

- 14) SJOVALL, J., ALVAN, G. y WESTERLUND, D. (1985). Oral cyclacillin interacts with the absorption of oral Ampicillin, Amoxicillin and Bacampicillin. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 29: 495-502.
- 15) TSUJI, A., MIYAMOTO, E., KUBO, O., y YAMANA, T. (1979). GI absorption of  $\beta$ -lactam antibiotics III: kinetic evidence for «in situ» absorption of ionized species of monobasic Penicillins and Cefazolin from the rat small intestine and structure-absorption rate relationships. *J. Pharm. Sci.* 68 (7): 812-816.
- 16) TSUJI, A. y YAMANA, T. (1981). Gastrointestinal absorption of  $\beta$ -lactam antibiotics. En MITSUHASHI, S.:  *$\beta$ -Lactam Antibiotics*, Japan Scientific Societies Press, Tokio. Springer-Verlag, New York, 235-257.
- 17) UMEIWA, K., OGINO, O., MIYAZAKI, K. y ARITA, T. (1979). Intestinal absorption of several  $\beta$ -lactam antibiotics II. Absorption characteristics of amino-penicillins and amino-cephalosporins. *Chem. Pharm. Bull.* 27 (9): 2.177-2.182.

## RELACION ESTRUCTURA QUIMICA-ACTIVIDAD ANALGESICA DE ALGUNOS DERIVADOS DEL ACIDO N-PIRROLIL ACETICO

Por J. M. Serrano (1)  
H. J. Miguélez (1)  
A. Negro (2)  
M. T. Terán (2)  
D. Santiago (1)

### INTRODUCCION

La introducción de nuevos agentes en el arsenal terapéutico presupone y requiere un amplio estudio de sus propiedades químicas y biológicas. Hoy día, casi todos los productos de síntesis se obtienen a través de líneas de analogía estructural, en las que existe un cabeza de serie sobre el que se van realizando modificaciones químicas hasta obtener un grupo de derivados con características biológicas similares.

Por ello, continuando los estudios realizados en trabajos anteriores sobre la actividad analgésica de algunos derivados N-pirrolil sustituidos de ácidos orgánicos<sup>2,3</sup>, en el presente trabajo se investiga la relación entre el coeficiente de reparto octanol/agua (como factor dependiente de la estructura química) y la actividad analgésica de cinco productos cuya estructura base es el ácido N-pirrolil acético y cuyas fórmulas desarrolladas se muestran en la Figura I. Se trata de una primera aportación que se completará posteriormente con el estudio de la inhibición del sistema de la prostaglandín sintetasa.

### MATERIAL Y METODOS

#### 1.-Determinación del coeficiente de reparto

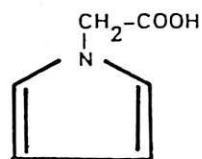
Para ello se han preparado cinco disoluciones tampón de fosfatos a pH 7,0, 6,5, 6,0, 5,5 y 5,0 con una fuerza iónica constante de 0,1 y una concentración 0,04M de fosfatos.

En cada uno de estos tampones se ha realizado la disolución de los productos utilizados a las concentraciones que se indican en la Tabla I.

(1) Departamento de Farmacología y Toxicología. Universidad de Córdoba.

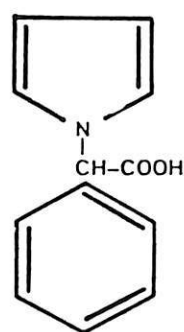
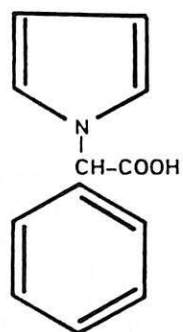
(2) Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular, Fisiología y Farmacología. Universidad de León.

ACIDO N-PIRROLIL ACETICO



ACIDO

$\alpha$ -(N-PIRROLIL)-FENIL ACETICO  $\alpha$ -(N-PIRROLIL)-p-CL-FENIL ACETICO



ACIDO

$\alpha$ -(N-PIRROLIL)-FENIL PROPANOICO  $\alpha$ -(N-PIRROLIL)-p-CL-FENIL PROPANOICO

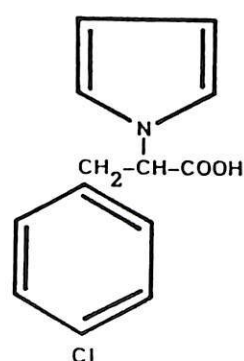
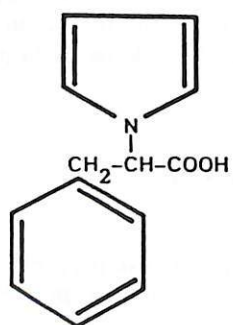


Figura 1.- Estructura química de los fármacos estudiados.

TABLA I  
Pesos moleculares y concentraciones utilizadas para la determinación de los coeficientes de reparto de derivados del ácido N-pirrolil acético.

Productos	Peso molecular	Concentración (M)
Acido N-pirrolil acético	124,12	$1,007 \cdot 10^{-3}$
Acido $\alpha$ -(N-pirrolil)-fenil acético	201,22	$6,212 \cdot 10^{-4}$
Acido $\alpha$ -(N-pirrolil)-p-Cl-fenil acético	235,67	$5,304 \cdot 10^{-4}$
Acido $\alpha$ -(N-pirrolil)-fenil propanoico	215,25	$5,807 \cdot 10^{-4}$
Acido $\alpha$ -(N-pirrolil)-p-Cl-fenil propanoico	249,70	$5,006 \cdot 10^{-4}$

De cada una de estas soluciones se han tomado 10 ml. que se han introducido en matraces Erlenmeyer, junto con 10 ml. de octanol saturado de agua, procediendo a su posterior cierre manteniéndose en agitación durante 2 horas en un baño termostatizado a 25°C., según la técnica de Tsuji y col. (1977) <sup>7</sup>.

Una vez transcurrido este tiempo y producida la decantación, se han tomado alícuotas de la fase acuosa y de la fase orgánica, que se han centrifugado durante 5 minutos a 250 g.

Las concentraciones de los fármacos se han determinado en un espectrofotómetro Bausch and Lomb, Spectronic 2.000, a las siguientes longitudes de onda: ácido N-pirrolil acético, 250 nm; ácido  $\alpha$ -(N-pirrolil)-fenil acético, 275 nm; ácido  $\alpha$ -(N-pirrolil)-p-Cl-fenil acético, 250 nm; ácido  $\alpha$ -(N-pirrolil)-fenil propanoico, 250 nm y ácido  $\alpha$ -(N-pirrolil)-p-Cl-fenil propanoico, 265 nm. Para ello, con anterioridad se han obtenido las rectas de calibrado en octanol y en los tampones para cada ácido.

Estas longitudes de onda no se corresponden con los máximos de absorción de los productos, ya que todos ellos están en las proximidades de los 200 nm <sup>3</sup>. No obstante, a las longitudes de onda señaladas, se ha comprobado que la absorción de la luz por los productos ensayados en un rango de concentraciones acorde con las obtenidas después de los ensayos se ajusta perfectamente a la ley de Beer-Lambert.

Los coeficientes de reparto aparentes (Pap) se han determinado relacionando la concentración de fármaco en la fase orgánica con la de la fase acuosa. A partir de estos coeficientes de reparto aparentes se han calculado los coeficientes de reparto verdaderos de las formas no ionizada (Pni) e ionizada (Pi), aplicando la siguiente ecuación (Tsuji y col. 1977 <sup>7</sup>).

$$\text{Pap} ([\text{H}^+] / \text{Ka} + 1) = \text{Pni} ([\text{H}^+] / \text{Ka}) + \text{Pi}$$

2.-Determinación de la actividad analgésica

Se ha realizado utilizando el test de Siegmund y col. (1957) <sup>6</sup>, modificado por Koster y col. (1959) <sup>1</sup>, que sustituye la 2-fenil-1,4-benzoquinona por ácido acético al 0,5%.

Se han utilizado 60 ratones blancos (NRI), hembras, con pesos comprendidos entre 20-30 g, suministrados por Antibióticos S.A., distribuidos al azar en seis lotes de diez animales cada uno.

Antes de realizar los ensayos, los animales fueron ayunados durante 15-18 horas, disponiendo de agua «ad libitum».

Los productos utilizados se han disueltos en una mezcla propilenglicol/agua destilada (4:1 v/v), a la concentración de 10 mg/ml. Cada animal recibió el producto corres-

pondiente, por vía oral, a la dosis de 100 mg/Kg p.v., excepto los del lote testigo que recibieron únicamente el vehículo a la dosis de 0,01 ml/g p.v.. La disolución de ácido acético se administró i.p. a la dosis de 0,01 ml/g p.v., 30 minutos después de los fármacos, midiéndose el número de estiramientos de cada animal entre los 15 y 45 minutos después de la administración de ácido acético.

## RESULTADOS

Los valores de los coeficientes de reparto aparentes, a los distintos valores de pH, para los productos ensayados, aparecen en la Tabla II. En ella, igualmente, se indican los valores de los coeficientes de reparto verdaderos de las formas no ionizada e ionizada, así como la razón entre estos dos parámetros.

**TABLA II**  
Valores de los coeficientes de reparto aparentes y verdaderos de los derivados del ácido N-pirrolil acético.

Productos	P <sub>ap</sub>					P <sub>ni</sub>	P <sub>i</sub>	P <sub>ni</sub> /P <sub>i</sub>
	pH7,0	pH6,5	pH6,0	pH5,5	pH5,0			
Acido N-pirrolil acético	0,68	0,55	0,68	0,47	0,92	5,02	0,61	8,23
Acido α-(N-pirrolil)-fenil acético	0,12	0,12	0,12	0,63	1,20	36,70	0,10	367,00
Acido α-(N-pirrolil)-p-Cl-fenil acético	0,29	0,23	0,90	2,00	4,60	223,60	0,29	771,03
Acido α-(N-pirrolil)-fenil propanoico	2,25	0,25	0,53	1,20	2,83	203,20	0,24	846,67
Acido α-(N-pirrolil)-p-Cl-fenil propanoico	0,36	1,60	3,80	7,17	22,15	124,00	0,43	288,37

La Tabla III muestra los valores medios del número de estiramientos de cada lote, así como la protección que produce cada ácido frente al lote testigo y la potencia analgésica relativa en relación equimolar, en tanto por ciento con respecto al ácido α-(N-pirrolil)-p-Cl-fenil acético (que se toma como 100).

**TABLA III**  
Actividad analgésica de los productos ensayados

Productos	Estiramientos	% Protección	Potencia relativa
Acido N-pirrolil acético	12,9 ± 4,8	44,15	29,35
Acido α-(N-pirrolil)-fenil acético	5,3 ± 1,5	77,05	83,05
Acido α-(N-pirrolil)-p-Cl-fenil acético	4,8 ± 1,1	79,22	100,00
Acido α-(N-pirrolil)-fenil propanoico	7,6 ± 3,9	67,09	77,35
Acido α-(N-pirrolil)-p-Cl-fenil propanoico	8,9 ± 4,4	61,47	82,21
Lote testigo	23,1 ± 4,2	-----	-----

## DISCUSION

De la actividad analgésica mostrada por los productos empleados se observa que la introducción de radicales fenilo y benzoilo, en el carbono α del ácido N-pirrolil acético incrementa su actividad, más por la introducción del radical fenilo (para formar el ácido α-(N-pirrolil)-fenil acético que por la introducción de un grupo benzoilo (para formar el ácido α-(N-pirrolil)-fenil propanoico).

Igualmente, la introducción de un átomo de cloro en posición para, en los anillos bencénicos de estos dos nuevos ácidos, incrementa todavía más la potencia analgésica relativa.

Desde un punto de vista cuantitativo, y dado que las modificaciones químicas introducidas originan incrementos en la razón de los coeficientes de reparto verdaderos entre las formas no ionizada e ionizada, hemos realizado diversos procedimientos de ajuste a la línea recta y a la parábola, de la potencia analgésica «versus» la razón P<sub>ni</sub>/P<sub>i</sub> y algunas transformaciones de éstos.

De esta manera, hemos estudiado los ajustes lineal y parabólico entre la potencia analgésica relativa (en abscisas) y la razón de los coeficientes de reparto (en ordenadas). En este caso, el ajuste parabólico entre dicha potencia analgésica relativa y la relación P<sub>i</sub>/P<sub>ni</sub> es el óptimo, puesto que presenta un coeficiente de correlación de 0,9991, y un coeficiente de determinación de 0,9982, siendo ambos valores más elevados que en el ajuste lineal (0,9488 y 0,9003, respectivamente).

No obstante, Pacheco (1973)<sup>4</sup>, Wepierre (1981)<sup>8</sup> y Santiago (1984)<sup>5</sup> entre otros autores, indican que la actividad es la variable que depende de la modificación estructural, y por lo tanto, hemos de considerar el hecho de que los coeficientes de reparto no dependen de la potencia analgésica relativa, como hasta ahora aparece, sino que, en todo caso sería al contrario, es decir, la potencia analgésica relativa puede depender en mayor o menor grado de los citados coeficientes, que son un índice de la liposolubilidad, que condiciona el paso de los electrolitos débiles a través de las membranas celulares.

En este sentido, hemos comprobado que cuando se relacionan los coeficientes de reparto (como variable independiente) con la potencia analgésica relativa (como variable dependiente), el mejor ajuste se produce cuando se enfrenta P<sub>i</sub>/P<sub>ni</sub> en abscisas con la inversa de la potencia analgésica relativa en ordenadas, y que, tanto el ajuste a la recta como a la parábola son muy similares, ya que los coeficientes de correlación obtenidos son de 0,9946 para la recta y de 0,9948 para la parábola.

En consecuencia, podemos indicar que si bien la mejor relación es la que se establece cuando aplicamos la siguiente correlación parabólica:

$$P_i/P_{ni} = 3,2607 \times 10^{-5} (\text{Pot. an.}^*)^2 - 5,9092 \times 10^{-3} (\text{Pot. an.}^*) + 0,2667$$

Resulta más práctico utilizar la expresión lineal:

$$1/(\text{Pot. an.}^*) = 0,186836 (P_i/P_{ni}) + 0,011377$$

que ofrece un modelo lineal sencillo a la hora de predecir, en esta serie, cambios en la potencia analgésica relativa de sus componentes, en función de los coeficientes de reparto.

## RESUMEN

En el presente trabajo se estudia la relación estructura química-actividad analgésica (test de Siegmund) de algunos derivados del ácido N-pirrolil acético.

Partiendo de la estructura básica del ácido N-pirrolil acético, se observa que la introducción de grupos fenilos o benzoilos, en el carbono α, incrementa significativamente la potencia analgésica relativa, al igual que la posterior incorporación de un átomo de cloro en posición para, en este núcleo aromático. Por otra parte, la actividad analgésica relativa ha sido correlacionada cuantitativamente con el cociente de los coeficientes de reparto octanol/agua correspondientes a las formas ionizada y no ionizada (P<sub>i</sub>/P<sub>ni</sub>):

$$1/(\text{Pot. an.}) = 0,186836 (P_i/P_{ni}) + 0,011377$$

\* Pot. an. = Potencia analgésica relativa

## STRUCTURE-ANALGESIC ACTIVITY RELATIONSHIP OF SOME N-PYRROLYL ACETIC ACID DERIVATIVES

### SUMMARY

The relationship between analgesic activity (Siegmond test) and chemical structure of some N-pyrrolyl acetic acid derivatives is studied in this paper.

Starting from a N-pyrrolyl acetic acid structure, the introduction in the  $\alpha$  carbon of phenyl or benzoyl groups increased significantly the analgesic potency of this molecule. Further incorporation of a p-chlorine atom in the aromatic nucleus has also been interesting in order to improve this pharmacological action. The analgesic activity has been quantitatively related to the octanol/water partition coefficients ratio between ionized and non ionized forms (Pi/Pni):

$$1/(\text{An. Pot.}) = 0,186836 (\text{Pi/Pni}) + 0,011377$$

### BIBLIOGRAFIA

- 1) KOSTER R., ANDERSON M. & DE BEER E. J. (1959). Acetic acid for analgesic screening. *Fed. Proc.* 18: 412
- 2) MIGUELEZ J., TERAN M. T., NEGRO A., SERRANO J., CABANAS F. & SANTIAGO D. (1985). Ensayo preliminar de la actividad analgésica de algunos derivados del ácido fenil acético y otros análogos estructurales. *An. Fac. Vet. León* 21: 125-132.
- 3) NEGRO A. (1985). Síntesis química, propiedades físico-químicas y farmacológicas de ácidos N-pirrol sustituidos. *Tesis Doctoral*, Universidad de León.
- 4) PACHECO H. (1973). *La pharmacologie moléculaire*. Presses Universitaires de France. Pag. 174-215.
- 5) SANTIAGO D. (1984). *Farmacología veterinaria*. Tipografía Católica. Córdoba. Pag. 54-58.
- 6) SIEGMUND E., CADMUS R. & LU G. (1957). A method for evaluating both non-narcotic and narcotic analgesics. *Proc. Soc. Exp. Bio. Med.* 95: 729-731.
- 7) TSUJI A., KUBO O., MIYAMOTO E. & YAMANA T. (1977). Physicochemical properties of  $\beta$ -Lactam antibiotics: Oilwater distribution. *J. Pharm. Sci.* 66 (12): 1.675-1.678.
- 8) WEPIERRE J. (1981). *Abrégé de pharmacologie générale et moléculaire*. 2.ª ed. Masson, Paris. Pag. 186-199.

## VARIABILIDAD GENETICA DE LAS RAZAS Y AGRUPACIONES CAPRINAS AUTOCTONAS ESPAÑOLAS

Por M. J. Tuñón (1)  
P. González (1)  
M. Vallejo (2)

### INTRODUCCION

El análisis de los sistemas genéticos de ciertas proteínas e iones conocidos permite caracterizar, de una forma precisa, el patrimonio hereditario de las razas.

La medida de la variación de las frecuencias alélicas de los distintos loci que controlan el polimorfismo bioquímico sanguíneo, constituye un método eficaz para calcular un índice sintético de los datos que refleje los grados de semejanza o de diferencia genética global entre las poblaciones.

Los resultados de esta comparación racial aportan, por otro lado, algunas indicaciones importantes a propósito de la variabilidad genética existente en cualquier especie. Estas indicaciones son particularmente útiles, ya que el patrimonio genético de las especies de interés zootécnico tiende a empobrecerse rápidamente como consecuencia de la desaparición de ciertas razas y la homogeneización de otras.

Para estimar la variabilidad genética de las poblaciones, uno de los parámetros más utilizados es el promedio de heterocigosis por locus (Nei y Roichoudhury<sup>14</sup>).

El objetivo principal del presente trabajo ha sido cuantificar la tasa de heterocigosis existente en las razas y agrupaciones autóctonas españolas, mediante sistemas genéticos sanguíneos, y comparar, en lo posible, dichas estimas con las obtenidas para otras poblaciones caprinas extranjeras.

Dentro de nuestras limitaciones, se ha intentado estudiar el mayor número de loci posibles, sin elegir a priori tan solo aquellos en los que era previsible la existencia de polimorfismo, con el fin de no sesgar las estimaciones de la variabilidad.

(1) Dpto. Bioquímica y Biología Molecular, Fisiología y Farmacología  
(2) Dpto. Producción Animal (Universidad Complutense de Madrid)