



Prof.^a Dra. D.^a Susana Abdala Kuri
Prof. Dr. D. Domingo Martín Herrera
Prof.^a Dra. D.^a Sandra Dévora Gutiérrez

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es> ES



Universidad
de La Laguna

Departamento de
Medicina Física y
Farmacológica

**GUÍA DIDÁCTICA DE PRÁCTICAS DE LA
ASIGNATURA FARMACOLOGÍA I DE LA SECCIÓN DE
FARMACIA DE LA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA**

CONTENIDO

	<u>Pág.</u>
<u>Práctica n°1.</u> Principios generales de acción de fármacos. Paso de fármacos a través barreras biológicas: papel del pH del medio y del pK_a	2
<u>Práctica n°2.</u> Principios generales de acción de fármacos. Distribución de fármacos: papel de las proteínas plasmáticas.....	4
<u>Práctica n°3.</u> Analgesia: estudio de la actividad analgésica.....	9

PRÁCTICA N°1

PRINCIPIOS GENERALES DE ACCIÓN DE FÁRMACOS. PASO DE FÁRMACOS A TRAVÉS BARRERAS BIOLÓGICAS: PAPEL DEL pH DEL MEDIO Y DEL pK_a

Objetivos: Estudiar la influencia que el pH de la orina tiene sobre la excreción renal de los fármacos electrolitos débiles.

1. Conceptos a recordar

- 1.1. Ionización de ácidos y bases débiles. Ecuación de Hendersson-Hasselbach.
1.2. Procesos de excreción renal de los fármacos.

2. **Fármaco a estudiar:** Salicilato sódico ($pK_a = 3$)

3. **Animal de experimentación:** Rata

4. Realización de la práctica

4.1. Material y reactivos necesarios:

Salicilato sódico, CO_3HNa , $CINH_4$, NO_3Fe , cánulas oral e ip para ratas, rotulador marcador, cajas de metabolismo, probetas, vasos precipitado, erlenmeyers, papel de pH, papel de filtro,

Soluciones: CO_3HNa [50 mg/ml]
 $CINH_4$ [50 mg/ml]
 $(NO_3)_3Fe_2$ [40g/l]
Salicilato sódico [30 mg/ml]

4.2. Método:

- a) Pesar 6 ratas y formar dos grupos de 3 ratas cada uno e identifique cada rata con una marca de rotulador. Coloque los animales de cada grupo en jaulas distintas.
b) Administrar por vía oral $CINH_4$ (400 mg/kg) a las tres ratas del grupo I, y CO_3HNa (400mg/kg) a las tres ratas del grupo II. Previamente se les enseñará la técnica de administración por vía oral. Se mantiene a las ratas en sus respectivas cajas durante una hora.

	Grupo I	Grupo II
Peso rata 1/volumen	/	/
Peso rata 2/volumen	/	/
Peso rata 3/volumen	/	/
Sustancia administrada	/	/
Hora de administración	/	/
Hora de administración del salicilato sódico	/	/

c) Pasada la hora, administrar por vía oral a cada rata una sobrecarga de agua que corresponda al 5% de su peso. Inmediatamente después inyecte i.p. el salicilato sódico (300 mg/kg). Coloque seguidamente a los animales en sus correspondientes cajas de metabolismo.

d) Recójase a continuación la orina que excreten los animales para su posterior análisis. A los 20 y 50 minutos retire la orina (2 orinas por grupo de animales). Mida el pH de cada muestra y anótelos.

e) Diluya cada muestra de orina con agua corriente hasta un volumen de 10 ml en una probeta o en un matraz aforado. Añada a cada muestra un volumen de 10 ml de $(\text{NO}_3)_3\text{Fe}_2$ [40g/l] y observe el color que aparece. La intensidad de color es proporcional a la concentración de salicilato presente en la muestra. Compare cuantitativamente la diferencia de excreción del salicilato entre ambos grupos de ratas.

4.3. Resultados y comentarios a la práctica:

	Grupo I		Grupo II	
	PH	Excreción de salicilato	pH	Excreción de salicilato
20 minutos				
50 minutos				

PRÁCTICA N°2

PRINCIPIOS GENERALES DE ACCIÓN DE FÁRMACOS. DISTRIBUCIÓN DE FÁRMACOS: PAPEL DE LAS PROTEÍNAS PLASMÁTICAS.

Objetivos: Estudiar la influencia que la unión de los fármacos con la albumina plasmática tiene sobre la concentración de fármaco libre en el plasma y sobre el volumen de distribución y, por tanto, sobre los procesos de distribución y excreción.

1. Conceptos a recordar

1.1. Unión a proteínas plasmáticas. Fármaco libre y unido a proteínas plasmáticas

Los fármacos una vez absorbidos se distribuyen por los distintos compartimentos líquidos del organismo tejidos en parte disueltos en agua y en parte unidos a proteínas (fracción liposoluble). A menor hidrosolubilidad, mayor porcentaje de unión a las proteínas plasmáticas.

Sólo la fracción no unida a proteínas plasmáticas puede difundir libremente y alcanzar los compartimentos extravasculares. Transcurrido cierto tiempo la concentración de fármaco libre será la misma en los distintos compartimentos, aunque puede no serlo la concentración total (fármaco libre + fármaco-proteína).

Sólo la fracción libre es capaz de unirse a los receptores. Por tanto, la intensidad de la respuesta será directamente proporcional a la concentración de fármaco libre en el plasma. Este es el fundamento de la monitorización de la terapéutica farmacológica a través de la medida de las concentraciones plasmáticas de los fármacos.

1.2. Volumen de distribución e influencia en la intensidad y duración del efecto farmacológico.

Un concepto muy útil para establecer la dosis de los fármacos es el volumen aparente de distribución, que expresa el volumen líquido en el que parece hallarse disuelto el fármaco tras su distribución. Aunque no siempre es una medida real (p. ejem. los fármacos que permanecen “secuestrados” en el compartimento intravascular debido a que se unen intensamente a las proteínas plasmáticas), en la práctica el volumen de distribución determina la cantidad de fármaco necesaria para alcanzar una concentración concreta a nivel de los receptores.

El volumen aparente de distribución puede ser calculado a través del principio de Fick :

$$\text{Volumen} = \text{Dosis/Concentración}$$

La unión a proteínas plasmáticas reduce la concentración plasmática de fármaco libre y, por tanto, aumenta el volumen aparente de distribución. Cuanto mayor sea dicha unión, mayor será el volumen aparente de distribución.

Existe una relación directa entre la concentración de fármaco a nivel del receptor y la intensidad de respuesta, y dado que: **Concentración = Dosis/Volumen**, es evidente que cuanto mayor es el volumen aparente de distribución, mayor dosis de fármaco será requerida para conseguir una respuesta concreta.

Estas consideraciones teóricas tienen interés práctico en situaciones como la hipoalbuminemia (ej.: la que se da en el síndrome nefrótico), en las cuales, las dosis habituales de los fármacos pueden desencadenar respuestas excesivas por lo que deberán practicarse los reajustes posológicos pertinentes. Ya que en una situación así, existe mucha mayor concentración de fármaco unido o de fármaco libre, capaz de difundir hacia los distintos compartimentos y por tanto, hay disminución del volumen de distribución. Esto implica que se debe reajustar la dosis de fármaco administrado para evitar una concentración plasmática mayor (hiperdosificación).

2. Fármaco a estudiar: Salicilato sódico

3. Objetivo y desarrollo de la práctica

Se pretende comprobar como la presencia de albúmina:

- a) Reduce la concentración de fármaco libre en el plasma.
- b) Aumenta el volumen de distribución
- c) Obliga a incrementar la dosis para conseguir la misma concentración que se alcanzaría si no existiese albúmina.

Para ello utilizaremos un modelo experimental en el que un compartimiento líquido es simulado mediante un matraz Erlenmeyer conteniendo un volumen concreto de líquido. Con dicho modelo es fácil crear dos situaciones opuestas que simulen el compartimiento de un organismo sin albúmina y con albúmina: bastará para ello tomar dos matraces Erlenmeyer, uno de los cuales contendrá un volumen concreto de agua destilada y el otro, un volumen similar de una solución de albúmina en agua destilada, a la concentración de 4 g/dl (similar a la del plasma humano: 3.5-4.8 g/dl). Como fármaco se utilizará salicilato sódico.

El alumno deberá:

- 1º Añadir 10 mg de fármaco a cada uno de los matraces.
- 2º Medir la concentración de salicilato libre en ambos matraces. En el sistema con albúmina, deberá precipitarse previamente el salicilato ligado con ácido tricloroacético y posterior centrifugación. Sobre el sobrenadante (salicilato libre) se practica la lectura.
- 3º Calcular el volumen aparente de distribución en ambos sistemas

4º Calcular la cantidad adicional de salicilato que deberá añadirse al sistema con albúmina para que la concentración final sea la misma en ambos sistemas.

4. Realización de la práctica

4.1. Material y reactivos necesarios:

Espectrofotómetro, centrífuga, 3 matraces erlenmeyer rotulados (A, B y C) y conteniendo un volumen desconocido, pero igual en todos, de agua destilada (matraz A) y solución de albúmina en agua destilada al 4% (matraces B y C), gradillas con tubos de ensayo, gradilla con tubos para medida de absorbancia, pipetas de 1 y 5 ml, rotulador marcador, agitador magnético, imanes.

Soluciones:

Nitrato férrico [40g/l]

Solución de reserva de salicilato sódico equivalente a [2mg/ml] de ácido salicílico

Patrón de trabajo de salicilato sódico equivalente a [0.2mg/ml] de ácido salicílico.

Ácido tricloroacético al 10%

4.2. Método:

a) Se toman dos matraces A y B, que simularan el comportamiento de un compartimento plasmático sin y con **albúmina**, respectivamente. El matraz A contendrá un volumen concreto de agua destilada (20 ml) y el B, un volumen similar de una solución de albúmina en agua destilada, a la concentración de 4 g/dl (similar a la del plasma humano: 3.5-4.8 g/dl). Otro matraz, matraz C, que se utilizará exclusivamente para preparar el blanco frente al que se leerá la concentración de fármaco libre existente en el matraz B, contendrá también albúmina.

b) Tomar 5 ml de **ácido salicílico** a partir de la solución de reserva de salicilato y añadirlos al matraz A y la misma cantidad de fármaco al matraz B. Un volumen similar de agua destilada al matraz C (la solución de fármaco es sustituida por un volumen similar de agua destilada). Agitar los tres matraces durante unos minutos hasta conseguir una mezcla homogénea.

c) En el matraz B, parte del ácido salicílico se hallará libre y parte unido a la albúmina. Puesto que nos interesa comparar la concentración de fármaco libre existente en el matraz B con la del matraz A (sin albúmina), los pasos siguientes tienen por objeto separar el ácido salicílico unido y preparar el blanco frente al que se leerá la concentración del ácido salicílico libre en el matraz B. Para ello:

1) Pipetear en dos tubos de ensayo 5ml del matraz B y C

2) Añadir a cada uno de los tubos 5ml de la solución de ácido tricloroacético al 10%.

3. Agitar vigorosamente y centrifugar a continuación ambos tubos a 8000 rpm durante 10 min.

4. Filtrar el sobrenadante (el correspondiente al matraz B contendrá ácido salicílico libre exclusivamente).

d) Numerar cinco tubos de ensayo (del 1 al 5).

e) Pipetear 5 ml de solución de nitrato férrico en cada uno de los 5 tubos de ensayo.

f) Pipetear 1 ml de agua destilada en el tubo 1 (el contenido de este tubo servirá como blanco para leer la concentración de ácido salicílico en los tubos 2 y 3).

g) Pipetear 1 ml de la solución de trabajo de salicilato [0.2 mg/ml] en el tubo 2 (patrón).

h) Pipetear 1 ml del matraz A en el tubo 3 (problema 1).

i) Pipetear 1 ml del sobrenadante del matraz B en el tubo 4 (problema).

j) Pipetear 1 ml del sobrenadante del matraz C en el tubo 5 (el contenido de este tubo servirá como blanco para leer la concentración de ácido salicílico en el tubo 4).

5. Lectura de la concentración de ácido salicílico

Se realizará mediante procedimiento espectrofotométrico basado en la formación de complejos de ácido salicílico con los iones férrico aportados por el nitrato férrico. Los complejos resultantes dan una coloración violeta que absorbe a 540 nm. Por consiguiente, el alumno deberá leer la absorbancia del patrón de trabajo de salicilato (tubo 2) y de las soluciones problema (tubos 3 y 4) contra sus respectivos blancos (tubos 1 y 5), a una longitud de onda de 540 nm.

La concentración de ácido salicílico en las soluciones problemas se calcula de la siguiente manera:

$$[\text{Absorbancia del problema}/\text{Absorbancia del patrón}] \times 0.2 \text{ mg/ml} = [\text{mg/ml}] \text{ de salicilato}$$

5.1. Procedimiento

1° Ajustar la longitud de onda del espectrofotómetro a 540 nm.

2° Ajustar el cero con el primer blanco (tubo 1).

3° Leer y anotar la absorbancia de las soluciones patrón y primer problema (tubos 2 y 3).

4° Ajustar el cero con el segundo blanco (tubo 5).

5° Leer y anotar la absorbancia del segundo problema (tubo 4).

6° Calcular las concentraciones de las dos soluciones problema.

7º Calcular el porcentaje de ácido salicílico libre y unido a la albúmina en el matraz B, tomando como referencia la concentración del matraz A (en él, todo el ácido salicílico está libre).

8º Aplicando el principio de Fick, calcular el volumen aparente de distribución correspondiente a las dos soluciones problema.

9º Calcular la cantidad (dosis) de ácido salicílico que debería haberse añadido al matraz B para conseguir una concentración de ácido salicílico similar a la del matraz A.

6. Resultados y comentarios a la práctica:

Absorbancias tubo 2:

tubo 3:

tubo 4:

Concentración problema 1 (tubo 3):

(Sin albúmina)

Concentración problema 2 (tubo 4):

(Con albúmina)

% de Ácido salicílico libre en el matraz B:

% de Ácido salicílico unido a la albúmina en el matraz B:

Vad (A):

Vad (B):

Dosis de Ácido salicílico que debería añadirse al matraz B, para conseguir una concentración de libre del mismo similar a la del matraz A

PRÁCTICA N°3

ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANALGÉSICA

Objetivos: Comprobar el efecto analgésico de los fármacos AINE en ensayos para el estudio de la nocicepción.

1. Conceptos a recordar

Se trata de un conjunto de fármacos cuyo prototipo es el ácido acetilsalicílico y que se agrupan todos bajo el nombre de AINE. Aunque la mayoría de estos fármacos comparten las tres acciones que los definen: analgésica, antiinflamatoria y antitérmica, su eficacia para cada una de ellas puede ser diferente, es decir, un fármaco concreto puede mostrar mayor actividad antiinflamatoria o analgésica que otro.

Se suelen prescribir sin control médico para aliviar dolores moderados o para bajar la fiebre; pero ojo a las reacciones adversas que pueden producir de intensidad y gravedad diversas.

2. Mecanismo general de acción de los AINE

Los principales efectos terapéuticos y muchas de las reacciones adversas pueden explicarse por su efecto inhibitorio de las ciclooxigenasas, enzimas que convierten el ácido araquidónico, que existe en las membranas celulares, en endoperóxidos cíclicos inestables, los cuales se transforman en prostaglandinas y tromboxanos, algunos de los cuales participan en los mecanismos patógenos de la inflamación, el dolor y la fiebre; por ello la inhibición de la síntesis de prostaglandinas por los AINE sería responsable de su actividad terapéutica. A su vez y dada la participación de estas PGs en determinados procesos fisiológicos, dicha inhibición sería también responsable de diversas reacciones adversas características de estos fármacos, en especial, a nivel gástrico, ya que estas PGs son protectoras de la mucosa gástrica.

2. Fármaco a estudiar: Acido acetilsalicílico (AAS)
Piroxicam

3. Animal de experimentación: Ratón

4. Realización de la práctica

4.1. Material y reactivos necesarios:

AAS, Piroxicam, CMC, Fenilquinona, Etanol, cánulas oral e i.p. para ratones, rotulador marcador, jaulas, cronómetros, papel de filtro, agitadores.

4.2. Método: Test de contorsiones por p-fenilquinona. Test de Siegmund.

a) Pesar 6 ratones y formar tres grupos de 2 ratones cada uno e identifique cada ratón con una marca de rotulador. Coloque los animales de cada grupo en jaulas distintas.

b) Administrar por vía oral CMC (tantas unidades como pesa el ratón) a los dos ratones del grupo I, AAS (100mg/kg) a los dos ratones del grupo II, y Piroxicam (50mg/kg) a los dos ratones del grupo III. Previamente se les enseñará la técnica de administración por vía oral. Se mantiene a los ratones en sus respectivas cajas durante 45 minutos.

	Peso	Hora de administración	Sustancia administrada	Hora de inyección de FQ
Nº 1			CMC	
Nº 2			CMC	
Nº 3			CMC	
Nº 4			CMC	
Nº 5			AAS	
Nº 6			AAS	
Nº 7			AAS	
Nº 8			AAS	
Nº 9			Piroxicam	
Nº 10			Piroxicam	
Nº 11			Piroxicam	
Nº 12			Piroxicam	

c) Pasados los 45 minutos, administrar por vía i.p. a cada ratón una solución de p-fenilquinona (4mg/kg preparada a partir de una solución madre de 2mg/ml en etanol). Coloque seguidamente a los animales en sus correspondientes jaulas, y a partir de los 5 minutos siguientes a la inyección de fenilquinona, se contabiliza durante 15 minutos el número de contorsiones o estiramientos. Estos se caracterizan por episodios intermitentes de rotación interna en extensión de una o ambas patas traseras, hiperextensión del cuello, arqueado del dorso y elongación del cuerpo, junto a la contracción de la musculatura abdominal de tal forma que el abdomen toca el cuerpo. Las respuestas se cuentan individualmente aunque se presentan episódicamente.

A fin de seguir de forma adecuada a los 6 ratones, cada componente del grupo se responsabilizará de un animal.

4.3. Preparación de material

A cada ratón se le administra tantas unidades como su peso. 1 ml equivale a 40 unidades.

CMC: 1% en agua destilada

AAS: 100 mg/kg = 4 mg/ml de CMC

Piroxicam: 50 mg/kg = 2 mg/ml de CMC

Fenilquinona: Solución madre: 2mg/ml etanol

Se coge 1 ml de esta solución madre, y se le añaden 11.5 ml de agua.

4.3. Resultados y comentarios a la práctica:

	Nº estiramientos	Nº estiramientos	Nº estiramientos	
	CMC	AAS	Piroxicam	Número total
Nº1		-	-	
Nº 2		-	-	
Nº 3		-	-	
Nº 4		-	-	
Nº 5	-		-	
Nº 6	-		-	
Nº 7	-		-	
Nº 8	-		-	
Nº 9	-	-		
Nº 10	-	-		
Nº 11	-	-		
Nº 12	-	-		