

ESTUDIO DE LA UNION DE SILIMARINA A PROTEINAS  
PLASMATICAS.I. PROTEINAS DE BOVINO.

(A STUDY OF THE BINDING OF SILYMARIN TO PLASMATIC PROTEINS. I. BOVINE  
PROTEINS).

por

Juan Manuel Serrano Caballero y Félix Infante Miranda

Departamento de farmacología y toxicología de la Facultad de veterinaria  
de la Universidad de Córdoba (España).

Palabras clave: Veterinaria. Toxicología. Hígado. Faloidina. Ganado vacu-  
no. Sylibum marianum. Diálisis del equilibrio.

Keywords: Veterinary. Toxicology. Liver. Phalloidine. Sylibum marianum.  
Dialysis. Cattle.

Summary

The binding of the silymarin-antihepatotoxic principle from Sylibum marianum (L.) Gaertn - to the plasmatic proteins has been studied by equilibrium dialysis. From the results obtained it is inferred that  $68.21 \pm 1.61$  per cent of the silymarin is adsorbed on the plasmatic proteins when the dialysis is carried out at  $4^{\circ}$  C.

Resumen

Se estudia la unión de la silimarina, principal antihepatotóxico del Sylibum marianum (L.) Gaertn, a las proteínas plasmáticas de bovino mediante diálisis al equilibrio. De los resultados obtenidos se deduce que el  $68.21 \pm 1.61$  por ciento de la silimarina se encuentra adsorbida por las proteínas del plasma cuando la diálisis se realiza a  $4^{\circ}$  C.

Recibido para publicación el 2-9-1982.

### Introducción

La silimarina es el nombre genérico de un grupo de sustancias (silibina, silidianina y silicristina) que previenen la alteración hepática tóxica producida por faloidina y otros agentes y que se obtiene de los frutos del Sylibum marianum (L.) Gaertn. Estas sustancias son solubles en alcoholes y otros solventes orgánicos y presentan en solución metanólica un máximo de absorción entre 288 y 322 nm (Cavallini y Luccheti (1)). Son poco solubles en agua, aunque debido a su débil carácter ácido son solubles en álcalis.

Gibaldi (3) indica que las sustancias poco solubles en agua han de unirse fuertemente a las proteínas plasmáticas para mantenerse en solución en el torrente circulatorio, por lo que dichas proteínas actúan como verdaderos solubilizadores fisiológicos y farmacológicos. Efectivamente, esto ocurre con multitud de sustancias fisiológicas y con fármacos; concretamente, la silimarina se encuentra unida a las proteínas plasmáticas de la gallina en el 94 p.100 aproximadamente (Serrano (5)). En el presente trabajo informamos de los resultados, de un estudio mucho más amplio, de la unión de la silimarina a las proteínas plasmáticas de bovino, como una primera aportación a estudios posteriores en ésta y en otras especies animales.

### Material y métodos

De una solución de silimarina (valorada como silibina con el 72 p.100 de riqueza, por C.H. Boehringer Sohn Ingelheim S.A.E.) 0.1 M en etanol/propilenglicol (1.5/1), tomamos 0.1 ml al que añadimos 0.4 ml de una solución de carbonato sódico 0.075 M y completamos hasta 10 ml con un tampón de fosfatos de sodio 0.085 M, para obtener una solución acuosa de silimarina  $10^{-3}$  M.

A partir de esta solución madre preparamos las distintas soluciones hijas con las que realizamos la diálisis al equilibrio enfrentando 1 ml de plasma bovino o de tampón, en el interior de las bolsas de diálisis, contra 9 ml de las distintas soluciones de silimarina, que contenían en principio 0.00, 2.98, 5.96, 8.94, 11.92 y 14.90 mcg/ml, para que en caso de que no existiese adsorción ni por el celofán de las bolsas ni por las proteínas, se alcanzasen concentraciones de 0.00, 4.00, 8.00, 12.00, 16.00 y 20.00 micromoles/litro, tras el equilibrio.

Las bolsas de celofán para diálisis (Visking Dialysis Tubing, type 8/32 de Serva) se prepararon hirviéndolas durante 15 minutos, tres veces, como preconizan Rudman y Kendall (4) y se mantuvieron en buffer a 4°C durante 24 horas. Una vez transcurrido este tiempo, se llenaron con 1 ml de plasma bovino y, una vez cerradas, se enfrentaron contra 9 ml de las distintas soluciones de silimarina durante 16 a 18 horas a 4°C. Las series de referencia eran en todo iguales, salvo que las bolsas se llenaron con 1 ml de tampón en lugar de plasma.

El método de determinación de silimarina utilizado por nosotros ha sido el descrito por Serrano (5), midiendo las absorbancias de las soluciones externas a las bolsas de diálisis directamente a 320 nm y diluyendo 0.5 ml de los plasmas internos con 2 ml de carbonato de sodio 0.1 M antes de la lectura espectrofotométrica a la misma longitud de onda.

Una vez obtenidas las distintas absorbancias en un espectrofotómetro Perkin-Elmer modelo 55 B con accesorio U.V. se calcularon las concentraciones mediante recta de calibración. Por último, los porcentajes de unión de la silimarina a las proteínas plasmáticas se obtuvieron dividiendo la diferencia entre la concentración en plasma y la concentración en el tampón externo a las bolsas de diálisis por la concentración en plasma y multiplicando este resultado por 100.

### Resultados y discusión

Los valores de absorbancia obtenidos en las tres series de plasma frente al tampón se someten a un análisis de varianza para determinar si existen diferencias significativas entre las series y entre las concentraciones, tanto para absorbancias de los plasmas como para las de los tampones externos. Obtenemos valores de F de Senecor, entre series, no significativos (2.267. para plasma; y 0.006, para tampón), mientras que entre las concentraciones los valores de la F de Senecor han sido de 1.549 para los tampones y de 33.075 para los plasmas; valor, este último, que presenta un nivel de significación superior al 99.9 p.100. Deducimos de aquí que los valores obtenidos en las distintas series son estadísticamente iguales, mientras que las diferencias entre concentraciones son debidas a que hemos utilizado, efectivamente, concentraciones de silimarina distintas. Dado, pues, que no existen diferencias significativas entre las tres series, utilizamos el valor medio de cada una

de ellas para calcular las concentraciones de silimarina, tanto en los plasmas internos como en los tampones externos a las bolsas de diálisis.

A la vista de que las cantidades totales de silimarina en las distintas series, tanto de referencia como en las de plasmas, eran inferiores a las que habíamos puesto, deducimos que no toda la cantidad de silimarina está disponible para atravesar libremente la membrana de diálisis, ya que una parte de ella queda retenida por adsorción a la membrana. Debido a ello, y para determinar la fiabilidad de nuestros resultados, realizamos la determinación de los porcentajes de recuperación de silimarina en las series de referencia y en las de plasmas, y encontramos un porcentaje de recuperación medio de  $88.32 \pm 4.78$ , para las series de referencia, que no difiere del obtenido para las series de plasma y que fue de  $88.56 \pm 6.30$  (tabla I).

Los porcentajes de unión de silimarina a las proteínas plasmáticas que se producen con las distintas concentraciones (tabla II) y cuyo valor medio es de  $68.81 \pm 1.61$  p.100, indican que, del total de silimarina que se encuentra en el plasma, dos tercios de ella se hallan conjugados con las proteínas, mientras que el tercio restante está realmente disuelto en el agua plasmática.

El porcentaje de unión obtenido por nosotros es significativamente más bajo que el 94 p.100, aproximadamente, obtenido por Serrano (5), para las aves. Estas diferencias son explicables, ya que se trata de dos especies muy alejadas entre sí taxonómicamente y se trabaja a temperaturas distintas:  $4^{\circ}$  C, en nuestro caso, frente a temperatura ambiente, en el citado autor. Concordamos, por consiguiente, con Edsall y Wyman (2), quienes indican que la temperatura y la especie animal de la que proceden las proteínas son, entre otros factores, condicionantes de los valores a obtener en la diálisis al equilibrio.

#### Bibliografía

1. Cavallini, L. y G. Lucchetti. Gazz. Med. Ital. 135, (7-8), 365-374 (1976).
2. Edsall, J.T. y J. Wyman. Biophysical Chemistry, vol. I, Academic Press, New York (1958).
3. Gibaldi, M. Introducción a la biofarmacia, Ed. Acribia, Zaragoza (1974).

4. Rudman, D. y F.E. Kendal. J. Clin. Invest. 36, 538-542 (1957).
5. Serrano, J.M. Estudio farmacocinético de la silimarina en gallina. Tesis doctoral. Facultad de veterinaria. Universidad de Córdoba (España). (1982).

Tabla I. Porcentajes de recuperación de silimarina tras la diálisis al equilibrio.

Concentración teórica total (en micromoles)	Porcentaje de recuperación buffer/buffer	Porcentaje de recuperación plasma/buffer
4 mcM/1	93.10 p.100	81.66 p.100
8 "	88.10 " "	88.89 " "
12 "	85.46 " "	87.42 " "
16 "	91.11 " "	88.90 " "
20 "	83.83 " "	95.94 " "
Valor medio	88.32 " "	88.56 " "
Límite confianza 95 p.100	+ 4.75 " "	+ 6.30 " "

Tabla II. Concentraciones en plasma y tampón y porcentajes de unión de silimarina a proteínas plasmáticas de bovino.

Concentraciones plasmáticas	Concentraciones en tampón	Porcentajes de unión
8.204 mcM/1	2.718 mcM/1	66.87 p.100
18.992 "	5.790 "	69.51 " "
27.497 "	8.599 "	68.73 " "
37.178 "	11.672 "	68.61
52.230 "	15.474 "	70.37
Valor medio de porcentaje de unión		68.81
Límites de confianza del 95 p.100		+ 1.61