

17



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"ZARAGOZA"

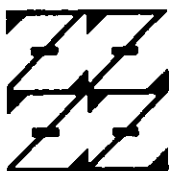
"ESTUDIO DE LA CAFEINA Y SUS METABOLITOS EN CULTIVO DE LINFOCITOS HUMANOS, MEDIANTE CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION"

29/10/75

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A :
ERENDIRA HERNANDEZ SANCHEZ.

U N A M
F E S
Z A R A G O Z A

DIRECTOR DE TESIS: M. en IBSH. ELIA ROLDAN REYES



LO HUMANO ES JE
DE NUESTRA REFLEXION

MEXICO, D.F.

200φ



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Citogenética, Mutagenésis y Toxicología Reproductiva, de la Facultad de Estudios Superiores "Zaragoza" UNAM, bajo la dirección de la M. en IBSH. Elia Roldán Reyes.

DEDICO ESTE TRABAJO A:

Mi madre

AMINTA SÁNCHEZ P.

Por ser lo más querido

Mi padre

JUSTINO HERNÁNDEZ P.

Por su apoyo y cariño

Mis hermanas y hermanos

LIBIA, LORNA, JUSTINO y OLAF

Por su confianza y cariño

Mi abuelita

SOFIA PEÑA

Por estar conmigo

AGRADECIMIENTOS ESPECIALES

A la UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO por ser mi alma mater

A la FEZ-ZARAGOZA por ser la base de mi formación profesional

A la M. en IBSH. Elida Roldán Reyes
Por su asesoría, apoyo y paciencia para la
realización de este trabajo.

Al Dr. Mario Altamirano Lozano
Por sus sugerencias y apoyo

Al Dr. Alejandro Domínguez González
Por su ayuda y sugerencias en el manejo del HPLC

Al Biol. Ruben Loyo
Por su apoyo en el manejo de datos

A todos los miembros del laboratorio de
Citogenética, Mutagénesis y Toxicología Reproductiva
Por sus consejos y apoyo

A los miembros del jurado:

M. en C. Carlos Bautista Reyes
M. en IBSH. Elia Roldán Reyes
Quim. Estela Jiménez Encarnación
Dr. Mario Altamirano Lozano
M. en C. María del Carmen García Rodríguez

ÍNDICE

	pag.
I. RESUMEN	
II. INTRODUCCIÓN	1
1. CAFEÍNA	1
1.1. EFECTOS TÓXICOS	2
1.2. EFECTOS FISIOLÓGICOS	4
1.3. ABSORCIÓN, DISTRIBUCIÓN, METABOLISMO Y ELIMINACIÓN	4
1.4. FARMACOCINÉTICA	8
1.5. FACTORES AMBIENTALES Y FISIOLÓGICOS QUE INFLUYEN EN EL METABOLISMO DE CAFEÍNA	9
1.6. EFECTOS GENOTÓXICO Y CARCINOGENICO	14
III. JUSTIFICACIÓN	19
IV. HIPÓTESIS	20
V. OBJETIVOS	21
1. OBJETIVO GENERAL	21
2. OBJETIVOS PARTICULARES	21

	pag.
VI. MATERIAL Y MÉTODO	22
1. REACTIVOS	22
2. SOLUCIONES ESTÁNDAR DE XANTINAS	22
3. FASE MÓVIL	22
4. CULTIVOS	22
5. TRATAMIENTOS	23
6. PREPARACIÓN DE ESTÁNDARES	23
7. COSECHA Y TRATAMIENTOS DE LA MUESTRA PARA SOMETERLA A HPLC	23
8. CONDICIONES DEL HPLC	24
9. EVALUACIÓN	24
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	26
VIII. CONCLUSIONES	45
IX. BIBLIOGRAFÍA	46
X. APENDICE (CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN)	60

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

	pag.
FIGURA 1 ESTRUCTURA QUÍMICA DE LA CAFEÍNA Y POSICIÓN DE LOS GRUPOS METILO.	2
FIGURA 2 PRINCIPALES METABOLITOS DE LA CAFEÍNA	10
TABLA 1 EFECTOS DE LA CAFEÍNA EN COMBINACIÓN CON CARCINÓGENO	18
FIGURA 3 ESQUEMA DE TRATAMIENTOS CON CAFEÍNA	25
TABLA 2 TIEMPOS DE RETENCIÓN DE LA CAFEÍNA Y SUS METABOLITOS EN LINFOCITOS HUMANOS <i>IN VITRO</i> MEDIANTE HPLC	26
FIGURA 4 CROMATOGRÁMAS DE ESTÁNDARES DE LOS METABOLITOS DE CAFEÍNA	27
FIGURA 5 CROMATOGRÁMAS DE MEZCLA DE ESTÁNDARES	28
FIGURA 6 CROMATOGRÁMA DE TESTIGO ABSOLUTO (BLANCO)	29

	pag.
FIGURA 7 CROMATOGRÁMAS DE CAFEÍNA 0h Y COSECHA 2h	30
FIGURA 8 CROMATOGRÁMAS DE CAFEÍNA 0h Y COSECHA 72h	31
FIGURA 9 CROMATOGRÁMAS DE CAFEÍNA 24h Y COSECHA 26h	32
FIGURA 10 CROMATOGRÁMAS DE CAFEÍNA 24h Y COSECHA 72h	33
FIGURA 11 CROMATOGÁMAS DE CAFEÍNA 48h Y COSECHA 50h	34
FIGURA 12 CROMATOGRÁMAS DE CAFEÍNA 48h Y COSECHA 72h	35
FIGURA 13 GRÁFICA DE TEOBROMINA PRESENTE EN LINFOCITOS HUMANOS EN CULTIVO	36
FIGURA 14 GRÁFICA DE TEOFILINA PRESENTE EN LINFOCITOS HUMANOS EN CULTIVO	37
FIGURA 15 GRÁFICA DE CAFEÍNA PRESENTE EN LINFOCITOS HUMANOS EN CULTIVO	38

I. RESUMEN

La cafeína (1,3,7-trimetilxantina) es un alcaloide que proviene de plantas de amplia distribución geográfica. Es el estimulante más utilizado por las poblaciones humanas, se encuentra en forma natural en el café, té, cocoa, bebidas de cola y en algunos fármacos.

La cafeína y otras metilxantinas tienen efectos en muchos organismos y sistemas celulares en cultivo. Estos efectos incluyen mutagénesis, inducción de aberraciones cromosómicas, inhibición de los mecanismos de reparación como el posreplicativo en células de mamífero, incrementa *in vitro* la transformación por químicos carcinógenos, y alteran los niveles de AMPcíclico, lo cual implica que la cafeína puede interactuar con el material genético. Algunos efectos pueden ser mediados por cafeína por sí misma, sin embargo otros pueden ser mediados por sus productos metabólicos.

En estudios realizados en ciertos tipos celulares *in vitro* como fibroblastos se ha visto que la cafeína es rápidamente metabolizada (0.5-3h), sin embargo en otros tipos celulares como los linfocitos humanos algunos autores sugieren que estos no son capaces de metabolizar este compuesto, de tal forma que interactúa con las células humanas a través del periodo de cultivo.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la biotransformación *in vitro* de la cafeína en linfocitos humanos mediante la técnica de cromatografía líquida de alta resolución. Para lo cual se efectuaron cultivos de linfocitos humanos de 2 y 72 horas, a los cuales se les agregó cafeína en una concentración de 10 mg/10ml. Se dividieron en tres grupos y en todos los casos se realizaron experimentos por duplicado aplicando la cafeína a diferentes tiempos. Grupo A: 0h de aplicación y cosecha a las 2 y 72h, Grupo B: 0, 24h de aplicación y cosecha a las 2 y 72h, Grupo C: 48h de aplicación y cosecha a las 2 y 72h. Registrándose la teofilina en todos los tiempos cortos (2, 26 y 50h) y la teobromina en todos los tratamientos excepto en el de 48h (cosecha 50h).

En base a los resultados obtenidos se propone que los linfocitos humanos *in vitro* son capaces de metabolizar a la cafeína en teobromina y teofilina en un tiempo aproximado de 2 horas.

II. INTRODUCCIÓN

La cafeína, la teofilina y la teobromina son tres alcaloides estrechamente relacionados entre sí que provienen de plantas de amplia distribución geográfica. Se cree que el hombre paleolítico descubrió las principales plantas que contienen cafeína en el mundo y preparó bebidas con ellas. En Sudamérica las bebidas muy antiguas que contienen cafeína son el guaraná (de la semilla de la *Paullinia cupana* o *paullina sorbilis*), yoco (de la corteza de *Paullina yoco*) y mate (*del Ilex paraguariensis, una especie de abeto*). El cacao y el chocolate, de las semillas de *Theobroma cacao*, contienen teobromina y algo de cafeína así como las bebidas de cola debido a las considerables cantidades de cola acuminata y al agregado de cafeína como tal en su producción. La base de la popularidad de las bebidas que contienen cafeína ha sido la antigua creencia de que las mismas tenían acciones estimulantes y antisoporíficas que elevan el ánimo, disminuían la fatiga y aumentaban la capacidad de trabajo.

1. CAFÉINA

La cafeína (1,3,7-trimetilxantina), el estimulante más usado por el público se encuentra en forma natural en el té, café cocoa y bebidas de cola . Se le conoce como 3,7-Dihidro-1,3,7-trimetil-1H-purina-2,6 diona; 1,3,7-trimetil-2,6-dioxo purina; guaranina; metilteobromina la cual tiene la siguiente estructura química (figura 1), donde se indica la posición de los grupos metilo que son removidos en sus metabolitos.

Se presenta como agujas incoloras brillantes o prismáticas hexagonales, inodoras y de sabor amargo (Gennaro , 1985 Macrae 1985; Mc Elvoy 1989); su punto de fusión es de 234 - 239 °C, (Moffat, 1986; Budavari, 1989), densidad $d=1.23$ (Budavari,1989), su K_b a 19 °C es 0.7×10^{-14} a 19°C, su K_a a 25 °C es menor de 1×10^{-14} (Windholz, 1983), el pH de una solución de cafeína al 1% es de 6.9.

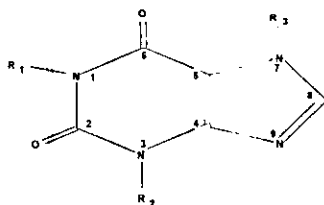


Figura 1.- Estructura química de la cafeína y la posición de los grupos metilo que son sustituidos en sus metabolitos.

	R ₁	R ₂	R ₃
Cafeína (1,3,7-trimetilxantina)	CH ₃	CH ₃	CH ₃
Teobromina (3,7- dimetilxantina)	H	CH ₃	CH ₃
(1,3-dimetilxantina)	CH ₃	CH ₃	H
Paraxantina (1,7-dimetilxantina)	CH ₃	H	CH ₃

Un gramo de cafeína dependiendo de las condiciones se disuelve en: 46.0 ml de agua a temperatura ambiente, 5.5 ml de agua a 80°C, 1.5 ml de agua hirviendo, 66.0 ml de alcohol, 22.0 ml de alcohol a 60 °C, 50.0 ml de acetona, 5.5 ml de cloroformo, 530.0 ml de éter, 100.0 ml de benceno, 22.0 ml de benceno hirviendo.

Es muy soluble en pirrol, tetrahydrofurano, es soluble en acetato de etilo y ligeramente en éter de petróleo. (Budavari, 1989). La solubilidad se incrementa en el agua con la presencia de ácidos orgánicos, benzoatos alcalinos, cianamtos, citratos o salicilatos. La cafeína es eflorescente al aire (Merck, 1989), su espectro en el ultravioleta es: en ácido acuoso; 273 nm; sin cambios alcalinos; su espectro en infrarrojo: se observan principalmente picos a una longitud de onda de 1658, 1698, 747, 1548, y 760 nm (pastillas de bromuro de potasio); su masa espectral: presenta picos a 194, 109, 55, 67, 82, 195, 24 y 110 m/z (Moffat, 1986).

1.1. EFECTOS TÓXICOS

En humanos a dosis bajas de 2 µg/ml en sangre la cafeína estimula el sistema nervioso central, a altas concentraciones en sangre (10-30 µg/ml) produce inquietud, excitación, temor, temblores, dolor de cabeza e insomnio (Lachance 1982; Ashton, 1987; Stavric, 1988), puede inducir mal humor alterar los patrones del sueño, incrementa la producción de orina y la secreción ácido gástrico, altera la función

miocárdica, induce hipertensión y arritmia, incrementa los niveles de catecolaminas en el plasma (Leonard *et al.*, 1987; Stavric 1988). El consumo excesivo de cafeína produce ansiedad nerviosa (Greden, 1979; Griffiths y Woodson, 1988).

La toxicidad aguda debido a cafeína no es muy común, solamente algunos efectos adversos como síntomas gástricos, insomnio, diuresis han sido observados como un resultado de la sobredosis (Lachance, 1982; Rall, 1985; Stavric, 1988). Se sabe que las personas con cirrosis acumulan 40 veces más cafeína y sus metabolitos que las personas sanas (Wahlander *et al.*, 1985), mientras que con dosis de 250 mg ingerida por 3 veces al día por 7 días se reportó un incremento de un 5-10% de los ritmos cardíacos (sístole y diástole) y de la presión sanguínea de 1-3h (Robertson *et al.*, 1978, 1981; Arnaud, 1987). Cuando se utiliza café descafeinado (40 mg cafeína) por 6 semanas existe un pequeño pero significativo decremento en sístoles diástoles y presión sanguínea. La cafeína produce dependencia psíquica y en casos extremos física, de tal modo que la abstinencia produce irritabilidad y somnolencia.

Por otro lado a la cafeína se le atribuyen acciones teratológicas y en ocasiones induce aberraciones cromosómicas debido a la inhibición de procesos de reparación del ADN (Hamed *et al.*, 1994).

La toxicidad de la cafeína se observó en ratas cuando fue administrada diariamente vía intragástrica por 100 días, mostrando una reacción de fatiga nerviosa (estrés) en forma de hipertrofia y atrofia de la corteza adrenal y de la glándula del timo, induciendo una mutilación física entre ellos, además de úlceras gástricas, hipertrofia de las glándulas salivales, hígado, corazón, pulmones, inhibición de la organogénesis, pequeños cambios en los niveles de agua en los órganos y una aparente muerte por bronconemia (Tarka, 1992). La dosis de 600 µg/día en animales de laboratorio induce aborto o nacimiento prematuro. La dosis letal media para humanos es $LD_{50} = 100$ mg/kg, para ratas es $LD_{50} = 20$ mg/kg, para ratón $LD_{50} = 127$ mg/kg, para hámster $LD_{50} = 230$ mg/kg y para conejo $LD_{50} = 246$ mg/kg.

1.2. EFECTOS FISIOLÓGICOS

La cafeína tiene diversos efectos sobre el organismo en general. Es un estimulante del sistema nervioso central actuando inicialmente sobre la corteza cerebral, bulbo y médula espinal, estos efectos se atribuyen a la capacidad que tiene para inhibir la fosfato- diesterasa, la cual inactiva el AMPcíclico.

Sobre el sistema cardiovascular, la cafeína, incrementa el gasto cardíaco, al antagonizar la acción de compuestos adenílicos, evita la bradicardia y el bloqueo de la conducción auriculoventricular. Por esa misma propiedad se emplea como estimulante en casos de intoxicación aguda por etanol (Cabello, 1988).

En el músculo estriado la cafeína, favorece la liberación de Ca^{+2} del retículo sarcoplásmico que provoca la relajación del mismo y del músculo liso, reduce el ritmo y la capacidad de acumulación del Ca^{+2} en retículo sarcoplásmico y las mitocondrias por medio del desacoplamiento de la actividad de ATPasa, además de producir broncodilatación. Posee acción diurética inhibiendo la resorción tubular de sodio y cloruro aumentando la eliminación de potasio, el número de glomerulos en acción, elevando la presión de filtración y dilatando más las arteriolas eferentes (Bowman et al., 1985).

1.3. ABSORCIÓN, DISTRIBUCIÓN, METABOLISMO Y ELIMINACIÓN

La ruta de administración de la cafeína puede ser por vía oral, intravenosa o por piel. La cafeína se absorbe rápidamente y completamente por tracto gastrointestinal, dependiendo directamente del pH (Chvasta y Cooke, 1971), en humanos en 45 minutos se absorbe un 99% de la cafeína administrada (Chvasta y Cooke, 1971), mientras que la administración oral de cafeína es absorbida por el intestino delgado (20 %) así como por estomago (Chvasta y Cooke 1971), se distribuye en todos los fluidos del cuerpo (Bonati y Garattini, 1984), y aparece en todos los tejidos en 5 minutos, no existiendo acumulación de cafeína o sus metabolitos en órganos específicos, el volumen de distribución en humanos es de 0.5 a 0.8 l/kg (peso corporal) y de 0.8 l/kg (peso corporal) en otras especies.

Se distribuye ampliamente en el organismo y se une en un 60% a proteínas plasmáticas principalmente la albúmina (del 10 al 30%) (Bonati y Garattini, 1984), pasa a través de todas las membranas biológicas conocidas (Maikel y Snodgrass, 1973; Tanaka *et al.*, 1984; Lachance *et al.*, 1983), incluyendo la barrera placentaria (Kimmel *et al.*, 1984). Después de los tratamientos orales se han detectado concentraciones de cafeína en fluidos biológicos como el suero y la leche materna, en sangre del cordón umbilical (Parsons *et al.*, 1982; Van Thoff, 1979), bilis (Arnaud y Enslin, 1992) saliva, líquido cefalorraquídeo y semen (Bowman *et al.*, 1985) y en sangre una hora después de la administración (Beach *et al.*, 1982).

En humanos después de la ingestión de cafeína los metabolitos como la teofilina, la teobromina y la paraxantina se detectan en fluidos biológicos encontrándose un pequeño incremento en las concentraciones de teofilina y teobromina, siendo los niveles de paraxantina 10 veces más altos. Las concentraciones de paraxantina son mas altas que las de cafeína en las primeras 8 a 10h posteriores a la administración (Tang-Liu y Riegelman, 1981). Por su lado se ha descrito que en monos se encuentra en mayor concentración la teofilina, mientras que en las ratas están en igual concentración la paraxantina, teofilina y teobromina (Bonati *et al.*, 1984). La dosis ingerida de cafeína presenta un 98% de reabsorción en el tubo renal, excretándose inalteradamente en orina (de 0.5-2% en humanos y 5% en ratón).

Las reacciones enzimáticas que llevan a cabo la biotransformación de compuestos xenobióticos como la cafeína se clasifican en dos tipos: de fase I y de fase II. Las primeras realizan oxidaciones, reducciones e hidrólisis, agregando o exponiendo grupos funcionales (-OH, -SH, -NH₂ -COOH), aumentando la solubilidad del compuesto en el agua y constituyendo el sustrato para las reacciones de fase II. Las reacciones de fase II son reacciones biosintéticas en las que un xenobiótico o un metabolito derivado de fase I es unido a moléculas endógenas como el ácido glucurónico, glutatión y sulfato, entre otras formando los llamados conjugados, aun más hidrofílicos y por lo mismo más fácilmente eliminables; el sistema enzimático más importante involucrado en las reacciones de fase I es el citocromo P-450. Los

citocromos P450s son un conjunto de isoenzimas polipeptídicas de peso molecular comprendido entre 45,000 y 55,000 daltones, poseen un grupo hemo. Su función consiste en activar el oxígeno tisular e incorporarlo a sustancias endógenas y xenobióticas, se le denomina así porque en su estado reducido forma un complejo con monóxido de carbono cuya absorbancia máxima de luz es a 450 nm y se encuentran en la membrana del retículo endoplásmico liso.

Existen varias isoenzimas del citocromo P-450 con diferentes afinidades por diferentes sustratos. En mamíferos, el número de genes que codifican para los diferentes citocromos P-450 va de 60 a más de 200. El CYP1A2 es encontrado en algunos mamíferos en tejido de hígado siendo inducible por algunos compuestos como hidrocarburos aromáticos. Este compuesto es encontrado en el metabolismo de drogas como acetaminofén, fenacetin y cafeína, siendo el principal P-450 requerido para la activación de anillos procarcinógenos y arilamidas heterocíclicas procarcinógenos encontrados en comidas (Guengerich y Shimada, 1991). El CYP1A2 lleva a cabo una hidroxilación de compuestos y los metabolitos son encontrados activos por esterificación, por acetilación y grupos sulfato.

La cafeína se metaboliza en el hígado por dimetilación y oxidación parcial, teniendo vida media de 6.85h, la vía metabólica consiste en múltiples y separadas dimetilaciones por oxidación del carbono 8 (C-8) de 1-metilxantina a 1-ácido metilúrico que es una biotransformación no microsomal llevada a cabo por la xantina oxidasa (Bergmann y Dikstein, 1956). Existe una biotransformación a dimetil xantinas, dimetil ácido monometilúrico, trimetil, dimetilación y derivados uracilos, este perfil metabólico depende de la distribución en el cuerpo, concentración plasmática y excreción renal (figura 2).

Estudios *in vivo* muestran que diferentes tipos celulares como: fibroblastos normales, fibroblastos de Xeroderma pigmentosum, fibroblastos de Lesch-Nyhan, células HeLa, células normales (silvestres) de ratón, células de ratón deficientes en

adenin-fosforibosil-transferasa; metabolizan por demetilación a la cafeína en un lapso de aproximadamente 1 a 3 horas (Goth y Cleaver, 1976)

La vía metabólica más importante en humanos es la dimetilación de cafeína (95%) solo el 5% son derivados trimetil. Esta transformación se lleva a cabo por las enzimas microsomales del hígado (Grant *et al.*, 1987; Berthou *et al.*, 1989) y no hay un metabolismo significativo en otros órganos, esta biotransformación se lleva a cabo por el citocromo P450 (P4501A, P4501A2).

La paraxantina es el precursor de AFMU (5-acetilamino-6-formilamino-3-metiluracilo) que cuenta con el 67% de eliminación aproximada y los cambios de acuerdo a la velocidad de producción de 1-metilxantina y ácido metilurico (Lelo *et al.*, 1989, Grant, 1983a) sugieren que es formado por un precursor común AFMU y 1-metilxantina no conociéndose el intermediario. El otro uracilo derivado identificado es producido *in vivo* por microsomas de hígado de rata; pero el mecanismo de su formación con un posible precursor común por trimetil o ácido dimetilurico todavía no ha sido demostrado. La porción molar en paraxantina de la cafeína en la orina tomada 3 ó 4 horas después de la administración de ésta, fue propuesta como una metodología para evaluar el citocromo P450 (Kilbane *et al.*, 1990).

Con la identificación de la velocidad de producción y excreción del AAMU (5-acetilamino-6-amino-3-metiluracil) y AFMU se puede establecer el polimorfismo de acetilación (Grant *et al.*, 1983b) de la población en general, señalando quienes son acetiladores rápidos y lentos (Evans y White, 1964).

La expresión genética juega un papel importante en la eliminación de la cafeína y el metabolismo en animales y humanos, las concentraciones urinarias constituyen índices de actividades enzimáticas hepáticas, este es el caso de la xantina oxidasa y de la proporción metabólica de cafeína que se correlaciona con la dimetilación en la posición 3 de la cafeína y la actividad del citocromo P450 (Arnaud *et al.*, 1989).

La excreción fecal después de la administración oral en ratas es de 8-10% de la dosis administrada y de 2-5% en humanos. Los productos identificados en las heces fecales de humanos es: 1,7-ácido dimetilurico (44%), el 1-ácido metilurico (38%), el 1-3 ácido dimetilurico (14%), el 1,3,7-ácido trimetilurico (6%) y la cafeína (2%) de radioactividad fecal.

1.4. FARMACOCINÉTICA

El pico de concentración de cafeína en plasma con dosis de 5 - 8 mg/ kg es alcanzado de 15 a 20 minutos después de la ingestión oral en humanos, siendo los promedios de los valores del plasma de 8 a 10 mg/l (Bonati *et al.*, 1982, Arnaud y Welsch, 1980, 1982). La diferencia en la farmacocinetica de eliminación de la cafeína se puede deber a un retardo en el vacío gástrico debido a la presencia de constituyentes de la dieta y a patologías como la estasis gástrica (Chvasta y Cook, 1971, Bonati *et al.*, 1982, Arnaud, 1976). La fracción de la cafeína reversiblemente pegada a las proteínas plasmáticas animales ó humanas varia de un 10% a un 30%, siendo eliminada aparentemente por una cinética de primer orden, descrito por un comportamiento abierto del sistema en humanos (Bonati *et al.*, 1982). La dimetilación de las paraxantinas, de la teofilina y de la teobromina a altas concentraciones muestran una cinética bifásica en la producción de metabolitos individuales con microsomas humanos (Campbell, *et al.*, 1987).

Para dosis menores que 10 mg/kg los rangos de vida media son de 0.7-1.2 horas en rata y ratón, 1- 4 horas en conejos, 3-5 horas en monos, 6 horas en perros y 11 horas en babuinos (Chistensen *et al.*, 1981, Bonati *et al.*, 1984). En humanos con una dosis administrada de 4 mg/kg de cafeína se observo una vida media de 2.5-4.5 horas (Arnaud, 1987), no existiendo una diferencia significativa entre las personas jóvenes y adultas lo cual sugiere que no hay una dependencia ni alteración de la eliminación de cafeína del plasma a mayor edad (Blanchard y Sawers, 1983), aunque se ha reportado en humanos un escaso decremento de esta en el plasma a mayor edad (Blanchard y Sawers, 1983). En rata si se observa un incremento en la dependencia con la edad y modificación de la vida media (Feely *et al.* , 1987; Latini *et*

al., 1981). La vida media de la cafeína es incrementada en el periodo neonatal en humanos y animales debido a la inmadurez del sistema enzimático hepático (Aranda, et al., 1979). La vida media de 500 - 103 horas fue encontrada en niños prematuros y recién nacidos pero decrece rápidamente a 14.4 horas y 2.6 horas en niños de 3-5 meses respectivamente (Pearlman, et al., 1989).

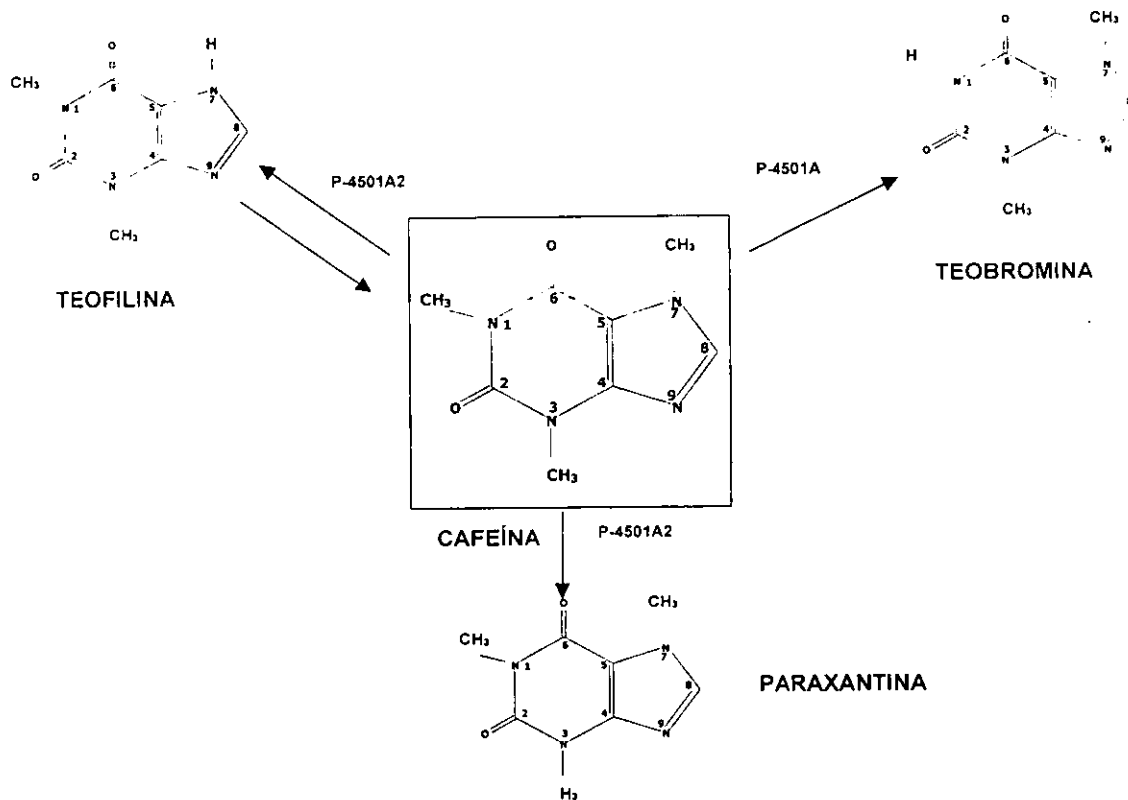
1.5. FACTORES AMBIENTALES Y FISIOLÓGICOS QUE INFLUYEN EN EL METABOLISMO DE LA CAFEÍNA.

El tiempo de eliminación de la cafeína puede ser modificada por factores exógenos y endógenos como: constituyentes de la dieta, el ejercicio, las drogas, el ciclo menstrual, padecimientos hepáticos, obesidad y diabetes mellitus, respectivamente.

No se observa diferencia en la metabolización de cafeína entre hombres y mujeres (Patwardhan, 1990). Sin embargo en mujeres sanas la eliminación de cafeína fue 25% más larga (vida media 6.85 horas) en la fase lútea de el ciclo menstrual comparada con la fase folicular (vida media de 5.54 horas) (Balogh et al., 1987). El uso de anticonceptivos orales pueden doblar la vida media de la cafeína (Callahan et al., 1983 Patwardhan, 1980), así como la excreción urinaria de esta, la paraxantina y 1,7-ácido dimetilurico a expensas de 1-metilxantina, 1-acido metilurico los metabolitos acetilados AFMU y AAMU (Callahan et al., 1983).

Durante el embarazo, la excreción de la 1-metilxantina y del 1-ácido metilurico tienen un incremento, prolongándose la vida media de la cafeína en la mujer durante el primer trimestre de embarazo (Aldridge et al., 1981, Brazier et al., 1983). Esto también se observa durante la etapa de gestación en el conejo (Dorrbecker et al., 1988). La vida media retorna a los valores del pre-embarazo a pocas semanas del post parto (Parsons, et al 1982, Brazier et al., 1983). En mujeres embarazadas no fumadoras y fumadoras así como mujeres no fumadoras usando anticonceptivos orales, la porción de metabolitos de cafeína fue reducido en un 20% y 29% respectivamente comparado con un grupo control, indicando una inhibición de P4501A2 (Vistisen et al., 1990)

FIGURA 2.- PRINCIPALES METABOLITOS DE LA CAFEÍNA



La eliminación de cafeína se retarda en pacientes que presentan padecimientos hepáticos y renales incrementándose la vida media de 50 a 60 horas. En personas sanas que ingieren café un periodo de restricción de 21 días produce un pequeño pero significativo decremento en la velocidad de eliminación (Ratanasavanh et al., 1990). En humanos la 3-dimetilación es catalizada por el citocromo P-450IA2, y no por otro citocromo (Butler et al., 1989). Estudios clínicos reportan un incremento frecuente en la interacción de drogas que alteran la eliminación de cafeína. En humanos adultos el decremento de cafeína y de la paraxantina es debido a la inhibición competitiva de los niveles microsomales hepáticos (Lelo et al., 1989, Joeres et al., 1987). En rata el incremento de la vida media varía según la edad: de 1 hora para las de 49 días, de 1.5 horas para 105 días y 3 horas para 210 días de edad, (Feely et al., 1987) estudios en el hígado indican una baja relacionada con la edad en la dimetilación hepática de cafeína (Latini et al., 1980).

Se ha observado que algunos constituyentes de la dieta pueden tener un efecto en el metabolismo de medicamentos (Anderson et al., 1982, Vesell, 1984) y dañar o incrementar la eliminación de la cafeína, como por ejemplo el alcohol (George et al., 1986, Mitchell et al., 1983) y el brocoli (Vistisen et al., 1990) respectivamente.

El ejercicio causa una clara elevación en el plasma de las concentraciones de cafeína de 7.28 mg/l a 10.45 mg/l un decremento en la distribución del volumen de 37.1 mg/l a 20.911 mg/l y una reducción de la vida media de 4.00 a 2.30 horas, mientras que en personas obesas con más de 30% de grasa en el cuerpo se observa un decremento en la concentración máxima en suero, siendo mayor el volumen de distribución de cafeína en descanso que haciendo ejercicio comparándolo con personas delgadas (Kaminori et al., 1987).

Un estudio en pacientes con descompensación Tipo I y Tipo II de diabetes mellitus muestra que la eliminación de la cafeína y el volumen de esta y su distribución fue similar al control (Zysset Wiethoultz, 1991). Factores genéticos y/o ambientales sugieren una explicación para la larga variabilidad de la eliminación de cafeína cuando

se compara con la eliminación de la galactosa hepática en algunos pacientes (Nagel *et al.*, 1990). Cambios en el patrón de excreción de metabolitos de cafeína en orina fueron evaluados en fumadores de cigarro después de 3 ó 4 días de abstinencia (Brown *et al.*, 1988). Durante la abstinencia, en orina de 24 horas la proporción de dimetilxantinas a cafeína y de monometilxantinas a dimetilxantinas fue reducida, sugiriendo que los fumadores de cigarro aceleran los pasos de la dimetilación. Menos del 50% de la dosis tomada fue recobrada en orina de 24 horas.

En humanos muchas drogas tomadas simultáneamente con cafeína inhiben completamente su metabolismo a través de la primera y más importante transformación metabólica, la 3-dimetilación (Tarrus *et al.*, 1987). Este efecto inhibitorio en el metabolismo de la cafeína ha sido demostrado *in vitro* usando microsomas de hígado de humano y rata (Sesardic *et al.*, 1990). Algunas drogas como el alopurinol causa inhibición dosis dependiente de la conversión de 1-metilxantina a ácido 1-metilurico (Lelo *et al.*, 1989).

Los procedimientos analíticos para la determinación de cafeína, sus metabolitos y otras xantinas en fluidos biológicos han sido revisados por (Chistensen y Whitsett, 1979; Tobias, 1982; Chistensen y Neims, 1984; Hurst *et al.*, 1984). Hasta mediados de los setentas, la técnica usual para determinar cafeína en fluidos biológicos fue la de espectroscopia de ultravioleta (Axelrod y Reichenthal, 1953; Routh *et al.*, 1969). Se usó la cromatografía de capa fina (Welch *et al.*, Riechert, 1977; Bradbrook *et al.*, 1979), Cromatografía de gases (Grab y Reinstein, 1968, Demas y Statland, 1977; Bradbrook *et al.*, 1979) y cromatografía de gas-espectrofotometría de masas (Merriman *et al.*, 1978) para análisis de cafeína en el plasma. El mínimo nivel de cafeína detectado en plasma por cromatografía de capa fina fue 0.1 µg / ml (Bradbrook *et al.*, 1979) mientras que en suero, saliva y orina fue de 1µg/ml (Riechert, 1978).

Los niveles de cafeína en plasma por cromatografía de gases fue de 0.05 µg/ml (Bradbrook *et al.*, 1979). La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), es

actualmente el procedimiento más frecuente para determinar cafeína y sus metabolitos así como para separar a la cafeína de otras xantinas y drogas en fluidos biológicos.

El descubrimiento de técnicas para la longitud de onda ultravioleta fija y ultravioleta variable para métodos electroquímicos y rangos de técnicas de separación para fase reversa y normal para pares de iones son algunas otras variantes que vienen a complementar el análisis por HPLC (Sued y Wilson, 1977; Aldridge y Neims, 1979; Christensen y Whitsett, 1979; Tin *et al.*, 1979; Foenander *et al.*, 1980; Van der Meer y Haas, 1980; Christensen y Isemhagen, 1981; Haughey *et al.*, 1982; Muir *et al.*, 1982; Klassen y Stavric, 1983; O'Connell y Zurzola, 1984; Stavric y Klassen, 1984; Kapke y Franklin, 1987; Papadoyannis y Caddy, 1987; Meatherall y Ford, 1988).

Procesos adicionales para la determinación de cafeína en fluidos biológicos incluye la cromatografía de resina de intercambio de iones (Walton *et al.*, 1979), de radioinmuno ensayos (Cook *et al.*, 1976) y técnicas de inmunoensayos enzimáticos (Aranda *et al.*, 1987).

La cafeína la teobromina y la teofilina ha podido ser determinados en alimentos y bebidas, incluyendo café, te y cocoa, formulas de drogas por varias técnicas (Hurst *et al.*, 1984) incluyendo la espectrofotometria (Fincke, 1963; Ferren y Shane 1968; Somori, 1973, 1974; Horwitz, 1980a) la trimetria (Mayanna y Jayaram, 1981), la cromatografía en columna (Levine, 1962; Johnson, 1967) y la determinación de nitrógeno en kjeldahl (Moore y Campbell, 1948).

Los estudios anteriores fueron seguidos por el empleo de la cromatografía en capa fina (Senanayake y Wijesekera, 1968, 1971, Somorin, 1974; Jalal y Collin, 1976) y la cromatografía de gases (Horwitz, 1980b). La cromatografía de alta resolución es la más usada en el presente para determinar cafeína y otras metilxantinas en alimentos y bebidas (Madison *et al.*, 1976; Kreiser y Martin, 1978, Timbie *et al.*, 1978; Horwitz, 1980c; Zoumas *et al.*, 1980; De Vries *et al.*, 1981; Reid y Goog, 1982; Blauch y Tarka, 1983; Craig y Nguyen, 1984; Vergnes y Alary, 1986).

1.6. EFECTOS GENOTÓXICO Y CARCINOGENICO

La cafeína es una metilxantina, que tiene una estructura química similar a las purinas que constituyen al ADN y por lo tanto tiene el potencial de interferir con la división y el metabolismo celular (Alder, 1970), interactúa en diferentes partes con la estructura del ADN principalmente con regiones de una hebra intercalándose con la doble hélice de ADN (Richardson *et al.*, 1981; Tornaletti *et al.*, 1989), daña la estructura helicoidal del ADN (Ts'o *et al.*, 1964), causando un incremento en el rango de elongación (Bowden *et al.*, 1979) y bajas en el punto de fusión.

Cuando el ADN es tratado a bajas concentraciones de cafeína e irradiado con luz ultravioleta, las moléculas de cafeína se pegan a la región irradiada, preferentemente a la cadena sencilla del ADN (desnaturalizado) a las regiones ricas en adenina y timina (Kihlman, 1977).

La co-incubación de la cafeína específicamente con una cadena de endonucleasas induce algunos rompimientos, esto no pasa cuando el ADN es incubado con cafeína o solo con endonucleasas (Sleigh y Grigg, 1974; Chetsanga *et al.*, 1976). Así mismo la cafeína es altamente afín al ADN desnaturalizado (de una cadena) que al ADN nativo (de doble cadena) (Ts'o y Lu, 1964).

La cafeína inhibe la actividad de las polimerasas del ADN y de las nucleasas de *E. coli* (Solberg *et al.*, 1978) así como en células de pulmón de embrión (Wragg *et al.*, 1967). Se sabe que también inhibe tres diferentes exonucleasas de *E. coli* (Roulland y Dussoix, 1967), en altas concentraciones a la timidina cinasa (Sandlie *et al.*, 1980) y a algunas fosforilasas de la ribosa o desoxirribosa (Koch y Lamont, 1956), además de incrementar el número de sitios de replicación en el ADN en células V79 de hámster Chino y células de HeLa.

En células HeLa, la cafeína inhibe síntesis del ARN pero no la del ADN (Kuhlmann *et al.*, 1968), mientras que en linfocitos humanos no se incorpora en el ADN (Brogger, 1974) pero reduce el número de segmentos de síntesis de ADN por la

reparación de escisión en células de xeroderma (Buhl y Regan, 1974). Algunos estudios indican que un análogo de las purinas como la cafeína puede afectar el metabolismo precursor del ADN (Haynes y Collins, 1984), inhibir enzimas del metabolismo de purinas y alterar la proporción normal de la reserva precursora del ADN causando errores en el apareamiento de las bases, e inhibir la síntesis de Novo de purinas, de las purinas exógenas en cultivo de células CHO (Células de Ovario de Hámster Chino), así como la incorporación de timinas en el ADN en células procariontes y eucariontes. En *E. coli* esta inhibición es causada por una inhibición de la timidina cinasa o probablemente inhibe el proceso de síntesis de ADN. Sin embargo el mayor efecto de cafeína en la reserva nucleotídica es debido a los procesos de inhibición que envuelven a la trifosfato timidina (Selby y Sancar, 1990).

La cafeína induce anomalías cromosómicas en células vegetales y de mamíferos en cultivo, tiene potentes efectos mutagénicos en los microorganismos sola o combinada con otros mutagenos. Estos efectos parecen estar asociados a la inhibición de los procesos de reparación de ADN. Esto se observa con concentraciones de cafeína mucho mayores que las que se ingieren en las bebidas y medicaciones (Selby y Sancar, 1990).

Las pruebas conocidas sugieren que la cafeína no es mutagena por si sola en los mamíferos, sin embargo en dosis muy altas parece tener cierta actividad teratogena. Aunque la información en cuanto al hombre no es clara, se ha visto que al agregar cafeína al esperma humano se incrementa la movilidad (Homonnai et al., 1976; Traub et al., 1982; Aitken et al., 1983) no alterando la morfología.

A pesar de que la United States Food and Drug Administración lanzó una alarma en 1980 sugiriendo a las mujeres embarazadas que limitaran su ingesta de alimentos que incluyeran a la cafeína, estudios recientes no han encontrado ninguna asociación entre el consumo materno de cafeína y la incidencia de malformaciones en los niños. Así es que, si bien los efectos mutagenos parecen representar poco riesgo

en el hombre, la toxicidad potencial para el desarrollo del feto humano y el recién nacido merece más investigación (Robertson *et al.*, 1981).

Se ha establecido que la cafeína tiene efectos mutagénicos en bacterias, hongos, plantas y cultivo de células humanas (Ostertag *et al.*, 1965), potencializa los efectos mutagénicos y letales de agentes genotóxicos sabiéndose que algunos organismos esto se debe a la inhibición de los mecanismos de reparación de fotorreactivación y escisión de nucleótidos *in vivo* (Witkin, 1969) y en el sistema de células permeabilizadas. Así como el proceso de reparación por escisión de nucleótidos en células de HeLa a la concentración de 10mM (Selby y Sancar, 1990).

En otros estudios Kuhlmann y colaboradores (1968) encontraron que la cafeína induce daño mutagénico que puede acumularse en células germinales de organismos superiores reportando un riesgo genético, sin embargo esto ha sido demostrado en el hombre. No obstante Lagarde y Colbert (1972) reportan que las metilxantinas pueden inhibir a la enzima fosfodiesterasa en linfocitos humanos, el efecto clastogénico de la cafeína puede ser atribuido a la inhibición que sufre esta enzima, pero Allison y Paton en 1963 encontraron que la cafeína produce clastogenidad en la línea celular diploide humana W1-38 por inhibición de enzimas lisosomales. Así mismo la teofilina y la teobromina presentan efecto clastogénico en linfocitos humanos. Butcher y Sutherland en 1962 reportaron que la teofilina es el inhibidor natural más importante de la fosfodiesterasa y que el orden de inhibición de esta por metilxantinas es el siguiente: cafeína>teofilina>1-metilxantina>7-metilxantina>3-metilxantina, la teobromina no inhibe a la enzima.

Así mismo estudios recientes han demostrado que la cafeína puede actuar como un antimutágeno e inhibir el efecto citotóxico y citostático de agentes que se intercalan con el ADN, este efecto inhibitorio puede ser debido al complejo de la intercalación del ADN con la cafeína la cual muestra una actividad antimutágena contra N-metil-Nnitroso guanina (Borodina *et al.*, 1979; O'Neal, 1979, Levin, 1982; Roberts, 1984, Selby y Sancar 1990). En presencia de agentes modificadores de ADN como

novatrone (NOVI), bromuro de etidio (EBR), se ha demostrado que la cafeína puede alterar el espectro de absorción del ADN, comportándose como interceptor molecular (Traganos *et al.*, 1991, Kapusemki y Kimel, 1993).

La cafeína no muestra efectos carcinogénicos por sí sola, sin embargo cuando se combina con conocidos inductores de carcinogénesis puede o no potenciar los efectos carcinogénicos y esto depende de una gran cantidad de factores entre los cuales podemos considerar: el compuesto, el tiempo de tratamiento, la edad del animal, la especie, el órgano blanco, la concentración y la vía de aplicación de la cafeína etc. (Tabla 1).

En estudios previos realizados por Roldán en 1997 se analizó el efecto de la cafeína en la expresión de lesiones inductoras de ICH's producidas por el pentóxido de vanadio (V_2O_5) en cultivo de linfocitos humanos cosechados a las 72 horas, se realizaron tres tratamientos de V_2O_5 aplicados en los diferentes tiempos de división celular (0, 24, y 48 horas de haber iniciado los cultivos) utilizando concentraciones de 2,4 y 6 $\mu\text{g/ml}$, en combinación con cafeína (20 $\mu\text{g/ml}$). La cafeína se adicionó a las 0 horas (siembra), 24 y 48 horas de haber iniciado los cultivos. Se encontró que cuando se agregó el V_2O_5 a las 48 horas en combinación con cafeína a las 24h hubo un incremento en la frecuencia de ICH's en la concentración de 6 $\mu\text{g/ml}$ y al agregar la cafeína a las 48 horas de haber iniciado los cultivos en el mismo tratamiento este aumento se vio más marcado en las concentraciones de 4 y 6 $\mu\text{g/ml}$ de vanadio. Estos resultados indican que el vanadio induce lesiones desde el primer ciclo de replicación que están siendo eficientemente reparadas por los mecanismos de reparación, al agregar cafeína estos se inhiben por acción de esta o sus metabolitos, razón por la cual no se observan ICH's en los dos primeros protocolos. Sin embargo cuando la permanencia de la cafeína en el medio fue de un ciclo (24h), se encontró un incremento en la frecuencia de ICH's lo que sugiere la posible expresión de las lesiones en forma de ICH's.

TABLA 1.-EFECTOS DE CAFEÍNA EN COMBINACIÓN CON CARCINÓGENOS

Carcinógeno	Animal	Órgano	Cafeína	Resultados	Comentarios
4-Nitroquinolina-1-óxido (Nomura, 1976, 1980)	ratón	pulmón	100 µg/g subcutáneo	Decrece número de tumores	p<0.05
4-Nitroquinolina-1-óxido (Hoshino y Tanooka, 1979)	ratón	piel	0.8 mg aplicado en piel	Incrementa número de tumores	p<0.01; limite reportado
4-Hidroxyaminoquinolina-1-óxido (Denda <i>et al.</i> , 1983)	rata	páncreas	120mg/kg. subcutáneo	Decrece número de nódulos pancreáticos cuando la cafeína se da después del agente. Incrementa el número de nódulos pancreáticos cuando la cafeína se da antes del agente	p<0.01
Uretano (Armuth y Berenblum, 1981)	ratón	piel	100µg/g inyección subcutánea	No afecta solo cuando se da cafeína 6 h antes del agente aumenta la incidencia de papilomas	promotor inadecuado
Uretano (Theiss y Shimkin, 1978)	ratón	pulmón.	20 o 40 mg/kg. intraperitoneal	El número de tumores por animal decrece en ambos grupos cuando la cafeína se da antes o al mismo tiempo que el agente	p<0.01
Uretano (Nomura, 1983)	ratón	pulmón	0.05µmol/g intraperitoneal	Decrece incidencia de tumores	p<0.01
N-Nitroso-N-butil(4- hidroxibutil)amina (Nakanishi <i>et al.</i> , 1978)	ratas	vejiga urinaria	0.1 % (w/v) en agua tomada	No hay efecto	
N-Nitroso-N-butil(4- hidroxibutil)amina (Nakanishi <i>et al.</i> , 1980)	ratas	vejiga urinaria	0.1 % en agua tomada	No hay efecto	
N-Nitroso-N-butil(4- hidroxibutil)amina (Kunze <i>et al.</i> , 1987)	ratas	vejiga urinaria	110 mg/kg. por día en agua tomada	No hay efecto	
7,12-dimetilbenz(a)- antraceno (Welsch <i>et al.</i> , 1988a)	ratón	glándula mamaria	250 o 500 mg/l en agua tomada	No hay efecto en la incidencia o en el tiempo de aparición del tumor ;se incrementa el número de tumores por ratón en la dosis alta	
7,12-Dimetilbenz(a)-antraceno (Minton <i>et al.</i> , 1983)	ratas	glándula mamaria	10 mg/kg. en agua tomada	Decrece en latencia e incrementa el número de tumores por animal. La cafeína sola incrementa la latencia	Análisis basado solo en animales que desarrollan tumores; diferentes supervivencia entre grupos
7,12-Dimetilbenz(a)- antraceno (Welsch <i>et al.</i> , 1983)	ratas	glándula mamaria	250-500 mg/l en agua tomada	No afecta en incidencia, el número de tumores por animal o latencia cuando se da antes o con el carcinógeno; incremento en la incidencia de tumores cuando se da después del carcinógeno	

III. JUSTIFICACIÓN

Se ha reportado que la cafeína es rápidamente metabolizada *in vitro* (0.5 a 3h) por diferentes tipos celulares como los fibroblastos normales, células de HeLa y fibroblastos de xeroderma pigmentoso. Sin embargo otros autores sugieren que los linfocitos humanos no son capaces de metabolizar este compuesto, resultados que llevan a pensar que la cafeína se mantiene como tal e interactúa con las células durante el periodo de cultivo. Además tomando en cuenta que la cafeína tiene la capacidad de potenciar el daño al ADN, inducido por diferentes agentes ya sean físicos (radiación) o químicos y considerando los estudios realizados en el laboratorio de citogenética y mutagénesis de la FES-Zaragoza en los cuales se encontró que en cultivos de linfocitos humanos tratados con pentóxido de vanadio no muestran daño las células, mientras que al ser tratados con cafeína y pentóxido de vanadio hubo un incremento en la frecuencia de ICH's y una alteración de la cinética de división celular, lo cual pudo ser debido a que la cafeína interfiere en los mecanismos de reparación del ADN y a la expresión de las lesiones inducidas por el vanadio, durante un periodo determinado de tiempo, lo cual permite suponer una inactivación o metabolismo de la misma en los cultivos.

Con base en los antecedentes señalados y tomando en cuenta que los reportes relacionados con la metabolización de la cafeína *in vitro* no son concluyentes, en el presente trabajo se pretende elucidar el comportamiento metabólico de la cafeína en un sistema *in vitro* como es el cultivo de linfocitos humanos.

IV. HIPÓTESIS:

En ciertos tipos celulares *in vitro* como fibroblastos se ha visto que la cafeína es rápidamente metabolizada (0.5 a 3h), mientras que en cultivos de linfocitos se ha podido observar que pierde actividad con el tiempo, por tanto si linfocitos humanos en cultivo son tratados con cafeína a diferentes tiempos, esta pérdida de actividad puede ser debida a que estas células son capaces de biotransformar esta purina.

V. OBJETIVOS

1. OBJETIVO GENERAL:

Establecer la posible biotransformación *in vitro* de la cafeína en linfocitos humanos mediante la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

2. OBJETIVOS PARTICULARES:

a) Estandarizar la técnica de HPLC para el análisis de la posible biotransformación de la cafeína en linfocitos humanos, *in vitro* (tratados con cafeína 10 mg/10 ml).

b) Identificar los posibles metabolitos de la cafeína en linfocitos humanos *in vitro* por la técnica de HPLC.

VI. MATERIAL Y MÉTODO

1. REACTIVOS:

Cafeína (1,3,7-trimethylxantine) (Sigma-Chemical), Teobromina (3,7-methylxantina), (Sigma-Chemical), Teofilina (1,3-dimetilxantine), (Sigma-Chemical) Paraxantina (1,7-Dimethylxantina) (Sigma-Chemical), acetonitrilo grado HPLC (Sigma-Aldrich), tetrahidrofurano grado HPLC (Sigma-Aldrich) y fosfato de potasio (Sigma-Chemical). El agua Milli Q deshionizada (Waters).

2. SOLUCIONES ESTÁNDAR DE XANTINAS :

Se prepararon soluciones estándar de cada una de las xantinas con fase móvil con una concentración de 10 mg/10 ml de grado HPLC.

3. FASE MÓVIL :

Se preparó un buffer de fosfato de potasio de la siguiente manera: 94% de una solución 10 mM de KH_2PO_4 a pH de 4.8, con agua grado HPLC, se ajustó el pH y se filtró tres veces con filtros de 0.45 y 0.22 μm respectivamente. En seguida se degasificó con una corriente de helio durante 10-15 minutos sin vacío; posteriormente se degaseo con vacío, primero en la parrilla de agitación con temperatura (por 10 minutos) y después en el baño de ultrasonido (aproximadamente 10 minutos o hasta que desaparecieran las burbujas). Finalmente se adicionó el acetonitrilo (4%) y el tetrahidrofurano (2%).

4. CULTIVOS:

A partir de donadores sanos, se extrajeron por punción venosa 5 ml de sangre periférica, con una jeringa heparinizada. Posteriormente 0.5 ml de esta sangre se cultivó en 5 ml de medio de McCoy (GIBCO BRL) con 1.25 ml de fitohemaglutinina (Sigma-USA), aplicando el tratamiento a las 0, 24 y 48h a 37°C en la obscuridad y cosechando a las 2, 26 y 50h de iniciados los cultivos.

5. TRATAMIENTOS:

Se dividieron en tres grupos y en todos los casos se realizaron dos experimentos y cada uno por duplicado (ver figura 3).

Grupo A: A todos los tubos se les adicionó cafeína (10mg/10ml) a las cero horas de iniciados los cultivos y las cosechas serán a las 2 y 72h

Grupo B: En este caso se adicionó cafeína (10mg/10ml) a las 24h de iniciada la siembra y la cosecha se realizó a las 26 y 72h de iniciados los cultivos.

Grupo C: La cafeína (10 mg/10ml) se agregó a las 48h de iniciados los cultivos, y la cosecha se realizó a las 50 y 72h de iniciados los cultivos.

6. PREPARACIÓN DE ESTÁNDARES:

Los estándares utilizados fueron: Cafeína, Teobromina, Teofilina y Paraxantina. Las concentraciones utilizadas fueron de 10 mg/10 ml de grado HPLC. Se filtraron con membranas de 0.22 μm . Se tomaran 100 μl de cada uno y se llevaron a 1 ml con 900 μl de fase móvil, respectivamente. De esta forma estuvieron listos para ser inyectados al cromatografo. Primeramente se inyectaron uno por uno y luego se realizó una mezcla de todos para obtener el tiempo de retención (TR), de cada uno y de la mezcla.

7. COSECHA Y TRATAMIENTO DE LA MUESTRA PARA SOMETERLA A HPLC:

A las 2 y 72 horas se realizó la cosecha de cada uno de los grupos antes mencionados. Los tubos se sonicarán durante 30 segundos aproximadamente. Posteriormente se centrifugaron a 14,000 r.p.m. durante 10 minutos, se desechó el botón y se trabajó con el sobrenadante. Se tomó una alícuota de 1.5 ml se filtró tres veces (la primera con un filtro de 0.45 μm y las otras dos con un filtro de 0.22 μm) y seguidamente se realizó una dilución 1:9 con fase móvil para finalmente inyectarla al HPLC.

8. CONDICIONES DEL HPLC:

El HPLC se utilizó a temperatura ambiente, con una longitud de onda de 254 nm UV y un flujo de 1500 p.s.i. y 0.2 a.u.f.s. (se utilizó la bomba isocrática). El sistema de registro fue automatizado y se pudo tener la impresión de los cronogramas, con una velocidad de flujo de 2.0 ml/min.

9. EVALUACION :

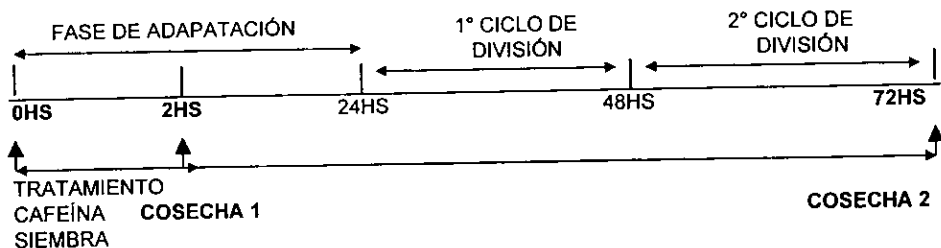
Para el análisis de la concentración de los metabolitos (C.M), se utilizó la siguiente fórmula:

$$C.M. = \frac{\text{Lectura del área de la muestra problema}}{\text{Lectura del área de la muestra estándar}} \times \frac{\text{Peso del estándar}}{\text{Dilución del estándar}} \times \frac{\text{Dilución a la que se llevo el estándar}}{\text{Dilución de la muestra problema}} \times \frac{\text{Peso de la muestra problema}}{\text{Peso de la muestra problema}}$$

FIGURA 3.- TRATAMIENTOS CON CAFEÍNA

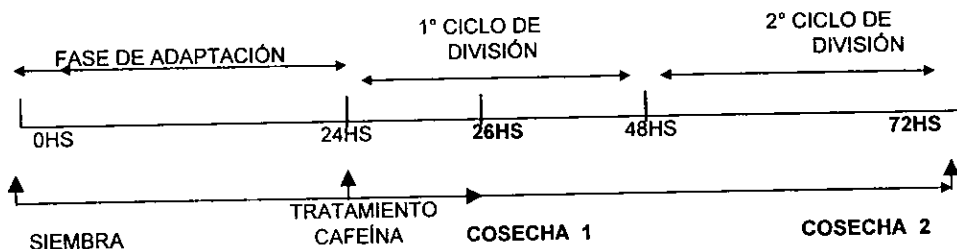
TRATAMIENTO 1:

(A) CAFEÍNA CERO HORAS



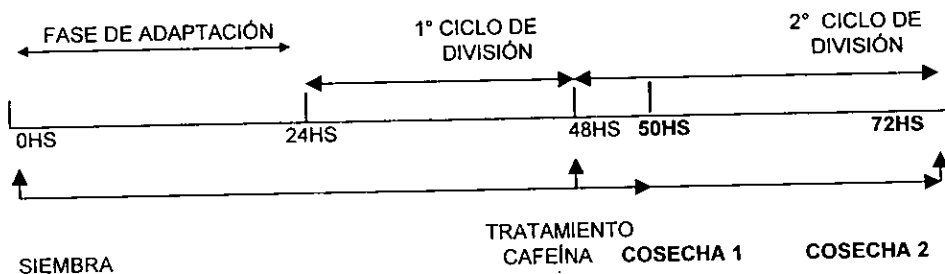
TRATAMIENTO 2:

(B) CAFEÍNA 24 HORAS



TRATAMIENTO 3:

(C) CAFEÍNA 48 HRS



VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Del análisis de los cromatogramas (Figuras 4 a la 12), se obtuvieron los tiempos de retención y se presentan en la tabla 2 (se realizó una media por tratamiento). Como se puede observar en el tratamiento con cafeína (10 mg/10 ml) a las cero horas de iniciados los cultivos y cuya cosecha se realizó a las 2 horas (figura 3), se encontraron metabolitos como la teobromina con un tiempo de retención (Tr) de 1.11, la teofilina Tr=1.59 y la presencia de la cafeína con un Tr = 2.0. En el mismo tratamiento pero con cosecha a las 72h registramos un tiempo de retención de 1.20 el cual equivale al metabolito conocido como teobromina. En el tratamiento que se realizó con cafeína a las 24h y cosechado a las 26h se registraron los tiempos de retención correspondientes a teobromina 1.17, teofilina 1.58 y cafeína 2.10. Cuando la cosecha de este mismo tratamiento se efectuó a las 72h encontramos únicamente el metabolito teobromina con tiempo de retención de 1.16. En el tratamiento en el que se le agregó cafeína a las 48 horas se encontró un metabolito teofilina (Tr =1.58) y cafeína (Tr = 2.01). Así mismo cuando se cosecho a las 72h encontramos los metabolitos teobromina (Tr = 1.20), teofilina (Tr = 1.57), y nuevamente a la cafeína Tr = 2.09.

TABLA 2 .-DETERMINACIÓN DE LOS TIEMPOS DE RETENCIÓN DE LA CAFEÍNA Y SUS METABOLITOS EN LINFOCITOS HUMANOS *IN VITRO* MEDIANTE HPLC

	TR (min/abs)	TIEMPO DE COSECHA 2h			TIEMPO DE COSECHA 72h		
		CAFEÍNA (h)			CAFEÍNA (h)		
		2	26	50	72	46	22
TESTIGO	2.65	2.65	2.65	2.65	2.65	2.65	
ESTÁNDARES TR (min/abs)		TRATAMIENTOS TR (min/abs)					
TEOBROMINA	1.11	1.11	1.17	0.0	1.20	1.16	1.20
TEOFILINA	1.50	1.59	1.58	1.58	0.0	0.0	1.57
CAFEÍNA	2.01	2.0	2.10	2.01	0.0	0.0	2.09

TR = TIEMPO DE RETENCIÓN
ABS = ABSORBANCIA

FIGURA 4.-CROMATOGRAMAS DE LOS ESTÁNDARES DE LOS METABOLITOS DE CAFEÍNA

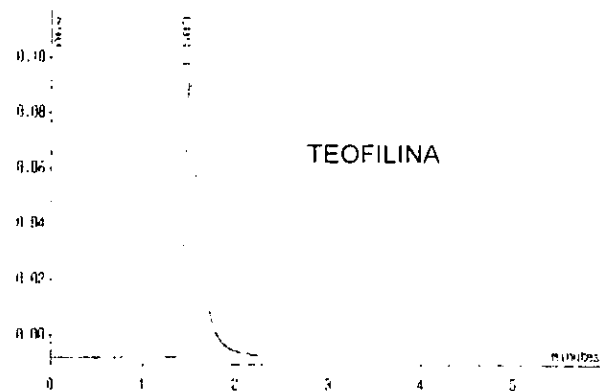
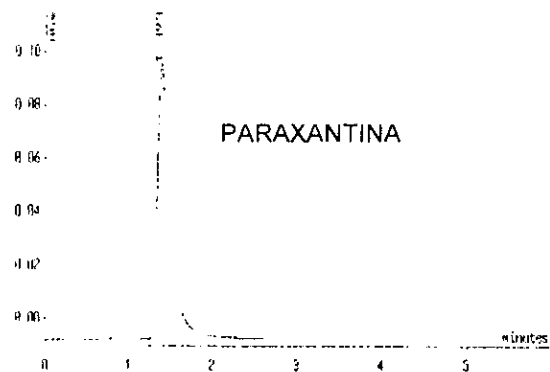
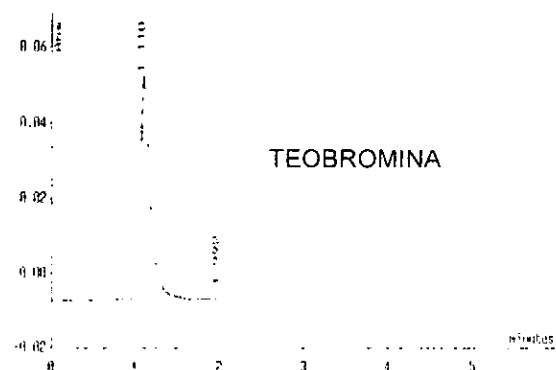
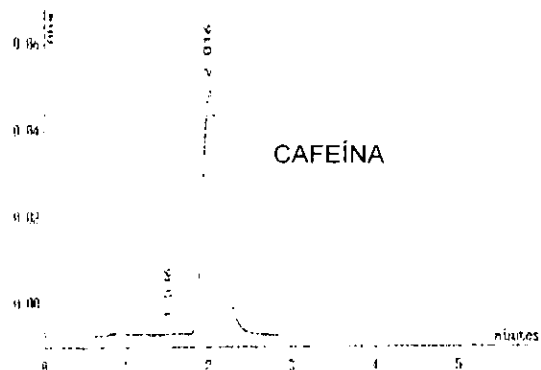


FIGURA 5.- CROMATOGRAMAS DE LA MEZCLA DE ESTÁNDARES

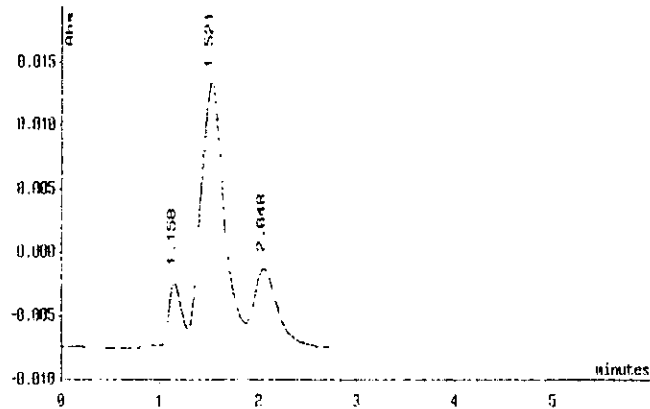
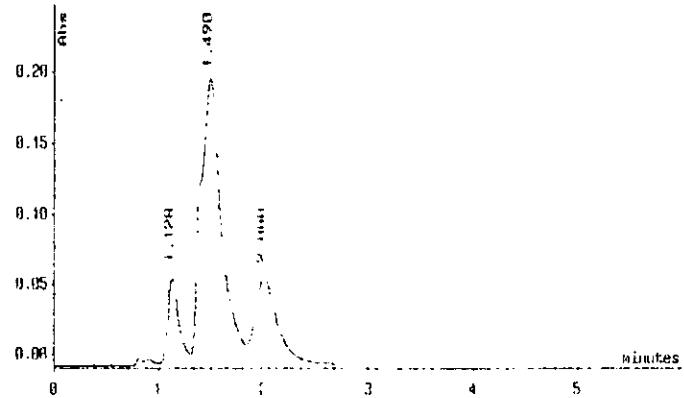
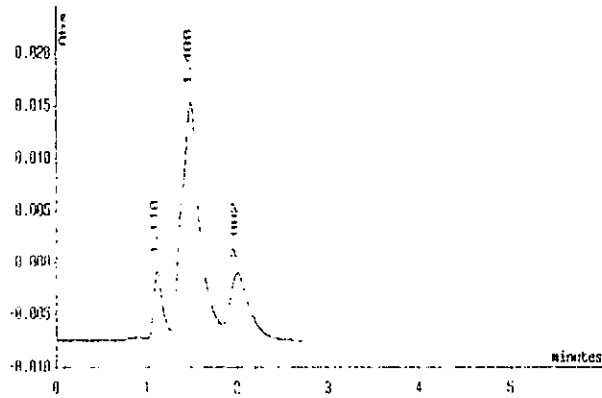


FIGURA 6.- CROMATOGRAMA DE TESTIGO ABSOLUTO (BLANCO)

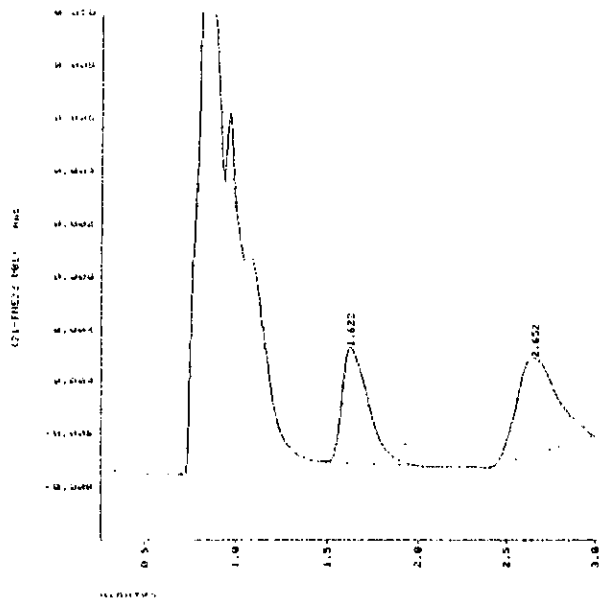


FIGURA 7.- CROMATOGRAMAS DE CAFÉINA 0h Y COSECHA A LAS 2h

30

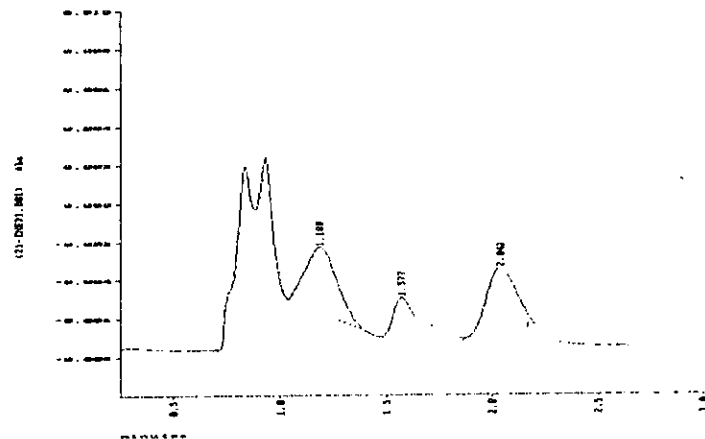
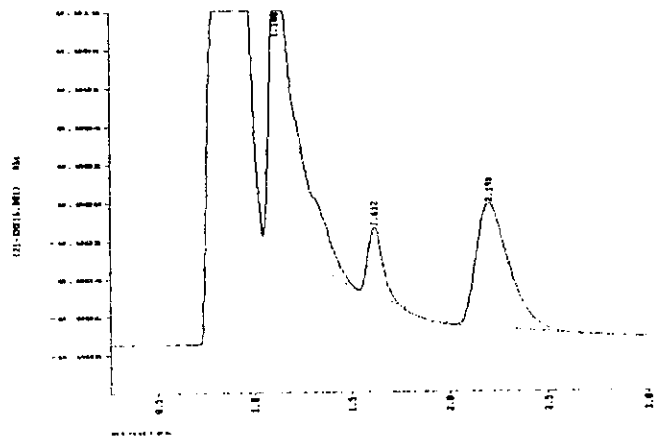


FIGURA 8.- CROMATOGRAMAS DE CAFEÍNA 0h Y COSECHA A LAS 72h

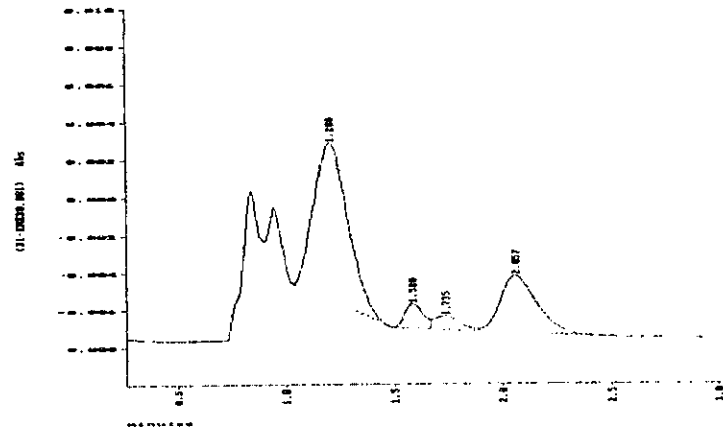
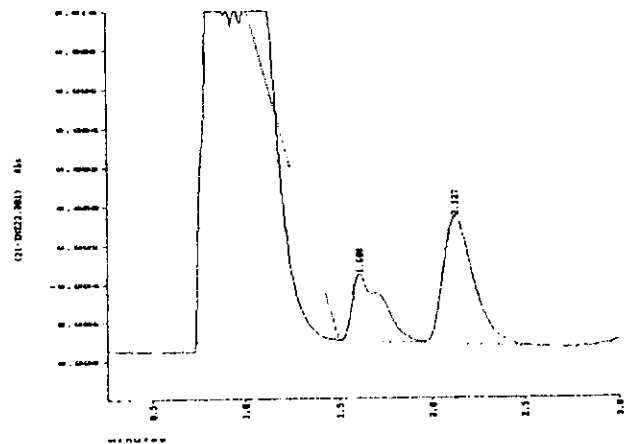


FIGURA 9.- CROMATOGRAMAS DE CAFEÍNA 24h Y COSECHA A LAS 26h

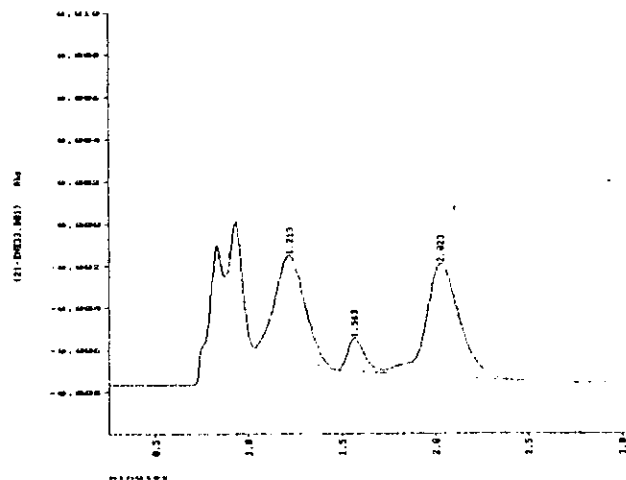
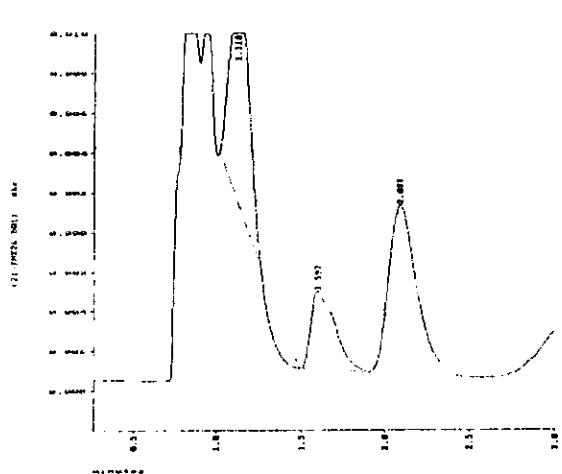


FIGURA 10.- CROMATOGRAMAS DE CAFEÍNA 24h Y COSECHA A LAS 72h

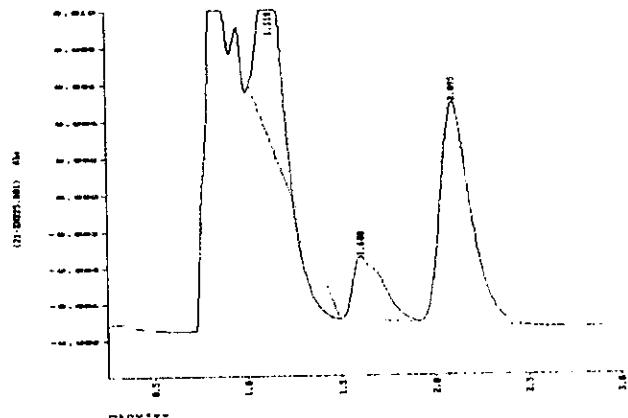
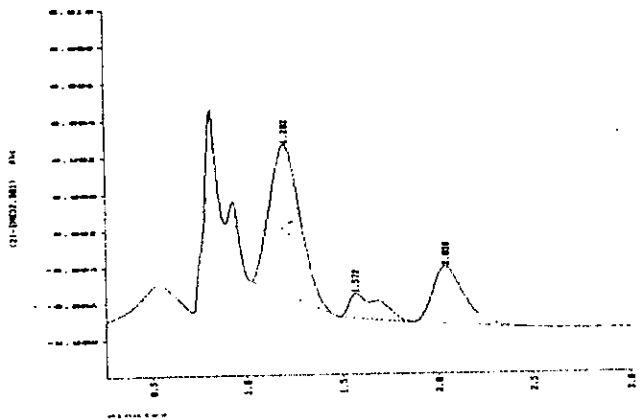


FIGURA 11.- CROMATOGRAMAS DE CAFEÍNA 48h Y COSECHA 50h

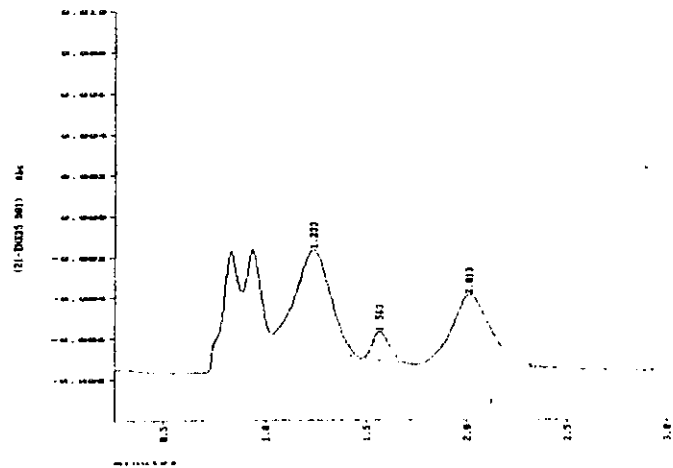
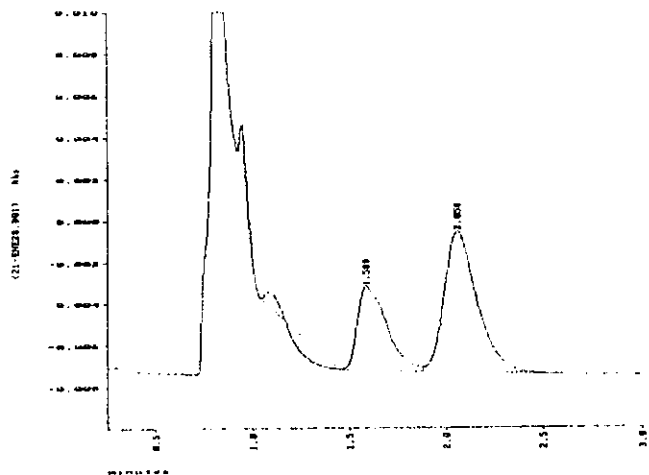
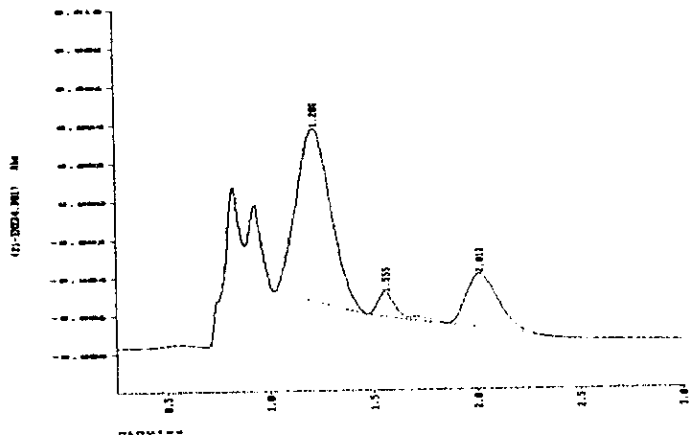
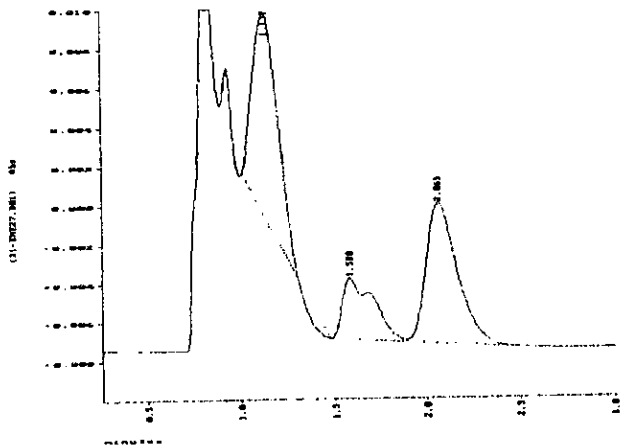
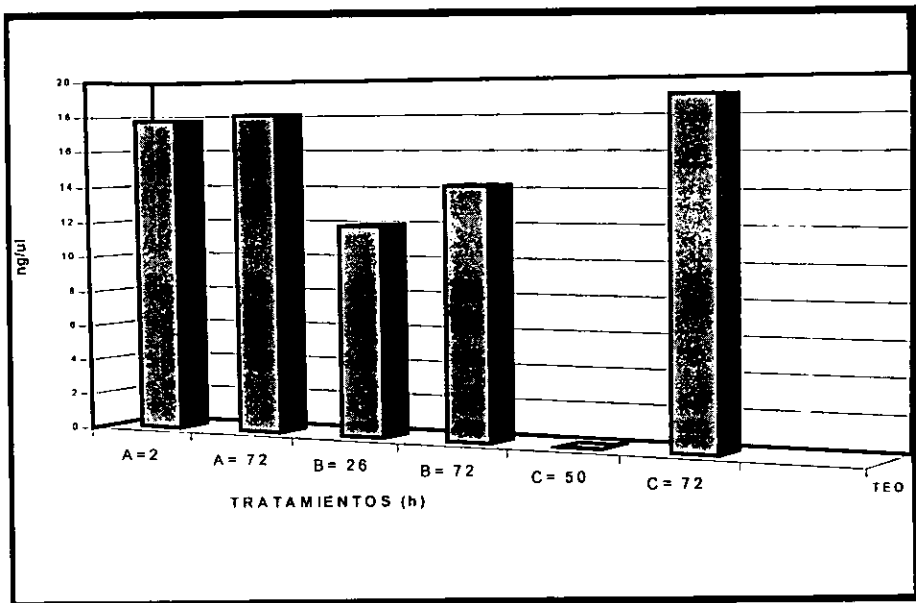


FIGURA 12.- CROMATOGRAMAS DE CAFEÍNA 48h Y COSECHA A LAS 72h



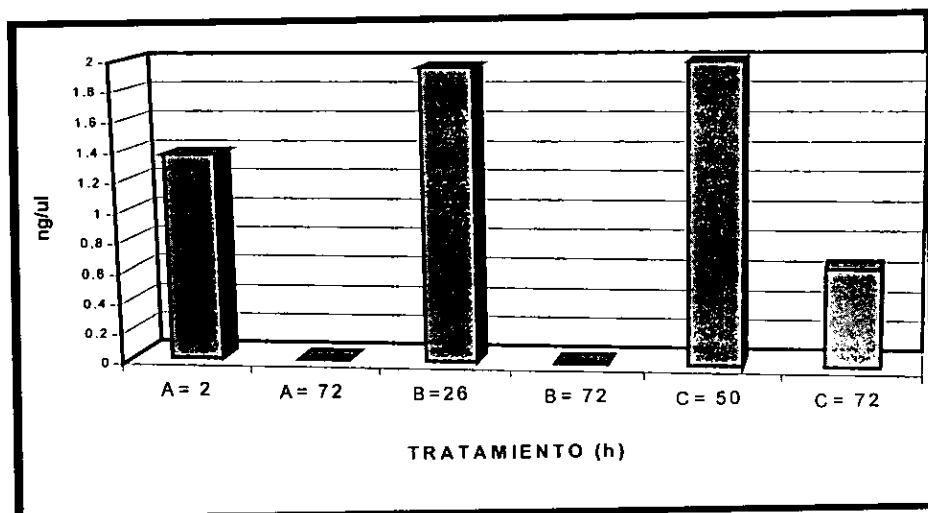
En las figuras 13, 14 15 y 16 se presentan los resultados en relación a las concentraciones ($\eta\text{g}/\mu\text{l}$) de los metabolitos que se registraron mediante el análisis de los cromatogramas, inicialmente mencionados. En la figura 13 se ve en el primer tratamiento (cafeína 0h y cosecha 2 y 72h) una concentración de teobromina de 17.76 $\eta\text{g}/\mu\text{l}$ (18%) muy semejante a la concentración que se encontró a las 72h de este mismo tratamiento (18.07 $\eta\text{g}/\mu\text{l}$) (18%) lo que indica que la concentración de teobromina se mantiene constante durante todo el cultivo. En el segundo tratamiento cafeína 24h cosecha 26h se registra una concentración de 11.88 $\eta\text{g}/\mu\text{l}$ (12%) y en la cosecha de 72h se encuentra una concentración de 14.19 $\eta\text{g}/\mu\text{l}$ (14%) observándose un ligero aumento. En el tercer tratamiento (cafeína 48h) no se registro teobromina en el primer tiempo de cosecha (50h) y en la cosecha 72h se tiene una concentración de 19.05 $\eta\text{g}/\mu\text{l}$ (19%).

FIGURA 13.- PRESENCIA DE TEOBROMINA EN EL METABOLISMO DE CAFEÍNA POR LINFOCITOS HUMANOS EN CULTIVO, TRATADOS A LAS 0h (A), 24h (B) Y 48h (C) DE LA SIEMBRA Y COSECHADOS A LAS 2 Y 72h DE CADA TRATAMIENTO



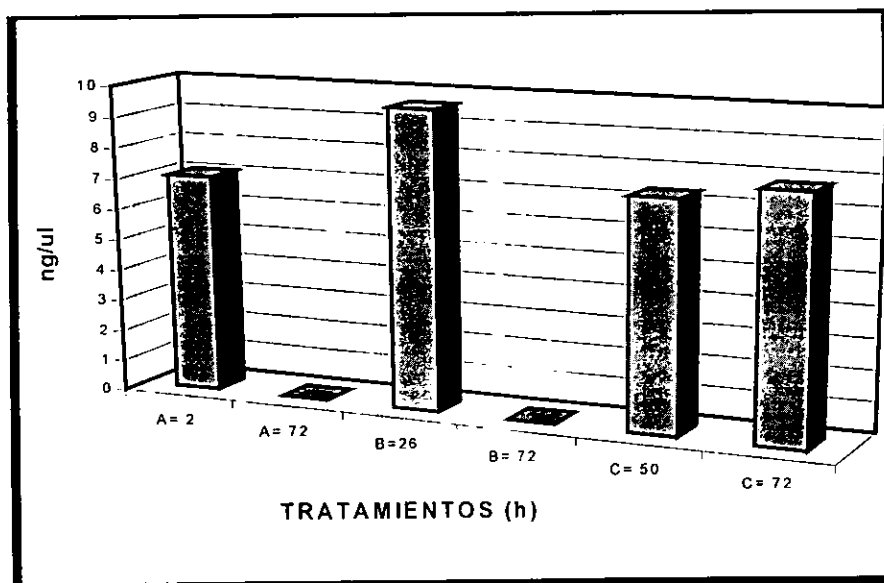
En la **figura 14** observamos la presencia de teofilina en el metabolismo de cafeína por linfocitos humanos en cultivo tratados a las 0, 24 y 48h y cosechados a las 2 y 72h. En el primer tratamiento cafeína 0h y cosecha a las 2h de iniciados los cultivos se registra una concentración de 1.37 $\eta\text{g}/\mu\text{l}$ (1%) y en el segundo tiempo de cosecha (72h) no se observa teofilina. En el segundo tratamiento 24h y cosecha a las 26h de iniciados los cultivos se registra, 1.94 $\eta\text{g}/\mu\text{l}$ (2%) de teofilina, en el mismo tratamiento y en la cosecha a las 72h no se registró. En el tercer tratamiento 48h y 50h de cosecha se observa una concentración de teofilina de 1.98 $\mu\text{ng}/\mu\text{l}$ (2%) la cosecha de 72h se registro una concentración de 0.649 $\eta\text{g}/\mu\text{l}$ (1%).

FIGURA 14.- PRESENCIA DE TEOFILINA EN EL METABOLISMO DE CAFEÍNA POR LINFOCITOS HUMANOS EN CULTIVO, TRATADOS A LAS 0h (A), 24h (B) Y 48h (C) DE LA SIEMBRA Y COSECHADOS A LAS 2 Y 72h DE CADA TRATAMIENTO



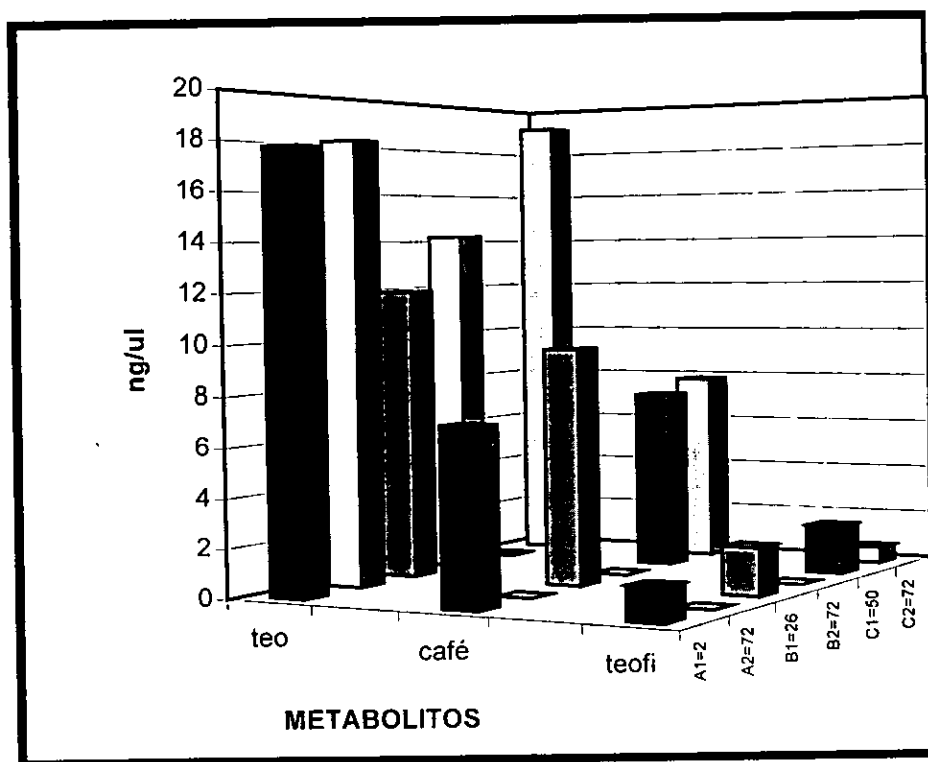
En la **figura 15** se observa la presencia de la cafeína en los cultivos de linfocitos humanos tratados a las 0, 24 y 48h y cosechados a las 2 y 72h. Como se puede ver en el primer tratamiento con cafeína (0h y cosecha 2h) se registra una concentración de 7.05 ng/μl (7%), en el mismo tratamiento en la cosecha a las 72h no aparece la cafeína. En el segundo tratamiento con cafeína 24h y cosecha 26h, se observa una concentración de 9.62 ng/μl (10%) y a las 72h no se detectó. En el tratamiento de cafeína a las 48h y cosecha a las 50h se observa una concentración de cafeína de 7.34 ng/μl (7%) y a las 72h de 7.81 ng/μl (8%).

FIGURA 15.- PRESENCIA DE CAFÉINA EN EL CULTIVO DE LINFOCITOS HUMANOS, TRATADOS A LAS 0h (A), 24h (B) Y 48h (C) DE LA SIEMBRA Y COSECHADOS A LAS 2 Y 72h DE CADA TRATAMIENTO



En la **figura 16** se observan los resultados generales del metabolismo de la cafeína por linfocitos humanos tratados a las 0, 24 y 48h y cosechados a las 2 y 72h de cada tratamiento, en donde podemos observar la presencia de la teobromina, teofilina y cafeína, en los tres tratamientos en las cosechas de tiempos cortos (2h), excepto que en la cosecha del tercer tratamiento en el cual no se registro la teobromina.

FIGURA 16.- METABOLISMO DE CAFEÍNA POR LINFOCITOS HUMANOS EN CULTIVO, TRATADOS A LAS 0h (A), 24h (B) Y 48h (C) DE LA SIEMBRA Y COSECHADOS A LAS 2 Y 72h DE CADA TRATAMIENTO



El primer paso en el metabolismo de la cafeína en el hombre es la N-dimetilación el cual ocurre en la posición 1, 3, o 7 para dar origen a la teobromina, a la paraxantina y a la teofilina respectivamente (Sueds y Wilson, 1977) y es llevado a cabo por lo menos por dos isoenzimas de la familia del citocromo P450IA. Butler en 1989 propone que la 3-dimetilación que da origen a la paraxantina es llevada a cabo por el citocromo P450IA2 y no por otro P450, mientras que Colbert y Back, en el 1995 proponen que este mismo citocromo (P450IA2) da origen a la teofilina en humanos.

La teobromina también es metabolizada por el CYP450IA pero no se sabe con exactitud cual citocromo es el que la metaboliza. La cafeína es eliminada en animales a través de la biotransformación por enzimas microsómicas del hígado a dimetilxantinas y ácidos mono metil urico, trimetil y dimetilación y derivados uracilos. El perfil metabólico cuantitativo de la cafeína en orina depende de la velocidad de formación, distribución en el cuerpo, concentración en el plasma y excreción renal. Los pasos metabólicos, muestran una múltiple y separada dimetilación, oxidación del C-8 y formación de uracilos en humanos y roedores. (Bergman y Diksteins, 1956).

Específicamente la biotransformación de la de la teofilina se realiza por el citocromo P450IA2 para llevar a cabo la N- dimetilación a 1-metilxantina y por la 8-hidroxilación a 1,3 - ácido dimetilurico. La máxima concentración de teofilina se encuentra en las dos primeras horas, coincidiendo con nuestros resultados que muestran que este metabolito apareció desde las primeras cosechas (2, 26, 50 y 72h).

Se sabe que la teobromina también es metabolizada por el CYP450IA para dar origen a la 7-metilxantina y al 3,7 ácido dimetilurico. En la **figura 13** se observa en el primer tratamiento una mayor concentración de este metabolito que el de la teofilina y el de la cafeína, coincidiendo con Werner y col. (1991) en el cual propone que el 12% de la cafeína total es dimetilado a teobromina y el 3.7% se transforma en teofilina. Posiblemente la teobromina sea el metabolito más estable y con una vida media mayor ya que en este tratamiento en los dos tiempos de cosecha (2 y 72h) se registro una concentración muy semejante (17.76 $\eta\text{g}/\mu\text{l}$ y 18 $\eta\text{g}/\mu\text{l}$) (18% para las dos) mientras que la teofilina y la cafeína solo se registraron en el primer tiempo de cosecha.

posiblemente porque para las 72h estos compuestos se metabolizaron en otros productos que no se registraron.

Cuando se detectaron los metabolitos en los tiempos de cosecha largos (72, 48 y 24h), Observamos que la teobromina aparece en todos y la teofilina y la cafeína solo aparecieron en la cosecha de 24h. Probablemente esto se deba a que ya hubo un ciclo de adaptación celular y uno de replicación existiendo un mayor número de células que están metabolizando la cafeína las cuales necesitan de energía para sus funciones vitales y posiblemente el CYP4501A necesite activarse para poder llevar a cabo el metabolismo de la teobromina por lo que no se registra en el tiempo corto del tercer tratamiento. En cambio para la teofilina el CYP4501A2 que es el que la metaboliza puede estar activo y biotransformarla obteniendo indicios de este metabolito inmediatamente, registrando una concentración de 1.98 $\eta\text{g}/\mu\text{l}$ (2%) a las 50h y de 0.064 $\eta\text{g}/\mu\text{l}$ (1%) a las 72h. La teofilina es un metabolito que se encuentra en una concentración máxima a las dos primeras horas y que tiene una vida media de 7h *in vivo*, por lo que se detectó en todos los tratamientos y cosechas en tiempos cortos, mientras que en los tiempos de cosecha largos no se observa, debido posiblemente a que ya se había transformado en otros compuestos como la 1-metilxantina, el 1,3 ácido dimetilurico o el 1-acido metilurico los cuales no se evaluaron.

Para la cafeína se obtuvo a las 50h una concentración de 7.34 $\eta\text{g}/\mu\text{l}$ que corresponde al 7.0% de la concentración inicial, y a las 72h 7.81 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (8.0%), comprobando que desde las primeras 2h la cafeína es metabolizada. Sin embargo dicho porcentaje se mantiene en vez de aumentar, esto se debe posiblemente a que la teofilina es el único metabolito que puede sufrir una reacción reversible y formar nuevamente cafeína, como sucede *in vivo* (Tang-Liu y Riegelman, 1981). Se sabe que la teofilina es metabolizada *in vivo* por el CYP1A2, éste se encuentra principalmente (90%) en hepatocitos y en un 2% en las células extra-hepáticas razón por la cual se encontró en bajas concentraciones en el sistema de linfocitos en cultivo, comparada con las concentraciones de teobromina, apareciendo en todos los tiempos cortos de cosecha. Posiblemente esta sea también la razón del porque se registro más teobromina, ya que el CYP1A, que es el que se encarga de su metabolismo, es principalmente extra-hepático a diferencia del CYP1A2.

En general no se observa la aparición de la paraxantina en los cromatogramas, esto debido a que se sabe que la concentración más alta se registra en las primeras 8 a 10 horas de administración (Tang, 1983) por lo que posiblemente con nuestras horas de cosecha no logramos registrarla ya sea porque tenemos tiempos muy cortos de cosecha (2h) o muy largos (72h) y no se sabe exactamente a que tiempo empieza aparecer. Así mismo se sabe que la teofilina y la paraxantina se traslapan cuando se utiliza para su identificación por medio de HPLC con fase reversa (Farrish y Wargin, 1980), eso también podría estar sucediendo en este caso.

Por otro lado se sabe que hay otros tipos celulares como los fibroblastos normales, fibroblastos de Lesch-Nylian, fibroblastos de xeroderma pigmentoso, células de HeLa, células silvestres de ratón y células de ratón deficientes de fosforiltransferasa, en las cuales se lleva a cabo la biotransformación de la paraxantina la cual se transforma rápidamente en otros subproductos o metabolitos secundarios como AFMU (5-acetil amino-6-formilamino-3-metiluracil) transformándolo en AAMU (5-acetilamino-4-amino-3-metiluracilo). Esto se debe a que *in vivo* la enzima P-4501A2 encargada de la biotransformación (83.9% de la dimetilación en la posición 3 de la cafeína) se localiza principalmente en los hepatocitos del hígado (Werner y Bing-Kou Tang, 1991).

Debido a que se trabajo con muestras de sangre completa es necesario señalar que los eritrocitos y plaquetas presentan citocromos que no tienen que ver con la transformación de la cafeína por lo cual consideramos que la transformación de esta realmente la están llevando a cabo los linfocitos, debido a que los monocitos y macrófagos no expresan los citocromos P4501A2 que es la principal enzima que se encargan de la biotransformación de la cafeína (Raucy y Ingelman-Sundberg, 1999).

Se sabe que la cafeína tiene una estructura química similar a las purinas que constituyen al ADN y por lo tanto tiene la capacidad de interferir con la división y el metabolismo celular (Aldeer, 1970) existiendo la evidencia de interacción de esta con la doble hebra del ADN (Richardson *et al.*, 1981, Tornaletti *et al.*, 1989) intercalándose primeramente con regiones de una sola hebra, uniéndose preferentemente a las regiones ricas en A y T (Kihlman, 1977). Forma complejos con el ADN aislado y

polinucleotidos sintéticos (Tse y Le, 1960). La cafeína inhibe enzimas requeridas para la síntesis de ADN causando un aumento en la condensación de la cromatina e incrementando la duración de la fase G₁.

En estudios anteriores se ha demostrado que la cafeína produce una gran variedad de respuestas celulares, se asocia al ADN por intercambio entre las bases adyacentes e interfiere con las uniones específicas de las enzimas reparadoras del daño genético, lo cual inhibe la reparación del ADN así como la división y el metabolismo celular y amplifica los efectos mutagenicos y letales de agentes genotóxicos que dañan al ADN. En otro estudio similar Roldán y colaboradores (1997) reportaron en cultivo de linfocitos humanos tratados con pentóxido de vanadio y cafeína, el papel de ésta última en la expresión de lesiones inductoras de ICH's producidas por el vanadio, donde el daño inducido por el vanadio no puede ser evidenciado por si solo, sin embargo al inhibir los mecanismos de reparación por parte de la cafeína se pone de manifiesto su efecto, como un incremento en los ICH's. En otros estudios *in vivo* e *in vitro* indican que la teobromina y posiblemente la teofilina (dos metabolitos de la cafeína) inducen rompimientos cromosómicos e intercambio de cromatidas hermanas (Renner, 1982; Tarka 1982; Renner y Munzer, 1982).

De la misma forma se ha reportado que las metilxantinas, dentro de las que se encuentra la cafeína, inducen daño a los linfocitos humanos *in vitro*, donde la teobromina y teofilina son menos clastogenas (Lee, 1971; Ostertag, 1966; Weinstein *et al.*, 1972, Zhurko, 1971). Por otro lado en cultivo de linfocitos humanos de 72h, la teofilina y paraxantina disminuye el índice mitótico (IM) en concentraciones de 250 µg/ml induce anomalías cromosómicas (Weinstein *et al.*, 1972). A la concentración de 750 µg/ml todas las dimetilxantinas producen anomalías cromosómicas, siendo más clastogena la cafeína, seguida por la teobromina, la teofilina y finalmente la paraxantina.

Los resultados muestran una transformación del 92% de cafeína lo cual es muy semejante a lo que ocurre *in vivo*. El hecho de que *in vitro* no tengamos la misma concentración de citocromos que *in vivo* requiere una mayor investigación en este punto para reforzar este resultado.

En base a los datos obtenidos y a todos los antecedentes ya mencionados y discutidos se concluye que la cafeína es metabolizada en teobromina y teofilina por los linfocitos humanos en cultivo, y que dicha metabolización se lleva a cabo en un tiempo aproximado de 2 horas. Pudiendo constatar que los linfocitos que no son células especializadas en la metabolización de xenobióticos presentan citocromos que les permiten tener una mayor actividad metabólica en relación a la cafeína.

VIII. CONCLUSIONES

- ❖ Los resultados de HPLC permiten establecer que los linfocitos humanos en cultivo son capaces de metabolizar a la cafeína.
- ❖ El metabolismo de la cafeína fue principalmente a teobromina y a teofilina.
- ❖ La paraxantina no se detectó en nuestros estudios posiblemente porque los tiempos de cosecha son o muy cortos (2h) o muy largos (72h) o porque se enmascara el pico con la teofilina.
- ❖ La Teobromina se detectó en todos los tratamientos excepto en el de 48h (cosecha 50h), teniendo concentraciones que no variaron drásticamente, lo cual indica que es un metabolito estable.

IX. BIBLIOGRAFÍA:

- Adler, I.-D.** (1970) The problems of caffeine mutagenicity. En: Vogel, F y Rohrborn, G., eds, *Chemical Mutagenesis in Mammal and Man*, Berlin, Springer, pp. 383-403.
- Aitken, R.J., Richardson, D.W., Schats, R. y Simm, G.** (1983) Influence of caffeine on movement characteristics, fertilizing capacity and ability to penetrate cervical mucus of human spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.*, 67: 19-27.
- Aldridge, A., Parson, W.D., Neims, A.H.** (1979) Stimulation of caffeine metabolism in the rat by 3-methylcholanthrene. *Life Sci.* 21:967-74.
- Aldridge, A., Baikey, J. y Neims, A.H.** (1981) The disposition of caffeine during and after pregnancy. *Semin. Perinatol.*, 5: 310-314.
- Anderson, K.E., Conney, A.H. y Kappas, A.** (1982) Nutritional influences on chemical biotransformations in humans. *Nutr. Rev.*, 40: 161-171.
- Aranda, J.V., Collinge, J.M., Zinman, R., y Watters, G.** (1979) Maturatoin of caffeine elimination in infancy. *Arch Dis Child* 54: 946-949.
- Aranda, J.V., Beharry, K., Rex, J., Johannes, R.J. y Charest-Boule, L.** (1987) Caffeine enzyme immunoassay in neonatal and pediatric drug monitoring. *Ther. Drug Monit.*, 9: 97-103.
- Arnaud, M.J.** (1976) Identifacation, Kinetic and quantitative study of [2-¹⁴C] and [1-Me¹⁴C] caffeine metabolites in rat's urine by chromatographic separations. *Biochem. Med.*, 16: 67-76.
- Arnaud, M.J. y Welsh, C.** (1979) Metabolic pathway of theobromine in the rat and identification of two new metabolites in human urine. *J. Agric food Chem*; 27: 524-527.
- Arnaud, M.J. y Welsch, C.** (1980) Caffeine Metabolism in human subjects. En: *9e Colloque scientifique international sur le café*. London, 1980, Association Scientifique Internationale du Café, pp.385-396.
- Arnaud, M.J. y Welsch, C.** (1982) Theophylline and metabolism in man. En: Rietbrock, N., Woodcock, B.G. y Staib, A.H., *Theophylline and Other Methylxanthines*, Braunschweig, Wiesbaden, Friedr. Vieweg and Sohn, pp. 135-148.
- Arnaud, M. J.** (1984) Products of metabolism of caffeine. En: Dews, P. B. *Caffeine. Perspectives from Recent Research*, Berlin, Ed. Springer, pp. 3-38.
- Arnaud, M. J.** (1985) Comparative metabolic disposition of [1-Me¹⁴C] caffeine in rats, mice and chinese hamsters. *Drug Metab Dispos* 13: 471-478.

- Arnaud, M.J.** y Getaz, F. (1986) Effect of pregnancy on [1,3,7-Me¹⁴C] Caffeine breath test in the rat. *Acta pharmacol. toxicol.*, Suppl. 5, Abstract 859.
- Arnaud, M.J.**, Ben-Zvi, Z., Yaari, A. y Gorodischer, R. (1986a) 1,3,8-Trimethylallantoin: A major caffeine metabolite formed by rat liver. *Res. Commun. chem. Pathol. Pharmacol.*, 52: 407-410.
- Arnaud, M. J.**, Richli, U. y Philipposian, G. (1986b) Isolation and identification of paraxanthine (Px) gluconide as the major caffeine metabolite in mice (Abstract). *Experientia*, 42: 696.
- Arnaud, M. J.** (1987) The pharmacology of caffeine. *Progr. Drug Res.*, 31: 273-313.
- Arnaud, M.J.**, Bracco, I. y Getaz, F. (1989) Synthesis of ring labelled caffeine and the study of metabolic and pharmacokinetics. Mouse interstrain differences in relation to pharmacologic and toxic effects. En: Baillie, T.A. y Jones, J. R., *Synthesis and Applications of Isotopically Labelled Compounds*, Amsterdam, Elsevier, pp. 645-648.
- Arnaud, M.J.**, y Enslin, M. (1992) The role of paraxanthine in mediating physiological effects of caffeine. 14 Intern conf in coffee science San Francisco, 14-19, proceedings Asic paris 71-79.
- Ashton, C.H.** (1987) Caffeine and health. *Br. med. J.*, 295: 1293-1294.
- Axelrod, J.**, Reichental, J. (1953) The fate of caffeine in man and a method for its estimation in biological material. *J Pharmac Exp Ther* 107:519-23.
- Balogh, A.**, Irmisch, E. Klinger, G., Splinter, F.K., y Hoffman, A. (1987) Untersuchungen zur Elimination von Caffein und Metamazol im Menstruationszyklus der fertilen Frau. *Zent bl. Gynäkol*; 109: 1135-1142.
- Beach, C.A.**, Bianchine, J.R. y Gerber, N. (1982) The excretion of caffeine in the semen of men: comparison of the concentrations in blood and semen. *Proc. West. Pharmacol. Soc.*, 25: 377-380.
- Bergmann, F.** y Dikstein, S. (1956) Studies on uric acid and related compounds. III. Observations on the specificity of mammalian xanthine oxidases. *J. biol. Chem.*, 223: 765-780.
- Berthou, F.**, Ratanasavanh, D., Riche, C., Picart, D., Voirin, T. y Guillouzo, A. (1989) Comparison of caffeine metabolism by slices, microsomes and hepatocyte cultures from adult human liver. *Xenobiotica*, 19: 401-417.
- Blanchard, J.** y Sawers, S.J.A. (1983) Comparative pharmacokinetics of caffeine in young and elderly men. *J. Pharmacokin. Biopharm.*, 11: 109-126.

Blanchard, J. y Hochman, D. (1984) Effects of vitamin C on caffeine pharmacokinetics in young and aged guinea pigs. *Drug Nutrient Interactions* 2:243-255.

Blauch, J. L. y Tarka, S. M. (1983) HPLC determination of caffeine and theobromine in coffee, tea and instant hot cocoa mixes. *J. Food Sci.*, 48: 745-750.

Bonati, M., Latini, R., Galletti, E., Young, Tognoni, y Garattini, S. (1982) Caffeine disposition after oral doses. *Clin Pharmacol. Ther.*, 32: 98-106.

Bonati, M., Latini, R., Galletti, E., Young, J. F., Tognoni, G. y Garattini, S. (1982) Caffeine disposition after oral doses. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 32: 98-106.

Bonati, M., y Garattini, S. (1984) Interspecies comparison of caffeine disposition. En: Dews PB, de. *Caffeine*. Springer Verlag, Berlin: 48-56.

Bonati, M. Latini, R., Tognoni, G. Young, J.F., Garrattini, S. (1984) Interspecies Comparison of in vivo caffeine pharmacokinetics in man, monkey, rabbit, rat and mouse. *Drug Metabolism Reviews* 15:1355-1383.

Bowden, G. T., Hsu, I.C. y Harris, C.C. (1979) The effect of caffeine on cytotoxicity, mutagenesis, and sister-chromatid exchanges in Chinese hamster cell treated with dihydrodiol epoxide derivatives of benzo[a]pyrene. *Mutat. Res.*, 63: 361-370.

Bowman, W.C. y Rand, M.J. (1985) *Farmacologia: Bases Bioquimicas y Patologicas, Aplicaciones clinicas*, 2ª edicion, Editorial Interamericana Mexico D.F. pp. 400.

Brachtel, D., Richter, E. (1988) Effect of altered gastric emptying on caffeine absorption. *Z Gastroenterol* 26:245-51.

Bradbrook, Y. D., James, C. A., Morrison, P.J. y Rogers, H.J. (1979) Comparison of thin-layer and gas chromatographic assays for caffeine in plasma. *J. Chromatogr.*, 163:118-122.

Brazier, J.L., Ritter, J., Berland, M., Khenfer, D. y Faucon, G. (1983) Pharmacokinetics of caffeine during and after pregnancy. *Dev. Pharmacol. Ther.*, 6: 315-322.

Brown, C.R., Jacob, P., Wilson, M. y Benowitz, N.L. (1988) Changes in rate and pattern of caffeine metabolism after cigarette abstinence. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 43: 488-491.

Brogger, A. (1974) Caffeine-induced enhancement of chromosome damage in human lymphocytes treated with methyl methanesulfonate, mitomycin C and X rays. *Mutat. Res.*, 23: 353-360.

- Brusick, D., Myhr, B., Galloway, S., Rundell, J., Jagannath, D.R. y Tarka, S. (1986)** Mutation Research, 169:105-114
- Budavari, S., (1989)** The Merck Index, 11th edicion., Rahway, N.J, Merck y Co., pp. 248.
- Buhl, S.N. y Regan, J.D. (1974)** Effect of caffeine on postreplication repair in human cells. Biophys. J., 14: 519-527.
- Butler, M.A., Iwasaki, M., Guengerich, F.P. y Kadlubar, F.F. (1989)** Human cytochrome P-450PA (P-450IA2), the phenacetin O-deethylase, is primarily responsible for the hepatic 3-demethylation of caffeine and N-oxidation of carcinogenic arylamines. Proc. natl Acad. Sci USA, 86: 7696-7700.
- Cabello, C.D.(1988)** Efecto de sustancias de impregnación en la velocidad de liberación de cafeína en microsferas, Licenciatura UNAM. ENEP Zaragoza, México.
- Callahan, M. M., Robertson, R. S., Arnaud, Branfman, A.R., McComish, M.F. y Yesair, D.W. (1982)** Human metabolism of {1-methyl-14C}-and {2-14C} caffeine after oral administration. Drug Metab. Disposition, 10: 417-423.
- Callahan, M.M., Robertson, R. S., Branfman, A.R., McComish, M.F. y Yesair, D. W.** Comparison of caffeine metabolism in three nonsmoking populations after oral administration of radiolabeled caffeine. DrugMetab.Disposition, 11: 211-217.
- Campbell, M.E., Grant, D.M., Inaba, T., Kalow, W. (1987)** Biotransformation of caffeine, Paraxanthine, theophylline and theobromine by polycyclic aromatic hydrocarbon- inducible cytochrome(s)P-450 in human liver microsomes. Drug Metab Dispos 15: 237-249.
- Chetsanga, C.J., Rushlow, K. y Boyd, V. (1976)** Caffeine enhancement of digestion of DNA by nuclease S1. Mutat. Res., 34: 11-20.
- Christensen, H. D. y Whitsett, T. L. (1979)** Measurements of xanthines and theirmetabolites by means of high pressure liquid chromatography. Chromatogr. Sci., 10: 507-537.
- Christensen, H. D. y Isernhagen, R. (1981)** The application of the radial compression separation system for biological materials. En:Hawk G.L., de., *Biological/Biomedical Applications of Liquid Chromatography*, Vol.3, New York, Marcel Dekker, pp. 71-93.
- Christensen, H. D. y Neims, A. H. (1984)** Measurement of caffeine and its metabolites. En: Dews, P.B., de., *Caffeine. Perspectives from recent research*, Berlin, Springer, pp.39-47.

- Christensen, H. D., Manio, C. V., Kling, O. R.** (1981) Caffeine Kinetics during late pregnancy. En: Soyka LF and Redmond GP, eds Drug metabolism of the immature human. New York: Raven Press; 163-81.
- Chvasta, T. E. y Cooke, A. R.** (1971) Emptying and absorption of caffeine from the human stomach. *Gastroenterology*, 61: 838-843.
- Colbert, J. y Back, D.J.** (1996) Theophylline Metabolism in Human Liver Microsomes: inhibition studies. *The journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 276: 912-917.
- Cook, C. E., Tallent, C. R., Amerson, E. W., Myers, M.W., Kepler, J.A., Taylor, G.F. y Christensen, H.D.** (1976) Caffeine in plasma and saliva by a radioimmunoassay procedure. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 199: 679-686.
- Craig, W. J. y Nguyen, T. T.** (1984) Caffeine and theobromine levels in cocoa and carob products. *J. Food Sci.*, 49: 302-305.
- Demas, T., Statland, B. E.** (1977) Prolonged half-life of serum caffeine in patients with hepatic insufficiency (ABSTRACT No. 203). *Clin. Chem.*, 23: 1156.
- De Vries, J. W., Johnson, K. D. y Heroff, J.C.** (1981) HPLC determination of caffeine and theobromine content of various natural and dutched cocoas. *J. Food Sci.*, 46: 1968-1969.
- Dorrbecker, S. H., Raye, J. R., Dorrbecker, B. R. y Kramer, P. A.** (1988) Caffeine disposition in the pregnant rabbit. Y. Pharmacokinetics following administration by intravenous bolus and continuous zero-order infusion. *Dev. Pharmacol. Ther.*, 11: 109-117.
- Evans, D. A. P. y White, T.A.** (1964) Human acetylation polymorphism. *J. Lab. clin. Med.*, 63: 394-403.
- Farrish, H.H., Wargin, W.A.** (1980) Separation and quantitation of theophylline and paraxanthine by reversed-phase liquid chromatography, *Clin Chem* 26: 524-525.
- Feely, J., Kelleher, P. y Odumosu, A.** (1987) The effects of ageing on aminopyrine and caffeine breath tests in the rat. *Fundam Clin Pharmacol* 32: 596-599.
- Ferren, W. P. y Shane, N. A.** (1968) Differential spectrometric determination of in soluble coffee and in drug combinations. *J Assoc. off. anal. Chem.*, 51: 573-577.
- Fincke, A** (1963) The occurrence of caffeine and theobromine in chocolate fats (Ger.). *fet. Serf. Antrichmitt.*, 65: 647-650.
- Foerander, T., Birkett, D. J., Miners, J. O. Y Wining, L. M. H.** (1980) The simultaneous determination of theophylline, Theobromine and caffeine in plasma by high performance liquid chromatography. *Clin. Biochem.*, 13: 132-134.

- Gennaro, A. R.**, (1985) Remington's Pharmaceutical Sciences, 17 edition., Easton, PA, Mack Publishing, pp. 1133-1135.
- George, J., Murphy, T., Roberts, R., Cooksley, W. G., Halliday, J. W. Powell, L.W.** (1986) Influence of alcohol and caffeine consumption on elimination. *Clin. exp. Pharmacol. Physiol.*, 13: 731-736.
- Grab, F. L. y Reinstein, J. A.** (1968) Determination of caffeine in plasma by gas chromatography. *J. pharm. Sci.*, 57: 1703-1706.
- Grant, D. M., Tang, B. K. y Kalow, W.** (1983a) Variability in caffeine metabolism. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 33: 591-602.
- Grant, D. M., Tang, B. K. y Kalow, W.** (1983b) Polymorphic N-acetylation of a caffeine metabolite, *Clin. Pharmacol. Ther.*, 33: 355-359.
- Grant, D. M., Tang, B. k., Campbell, M.E. y Kalow, W.** (1986) Effect of allopurinol on caffeine disposition in man. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 21: 454-458.
- Grant, D. M., Campbell, M. E. y Tang, B. K.** (1987) Biotransformation of caffeine by micromes from human liver. Kinetics and inhibition studies. *Biochem Pharm* 36:1251-1260.
- Griffiths, R. R. y Woodson, P. P.** (1988) Caffeine physical dependence: a review of human and laboratory animal studies. *Psychopharmacology*, 94: 437-451.
- Grygiel, J. J., Wing, I. M.H., Farkas, J. y Birkett, D. J.** (1979) Effects of allopurinol on theophylline metabolism and clearance. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 26: 660-667.
- Hamed, M.R., Saad, F.S. y Younan, G. M.** (1994) Influence of caffeine on susceptibility to acetylsalicylic and teratogenicity in rats. *Med. Sci Res.* 22: 557-560.
- Haughey, D.B., Geenberg, R., Schaal, S.F. y Lima, J.J.** (1982) Liquid chromatographic determination of caffeine in biological fluids. *J. Chromatogr.*, 229: 387-395.
- Haynes, R. H. y Collins, J. D. B.** (1984) The mutagenic potential of caffeine. En: Dews, P.B., ed., *Caffeine Perspectives From Research, Berlin*, Springer, pp. 221-238.
- Homonnai, Z.T., Paz, G., Sofer, A., Kraicer, P.F. y Harell, A.** (1976) Effect of caffeine on the motility, viability, oxygen consumption and glycolytic rate of ejaculated human normokinetic and hypokinetic spermatozoa. *Int. J Fertil.*, 21: 163-170.

- Horwitz, W.** (1980a) Coffe and tea, spectrophotometric and chromatographic methods. En: *Official Methods of Analysis of The Association of Official Analytical Chemists*, 13 th. Washington DC, Association of the Official Analytical Chemists, pp 234.
- Horwitz, W.** (1980b) Coffe and tea, GLC method. In: *Official Methods of Analysis of Association of Official Analytical Chemists*, 13th ed., Washington DC, Association of the Official Analytical chemists, pp 234.
- Hurst, W.J., Martin, R.A. y Tarka, S.M.** (1984) Analytical methods for quantitation of methylxanthines. En: Spiller, G. A., ed., *The Methylxanthine Beverages and Foods: Chemistry, Consumption and Health Effects*, New York, Alan R. Liss, pp. 17-28.
- Jalal, M.A.F. y Collin, H.A.** (1976) Estimation of caffeine, theophylline and theobromine in plant material. *New Phytol.*, 76: 277-281.
- Joeres, R., Klinker, H. y Heusler, H.** (1987) Factors influencing the caffeine test for cytochrome P448-dependent liver funtion, *Hepatology*, 60:93-94.
- Joeres, R., Kinker, H., Heusler, H., Epping, J., Zilly, W. y Richter, E.** (1988) Influence of smoking on caffeine elimination in healthy volunteers and in patients whith alcoholic liver cirrhosis. *Hepatology*, 8: 575-579.
- Johnson, A.R.** (1967) Collaborative study of a method for the determination of caffeine in nonalcoholic beverages. *J.Assoc. off. anal. Chem.*, 50: 857-858.
- Kapke, G.F. y Franklin, R.B.** (1987) A direct liquid chromatography method for serum caffeine analysis. *J. liquid chromatogr.*, 10: 451-463.
- Kihlman, B.A. Sturelid, S., Palitti, F. y Becchetti, A.** (1977) Effect of caffeine an inhibitor of post-replication repair in mammalian cell, on the frequencias of chomosomal aberrations and sister chomatid exchanges induced by mutagenic agents, *Mutat. Rest.*, 46: 13.
- Kilbane, A.J, Silbart, L.K, Beitins, I.Z, Weber, W.W** (1990) Human N-acetylation genotype determination with urinary caffeine metabolites. *Clin. Pharmacol Ther*, 47: 470-477.
- Kimmel, C.A., Kimmel, G.L., White, C.G., Grafton, T.F., Young, J.F., Nelson, C.J.** (1984) Blood flow changes and conceptual development in pregnat rats in response to caffeine. *Fundand. Appl. Toxicol.*, pp. 4: 240-247.
- Klassen, R. y Stavric, B.** (1983) HPLC separation of theophylline, paraxanthine, theobromine, caffeine and other metabolites in biological fluids. *liquid Chomatogr.*, pp 6: 895-906.
- Koch, A. L. y Lamont, W.A.** (1956) The metabolism of methylpurines by *Escherichia coli*. II Enzymatic studies. *J. biol. Chem.*, pp 219: 189-210.

Kreiser, W.R. y Martin, R.A.(1978) High pressure liquid chromatographic determination of theobromine and caffeine in cocoa and chocolate products. *J. Assoc. off. anal Chem.*, 61: 1424-1427.

Kuhlmann, W., Fromme, H. G., Heege, E.M. y Ostertag, W. (1968) The mutagenic action of caffeine in higher organisms. *Cancer Res.*, pp. 28: 2375-2389.

Lachance, M.P. (1982) The pharmacology and toxicology of caffeine. *J. Food Saf.*, 4: 71-112.

Lachance, M.P., Marlowe, C. Waddel, W.J. (1983) Autoradiographic disposition of (1-methyl-¹⁴C) and (2-¹⁴C) Caffeine in mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 71:237-241.

Latini, R., Bonati, M., Marzi, E., Tacconi, M.T, Sadurska, B., Bizzi, A.(1980) Caffeine Disposition and effects in young and one-year old rats. *J. Pharmm Pharmacol* 32: 596-599.

Latini, R., Bonati, M., Marzi, E. y Garattini, S. (1981) Urinary excretion of an uracilic metabolite from caffeine by rat, monkey and man. *Toxicology*, 7:267-272.

Lee, S. (1971) Chromosome aberrations induced in cultive human cell by caffeine. *Japan J. Genet* 46: 337-344.

Lelo, A., Miners, J.O., y Birkett, D. J. (1989) Assessment of caffeine exposure: caffeine content of beverages, caffeine intake, and plasma concentration of methylxantines. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 39: 54-59.

Leonard, T. K., Watson, R. R. y Mohs, M. E. (1987) The effects of on various body systems: a review. *J. Am. diet. Assoc.*, 87: 1048-1053.

Levine, J. (1962) Determination of caffeine in coffee products, beverages and tablets. *J. Assoc. off. anal. Chem.*, 45: 254-255.

Macrae, R.(1985) Nitrogenous components. En: Clarke, R. Y. y Macrae, R., eds, *Coffee*, vol. 1, Chemistry, London, Elsevier Applied Science, pp. 115-152.

Madison, B.L.,Kozarek, W.J. y Damo, C.P. (1976) High-pressure liquid chromatography of caffeine in coffee. *J. Assoc. off. anal. Chem.*, 59: 1258-1261.

Maikel,R., Snodgrass, W. (1973) Physicochemical factors in maternal-fetal distribution of drugs *Toxic Appl Pharmacol* 26:218-230.

Mayanna, S.M. y Jayaram. B. (1981) Determination of caffeine using sodium N-chloro-p-toluenesulfonamide. *Analyst*, 106: 729-732.

Mc Elvoy, G. K. (1989) American Health Formulary Service (AHFS) Drug Information, Bethesda, MD, American Society of Hospital Pharmacists, pp. 1179-1181.

Meatherall, R. y Ford, D. (1988) Isocratic liquid chromatographic determination of theophylline, acetaminophen, chloramphenicol, caffeine, anticonvulsants, and barbiturates in serum. *Ther. Drug Monit.*, 101-115.

Merck, S. (1989) The Merck Index, Merck & Co. Inc., Ninth Edition, Rahway N.J. USA.

Merriman, R.L., Swanson, A., Anders, M.W. y Sladek, N.E. (1978) Micro-determination of caffeine in blood by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr.*, 146: 85-90.

Mitchell, M.C., Hoyumpa, A.M., Schenker, S., Johnson, R.F., Nichols, S. y Patwardhan, R.V. (1983) Inhibition of caffeine elimination by short-term ethanol administration. *J. Lab. clin. Med.*, 101: 826-834.

Moffat, A.C. (1986) Clarke's isolation and identification of drugs, 2nd ed., London, The Pharmaceutical Press, pp. 420-422.

Moore, R.G. y Campbell, H.A. (1948) Determination of theobromine and caffeine in cocoa materials. *Anal. Chem.*, 20: 40-47.

Muir, K.T., Kunitani, M. y Riegelman, S. (1982) Improved high-performance liquid chromatographic assay for theophylline in plasma and saliva in the presence of caffeine and its metabolites and comparison with three other assays. *J. Chromatogr.*, 231: 73-82.

Nagel, R.A., Dirix, L.Y., Hayllar, K.M., Preisig, R., Tredger, J.M., Williams, R. (1990) Use of quantitative liver function tests-caffeine clearance and galactose elimination capacity-after orthotopic liver transplantation. *J. Hepatol.* 10:149-157.

O'Connell, S.E. y Zurzola, F.J. (1984) Rapid quantitative liquid chromatographic determination of caffeine levels in plasma after oral dosing. *J. Pharm. Sci.*, 73: 1009-1011.

Ostertag, W. (1966) Koffein and theophyllin mutagenese bei zell und Leucozytenkulturen des Menschen, *Mutation Res.*, 3: 249-267.

Papadoyannis, I.N. y Caddy, B. (1987) Application of high-performance liquid chromatography for the simultaneous determination of morphine, codeine and caffeine. *Microchem. J.*, 36: 182-191.

Parsons, W.D. y Pelletier, J.G. (1982) Delayed elimination of caffeine by women in the last 2 weeks of pregnancy. *Can. med. Assoc. J.*, 127: 377-380.

- Patwardhan, R.V., Desmond, P.V., Jhonson, R.F. y Schenker, S. (1980)** Impaired Elimination of caffeine by oral contraceptive steroids. *J Lab. clin. Med.*, 95: 603-608.
- Pearlman, S.A, Duran, C., Wood, M.A., Maisels, M.J. y Belin, C.M. (1989)** Caffeine Pharmacokinetics in preterm infants older than 2 weeks. *Dev. Pharmacol Ther* 12: 65-69.
- Rall, T.W. (1985)** The methylxanthines. En: Gilman, A.G., Goodman, L.S., Rall, T.W. y Murad, F., eds, *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 7th ed., New York, MacMillan, pp. 589-603.
- Ratanasavanh, D. Berthou, F., Mondine, P., Guillouzo, A. y Riche, G. (1990)** Methylcholanthrene but not phenobarbital enhances caffeine and theophylline metabolism in cultured adult human hepatocytes. *Biochem Pharmacol*, 39:85-94.
- Raucy, J.L., Ingelman-Sundberg, M., Carpenter, S. Rannug, A, Rane, A. Franklin, M. y Romkes, M. (1999)** Drug Metabolizing Enzymes in Lymphocytes, *J Biochem Molecular Toxicology*. 13: 223-226.
- Reid, S.J. y Good, T.J. (1982)** Use of chromatographic mode sequencing for sample preparation in the analysis of caffeine and theobromine from beverages. *J. Agric. Food Chem.*, 30: 775-778.
- Renner, H.W. (1982)** Sister chromatid exchanges induced by methylxanthines contained in coffee, tea and cocoa. *Experientia*, 38:600.
- Renner, H.W. y Munzer, R. (1982)** Genotoxicity of cocoa examined by microbial and mammalian systems. *Mutation Res.*, 103: 275-281.
- Richardson, C.L., Grant, A.D. y Schulman, G.E. (1981)** The interaction of caffeine and other xanthine analogs with DNA as measured by competitive fluorescence polarization (Abstract No. AC-5). *Environ. Mutagenesis*, 3: 343.
- Riechert, M. (1978)** Micromethod for the determination of caffeine and theophylline allowing direct application of biological fluids to thin-layer chromatography plates. *J. Chromatogr.*, 146: 175-180.
- Robertson, D., Frölich, J.C., R.K., Watson, J.T., Hollifield, J.W., Sand, D.G. y Oates, J.A. (1978)** Effects of caffeine on plasma renin activity, catecholamines and blood pressure. *New engl. J. Med.*, 298: 181-186.
- Robertson, D., Wade, E., Workman, R., Woosley, R.L. y Oates J.A. (1981)** Tolerance to the humoral and hemodynamic effects of caffeine in man. *J. Clin. Invest.*, 67: 111 - 1117.
- Roldán, R.E., Aguilar, M.C., Frias, V.S. y Altamirano, L.M. (1997)** Induction of sister chromatid exchanges in human lymphocytes by vanadium pentoxide in combination with caffeine. *Med. Sci. Res.* 25:501-504

- Roulland-Dussoix, D.** (1967) Degradation of ultraviolet-irradiated lambda bacteriophage DNA by the host cell (Fr.). *Mutat. Res.*, 4: 241-252.
- Routh, J.I., Shange, N.A., Arredondo, E.G. y Paul, W.D.** (1969) Determination of caffeine in serum and urine. *Clin. Chem.*, 15:661-668.
- Sandlie, Y., Solberg, K. y Kleppe, K.** (1980) The effect of caffeine on cell growth and metabolism of thymidine in *Escherichia coli*. *Mutat. Res.*, 73: 29-41.
- Selby, P. y Sancar, A.** (1990) Molecular mechanisms of DNA repair inhibition by caffeine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87: 3522-3525.
- Senanayake, U.M. y Wijesekera, R.O.B.** (1968) A rapid micro-method for the separation, identification and estimation of the purine bases: caffeine, theobromine and theophylline. *J. Chromatogr.*, 32: 75-86.
- Senanayake, U.M. y Wijesekera, R.O.B.** (1971) Theobromine and caffeine content of the cocoa bean during its growth. *J. Sci. Food Agric.*, 22: 262-263.
- Sesardic D, Boobis A.R, Murray B.P.** (1990) Furafylline is a potent and selective inhibitor of cytochrome P-450IA2 in man *Br. J. Clin Pharmacol*; 29: 651-663.
- Sleigh, M.J. y Grigg, G.W.** (1974) Induction of local denaturation in DNA *in vitro* by phleomycin and caffeine. *FEBS Lett.*, 39: 35-38.
- Solberg, K.A., Ovrebo, S., Kleppe, R.K. y Kleppe, K.** (1978) Effect of caffeine on DNA polymerase γ from *Escherichia coli*. Studies *in vitro* and *in vivo*. *Mutat. Res.*, 51: 1-10.
- Somorin, O.** (1973) Spectrophotometric determination of caffeine in Nigerian Kola nuts. *J. Food Sci.*, 38: 911-912.
- Somorin, O.** (1974) Caffeine distribution in *C. acuminata*, *T. cacao* and *C. arabica*. *J. Food Sci.*, 39: 1055-1056. **Stavric, B.** (1988) Methylxanthines: Toxicity to Humans. 2. Caffeine. *Food chem. Toxicol.*, 26: 645-662.
- Stavric, B. y Klassen, R.** (1984) Automated high-performance liquid chromatographic assay for monitoring caffeine and its metabolites in biological fluids of monkeys consuming caffeine. *J. Chromatogr.*, 310: 107-118.
- Sved, S. y Wilson, D.L.** (1977) Simultaneous assay of the methylxanthine metabolites of caffeine in plasma by high performance liquid chromatography. *Res. Commun. chem. Pathol. Pharmacol.*, 17: 319-331.
- Tanaka, H., Nakazawa, K., Arima, M., Iwasaki, S.** (1984) Caffeine and its dimethylxanthines in fetal cerebral development in ret. *Brain Dev.* 6:355-361.

- Tang, B.K., Grant, D.M. y Kalow, W. (1983)** Isolation and identification of 5-acetyl-amino 6-formyl-amino-3-methyluracil as a major metabolite caffeine in man. *Drug Metab. Dispos.*, 11: 218-220.
- Tang-Liu, D.D.S. y Riegelman, S. (1981)** Metabolism of theophylline to caffeine in adults. *Res. commun in chemical Pathol and Pharmacol* 34: 371-380.
- Tarka, S. M. (1982)** The toxicology of cocoa and dimethylxanthines: a review of the literature. *CRC Cri. Rev. Toxicol.*, 9:275-312.
- Tarrús, E., Cam, J., Roberts, D. J., Spickett, R. G. W., Ceñdran, E. y Segura, J. (1987)** Accumulation of caffeine in healthy volunteers treated with furatyllone. *Br. J. Clin. Pharmacol*; 23: 9-18.
- Timbie, D. J., Sechrist, L. y Keeney, P. G. (1978)** Application of high-pressure liquid chromatography to the study of variables affecting theobromine and caffeine concentrations in cocoa beans. *J. Food Sci.*, 43:560-565.
- Tin, A. A., Somani, S. M., Bada, H.S. y Khanna, N.N. (1979)** Caffeine, theophylline and theobromine determinations in serum, saliva and spinal fluid. *J. anal. Toxicol.*, 3:26-29.
- Tobias, D.Y. (1982)** Current Methods of Caffeine Determination: Review of the Literature, 1975-1980. *FDA By Lines*, 3:129-156.
- Tornaletti, S., Russo, P., Parodi, S. y Pedrini, A.M. (1989)** Studies on DNA binding of caffeine and derivatives: evidence of intercalation by DNA-unwinding experiments. *Biochem. biophys. Acta*, 1007:112-115.
- Traub, A.I., Earnshaw, J.C., Brannigan, P.D. y Thompson, W. (1982)** A critical assessment of the response to caffeine of human sperm motility. *Fertil. Steril.*, 37: 436-437.
- Ts'o, P.O. y Lu. P. (1964)** Interaction of nucleic acids and Physical binding of thymine, adenine, steroids, and aromatic hydrocarbons to nucleic acids. *Proc. natl Acad. Sci. USA*, 51: 17-24.
- Ts'o, P.O.P., Heimkamp, G.K. y Sander, C. (1962)** Interaction of nucleosides and related compounds with nucleic acids as indicated by the change of helix-coil transition temperature. *Proc. Natl Acad Sci USA*, 48:685-698.
- Van Thoff, W. (1979)** Caffeine in pregnancy. *Lancet*, 1:1020.
- Van der Meer, C. y Haas, R.E. (1980)** Determination of caffeine in serum by straight-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, 182: 121-124.

- Vistisen, K., Poulsen, H. E.** (1990) Cytochrome P450I activity in man measured by caffeine metabolism: effect of smoking, broccol and exercise In: witmer, et al. Eds Biological reactive intermediates W. New York: Plenum Press; 407-411.
- Vergnes, M. F. y Alary, J.** (1986) Determination of natural xanthines by HPLC (Fr.). *Talanta*, 33: 997-1000.
- Wahllander, A., Renner, E. y Karlaganis, G.** (1985) High-performance liquid chromatographic determination of demethylxanthine metabolites of caffeine in human plasma. *J. Chromatogr. (Biomed. Appl.)*, 338:369-375.
- Walton, H.F., Eiceman, G.A. y Otto, J.L.** (1979) Chromatography of xanthines on ion exchange resins. *J. Chromatogr.*, 180:145-156.
- Weinstein, D., Maver, M. L. y Kazmer, S.** (1972) The effect of caffeine on chromosome of human lymphocyte: *in vivo* and *in vitro* studies. *Mutation Res.*, 16:391-399.
- Welch, R. M., Hsu, S. Y. y De Angelis, R.L.** (1977) Effect of Aroclor 1254, phenobarbital, and polycyclic aromatic hydrocarbons on the plasma clearance of the rat. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 22:791-798.
- Werner Kalow, M.D. y Bing-Kou Tang, Ph.D.** (1991) Use of caffeine metabolite ratios to explore CYP1A2 and xanthine oxidase activities. *Clin Pharmacol Ther.* 50: 508-519
- Windholz, M.** (1983) *The Merck Index*, 10th edition, Rahway, pp. 225-226.
- Wragg, J. B., Carr, J. V. y Ross, V.C.** (1967) Inhibition of DNA polymerase activity by caffeine in a mammalian cell line (Abstract No. 305). *J. Cell Biol.*, 35: 146-147.
- Yesair, D.W., Branfman, A. R. y Callahan, M. M.** (1984) Human disposition and some biochemical aspects of methylxanthines. En: Spiller, G.A., de *The Methylxanthine Beverages and Foods: Chemistry, Consumption and Health Effects*, New York, Alan R. Liss, pp. 215-233.
- Yost, R.W., Etre, L.S. y Conlon, R. D.** (1981) Introducción a la Cromatografía Líquida Práctica Perquin - Elmer. México. 34 - 42, 173 - 183, 220 - 230.
- Zhurkov, V.S. y Suraykina, T.** (1971) Cytogenetic effect of caffeine in human lymphocyte cultures (In Russian) *Genetika*, 9: 161-163.
- Zoumas, B.L., Kreiser, W.R. y Martin, R.A.** (1980) Theobromine and content of chocolate products. *J. Food Sci.*, 45: 314-316.

Zysset, T., Wietholtz, H. (1991) Pharmacokinetics of caffeine in patients with Decompensated type I and type II diabetes mellitus. Eur J. Clin Pharmacol; 41: 449-452.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

X. APENDICE

CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN HPLC

La cromatografía es un método físico de separación en el cual los componentes a separar se distribuyen entre dos fases; una de ellas es un lecho estacionario, mientras la otra se mueve por percolación a través de este lecho. Los procesos cromatográficos tienen lugar como resultado de repetidas adsorciones y desorciones durante el movimiento de los componentes de la muestra a lo largo del lecho estacionario, alcanzándose la separación gracias a las diferencias en los coeficientes de distribución de los distintos componentes de la muestra.

Se utiliza "lecho estacionario" como término general para denominar cualquiera de las diferentes formas en que puede usarse la fase estacionaria que puede estar empaquetada en una columna, extendida en forma de capa, etc. La fase móvil puede ser gaseosa o líquida.

En la cromatografía gaseosa la fase móvil es un gas, mientras en la cromatografía líquida, es un líquido. La cromatografía líquida, puede desarrollarse en diferentes sistemas, en función de la forma física de la fase estacionaria. En la cromatografía en capa fina y cromatografía sobre papel dicha fase se extiende en forma de capa (cromatografía plana), mientras en la cromatografía en columna se empaqueta en una "columna" que es un tubo relativamente delgado.

Existen muchas maneras de clasificar la cromatografía líquida en columna. Basándose en la naturaleza de la fase estacionaria y en los procesos de separación.

- a) cromatografía de adsorción: La fase estacionaria es un adsorbente y la separación se basa en repetidas etapas de adsorción-desorción.
- b) cromatografía de partición: La separación no se basa en la adsorción, sino en una verdadera partición entre la fase móvil y la fase estacionaria.

- c) cromatografía de intercambio iónico: El lecho estacionario tiene una superficie cargada iónicamente, con carga contraria a la de la muestra. Esta técnica se usa casi exclusivamente con muestras iónicas o ionizables. Cuanto mayor sea la carga de la muestra, más fuertemente será atraída hacia la superficie iónica y, por tanto, más tiempo tardará en ser eluida. La fase móvil es un tampón acuoso, en el que el pH y la polaridad se utilizan para controlar el tiempo de elución.
- d) cromatografía de exclusión: Se rellena la columna con un material que posea poros de dimensiones comprendidas entre ciertos límites, con lo que la muestra es retenida o filtrada según sea su tamaño molecular. A esta técnica también se le llama Filtración sobre geles o cromatografía sobre geles.

En cuanto a los dos primeros tipos no siempre puede asegurarse cuál de los procesos implicados (adsorción o reparto) desempeña el papel más importante. Por esta razón, en la práctica se definen dos o más tipos, según sea la polaridad relativa de las dos fases: Cromatografía en fase normal y cromatografía en fase inversa.

En la cromatografía en fase normal el lecho estacionario es de naturaleza fuertemente polar (p.ej. sílice) y la fase móvil es apolar (p.ej. n-hexano o tetrahidrofurano). Las muestras polares quedan retenidas en la columna durante tiempos mayores que los materiales menos polares.

La cromatografía en fase inversa es exactamente a la inversa. El lecho estacionario es de naturaleza apolar (hidrocarburo), mientras la fase móvil es un líquido polar, normalmente agua o un alcohol. En este caso, cuanto más apolar sea la muestra mayor será su retención.

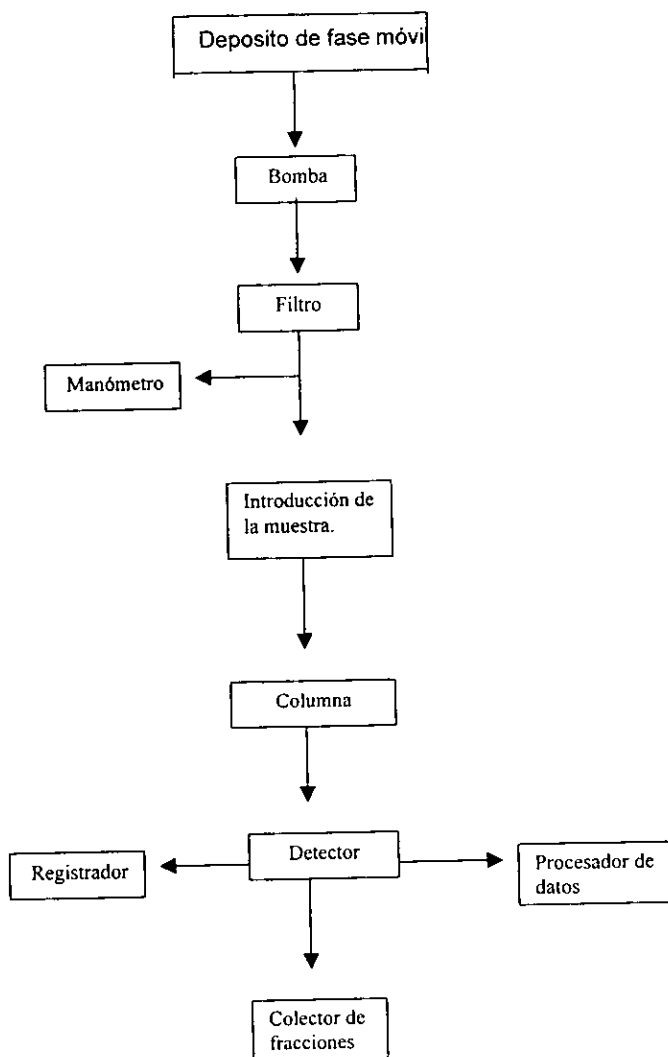
Algunas veces se puede modificar la fase móvil para ajustar su polaridad. En fase normal, puede hacerse por adición de una sustancia más polar, en tanto que en fase inversa el aditivo será una sustancia menos polar.

La moderna cromatografía líquida, comparada con la clásica, se caracteriza por tener: Columnas reutilizables de pequeño diámetro (2–5 mm), rellenos de columna de partículas muy pequeñas (5–50 μm), y desarrollo de nuevos materiales para usarlos como fases estacionarias, presiones de entrada relativamente altas y flujo controlado de la fase móvil, introducción precisa de la muestra, sin necesidad de grandes cantidades, detectores continuos especiales, capaces de operar a caudales muy bajos y de detectar cantidades muy pequeñas, instrumentos normalizados y automatizados, análisis rápidos, alta resolución.

El flujo controlado de la fase móvil se logra por medio de bombas de alta presión. El control del flujo se traduce en operaciones reproducibles, las cuales a su vez, proporcionan mejor precisión y exactitud. Los nuevos detectores además de proporcionar el cromatograma, pueden pasar información a un procesador de datos, por estas características se eligió inicialmente la presión como criterio principal de la moderna cromatografía líquida, denominándola cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC, high pressure liquid chromatography), sin embargo parece indicar que la mejora lograda en la eficacia no se debe primordialmente a la elevada presión, ya que esta no contribuye a mejorar la separación, ciertamente se necesita para alcanzar un caudal de fase móvil preestablecido, por lo que muchos cromatografistas experimentados denominan a esta técnica cromatografía líquida de alta eficiencia, lo cual aun permite el uso de las siglas HPLC.

Los componentes básicos del equipo general de cromatografía líquida son: una bomba para impulsar la fase móvil, un mecanismo para la introducción de la muestra, una columna que contenga la fase estacionaria y un detector para determinar la separación que tiene lugar y proporcionar datos que permiten una evaluación cualitativa y cuantitativa de los resultados. Esto se consigue con un registro del detector en forma de cromatograma (curva de respuesta con respecto al tiempo) o de un equipo de tratamiento de datos.

ESQUEMA GENERAL DE UN EQUIPO DE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA



Tomado de Vost *et al.*, 1981.

Las dos fases tienen influencia sobre la separación: la fase móvil y la fase estacionaria.

FASE MÓVIL

La fase móvil desempeña una parte activa en la cromatografía líquida. Es una de las diferencias más importantes entre la cromatografía líquida y la gaseosa, en la cual la fase móvil no tiene acción alguna en el proceso de separación. La selección de la fase móvil es una de las decisiones más importantes al establecer los parámetros de una separación en cromatografía líquida.

En cromatografía líquida se puede usar una única sustancia como fase móvil durante el análisis de una mezcla de dos o más sustancias, ajustando adecuadamente las características de esta. También es posible mantener constante la composición de la fase móvil durante el análisis, o bien cambiarla. El primer método se llama operación isocrática, mientras que el segundo se conoce como elución por gradiente. Cabe mencionar que en el presente trabajo se utilizó el primer método.

FASE ESTACIONARIA

La fase estacionaria puede ser un sólido poroso, difiere en su composición química, estructura y tamaño de partícula. Las partículas de soporte totalmente poroso son, en general de gel de sílice de gran superficie y se dispone de ellas en una gran variedad de tamaños de partícula. Los soportes peculiares están formando un núcleo sólido, generalmente bolas de vidrio, recubiertas por una fina capa porosa, normalmente de sílice. Estos soportes peculiares son de forma más regular, con lo cual las columnas pueden rellenarse fácilmente con dicho material y pueden trabajar a bajas presiones.

El tamaño de las partículas es muy importante ya que la fase móvil y la muestra disuelta no se difunden con facilidad, con lo cual las partículas del relleno han de ser tan pequeñas como sea posible en la práctica con el fin de aproximarse a la condición ideal, en la que muestra se pone en contacto con la máxima cantidad de superficie del relleno. Existe un límite inferior de tipo práctico, aproximadamente por debajo de unos 3 μm de diámetro, las partículas empiezan a empaquetarse de manera tan compacta

que el líquido no puede bombearse con facilidad a lo largo de la columna. La mayoría de las columnas tienen rellenos con partículas cuyo tamaño promedio es de 5–5 μm .

CONTROL DEL FLUJO DE LA FASE MÓVIL

Se utilizan varios tipos de bombas que se clasifican de acuerdo a con la función que regulan: la presión de entrada, o bien el flujo de la fase móvil. Las primeras proporcionan presión constante, mientras las segundas suministran un flujo constante durante la operación.

Cuanto más rápido sea el flujo, más rápido será el movimiento de la muestra a través del sistema, debido a que prácticamente no existe difusión de la muestra en el interior de la columna en general se utilizan caudales bajos, ya que la eficacia aumenta a medida que el flujo disminuye. Se utilizan presiones de entrada elevadas, a causa de la gran resistencia que ofrece la columna rellena con partículas muy pequeñas. Cuanto más compacto sea el relleno de la columna (y mas viscosa la fase móvil) mayor será la presión necesaria.

La presión aumenta linealmente con el flujo, lo cual resulta de gran importancia al cambiar el caudal. En cromatografía líquida la presión no resulta positiva para el sistema, sino más bien lo contrario, ya que a presiones elevadas se producen más fugas, la inyección resulta difícil y la eficacia disminuye al volverse más denso el líquido y reducirse las velocidades de transferencia de masa.

INTODUCCIÓN DE LA MUESTRA

La introducción de la muestra puede llevarse a cabo de diferentes maneras. El método más simple consiste en la inyección a través de un septum con la ayuda de una microjeringa. Esta introducción presenta problemas derivados fundamentalmente de la alta presión de la fase móvil, para lo cual se han incorporado mecanismos en los que la introducción de la muestra se lleva acabo con ayuda de válvulas de diversos tipos.

COLUMNAS

Las columnas mas comúnmente usadas tienen una longitud de 25 – 50 cm y están rellenas de partículas de diámetro muy pequeño (5 – 15 μm). El diámetro interno

de las columnas esta generalmente comprendido entre 2 y 5 mm, considerado como el óptimo compromiso entre capacidad de muestra, consumo de fase móvil velocidad y resolución.

TEMPERATURA DE LA COLUMNA

La columna puede usarse a temperatura ambiente o a temperatura superior. Aunque la temperatura puede usarse, para el control de la separación, para disminuir la viscosidad de la fase móvil y lograr así presiones menores y aumento de la transferencia de masa, para aumentar la solubilidad de la muestra en la fase enlazada y obtener así una mayor eficacia global del equipo, para aumentar la velocidad de migración en los sistemas de intercambio iónico y para aumentar la solubilidad de la muestra en la fase móvil cuando es muy baja lo que permite la introducción de una cantidad de muestra adecuada.

DETECTORES

Los detectores actuales de cromatografía líquida poseen un amplio intervalo operativo que normalmente permite trabajar en un mismo aparato a escala analítica o preparativa. Tienen una gran sensibilidad, lo que normalmente permite la detección de nanogramos de material. El principal concepto en el diseño de todos los detectores de cromatografía líquida es que deben efectuar su control sobre el propio flujo del instrumento. Es decir, casi siempre se utilizan con flujo continuo y la muestra siempre esta disuelta en el eluyente durante la detección. Normalmente, la muestra real solamente esta presente en el detector en una relación de 1:100 aunque en los análisis traza la relación puede llegar a 1:10000.

Actualmente en los equipos de cromatografía líquida se utilizan principalmente los detectores ópticos. En estos detectores se hace pasar la corriente líquida a través de una microcubeta de pequeño volumen (aproximadamente 10 μ l) donde la atraviesa un rayo de luz las variaciones en la intensidad de luz causadas por absorción UV, emisión de fluorescencia, o cambio en el índice de refracción (según el tipo de detector utilizado), que resultan de la interacción con los componentes de la muestra que pasan sucesivamente a través de la cubeta, se registran en forma de variaciones del voltaje de salida. Estas variaciones de voltaje se registran gráficamente en un registrador, se

suministran a un integrador o computadora que proporciona tiempos de retención y áreas de los picos.

El detector más utilizado en cromatografía líquida es el de absorción ultravioleta, es de longitud de onda variable, capaz de controlar desde 190 a 800 nm, resulta adecuado para controlar la detección de casi todas las muestras.

Cuando algunos grupos funcionales se exponen a la radiación experimentan una excitación electrónica a causa de la absorción de energía a la longitud de onda específica del grupo funcional. Esta energía provoca el paso de un electrón desde el estado fundamental hasta un nivel de energía superior. Esta absorción de energía se traduce en una disminución del haz que se ha proyectado a través de la muestra, y que ha llegado hasta la fotocélula.