $6,0102 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ ) y en yeyuno ( $0,01742 \text{ min}^{-1}$ ). Se ha comprobado estadísticamente que la absorción es más rápida en yeyuno que en duodeno.

También se realizó el estudio de la unión de la silimarina a las proteínas plasmáticas de conejo, resultando un porcentaje de unión medio de 82,41, una capacidad de fijación de la silimarina de 1,6043 mg/g y una constante de asociación de 9,45301/g.

*Palabras clave:* Silimarina, conejo, absorción digestiva, unión a proteínas.

### SUMMARY

The digestive absorption of silymarin on rabbit has been studied, and the absorption constant in duodenum ( $6,0102 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ ) and jejunum ( $0,01742 \text{ min}^{-1}$ ) has been found. It has been proved statistically that the absorption is more rapid in jejunum than in duodenum.

Also, the binding of silymarin to plasmatic proteins of rabbit has been studied, resulting an average percentage of union of 82,41, capacity of fixation of silymarin of 1,6043 mg/g and an association constant of 9,45301/g.

*Key-words:* Silymarin, rabbit, digestive absorption, protein-binding.

### INTRODUCCIÓN

La silimarina es un producto que se encuentra en los frutos del *Silybium marianum* (L) Gaerth. En su estructura entran a formar parte la taxifolina y el alcohol coniferílico (CAVALLINI y LUCCHETTI, 1976).

Este medicamento muestra un marcado tropismo por el hígado, al que protege de agresiones con tóxicos experimentales diversos (RAUEN y SCHIREIWER, 1973; VOGEL y col., 1979; etc.) y al que regenera desde el punto de vista terapéutico, de afecciones tóxico-metabólicas e infecciosas (REALINI y col., 1975; SABA y col., 1979; etc.).

La farmacocinética intravenosa de este fármaco ha sido realizada por SERRANO (1982) en gallinas y por CÁRCELES y col. (1987) en conejos. Para ambas especies se describen modelos de disposición bicompartimentales abiertos.

La unión a las proteínas plasmáticas ha sido igualmente realizada por SERRANO e INFANTE (1983), y SERRANO y col. (1984-1985a), describiéndose distintos porcentajes de unión según la especie considerada, y estableciéndose los parámetros determinantes de la interacción con seroalbúminas humana y bovina (SERRANO y col., 1985b).

La presente publicación aborda la absorción

digestiva de silimarina en el conejo, a fin de establecer las particularidades cinéticas de este proceso, así como la unión a las proteínas plasmáticas de esta especie interesante desde el punto de vista comercial y zootécnico, y como animal de experimentación biomédica.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Para la realización de las experiencias hemos utilizado conejos hembras con peso comprendido entre 1'6 y 2'1 kg procedentes de una explotación comercial. Todos los animales fueron sometidos a un ayuno de 24 h antes de realizar la experiencia. La silimarina empleada ha sido valorada por Boehringer Sohn Ingelheim S.A.E. como silibina con el 72% de riqueza.

Los experimentos realizados fueron los siguientes:

*Experimento 1.* Un lote de 10 animales ha recibido mediante sonda grástica una solución hidroalcohólica de silimarina a la dosis de 30 mg/kg de peso vivo. Las extracciones de sangre se han realizado a los 0, 3, 9, 30, 60, 90 y 150 minutos de la administración, de la vena marginal de la oreja.

*Experimento 2.* Un lote de 10 animales ha recibido por vía intraperitoneal una solución hidroalcohólica de silimarina a la dosis de 30 mg/kg de peso vivo. Las extracciones de sangre se han realizado de manera idéntica al experimento anterior.

*Experimento 3.* Un lote de 5 animales se ha anestesiado con carbamato de etilo (uretano) por vía intravenosa a dosis de 1'5 g/kg de peso vivo. Se les ha practicado una laparotomía media y se les ha canulado todo el intestino delgado, desde el píloro hasta la válvula ileocecal. Se ha procedido a limpiar el contenido entérico con solución salina que se ha hecho circular mediante bomba peristáltica, y posteriormente se ha sustituido la solución salina por solución Tyrode a pH 6 y con silimarina a la concentración de 180 mg/l. Se han tomado muestras del líquido de perfusión a los 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 y 50 minutos del comienzo de la misma.

*Experimento 4.* Se ha procedido de manera idéntica al experimento anterior pero ajustando el pH de la solución Tyrode a un valor de 7'5 y empleando 16 animales a los que se han canulado 10 cm de intestino delgado a partir del píloro (duodeno).

*Experimento 5.* Se ha procedido de manera similar al experimento 4 con 13 animales y con las mismas condiciones salvo que se han canulado 21 cm de la porción intermedia del intestino delgado (asas yeyunales).

*Experimento 6.* El método empleado para el estudio de la unión de silimarina a las proteínas plasmáticas de conejo ha sido el de diálisis en el equilibrio. Las bolsas de celofán se han preparado según el método de RUDMAN y KENDALL (1957) modificado por SERRANO y col. (1984). Se han realizado seis series en las que se han enfrentado 9 ml de tampón fosfato 0'068 M a pH 7'4, a 1 ml de tampón (tres series) o de plasma de conejo (tres series). Las concentraciones de silimarina empleadas en los tampones externos a las bolsas de diálisis han sido de 55'55, 33'33, 27'28, 22'22, 16'67, 8'33, 5'56 y 0 mg/l. De ellas la última se ha utilizado como blanco.

La diálisis se ha mantenido durante 24 h a temperatura ambiente y en oscuridad.

*Determinación de silimarina.* La determinación de silimarina se ha determinado por el método de SERRANO (1982) que se basa en la ionización del oxidrilo fenólico de la silimarina a pH alcalino y la absorción de la luz ultravioleta en esta forma ionizada a 320 nm en un espectrofotómetro Bausch & Lomb Spectronic

## RESULTADOS

*Experimento 1.* La administración oral de silimarina a conejos, a la dosis de 30 mg/kg de peso vivo, no permite establecer las curvas de disposición sanguínea, ya que los valores de absorbancia que se obtienen de los plasmas recogidos en las diferentes extracciones sanguíneas a cada individuo, son sensiblemente iguales en todos los tiempos de extracción al valor basal.

*Experimento 2.* Un hecho idéntico se produce cuando se administran 30 mg/kg de peso vivo por vía intraperitoneal a los conejos, y al no encontrar diferencias significativas en los valores de absorbancia a los distintos tiempos de extracción; no es posible en este caso, como en el anterior, establecer las curvas de disposición sanguínea.

*Experimento 3.* El estudio directo de la absorción intestinal de silimarina a pH 6 y considerando la totalidad del intestino delgado nos ha demostrado que la silimarina precipita parcialmente a este valor de pH por lo que se reduce la cantidad en solución y disminuye la absorción. Así, hemos observado que los valores de absorbancia, y por consiguiente las concentraciones en solución, descienden de manera lenta en función del tiempo.

La curva exponencial obtenida con los datos medios de concentración a los distintos tiempos es la siguiente:

$$C_t = 49'87 \exp(-3'7798 \cdot 10^{-3} \cdot t) \text{ mg/l}$$

CUADRO 1  
VALORES MEDIOS DE CONCENTRACIÓN REMANENTE (mg/l) EN EL LÍQUIDO DE PERFUSIÓN A LOS DISTINTOS TIPOS DE MEDIDA, Y PARÁMETROS DE DISPERSIÓN EN LA ABSORCIÓN DUODENAL DE SILIMARINA

TIEMPOS (min)	MEDIA $\bar{X} + E_x$	DESVIACIÓN TÍPICA	COEFICIENTE DE VARIACIÓN (%)
5	190'20±6'00	23'23	12'21
10	174'72±5'31	20'56	11'77
15	167'87±5'38	20'82	12'40
20	164'02±5'06	19'61	11'95
25	150'30±5'22	20'22	12'69
30	154'74±5'03	19'47	12'58
35	149'98±4'59	17'80	11'86
40	145'85±4'52	17'51	12'01
45	143'90±4'49	17'40	12'09
50	141'57±4'39	17'01	12'01

CUADRO 2  
VALORES MEDIOS DE CONCENTRACIÓN REMANENTE (mg/l) EN EL LÍQUIDO DE PERFUSIÓN A LOS DISTINTOS TIPOS DE MEDIDA, Y PARÁMETROS DE DISPERSIÓN EN LA ABSORCIÓN YEYUNAL DE SILIMARINA

TIEMPOS (min)	MEDIA $\bar{X} + E_x$	DESVIACIÓN TÍPICA	COEFICIENTE DE VARIACIÓN (%)
5	173'37±5'08	17'59	10'14
10	154'42±3'63	12'57	8'14
15	143'49±3'81	13'20	9'20
20	133'22±3'44	11'92	8'95
25	125'56±3'45	11'94	9'51
30	113'36±3'54	12'25	10'80
35	105'06±3'71	12'84	12'22
40	95'85±2'66	9'22	9'62
45	83'34±2'74	9'50	11'40
50	77'73±3'00	10'38	13'35

*Experimento 4.* Cuando se eleva el pH de la solución y se reduce la longitud del intestino donde se estudia la absorción no se producen precipitados de silimarina, por lo que se pueden calcular las concentraciones remanentes de fármaco en el líquido de perfusión a partir de los datos de absorbancia. Estos valores medios de concentración así como algunos parámetros de dispersión se muestran en el cuadro 1.

La ecuación obtenida para este caso es la siguiente:

$$C_t = 185'98 \exp(-6'0102 \cdot 10^{-3} \cdot t) \text{ mg/l}$$

*Experimento 5.* Los valores medios de con-

centración remanente en el líquido de perfusión y los parámetros estadísticos de dispersión se indican en el cuadro 2.

La ecuación obtenida es:

$$C_t = 188'67 \exp(-0'01742 \cdot t) \text{ mg/l}$$

*Experimento 6.* Los porcentajes de recuperación de medios tras la diálisis en el equilibrio de las series tampón/plasma se encuentran en el cuadro 3. Las concentraciones libre (tampón), total (plasma) y unida (diferencia entre ambas), así como los porcentajes de unión, se indican en el cuadro 4.

CUADRO 3  
 PORCENTAJES DE RECUPERACIÓN DE SILIMARINA TRAS LA DIÁLISIS EN EL EQUILIBRIO EN LAS SERIES TAMPÓN/TAMPÓN Y TAMPÓN/PLASMA

CONCENTRACIÓN TEÓRICA ESPERADA TRAS DIÁLISIS mg/l	TAMPÓN/TAMPÓN		TAMPÓN/PLASMA	
	CONCENTRACIÓN MEDIA mg/l	% RECUP.	CONCENTRACIÓN MEDIA mg/l	% RECUP.
5'00	3'62	72'40	3'72	74'40
7'50	7'30	97'33	7'39	98'53
15'00	11'06	73'73	11'38	75'87
20'00	18'53	92'65	18'98	94'90
25'00	22'64	90'56	22'63	90'52
30'00	26'41	88'03	27'20	90'67
50'00	36'86	73'72	34'80	69'60

CUADRO 4  
 VALORES MEDIOS DE CONCENTRACIÓN DE SILIMARINA LIBRE, TOTAL Y UNIDA Y PORCENTAJES DE UNIÓN A LAS PROTEÍNAS PLASMÁTICAS

LIBRE (mg/l)	CONCENTRACIONES			PORCENTAJES DE UNIÓN %
	TOTAL (mg/l)	UNIDA (mg/l)		
1'87	20'34	18'47		90'81
4'91	29'73	24'82		83'48
7'27	48'72	41'45		85'05
13'30	70'10	56'80		81'03
15'90	83'23	67'33		80'90
19'92	92'71	72'79		78'51
26'06	113'52	87'46		77'04

## DISCUSIÓN

La consideración global de los resultados obtenidos en los dos primeros experimentos nos informan que, cuando se administran 30 mg/kg de peso vivo de silimarina por vía oral o intraperitoneal a los conejos, ésta no accede a circulación periférica. Ello puede ser debido a que la absorción digestiva y, probablemente, la mayor parte de la que se produce en territorio esplácnico, vehicula al producto por un sistema venoso subsidiario de la porta y por lo tanto del hígado. En tales circunstancias este órgano puede retener prácticamente la totalidad del producto administrado y, por consiguiente, su biodisponibilidad es nula.

Estudios realizados en ratones (MEYERBURG, 1972) y en ratas (MENNICKE, 1974) demuestran que en estas especies se produce absorción digestiva. En la especie humana, los estudios clínicos realizados en los que se de-

muestran mejorías de los cuadros hepáticos de muchas afecciones, nos informan, aunque de manera indirecta, que también se produce absorción desde el tracto digestivo.

Todo ello nos indujo a estudiar la absorción digestiva en el conejo mediante ensayos directos. En primer lugar observamos que cuando se perfunde a través de todo el intestino delgado una solución de 180 mg/l de silimarina en Tyrode a pH 6, ésta precipita parcialmente reduciendo así la cantidad total de silimarina. De hecho cuando relacionamos la concentración inicial teórica con la real (49'87/180) obtenemos un valor de 0'277 lo que nos indica que aproximadamente el 72% de silimarina se pierde por precipitación. Por otra parte cabe pensar que, conforme se va absorbiendo el producto, parte del que ha precipitado vuelve a la disolución por lo que la constante de absorción calculada ( $3'7798 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ ) se ve influenciada también por la de redisolución.

Los ensayos realizados en duodeno tomando una porción de 10 cm y perfundiendo una solución de silimarina en Tyrode a pH 7.5 y a la concentración de 180 mg/l, nos demuestran que la totalidad de silimarina está disponible para la absorción, como se extrae del hecho de que la concentración inicial teórica (185.98 mg/l) es sensiblemente igual a la concentración real utilizada (180 mg/l). Por otra parte la constante de absorción hallada, con un valor de  $6.0102 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ , es superior a la obtenida en el experimento anterior, lo que tiene una importancia práctica.

En efecto, muchos medicamentos de carácter ácido como la silimarina son prácticamente insolubles en soluciones neutras o ácidas, por lo que la administración del producto en una solución tamponada, como el Tyrode en este caso, y a un valor de pH que mantenga el fármaco disuelto favorece la absorción del mismo.

Un hecho similar acontece cuando se perfunde una solución idéntica a la anterior por un asa yeyunal. Igualmente la totalidad del producto en solución está disponible para la absorción ya que la concentración inicial teórica (188.67 mg/l) es prácticamente igual a la concentración real utilizada (180 mg/l). La constante de absorción encontrada ( $0.01742 \text{ mg/l}$ ) es mayor que la obtenida en idénticas condiciones, para el duodeno. No obstante, el valor más elevado de la constante de absorción en yeyuno que en duodeno es debido, al menos parcialmente, a la mayor longitud del tramo intestinal empleado. Para comprobar si la absorción es más rápida realmente en yeyuno que en duodeno hemos de referirlo a igual longitud, ya que así las superficies de absorción serán muy próximas. La constante de absorción es bajo estas condiciones de  $8.2952 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ , superior 1.38 veces a la del duodeno. Esta diferencia es estadísticamente significativa ( $p < 0.001$ ), ya que la comparación mediante la «t» de Student da un valor de 8.838 para 27 grados de libertad, por lo que podemos afirmar que la absorción en duodeno es más lenta que en yeyuno.

De lo expuesto hasta ahora se pueden extraer una serie de consideraciones prácticas importantes con respecto a la absorción de silimarina en conejos:

La administración oral determina una absorción muy lenta del producto debido a la escasa solubilidad del mismo en medio acuoso ácido o neutro, por lo que para aumentarla es conveniente administrar simultáneamente compuestos alcalinos que favorezcan su disolución. Este hecho ya fue indicado por WAGNER (1983) quien afirma que las sales alcalinas de ácidos orgánicos débiles se disuelven más rápidamente

que los ácidos correspondientes, cualquiera que sea el pH del medio.

Por otra parte, el no encontrar silimarina en circulación periférica tras la administración oral puede ser debido bien al efecto de «primer paso», preferentemente del hígado aunque también puede deberse a la mucosa digestiva y a los pulmones, o bien a que siga un modelo farmacocinético de «flip-flop», ya que al no conocer realmente la constante de absorción digestiva no sabemos si ésta es menor que la constante de eliminación establecida por CÁRCLES y col. (1987) en  $0.0142 \text{ min}^{-1}$  (fase beta).

En relación a la unión de silimarina a proteínas plasmáticas de conejo, los porcentajes de recuperación obtenidos en las series de referencia y en las de ensayo (cuadro 3), con valores medios de 84.06 y 84.93 respectivamente, son estadísticamente iguales ya que el valor de la «t» de Student, que hemos realizado para datos correlacionados, da un valor de 0.9695 ( $p < 0.10$ ). Este hecho pone de manifiesto que la presencia de proteína en las series de ensayo no modifica la capacidad de absorción del celofán de las bolsas, por lo que en ulteriores ensayos no es necesario medir la concentración en el interior de las bolsas de diálisis.

La concentración de silimarina unida, que se calcula por diferencia (cuadro 4), es la consecuencia de la capacidad de fijación y de la constante de asociación. Debido a que se trabaja con plasma, no es posible calcular los parámetros molares de la unión pero sí en unidades de peso empleando la ecuación de KRÜGER-THIEMER (1961).

Hemos obtenido que la capacidad de fijación de la silimarina a las proteínas plasmáticas de conejo es de 1.6043 mg/g con una constante de asociación de 9.4530 l/g.

En general, la unión de los fármacos a las proteínas plasmáticas suele expresarse como porcentajes de unión, sobre todo cuando se trabaja con plasma en lugar de con soluciones de proteína pura. Estos porcentajes de unión son consecuencia de la capacidad de fijación y de la constante de asociación que son los parámetros determinantes. En nuestro caso hemos obtenido un valor medio de 82.40% en el rango de concentraciones empleadas. Este valor se sitúa intermedio entre los que obtienen SERRANO y col. (1984) para otros mamíferos, incluido el hombre, quienes encuentran el valor más bajo para la oveja con un 57.48% y el más alto para la cabra con un 92.96%.

En los pollos, SERRANO y col. (1985a) encuentran un porcentaje de unión medio de 94.53, mayor que el obtenido en los mamíferos estudiados en su trabajo anterior y que el obtenido por nosotros en el conejo.

## BIBLIOGRAFÍA

- CÁRCELES, C.; PONFERRADA, C.; SANJUÁN, M. A.; SERRANO, J. M. (en prensa): Farmacocinética de silimarina intravenosa en conejos a dosis única. *An. Vet. (Murcia)*.
- CAVALLINI, L.; LUCHETTI, G. 1976: Considerazioni clinico-farmacologiche sulla silimarina. *Gazz. Med. Ital.* 135: 365-374.
- KRUGER-THIEMER, E. 1961: Theorie des Wirkung bakteriostatischer Chemotherapeutika. *Jahresbericht Borstel, B*, 5: 316-400.
- MENNICKE, W. 1974: ¿Qué se conoce acerca del metabolismo y farmacocinética de la silimarina? *Symposium über Pharmakodynamik der Silymarin* (trad.). Colonia.
- MEYER-BURG, J. 1972: Zur Frage der Resorption von Silymarin bei der Ratte. *Klin. Wschr.* 50: 1.060-1.061.
- RAUEN, H. M.; SCHRIEWER, H. 1973: Die antihepatotoxische Wirkung von paren teral verabreichtem Silymarin bei derr Leberchädigung der Ratte durch  $CCl_4$ . *Arzneim. Forsch.* 23: 148-149.
- REALINI, S.; GONVERS, J. I.; HOFSTETTER, J. R. 1975: Essai clinique de la silymarine dans les affections chroniques du foie. *Praxis* 64: 595-589.
- RUDMAN, D.; KENDAL, F. E. 1957: Bile acid content of human serum. II. The binding of cholanic acids by human plasma proteins. *J. Clin. Invest.* 36: 538-542.
- SABA, P.; MIGNANI, E.; PAGLIAI, E.; GUIDI, G. SCALABRINO, A.; STOPPA, A.; GALEONE, F.; TROYER, C. 1979: Efficacia del trattamento con silimarina nella epatite acuta virale. *Epatologia* 25: 236-251.
- SERRANO, J. M. 1982: Estudio farmacocinético de la silimarina en Gallina. Tesis Doctoral, Univ. Córdoba.
- SERRANO, J. M.; INFANTE, F. 1983: Estudio de la unión de la silimarina a proteínas plasmáticas. I. Proteínas de bovino. *Arch. Zootec.* 122: 61-66.
- SERRANO, J. M.; CABANAS, L. F.; SANTIAGO, D. 1984: Estudio de la unión de silimarina a proteínas plasmáticas. II. Proteínas de cerdo, ovino, caprino, bovino y hombre. *Arch. Zootec.* 125: 89-95.
- SERRANO, J. M.; CABANAS, L. F.; INFANTE, F. 1985a: Estudio de la unión de silimarina y (+) cianidanol-3 a las proteínas plasmáticas de pollo. *An. Vet.* 1: 163-166.
- SERRANO, J. M.; QUINONERO, M.; DE LA PEÑA, M. L. 1985b: Interacción de la silimarina con seroalbúminas humana (HSA) y bovina (BSA). *Arch. Farmacol. Toxicol.* 11: 135-139.
- VOGEL, G.; BRAATZ, R.; MENGES, V. 1979: On the nephrotoxicity of alpha-amanitin and the antagonistic effects of silymarin in rats. *Agents Act.* 9: 221-226.
- WAGNER, J. G. 1983: Farmacocinética. *Reverté, Barcelona*.