

Influencia de vehículos en la farmacocinética a dosis única de la vainillina (4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído)

Yoagne M. Trapero-Quintana,* Carlos A. González-Delgado,** Lourdes Olivera-Ruano,**
Armando Correa

RESUMEN

El 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído (vainillina) es candidato a fármaco para la anemia por hematíes falciformes, enfermedad para la cual no existe tratamiento efectivo. Es necesario el desarrollo de los estudios preclínicos de este compuesto con una formulación que garantice su biodisponibilidad. Las referencias de los estudios toxicológicos del 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído sólo reportan su administración como componente de la dieta animal, por lo cual no resulta seguro el cálculo de la cantidad realmente absorbida y la desperdiciada, y es necesario realizar un estudio de preformulación buscando el vehículo que favorezca una mejor absorción y que se pueda utilizar en los estudios preclínicos, a través de la administración oral por intubación gástrica. Se estudiaron tres formulaciones (carboximetilcelulosa al 0.5%, carboximetilcelulosa al 2% y solución hidroalcohólica al 15%, como referencia) en ratas Wistar, con el propósito de buscar la más adecuada para los estudios toxicológicos de la vainillina. Se determinaron algunos parámetros farmacocinéticos: área bajo la curva (ABCtotal), concentración máxima (Cmáx), tiempo máximo (tmáx), tiempo de vida media ($t_{\frac{1}{2}}$), tiempo medio de residencia (MRT), tiempo de latencia (Tlag), biodisponibilidad relativa (FreI), en las tres formulaciones, seleccionando finalmente la carboximetilcelulosa al 0.5% que ofreció los niveles plasmáticos que garantizan un adecuado nivel de exposición, determinado a través de un método analítico por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) validado en el Centro Nacional de Toxicología.

Palabras clave: Vainillina, biodisponibilidad, preformulación, HPLC.

ABSTRACT

The 4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde (vanillin) candidate agent for Sickle Cell Disease, a disease for which effective treatment doesn't exist. It is necessary to develop preclinical studies of this made up with a formulation that guarantees its bioavailability. The references of the toxicological studies of 4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde only report its administration like component of the animal diet, reason why it is not safe to calculate the really absorbed quantity and the one wasted. It should be carried out a preformulation study looking for the vehicle that favors a better absorption and that you can use in the preclinical studies, through the oral administration for gastric intubation. We were studied three formulations (0.5% carboxymethylcelulose, 2% carboxymethylcelulose and 15% hydroalcoholic solution as reference) in Wistar rats. The purpose was to looking for the most appropriate for the toxicological studies of vanillin. We determined some pharmacokinetics parameters (ABCtotal, Cmax, tmax, $t_{\frac{1}{2}}$, MRT, Tlag, FreI) of the three formulations. The 0.5% carboxymethylcelulose was selected because it offered the plasmatic levels that guarantee an appropriate exhibition level, determined using an analytic method for high performance liquid chromatography (HPLC), validated in the National Center of Toxicology.

Key words: Vanillin, bioavailability, preformulation, HPLC.

* Departamento de Biofísica, Centro de Biofísica Médica, Universidad de Oriente. Patricio Lumumba s/n, 90500, Santiago de Cuba, Cuba. Fax: (53) (22) 686214, 632545. E-mail: ymtquin@infomed.sld.cu

** Centro Nacional de Toxicología CENATOX.

Correspondencia:

Yoagne M. Trapero-Quintana, Centro de Biofísica Médica, Universidad de Oriente. Patricio Lumumba s/n, 90500, Santiago de Cuba, Cuba.

E-mail: ymtquin@infomed.sld.cu, ymtquin2006@yahoo.es

Apoyo material y financiero para el desarrollo de las investigaciones suministrado por:

Centro de Biofísica Médica, Universidad de Oriente. Proyectos Territoriales del Ministerio de Ciencias, Tecnología y Medio Ambiente y el Ministerio de Salud Pública.

Recibido: 12-02-2007

Aceptado: 27-03-2007

INTRODUCCIÓN

La hemoglobinopatía SS o anemia de hematíes falciformes es una anemia hemolítica congénita, caracterizada por la presencia en la sangre de numerosos glóbulos rojos drepanocíticos y otras formas anormales, más rígidas que los de un individuo normal.^{1,2} Esta enfermedad se considera un problema de salud pública a escala global. En Cuba afecta al 3.1% de la población. La incidencia en pacientes de raza negra en la región oriental y occidental del país es de 10.6% y 3.04% respectivamente.^{3,4}

Desde 1995 el Centro de Biofísica Médica de la Universidad de Oriente, trabaja en el diagnóstico y búsqueda de tratamientos efectivos para contrarrestar esta enfermedad, evaluando y comprobando la actividad farmacológica antidrepanocítica de la vainillina a través de la medida de los tiempos de relajación nuclear por medio de la técnica de relajación magnética nuclear⁵ y microscopia electrónica de transmisión.⁶ Este compuesto se ha convertido en uno de los candidatos terapéuticos de mayor interés a nivel mundial.

Diversos autores plantean que la acción antidrepanocítica de la vainillina se afecta cuando es administrado por vía oral porque se descompone en el tracto gastrointestinal.⁷ Otro grupo de investigadores desarrollaron una prodroga para contrarrestar esto,⁸ no obstante, esta es la vía sugerida para un futuro tratamiento sea cual fuera la formulación a utilizar.

Dentro del diseño de los ensayos toxicológicos para posibles fármacos, la implementación conjunta de estudios toxicocinéticos permite, a través del cálculo de los parámetros farmacocinéticos, una mejor interpretación de los resultados obtenidos en dichos estudios, además de contribuir al diseño de otros y garantizar que se alcance un adecuado nivel de exposición al seleccionar el mejor vehículo, la vía de administración y régimen de dosificación óptima.

La investigación y desarrollo de formulaciones desempeña un papel clave en la selección del vehículo apropiado para los ensayos de toxicidad, encaminado a favorecer la absorción de un fármaco. Además se puede observar la profunda influencia que tiene el efecto de la formulación en la exposición del fármaco, por lo que el desafío sería asegurar que el producto sea sistemáticamente activo y que exista una relación entre dosis administrada y exposición.⁹

Debido a la baja solubilidad de la vainillina en sistemas acuosos, y tomando en consideración la baja toxicidad de la carboximetilcelulosa (CMC), se estudiaron dos formulaciones empleando este vehículo a

concentraciones diferentes 0.5% y 2% con el objetivo de definir la que favoreciera una mejor absorción y por lo tanto pudiera ser utilizada en los estudios pre-clínicos requeridos en el desarrollo de este producto.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron ratas Wistar procedentes de la colonia del Laboratorio de Investigaciones Biológicas del Centro de Investigaciones y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM), identificadas mediante un código de marca empleando ácido pícrico. Los estudios se llevaron a cabo según las normas éticas descritas para el uso de animales de experimentación¹⁰ y siguiendo las guías de buenas prácticas de laboratorio.¹¹ Se emplearon 36 animales machos adultos jóvenes con un peso de 200 a 250 g. Los animales se mantuvieron en condiciones convencionales de temperatura 22 ± 2 °C, humedad relativa del 65-80 % y ciclo luz oscuridad 12:12.

Fueron estudiadas dos formulaciones de la vainillina (4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído, Panreac) en CMC (Panreac) al 0.5 y 2%, y una solución hidroalcohólica (alcohol etílico, Panreac) al 15% como referencia. Para preparar la solución hidroalcohólica 15% se pesaron 5 g de vainillina, se disolvieron en 15 mL de alcohol y luego se le añadieron 100 mL de agua destilada. Las soluciones en CMC a una concentración de 50 mg/mL se prepararon a partir de 5 g de vainillina y 100 mL de la solución de CMC al 0.5% y al 2%, respectivamente. Se agitaron durante cinco minutos a una velocidad de 245 rpm. Posteriormente, se mantuvieron en baño a una temperatura de 40 °C, por espacio de 50 min. Inmediatamente después de haber sido preparada la formulación correspondiente se administró mediante intubación intragástrica con una cánula curva metálica (Gavage). Después de administrada la sustancia se tomaron muestras de sangre a diferentes intervalos para cuantificar los niveles plasmáticos.

Secuencia de extracción de muestras de sangre

Tiempos: 0, 1, 3, 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90, 120 y 180 min.

A cada rata se le realizaron cuatro extracciones de sangre, correspondiendo siempre la primera al tiempo igual cero (antes de la administración) y las otras tres a diferentes tiempos posterior a la administración. Se emplearon tres animales por punto de muestreo. Este estudio consumió un número pequeño de animales por formulación estudiada (12 animales en cada una), para disminuir la variabilidad y obtener

niveles plasmáticos en la fase de absorción y eliminación de cada animal, lo cual facilitó definir con mayor precisión los valores de concentración máxima (Cmáx) y tiempo máximo (tmáx) y evaluar de forma preliminar la cinética general del producto en este modelo animal por vía oral.

La extracción de sangre se realizó del seno orbital de los animales anestesiados con éter dietílico (Panreac), mediante capilares heparinizados. Se obtuvo un volumen de sangre total de 1 mL por punto. La sangre fue recogida directamente en viales plásticos (Eppendorf) que contenían dos gotas de heparina. De inmediato se centrifugó la sangre a 2,000 rpm durante cinco minutos, para la separación del plasma, del cual se tomó una alícuota de 0.5 mL que fue transferida a viales plásticos (1.5 mL).

Instrumentación

Se utilizó un cromatógrafo HPLC Shimadzu LC-6A a 230 nm, una columna analítica Merck ODS (4.6 mm i.d x 25 cm). La fase móvil consistió en una mezcla de solución amortiguadora salina-fosfato (PBS) 100 mM (pH = 5.5): Metanol (1:1), a un flujo de 1 mL/min y una temperatura de 50 °C. Para la cuantificación se determinó la altura de los picos obtenidos en los chromatogramas correspondientes al analito.

Procedimiento de extracción líquido-líquido

En el procedimiento de extracción, a 200 µL de plasma se le adicionaron 200 µL de acetonitrilo (Panreac), se mezcló en un mezclador (Vortex) durante un minuto y se centrifugó a 2,000 rpm durante 10 minutos. Se extrajeron 50 µL del sobrenadante y se inyectaron en el cromatógrafo.

Análisis farmacocinético

Los datos de concentración plasmática se analizaron en el programa de computación WinNonlin profesional versión 2.1. Una vez obtenidos los niveles plasmáticos, tras la administración de las formulaciones sometidas a estudio, se estimaron mediante técnicas "no compartimentales" los siguientes parámetros farmacocinéticos: constante de eliminación (Ke), tiempo de vida media ($t_{1/2}$), concentración máxima (Cmáx), tiempo máximo (tmáx), área bajo la curva (ABC_{0-t}, ABC_{0-∞}), tiempo de latencia (T lag), biodisponibilidad relativa (Frel), tiempo medio de residencia (MRT), volumen de distribución (Vd).

RESULTADOS

Las curvas correspondientes a los perfiles farmacocinéticos de la vainillina en las dos soluciones de CMC al 2% y 0.5% obtenidas en los estudios cinéticos, se observan en la figura 1. Para la formulación al 0.5% se obtuvieron valores de concentración plasmática superiores en relación a la formulación al 2%, alcanzándose valores de concentración máxima (Cmáx) de 63.7 µg/mL y 13.45 µg/mL respectivamente. El tmáx necesario para alcanzar estos valores en ambos casos fue de 3 y 10 minutos respectivamente. Por su parte, en la figura 2 se observan los perfiles de concentración plasmática de vainillina en las formulaciones de CMC al 0.5% y solución hidroalcohólica (HA) al 15%. Para esta última el valor de Cmáx fue de 97.3 µg/mL con un tmáx igual a los 5 minutos.

En el cuadro I se muestran los valores de los parámetros farmacocinéticos que definen el nivel de exposición de la sustancia evaluada, tomando en consideración la magnitud y la velocidad de la absorción de la vainillina. Se observa que con la formulación donde se utiliza la CMC al 0.5% se obtuvo una mayor área bajo la curva (ABCtotal) en relación a la formulación de CMC al 2%; de igual forma los valores de Cmáx alcanzados para la primera son superiores. En los últimos dos puntos de la curva de CMC al 2% se evidencia una tendencia al aumento de la concentración al final del tiempo de muestreo. Fue imposible realizar el cálculo de la Ke y del $t_{1/2}$, ya que el $t_{1/2}$ observado fue muy corto. El valor del MRT para la solución de CMC al 2% tiende al aumento pues ésta

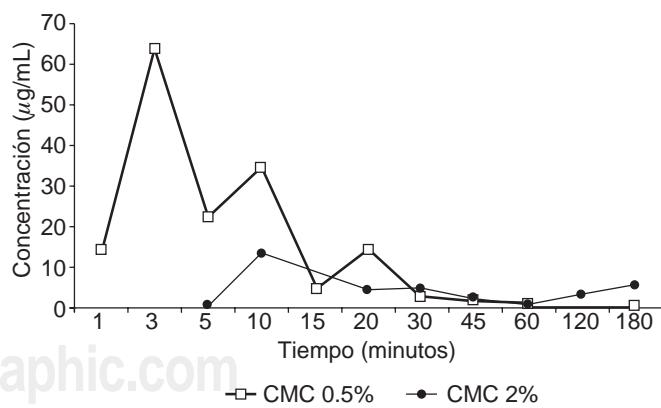


Figura 1. Perfiles de concentración plasmática en función del tiempo para las formulaciones de la vainillina en carboximetilcelulosa al 0.5 % y 2 % a la dosis de 400 mg/kg en ratas Wisistar. CMC: carboximetilcelulosa.

Cuadro I. Parámetros farmacocinéticos de las soluciones hidroalcohólica al 15% y de carboximetilcelulosa al 0.5% y 2% a la dosis de 400 mg/kg en ratas Wistar.

Parámetros farmacocinéticos	Sol. HA 15%	Sol. CMC 0.5%	Sol. CMC 2%
ABC total ($\mu\text{g}_\text{min}/\text{mL}$)	1965.2	801.2	623.5
Cmáx ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	97.3	63.7	13.5
tmáx (min)	5.0	3.0	10.0
t $_{1/2}$	42.5	84.1	—
MRT	28.1	24.3	96.5
T lag (min)	0.0	0.0	3.0
Frel (%)	—	41.0	32.0

Sol. HA: solución hidroalcohólica, Sol. CMC: solución de carboximetilcelulosa.

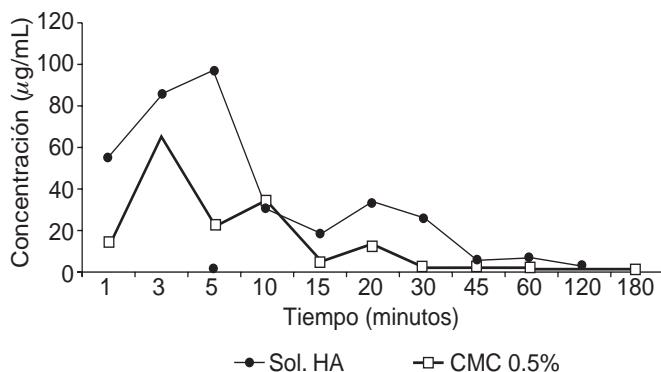


Figura 2. Perfiles de concentración plasmática en función del tiempo para las formulaciones de la vainillina en carboximetilcelulosa al 0.5 % y solución hidroalcohólica al 15% a la dosis de 400 mg/kg en ratas Wistar. Sol. HA: solución hidroalcohólica, CMC: carboximetilcelulosa.

propicia una absorción retardada, sin embargo, para las otras dos formulaciones los valores son similares. Para la CMC al 2% se observa a diferencia de las otras formulaciones, CMC al 0.5% y la solución hidroalcohólica al 15%, un tiempo de latencia de 3 minutos. Esto ocurre porque sus características físico-químicas impiden una absorción inmediata de la vainillina. Como consecuencia, al calcular la biodisponibilidad relativa (Frel) de ambas formulaciones, tomando como referencia a la solución hidroalcohólica al 15%, la biodisponibilidad resultante es mayor para la de CMC 0.5% (41%) que para la de CMC al 2% (32%).

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos pueden atribuirse a las características físico-químicas obtenidas al preparar cada formulación. La solución de CMC al 2%

presenta una viscosidad muy grande, lo cual dificulta en gran medida la disolución de la vainillina y provoca que ésta ocurra de forma no homogénea; por lo que al administrar esta formulación, la dosis puede no ser la correspondiente de acuerdo al peso de cada animal. A esto también pudiera contribuir el hecho de que, al tener una mayor viscosidad, el número de moléculas que se ponen en contacto con la mucosa del epitelio gastrointestinal para ser absorbidas, así como la velocidad a la cual ocurre este proceso sea menor. Sin embargo, en la formulación de CMC al 0.5%, se favorece la solubilidad de la vainillina, a pesar de presentar también cierto grado de viscosidad. En correspondencia con esto, el tiempo necesario para alcanzar la concentración máxima (tmáx) es mayor para la formulación de CMC al 2% que para la formulación de CMC al 0.5% (10 y 3 minutos respectivamente). Todo esto trae como resultado que los niveles de concentración plasmática alcanzados para la formulación de CMC al 0.5% sean mayores, como se observó en la figura 1. Aunque los valores de concentración plasmática alcanzados para la formulación de CMC al 0.5% son mayores que para la formulación al 2%, la biodisponibilidad de la primera continúa siendo baja.

Los siguientes factores pueden haber influido en esto:

- Las características físico-químicas (viscosidad) explicadas anteriormente, si bien no son de la misma magnitud para las dos formulaciones.
- Los posibles procesos de biotransformación de esta sustancia, tanto a nivel de la pared gastrointestinal, así como a un efecto de primer paso hepático.
- Procesos de degradación de la vainillina en el trato gastrointestinal.

La tendencia al aumento de la concentración al final del tiempo de muestreo observada en los últimos dos puntos de la curva de CMC al 2% pudiera estar dada por una absorción de vainillina remanente debido a las características antes descritas para esta formulación. Esto imposibilita realizar el cálculo de la Ke y del $t_{1/2}$. Para ejercer su acción, la vainillina penetra al interior de los eritrocitos y se une de forma estable a la hemoglobina S mediante enlace covalente, ocurriendo una disminución rápida de los niveles plasmáticos, producto de la simultaneidad de los procesos de distribución al interior de los eritrocitos y a su propia eliminación. Paralelamente a esta disminución de los niveles plasmáticos se debe corresponder un aumento de los valores de concentración intraeritrocitarios. De ahí que sea tan corto el tiempo de vida media observado.

Un aspecto importante a considerar en el análisis de los resultados es que estos estudios cinéticos se realizaron en una especie roedora, cuyo metabolismo es más intenso que otras especies animales. Estudios cinéticos realizados en perros demostraron que en esta especie la vainillina presenta una biodisponibilidad del 60%.¹²

Los resultados permiten definir que para estudios posteriores, tanto a dosis única como repetida, la formulación más adecuada a emplear es la de CMC al 0.5%. El intervalo de dosificación tomando en consideración el tiempo de vida media debe ser de 8 -12 horas.

REFERENCIAS

1. Serjeant GR. *Sickle cell disease*. 2nd ed. Oxford: University Press; 1992: 56, 61, 71-77, 120-366.
2. Colombo B, Guerchicoff E, Martínez G. *Genética y clínica de las hemoglobinas humanas*. La Habana: Editorial Pueblo y Educación; 1993: 146-195.
3. Espinosa E. La anemia drepanocítica en Cuba. Experiencia de 30 años. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemot*. 1996; 12: 97-105.
4. Govin AT, Fernández AA, Navarro ZR. Sicklemia. *Atención integral y repercusión social*. V Conferencia Internacional Cultura Africana y Afroamericana. Santiago de Cuba: 1998.
5. Del Toro G, Falcón JE, Alonso Y, Valdés YC, Cabal CA. Vainillina: agente inhibidor de la polimerización de la hemoglobina. *S Bioquímia*. 2003; 28: 4-10.
6. Del Toro G, Valdés YC, de la Rosa MC, Falcón V, Cabal CA. Actividad antidiapanocítica de la vainillina sobre hematíes de un paciente con drepanocitemia por microscopía electrónica de transmisión. *Bioquímia*. 2004; 29: 5-10.
7. Aruoma OI. Dietary management of sickle cell anemia with vanillin. *Free Radic Res Commun*. 1992; 17: 349-352.
8. Zhang CH, Li X, Lian L, Chen Q, Abdulmalik O, et al. Anti-sickling effect of MX-1520, a prodrug of vanillin: an *in vivo* study using rodents. *Br J Haematol*. 2004; 125: 788-795.
9. Castel-Branco MM, Cayen MN. Considerations in the design of toxicokinetic programs. *Toxicol Pathol*. 1995; 23: 148-157.
10. *Guidelines for breeding and care of laboratory animals*. World Health Organization and International Council for Laboratory Animals Science (ICLAS). 1998.
11. *Food and Drug Administration*. Good laboratory practice for non clinical laboratory studies. Title 21 code of federal regulations subchapter A, 1997 (Pt 58).
12. Trapero YM, González CA, Olivera L. Estudio farmacocinético del 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído en perros beagles por vía oral. *Rev Cubana Farm*. 2002; 36 (Suppl. 1).

