

723



---

FACULTAD DE QUIMICA

## Identificación Toxicológica de Warfarina

T E S I S

Que para obtener el título de :

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

p r e s e n t a :

SANTA GARCIA MARTINEZ





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CLAS. Tesis  
ADQ. 1975  
FECHA             
PROC. M7-120



QUÍMICA

Jurado asignado según el tema:

Presidente      Profr. : Ignacio Diez de Urdanivia.  
Vocal            "      : Etelvina Medrano de Jaimes.  
Secretario      "      : Enrique Calderón García.  
1/er. Suplente   "      : César A. Domínguez Camacho.  
2/o. Suplente    "      : Miguel A. Cevallos Leal.

Tema desarrollado en los laboratorios de la Procuraduría  
General de Justicia de la República Mexicana.

Sustentante            : Santa García Martínez.  
Asesor del tema        : Q. F. B. Ignacio Diez de Urdanivia

A LA MEMORIA DE MIS PADRES

A MIS HERMANAS

A MI HIJA Y A SU PADRE

Porque representan lo  
mejor de mi vida.

AL LICENCIADO LUIS CANO VAZQUEZ

Por el franco, paternal y valioso -  
apoyo que me brindó para realizar  
esta obra.

Al Ing. MIGUEL JIMENEZ Y JIMENEZ,  
A la Srta. ADELA SILVA OLMEDO,

Por su estimulante y alentadora labor en el logro de este trabajo.

AL SR. LICENCIADO PEDRO OJEDA PAULLADA

Con mis agradecimientos por haber permitido que este trabajo se desarrollara en los Laboratorios de la Institución a su muy digno cargo.

Al querido Maestro:

IGNACIO DIEZ DE URDANIVIA,

por su amplia colaboración en la  
dirección de este trabajo.

## I N D I C E

	Pág.
I. - INTRODUCCION	3
II. - HISTORIA	5
III. - CARACTERISTICAS FISICAS Y QUIMICAS DE LA WARFARINA.	9
IV. - FORMAS DE PRESENTACION Y USOS DE LA WAR FARINA.	12
V. - FARMACOLOGIA DE LA WARFARINA	
1. - ACCION SOBRE EL ORGANISMO	14
2. - FARMACODINAMIA.	39
3. - RELACION ENTRE ESTRUCTURA QUIMICA Y EFECTOS FARMACODINAMICOS DE LA WARFARINA	55
4. - METABOLISMO Y METABOLITOS DE LA - WARFARINA	60

VI. -	TOXICIDAD	
	1) EXPERIMENTOS EN PERROS Y CERDOS	85
	2) OBSERVACIONES CLINICAS	95
	3) OBSERVACIONES ANATOMOPATOLOGICAS	97
VII. -	TECNICAS DE IDENTIFICACION DE WARFARINA.	102
	1) EN PRODUCTO TECNICO	115
	2) EN PRODUCTOS COMERCIALES	111
	3) EN PRODUCTOS BIOLÓGICOS	124
VIII. -	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	144
IX. -	BIBLIOGRAFIA	156

## I. - INTRODUCCION

El aumento cada vez mayor en el uso de anticoagulantes derivados de la coumarina y de estos es especialmente la Warfarina, en la lucha diaria contra la dañina influencia de los roedores que tanto daño causan a comerciantes, amas de casa y agricultores ha creado serias dificultades en dicho sector humano, pues si bien los productos elaborados a base de este compuesto se han preparado para ser usados con un máximo de seguridad, la ignorancia o el descuido en el manejo y aplicación de los mismos puede ser de fatales consecuencias.

El riesgo en el uso de rodenticidas a base de Warfarina es considerable para los animales domésticos, especialmente perros, gatos y cerdos debido a que estos productos son muy apreciados como alimentos por dichos animales, además; cuando tienen gran libertad de movimientos pueden fácilmente llegar a comerlos y en algunas ocasiones pueden comer ratas o ratones que han muerto por ingestión del rodenticida.

También es frecuente que las formulaciones preparadas en forma

de polvo se mezclen por descuido o por accidente con los alimentos de estos animales, en una ocasión la formulación a base de Warfarina se molió junto con el alimento para cerdos, muriendo 56 de un total de 120.

Se han dado casos de suicidio con Warfarina y en una ocasión se produjo contaminación de harina de trigo que al ser utilizada en la elaboración del pan familiar dió por resultado que 14 personas cayeran enfermas y dos de ellas perdieran la vida.

Así pues el trabajo que presento a la digna consideración de ustedes, está encaminado a proporcionar un mayor conocimiento de la acción y efectos patológicos de la Warfarina así como su estimación cuantitativa en productos técnicos, formulados y productos biológicos en caso de sospecha de intoxicación o muerte por ingestión de dicho rodenticida.

Esta substancia está en contacto con el ser humano diariamente y la expone a graves intoxicaciones, razón por la que es necesario hacer del conocimiento público sus propiedades tóxicas con el fin de que se proteja. Por ello es que el señor Licenciado Don Pedro Ojeda Paullada, Procurador General de la República permitió que el presente trabajo se realizara en los laboratorios de la oficina de Peritos de la Procuraduría General de la República.

## II. - HISTORIA

En las praderas de North Dakota (Estados Unidos) y en las de Alberta (Canadá) el ganado se vió afligido por una afección muy frecuente que se agudizó especialmente en el invierno de los años de 1921 y 1922.

Este padecimiento se observó generalmente en los animales jóvenes los cuales presentaban tumefacciones subcutáneas que a menudo eran denominadas como "Pierna Negra".

Cuando se hacía la autopsia de estos animales, se descubrían hemorragias internas más o menos extensas en los tejidos y entonces se diagnosticaba la enfermedad como "Septicemia Hemorrágica".

En la misma zona solía suceder que animales aparentemente sanos se desangraban hasta morir, después de operaciones como castración o aserrado de los cuernos.

Los primeros investigadores que estudiaron estos padecimientos

fueron Schofield de 1922 a 1924, Roderick de 1921 a 1931, Roderick y Shalk en 1931.

Schofield encontró que los animales que comían trébol dulce de las variedades *Melilotus officinales* y *Melilotus alba*, en forma de heno o ensilado que se había contaminado con mohos, adquirirían el padecimiento que se caracterizaba por la disminución progresiva del poder de coagulación de la sangre después de 50 a 60 días de ingerir el heno de trébol dulce enmohecido.

El pensó que probablemente los hongos producirían alguna sustancia capaz de reducir la actividad coagulante de la sangre. La presencia de los hongos sobre el trébol dulce fué pues por consiguiente considerada como señal de peligro a partir de entonces.

En 1931, Roderick llegó a la conclusión de que la reducción de la actividad coagulante de la sangre se debía a la presencia de alguna o algunas sustancias que se formaban en el trébol dulce echado a perder durante el almacenaje y que esta sustancia originaba una reducción en la concentración de protrombina en la sangre. Esta conclusión fue confirmada por Quick en el año de 1937.

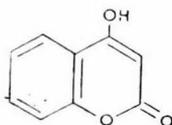
Schofield y Roderick encontraron que si el padecimiento no estaba muy avanzado, los animales podían salvarse si se les practicaba una transfusión de sangre de animales sanos.

En 1933, Karl Paul Link y sus colaboradores iniciaron las inves

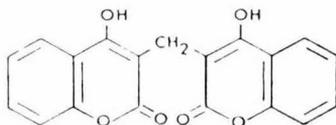
tigaciones tendientes a encontrar la sustancia que causaba el hasta entonces desconocido y llamado "Padecimiento del Trébol Dulce" en la Universidad de Wisconsin.

La investigación fué intensa y exhaustiva y se siguió hasta el año de 1941 cuando Campbell y Link lograron aislar la sustancia anticoagulante del trébol dulce y cuando Stahmann, Huebner y Link la identificaron y la sintetizaron.

Esta sustancia es la 4 - hidroxí - coumarina



y la sustancia que se forma por la acción de los hongos en el trébol dulce almacenado, es un derivado de la 4 - hidroxí - coumarina: el 3,3 metilénbis 4 - hidroxícoumarina, hoy conocido como Dicumarol y cuya fórmula es la siguiente:



En 1948, O'connor parece ser el primero que trata de hacer un rodenticida a base de un anticoagulante, encontrando que una dosis relativamente grande de Dicumarol no tenía efecto tóxico sobre las ratas Albinas, pero que cuando se daban pequeñas dosis diarias: 2mg/kg. de pe

so, el animal moría en un promedio de 14 días después de la primera dosis. Por lo tanto la dosis letal era de 28 mg. /Kg. de Dicumarol. Si se daba a las ratas la misma dosis distribuída en 3 dosis sucesivas, la capacidad de coagulación se reducía pero los animales lograban sobrevivir. En consecuencia, la dosis letal tenía un gran efecto cuando se daba en -pequeñas dosis diarias o si se administra en una sola dosis.

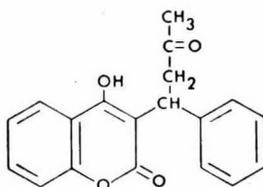
La Warfarina, uno de los derivados de la 4 - hidroxycoumarina, substituídos en la posición 3 fué sintetizada en la Universidad de Wisconsin en el año de 1944 por Ikawa, Stahmann y Link.

Este compuesto que en la experimentación se denominó "Com - puesto 42" demostró tener una toxicidad mucho mayor para la rata blanca que la del Dicumarol. La dosis letal media para ratas de campo y ratas grises se obtuvo con 5 dosis diarias de 1mg/Kg. o con una sola dosis de 5.0 a 6.0 mg. /Kg. de peso con lo cual se volvió y aún es el princi--pal producto utilizado en el campo de los rodenticidas.

Este producto fue patentado en 1947 con el nombre de "Warfari-na". La patente fue hecha por la Wisconsin Alumini Research Foundation (W. A. R. F. ) de ahí el nombre de "Warfarina".

### III. - CARACTERISTICAS FISICAS Y QUIMICAS DE LA WARFARINA.

La Warfarina: 3 - (alfa acetnilbenzil) 4 - hidroxicoumarina es - un ácido débil con la siguiente fórmula desarrollada:

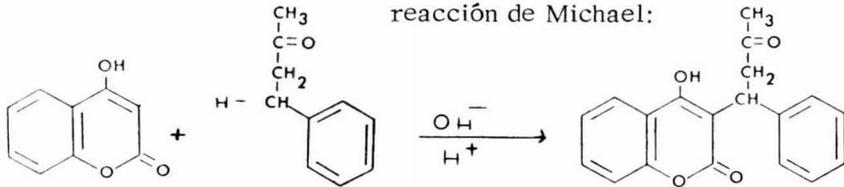


Fórmula empírica	$C_{19}H_{16}O_4$
PESO Molecular	308.22
Nombre químico	3 - (Alfa acetnilbenzil) 4 - hidroxicoumarina.
Sinónimos:	El nombre común aprobado por la I. S. O. es Warfarina. En Francia se conoce como Coumafene. En la Unión Soviética y en las Islas Neerlandesas como Zoocoumarina.

Otros nombres son Marevan, Coumadina y Warf 42.

Síntesis:

Se prepara por condensación de la 4-hidroxicoumarina con benzalecetona en condiciones ácidas o básicas por una reacción de Michael:



La forma racémica d, l, es sólida, cristalina, incolora, inodora e insípida.

Su punto de fusión es de 159 - 161 °C.

Es prácticamente insoluble en agua, benceno, tetracloruro de Carbono y eter de petróleo:

1.7 mg. /100 ml. de agua a 20 °C

4.0 mg. /100 ml. de agua a 40 °C

7.2 mg. /100 ml. de agua a 70 °C

0.3 mg. /100 ml. de benceno a 20 °C

0.015 mg. /100 ml. de tetracloruro de carbono.

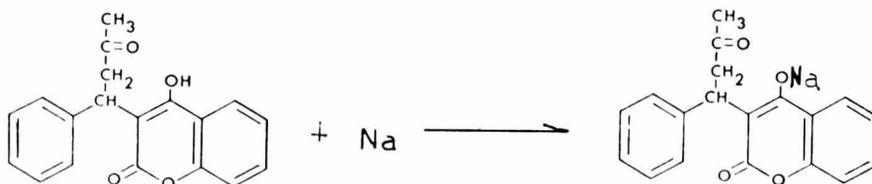
0.00125 mg. /100 ml. de eter de petróleo.

Es fácilmente soluble en acetona y en dioxano:

6.5 mg. /100 ml. de acetona a 20 °C.

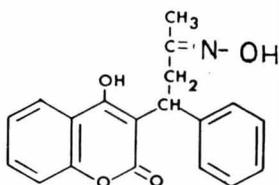
10.0 mg. /100 ml. de Dioxano

Su forma enólica es ácida y forma sales con los metales:

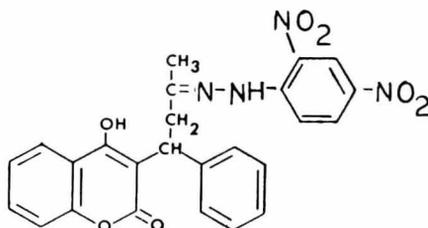


La sal de sodio formada es soluble en agua, pero insoluble en solventes orgánicos.

La forma cetónica da la oxima correspondiente de punto de fusión 181 - 183 °C:



Con la 2, 4 dinitrofenil hidrazina da la 2, 4 dinitrofenilhidrazona de punto de fusión 205 - 210 °C:



#### IV. - FORMULACIONES Y USO DE LA WARFARINA .

##### A) RODENTICIDAS.

La Warfarina se vende bajo varias marcas como concentrados - cuando contiene 0.5% de principio activo, en forma de polvos o en forma de soluciones acuosas de sus sales de sodio.

Los cebos se preparan mezclando el concentrado con una base - adecuada generalmente en proporción de 1: 19 con lo cual su concentración viene a ser de 0.025% como preservativo se adiciona un 0.3 a 0.5% de para nitro fenol.

A menudo el concentrado se prepara en granulados que se esparcen o extienden en los lugares frecuentados por las ratas, estos preparados se adhieren a las patas y la cola de las ratas y son ingeridos cuando se lamen para limpiarse .

En almacenes y establos donde las ratas tienen acceso ilimitado a la comida pero no al agua, la Warfarina se proporciona en forma de so

lución acuosa.

b) MEDICAMENTOS.

Para uso en el tratamiento de padecimiento de las coronarias, -  
embolia pulmonar y en la prevención de coagulación de la sangre en el  
uso de válvulas artificiales en el corazón.

Tabletas 25 mg. de W. como ácido libre o como sal de sodio. *cu*

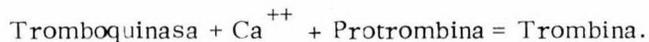
Soluciones.

## V. - FARMACOLOGIA DE LA WARFARINA

### 1. - MODO DE ACCION DE LA WARFARINA.

En el organismo de los mamíferos, la Warfarina produce la misma acción que produce la deficiencia de vitamina K: se inhibe la síntesis de protrombina, el complejo de proteínas plasmáticas especialmente importante en la coagulación de la sangre. La protrombina actúa como precursora de la enzima trombina que convierte el fibrógeno en fibrina.

El proceso de coagulación de la sangre es sumamente complicado y existen varias teorías para explicarlo, la primera y que podemos considerar como la "Teoría Clásica" porque reúne los conocimientos adquiridos al final del siglo pasado sobre la coagulación de la sangre es la de Morawitz basada en la sencilla ecuación:



Esta teoría estuvo vigente por muchos años hasta que la tremenda expansión de conocimientos acerca de la coagulación de la sangre la

hizo inadecuada, pero sus principios básicos siguen siendo una guía útil hasta nuestros días.

Seegers en estudios sobre la coagulación de la sangre con factores de coagulación de la sangre son la trombina y la autotrombina C y que todos los demás factores excepto el Factor VIII o Cofactor I de las plaquetas y el Factor V o AC Globulina son derivados de la protrombina.

Mc Farlane, Davie y Rattnof proponen la Teoría de la Cascada en la que postulan que la coagulación principia con la actividad del Factor XII o Factor Hagerman por un efecto de superficie de contacto, haciendo que éste, cambie a una enzima que activa al siguiente Factor XI al estado enzimático activo que a su vez activa al siguiente y así sucesivamente. En consecuencia, cada factor se vuelve activador hasta que se llega al paso final que es la conversión de Protrombina a trombina.

En resúmen, podemos decir que los aspectos fundamentales del proceso son los siguientes: la Tromboplastina, activador de la coagulación que algunos autores consideran idéntica a la cefalina, se forma por la destrucción de las plaquetas al entrar en contacto con una superficie que la sangre humedece o con los tejidos dañados.

Esta substancia induce la conversión de la Protrombina que se encuentra en la sangre a Trombina, la cual tiene ciertas propiedades enzimáticas; en esta conversión intervienen los iones calcio.

La trombina actúa luego sobre la proteína plasmática soluble - que es el Fibrinógeno convirtiéndolo en Fibrina, proteína fibrilar insoluble.

El coágulo es pues una red de fibras de fibrina en las cuales se detienen los corpúsculos de la sangre y el resto del plasma.

Para la determinación de la coagulación de la sangre se usa a menudo el Método de un solo paso de Quick que se considera el más adecuado en el control de anticoagulantes porque es rápido, sencillo y da resultados reproducibles, o alguna de sus modificaciones.

De acuerdo a Quick, la velocidad de coagulación depende del contenido de protrombina en la sangre.

El denomina "Tiempo de Protrombina" al tiempo (en segundos) que transcurre antes de la coagulación de la sangre.

Puede determinarse también en relación al tiempo de coagulación de la sangre normal como "Índice de Protrombina".

$$\text{Índice de Protrombina} = (\text{T. P. N.} / \text{T. P. E.}) 100$$

T. P. N. = Tiempo de protrombina en sangre normal.

T. P. E. = Tiempo de protrombina en sangre de prueba.

Para la sangre normal el tiempo de protrombina es igual a 100.

A mayor inhibición de coagulación de la sangre, los tiempos de protrombina son mayores y los índices de protrombina son menores.

En la actualidad se sabe que el tiempo de protrombina no depende únicamente de el contenido de protrombina en la sangre sino que también interviene la actividad o contenido de Fibrinógeno, del Factor V o Proaccelerina y del Factor VII o Proconvertina y se han ideado métodos que determinan la actividad de estos factores solos o en conjunto, como son los métodos de Ware, Koller, Loeliger, Owren y otros.

Sin embargo, como dijimos antes el método de Quick es el que se usa generalmente porque es, además de rápido, sencillo y reproducible, muy sensible a la disminución del contenido de factor VII o Proconvertina que es el factor que disminuye primero en la administración de anticoagulantes del tipo de la coumarina.

Los tiempos de Protrombina normales en seres humanos, de acuerdo al método de Quick son: de 11 a 12 segundos y de 11 a 16 segundos en perros.

Debido a que la estructura química entre la Warfarina y la vitamina K es muy semejante, se ha pensado que la Warfarina actúa como antimetabolito natural de la vitamina K en el sistema enzimático responsable de la síntesis de las proteínas plasmáticas que integran el Complejo Protrombina, de manera semejante a la función de antimetabolitos que

tienen las sulfonamidas en las bacterias, compitiendo con el ácido fólico.

Según esta teoría el organismo es incapaz de distinguir entre las dos sustancias permitiendo que la Warfarina se una a las enzimas en las cuales la vitamina K debería entrar inactivándolas de ese modo.

Es este efecto antagonista de la vitamina K lo que se utiliza en el combate de los roedores.

Cuando estos animales ingieren dosis suficientes de Warfarina para hacer la sangre esencialmente incoagulable, presentan hemorragias internas y externas espontáneas acompañadas de emblanquecimiento y la lsitud seguidas de la muerte aparentemente sin sufrimiento.

Las proteínas componentes del Complejo Protrombina cuya síntesis se inhibe a nivel celular por acción de la Warfarina son cuatro:

Protrombina o Factor II

Preconvertina o Factor VII

Christmas Factor o Factor IX (Autoprotrombina II)

Stuart Factor o Factor X.

Y cuyos niveles de concentración disminuyen de acuerdo a sus tiempos biológicos de vida media.

Borchgrevink, Egeler, Pool y colaboradores determinaron el tiem

po de vida media, del Factor II (Protrombina) después de bloquear su síntesis en sujetos normales como 56.9 horas, Hjort y asociados determinaron un tiempo de vida media de 60 horas. Posteriormente Borchgrevink y colaboradores reportaron un tiempo de vida media de 48 a 60 horas para el Factor II (Protrombina) en experimentos de transfusión.

Helleman, Vorlat y Verstraete reportan 41.0 horas de tiempo de vida con una velocidad de recuperación de 1.69% por hora en perros.

Para el Factor VII (Proconvertina) que es el factor que disminu-ye primero y en forma espectacular en la administración de dosis únicas de anticoagulantes de tipo Coumarfínico. (O'Reilly encontró que su actividad en el plasma de un individuo normal al que se le administró una dosis única de 30 mg./Kg. de peso corporal bajó del 100% a solamente el 7%, 51 horas después de la administración de la droga).

Helleman y colaboradores determinaron un tiempo de vida media de 6.2 horas y una velocidad de recuperación de 11.14% por hora en ex-perimentos con perros.

Loeliger y colaboradores y Hjort y sus ayudantes reportaron 4.2 a 6.3 horas y 290 a 325 minutos como tiempos de vida media en experi-mentos con hombres.

Hitzig y Zollinger encontraron un tiempo de vida media de 4 ho -ras y Roos y colaboradores de 5.5 horas después de transfusión de sue-ro a sus pacientes.

Para el Factor IX Loeliger y Hensen determinaron 25 a 27 horas y Hjort y colaboradores 24 horas. Loeliger y Hansen determinaron 28 a 40 horas en experimentos de transfusión a pacientes con deficiencias de Factor IX.

Helleman determinó un tiempo de vida media de 13.9 horas con una velocidad de recuperación de 4.11% por hora.

Para el Factor X Graham determinó un tiempo de vida media de 68 horas, Duckert determinó 40 a 50 horas, Van der Esch determina - 30.4 a 51 horas y Helleman reporta 16.5 horas con una velocidad de recuperación de 4.21% por hora.

Loeliger y colaboradores probaron la disminución de la actividad de los 4 factores del Complejo Protrombina en pacientes con infarto del miocardio sujetos a un largo tratamiento a base de Warfarina, encontrando que la actividad de los Factores IX y X se deprime en cantidad ligeramente menor que la de los Factores II y VII y que la prolongación - del tiempo de protrombina de 2 a 2 1/2 veces de lo normal parece corresponder a una depresión de la actividad de los 4 factores del 100% a solamente el 20%.

La Teoría de Inhibición por Competencia no ha podido comprobarse en el trabajo experimental. Para que un mecanismo se considere de Inhibición Competitiva, es necesario que la respuesta a proporciones constantes de agonista y antagonista sea constante no importa cuanto se incrementen las dosis.

Lowental y MacFarlane al administrar simultáneamente Warfarina y vitamina K, encontraron que la Warfarina inhibe parcial o completamente el aumento del nivel plasmático del Factor VII de una dosis óptima de vitamina K<sub>1</sub> en ratas con deficiencia en vitamina K pero no en ratas previamente tratadas con el anticoagulante.

Cuando la proporción de vitamina K<sub>1</sub> a Warfarina se mantiene -- constante y las dosis se aumentan, al principio aumenta la inhibición pero al seguir aumentando la dosis desaparece la inhibición

La dosis de vitamina K<sub>1</sub> necesaria para que la inhibición desaparezca es constante para todas las proporciones probadas y del mismo orden de magnitud que la necesaria para producir un aumento considerable del nivel plasmático del Factor VII en ratas tratadas previamente con el anticoagulante .

Estos resultados conducen a la hipótesis de que además de su mecanismo normal de acción, grandes cantidades de vitamina K pueden tener otro mecanismo de acción diferente.

Mientras la Warfarina inhibe la acción de la vitamina K<sub>1</sub> en el sitio normal por un antagonismo no solo competitivo sino también por un mecanismo no competitivo, grandes dosis de vitamina K<sub>1</sub> eliminan la inhibición actuando por un mecanismo diferente o en un sitio diferente que no es inhibido por el anticoagulante .

Estudios posteriores sobre la acción de la vitamina K hacen suponer que su papel biológico no es solamente dirigir o restringir la síntesis de los 4 factores de coagulación antes mencionados sino que también juega un papel muy importante en la producción de energía a nivel celular ya sea como parte de la cadena de transporte de electrones o en el mecanismo de la fosforilación oxidativa y en ese caso la Warfarina como antagonista de la vitamina K actuaría disminuyendo la síntesis de todas las proteínas y no solamente las del complejo protrombina así Martius y Netz Litzow aseguran que los anticoagulantes de la coumarina desacoplan la fosforilación oxidativa en mitocondrias aisladas inhibiendo la síntesis de proteínas; con el objeto de comprobar estas teorías Judith Graham Pool y G. F. Borchgrevink hacen un estudio comparativo de la acción de Warfarina sobre el hígado de ratas en vivo y en vitro, llegando a las siguientes conclusiones:

1/o. Cuando la Warfarina se adiciona sobre rebanadas de hígado incubadas en solución reguladora de carbonato, la síntesis del Factor VII (Proconvertina) se inhibe en proporción al logaritmo de su concentración

Como la producción de el Factor VII es variable, se determina su producción en muestras de hígado incubadas en ausencia de Warfarina y el promedio se considera como 100% (patrón) los niveles encontrados en las muestras incubadas en presencia de cantidades crecientes de Warfari

na se expresaron en por ciento relativo al patrón. Al graficar los resultados se obtiene una línea recta para las concentraciones de  $10^{-2}$  y  $10^{-5}$  moles de Warfarina.

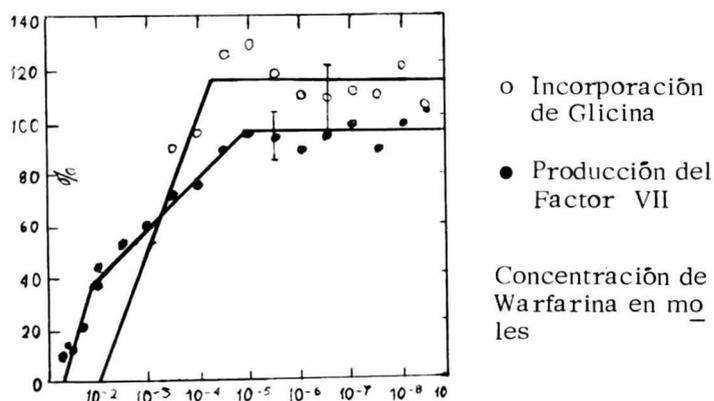


Fig. 1

2/o. La adición de Warfarina sobre rebanadas de hígado incubadas en solución reguladora de carbonato inhibe la incorporación de glicina marcada con carbón 14 a las proteínas totales del hígado, de manera similar a la inhibición del Factor VII. La inhibición fué proporcional al logaritmo de la concentración de Warfarina entre  $10^{-2}$  y  $10^{-6}$  moles.

Fig. 1. Para esta determinación se usaron las muestras de hígado, utilizadas en la inhibición del Factor VII, esta inhibición parece reforzar la teoría de que la vitamina K juega un papel importante en la fosforilación oxidativa y -

que la Warfarina como antagonista de la vitamina K desacopla dicha reacción y por lo tanto ejerce un efecto general en el abastecimiento de la energía celular.

- 3/o. Cuando la Warfarina se administra en vivo aparentemente sólo tiene una acción principal que es la disminución de los niveles plasmáticos del Complejo Protrombina y que si hay desacoplamiento de la fosforilación oxidativa, éste es tan pequeño que no interfiere con el transporte o la incorporación de aminoácidos a las proteínas.
- 4/o. La deficiencia de vitamina K que produce una disminución severa de la síntesis y de la cantidad de Complejo Protrombina circulante en la sangre no tiene ningún efecto en vivo o en vitro sobre la incorporación de aminoácidos a las proteínas
- 5/o. Que los efectos de la Warfarina sobre el hígado son muy diferentes cuando la droga se administra en vivo o en vitro y que estas diferencias se deben fundamentalmente a las condiciones en que se encuentran los tejidos, por ejemplo: La Warfarina administrada en vivo llega al hígado disuelta en el plasma normal en cambio cuando se administra en vitro va disuelta en solución reguladora de carbonato. En vivo el Sistema Retículo Endotelial elimina rápida

mente el compuesto coumarínico del torrente sanguíneo, mientras que en vitro no funciona permitiendo que el compuesto llegue hasta las células del parénquima hepático.

Couri y Wosilait usando como índice el contenido de Adenin Dinucleótidos y la incorporación de ortofosfato marcado con  $P_{32}$  en los nucleótidos hepáticos de ratas vivas, encontraron que los anticoagulantes de tipo coumarínico no tienen efecto sobre la fosforilación oxidativa.

Mas tarde R. B. Hill y colaboradores trabajando con microsomas de ratas deficientes en vitamina K y de ratas tratadas con Warfarina encontraron que el consumo de oxígeno relativo a la peroxidación estaba disminuído

Adlercreutz, Jurgens y Slatis proponen que las células del Sistema Retículo Endotelial son las que llevan a cabo la síntesis de las proteínas del Complejo Protrombina o que de alguna manera pueden liberar o transportar el compuesto coumarínico a las células o sitios encargados de sintetizar el Complejo Protrombina y reprimir o inhibir su síntesis o su liberación

La cuestión de si la protrombina tenía origen hepático o extra-hepático fué resuelta mediante la aplicación de técnicas de inmunofluorescencia sobre varios órganos de perros, bovinos y seres humanos. Únicamente un pequeño porcentaje de células del parénquima hepático reac

cionaron con antiprotrombina fluorescente, ningún otro tipo de células - del hígado, médula, bazo o de los nódulos linfáticos dió reacción positiva a la antiprotrombina específica, las células retículo endoteliales como las sinusoidales o células de Kupffer no reaccionaron tampoco. Estaba claro pues que la Protrombina o una substancia precursora existía en los hepatocitos y que su localización en ellos indicaba el sitio probable de síntesis, o bien su lugar de almacenamiento. Para comprobarlo se hizo fraccionamiento celular y reacción inmunofluorescente. La protrombina o su compuesto precursor se evidenciaron únicamente en el microsoma y en la fracción soluble. Los microsomas de perros deficientes en protrombina reaccionaron muy pobremente o no dieron reacción.

Después de corregir la deficiencia de protrombina con la administración de vitamina K se obtuvieron fracciones microsomales que de inmediato reaccionaron con el reactivo marcado. Esto lleva a pensar que el sitio probable de síntesis de las proteínas del complejo trombina sean los microsomas y que la proteína soluble sea protrombina almacenada.

Cuando los niveles plasmáticos de la protrombina están dentro de límites normales sólo el 10 - 20% de hepatocitos de bovino y el 26 - 30% de hepatocitos humanos producen y almacenan protrombina pero hasta un 86% de ellos son capaces de producirla ante un estímulo adecuado.

do por ejemplo la administración de vitamina K.

La administración de Warfarina en dosis de 6 mg./Kg. de peso corporal por vía intravenosa durante 2 días produjo una deficiencia de Protrombina.

Al hacer la reacción de inmunofluorescencia la reacción de los hepatocitos disminuyó considerablemente y no se llevó a cabo, aparentemente toda la Protrombina sintetizada antes de la inhibición por la Warfarina se había liberado a la circulación. Este dato da alguna información sobre la acción de la Warfarina en la inhibición de la protrombina: La Warfarina no interfiere con la liberación de Protrombina de los hepatocitos ya que de ser así se produciría una gran acumulación de Protrombina en los hepatocitos y su respuesta a la fluorescencia sería muy grande en comparación con un estado normal.

La Warfarina pues debe actuar en algún estado anterior al acoplamiento del grupo antigénico determinante de la Protrombina.

Además de la disminución de Protrombina la Warfarina produce una desorganización del retículo endoplasmático de los hepatocitos y una disminución de los ribosomas. La administración rápida de vitamina K, restaura la organización del retículo endoplasmático y se aumentan los ribosomas libres o combinados.

En la década de los 60 se descubrió que ciertos antibióticos inter

fieren en la síntesis de protrombina. Por ejemplo la Puromicina cuya interferencia se efectúa a nivel del complejo ribosomal s-RNA impidiendo la completación de la cadena polipeptídica. Los factores de coagulación sintetizados en las células del parénquima hepático tienen una velocidad de recuperación relativamente rápida, lo cual hace pensar que los agentes que interfieren la síntesis de proteínas pueden disminuir rápidamente los niveles plasmáticos de los factores circulantes. Si la Puromicina interfiere en la síntesis de proteínas a nivel del complejo ribosomal s-RNA, es de esperarse que esta droga interfiera la síntesis de los factores de coagulación dando por resultado la prolongación del tiempo de protrombina.

James Polson y W. Wosilait experimentaron el efecto de Puromicina en ratas albinas concluyendo que aunque la Warfarina y la Puromicina prolongan el tiempo de protrombina no podían aseverar que el sitio de acción de las dos drogas fuera el mismo.

Si la Puromicina actúa impidiendo la síntesis de las proteínas en el hígado a nivel ribosomático su experimento indica que los ribosomas son susceptibles a la acción de las drogas en la síntesis de los factores de coagulación y por consiguiente bien pueden ser los sitios de acción del anticoagulante, o su sitio de acción puede estar en un paso subsiguiente, por ejemplo podría inhibir la adición de la porción no proteica a la nueva proteína formada.

El tiempo de vida media del factor VII Proconvertina determinado después de la inyección de Warfarina y de Puromicina es tan semejante - que puede sugerirse que el sitio de acción de las 2 drogas queda relativamente cerca en la secuencia de reacciones que integran la síntesis de los factores de coagulación.

Aunque los resultados del experimento no prueban inequívocamente que la Warfarina actúe a nivel ribosomático parece que su sitio de acción no está lejos de ellos.

D. V. Shah y colaboradores informan que la Puromicina inhibe el efecto de la vitamina K en ratas con deficiencia de vitamina K

Robert Olson demostró que la Actinomicina D inhibe la produc -- ción de los factores de coagulación inducida por la vitamina K en pollitos deficientes de ésta. En dosis que inhiben la síntesis de los factores de coagulación, la Actinomicina también inhibe la síntesis hepática del áci -- do ribonucleico RNA formado a partir de adenosintrifosfato ATP.

El efecto de la Actinomicina al bloquear la acción de la vitamina K concuerda con su habilidad comprobada de bloquear la síntesis del -- RNA dependiente del DNA.

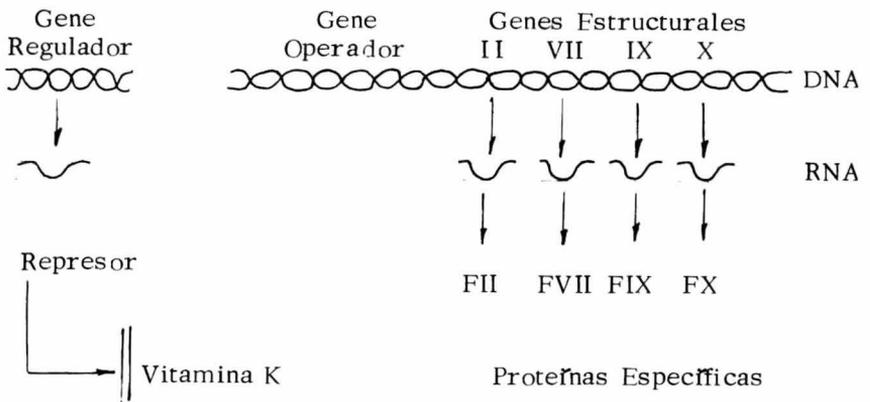
Si se supone que las drogas de la coumarina antagonizan el efec -- to de la vitamina K, parece posible que el sitio de ese antagonismo pu -- diera ser el mismo.

Usando el modelo de Jacob y Monod, Olson postula que en ausencia de vitamina K, un gene regulador reprime la actividad del gene operador que controla a los genes estructurales responsables de la producción de los cuatro factores de coagulación dependientes de la vitamina K.

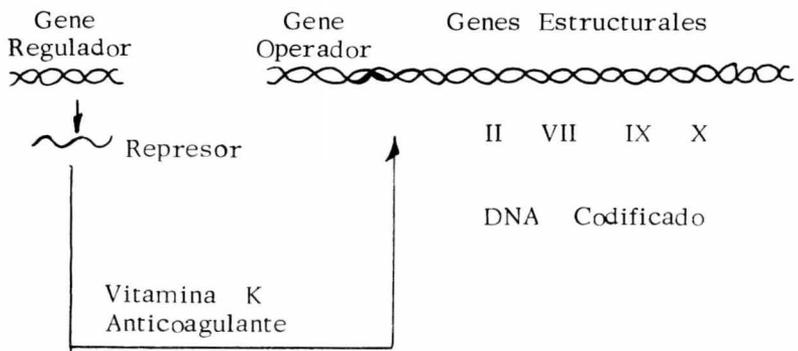
Este modelo propone que en la porción de los cromosomas que contienen el DNA codificado para la síntesis específica de una proteína dada, hay un grupo de Genes Estructurales adyacentes, que están bajo el control de un Gene Operador situado junto a una de las cifras de dicha codificación. Este operador permite o previene la transcripción enzimática de la información genética al RNA mensajero.

La porción de ácido desoxiribonucleico que actúa como Gene-Operador está a su vez bajo el control de un Gene Represor que parece ser una proteína que se sintetiza a través de su propio RNA mensajero desde otro DNA codificado que puede estar o no en el mismo cromosoma.

Pequeñas moléculas como sustratos, hormonas, etc., pueden combinarse con la proteína represora induciendo una transición alostérica que modifica la afinidad del represor hacia su respectivo sitio de acción sobre el gene operador específico. Fig. 2.



De acuerdo con la teoría de Olson, la vitamina K inactiva la molécula del represor, permitiendo que el Operador inicie la transcripción al ácido ribonucleico mensajero por los Genes Estructurales dando así origen a la formación de los cuatro factores de coagulación. Fig. 2.



En base a lo anterior, la Warfarina debe interferir con la acción de la vitamina K sobre la sustancia represora dejándola ejercer su acción sobre el gene Operador con lo cual el sistema no produce las proteínas específicas. Fig. 3.

De acuerdo a lo anterior Olson postula que la vitamina K actúa induciendo la síntesis de protrombina por un mecanismo genético al modificar las propiedades de la proteína represora y que si los anticoagulantes del tipo comarínico antagonizan la acción de la vitamina K, es posible que su sitio de acción sea el mismo: El Gene represor que regula la expresión de información genética para la producción de los factores de coagulación. Como es bien sabido por varios estudios que la interacción entre vitamina K y los anticoagulantes de la coumarina no se ajusta al tipo de inhibición competitiva o no competitiva, parece probable que la molécula de represor tenga múltiples sitios alostéricos para combinarse con las drogas anticoagulantes o procoagulantes.

Estas observaciones no pudieron ser confirmadas por Johnson y colaboradores que usaron sistemas diferentes para la determinación de los tiempos de Protrombina, tiempo de administración de los antibióticos y forma y modo de administración de la vitamina.

J D Sutiie trabajando con Actinomicina D, Puromicina y Acido Orótico marcado con Carbón 14 sobre ratas de la raza Holtzman deficientes en vitamina K y en hígado aislado y perfundido demostró que la trans

cripción del DNA no era necesaria ya que el hígado aislado respondió la administración de vitamina K produciendo y liberando Factor VII en el líquido de perfusión. Esta respuesta no se inhibió con Actinomicina pero sí con Puromicina.

Los resultados de este estudio sugieren que el sitio de acción de la vitamina K y por lo tanto de sus antagonistas en la producción de los factores de coagulación está situado mas allá o después de la formación del ácido ribonucleico mensajero específico (mRNA). Este sitio o este paso puede ser o puede estar probablemente entre la formación del péptido naciente, en la separación del péptido del ribosoma, en la unión de la porción carbohidrato o en el transporte de la glicoproteína completa fuera de la célula.

Anne Gaarder y Hans Prydz y W. H. Seegers postulan que los 4 factores del complejo Protrombina son glicoproteínas que se sintetizan en el hígado y que posiblemente su síntesis sea diferente a la de otras glicoproteínas plasmáticas. La posibilidad más aceptada es que estos factores se sinteticen en las mitocondrias ya que la síntesis de proteínas (o sea la incorporación de aminoácidos) se lleva a cabo en dichos organelos. La localización del Factor VII se hizo mediante una técnica de centrifugación fraccionada en homogenado de células hepáticas.

Los Factores VII y X fueron aparentemente localizados en la fracción microsomática como era de esperarse tratándose de proteínas plasmáticas.

Nada o muy poco de los Factores VII y X se encontró en las mitocondrias, lisosomas y microcuerpos.

Tampoco se obtuvo evidencia de la localización de proceso biosintético en las mitocondrias con el experimento, aunque no se puede excluir la posibilidad de que lo haya.

La fracción microsomal es heterogénea y sus enzimas se distribuyen en diferentes subfracciones. Para localizar el Factor VII en las subfracciones se centrifugó a través de gradiente de sucrosa, la fracción microsomal pesada que sedimentó a 18 000 x g, usándose enzimas microsomales marcadas y microscopia electrónica para identificarlo.

Se centrifugó a 63000 x g y a 26000 x g.

La máxima actividad del Factor VII se encontró en la parte superior o fracción 2, las mitocondrias, lisosomas y microcuerpos se localizaron en la parte baja del gradiente.

Las preparaciones para la microfotografía electrónica se fijaron con tetraóxido de osmio, se deshidrataron con acetona y se embebieron en Vestopal.

En la fracción 2 se obtuvieron 2 capas, la del fondo de color café rojizo formada por ribosomas libres y la superior blanco grisácea formada por pequeñas vesículas suaves homogéneas.

No se observaron membranas rugosas ni otras partículas.

El Factor VII y las membranas suaves de la fracción 2 se sedimentaron en el fondo del tubo cuando se agregaron 10 mM de  $MgCl_2$ .

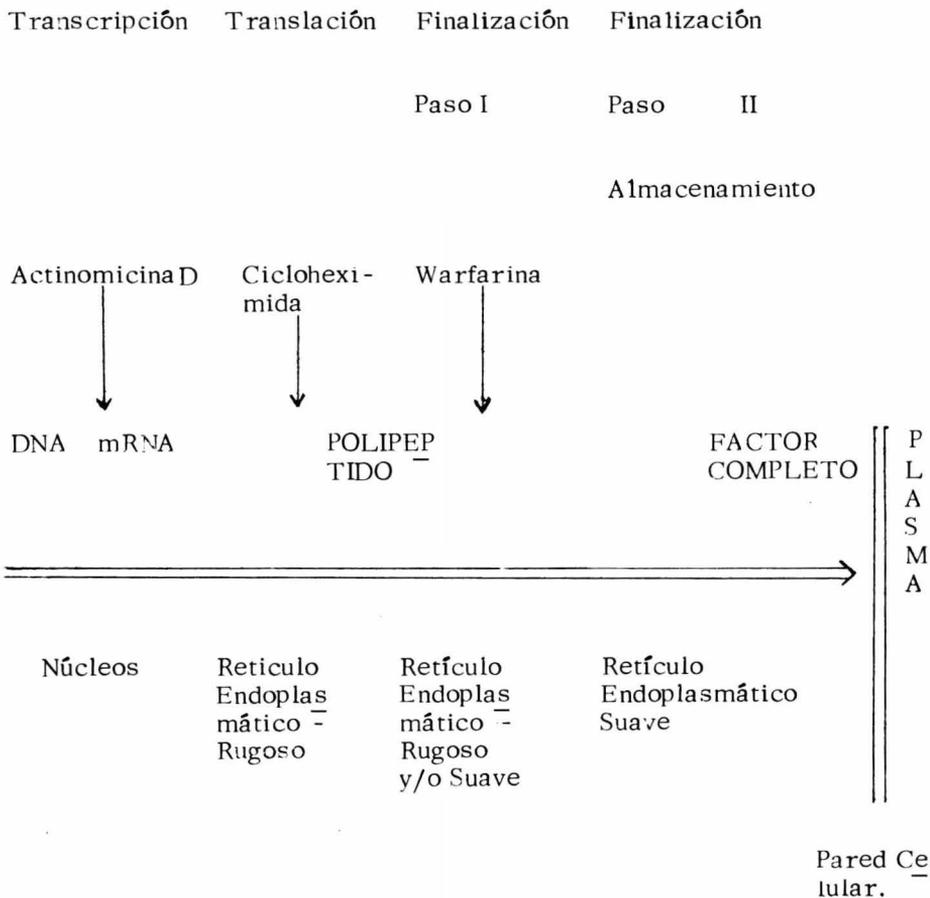
Este experimento demuestra que el Factor VII y las enzimas microsomáticas se localizan en partículas con diferentes grado de sedimentación.

Puesto que el Factor VII debe salir al plasma y las enzimas son proteínas intracelulares esta separación sugiere una localización diferente de estas proteínas en el retículo endoplasmático. La distribución de albúmina como una proteína típica de "Exportación" se investigó por difusión en gelosa con suero antialbúmina específico. Todas las fracciones dieron líneas de precipitación con el anticuerpo específico con excepción de las dos subfracciones microsomales, por lo que se supone que el Factor VII de las membranas suaves no se incluía en el transporte de las proteínas de "Exportación" en el momento en que se extirpó el hígado.

El Factor VII purificado contiene carbohidratos y es posible que a ello se deba la localización diferente de la albúmina. Estudios sobre la liberación del Factor VII de la 2/a fracción microsomal indican que estas partículas están involucradas en un paso final de la biosíntesis del Factor VII o que son un lugar de almacenamiento temporal del cual puede liberarse el Factor VII probablemente por un mecanismo enzimático.

Debe ser pues la fracción microsomal correspondiente a las -- membranas suaves el lugar de un paso final en la terminación de la proteína específica del factor VII y también su sitio de almacenamiento, como precursor del Factor VII plasmático.

Los estudios inmunológicos sobre el Factor VII indican que es - una Glicoproteína y suponiendo que su biosíntesis no es fundamentalmente diferente de las de otras glicoproteínas y que si la Cicloheximida, Puromicina y Actinomicina D tienen esencialmente el mismo efecto sobre la síntesis del polipéptido y la del ácido ribonucleico mensajero como la tienen sobre la síntesis de proteínas y ácido ribonucleico en general se puede proponer un esquema tentativo para la biosíntesis del Factor VII.



Esquema I

La finalización en el paso I puede representar la adición de carbohidratos a la cadena polipeptídica. El paso II es la reacción que se lleva a cabo en las fracciones microsomáticas suaves, puede ser la unión de carbohidratos, el establecimiento de puentes disulfuro o aspectos relacionados con la estructura secundaria o terciaria de la proteína.

La Cicloheximida y la Puromicina inhiben de inmediato la síntesis de las proteínas en general en un 95% en cinco minutos y el 97% en 35 a 40 minutos, en cambio la reducción del Factor VII por la Warfarina no se efectúa sino hasta los 90 - 120 minutos, tal periodo de latencia indica que el punto de acción de la Warfarina está mas allá del sitio de acción de los inhibidores de las proteínas.

Los estudios inmunológicos hechos con suero específico para el Factor X han puesto en evidencia la existencia de una molécula que da reacción cruzada con el suero anti X (Precursor del Factor X sin actividad coagulante) en la sangre de pacientes accidentalmente sobredosificados con anticoagulante. De manera semejante se ha encontrado un precursor inactivo para el Factor II.

Los requerimientos mínimos para que estos compuestos sean considerados como precursores es que sean cadenas completas o casi completas de polipéptidos. Estos datos concuerdan con los resultados obtenidos en el estudio del Factor VII, indicando que la Warfarina actúa después que la síntesis de la cadena polipeptídica se ha completado. Por otro lado, la finalización última y el transporte del Factor VII fuera de la célula están mas allá del paso de inhibición de la Warfarina por lo que es de suponer que el punto de acción de la droga está en el acoplamiento del grupo carbohidratado en la cadena polipeptídica. H.J. Knierheim y A.B. Chandler informan que la administración de Warfarina aumenta el tiempo

de agregación de las plaquetas en un 30% de lo normal.

Además de su efecto anticoagulante la Warfarina como todas las drogas del tipo comarínico tiene acciones farmacológicas que no están relacionadas con la coagulación de la sangre como son:

Depresión del músculo cardíaco.

Depresión de la contractibilidad de la musculatura lisa.

Vasodilatación.

Uricosuria.

Acción antibacteriana.

Sin embargo en experimentos que O' Reilly y colaboradores llevaron a cabo para comparar los efectos biológicos y la farmacodinamia de la Warfarina en 6 sujetos normales cuyas edades fluctuaban entre 32 y 63 años se observó que la administración de dosis superiores a 800 mg./Kg. no producen efectos laterales, solo ocasionalmente se produjeron vértigos y dolor de cabeza ligero una hora después de la administración de la droga. Estos efectos tienen corta duración una hora más o menos.

## 2. - FARMACODINAMIA DE LA WARFARINA.

Aunque la Warfarina ha tenido amplio uso en el tratamiento de los desórdenes tromboélicos, hasta el año de 1955 no existían informes de su disposición fisiológica en el hombre, probablemente por la falta de un método adecuado de identificación y evaluación en fluidos biológicos.

En 1953 Yuyama, Goto y Umezu, describen un método colorimétrico para la estimación de Warfarina en ratas, pero aparentemente este método no se aplicó a productos biológicos humanos.

Weiner, Brodie y Burns, en 1955 propusieron que el tiempo de vida media de la Warfarina en el hombre era de 90 horas pero no incluyeron en su informe datos suficientes para respaldar su aseveración ni el método de prueba que usaron.

No fue sino hasta los años de 1960 a 1962 en que Wanthorp y O'Reilly desarrollaron un método colorimétrico y un método espectrofotométrico respectivamente para la determinación de Warfarina en fluidos biológicos cuando empieza la investigación de la farmacodinamia de la Warfarina en el hombre.

O'Reilly, Paul M. Aggeler y Lois Leong investigaron la farmacodinamia de la Warfarina en 2 grupos de sujetos normales a los que administraron la droga por vía oral e intravenosa.

En el primer grupo, 14 voluntarios cuyas edades fluctuaban entre 27 a 63, años se observaron los siguientes resultados:

- a) Respuesta a una dosis estandar de 1.5 mg./Kg. de peso corporal.

La máxima concentración de Warfarina en plasma se obtiene en 2 a 12 horas.

TABLA I. CONCENTRACION DE WARFARINA EN SUJETOS NORMALES DESPUES DE UNA SOLA DOSIS.

S E u d j a o d	S D e O x S i O S	Concentracion de Warfarina														
		1	1½	2	3	6	9	12	24	36	48	72	96	120	tj†	
	mg	mg/l. plasma														
N-1 50	M 100	0.0	1.9		3.3	6.6	9.1	10.8	8.6	5.6	4.0	2.7	0.8	0.0	0.0	29
N-2 31	M 100	0.0		8.4	9.7	9.8			11.0	8.3	7.7	6.3	4.1	3.0	1.4	49
N-3 40	M 120				12.0	13.2	14.4			9.6	8.2	7.8	5.8	4.3	3.0	58
N-4 46	F 60				11.1.	11.9	9.8		11.0	8.5		5.4	4.5	3.3	2.3	44
N-5 43	M 113					8.6			8.6	7.0	5.7	4.7	3.3	2.3		46
N-6 36	F 90				13.4	12.4	12.7		8.8	6.1	3.5	1.8	1.5	1.0	0.0	15
N-7 41	M 135			17.6	17.3	15.0	15.0		12.4	7.9	7.9	5.1	3.6	2.4	2.0	50
N-8 27	F 75				12.7	12.7	12.9		11.4	9.1	8.2	5.9	3.6	1.7	1.1	31
N-9 28	M 105	0.0	1.0		4.6	8.0	11.5	11.4	11.0	8.6	8.0	6.0	4.4	3.6	2.8	50
N-11 31	M 123			11.4	15.4	17.5			14.0	9.0	8.9	6.6	4.2	3.6	2.6	52
N-12 32	M 113			0.6	2.8	13.8	15.0			10.5	9.1	6.6	4.9	2.4	1.9	39
N-13 63	M 113			3.6	12.9	12.9	10.2			6.4	6.9	4.5	3.2	2.4	1.3	52
N-14 36	F 75	0.0	2.7		11.6	11.3	9.7			6.5	5.2	3.6	2.4	0.9	0.0	31
N-15 27	F 85		6.6		11.9	11.7	12.2			8.1		6.8	5.3	3.0	2.0	46
					11.2	12.3	12.2		10.8	8.0	6.9	5.3	3.7	2.4	1.5	42
SD					± 3.8	± 2.3	± 2.0	± 2.1	± 1.2	± 1.9	± 1.7	± 1.4	± 1.2	± 1.1	± 1.2	1
Coeficiente de de varia - - ción en %					34.	19	16	19	15	28	31	38	50	73	28	

T 1/2 - Tiempo de vida media de la Warfarina en el plasma.

Dosis . - 1.5 mg./Kg.

Durante la fase de eliminación la concentración disminuye exponencialmente alcanzando valores de 0.0 a 3.0 mg./L a las 120 horas.

El tiempo de vida media es de 15 a 58 horas con una media de 42 horas.

La actividad del complejo protrombina se reduce significativamente a las 24 horas alcanzando los máximos de reducción entre 36 y 72 horas Tabla I.

TABLA I. - RESPUESTAS DEL COMPLEJO DE PROTROMBINA EN SUJETOS NORMALES DESPUES DE UNA DOSIS

Actividad del Complejo Protrombina

Suj.	Horas	24	36	48	72	96	120	144
		% de normal						
N-1		44	27	28	31	60	65	71
N-2		46	22	19	20	42	49	54
N-3		30	24	13	09	09	11	12
N-4		43	25	18	17	23	29	41
N-5		34		20	16	17	18	25
N-6		36	33	28	52	80	90	100
N-7		35	20	12	16	23	36	48
N-8		33	22	16	18	32	30	45
N-9		39	22	17	17	22	25	33
N-11		37		14	11	14	23	33
N-12		25	15	11				
N-13		41	23	16	14		22	35
N-14		32	22	21	28	38	46	65
N-15		43		15	13	21	28	39
		37	23	18	20	32	36	46
		±6.0	±4.5	±5.3	±11.5	±20.7	±19.9	±21.6
		16	19	29	57	64	55	47

Dosis: 1.5 mg/Kg.

Existe un alto grado de correlación entre la concentración del plasma a las 48, 72 y 96 horas y el tiempo de vida media de desaparición de la Warfarina, así como entre la concentración en plasma y el grado de disminución de la actividad del complejo protrombina.

b) Absorción

La duración de la absorción gastrointestinal determinada por el tiempo en que comienza la desaparición exponencial de la droga, fue de 6 a 24 horas después de la administración de una sola dosis de Warfarina. La cantidad de absorción gastrointestinal se midió por la concentración de Warfarina en el contenido intestinal después de la administración oral

o intravenosa. No se encontró Warfarina en el contenido intestinal ni - aún después de administrar 6 mg./Kg. de peso, por lo cual se considera que es completa.

El volumen de distribución aparente expresado como porcentaje de peso corporal está entre los límites de 9.8 a 15.8 con una media de 12.8. El espacio de la Warfarina es el mismo que el de la albumina.

c) Excreción

No se determinó Warfarina inalterada en el contenido intestinal ni en la orina pero en cambio se determinaron grandes cantidades de un metabolito en la orina. El tiempo necesario para que se excretara el - 50% de el metabolito fue de 19 a 49 horas.

TABLA III. - EXCRECION DE METABOLITOS EN LA ORINA EN 5 SUJETOS NORMALES

S	DT.	D/P	AD.	TIEMPO EN HORAS									Tiempo de excreción 50 %	
				mg.	mg/kg.	0	6	14	24	36	48	72		96
N-1	100	1.5	Oral	0.0			7.4		7.2	1.2	0.4	0.0	0.0	26
				0.0			7.4		14.6	15.8	16.2	16.2	16.2	
				0			46		90	98	100	100	100	
		1.5	Iv.	0.0			15.0		5.4	1.8	1.5	0.5	0.0	19
				0.0			15.0		20.4	22.2	23.7	24.2	24.2	
				0			62		84	92	98	100	100	
N-2	100	1.5	Oral	0.0			6.2		14.0	9.0	5.0	2.0	46	
				0.0			6.2		20.2	29.2	34.2	36.2		
				0			17		56	81	94	100		
		1.5	Iv.	0.0	1.6	2.3	2.7		9.9	6.0	5.4	3.1	1.3	47
				0.0	1.6	3.9	6.6		16.5	22.5	27.9	31.0	32.3	
				0	5	12	20		51	70	86	96	100	
N-3	120	1.5	Oral	0.0			4.3		9.1	5.1	3.0	1.8	0.7	44
				0.0			4.3		13.4	18.5	21.5	23.3	24.0	
				0			18		56	77	90	97	100	
N-4	60	1.5	Oral	0.0			1.6		2.3	2.7	1.3	0.3	49	
				0.0			1.6		3.9	6.6	7.9	8.2		
				0			17		48	81	96	100		
N-1	200	3.0	Oral	0.0	3.1	12.4	10.6	11.4	3.8		2.9	1.5	1.0	22
				0.0	3.1	15.5	26.1	37.5	41.3		44.2	45.7	46.7	
				0	7	33	56	80	88		95	98	100	
N-13	600	8.0	Iv.	0.0		49	51	48	32	43	30	4	31	
				0.0		49	100	148	180	223	253	257		
				0		19	39	58	70	87	98	100		

S = Sujeto

DT = Dosis Total

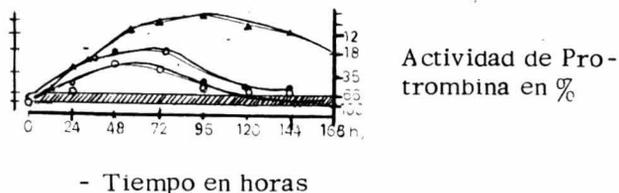
D/P = Dosis por Peso Corporal

AD = Administración.

En el segundo grupo: 6 voluntarios de edades entre 32 y 63 años se hicieron las siguientes observaciones:

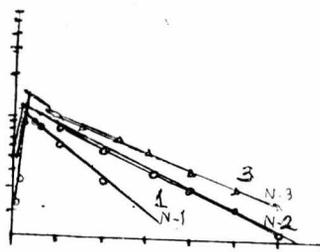
a) Respuesta del complejo protrombina.

La respuesta empieza a ser notable a las 12 horas después de la administración de la droga, llegando al máximo en 36 a 96 horas y regresar a los límites normales en 4 a 14 días: Fig. 4.



La concentración de la Warfarina en el plasma se empieza a elevar media hora después de la administración alcanzando los máximos niveles en 3 a 9 horas, seguido de un periodo de equilibrio que dura varias horas durante las cuales el nivel plasmático disminuye más rápidamente que en un proceso de primer orden. Después de 18 horas la eliminación fué exponencial. Fig. 5.

Concentración de Warfarina en mg/lt. de plasma.



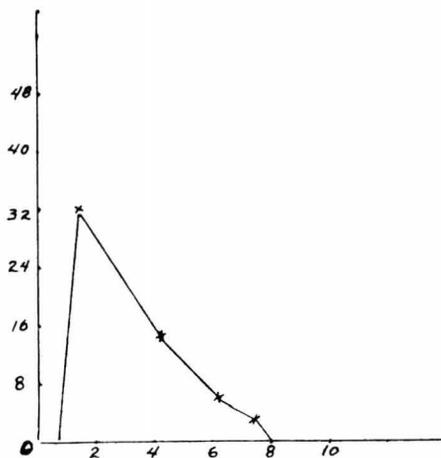
- Tiempo en horas

### b) Absorción

La velocidad de absorción gastrointestinal se calculó de la velocidad de aparición de la droga en el plasma. La velocidad medible empieza media hora después de la administración alcanzando su máximo en 2 horas y luego declina rápidamente hasta llegar a cero en 8 horas -

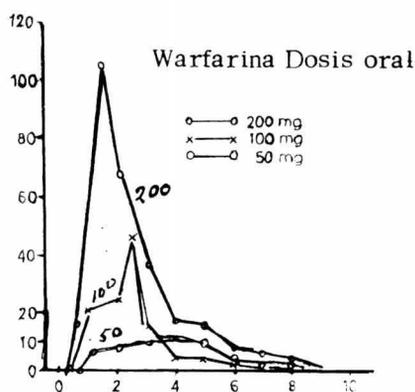
Fig. 6.

Concentración de Warfarina en mg/lt. de plasma.



- Tiempo en horas

Al dar 3 dosis diferentes de Warfarina a un mismo individuo: 50, 100 y 200 mg. las dosis mayores produjeron una velocidad de absorción mayor y más rápida en tanto que la dosis menor alcanzó el máximo con lentitud. La duración de la absorción fué la misma para las tres dosis, pero la configuración de cada curva fué diferente. El área correspondiente a cada curva es directamente proporcional al tamaño de la dosis. Fig. 7.



c) Excreción.

En pruebas repetidas a individuos normales que tomaron dosis de Warfarina de 800 mg. se encontró menos del 1% de Warfarina inalterada en la orina. En el contenido intestinal no se encontró Warfarina.

En la orina se encontró un metabolito que representó casi el 30% de la dosis administrada. La excreción del metabolito sigue un esquema invariable para diferentes dosis de Warfarina: La velocidad es -

muy lenta inicialmente, alcanzando su máximo en 12 a 60 horas. Casi el 90% del metabolito se excreta en 96 horas y el 99% en 144 horas.

d) Unión de la Warfarina a proteínas plasmáticas.

En muestras de plasma de pacientes que ingirieron dosis de Warfarina se determinó por ultracentrifugación que el 97% de la Warfarina está unida a la albumina. La unión de la Warfarina a la albumina probablemente afecte la duración y la intensidad de acción de la droga protegiendo al organismo contra su efecto farmacológico total, por inactivación temporal en un reservorio circulante que está en equilibrio con la forma activa libre de la droga, impidiendo así su acceso a los sitios de acción de metabolismo y excreción.

La Unión a la albumina es bastante fuerte y por eso se explica que no entre a los glóbulos rojos a al fluido cerebroespinal que no aparezca en la orina y que su volumen de distribución sea idéntico al espacio correspondiente a la albumina.

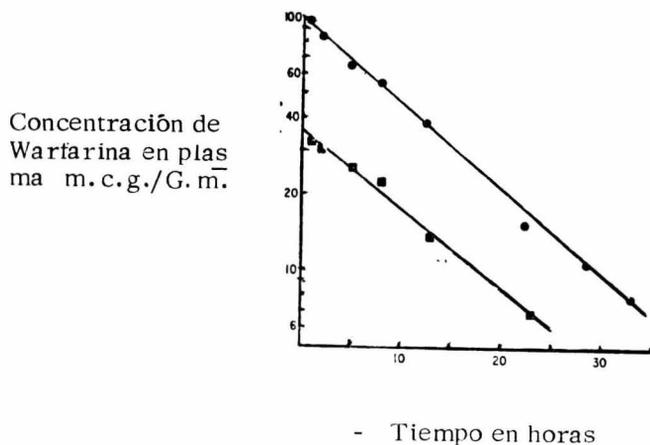
Sin embargo, esta unión puede modificarse por la presencia de otra sustancia con una capacidad de unión superior modificando las propiedades farmacológicas de la droga. Por ejemplo la actividad anticoagulante de la Warfarina se incrementa notablemente en vivo cuando se administra con fenilbutazona y este incremento puede atribuirse a un aumento en la concentración de Warfarina libre en los sitios de acción de la -

misma.

Nagashima y Levy trabajando con ratas, perros callejeros y monos rhesus en un estudio comparativo de la farmacocinética de la Warfarina encontraron:

a) Después de la inyección intravenosa de 2 dosis de Warfarina en rata.

1. - La concentración de Warfarina en plasma disminuye exponencialmente y sólo hay un aumento ligero en el volumen aparente de distribución cuando se aumenta la dosis. Fig. 8.



El tiempo de vida media de la Warfarina parece disminuir ligeramente con el incremento de la dosis, pero los datos son insuficientes

para establecer con certeza esta dependencia.

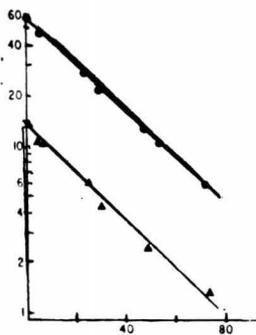
TABLA IV

Animal	Peso	Fecha de	Dosis	T 1/2	V. d.
No.	Kg.	Dosis	mg/Kg	horas	ml. /Kg.
6	0.39	6/14	12.5	9.8	130
	0.43	6/21	4.0	11.0	115
7	0.37	6/14	4.0	9.7	110
	0.36	6/21	12.5	9.0	120

b) En perros.

1. - La concentración en plasma declina exponencialmente con un tiempo de vida media de 21 horas. Fig. 9.

Concentración de Warfarina en Plasma, mcg/ml.



Tiempo en horas

2. - No hay un cambio pronunciado en el tiempo de vida media ni en el volumen aparente de distribución al aumentar la dosis:

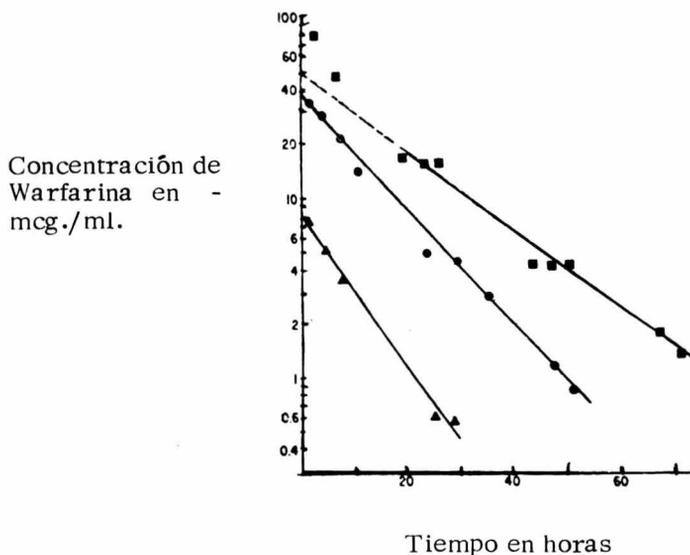
TABLA V

Animal No.	Peso en Kg.	Fecha de dosificación.	Dosis en mg/Kg.	T 1/2 h	V <sub>d</sub> ml/Kg.
6	10	11/21	10	24	1400
	10.3	12/12	2	22	140
7	8.4	11/21	2	21	155
	8.1	12/12	10	22	175

La droga se administró intravenosamente.

C). - En Mono Rhesus.

1. - La eliminación de Warfarina de plasma de mono Rhesus es dependiente de la dosis aunque la concentración disminuya exponencialmente: Fig. 10.



2. - El tiempo de vida media aumenta con el incremento en la dosis.

Se observa un marcado aumento en el Volumen de distribución aparente cuando se aumenta la dosis aunque bien puede ser un artefacto debido a una disminución inicial en la velocidad constante de eliminación por la administración en grandes dosis.

TABLA VI

Animal No.	Peso Kg.	Fecha de dosificación	Dosis en mg/Kg.	$T_{\frac{1}{2}h.}$	$V_d$ ml/Kg.
1	5.0	12/28	1	7.2	125
	5.0	1 / 4	4	9.5	105
	5.2	1 /17	10	14.0	205
2	6.4	2 / 7	10	9.2	215
	8.6	4 /25	1	7.9	160
3	6.1	11/28	10	20.0	140
	6.1	12/12	2	13.6	84

El resultado de los estudios de la farmacocinética de Warfarina en ratas, perros, mono rhesus y el hombre se sintetizan en la tabla siguiente:

TABLA VII

No. de Animales	Dosis en mg/Kg.	$T_{\frac{1}{2}}$ H.	$V_d$ ml/Kg.
RATAS.			
2	4	10.4	113
2	12.5	9.4	125
PERROS.			
2	2.0	22.0	148
2	10	23	158
MONOS RHESUS			
2	1.0	7.6	143
3	2.0	11.3	113
4	10.0	14.4	174
HOMBRE			
2	1.5	29.0	122
2	3.0	37.0	129
30	1.5	43 + 10	---

Pyorala y Nevanlina reportan un tiempo de vida media de 6 horas en ratas para la Warfarina.

Ikeda y colaboradores informan un tiempo de vida media de 9 horas en ratas.

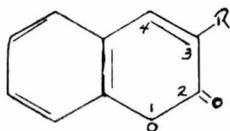
Hunningake y Azarnoff informan un tiempo de vida media de 29 horas en perros.

De estos estudios podemos concluir que las ratas y los monos - eliminan más rápidamente que el hombre y el perro la Warfarina.

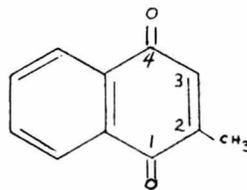
La cantidad de Warfarina eliminada por el mono depende de la - dosis administrada. En la eliminación de la Warfarina en el hombre no no observa esa dependencia, probablemente por la gran potencia de la - Warfarina y consecuentemente su dosis mas baja. Aunque de hecho se - gún los trabajos de O'Reilly y colaboradores sugieren, el tiempo de vida media de la Warfarina en el hombre, aumenta con el incremento de la do - sis.

### 3. - RELACION ENTRE LA ESTRUCTURA QUIMICA Y LOS EFECTOS FARMACODINAMICOS DE LA WARFARINA.

Que la Warfarina como todos los anticoagulantes de la 4 - hi - droxicoumarina actuen competitivamente como inhibidores de la vitami - na K parece probable si comparamos sus fórmulas estructurales:



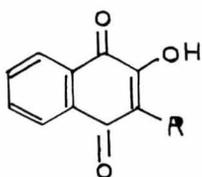
3-alkil 4 - hidroxicoumarina



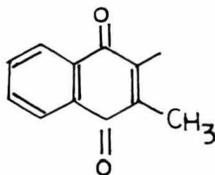
2 metil - 1 4naftaquinona o  
Menadiona (Vitamina K)

La vitamina K<sub>1</sub> natural difiere de la menadiona en que tiene un grupo fitilo en la posición 3 y en que es liposoluble.

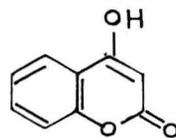
Smith, Fradkin y Lakey en 1946 y Smith en 1947 encontraron que ciertos derivados de la 3-hidroxi-1,4 naftoquinona que en la posición 2 tenían radicales con 6 ó más átomos de carbono actúan como anticoagulantes. En su fórmula estructural estos derivados concuerdan más con la menadiona que con los anticoagulantes de la coumarina:



3-hidroxi - 1,4 naftoquinona

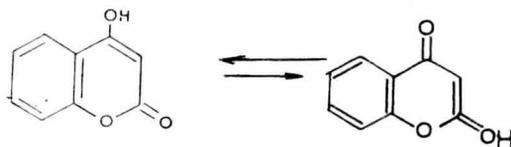


Menadiona



4-hidroxicoumarina.

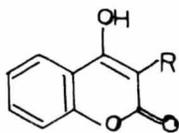
Knoblock, Kahac y Macha en el año de 1952, demostraron espectrográfica y potenciométrica que en solución hay un equilibrio tautomérico entre la 4 - hidroxicoumarina y el 2 - hidroxicromano:



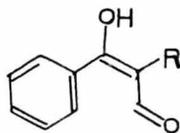
A pH de 7 - 8 el equilibrio se desplaza fuertemente hacia la derecha y los iones cromano totalmente disociados son los que causan el efecto de inhibición de la coagulación.

En el año de 1943, Stahmann, Walf y Link demostraron que las propiedades anticoagulantes no estaban ligadas a un compuesto simétrico como la 3, 3metilenbis 4-hidroxicoumarina (Dicumarol) sino que las mismas propiedades se obtienen si la 4-hidroxicoumarina está unida a grupos adecuados en el átomo 3 que a mayor fuerza de unión de los grupos alkilo en la posición 3, mayor es el efecto anticoagulante y que los grupos arilo producen mayor efecto que los grupos alkilo.

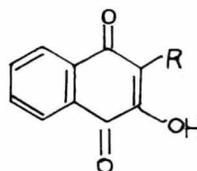
Si se pierde el oxígeno heterocíclico en la 4 - coumarina, se obtiene el compuesto denominado Indano 1 - 3 diona, Indanediona o Indandiona.



Derivados de la  
4-hidroxicoumarina



Derivados de la  
Indanediona

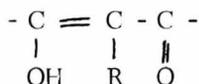


Derivados de la 3 hi -  
droxi, 1-4naftoquinona.

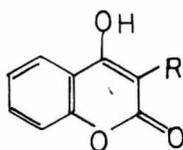
Kabat, Stohmann y Smith en el año de 1944 y Jurgens en el año de 1953, demostraron que varios derivados de la Indandiona son anticoagulantes efectivos. Estos derivados están relacionados a los compuestos

coumárfnicos desde el punto de vista químico y farmacodinámico por lo cual se les considera como anticoagulantes coumárfnicos.

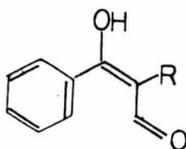
En el año de 1948, Mentzer propuso que las propiedades anticoagulantes de un compuesto químico se debían a la presencia del grupo:



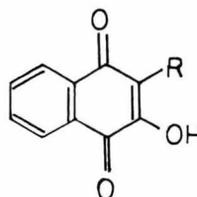
que está presente en los derivados de la 4 - hidroxicoumarina, indandiona y de la 3 - hidroxí, 1-4 naftoquinona:



Derivado de la  
4-hidroxicoumarina



Derivados de  
la indandiona



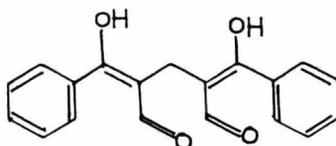
Derivados de la 3hidroxí,  
1-4naftoquinona.

Esta aseveración se confirma con la 2 fenil, 2 metil indandiona que no tiene acción anticoagulante:

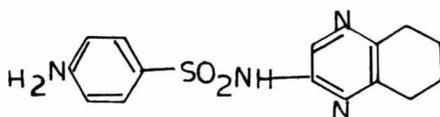
La presencia del grupo metilo impide la tautomerización ceto-enol.

Sin embargo, esta teoría se contradice por el hecho de que la 2,2 metileno bis indanediona 3 que posee el grupo  $\begin{array}{c} \text{C}=\text{C} - \text{C} - \\ | \quad | \quad || \\ \text{OH} \quad \text{R} \quad \text{O} \end{array}$  no tiene

propiedades anticoagulantes:



Y en cambio la 2 sulfanilamidoquinolina que carece de ese grupo si tiene propiedades anticoagulantes:



Los derivados de naftaquinona con el grupo  $\begin{array}{c} \text{C} = \text{C} - \text{C} - \\ | \quad | \quad || \\ \text{OH} \quad \text{R} \quad \text{O} \end{array}$

pero con diferente radical en la posición 2, tienen diferentes propiedades de acuerdo a la naturaleza del radical, algunos tienen efectos de vitamina K, otros son anticoagulantes y algunos otros no tienen ninguna de estas propiedades.

Parece ser que la solubilidad en lipoides si es un requisito necesario para que un compuesto ejerza su acción anticoagulante. Y es evidente que no es necesario que exista únicamente un determinado grupo atómico sino que debe existir una cierta configuración estructural tanto como determinadas condiciones de solubilidad.

#### 4. - METABOLISMO Y METABOLITOS DE LA WARFARINA.

Después de la introducción de la Warfarina como rodenticida y a pesar de que ha sido el anticoagulante oral usado con más frecuencia en el tratamiento de pacientes con padecimientos tromboélicos, la información correspondiente a su metabolismo es insuficiente.

Los primeros estudios sobre el metabolismo de la Warfarina se habían restringido a análisis de los datos obtenidos sobre los niveles plasmáticos de la droga inalterada en la sangre.

El primer informe concerniente al metabolismo de la Warfarina aparece en 1962 cuando O'Reilly en base a sus datos de absorción ultravioleta sugiere que la Warfarina puede ser excretada en la orina humana como un derivado hidroxilado. Karl P. Link, David Ber y W. M. Barker en 1965 fueron los primeros investigadores que estudiaron el metabolismo de la Warfarina, en vivo, inyectando ratas intraperitonealmente, con soluciones de Warfarina sódica marcada en el carbón cuatro con isótopo radiactivo  $C^{14}$ .

Sus estudios demostraron que:

El 90% de la radioactividad total se excreta en 14 días. El 10% restante se excreta lentamente en un período de 90 días. Más de la mitad, aproximadamente 2/3 se excreta en la orina y el resto en las heces.

En el CO<sub>2</sub> expirado no hay presencia de carbón marcado. La Warfarina marcada o sus metabolitos se acumulan en el riñón, hígado y páncreas en estos órganos se determina 3, 12, 15 veces (respectivamente) la concentración de la radioactividad encontrada en la sangre 96 horas después de la administración de la Warfarina marcada.

En el extracto etereo de la orina existen 3 compuestos cuyos porcentajes son:

15.4
35.0
9.5 de la radioactividad total de la orina.

La dilución isotópica del extracto etereo de la orina con derivados sintéticos de la Warfarina, hidroxilados en las posiciones 6, 7 y 8, demostraron que estos compuestos son productos metabólicos de la Warfarina marcada.

Los metabolitos demostraron no tener actividad anticoagulante en las ratas.

La radioactividad correspondiente a la Warfarina inalterada fue un 7% de la radioactividad total.

TABLA IX

Warfarina y Metabolitos:

Compuestos	Estructura	Porcentaje de Radioactividad en orina.
Warfarina		7 %
6-Hidroxiwarfarina		15.4 %
7-Hidroxiwarfarina		35.0 %
8-Hidroxiwarfarina		9.5 %

Masayuki Ikeda, V. Ullrich y H. Staudinger en 1968, estudian el metabolismo de la Warfarina in vitro para investigar el esquema de -

hidroxilación enzimática en el hígado y la oxidación no enzimática de -- acuerdo a ciertos sistemas tomados como modelos, con los siguiente resultados: Cuando se incuba la fracción sobrenadante de homogenado de hígado de ratas (tratadas con fenobarbital) en presencia de Warfarina marcada con isótopo radioactivo  $C^{14}$  y se analiza la muestra por cromatografía en capa fina sobre sílica gel se observan 4 productos de metabolismo de la Warfarina, 3 corresponden a los derivados hidroxilados de la Warfarina en posición 6, 7, 8 y el cuarto no es identificado. Los valores de Rf son 0.30, 0.43, 0.57 y 0.12 respectivamente.

Cuando esta fracción se incuba en las mismas condiciones en presencia de concentraciones diferentes de Warfarina marcada, la constante aparente de Michaelis para la hidroxilación de la Warfarina en las posiciones 6, 7, 8 es la misma:  $1.5 \times 10^{-4}$  M. La formación de los 6, 7, 8 hidroxiderivados de la Warfarina es catalizada por la fracción mitocondrial y baja a un 5% de el nivel original cuando la fase aérea de la incubación se reemplaza por nitrógeno, indicando que la reacción necesita oxígeno molecular.

TABLA X

Metabolismo de Warfarina por fracciones subcelulares de Hígado de Rata.

Fracción	Metabolitos formados en micromoles			
	Metabólito X	6-hidroxi Warfarina	7-hidroxi warfarina	8 hidroxi warfarina
1000 g. sobrenadante	5.9	12.9	24.1	7.3
9000 g. sobrenadante	6.2	10.7	20.8	6.6
Mitocondrias	0.1	0.2	0.4	0.3
Microsomas	3.1	11.2	19.9	9.0
Fracción soluble	5.4	1.8	0.3	0.1

La reacción de hidroxilación requiere NADPH. En ausencia de un sistema generador de NADPH (NADP, G-GP, G-6P DHasa) se forma muy poca cantidad de los derivados.

TABLA XI

Sistema	Metabolitos formados en mmoles		
	6-hidroxi warfarina	7-hidroxi warfarina	8-hidroxi warfarina
Completo	13.1	23.1	4.3
-NAD	9.7	17.6	2.1
-NAD P	1.0	1.9	0.4
-NADP, G-6-P, G-6-PDHasa	0.2	0.2	0.3

El sistema completo contiene:

1.3	micromoles de Warfarina marcada con isótopo radiactivo $C^{14}$ .
0.54	micromoles de NADP.
0.62	" " NAD.
2.00	" " ATP.
6.54	" " G-6-P.
120.0	" " Nicotinamida.
200.0	" " KCl.
10.0	" " $MgCl_2$ .
40.0	" " $K_2HPO_4$ - $KH_2PO_4$ solución reguladora de pH 7.4
10.0	micromoles de Tris-HCl solución reguladora de pH 7.4
10.0	Unidades Kornberg de G-6-P DHasa.

Microsomas hepáticos equivalentes a 500 mg. de hígado en un volumen total de 3.5 ml. en tubo de 50 ml. con tapón de vidrio. La incubación de los sistemas se hizo a  $37^{\circ}C$  durante 30 minutos en condiciones aeróbicas.

El metabolismo enzimático de la Warfarina en el hígado de ratas produce más 7-hidroxiwarfarina que los derivados 6 y 8.

La hidroxilación no enzimática produce mayor cantidad de 6 hidroxiwarfarina.

Un año mas tarde Masayuki Ikeda, A. H. Conney y J. J. Burns estudian el efecto estimulante de Fenobarbital, Clordano y DDT sobre el metabolismo de la Warfarina en ratas en vivo y en vitro concluyendo que:

1/o. El tratamiento previo a la administración de Warfarina - con fenobarbital e insecticidas causa gran incremento en la dosis letal media de el anticoagulante:

TABLA XII

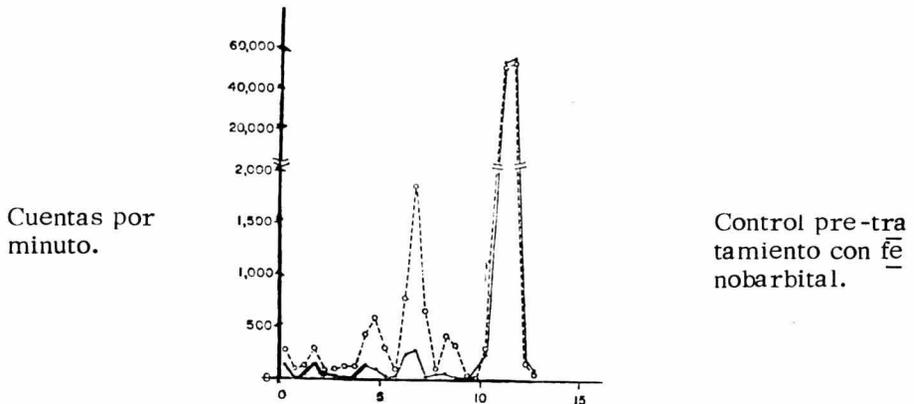
Exp. No.	Tratamiento	Dosis diaria de Warfarina mg/Kg.	LD <sub>50</sub> Warfarina. mg/Kg.
1	Control	-----	15
	Fenobarbital	75	750
2	Control	-----	15
	Fenobarbital	75	500
3	Control	-----	30
	Clordano	50	400
	DDT	50	450

Las ratas fueron inyectadas intraperitonealmente durante 4 días con fenobarbital e insecticidas al 5/o. día se les administró por vía oral la Warfarina el tiempo de observación para determinar la LD<sub>50</sub> fué de - 14 días.

Cada valor se obtuvo con 35 a 50 ratas.

2/o. La incubación de Warfarina (marcada con isotopo radioactivo) con la fracción sobrenadante centrifugadas a 9000 x g del homogenado del hígado de rata tratadas con fenobaro

bital, clordano y DDT durante 4 días aumenta la hidroxilación de la Warfarina en las posiciones 6, 7, 8, así como la formación del metabolito. Fig. 11



El aumento en la concentración de los productos 6, 7, 8, hidroxilados en el tratamiento con fenobarbital es 5 veces más que los controles y en los insecticidas el aumento es de 3 veces más. La concentración del metabolito X también se aumenta, como se ve en la tabla siguiente:

TABLA XIII

Metabolitos formados en micromoles.									
Trata - miento.	Dosis diaria mg/Kg	6-hidroxi- warfarina		7-hidroxi- warfarina		8-hidroxi- warfarina		Metabolito X	
Sol sa - lina	----	3.0	0.2	6.7	0.5	1.9	0.2	1.6	0.3
Aceite de maíz	----	2.7	0.2	5.7	0.5	1.5	0.2	2.3	0.1
Fenobar bital	75	16.2	0.6	29.6	1.2	9.2	0.3	4.2	0.3
Clorda - no	50	7.2	0.5	17.2	0.9	4.7	0.3	3.9	0.4
DDT	50	9.2	0.5	16.7	1.1	4.9	0.3	2.9	0.1

Se utilizaron 3 ratas por tratamiento y el valor anotado es la -  
media de los 3 valores obtenidos.

3/o. Cuando se administraron 150 mg/Kg. de Warfarina por -  
vía oral a ratas de 50g. de peso y se determinaron sus -  
metabolitos en plasma a varios intervalos, se observaron  
cantidades apreciables de Warfarina así como de los metabo  
litos 6-hidroxiwarfarina y 7-hidroxiwarfarina y un meta  
bolito con la misma movilidad cromatográfica del metabo  
lito X. No se observó la presencia del metabolito 8-hi--  
droxiwarfarina.

La administración previa de fenobarbital e insecticidas aumentan la concentración de los metabolitos 6-hidroxiwarfarina y 7-hidroxiwarfarina en la 3 horas después de la administración de Warfarina pero en 16 a 24 horas disminuye ese aumento.

TABLA XIV

Efecto estimulante de fenobarbital e insecticidas sobre el metabolismo IN VIVO en ratas.

Experi- mento No.	Ho- ras	Trata- miento	Concentración Plasmática.				
			Warfarina		6-hidroxi- warfarina	7-hidroxi- warfarina	Metabolito X
			Total	Li- bre			
1	1	Control	206 (155, 221, 213)	30	5 (5, 5, 6)	5 (5, 5, 6)	5 (2, 6, 8)
		Phenobarbital	215 (181, 217, 246)	33	21 (19, 22, 23)	16 (14, 17, 18)	11 (10, 11, 12)
	3	Control	170 (197, 167, 146)	18	8 (7, 7, 9)	10 (6, 9, 16)	10 (4, 9, 18)
		Phenobarbital	97 (111, 106, 75)	4.3	21 (19, 21, 22)	12 (7, 12, 17)	7 (4, 7, 9)
	5	Control	166 (193, 185, 121)	17	11 (9, 11, 12)	7 (7, 7, 8)	14 (9, 15, 19)
		Phenobarbital	62 (76, 67, 43)	1.6	12 (9, 13, 13)	10 (9, 10, 11)	2 (0, 2, 4)
16	Control	59 (67, 58, 51)	1.3	11 (10, 10, 14)	12 (9, 12, 14)	5 (4, 5, 6)	
	Phenobarbital	11 (18, 8, 8)	0.1	6 (5, 6, 7)	7 (4, 8, 8)	0 (0, 0, 0)	
24	Control	32 (37, 32, 26)	0.5	8 (6, 6, 8, 10)	9 (8, 9, 9, 11)	3 (3, 3, 3, 3)	
	Phenobarbital	7 (11, 7, 6, 5)	<0.1	4 (0, 4, 5, 7)	6 (4, 4, 7, 9)	0 (0, 0, 0, 0)	
2	5	Control	181 (176, 186)	22	11 (10, 12)	8 (7, 8)	24 (23, 25)
		Phenobarbital	67 (61, 72)	1.9	17 (16, 17)	10 (9, 11)	6 (5, 7)
3	5	Control	204 (208, 200)	29	8 (8, 8)	7 (7, 7)	16 (15, 17)
		Chlordane	91 (89, 92)	3.7	15 (13, 17)	13 (13, 13)	4 (3, 4)
		DDT	103 (92, 113)	5.1	18 (16, 19)	14 (14, 14)	7 (6, 7)

Esta misma tabla demuestra que las enzimas microsomáticas que inducen la hidroxilación tienen un efecto mayor sobre la concentración de Warfarina libre que sobre la concentración total de Warfarina en el plasma.

M. A. Hermodson, J. W. Suttie y K. P. Link estudiando el metabolismo de Warfarina marcada, en ratas resistentes a la Warfarina, en encontraron que los extractos etéreos de orina y heces de las ratas resis tentes contenían 53% de la radioactividad inyectada en comparación con el 50% que presentaban las ratas normales.

Casi 2/3 de la radioactividad total de la orina se excretó en los 2 primeros días en las ratas resistentes y normales.

La determinación cromatográfica del extracto etéreo de la orina colectada durante una semana, demostró la presencia de Warfarina inalterada y 6 metabolitos en cantidades relativamente iguales en los dos grupos de ratas: resistentes y normales. Pero no publica los datos correspondientes.

Posteriormente W. M. Barker, M. A. Hermodson y P. Link, - continuando los estudios sobre el metabolismo de Warfarina en encontraron que: cromatogramas de extractos de orina revelaban la presencia de Warfarina inalterada y 6 metabolitos que por dilución inversa de isotopos conocidos se identificaron como: 6-hidroxiwarfarina, 7-hi -

droxiwarfarina, 8-hidroxiwarfarina, 4-hidroxiwarfarina, 2,3-dihidro-2-metil-4-fenil-5-oxo-gammapyrano (3, 4-c) (1) benzopirano, y un compuesto conjugado 7-hidroxiwarfarina -glucuronido. Fig. 12

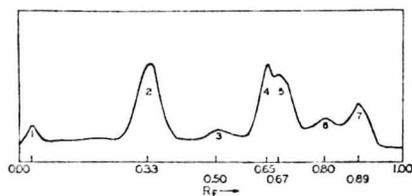


Fig. 12

Pico 1 Conjugado 7-hidroxiwarfarina -glucuronido.

Pico 2 7-hidroxiwarfarina.

Pico 3 8-hidroxiwarfarina.

Pico 4 4-hidroxiwarfarina.

Pico 5 6-hidroxiwarfarina.

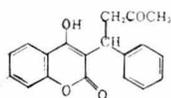
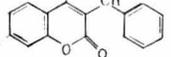
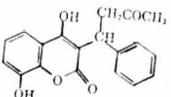
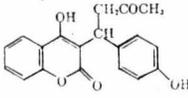
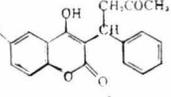
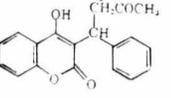
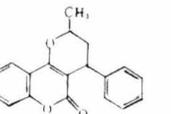
Pico 6 Warfarina.

Pico 7 2,3-dihidro-2-metil-4-fenil-5-oxo-gamma-pirano  
(3,2-c)-(1) benzopirano.

El sistema de solventes: t-butanol-benceno-hidróxido de sodio -  
concentrado - agua 45:20:9:3

Las estructuras y porcentaje de estos compuestos están en la -  
tabla XV.

TABLE XV

Pico No.	Rf.	Compuesto	Estructura	% Radioactividad	
				Dilución Isotópica. %	Cromatografía. %
1	0.04	Conjugado 7-Hidroxiwarfarina		35	3.9
2	0.33	7-Hidroxiwarfarina.			32.5
3	0.59	8-Hidroxiwarfarina.		8.9	3.9
4	0.65	4-Hidroxiwarfarina		21.0	41.6
5	0.67	6-Hidroxiwarfarina		15.4	
6	0.80	Warfarina		6.5	6.5
7	0.89	2,3-Dihidro-2-metil-4-fenil-oxo-8-pirano (3,2-c)(1) benzopyrano		6.6	11.7
Total				93.5+	100.1

- 2/o. Los cromatogramas de extractos de orina colectada a varios intervalos de tiempo después de la administración de la dosis de warfarina marcada, revelaron que los metabolitos se excretan en proporciones constantes, por lo que puede suponerse que la forma en que se metaboliza la Warfarina no cambió con el tiempo durante el curso del experimento.
- 3/o. Los cromatogramas de extractos etéreos de heces fueron cualitativamente idénticos a los de extractos de orina por lo que se supone que los metabolitos presentes en las heces son los mismos que en la orina. Solo que la concentración de los mismos es un poco diferente.
- 4/o. Todos los metabolitos excepto el conjugado glucurónico fueron probados para determinar su actividad anticoagulante en ratas, solo el 4'-hidroxiwarfarina demostró tener 1/4 de la actividad de la Warfarina.

Richard J. Lewis y William F. Trager, estudian el metabolismo de la Warfarina en el hombre, utilizando una mezcla racémica de los isómeros R y S, Fig. 13, e identifican los metabolitos del extracto urinario por cromatografía en capa fina, espectroscopía de absorción ultravioleta y espectrometría de masas.

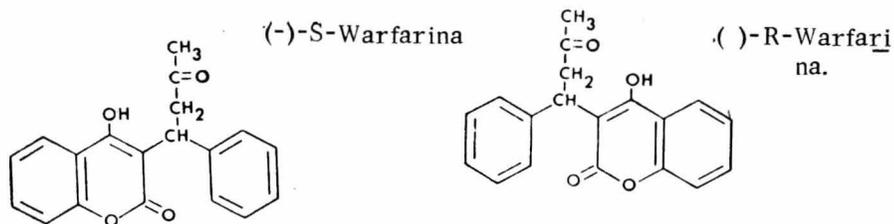


Fig. 13

1. - La cromatografía en capa fina del extracto de orina, desarrollada con dicloruro de etileno y acetona 9:1, reveló 5 manchas de fluorescencia azul y  $R_f$  de 0.75, 0.50, 0.23, 0.10 y 0.00 que se designaron como compuestos A, B, C, D, E, y una mancha de fluorescencia amarilla con  $R_f$  0.19 que se designó como compuesto CY. Fig. 14.

Usando ciclohexano, formiato de etilo y ácido fórmico - - 100:200:1 el compuesto se separó en 2 componentes  $D_1$  y  $D_2$  Fig. 14

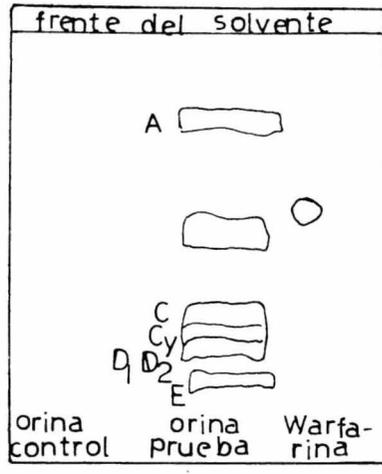


Fig. 14

No hay diferencias notables cuando las muestras de orina se obtienen de pacientes con tratamiento largo a base de Warfarina y de voluntarios que reciben una sola dosis. Tampoco hubo diferencias cuando las muestras de orina se analizaron inmediatamente o después de 3 meses de almacenamiento en congelación sin preservativos.

Con todos los sistemas de solventes que se probaron dieron resultados idénticos las cromatografías corridas con muestras de productos metabólicos sintéticos de Warfarina y los productos de purificación de los metabolitos extraídos en las muestras de orina de pacientes y voluntarios tratados con Warfarina:

El compuesto C fué idéntico a el compuesto 7 - hidroxivarfarina sintético.

El compuesto CY fué idéntico a el compuesto 6 - hidroxivarfarina sintético.

Los compuestos D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub> fueron cromatográficamente indistinguibles de los derivados alcohólicos en la cadena lateral de la Warfarina, como lo demuestra la fig. 15 y la Tabla XVI.

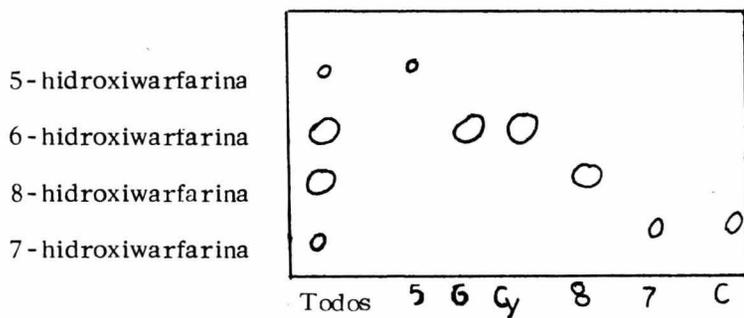


Fig. 15

TABLA XVI

COMPUESTOS	SISTEMA DE SOLVENTES		
	E:A:	C:EF:FA RF	T:B:A:W
7-hidroxiwarfarina	0.56	0.47	0.22
C (extracto de orina)	0.56	0.47	0.22
6-hidroxiwarfarina	0.52	0.45	0.32
CY (extracto urinario)	0.52	0.45	0.32
Alcohol <sub>1</sub> de la Warfarina	0.16	0.74	0.45
D <sub>1</sub> (extracto urinario)	0.16	0.74	0.45
Alcohol <sub>2</sub> de la Warfarina	0.12	0.66	0.40
D <sub>2</sub> (extracto urinario)	0.12	0.66	0.40
5-hidroxiwarfarina	0.10	0.49	0.43
8-hidroxiwarfarina	0.58	0.67	0.27
Warfarina	0.83	0.76	0.55

E:A = Dicloruro de etileno - Acetona 7:3

C:EF:FA = Ciclohexano: formiato de etilo: ácido fórmico 100:  
200: 1

T:B:A:W = t-butanol:benceno:hidróxido de amonio concentrado:  
agua 90:40:18:6

Los espectros de absorción ultravioleta obtenidos para el compuesto 7-hidroxiwarfarina sintético y el compuesto C del extracto urinario fueron idénticos, los 2 tienen la máxima extinción a 329 y a 256 milimicras en NaOH y a 312 después de acidificados Fig. 16

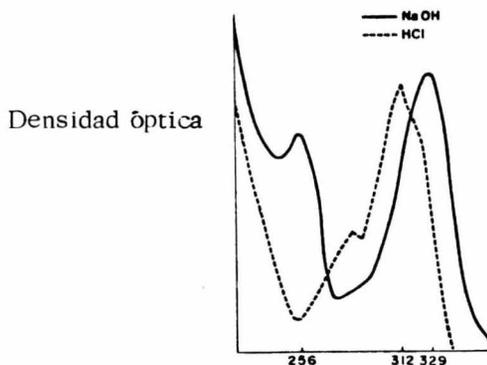
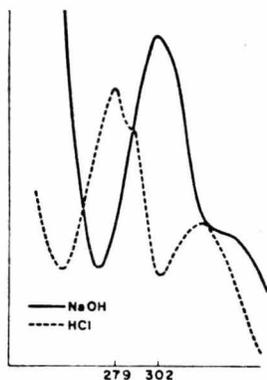


Fig. 16.

Longitud de onda en milimicras.

La absorción máxima para el compuesto sintético 6-hidroxiwarfarina y CY fue 302 milimicras en ácido. Fig. 17.

Densidad  
óptica.



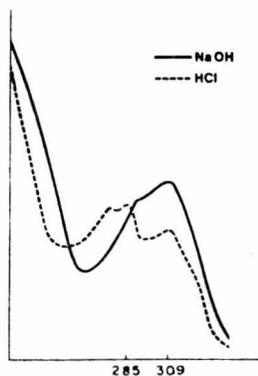
6-hidroxiwarfarina  
y compuesto CY

Fig. 17

Longitud de onda en milimicras

Los compuestos  $D_1$  y  $D_2$  dieron espectros de absorción idénticos entre sí, idénticos a los 2 alcoholes de la Warfarina, la máxima absorción a 309 en medio alcalino y 285 y 275 milimicras en medio ácido. Fig. 18 y 19.

Densidad  
óptica



Alcohol<sub>1</sub> de la Warfarina  
y compuesto  $D_1$

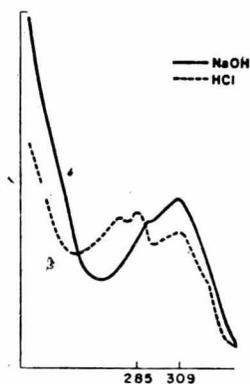
Fig. 18

Longitud de onda en milimicras



QU. N. C.

Densidad  
óptica



Alcohol<sub>2</sub> de la Warfa  
rina y compuesto D<sub>2</sub>

Fig. 19

Longitud de onda en milimicras

Para la 5-hidroxiwarfarina la máxima absorción en medio alcali no es de 312 y 300 y en medio ácido es de 299.

Para identificar los metabolitos de la Warfarina, se determinó su espectro de masas y se elucidó su esquema de fragmentación por una combinación de registro de los iones metaestables y medición exacta de su masa en comparación con Warfarina deuterada. Fig. 20

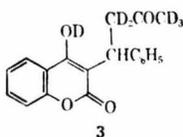


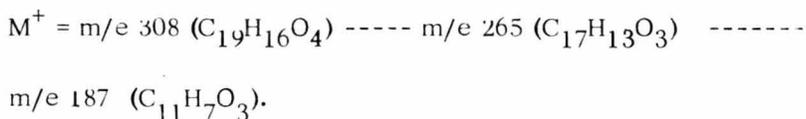
Fig. 20

La Warfarina tiene una fórmula empírica  $C_{19}H_{16}O_4$  y un peso molecular de 308 expresado con la proporción de masa a carga:

$$m/e + (M^+) \text{ am/e } 308 \quad \text{Warfarina} = (M^+) \text{ a } M/e \text{ } 308$$

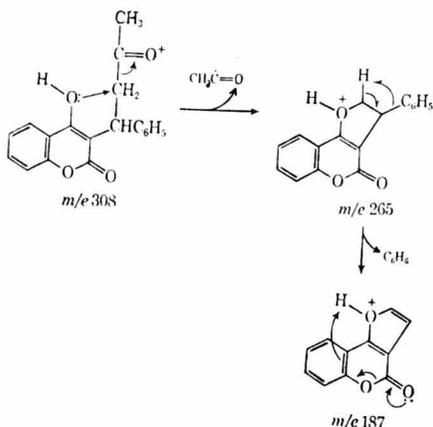
En el espectro de masas de la Warfarina además del ión molecular  $M^+$   $m/e$  308 aparece un primer pico que corresponde a  $m/e$  265 ( $M^+ - 43$ ) que resulta de la ionización inicial del grupo acilo - C = O de la cadena alifática lateral de la Warfarina, seguido del rompimiento heterocíclico con pérdida del radical acilo para formar el ión dihidroxifurano oxonio a  $m/e$  265. Este ión pierde benceno vía rompimiento hemolítico con abstracción de hidrógeno, para dar el ión furano oxonio estabilizado por resonancia a  $m/e$  187 ( $m/e$  265 - 78), que representa el núcleo cumarínico. Las fórmulas empíricas de estos iones se determinaron por medición exacta de la masa.

El esquema de fragmentación puede describirse pues como sigue:



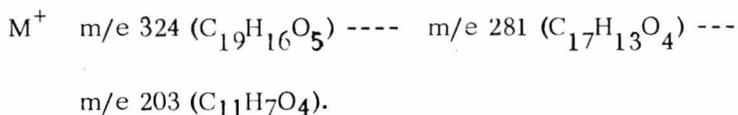
Las fórmulas estructurales y el mecanismo propuesto para la formación de estos iones se muestran en el esquema II.

## ESQUEMA II



Los esquemas de fragmentación de los compuestos sintéticos 6, 7 hidroxivarfarina son semejantes al de la Warfarina: A partir del ión molecular, rompimiento del grupo acilo para dar el pico base, enseguida - pérdida del grupo fenilo para dar el ión representativo del núcleo cumarínico.

La medición exacta de la masa de estos iones solo difiere de la - de los iones correspondientes a la Warfarina en el aumento de 16 unidades de masa debido a la adición de un átomo de oxígeno, por tanto su esquema de fragmentación es el siguiente:



Los compuestos C, CY, dieron espectros de masas idénticos a los de los compuestos sintéticos 6, 7-hidroxiwarfarina.

Los espectros de masas de los compuestos D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub> fueron diferentes a los de la Warfarina y a los de los compuestos hidroxilados.

Estos compuestos dieron un ión molecular inicial  $M^+ = m/e \ 310$  que correspondió a la fórmula empírica  $C_{19}H_{18}O_4$  sugiriendo un compuesto similar a la Warfarina pero con 2 átomos más de hidrógeno. La presencia de un ión a  $m/e \ 292 \ (C_{19}H_{16}O_3)$  indica que hay pérdida de agua en el ión molecular y por lo tanto, implica la reducción de la cetona de la cadena lateral de la Warfarina con formación de alcohol como una transformación metabólica, por lo demás la presencia de iones a  $m/e \ 265$  y  $m/e \ 187$  sugiere que la fragmentación posterior sigue el mismo esquema.

Los espectros obtenidos con los alcoholes sintéticos correspondientes, fueron idénticos a los de los compuestos D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub>. Fig. 21.

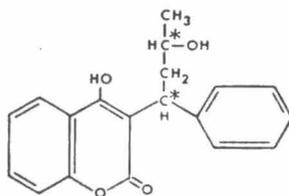


Fig. 21

Alcohol de la Warfarina

## VI. - TOXICIDAD DE LA WARFARINA.

### 1) EXPERIMENTOS EN PERROS

#### Y CERDOS.

Hans Wanntorp hizo los primeros estudios de toxicidad en animales domésticos, con el objeto de determinar la dosis mínima letal y para probar la efectividad del método químico de identificación de warfarina en materiales post-mortem.

Utilizó perros de raza indefinida y cerdos. Los perros fueron alimentados 2 veces al día con alimento para perros en forma de pelotillas. La dosis de Warfarina se mezcló con 100 gramos de carne picada y se dió a los perros antes de la comida de la tarde. Siempre se acabaron su ración de carne.

La comida de los cerdos era a base de granos, cáscaras, harinas de carne, harina de pescado, harina de alfalfa, minerales, aceite de hígado de bacalao y papas.

Se les dió de comer dos veces al día. La dosis de Warfarina se les mezcló con cascarilla de trigo y leche y se les dió antes de la comida de la tarde, asegurándose de que tomaran toda la ración.

La toxicidad de la Warfarina en envenamiento agudo se probó - dando una sola dosis correspondiente a 10 - 100 mg./Kg. de peso corporal a 14 perros.

Dosis de 10, 20, 25 y 40 mg/Kg. no causaron síntomas visibles ni lo hicieron tampoco cuando fueron elevadas hasta 60 mg./Kg. en 7 perros.

Por otra parte, un perro que recibió 100 mg/Kg. reaccionó en el 4/o., 5/o. y 6/o. día después de la administración de Warfarina con diarrea y hemorragia intestinal, perdió el apetito y se hizo marcadamente indiferente, hacia el 7/o. día cesó la hemorragia pero no recobró el - apetito hasta el 10/o. día. Sin embargo, el perro sobrevivió a la prueba sin daño aparente.

La coagulación de la sangre se examinó solamente en 3 casos. Para una sola dosis de 25 mg./Kg. de peso corporal, el tiempo de coagulación se elevó a 2.5 minutos después de 4 días de la ingestión de Warfarina recobrando su nivel normal en 9 días, con una dosis de 60 mg./Kg. el aumento del tiempo de coagulación fué de 4 minutos después de 4 días y a juzgar por la curva habría sido mayor después de los 4 días de haber

se hecho la determinación. Después de 6 días disminuyó a 3.5 minutos y en 8 días nuevamente era normal.

Con una dosis de 100 mg./Kg. el tiempo de coagulación subió a 10 minutos después de 4 días permaneciendo así durante 3 días. Después de 10 días recuperó su normalidad.

Experimento de toxicidad en perros.

TABLA XVII

Compuesto.	Dosis en mg/Kg.	Mortalidad.	Tiempo de supervivencia en días.
Warfarina	10.0	0/1	
	20.0	0/1	
Warfarina	25.0	0/1	Ninguno de los animales murió.
	40.0	0/3	
	60.0	0/7	
	100.0	0/1	

Para probar la toxicidad de Warfarina en dosis repetidas se les dieron dosis diarias de 0.2 - 10 mg./Kg. de peso corporal a 10 perros. El perro que había recibido la dosis mas baja (0.2 mg.) durante 15 días sobrevivió a la prueba sin ningún síntoma visible. De los 2 perros que recibieron dosis diaria de 0.3 mg./Kg. uno sobrevivió sin ningún síntoma a la prueba de 15 dosis y el otro murió después de 11 días (10 dosis) En el caso de las dosis mas altas 0.5 mg./Kg. administradas a 3 perros,

1 mg. a un perro, 2 mg. a un perro y 10 mg. a 2 perros solo siete murieron después de 7 a 14 días. Para probar el efecto de administración intermitente se hicieron pruebas con un perro al que se le dieron dosis de 0.5 mg./Kg. excepto en 4/o. 6/o. 11/o. 13/o. y 18/o. días.

El animal no murió sino hasta después de 21 días, cuando había recibido 16 dosis, a esta dosis comparativamente baja, el metabolismo y la excreción de la Warfarina se elevaron tan marcadamente que el tiempo de coagulación disminuyó después de cada interrupción, y no fué sino hasta los 20 días que el tiempo de coagulación excedió los 10 minutos.

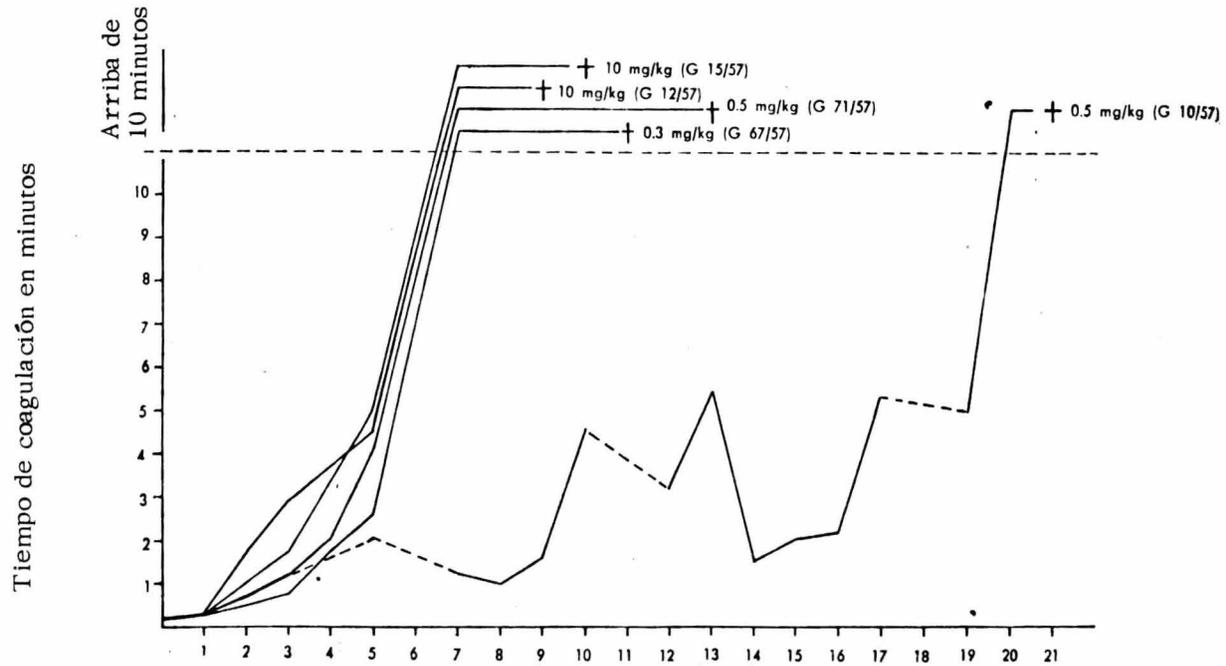
A otro perro se le administraron 0.3 mg./Kg. durante 6 días consecutivos con uno de descanso. Esta interrupción no se tradujo en disminución del tiempo de coagulación lo que demuestra que la cantidad de Warfarina acumulada era tal que la omisión de una dosis no causó ningún efecto visible en el tiempo de coagulación.

TABLA XVIII

Toxicidad de Warfarina con dosis repetidas en perros.

Dosis diaria en mg. /Kg.	Mortalidad	Tiempo de supervivencia en días.		
0.2	0/1			
0.3	1/2	11		
0.5	3/3	8	9	14
1.0	1/1	7		
2.0	1/1	7		
10.2	2/2	8	10	

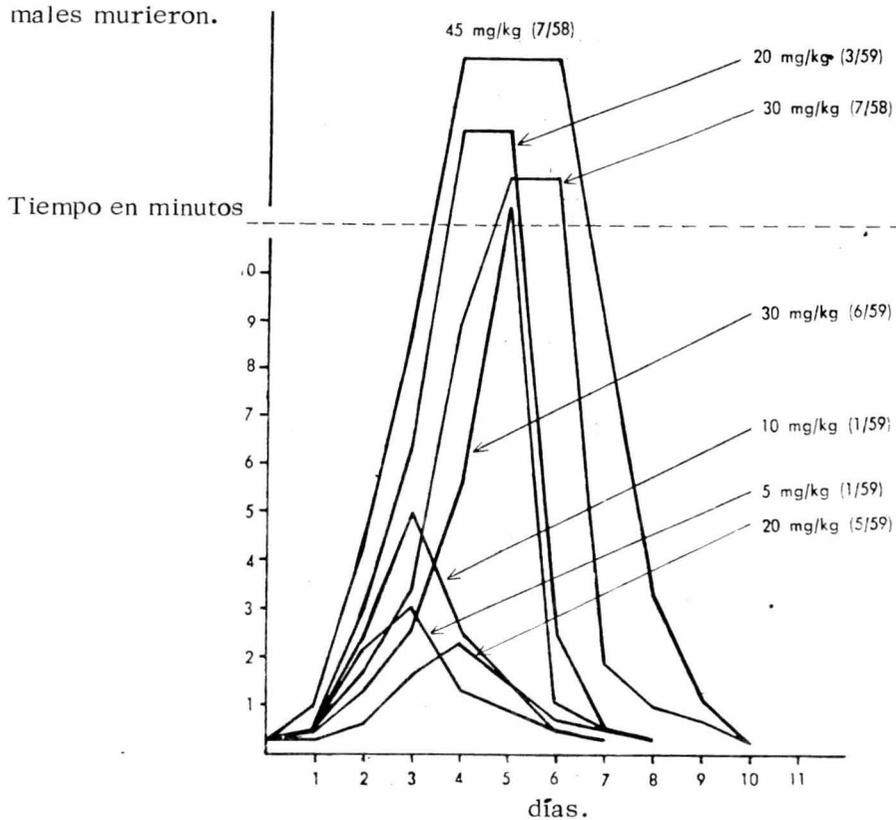
### Tiempo de coagulación en perros que recibieron dosis repetidas



Tiempo ( en días ) transcurrido después de la administración de la primera do  
sis.

La toxicidad aguda de Warfarina en cerdos, se probó con dosis únicas de 5 - 100 mg./Kg. de peso corporal, en 13 animales. Después de la dosis de 5 a 10 mg./Kg. un animal murió y otro sobrevivió sin presentar síntomas visibles. Dos cerdos que recibieron 20 mg./Kg. resistieron dosis sin efecto visible. De 3 cerdos que recibieron 30 mg./Kg. dos resistieron y uno murió, a uno de los sobrevivientes se le dió una dosis mas alta: 45 mg./Kg. unas semanas mas tarde, sobreviviendo a la dosis sin daño aparente.

En las pruebas con dosis mas altas 60 y 100 mg. Kg. los animales murieron.



Se determinó el tiempo de coagulación de los 13 animales, utilizados en esta prueba. (6 murieron y 7 sobrevivieron). En 3 de los supervivientes el tiempo de coagulación resultó marcadamente largo. A un cerdo que se le administraron 5 mg./Kg. presentó el tiempo de coagulación mas alto: 3 minutos después de 3 días.

El que recibió 10 mg./Kg. tuvo un tiempo de coagulación de 5 minutos en 3 días.

El que recibió 20 mg./Kg. tuvo un tiempo de coagulación de 21 min. después de 4 días después de 7 a 8 días los tiempos de coagulación volvieron a la normalidad en los 3 casos.

Otro cerdo que recibió 20 mg./Kg. el tiempo de coagulación sobrepasó los 10 minutos después de 4 y 5 días pero recuperó su normalidad en 8 días.

Después de una dosis de 30 mg./Kg. administrada a 2 animales el tiempo de coagulación sobrepasó los 10 minutos en 5 días. Uno de ellos siguió con ese nivel después de 6 días, después de 8 y 10 días respectivamente, los tiempos de coagulación volvieron a la normalidad.

En los 6 animales que murieron, dosis de 5 y 30 mg./Kg. dieron tiempos de coagulación mayores de 10 minutos en 5 y 6 días y en 9 a 12 días los tiempos de coagulación eran nuevamente normales pero presentaban tan serias hemorragias y cambios patológicos que fue nece-

sario matarlos. En los animales que recibieron 10, 60 y 100 mg./Kg. el tiempo de coagulación excedió los 10 minutos en 4 días. El animal que recibió 10 mg./Kg. murió en 7 días, los otros en 6 y 8 días. En ninguno de estos animales disminuyó el tiempo de coagulación. Fig. 24.

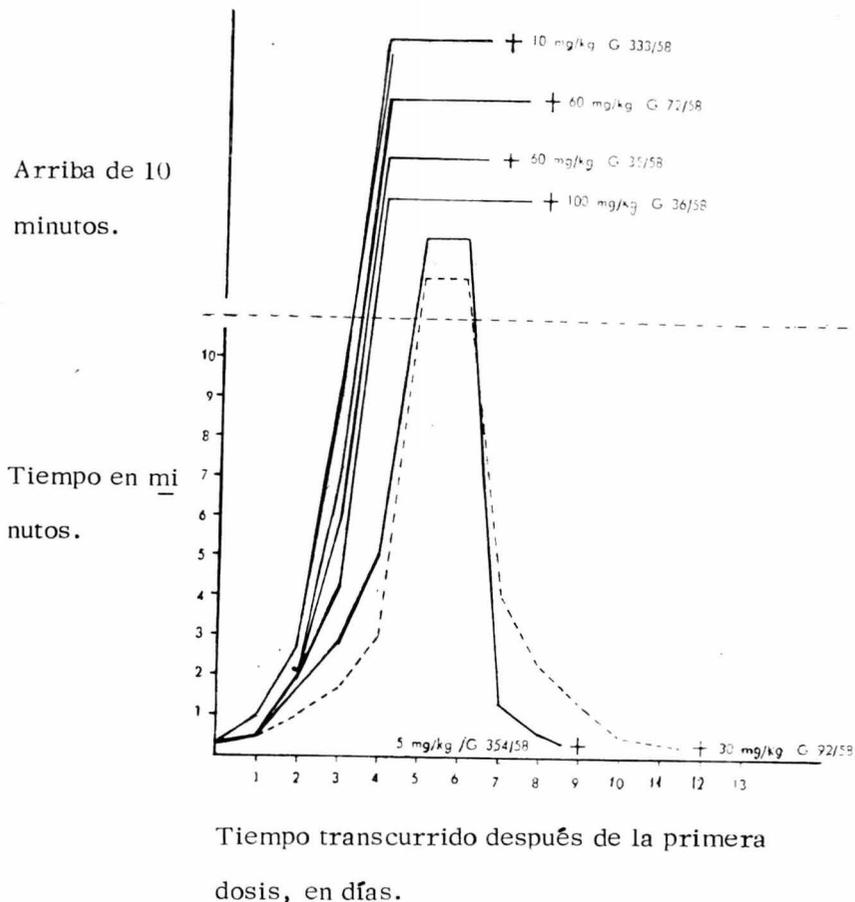


Fig. 24. - Tiempo de coagulación en cerdos que murieron con la administración de una sola dosis.

TABELA XIX

Toxicidad de Warfarina en cerdos ( dosis única ).

Dosis mg./Kg. de peso corporal	Mortalidad.	Supervivencia en días
5.0	1/2	9
10.0	1/2	7
20.0	0/2	
30.0	1/3	12
43.0	0/1	
60.0	2/2	6 - 8
100.0	1/1	7

La toxicidad de la Warfarina después de dosis repetidas se probó con dosis diarias de 0.2 y 0.5 mg./Kg. de peso corporal en 5 cerdos.

Un cerdo que recibió 0.2 mg./Kg. diariamente, murió después de 8 dosis. Cuatro murieron después de 5 a 10 dosis de 0.5 mg./Kg.

Los tiempos de coagulación se determinaron en todos los animales, después de la dosis diaria de 0.2 y 0.5 mg./Kg. los tiempos de coagulación excedieron los 10 minutos después de 5 días. Los animales murieron en 8 y 6 días.

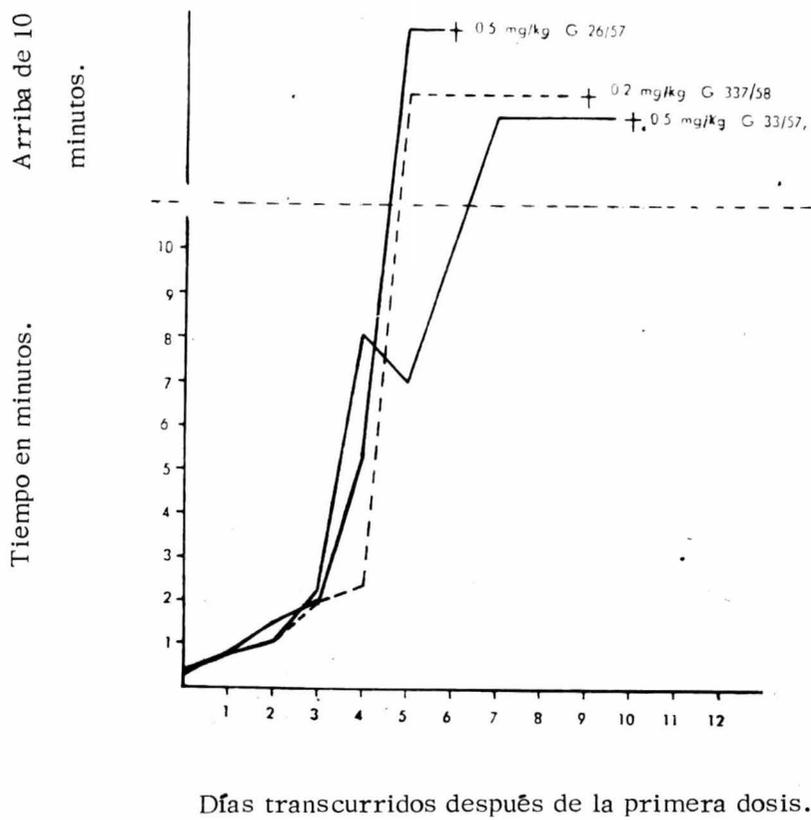


Fig. 25. - Tiempo de coagulación en cerdos que recibieron dosis repetidas.

2) OBSERVACIONES CLINICAS. -

a) En los perros y los cerdos usados en el experimento los tiempos de coagulación se elevaron en 24 horas y luego alcanzaron su máximo después de varios días. Este máximo fue superior a, 10 minutos en

mo fue superior a 10 minutos en dosis única o en dosis re  
petidas.

- b). El primer síntoma visible fué una creciente apatía que se observa a los 5 - 6 días después de la ingestión de la droga o unas horas antes de la muerte.

En algunos casos se observa sangre en la orina y diarrea. Algunos perros presentan inflamaciones con edema y hemau  
toma a los lados de la mandíbula inferior, en la parte anteu  
rior del pescuezo y alrededor de las articulaciones de las  
piernas.

- c). Los cerdos como los perros se vuelven apáticos se echan en la paja, y no se levantan. Algunas veces presentan sanu  
gre en las heces, algunos animales presentan grandes in-  
flamaciones o tumefacciones en la parte lateral e interior  
de la quijada inferior en la parte anterior del pezcuezo que  
se traduce en dificultad respiratoria. Las terminaciones  
de la piel especialmente las orejas y las piernas se vuel-  
ven cianóticas.

- d). Un síntoma común en perros y cerdos es la elevación de -  
temperatura durante el primer período de la intoxicación.  
Unas pocas horas o aún un día antes de morir la tempera-  
tura es normal o subnormal y las piernas se vuelven frías,

las mucosas están pálidas, se incrementa la actividad cardiaca y se acelera la respiración en la mayoría de los casos.

Durante los últimos días de vida hay hemorragias internas por punciones para toma de muestras de sangre o por las mas ligeras lastimaduras. Los animales con frecuencia se paralizan especialmente de los cuartos traseros. Un día antes de morir o a veces varios días antes los animales caen en coma y mueren quietamente.

### 3). OBSERVACIONES ANATOMOPATOLOGICAS.

Los experimentos sobre toxicidad de Hans Wantorp contribuyen al conocimiento de la patología de intoxicaciones por anticoagulantes.

La tabla XX muestra las características de intoxicación encontrados en el examen de los cadáveres de los animales utilizado en la experimentación de toxicidad de Warfarina y coumaclor anticoagulantes de tipo coumarínico.

T A B L A X X

E S P E C I E	Modo de Administración de la droga.	Mortalidad	HEMORRAGIAS EN										
			Pleura y Mediastino.	Cavidad Toráx.	Pulmones	Pericardio	Región Cervical Toráxica	Extremidades	Peritoneo Perirenal Periuretral	Cavidad Abdominal	Estómago e intestinos	Espacio Sub-	Necrosis del Hfgado.
P E R R O S	DOSIS UNICA Warfarina	0/14											
	DOSIS UNICA Coumaclor	17/24	++++ ++++ ++++ +	++++ ++++	++++ +	++++ +	++++ ++++ +	++++ ++++ +	++++ ++	+	+++		
	DOSIS REPETIDA. Warfarina	8/10	++++ ++++	++++ +			+++	++	+++				+
	DOSIS REPETIDA. Coumaclor	4/ 4	++++	+++	+		+++	+++	+++		+		
C E R D O S	DOSIS UNICA Warfarina	6/13				+	+	++++ ++	++++	+	+	+++	
	DOSIS UNICA Coumaclor	5/10			+	+		++++ +	+	+	++	++	+
	DOSIS REPETIDA. Warfarina	5/ 5	+	++	+	++	++	++++ +	+++	+	+	+	
	DOSIS REPETIDA. Coumaclor	5/ 5				++	+	++++	+++	++	+	+	++

Común a todos los casos es la hemorragia y la anemia general mas o menos pronunciada.

Como se observa en la tabla, las hemorragias aparecen en diferentes tejidos con predilección por ciertos sitios, esta variación es debida mas bien a diferencias de especie que a la naturaleza del tóxico y al modo de dosificación.

- a). En los perros la autopsia revela hemorragias severas en el mediastinoprecardial y postcardial y hemorragias subserológicas en diferentes secciones de la pleura y del pericardio. Con frecuencia se extienden peritraqueal y periesofágicamente hacia la cabeza, apareciendo como rocío intramuscular y subcutaneamente en la parte anterior del pescuezo arriba de la faringe y en las partes bajas de la mándibula inferior en la que pueden observarse hematomas como bolsas algunas veces del tamaño del doble del puño de un hombre normal.

Comunmente aparecen hemorragias en los sacos pleurales con mas de un litro de sangre. En la gran mayoría de los casos hay hemorragia interna intramuscular a los lados del cuello, pecho y extremidades y en algunos casos alrededor de las coyunturas. Con menor frecuencia se presentan hemorragias petequiales en las piernas y hemorragias subserológicas en diferentes secciones de la membra

na peritoneal, también puede haber hemorragias perirenales, periuretrales y retroperitoneales algunas veces como dos hematomas longitudinales simétricos subperitoneales desde los riñones a la cavidad pélvica.

Solamente un caso presentó hemocelia y 3 casos presentaron hemorragia en el estómago y en el intestino.

En todos los casos se observa anemia generalizada y en un caso se observó necrosis centrolobular del hígado.

b). En cerdos.

Solo unos pocos casos presentaron hemorragias torácicas en forma de hemorragias mediastinales.

Con mayor regularidad presentaron hemorragias subcutáneas inter e intramusculares y peri e intraarticulares en el frente y en la parte posterior de las extremidades, en algunos casos además de éstas, presentaron hemorragias subcutáneas intramusculares en la parte anterior del pezcuzo y en la región faríngea.

Son muy comunes las hemorragias y hematomas en la musculatura de los animales.

Además de las extremidades las cavidades abdominal y pélvica presentaron hemorragias abundantes. Cinco casos presentaron hemocelia con mas de 2 litros de sangre en la cavidad abdominal, con hemorragias en el estómago e in-

testino.

Todos los casos en los que se examinó el cordón espinal - mostraron extensas hemorragias subdurales en el lado dorsal del cordón cêrvico espinal.

Todos los casos presentaron un alto grado de anemia general. Tres casos presentaron necrosis lobular del hígado.

## VII. - TECNICAS DE IDENTIFICACION - DE LA WARFARINA.

A partir del descubrimiento de la Warfarina por Ikawa y colaboradores en la Universidad de Wisconsin en el año de 1944 y su aplicación posterior como medicamento humano en el tratamiento de trombosis y - en la preparación de concentrados y formulaciones o cebos para ratas y ratones de venta al público en general, fue necesario desarrollar métodos de determinación de Warfarina tanto para estudiar su distribución y efectos en el organismo como para garantizar la efectividad de los rodenticidas y salvaguardar la seguridad pública.

Varios autores han desarrollado métodos para su determinación en producto técnico, formulaciones y en productos biológicos. Estos - procedimientos en general, se fundamentan en el trabajo desarrollado en el laboratorio del Dr. Karl Paul Link de la Universidad de Wisconsin que demostró que la Warfarina podía determinarse cuantitativamente utilizando la máxima absorción a la luz ultravioleta del ácido libre o de la sal de sodio de la Warfarina.

El anticoagulante se extrae del material acidificado con un solvente orgánico y luego se extrae de dicho solvente con una solución alcalina.

La Wisconsin Alumini Research Foundation dió a conocer el primer procedimiento para la determinación de Warfarina en concentrados.

W. A. R. F. Método 821.0 Procedimiento I

Aplicación:

Determinación de la concentración de Warfarina en % en concentrados.

Equipo, Material y Reactivos.

Balanza analítica.

Espectofotometro Beckman D. U.

Agitador magnético.

Centrífuga.

Piptas volumétricas de 2, 3, 10 y 50 ml.

Tubos de centrífuga.

Matraces.

Solución de hidroxido de sodio al 1 % ( 0.25 N )

Eter etílico. Grado Reactivo.

Skellysolve. B.

Muestra del producto.

### Procedimiento.

Extraiga la muestra conteniendo más de 3 mg. de Warfarina con 50 ml. de eter etílico por agitación durante 10 minutos.

Pase una porción del extracto a un tubo de centrífuga y centrifugue durante 10 minutos.

Tome una alícuota de 2 ml. del sobrenadante y vacíelos a un tubo.

Agregue 10 ml. de solución de hidroxido de sodio al 1 % y 10 ml. de Skellysolve B. y agite durante 10 minutos.

Centrifugue hasta que esté clara la solución.

Tome 3ml. de esta solución clara y determine su densidad óptica a 308 milimicras en el espectrofotometro Beckman D. U. con una -- abertura de 0.86 mm.

Use solución de hidroxido de sodio al 1% para llevar a cero.

Calcule el % de Warfarina usando el coeficiente de extinción de 0.459 para una concentración de 1 mg. de Warfarina por 100 ml. de solución.

El método de la W. A. R. F. 821.0 fue modificado para hacer el análisis de concentrados al 0.5% de Warfarina en almidon de maíz.

Aplicación:

Determinación del contenido de Warfarina en concentrados al 0.50% con base de almidón de maíz.

Equipo, Material y Reactivos.

Balanza analítica.

Espectrofotometro Beckman Modelo D. U.

Agitador Magnético.

Centrífuga.

Pipetas volumétricas de 2, 3, 10, 50 ml.

Tubos de centrífuga.

Matraces de 125 ml. con tapón esmerilado.

Solución de Hidróxido de sodio al 1% ( 2.5 N )

Dicloruro de etilo.

Muestra del producto.

Procedimiento.

Se pesan con exactitud en la balanza analítica 0.600 g. de la muestra en el matraz de 125 ml. con tapón.

Con una pipeta se agregan 50 ml. de dicloruro de etileno grado reactivo.

Se coloca el matraz bien tapado en el agitador mecánico y se agita durante 10 minutos.

Se pasa el contenido del matraz a un tubo de centrifuga de 100 ml. y se centrifuga durante 10 minutos o el tiempo necesario para que el sobrenadante quede transparente.

Se pipetea 2 ml. del extracto en una probeta de 25 ml. con tapón.

Se agregan 10 ml. de solución de hidroxido de sodio.

Se tapa y se agita a mano durante 1 minuto.

Se prepara una solución a blanco del mismo modo, poniendo 2 ml. de dicloruro en lugar del extracto.

Se decanta la capa de hidroxido de sodio en un tubo de centrifuga y se centrifuga hasta que el sobrenadante quede transparente.

Se pipetean 3 ml. de la capa alcalina en la celda de cuarzo del espectrofotometro Beckman modelo D. U. con abertura de 0.86 mm. y se determina la absorbancia a 308 milimicras.

Cálculos:

La densidad óptica de una solución de 1 mg. de Warfarina en 100 ml. de solución de hidroxido de sodio al 1 % es de 0.463 usando el

mismo procedimiento.

Si la densidad óptica de la muestra es D

$$\begin{aligned} \% \text{ Warfarina} &= \frac{D (10 - 100) (100)}{0.463 (1000) (0.6) (2 - 50)} \\ &= D (0.9000) \end{aligned}$$

Este método fue aceptado por la Organización Mundial de la Salud para la determinación de Warfarina en concentrados al 0.5% - 1%.

J. B. Laclair del Departamento de Agricultura del Estado de California hizo una nueva modificación del procedimiento de la W. A. R. F. para la determinación de Warfarina en concentrados y en cebos comerciales.

#### W. A. R. F. Método 821.0 Procedimiento III

Aplicación:

La determinación de Warfarina en productos concentrados y en productos comerciales que contengan aproximadamente 0.025% de Warfarina.

#### Equipo, Material y Reactivos

Balanza analítica.

Espectrofotometro Beckman modelo D. U.

Agitador magnético.

Centrífuga.

Pipetas volumétricas de 2, 3, 10, 50 ml.

Tubos de centrífuga.

Solución de pirofosfato de sodio ( $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ ) al 1%.

Eter etílico.

Eter de petróleo.

### Procedimiento.

Se pesan 6 gramos de muestra en un tubo de centrífuga de 100 - ml.

Se agregan 50 ml. de eter etílico. Se tapa y se agita durante 30 minutos.

Se centrifuga hasta que la capa etérea esté transparente.

En otro tubo se ponen 10 ml. de solución de pirofosfato de sodio al 1%.

Se agregan 2 ml. de extracto etereo.

Se tapa y se agita vigorosamente durante 2 minutos

Se centrifuga a alta velocidad hasta que la capa etérea quede - - transparente.

Con un aspirador de punta fina se saca la capa etérea y la emulsión que se forma en la interfase.

Se agregan 2 ml. de éter, se agita vigorosamente, se centrifu-

ga y se elimina la capa orgánica.

Se repite la extracción con éter.

Se hacen dos extracciones mas con éter de petróleo purificado previamente por extracción con solución de pirofosfato de sodio al 1%.

Se elimina completamente la capa de solvente orgánico y se hace pasar una corriente de aire sobre la superficie de la capa acuosa durante unos segundos, para evaporar las últimas trazas de solvente, ya que si no se extrae completamente después de la extracción final, la fina película que forma sobre la superficie de la solución alcalina pasará como una suspensión de minúsculas gotitas a la cubeta de cuarzo del espectrofotómetro provocando la dispersión del rayo de luz.

Se llena la cubeta de cuarzo del espectrofotómetro con solución acuosa.

Se determina la densidad óptica a 305-310 milimicras usando solución de pirofosfato de sodio al 1% para ajustar el cero del aparato.

La solución de pirofosfato para ajustar el aparato debe extraerse con éter etílico y luego con éter de petróleo purificado.

$$\% \text{ Warfarina} = D \times 0.9$$

D = Densidad óptica de la muestra.

Esta modificación se hizo para evitar errores en la medición ya

que el dicloruro de etileno usado en la extracción del producto comercial produce una turbidez que persiste aún después de una hora de centrifugación.

Además su alta densidad hace que infinidad de pequeñas partículas de la composición floten sobre su superficie .

Por otra parte, la solución de hidroxido de sodio usada para extraer la Warfarina de la fase orgánica en el análisis de formulaciones comerciales, disuelve considerable cantidad de materia orgánica, tomando una coloración amarilla que no puede eliminarse completamente con las extracciones posteriores con éter etílico y éter de petróleo dando resultados muy altos como se demuestra en la siguiente tabla:

TABLA

Determinación de Warfarina en un cebo preparado con un contenido de: 0.025%.

Análisis	Solvente	Extractante	% Warfarina encontrada.
1	Dicloruro de etileno	10% NaOH	0.052
2	"	1% $\text{Na}_2\text{P}_2\text{O}_7$	0.027
3	Eter etílico	1% NaOH	0.048
4	"	1% $\text{Na}_2\text{P}_2\text{O}_7$	0.027

En el año de 1953 J. B. Lanclair uso columna de cromatografía empacada con atapulguita para purificar extractos de formulaciones comerciales preparadas con maíz molido y solución alcohólica de Warfarina así como cebos peleteados.

Al mismo tiempo J. Eble desarrollaba un nuevo método de determinación de Warfarina para la W. A. R. F. en el laboratorio del Dr. - Karl Paul Link de la Universidad de Wisconsin.

W. A. R. F. Método de Eble.

#### Aplicación:

Determinación de Warfarina en formulaciones comerciales.

Equipo, Material y Reactivos.

Balanza analítica.

Espectrofotómetro Beckman Modelo D. U.

Agitador magnético.

Centrífuga.

Pipetas volumétricas de 2, 3, 5, 10, 25, 50 ml.

Solución de hidróxido de sodio 0.005 N.

Solución de pirofosfato de sodio al 1%.

Solución de Acido clorhídrico 2.5 N

Eter etílico

Skellysolve.

Muestra de la formulación.

Procedimiento.

Pese 2 gramos de muestra en una botella de vidrio con tapon, agregue 50 ml. de solución de hidróxido de sodio 0.005 N o de solución de pirofosfato de sodio al 1%.

Agite una hora en el agitador mecánico.

Pase 30 - 35 ml. del extracto a un tubo de centrifuga con tapon esmerilado, asegure bien el tapon y centrifugue durante 5 minutos.

Pipetee 25 ml. del centrifugado en otro tubo de centrifuga.

Agregue 5ml. de solución 2.5 N de ácido clorhídrico.

Agregue 50 ml. de una mezcla eter etílico - Skellysolve (20-80)

Agite durante 5 minutos.

Centrifugue si hay formación de emulsión.

Pipetee 20 ml. de la capa éter etílico-Skellysolve en otro tubo de centrifuga y agregue 10 ml. de solución e hidroxido de sodio 0.005N o de solución de pirofosfato de sodio al 1%. Agite durante 2 minutos.

Saque la capta eter etílico-skellysolve y centrifugue durante un minuto con el tubo destapado.

Llene la celda del espectrofotómetro con la solución acuosa y -lea la densidad óptica a 308 milimicras.

Use solución de hidróxido de sodio 0.005 N o de pirofosfato de

sodio al 1% para llevar a cero el aparato.

Simultáneamente corra una muestra en blanco.

% Warfarina  $(D - B / -0.459) \times 0.025$

D Densidad óptica de la muestra.

B Densidad óptica del blanco.

El método de Eble fué modificado por F. B. Coon y E. F. Richter de la W. A. R. F. para hacerlo adecuado en la determinación de la concentración de Warfarina en cebos peletados en los que es muy difícil extraer completamente el principio activo solo con éter.

W. A. R. F. Método de Eble modificado por Coon.

Aplicación:

Determinación de la concentración de Warfarina en cebos peleteados.

Equipo, Material y Reactivos.

Balanza analítica.

Espectrofotómetro Beckman Modelo D. U.

Agitador mecánico.

Centrífuga.

Columna de vidrio para cromatografía.

Baño de María.

Pipetes volumétricas de 3, 20, 25, 50 ml.

Solución de pirofosfato de sodio (  $\text{Na}_2\text{P}_2\text{O}_7$  ) al 1%

Solución de Acido clorhídrico al 2.5 N.

Mezcla éter etílico-Skellysolve (20 - 80)

Eter etílico.

Attapulguita.

Procedimiento.

Pese 2 gramos de muestra.

Agregue 50 ml. de solución de pirofosfato de sodio al 1%

Agite durante 1 hora.

Centrifugue durante 5 minutos.

Tome alicuota de 25 ml.

Agregue 5ml. de solución de ácido clorhídrico 2.5 N.

Agregue 50 ml. de solución éter etílico-Skellysolve.

Agite durante 10 minutos.

Ponga 20 ml. de la fase etérea un vaso pequeño y evapore a sequedad en Baño de María usando una corriente suave de aire.

Recupere el residuo con 3 porciones de 1 ml. de éter etílico, - pasando cada una de las porciones a través de una columna de - cromatografía empacada con 2 gramos de Attapulguita.

Eluya con 20 - 25 ml. de éter etílico.

Agregue 10 ml. de solución de pirofosfato de sodio al 1%.

Agite vigorosamente. Deje separar las dos capas y saque la so

lución etérea.

Lave la solución de pirofosfato de sodio con éter y luego con -  
Skellysolve B.

Determine la densidad óptica de la solución alcalina a 308 mili-  
micras en el espectrofotómetro Beckman modelo D. U.

La Organización Mundial de la Salud en el boletín No. 6 - acep-  
ta el siguiente método de determinación de Warfarina en producto técni-  
co.

W. H. O./SRT/6.

#### Aplicación:

Determinación de la concentración de Warfarina en producto  
técnico.

#### Equipo, Material y Reactivos

Balanza analítica.

Espectrofotómetro Beckman Modelo D. U.

Matraces aforados de 100 ml.

Pipetas volumétricas de 2ml.

Solución de hidróxido de sodio 0.1N.

Muestra del producto técnico.

#### Procedimiento

Pese con exactitud 50 mg. de la muestra y páselos cuantitativa-

mente a matraz aforado de 100 ml.

Agregue solución de hidróxido de sodio 0.1 N, disuelva y afore a la marca. Tome 2ml. de esta solución y páselos a otro matraz aforado de 100 mililitros, afore a la marca con solución de hidróxido de sodio - 0.1 N. Determine la absorbancia de la dilución final a 308 milimicras - en el espectrofotómetro con abertura de 0.86 mm. usando solución 0.01 N de hidróxido de sodio para ajustar la transmitancia a 100%.

$$\% \text{ Warfarina} = A \times 1000 \times 100/461$$

A = Absorbancia de la muestra.

Lloyd C. Mitchell de la División de Alimentos, del Departamento de Educación, Salud y Bienestar Social de Washington D, C. presenta - un procedimiento para la separación e identificación de Antu Pival y Warfarina por Cromatografía en papel.

#### Equipo, Material y Reactivos.

Lámpara de ultravioleta de Luz Negra de la Vogel Luminescence Corp. de San Francisco California.

Cámara de cromatografía

Papel filtro Watman No. 1 de 8 x 8 pulgadas.

Matraces aforados de 100, 200 ml.

Pipetas volumétricas de 1 microlitro.

Fase estacionaria: Se diluyen 4 ml. de dimetilacetamida (De la

Eastman Organic Chemical, Distillation Products Industries, Rochester 3, N. Y. # 4972) a 100 ml con éter etílico A. C. S.

Fase móvil: Es una mezcla de octanos de grado comercial (De la Phillips Petroleum Corp. Bartlesville, Okla.)

Agente Cromogénico: Se disuelven 11 gramos de KOH en metanol A. C. S. se enfría y se diluye con 200 ml. de metanol.

Soluciones patrón: Se preparan al 1% peso en volumen en dioxano.

El Pival y la Warfarina son estables pero el Antu no, entonces se debe preparar justamente antes de poner la muestra en el papel.

No se debe mezclar con las soluciones de Pival y Warfarina.

#### Procedimiento.

Coloque un microlitro de la muestra en el papel a una distancia de 1 pulgada del extremo lateral e inferior y entre cada una de las muestras a probar.

Con las pipetas de un microlitro ponga la muestra de cada uno de los rodenticidas en la parte inferior de 2 hojas de papel a una distanccia de por lo menos una pulgada del límite inferior, lateral y entre cada una de las muestras. Deje secar el papel después de la aplicación de las muestras.

Ponga 50 ml. de la fase móvil en la cámara de cromatografía y colóquele su tapadera de vidrio.

Rocíe los papeles con el solvente inmóvil ( Fase estacionaria ).

Inmediatamente páselos a la cámara de cromatografía y séllela con un papel de celofan.

Cuando el solvente móvil alcance el límite superior de las hojas (10 a 12 cm. de la línea escogida para colocar las muestras).

Saque los papeles de la cámara, señale el frente del solvente - con un lápiz suave y cuélguelos en una varilla de vidrio en la campana.

Déjelos secar por 3 - 5 minutos y observe a la luz ultravioleta en 1 de ellos.

Marque las manchas con un lápiz suave y anote la coloración. Deje secar el cromatograma toda la noche.

Rocíe el segundo cromatograma ligeramente hasta que quede húmedo. Observe a la luz ultravioleta y vea si hay cambio de color en las manchas.

Marque las manchas, anote la coloración.

Deje secar toda la noche.

Al día siguiente observe el primer cromatograma a la luz ultravioleta y vea si hay cambio de color en las manchas.

Rocfelo con el agente cromogénico y proceda del mismo modo que con el segundo cromatograma.

La Warfarina da una mancha de color púrpura intenso tan pronto como se sacan los cromatogramas de la cámara por lo tanto el cromatograma debe observarse a la luz ultravioleta tan pronto como el solvente se evapore lo suficiente para poder manipular el cromatograma, la coloración púrpura se decolora lentamente pero al siguiente día aparece como una coloración oscura azulada.

Cuando el cromatograma se rocía con el agente cromogénico y se observa a la luz ultravioleta cuando aún está ligeramente húmedo, la coloración púrpura se desvanece considerablemente, se oscurece y aparece ligeramente azulada.

Los valores de Rf para mezclas de rodenticidas y para los rodenticidas solos se dan en la tablas siguientes:

TABLA 1

Valores de  $R_f$  y coloración de rodenticidas mezclados por superposición de la muestra sobre el papel.

Rodenticida	Coloración	Promedio	Límites de $R_f$
Warfarina	Púrpura	0.14	0.10 - 0.19
Antu	Azul	0.35	0.31 - 0.38
Pival	Ante	---	--- --- Insignificante.

TABLA 2

Valores de  $R_f$  cuando las muestras corresponden al rodenticida puro.

Rodenticida	Coloración	Valores de $R_f$ Promedio .	Límites.
Antes de rociar con el agente cromogénico			
Warfarina	Púrpura	0.66	0.05 - 0.07
Antu	Azul	0.25	0.20 - 0.27
Pival	Ante	---	--- ---

Manchas adicionales después de rociar con el agente cromogénico.

---

Warfarina	Púrpura	0.03	0.02 - 0.03
	Azul pálido	0.00	0.00 - 0.00
Antu	Azul	0.00	0.00 - 0.00
	Verde	0.04	0.02 - 0.04

---

Las formulaciones probadas fueron:

Antu al 25% en un diluyente silíceo.

Pival 0.05% en fluorita.

Warfarina 0.5% en fluorita.

El procedimiento fue el siguiente:

Se pesó 0.1 gramos de cada una de las muestras y se puso en 3 tubos de centrífuga.

Se agregó un ml. de dioxano en cada uno de los tubos.

Se mezcló bien y se les puso un tapón de corcho.

Se centrifugó hasta que quedó transparente.

Se puso un microlito de cada una de las muestras sobre el papel.

Se corrió el cromatograma y se hizo la observación a la luz ultravioleta.

La coloración de la Warfarina es muy ligera por lo que debe intensificarse por exposición del cromatograma a los vapores de amoníaco en un recipiente cerrado, durante media hora.

Corn M. y Berberich R. describen otro método Fluorimétrico para la determinación de Warfarina en plasma de pacientes bajo tratamiento médico a base de Warfarina y Fenilbutazona, en el año de 1967.

Robert L. Caswell del Departamento de Agricultura de Beltsville Md. presenta en la 27/a Reunión anual de la Asociación Oficial de Química y Agricultura el siguiente método de determinación de Warfarina en formulaciones que contengan 0.025% de principio activo y que no sean cebos peleteados o en cebos hechos a base de maíz molido tratados con solución alcohólica soluciones azucaradas de Warfarina y luego desecadas:

#### Equipo, Material y Reactivos

Balanza

Agitador mecánico.

Centrífuga.

Espectrofotómetro Beckman D. U.

Matraz erlenmeyer de 125 ml. con tapón.

Tubos de centrífuga de 15 ml.

Pipetas volumétricas de 2, 3, 10, 50 ml.

Solución de pirofosfato de sodio al 1% (Disolver 5g. de pirofosfato de sodio  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$  en 500 ml. de agua destilada)

Eter de petróleo purificado ( " 200 ml. de éter de petróleo se -  
tratan con 3 porciones de 20 ml. de solución de pirofosfato de -  
sodio al 1% ).

### Procedimiento.

Se pesan 10 gramos de muestra en un matraz erlenmeyer de 125 ml. provisto de tapón.

Se coloca el matraz en el agitador y se agita durante 30 minutos.

Se pasan de 5 a 10 ml. del extracto a un tubo de centrifuga con tapón y se centrifuga durante 5 minutos a alta velocidad o hasta que la solución esté clara.

Se pipetea 10 ml. de solución de pirofosfato de sodio al 1% en un tubo de centrifuga, se agregan 2 mililitros del extracto etéreo centrifugado. Se tapa el tubo y se agita vigorosamente durante 2 minutos. Se centrifuga a alta velocidad hasta que la capa acuosa esté transparente.

Se desecha la capa etérea incluyendo la emulsión que pueda formarse por medio de un aspirador.

Se agregan 2 ml. de éter de petróleo purificado, se agita vigorosamente y se descarga la capa etérea, repita la extracción dos veces más.

Haga una solución a blanco del mismo modo, poniendo éter purificado en lugar del extracto etéreo.

Tome 3 ml. del extracto acuoso en una cubeta de sílice y deter-

mine la absorbancia a 308 milimicras en el Expectrofotómetro Beckman D. U. con abertura de 0.86 mm. o en cualquier aparato equivalente.

$$\% \text{ Warfarina} = A \times 0.054$$

#### DETERMINACION DE WARFARINA EN PRODUCTOS BIOLOGICOS.

Como dijimos antes, las determinaciones de concentración de anticoagulantes de la coumarina en materias biológicas se han realizado con el objeto de estudiar su distribución y metabolismo en el organismo. Así pues los animales de experimentación fueron tratados con grandes dosis de anticoagulante y sacrificados cuando aún contenían sus organismos grandes cantidades.

En 1953 Yayaama, Goto y Umezu utilizaron el método que Roseman y Green desarrollaron el 1951 para la determinación de Dicumarol en sangre; para la determinación de Warfarina en sangre.

Para su determinación usaron ratas que habían recibido 75 mg. de Warfarina 24 horas antes de la muerte. Esta cantidad corresponda a 300 gramos de cebo para roedores.

En 1956 Garner desarrolló un método para la determinación de Warfarina en restos mortales, acidificó y extrajo con una mezcla etanol-eter, luego transfirió la Warfarina a una solución acuosa alcalina y des

pués a cloroformo, purificó por cromatografía y determinó la absorción a la luz Ultravioleta. No pudo hacer la determinación cuantitativa.

En casos de muerte vemos pues que el problema se complica ya que está comprobado por los experimentos hechos sobre toxicidad, que los animales no mueren sino hasta varios días después de la ingestión de una sola dosis de Warfarina por lo que es de esperarse que si este compuesto aún se encuentra como tal en el organismo del animal su concentración es pequeñísima y su distribución será diferente de la que tenía pocas horas después de tomar el veneno.

Si el animal muere después de ingerir varias dosis, estas debieron ser muy pequeñas. O puede suceder que el animal no ingiera el veneno durante los últimos días antes de la muerte.

Los métodos de determinación de Warfarina debían pues ser lo suficientemente exactos y sensibles para detectar las pequeñísimas cantidades del producto que permanecían inalteradas en el material biológico post-mortem (fracciones de miligramo/Kg.) o sus metabolitos. Fue hasta el año de 1960 cuando Hans Wantorp desarrolla el primer método aceptable para la determinación de Warfarina en material post-mortem.

#### Principio del método.

El material se extrae con éter y etanol se purifica por lavado -

con solución alcalina, luego se acidifica y vuelve a extraerse con éter. Este extracto coloreado se purifica pasandolo por una columna de oxido de aluminio básico que retiene las impurezas, incluyendo las sustancias coloridas y la Warfarina.

Finalmente se eluye con metanol. Por partición entre la fase etérea y la fase alcalina, la Warfarina se obtiene finalmente en forma suficientemente pura para graficar la curva de absorción a la luz Ultravioleta.

#### Equipo, Material y Reactivos.

Balanza.

Licuada

Agitador mecánico.

Centrífuga.

Mortero.

Matraces erlenmeyer de 500 ml. con tapón esmerilado.

Columna de cromatografía de (250) (15m) con llave esmerilada.

Embudos de separación.

Probetas de 25, 100, 200 ml.

Equipo de destilación a presión reducida.

Espectrofotómetro Beckman D. U.

Eter libre de peróxidos.

Alcohol etílico de 95%.

Metanol G. R.

Alcohol etílico de 95% acidificado con ácido sulfúrico 4 N (1+9)

Agua acidulada con ácido sulfúrico 4N (5ml. de ácido sulfúrico y 1ml. de agua destilada).

Solución acuosa de pirofosfato de sodio al 4.5%

Oxido de aluminio básico: AKT-STUFE (WOELM)

Sulfato de sodio anhidro.

Arena fina.

### Procedimiento

#### 1. - Preparación de la columna de absorción:

Se coloca un pequeño tapón de algodón en la parte baja de una columna de cromatografía de (15) (250) mm. con llave esmerilada.

Se llena con éter y se va poniendo óxido de aluminio a través del éter hasta que se forme una columna de 100 a 120 mm. de altura.

Encima del óxido de aluminio, se agrega sulfato de sodio anhidro - hasta formar una columna de 120 m. de altura.

Se hace fluir éter a través de las 2 capas hasta que la superficie superior del éter quede a 2cm. de alto por encima de la capa de sulfato de sodio anhidro.

#### 2. - Preparación de la muestra:

Los tejidos y el contenido estomacal, por separado, son homogenizados en una licuadora de aspas de rotación hasta que tengan consistencia

tencia de puré.

La sangre se centrifuga y se le separan los coágulos.

El contenido intestinal y la orina no necesitan preparación.

### 3. - Extracción del Material:

Se toman 25 gramos de muestra, bien sea de tejidos o contenido es tomacal.

Se muelen en el mortero con arena.

Se agregan 75 ml. de alcohol acidificado, en pequeñas porciones y se sigue moliendo.

Se pasa la mezcla a un matraz erlenmayer de 500 ml. con tapón es merilado se enjuaga el mortero con 3 porciones más de éter y se vacían al matraz.

Se coloca el matraz en el agitador mecánico y se agita durante 30 minutos.

Se filtra sobre un embudo de separación.

Se lava 3 veces con 75 ml. de éter sobre el embudo de separación.

Si la muestra es orina, únicamente se enjuaga el matrâz con 75 ml. en pequeñas porciones.

El extracto colectado se lava con 200 ml. de agua acidulada y luego dos veces mas con 100 ml.

Las aguas de lavado se extraen 2 veces mas con 75 y 50 ml. de éter.

Estas fases etéreas se juntan con la primera extracción etérea.

Los extractos etéreos combinados se secan con suficiente sulfato de sodio anhidro y luego se filtran en una matr az de destilación.

Se destila a presión reducida hasta que solo queden 20 a 25 ml. del extracto.

Este extracto se pasa a un embudo de separación lavando el matraz con una pequeña cantidad de éter.

#### 4. - Purificación del extracto:

El extracto se trata con 2 porciones de 20 y 10 ml. de pirofosfato de sodio.

Luego la solución acuosa de pirofosfatos se extrae con éter hasta que ya no haya coloración.

La fase acuosa alcalina se acidifica con 5 ml. de ácido sulfúrico - 4N comprobando con papel indicador que el pH no sea más alto de 4.

La solución ácida se extrae 3 veces con 20, 15, 15 ml. de éter.

Los extractos et reos se filtran sucesivamente a través de sulfato de sodio anhidro.

El extracto et reo completo o pequeñas alícuotas (es muy colorido) se vacían en la columna de absorción.

Cuando ha bajado lo suficiente, se lava la columna con 25 ml. de éter en pequeñas porciones.

Tan pronto como el éter desciende hasta la columna de sulfato de sodio se desecha el que corre a través de la columna de óxido de aluminio.

La elución se hace con 50 ml. de metanol. Es conveniente coleccionar el eluido en un recipiente de vidrio.

El eluido se evapora a Baño María hasta que solo queden 2 ml.

Se agrega un poquito de éter y se pasa a embudo de separación en el cual se han puesto de antemano 50 ml. de agua acidulada. El recipiente se enjuaga con otra pequeña porción de éter y se agrega el embudo de separación.

Se extrae con 3 porciones de 20, 15, 15 ml. de éter.

El extracto etéreo se evapora hasta 5 ml.

Se pasa a embudo de separación lavando el recipiente de evaporación con éter.

Finalmente se extrae la Warfarina con 10 ml. de solución acuosa de pirofosfato de sodio.

Esta solución alcalina se usa para graficar la curva de absorción de 230 a 360 milimicras, usando solución de pirofosfato de sodio saturada con éter para calibrar el aparato.

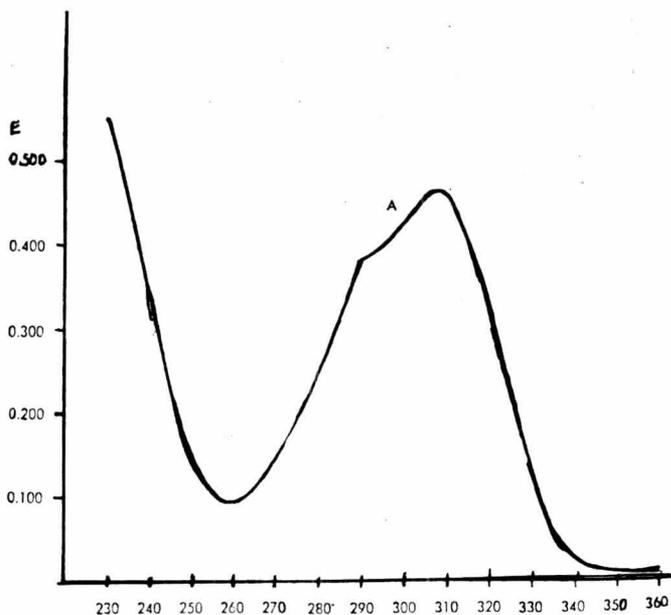


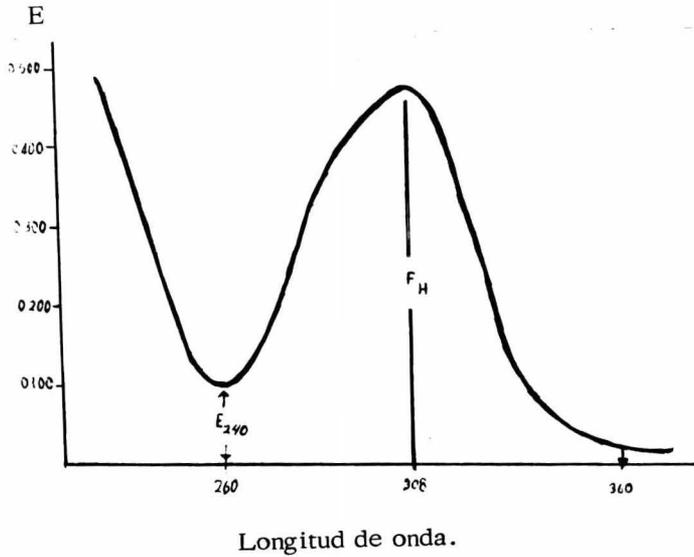
Fig. 26 Curva de absorción de Warfarina con 10 microgramos de Warfarina por ml. de solución de pirofosfato de so dio.

5. - Curva de calibración y Cálculo cuantitativo de Warfarina.

Las curvas de calibración empleadas en la determinación cuantitativa se separan con una solución que contenga de 1 a 20 microgramos de Warfarina por mililitro de solución de pirofosfato de sodio. La extinción se grafica a 308 milimicras sobre una línea base entre la extinción a 260 y a 360 milimicras.

La extinción de la línea base a 308 milimicras puede calcularse fácilmente mediante la siguiente fórmula:

$$E_B = E_{308} - (E_{260} + E_{360}/2)$$



La línea base de extinción a 308 milimicras forma una línea -  
 recta desde el origen para la Warfarina.

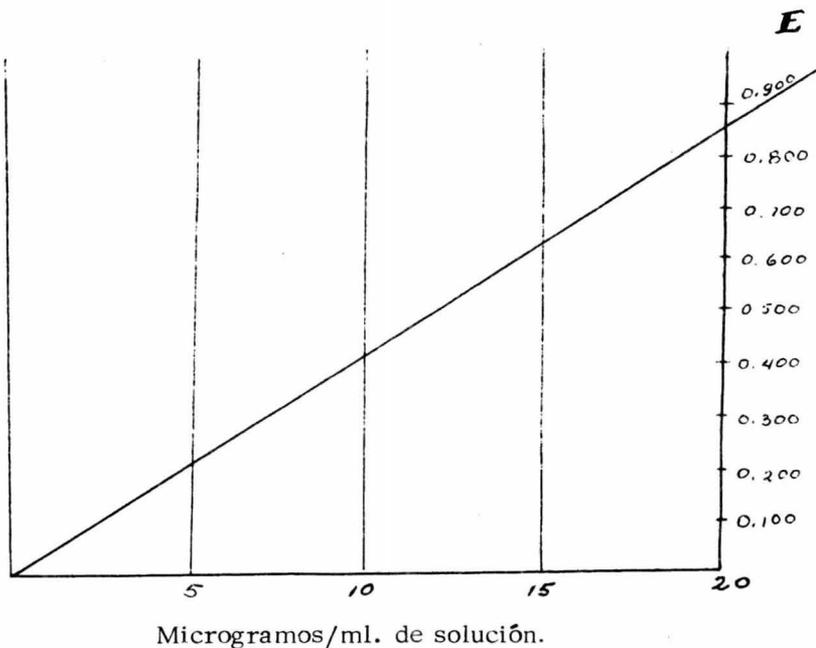


Fig. 28 . - Curva de calibración para Warfarina, longitud de onda 308 m $\mu$

Por medio de la curva de calibración se puede calcular la cantidad de Warfarina en la solución alcalina final sin que influyan apreciablemente las impurezas de los residuos.

Por medio del coeficiente angular de las curvas estandarizadas y la línea base de extinción se puede calcular la concentración de Warfarina en la solución de pirofosfato de sodio mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Microgramos de Warfarina/ml.} = 23.8 \times E_B$$

En 1962 Robert O' Reilly y colaboradores describen un método espectrofotométrico específico para la Determinación de Warfarina inalterada en plasma y para la determinación de un metabolito de la Warfarina en la orina.

Este método está basado en el método de determinación de Dicumarol en fluidos biológicos, propuesto por J. Axelrod y colaboradores - en el año 1949.

#### Fundamento del Método.

La Warfarina es extraída con dicloruro de etileno acidificado, - lavada con alcali suave y recuperada de la fase orgánica con alcali fuerte.

La extinción se mide espectrofotométricamente a la máxima absorción de la Warfarina en la luz ultravioleta.

#### Equipo, Material y Reactivos.

Espectrofotómetro Beckman D. U.

Agitador mecánico Kahn.

Centrífuga.

Jeringas hipodérmicas.

Pipetas volumétricas de 0.5, 1, 2, 4, 5, 10 ml.

Embudos de separación de 30 ml.  
Matraces erlenmayer de 50 ml. con tapón.  
Tubos de ensaye.  
Muestras de sangre, orina, heces.  
Solución salina al 0.7%  
Citrato de sodio.  
Solución de ácido clorhídrico 3N.  
Solución buffer de fosfatos de pH 7.25  
Solución de Hidróxido de sodio 2.5N.  
Dicloruro de etileno.

Procedimiento.

1. - Preparación de las muestras.

La sangre se saca por punción venosa.

En un tubo se mezcla con 3.2% de citrato de sodio en solución salina al 7% en proporción de 9: 1

Se centrifuga a 2000 r. p. m. durante 30 minutos a 4<sup>o</sup> C.

Se separa el plasma y se refrigera a -20<sup>o</sup> C. durante 24 horas.

La orina y las heces se pesan por separado y se toman alicuotas.

Se refrigeran a -20<sup>o</sup> C.

2. - Determinación de Warfarina en plasma:

Se ponen 20 ml. de dicloruro de etileno G. R. en un matraz de 50 ml.

Sobre esta capa orgánica se vacían 2 Ml. de plasma, 1 ml. de agua destilada y 0.5 ml. de ácido clorhídrico 3 N.

Se agita en el agitador horizontal de Kahn durante 2 minutos.

Se dejan separar las dos capas.

Se desecha la capa acuosa superior.

Se pasa la fase orgánica a un matraz.

Se agregan 5ml. de solución reguladora de fosfatos 0.5 M de pH 7.25.

Se agita durante 5 minutos y se desecha la capa acuosa superior.

Se toman 15 ml. de la fase orgánica y se vacían a un 3er. matraz.

Se agregan 4 ml. de solución de hidróxido de sodio 2.5 N.

Se agita durante 5 minutos.

Se toma muestra suficiente para llenar la cubeta del espectrofotómetro y se mide a 308 milimicras con una abertura de 30 mm.

Las sustancias interferentes se miden a 360 milimicras.

Simultáneamente se corre una muestra de plasma normal y un patrón que contenga de 5 a 20 microgramos de Warfarina por mililitro de plasma para cada determinación.

Se hacen 3 determinaciones y se saca promedio de las lecturas de absorbancia.

La concentración de Warfarina se calcula usando las siguientes fórmulas:

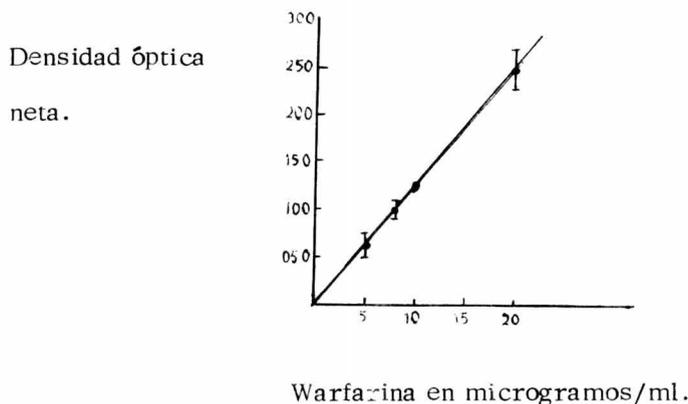
$$\text{Densidad óptica neta} = (A_{308} - A_{360}) - (B_{308} - B_{360})$$

A = Absorbancia de la muestra.

B = Absorbancia de el blanco (Plasma normal!).

Por medio de una gráfica que relacione la Densidad Optica neta y la concentración de Warfarina en microgramos por ml. se determina la concentración de la muestra.

La gráfica se traza con muestras de plasma normal al que se le agregan concentraciones sucesivas de Warfarina pura y se corren en las mismas condiciones que la muestra. La relación entre la densidad óptica y la concentración de Warfarina en microgramos es lineal como se muestra en la siguiente figura:



H. C. Hollifield y J. D. Winefordner de la Universidad de Florida, desarrollaron un método de determinación de Warfarina en sangre -

entera por Fluorimetría en el año de 1966.

### Fundamento.

La intensa fluorescencia que presenta la Warfarina cuando se excita mediante una fuente de Xenon, permite su determinación en amplios límites de concentración sin necesidad de procedimientos especiales de purificación.

### Equipo, Material y Reactivos.

Balanza analítica.

Centrifuga.

Agitador mecánico.

Espectrofluorimetro Aminco-Bowman No. 4-8202 equipado con

Tubo fotomultiplicador RCA IP 128.

Lámpara con arco de Xenon de 150 W.

Registrador X - Y No. 1620-814 American Instruments Co.

Inc.

Matraces aforados de 50, 100 ml.

Matraces erlenmeyer de 20 ml.

Pipetas de 1, 10 ml.

Columna de destilación de 6 pies.

Alcohol etílico absoluto. Destilado al vacío en la columna enchquetada, plateada, empacada con hélices enrolladas y proporción de reflujo 15:1.

Se toma el corazón y se prueba su señal de fondo en el espectrofluorímetro.

Solución patrón de Warfarina 50 mililitros de alcohol destilado, adicionado con 5 gotas de di-n-butilamina para mejorar la disolución.

#### Procedimiento.

Se determinan los aspectos de emisión y de excitación de la solución patrón y los límites de concentración detectables. (Son aquellas concentraciones que dan una señal al doble de la desviación estandar de la señal de fondo obtenida con el blanco).

La muestra a determinar "Desconocida" se prepara poniendo en un matraz erlenmeyer de 20 ml.: 8 ml. de alcohol etílico absoluto destilado, EAD.

1ml. de solución de Warfarina en AEAD.

1 ml. de sangre entera citratada.

El blanco se prepara poniendo en el matraz erlenmeyer:

9ml. de Alcohol etílico absoluto destilado A. E. A. I.

1ml. de sangre entera citratada.

Se colocan los matraces en el agitador mecánico y se agitan de 3-5 minutos.

Se centrifugan durante 5 minutos para separar las proteínas precipitadas.

Se toma un ml. del sobrenadante y se diluye con 9 ml. de A.E.A.D.

Se mezcla bien y se mide su intensidad relativa de fluorescencia.

Esta señal relativa se corrige restando el valor obtenido en la sangre (Que es la diferencia obtenida entre la señal dada por el Blanco: Sangre, alcohol etílico absoluto destilado - la señal obtenida con el A.E.A.D. solo).

La concentración del "Desconocido" se encuentra comparando la señal obtenida con la que se obtiene de una solución standard.

La sensibilidad de este método es de 0.1 mg. de Warfarina por 100 ml. de sangre a 10 mg. de Warfarina por 100 ml. de sangre.

Ruessel H. A. del Instituto de Química de Hannover Alemania, desarrolla un método de determinación de Warfarina y otros rodenticidas, por Cromatografía de Capa Fina en productos biológicos en el año de 1970.

Las placas son de MN-Polygram SIL N/UV<sub>254</sub>.

La fase móvil es dicloruro de etileno o una mezcla dicloruro de etileno-ácido acético 9:1.

Las muestras son 5 a 20 microlitros de extracto de hígado en acetato de etilo.

Las manchas se revelan con dos agentes cromogénicos:

- a) Con solución al 0.1% de dicloroquinona diclorimida en alcohol metílico y rociado posterior con solución de carbonato de sodio al 10%.
- b) Con una mezcla enfriada de 25 ml. de solución de ácido sulfánico al 0.3% en ácido clorhídrico de 8% y 1.5 ml. de solución de nitrito de sodio ( $\text{NaNO}_2$ ) al 5% y rociado posteriormente con solución de carbonato de sodio al 10%.

Las manchas aparecen en 30 minutos.

Los límites de sensibilidad para la Warfarina son de 3-5 microgramos.

P. Daenens y M. Van Boven del Laboratorio de Toxicología de la Universidad de Lovaina Bélgica, desarrollan un método de Cromatografía en Capa fina para la identificación de Warfarina en casos de intoxicación en el año de 1970.

Utilizan placas de vidrio recubiertas de Sílica Gel G de Merck

para prepararlas mezclan 30 gramos de sílica gel con 65 ml. de agua - destilada para placas normales y 65 ml. de una solución reguladora fosfatos 0.25 M de pH 11 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  y  $\text{Na}_3\text{PO}_4$ ).

Para placas con solución reguladora:

Se agita vigorosamente.

Se recubren las placas de vidrio de 20 x 20 cm. con una capa de 250 micras de espesor.

Se dejan secar a temperatura ambiente durante 30 minutos y luego se secan en el horno a  $110^\circ\text{C}$ . durante 45 minutos.

Los solventes usados en las mezclas de elución deben ser de grado analítico. Se preparan volúmen a volúmen.

a) Para placas de Sílica Gel G Normal: Cloroformo - metanol 97 ; 3

b) Para Placas de Sílica Gel G con solución Reguladora:  
Cloroformo-benceno-Acido fórmico (de 98-100%) -acetilacetona 49 : 48 : 2 : 1.

Muestras. - 20 microlitros de solución alcohólica contienen 5mg./ml. del compuesto.

La visualización se hace con 2 reveladores:

a) Solución de Hidróxido de Sodio al 8% en metanol o agua des

tilada y observación a la luz Ultravioleta (254 mm.)

- b) Solución de 2, 6 dibromoquinona 4-clorimida al 1% en metanol, seguida de calentamiento de las placas a 100 °C. durante unos pocos minutos.

La densidad de la coloración de las manchas puede aumentarse rociando las placas con una solución saturada de bicarbonato de sodio ( $\text{NaHCO}_3$ ) en agua destilada, antes del calentamiento.

Los valores de  $R_f$  y la conducta cromogénica de la Warfarina se dan en la siguiente tabla:

Solvente	$R_f \times 100$		NaO	2,6-Dibromoquinona-4-clorimida.
	a	b	Luz visible U. V (254nm)	
WARFARINA	12	49	-----	Púrpura Café verdosos

## VIII. - CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

La Warfarina como la mayoría de los derivados de la 4-hidroxi coumarina causa la reducción de la capacidad coagulante de la sangre, - disminuyendo los niveles plasmáticos de Protrombina o Factor II, Factor VII, Factor IX y Factor X que se agrupan bajo el nombre de Complejo - Protrombina. La consecuencia de esta disminución es la presencia de - hemorragias especialmente hemorragias internas de fatales consecuencias.

El modo de acción de la inhibición de los factores de coagula -- ción de la sangre no está aclarado de modo definitivo.

Muy al principio de las investigaciones correspondientes, se - pensó que había una acción competitiva entre la Warfarina y la vitamina K en el sistema enzimático responsable de la síntesis de las proteínas - que integran el Complejo-protrombina, de manera semejante a la fun -- ción de antimetabolito que tienen las sulfonamida en las bacterias, com-

pitando con el ácido para-aminobenzoico en el sistema enzimático responsable de la síntesis del ácido fólico. Esta teoría no pudo comprobarse en el trabajo de experimentación.

Martius y Nitz-Litzow quienes encontraron que el Dicumarol de sacpla la fosforilación oxidativa sugirieron que la Warfarina como derivado de la 4-hidroxicoumarina también desacoplaría la fosforilación oxidativa en mitocondrias, y por tanto habría una inhibición general en la síntesis de proteínas.

Judith G. Pool y Borchgrevink demostraron que la acción de la Warfarina sobre la fosforilación oxidativa solo se efectúa In Vitro y que In Vivo, no se efectúa o se efectúa en un grado tan pequeño que no interfiere con el transporte o la incorporación de aminoácidos a las proteínas.

El conocimiento de que las proteínas plasmáticas del Complejo Protrombina se sintetizan en la fracción microsomal de las células hepáticas llevó a la conclusión de que la Warfarina no actúa interfiriendo con la liberación del Complejo -protrombina de los hepatocitos sino que debe actuar en un paso anterior al acoplamiento del grupo antigénico determinante de la proteína.

Con el advenimiento de los antibióticos y el descubrimiento de que algunos de ellos interfieren con la síntesis de proteínas por ejemplo la Puromicina cuya interferencia se efectúa a nivel del complejo riboso-

mal s-RNA impidiendo la completación de la cadena polipeptídica, Polson y Wosilait concluyeron que si bien la Warfarina y la puromicina prolongan el tiempo de protrombina no podían asegurar que el sitio de acción de las dos drogas fuera el mismo y que si los ribosomas son susceptibles a la acción de estas drogas en la síntesis de los factores de coagulación, la Warfarina podría actuar ahí o en un paso subsecuente por ejemplo podría inhibir la adición de la porción proteica a la nueva proteína formada.

Robert Olson trabajando con Actinomicina D postula que la Warfarina actúa a nivel del RNA dependiente del DNA, interfiriendo con la acción de la vitamina K sobre el gene represor que regula la expresión de información genética para la producción de los factores de la coagulación de la sangre.

Sin embargo J. D. Suttie trabajando con puromicina, actinomicina D y ácido orótico no pudo comprobar la teoría de Olson ya que al experimentar con ratas deficientes de vitamina K, el hígado aislado y perfundido respondió a la administración de vitamina K, produciendo y liberando Factor VII en el líquido de perfusión. Los resultados de este estudio sugieren pues que la acción de la vitamina K y por lo tanto de la Warfarina como su antagonista está situado más allá de la formación del ácido ribonucleico mensajero específico y que este sitio puede ser o puede estar probablemente entre la formación del péptido naciente, en la separación del péptido del ribosoma, en la unión de la porción carbohidrato

o en el transporte de la glicoproteína fuera de la célula.

Hans Prydz, Anne Gaarder, G. Gaudernack y A. Glaudhaug, estudiando la localización celular del Factor VII sobre la base inmunológica de que es una Glicoproteína concluyen que la fracción microsomal de las células hepáticas está involucrada en un paso final de la biosíntesis del factor VII o es un lugar de almacenamiento temporal, del cual puede liberarse, probablemente por un mecanismo enzimático.

Ahora bien si la biosíntesis de esta glicoproteína es fundamentalmente semejante a la de otras glicoproteínas, y actinomicina D y la cicloheximida como inhibidores de la síntesis del ácido ribonucleico mensajero mRNA y de polipéptidos ejercen su acción en 35 a 40 minutos disminuyendo la concentración de Factor VII en tanto que la Warfarina necesita de 90 a 120 minutos para causar la disminución de dicho factor, su punto de acción debe estar mas allá del punto de acción de estos inhibidores, después que la síntesis de la cadena polipeptídica se ha completado. Esquema II.

Por otro lado, la finalización última y el transporte del factor VII fuera de la célula están mas allá del paso de inhibición de la Warfarina por lo que es de suponer que el punto de acción esté en el acoplamiento del grupo de carbohidrato en la cadena polipeptídica.

Además de su efecto anticoagulante la Warfarina tiene acciones

farmacológicas que no están relacionadas con la coagulación de la sangre como son

Depresión del músculo cardíaco.

Depresión de la contractibilidad de la musculatura lisa:

Vasodilatación

Uricosuria.

Acción antibacteriana.

Los estudios O'Reilly y colaboradores sobre la administración de Warfarina a voluntarios demuestran que la máxima concentración de Warfarina en plasma se obtiene en 2 a 12 horas . Tabla I.

Durante la fase de eliminación, la concentración de Warfarina - en el plasma disminuye exponencialmente.

El tiempo de vida media es de 15 a 58 horas con una media de - 42 horas.

La absorción de la Warfarina es completa ya que no se encuentra Warfarina en el contenido intestinal ni aún después de administrar al tas dosis (6mg/Kg.).

La velocidad de absorción está en relación directa con el tamaño de la dosis, las dosis mayores producen una velocidad de absorción - mayor y más rápida en tanto que las dosis menores alcanzan el máximo con lentitud. Fig. 7.

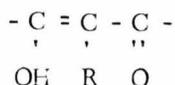
Menos del 1% de Warfarina se excreta inalterada en la orina. La excreción de metabolitos se inicia lentamente alcanzando su máximo en 12 a 60 horas. Casi el 90% se excreta en 96 horas y el 99% en 144 horas.

La Warfarina está unida fuertemente a la albumina, una proteína plasmática; en un 97% lo cual explica la ausencia de Warfarina en los glóbulos rojos, fluido cerebrospinal, orina y que su volumen de distribución sea idéntico al espacio correspondiente a la albúmina.

Los estudios farmacocinéticos de la Warfarina hechos en ratas, perros y monos Rhesus indican que las ratas y los monos eliminan más rápidamente la Warfarina que los perros y el hombre.

La teoría de acción competitiva entre la Warfarina y la vitamina K se fundamentó en la similitud de la estructura química de los dos compuestos.

Mentzer propuso que las propiedades anticoagulantes de un compuesto químico se deben a la presencia del grupo,



presente en la 4-hidroxicoumarina, indanediona y en la 3-hidroxi,1,4, -naftoquinona.

Parece ser que la solubilidad en lipoides es un requisito necesario para que un compuesto ejerza su acción anticoagulante.

En resumen podemos decir que es necesario que exista cierta configuración estructural tanto como determinadas condiciones de solubilidad.

Los primeros estudios sobre el metabolismo de Warfarina marcada con Carbón 14 en ratas, indicaron que el 90% de la radioactividad total se excreta en 14 días y el 10% restante en un período de 90 días - más de la mitad se excreta en la orina y el resto en las heces. No hay carbón marcado en el CO<sub>2</sub> expirado. La Warfarina marcada se acumula en el riñón, hígado y páncreas en el que existen 3, 12, 15 veces más que en la sangre.

En la orina se encontraron 3 metabolitos que se identificaron como los derivados hidroxilados de la Warfarina en las posiciones 6, 7 y 8 con una concentración de 15.4, 35 y 9.5%. Estos metabolitos no tienen actividad anticoagulante.

La formación de estos metabolitos es catalizada por la fracción microsomal, y necesita oxígeno molecular y NADPH para que se lleve a cabo.

Posteriores estudios demostraron que la orina de ratas resistentes a la Warfarina poseen 6 metabolitos que se identificaron como los

derivados hidroxilados de la Warfarina en las posiciones 6, 7, 8, 4', un conjugado del 7-hidroxiwarfarina-glucurónido y el 2, 3-dihidro-2-metil-4-fenil-5oxo-gamma-pirano(3, 2-c) (1) benzopirano.

Los metabolitos que se excretan en las heces son los mismos solamente varía su concentración.

Estos metabolitos son inactivos como anticoagulantes, sólo el 4' hidroxiiwarfarina presenta actividad.

En los extractos de orina de voluntarios que recibieron dosis de Warfarina se encontraron los derivados hidroxilados de la Warfarina en posición 6, 7 y 2 productos de reducción de la cetona de la cadena alquímica lateral: isómeros del acohol de la Warfarina.

Los experimentos para demostrar la toxicidad de Warfarina en perros y cerdos con dosis únicas y dosis repetidas demostraron que, - una sola dosis parece ser relativamente inocua para los perros, pero - que pueden morir con pequeñas dosis repetidas 0.2 mg/Kg. ó 0.3 mg/Kg.

Una sola dosis es fatal para los cerdos y mueren a pequeñas dosis repetidas 0.2 mg./KG.

Los tiempos de supervivencia después de ingerida la dosis de Warfarina son de 6-14 días en perros y 4-12 días en cerdos. Estos tiempos de supervivencia parecen ser independientes de la magnitud de la dosis.

Los tiempos de protrombina suben en 24 horas alcanzando el máximo (mas de 10 minutos) en pocos días.

Los animales se vuelven apáticos y mueren en estado de coma. Algunas veces aparecen tumefacciones alrededor de las articulaciones - de las extremidades y en la parte baja de la mandíbula inferior. En algunos casos hay presencia de sangre en la orina y las heces y hemorragias persistentes en pequeñas lastimaduras o raspaduras. En muchos casos los cerdos presentan parálisis.

Al principio aumenta su temperatura pero durante el último día de vida está bajo lo normal.

Las observaciones anatomopatológicas se caracterizan por hemorragias en diferentes órganos y tejidos.

Todos los perros presentaron hemorragias en la cavidad torácica y la mitad presentó hemorragias en las extremidades, en cambio en los cerdos las hemorragias se presentan en las extremidades y en la cavidad abdominal.

La determinación de la Warfarina en productos técnicos formuladas o biológicos cualquiera que sea la técnica que se emplea se fundamenta en el carácter débilmente ácido del compuesto que permite su extracción con solventes orgánicos en medios débilmente ácido o con soluciones acuosas alcalinas y su purificación por partición entre solventes.

orgánicos y soluciones acuosas alcalinas o por cromatografía en columna o en papel. La identificación final y la cuantificación por espectrofotometría es muy conveniente porque es altamente sensible aun a pequeñas concentraciones, para la determinación del anticoagulante en producto técnico y formulado los métodos son semejantes, solo que en estos, casos la concentración de anticoagulante es tan alta que hay que tomar cantidades relativamente pequeñas del producto a determinar, sin embargo frecuentemente la naturaleza del material empleado en las formulaciones dificulta la purificación y es necesario emplear métodos de purificación mas sofisticados como la cromatografía en bentonita o en óxido de aluminio.

Para la demostración de Warfarina en productos biológicos, se aplica el mismo principio, que se utiliza en la determinación de Warfarina en productos técnicos y formulados considerando que si se trata de productos pos-mortem en los que la concentración del anticoagulante es muy baja y las impurezas que pudieran falsear los resultados muy altas, se debe poner especial cuidado en la purificación de la muestra.

Después de la cromatografía es conveniente eluir con un solvente fuertemente polar como metanol, etanol o acetona. Este eluido es el que se utiliza para la identificación y cuantificación final de la Warfarina por la técnica mas adecuada: Cromatografía en Capa Fina, Espectroscopia de Absorción Ultravioleta o espectrometría de masas.

El material biológico post-mortem mas adecuado para hacer la identificación y cuantificación de Warfarina es el hígado pero también - puede hacerse en riñon y sangre. Si el animal o la persona intoxicados han ingerido la Warfarina un día o dos antes de la muerte, el anticoagulante puede permanecer en el estómago y en el contenido intestinal y por lo tanto puede identificarse y cuantificarse en ellos en forma inalterada o como sus metabolitos.

La determinación de Warfarina debe hacerse tan pronto como - sea posible después de la autopsia o a mas tardar una o dos semanas ya que pasado este tiempo, el anticoagulante puede sufrir cambios que impiden su identificación.

Con el objeto de disminuir el riesgo de intoxicación por Warfarina y proteger a las personas y a los animales domésticos cuando se empleen los rodenticidas para combatir a las ratas, es necesario no dejar estos productos donde los niños o animales domésticos tengan posibilidad de consumirlos.

Si se usan preparaciones en polvo no deben esparcirse en lugares frecuentados por los niños o animales domésticos ni en lugares en - que puedan mezclarse con los alimentos. Pasado un tiempo el cebo o - polvo rodenticida debe removerse cuidadosamente.

Es conveniente colocar el rodenticida en recipientes adecuados

y situarlos en lugares inaccesibles para los niños y animales domésticos.

También es conveniente impregnar los rodenticidas a base de cereales con un colorante con lo cual se evitaría la posibilidad de confundirlo con el alimento.

## IX. - BIBLIOGRAFIA .

1. - Bachman F. D., Duckert y Holler.  
Thrombosis et Diathesis Haemorrhagica.  
2, 24 - 38 ( 1958 ).
2. - Barker W. M., M. A. Hermodson y K. P. Link.  
The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.  
171, ( 2 ) 307 - 313 ( 1970 ).
3. - Barnhart Marion I.  
The Journal of Hystochemistry and Cytochemistry.  
13 ( 8 ) 740 - 751 ( 1965 ).
4. - Bleyler Hill Roberta, Florence Paul, B. Connor y A. J. Quick.  
Thrombosis et Diathesis Haemorrhagica.  
16, 318 - 330 ( 1966 ).
5. - Caswell L. Robert.  
The Journal of Association of Official Agricultural Chemist.  
43 ( 2 ) 365 ( 1960 ).

6. - Daenens P. y M. Van Boven.  
Journal of Chromatography.  
57, 319 - 121 ( 1971 ).
7. - Gaarder Anne y Hans Prydz.  
Biochimica et Biophysica Acta.  
140, 545 - 548 ( 1967 ).
8. - Gaarder Anne y Hans Prydz.  
Item.  
184, 220 - 223 ( 1969 ).
9. - Gladhaug A. y Hans Prydz.  
Item.  
215, 105 - 111 ( 1970 ).
10. - Harvey M. Salomón, John J. Schrogie y Dwight Williams.  
Biochemical Pharmacology.  
17, 143 - 151 ( 1968 ).
11. - Hellemans J., M. Vorlat y M. Verstraete.  
Britanic Journal of Haematology.  
9, 506 - 511 ( 1963 ).
12. - Hermodson M. A., J. W Suttie y Karl Paul Link.  
The American Journal of Physiology.  
217, ( 5 ) 1316 - 1319 ( 1969 ).

13. - Hermodson M. A., W. M. Barker., y Karl Paul Link.  
The Journal of Medicinal Chemistry.  
14 ( 2 ) 167 - 169 ( 1971).
14. - Hollifield H. C. y J. D. Winefordner.  
Talanta 14, 103 - 107 ( 1967 ).
15. - Ikawa Miyoxhi, Mark Arnord Stahmann y K. P. Link.  
66, 902 - 906 ( 1944 ).
16. - Ikeda Masayuki, Volker Ulrich y Hansjurgen Staudinger.  
Biochemical Pharmacology.  
17, 1663 - 1669 ( 1968 ).
17. - Ikeda Masayuki, A. H. Conney y J. J. Burns.  
The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutica.  
162, ( 2 ) 388 - 393 ( 1969 ).
18. - Knieriem H. J., A. B. Chandler.  
Thrombosis et Diathesis Haemorrhagica.  
18, 766 - 778 ( 1968 ).
19. - La Clair J. B.  
The Journal of Association of Official Agricultural Chemist.  
35 ( 2 ) 372 - 276 ( 1952 ).

20. - La Clair J. B.  
Item.  
36 ( 2 ) 373 - 377 ( 1953 ).
21. - La Clair J. B.  
Item.  
37 ( 3 ) 634 - 638 ( 1954 ).
22. - Lewis Richard y William Tragger.  
The Journal of Clinical Investigation.  
49, 907 - 913 ( 1970 ).
23. - Lewis Richard.  
The Journal of Pharmaceutical Sciences.  
60 ( 8 ) 1271 - 1272 ( 1971 ).
24. - Link K. Paul, David Berg y Walter M. Barker.  
Science 150, 378 ( 1965 ).
25. - Loeliger E. A., B. Van der Esch y M. J. Mattern.  
Thrombosis et Diathesis Haemorrhagica.  
9, 74 - 89 ( 1963 ).
26. - Lowenthal J. y J. A. Mac Farlane.  
The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.  
143, 273 - 277 ( 1964 ).

27. - Mitchell L. C.  
The Journal of Association of Official Agricultural Chemist.  
40 ( 4 ) 1034 - 1037 ( 1957 ).
28. - Nagashima Renpei y Gerhard Levy.  
Journal of Pharmaceutical Sciences.  
58 ( 7 ) 845 - 849 ( 1969 ).
29. - Nelson Eble J. Bruce D. y Karl Paul Link.  
Biochemical Pharmacology.  
15, 1003 - 1006 ( 1966 ).
30. - Olson E. Robert.  
Canadian Journal of Biochemistry.  
43, 1565 - 1573 ( 1965 ).
31. - O'Reilly Robert, Aggeler P. M. Hoag M. S. y Leong L.  
Thrombosis et Diathesis Haemorrhagica.  
8, 82 - 95 ( 1962 ).
32. - O'Reilly Robert., Aggeler P. M. , Leong L.  
The Journal of Clinical Investigation.  
42 ( 10 ) 1542 - 1551 ( 1963 ).
33. - O'Reilly R., Aggeler P. M. Leong L.  
Thrombosis et Diathesis Haemorrhagica.  
11, 1 - 22 ( 1964 ).

34. - O'Reilly R., Aggeler Paul M.  
Federation Proceedings.  
24, 1266 - 1273 ( 1965 ).
35. - O'Reilly R., Eino Nelson y Gerhard Levy.  
The Journal of Pharmaceutical Sciences.  
55 ( 4 ) 435 - 437 ( 1966 ).
36. - O'Reilly R., y Patricia Kowitz.  
The Journal of Clinical Investigation.  
46 ( 5 ) 829 - 837 ( 1967 ).
37. - Overman R., Mark Arnold Stahmann, Charles Ferdinand.  
Huebner, William R. Sullivan, Leonard Spero, David G. Doherty,  
Miyoshi Ikawa, Lloyd Graf, Saul Roseman y Karl Paul Link.  
The Journal of Biological Chemistry.  
153, 5 - 24 ( 1944 ).
38. - Pesticide Manual.  
Brithish Corporation Protection Council.  
Primera Edición 437 ( 1968 ).
39. - Polson B, James y Walter D. Wositlait.  
Biochemical Pharmacology.  
15, 113 - 115 ( 1967 ).

40. - Item  
963 - 967.
41. - Pool G. Judith y C. F. Borchgrevink.  
The American Journal of Physiology.  
206, 229 - 238 ( 1964 ).
42. - Prydz Hans y G. Gaudernack.  
Biochimica et Biophysica Acta.  
230, 375 - 380 ( 1971 ).
43. - Rabiner S. Frederick.  
The American Journal of Medical Sciences  
249, 68/404 - 74/410 ( 1965 ).
44. - Suttie J. W.  
Archives of Biochemistry and Biophysics.  
118, 166 - 171 ( 1967 ).
45. - Taylos A. y Townsend M. G.  
Proceedings of the Biochemical Society.  
118, 166 - 171 ( 1967 ).
46. - Tragger W. F., R. J. Lewis y A. Garland.  
The Journal of Medicinal Chemistry.  
13 ( 6 ) 1196 - 1204 ( 1970 ).

47. - Wagner John G.  
The Journal of Pharmaceutical Sciences.  
60 ( 8 ) 1272 - 1273 ( 1971 ).
48. - Wanntorp Hans.  
Acta Pharmacologia et Toxicologica.  
16 Suplemento 2, 1 - 123 ( 1960 ).
49. - West B. D., S. Preis, C. H. Schroeder y Karl Paul Link.  
83, 2676 - 2679 ( 1961 ).