



**ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES FISICOQUIMICAS
DE TOXINAS AISLADAS DE
KARWINSKIA HUMBOLDTIANA**

TESIS

QUE EN OPCION AL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

D.C.B. LAURA ESTHER MARTINEZ VILLARREAL

MONTERREY, N.L. ENERO DE 1990

TM

Z6658

FM

1990

M3



1020071181



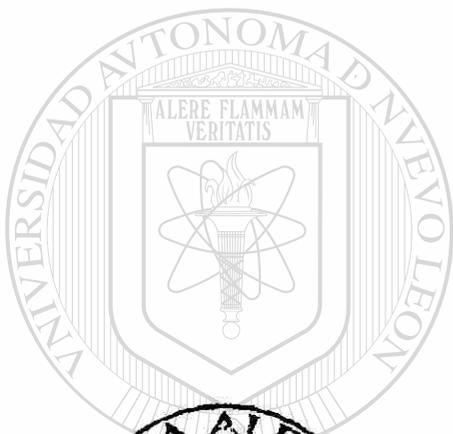
UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

TM
26658
FM
1990
M3



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

162047

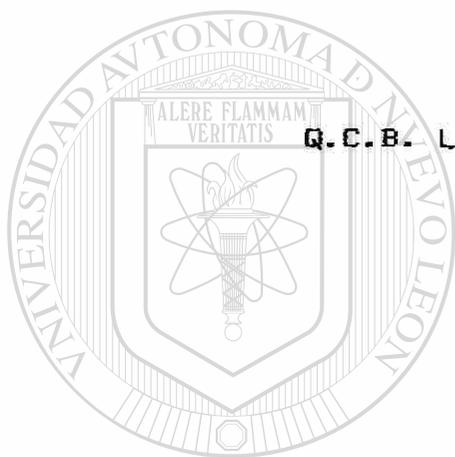
ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES FISICOQUIMICAS

DE TOXINAS AISLADAS DE

Karwinskia humboldtiana

POR

Q.C.B. LAURA ESTHER MARTINEZ VILLARREAL



TESIS PRESENTADA A LA

FACULTAD DE MEDICINA

DE LA

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

COMO REQUISITO PARCIAL PARA

LA OBTENCION DEL GRADO DE
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

®

MAESTRO EN CIENCIAS

CON ESPECIALIDAD EN QUIMICA ANALITICA BIOMEDICA

MONTERREY, N.L.

ENERO DE 1990

Noemi Wade Torres

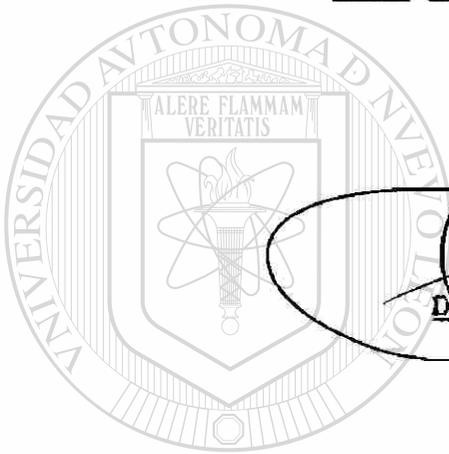
DRA. NOEMI WAKSMAN DE TORRES

PRESIDENTE

Mirthala Moreno de la Garza

DRA. MIRTHALA MORENO DE DE LA GARZA

SECRETARIO



Alfredo Piñeyro Lopez

DR. ALFREDO PIÑEYRO LOPEZ

PRIMER VOCAL

UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Mario Cesar Salinas Carmona

DR. MARIO CESAR SALINAS CARMONA

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

SEGUNDO VOCAL

Herminia GPE. Martinez Rodriguez

DRA HERMINIA GPE. MARTINEZ RODRIGUEZ

TERCER VOCAL



ASESOR DE TESIS: DRA NOEMI WAKSMAN DE TORRES

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA Y TOXICOLOGÍA

FACULTAD DE MEDICINA

UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

U.A.N.L.



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

AGRADECIMIENTOS

Dr. Alfredo Piñeyro López.

Director de la Facultad de Medicina y
Jefe del Departamento de Farmacología y Toxicología
de la U.A.N.L.

Con admiración y respeto por su apoyo para la culminación de
este trabajo.

Dra. Noemí Waksman de Torres.

Mi sincero agradecimiento por su valiosa asesoría y por
compartir sus conocimientos.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

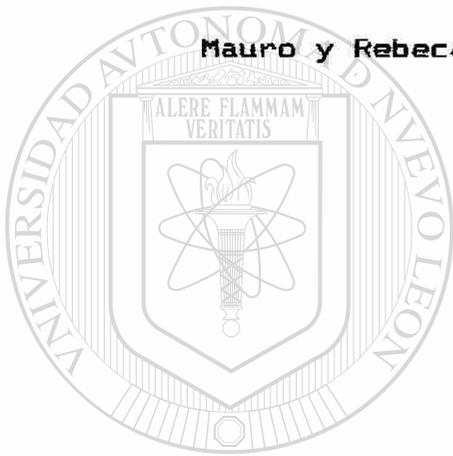
Sr. Rogerio González Alanís.

Por su apoyo y elaboración del material fotográfico de esta
tesis.

Esta tesis se realizó en parte gracias al apoyo económico de la
SEP según convenio # 86-01-371.

A mis padres

Mauro y Rebeca les dedico con amor este trabajo.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

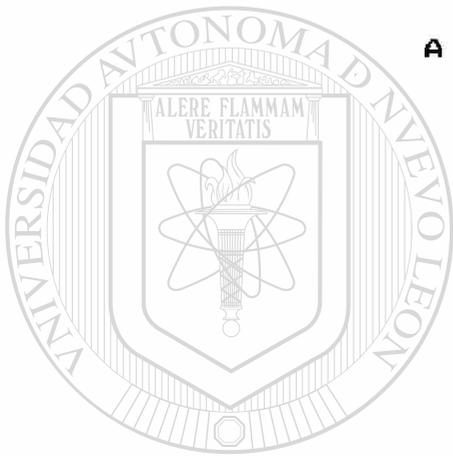


DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

A mis hermanos

Luis, Mario, Martha, Mauro, Thelma, Rogelio y Fernando.

Con cariño



A mis compañeros y amigos

Por su apoyo

UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

A mis maestros

Por sus enseñanzas

INDICE

-Abreviaturas.....	10
-Introducción.....	11
Hipótesis.....	22
Objetivo.....	23
-Material y métodos.....	24
I) Métodos generales.....	24
II) Obtención de las toxinas.....	26
III) Pureza de las toxinas.....	26
IV) Estudios fisicoquímicos.....	28
1) Solubilidad.....	28
2) Coeficiente de partición aparente (K _{pa}) lípidos/agua.....	28
3) Constante de acidez (K _a).....	29
A) Determinación del pK _a aproximado.....	30
B) Método espectrofotométrico.....	30
C) Método de partición.....	33
4) Degradación de las toxinas en soluciones acuosas.....	34
-Resultados.....	36
I) Solubilidad.....	36
II) Coeficiente de partición aparente (K _{pa}) lípidos/agua.....	36
III) Constante de acidez (K _a).....	36
1) Método espectrofotométrico.....	42
2) Método de partición.....	46
IV) Degradación de las toxinas en soluciones acuosas.....	50
-Discusión.....	65
-Conclusiones.....	72
-Bibliografía.....	73

INDICE DE TABLAS

Tabla I.	Solubilidad de T544, T514 y T496 en mg/ml.....	37
Tabla IIa.	Coeficiente de partición aparente (Kpa) lípidos/agua de T544.....	38
Tabla IIb.	Coeficiente de partición aparente (Kpa) lípidos/agua de T514.....	39
Tabla IIc.	Coeficiente de partición aparente (Kpa) lípidos/agua de T496.....	40
Tabla III.	Cálculo del pK_a aproximado.....	41
Tabla IVa.	Cálculo espectrofotométrico del pK_a de T544....	47
Tabla IVb.	Cálculo espectrofotométrico del pK_a de T514....	48
Tabla IVc.	Cálculo espectrofotométrico del pK_a de T496....	49
Tabla V.	Ecuaciones de velocidad y de vida media.....	54
Tabla VI.	Tiempo de vida media de T544 y T514.....	57
Tabla VII.	Tiempo de vida media de T496.....	61

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Arbusto de la <i>K. humboldtiana</i>	12
Figura 2. Distribución de la <i>K. humboldtiana</i> en la República Mexicana.....	13
Figura 3. Fruto de la <i>K. humboldtiana</i>	14
Figura 4. Toxinas de la <i>K. humboldtiana</i>	17
Figura 5. Posibles precursores o metabolitos de las toxinas aislados del fruto de la <i>K. humboldtiana</i>	18
Figura 6. Método modificado de Dreyer.....	27
Figura 7a. Espectro UV-Visible de la T544.....	43
Figura 7b. Espectro UV-Visible de la T514.....	44
Figura 7c. Espectro UV-Visible de la T496.....	45
Figura 8. Gráfica de K_{pa} vs $K_{pa}/[H^+]$ para calcular K_D y K_a	51
Figura 9a. Gráficas de $\ln T544$ vs tiempo.....	55
Figura 9b. Gráficas de $\ln T514$ vs tiempo.....	56
Figura 10. Cromatograma de T514. Efecto del tiempo.....	58
Figura 11. Cromatograma de T514. Efecto de la temperatura...	59
Figura 12. Gráfica de $\ln T496$ vs tiempo a 25°C, pH2, luz....	60
Figura 13. Cromatograma de T496 a diferentes pH.....	62
Figura 14. Cromatograma de T496 a diferentes tiempos.....	63
Figura 15. Gráfica de $\ln T496$ vs tiempo a 70°C, pH2, luz....	64

ABREVIATURAS

B/A	Benceno/acetona.
CCF	Cromatografía en capa fina.
EM	Espectro de masas.
k	Constante de velocidad.
K _a	Constante de acidez.
KD	Coefficiente de distribución verdadero.
Kpa	Coefficiente de partición aparente.
μ	Fuerza iónica.
pK	Logaritmo negativo de la constante de acidez o basicidad.
pK _a	Logaritmo negativo de la constante de acidez.
r ²	Coefficiente de correlación.
Rf	Factor de retardo.
rpm	Revoluciones por minuto.
SNP	Sistema nervioso periférico.
t _{1/2}	Tiempo de vida media.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

INTRODUCCION

La *Karwinskia humboldtiana*, también conocida comúnmente como tullidora o coyotillo, es un arbusto que se encuentra distribuido en todo México (1), sureste de los Estados Unidos y Centro América (2). (Figs. 1 y 2).

Humboldt, Bonpland y Kunth describen a la *K. humboldtiana* como un árbol de mucha elevación (más comúnmente es un arbusto), liso, no presenta olor desagradable; posee ramas cilíndricas y largas, rugosas, inermes, morenas; de ramitas delgadas, lampiñas; hojas pecioladas colocadas en el tallo de manera alterna y opuestas (3).

El fruto de la *K. humboldtiana* es una drupa de color violeta oscuro cuando está maduro (Fig. 3), de uno a uno y medio centímetros de diámetro, de endocarpo leñoso, que encierra frecuentemente dos semillas fértiles y dos abortadas. Tiene almendra central amarillenta y grasosa, no tiene olor, el sabor del mesocarpo es agradable, dulzón, debido a la presencia de glucosa y contiene materia colorante violeta, taninos y sustancias pépticas.

El fruto de la *K. humboldtiana* es tóxico, su ingestión provoca una polineuropatía ascendente, simétrica y progresiva, que en los casos más graves causa parálisis respiratoria y bulbar (4).



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Figura 1. Arbusto de la *K. humboldtiana*.

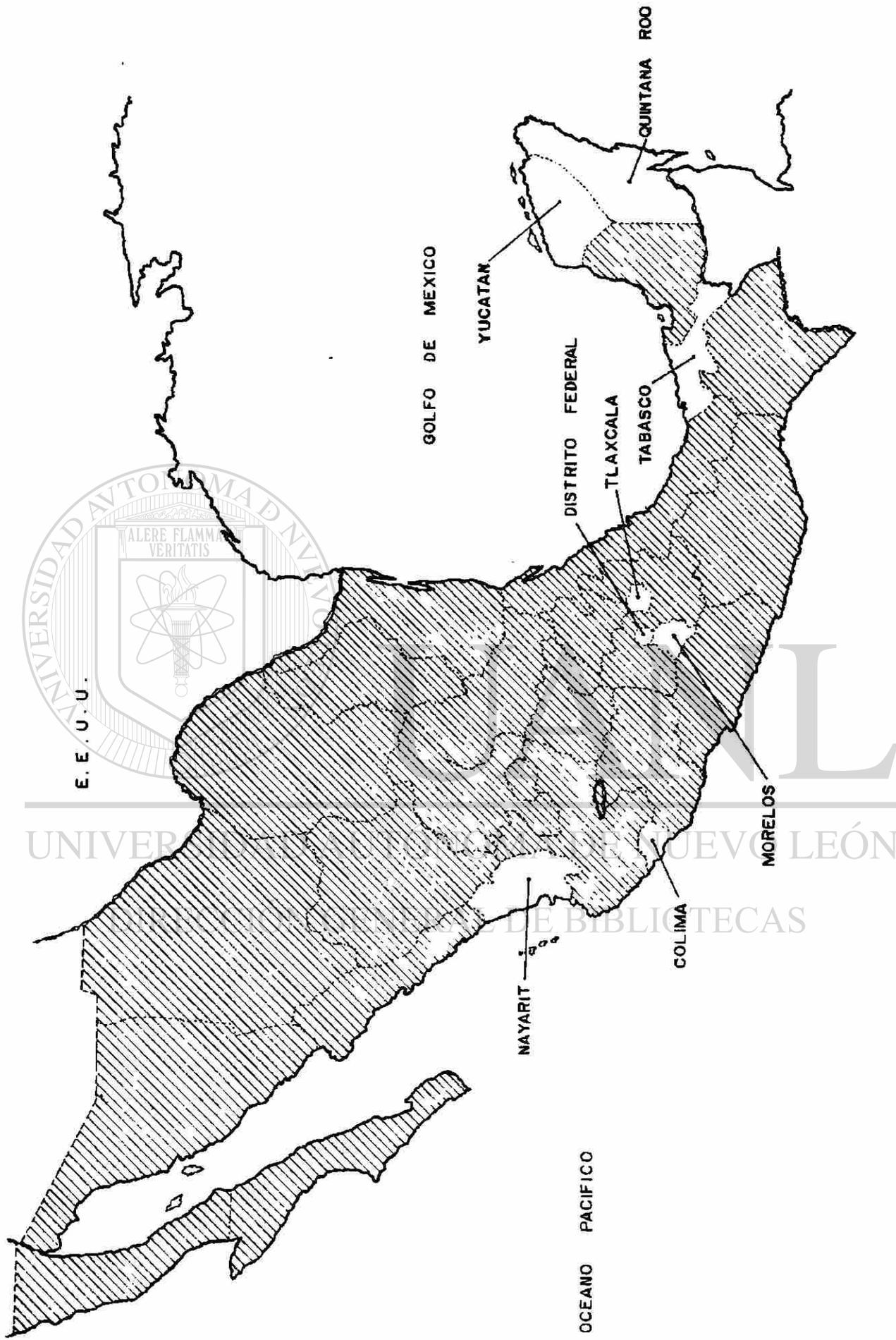


FIGURA 2 DISTRIBUCION DE LA K. HUMBERTIANA EN LA REPUBLICA MEXICANA



DIRECCION GENERAL DE BIBLIOTECAS

Figura 3. Fruto de la *K. humboldtiana*.

Verde, maduro, y semimaduro.

La ingestión accidental de este fruto produce muerte en humanos y en ganado (5). El grado de parálisis está en relación directa con el contenido de toxinas en los frutos de diferentes procedencias (6).

Padrón (7) refiere que ya desde el siglo XVIII se conocía que el agente tóxico de la *K. humboldtiana* se encontraba en la semilla del fruto, dato que aparece en la obra "Historia de la antigua o Baja California" escrita por el jesuita D. Francisco Xavier Clavijero. Padrón supuso que la naturaleza química del agente tóxico era hidrosoluble. Trece años más tarde (en 1964), Anguiano encontró los extractos clorofórmicos del fruto más activos que los extractos acuosos y por ello pensó que el agente tóxico era liposoluble (8).

En 1972, Kim (9) reportó el aislamiento y caracterización parcial de una sustancia neurotóxica, la cual fue extraída del fruto con cloroformo y se precipitó con n-hexano, se obtuvo un polvo amarillo. Este polvo fue purificado mediante cromatografía en columna de sílica gel G y eluido con una mezcla de B/A 20/1; los compuestos así obtenidos se analizaron por CCF. La fracción principal de color amarillo se evaporó y se precipitó con cloroformo/n-hexano. Por medio de la CCF se observó que se había aislado un solo compuesto, realizándose pruebas de grupo funcionales como la del $FeCl_3$ para identificar oxhidrilos fenólicos y la prueba de Tollens para aldehídos. Además, se

realizó el espectro de masas (EM) para conocer la composición elemental del compuesto, la cual fue de $C_{32}H_{32}O_8$ con un peso molecular de 544. Se probó la toxicidad de la sustancia aislada en un mono capuchino provocándole cuadriplejia y la muerte.

Más tarde (1975), Dreyer y colaboradores (10) aislaron e identificaron cuatro sustancias tóxicas. De manera semejante a Kim, Dreyer utilizó el extracto clorofórmico del fruto de la *K. humboldtiana* y la cromatografía en columna de sílica gel G para la separación de estos compuestos. Empleó como mezclas B/A de diferente polaridad: 50/1, 20/1, 10/1 y 5/1. Para la purificación de las toxinas se realizaron varias separaciones cromatográficas de las diferentes fracciones obtenidas de la primera columna. Mediante un espectro de masas de alta resolución se estableció la composición elemental de las cuatro sustancias aisladas; se las llamó T544, T496, T514 y T516 (el número representa su peso molecular). Por medio de la espectrofotometría infrarroja y resonancia magnética nuclear, se logró caracterizar las sustancias, las cuales son derivados diantracénicos y poseen una estructura común como se observa en la fig. 4.

No se ha estudiado la toxicidad del extracto hexánico del fruto de la *K. humboldtiana*; de él se han aislado cuatro compuestos: crisofanol, 7-metoxieleuterina, 6-OH-7-metoxieleuterina y el éter monometílico de la taracrisona (fig. 5). Estos compuestos

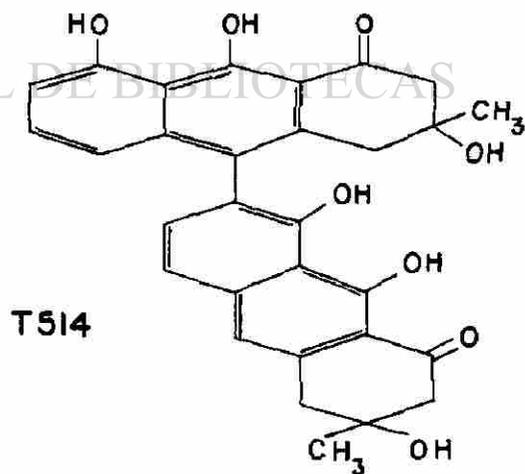
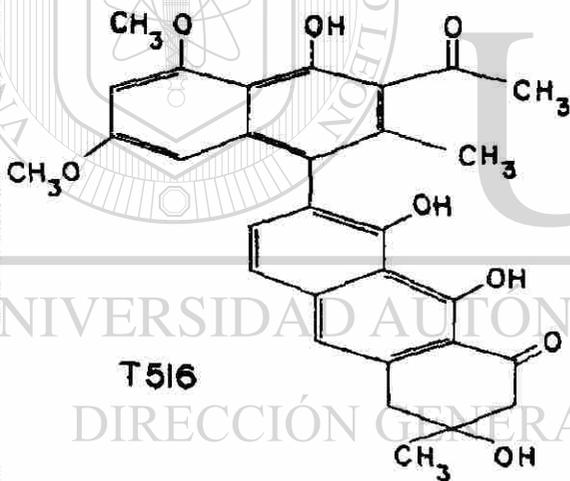
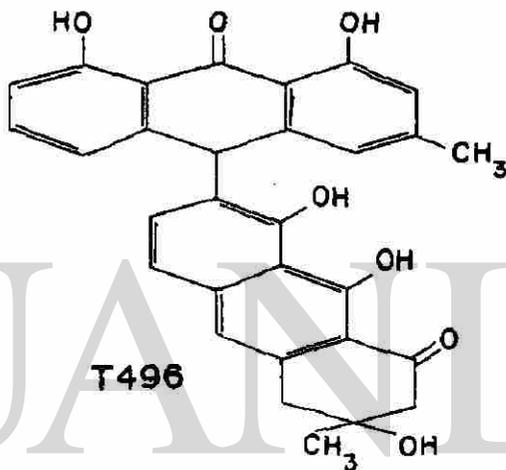
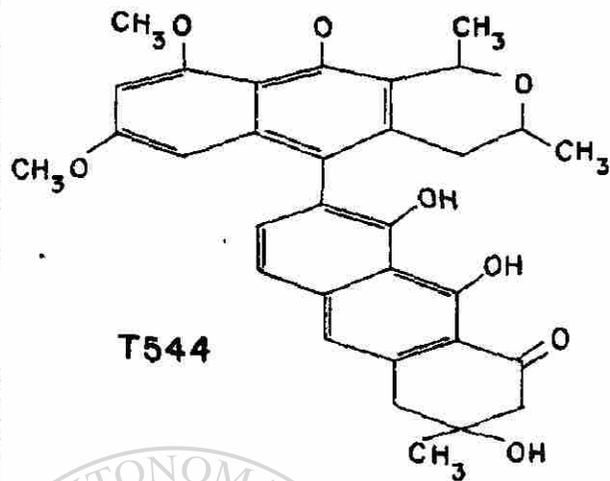
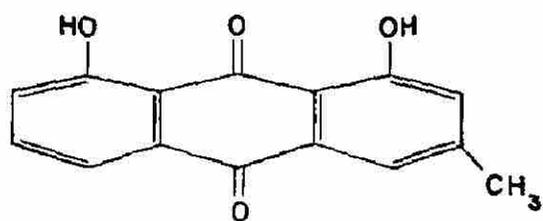
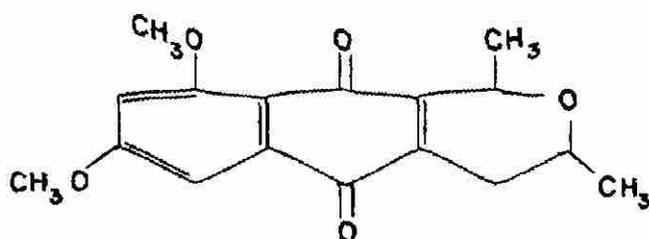


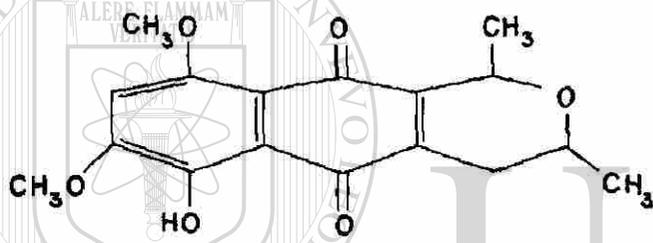
FIGURA 4 TOXINAS DE LA *K. HUMBOLDTIANA*



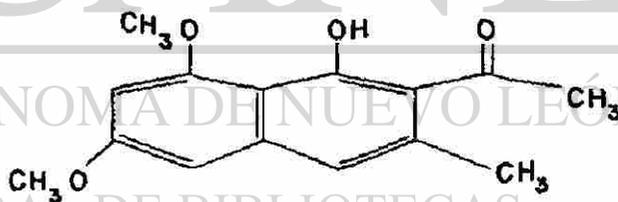
CRISOFANOL



7-METOXIELEUTERINA



6-OH-7-METOXIELEUTERINA



ETER MONOMETILICO DE LA TARACRISONA

FIGURA 5 POSIBLES PRECURSORES O METABOLITOS DE LAS TOXINAS AISLADAS DEL FRUTO DE LA K. HUMBOLDTIANA.

se asemejan a los monómeros que componen los dímeros de las toxinas y por esta razón se sospecha que pueden ser los precursores o metabolitos de las diantracenas neurotóxicas (11).

Domínguez (5) aisló de la raíz de la *K. humboldtiana*, T544 y T516, además la flavona baicaleína y el flavonol quercetina y otros dos nuevos flavonoides (no caracterizados aún). Los extractos de las hojas contienen tres de los componentes neurotóxicos encontrados en el fruto (5).

Así mismo, se han aislado de la raíz dos compuestos conocidos como dimetilbencisocromanos con actividad antimicrobiana (12).

Dada la toxicidad que presenta el fruto de la *K. humboldtiana*, se han realizado varios estudios experimentales en diferentes especies de animales. Ello dio lugar a algunos datos interesantes respecto de la acción biológica del fruto y toxinas de él aisladas.

Escobar y Nieto (8) realizaron intoxicaciones en gatos y ratas blancas administrando la semilla del fruto de la *K. humboldtiana*. Observaron y describieron una polineuropatía desmielinizante segmentaria. Charlton y colaboradores (13) efectuaron estudios en sistema nervioso periférico (SNP). Intoxicaron cabras con fruto molido de *K. humboldtiana* por medio

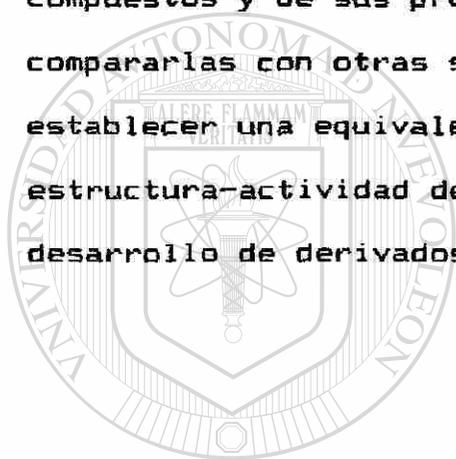
de la administración de distintas dosis orales diarias. Las lesiones encontradas por ellos en SNP revelaron inflamación de las células de Schwann, fragmentación en la vaina de mielina, desmielinización segmentaria y degeneración walleriana.

Mitchell y colaboradores (14) estudiaron las propiedades neurotóxicas de la T496 y T544 inyectando la toxina en el nervio ciático de rata provocando paresia en ambos casos; se observó desmielinización segmentaria en el nervio inyectado.

Mucho se ha estudiado acerca del daño que produce en el sistema nervioso de los animales, la intoxicación con fruto y toxinas de la *K. humboldtiana*. Recientemente se ha profundizado acerca de las variadas lesiones extraneuronales que produce la intoxicación aguda de fruto y toxinas en ratones, siendo las más importantes en hígado y pulmón (15). La T514 produce un mayor daño hepatopulmonar que la T544 (16).

Debido a los trabajos que se están llevando a cabo actualmente con las toxinas puras como agentes citotóxicos es de gran importancia el estudio de sus propiedades fisicoquímicas como son su hidrosolubilidad, liposolubilidad, polaridad, forma, tamaño, grado de ionización, para predecir su absorción, transporte, distribución, metabolismo y eliminación en el organismo.

Las toxinas también pueden estar sujetas a cambios químicos ya sea suprimiendo o introduciendo ciertos grupos para poder modificar su comportamiento farmacológico y así favorecer la distribución de las mismas entre los diferentes compartimientos para hacer más selectiva su acción. Además, el tener conocimiento de las estructuras químicas de este tipo de compuestos y de sus propiedades fisicoquímicas, nos permitiría compararlas con otras sustancias presentes en la naturaleza y establecer una equivalencia bioisótera. El conocer la relación estructura-actividad de las toxinas nos sería útil para el desarrollo de derivados biorreversibles.

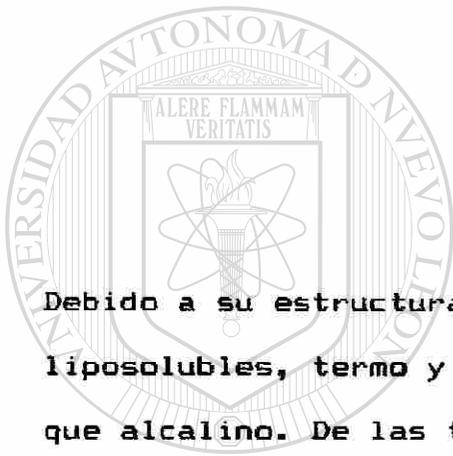


UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



HIPOTESIS

Debido a su estructura química las toxinas son ácidos débiles, liposolubles, termo y fotolábiles, más estables en medio ácido que alcalino. De las tres toxinas podría resultar la T514 la más ácida, la menos liposoluble y la más inestable.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



OBJETIVO

Conocer el comportamiento fisicoquímico de las toxinas 544, 514 y 496 aisladas de *K. humboldtiana*.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

MATERIAL Y METODOS

1) METODOS GENERALES.

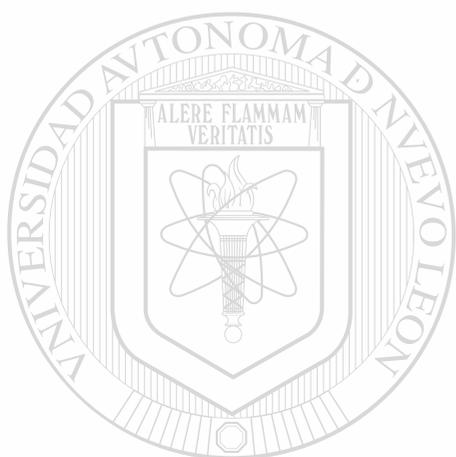
Todos los reactivos utilizados fueron grado analítico. Los pH se midieron con un potenciómetro Beckman digital modelo 3500 con una precisión de 0.01 unidades. Los espectros y las mediciones UV-Visible fueron realizados en un espectrofotómetro Beckman Acta III de doble haz con celdas de 1 cm, en el rango espectral comprendido entre 360 y 500 nm. Todas las evaporaciones se realizaron bajo N_2 para prevenir la descomposición.

Se utilizó una centrifuga refrigerada IEC CRU-5000. Los puntos de fusión se midieron en un aparato electrotérmico marca Electrothermal.

Las cuantificaciones en CCF se realizaron por reflectancia en un espectrofotómetro modelo PMQ 3 Carl Zeiss de acuerdo a la metodología propuesta por Guerrero y colaboradores (6).

Todos los experimentos se realizaron a temperatura ambiente ($22^{\circ}C$), excepto en los casos en que se señalan otras temperaturas de trabajo. En estos casos, las mismas fueron establecidas en un baño Blue M modelo MW-1120A-1 $\pm 2^{\circ}C$.

Las agitaciones se realizaron en un Vortex Mixer S/P modelo SB223-1. Para las mediciones de volúmenes pequeños se usaron pipetas Eppendorf.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

II) OBTENCION DE LAS TOXINAS.

El fruto de la *K. humboldtiana* se recolectó en Villa de García, Nuevo León, se secó en una estufa a 35-40°C por 12 días y se molió en un molino Wiley Mills modelo 4. Se utilizó el método modificado de Dreyer para la purificación de las toxinas (6). (Fig. 6).

III) PUREZA DE LAS TOXINAS.

A) Determinación del punto de fusión (17).

B) Cromatografía en capa fina

Se realizaron soluciones cualitativas de las toxinas y se aplicaron en las placas de sílica gel G junto con los estándares. Se eluyó con B/A 5/1. Se observó si existía una sola mancha, se determinaron los Rf y mediante una lámpara de luz UV a una λ de 375 nm se observó la fluorescencia de las mismas.

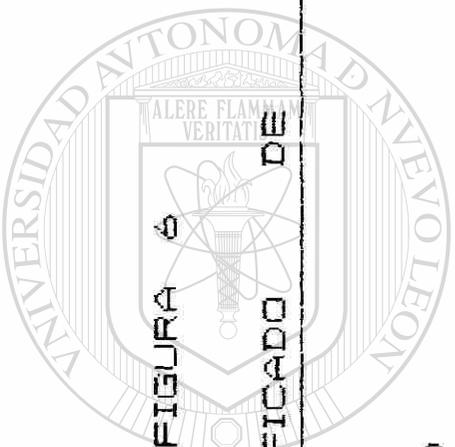
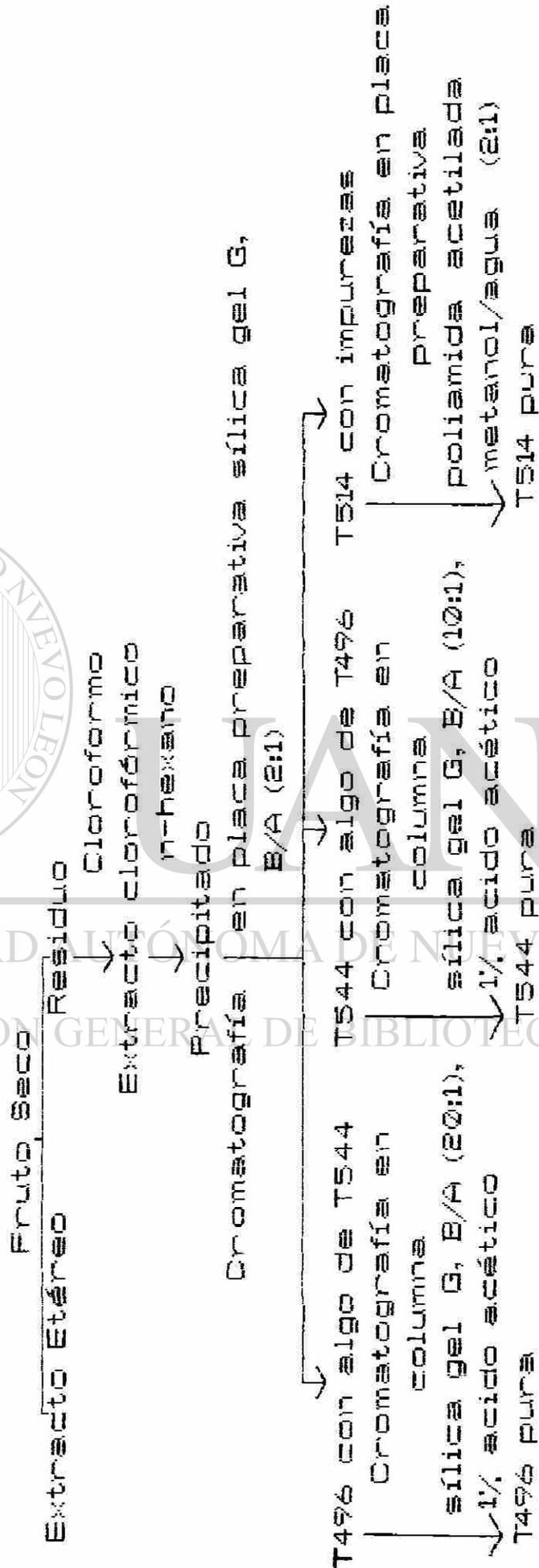


FIGURA 6

DREYER

METODO

MODIFICADO DE



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

®

IV) ESTUDIOS FISICOQUIMICOS.

1) SOLUBILIDAD.

Se pesó 1 mg de toxina en tubos de vidrio 13 x 50 mm, agregando porciones de 5 μ l de solvente cada vez y agitando hasta observar una solución homogénea. En los casos en que el mg de toxina fue insoluble al agregar hasta 1 ml del solvente, se llevó a un volumen de 5 ml, se agitó por 15 min. y se centrifugó a 3500 rpm por 10 min.; se separó el sobrenadante del precipitado. El sobrenadante se extrajo con CHCl_3 , agitando por 30 seg., se separó la fase orgánica la cual se llevó a sequedad con N_2 , se aforó con benceno al igual que el residuo. El cromatograma se cuantificó por reflectancia.

Se utilizaron los siguientes solventes: agua, metanol, cloroformo, n-hexano, n-heptano, n-octanol, dimetilsulfóxido, soluciones buffer de fosfatos de pH 2.5, 6, 9 y 12 ($\mu = 0.2$).

Los sobrenadantes de pH básicos se acidificaron con HCl concentrado antes de extraer.

2) COEFICIENTE DE PARTICION APARENTE (K_{pa}) LIPIDO/AGUA.

De una solución de 0.25 mg/ml de la toxina en acetona, se

colocaron 100 μl (25 μg) en tubos de vidrio 13 x 100 mm y se evaporó con corriente de N_2 hasta sequedad; se agregó 1 ml de solvente orgánico y se agitó con 1 ml de buffer por 30 seg.; se dejó reposar por 5 min. Una vez restablecido el equilibrio se separó la fase orgánica, se evaporó con N_2 , se aforó con benceno y la toxina en el cromatograma se cuantificó por reflectancia. En el caso del coeficiente de partición aparente para la T496 en butanol se realizó la cuantificación de la toxina por espectrofotometría UV-Visible.

La fase acuosa se extrajo con 1 ml de CHCl_3 , se agitó por 30 seg., se dejó reposar 5 min. y se siguió el mismo procedimiento descrito anteriormente para la cuantificación de las toxinas. Las soluciones acuosas de pH básico se acidificaron con HCl previamente a la extracción.

Se utilizaron soluciones buffer de fosfatos ($\mu = 0.2$) de pH 2.5, 6, 9 y 12 y como solventes orgánicos butanol, cloroformo y n-hexano.

3) CONSTANTE DE ACIDEZ (K_a).

La cantidad de toxina utilizada en cada caso se ajustó de acuerdo con la disponibilidad de la misma. El volumen de solvente empleado dependió de la solubilidad de cada uno de los compuestos.

A) DETERMINACION DEL pK_a APROXIMADO.

a) T544

Se pesaron 5 mg de toxina en un tubo de vidrio 16 x 100 mm, se les agregaron 3.5 ml de acetona + 4.5 ml de agua, se agitó y se midió el pH de la solución resultante.

b) T514

Se pesaron 3 mg de toxina en un tubo de vidrio 16 x 100 mm, se les agregaron 2 ml de acetona + 4 ml de agua, se agitó y se midió el pH de la solución resultante.

c) T496

Se pesaron 5 mg de toxina en un tubo de vidrio 16 x 100 mm, se les agregaron 4 ml de acetona + 4 ml de agua, se agitó y se midió el pH de la solución resultante.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

B) METODO ESPECTROFOTOMETRICO.

a) BARRIDO DEL ESPECTRO UV-VISIBLE.

1) T544

i) 500 μ l de T544 al 0.0625% (acetona:agua 3.5:4.5) + una gota de HCl conc. se aforaron a 10 ml con acetona-agua 50% .

ii) 500 μ l de T544 al 0.0625% (acetona:agua 3.5:4.5) + una gota de NaOH 0.1N se aforaron a 10 ml con acetona-agua 50% .

2) T514

i) 500 μ l de T514 al 0.05% (acetona:agua 1:2) + una gota de HCl conc. se aforaron a 10 ml con acetona-agua 50% .

ii) 500 μ l de T514 al 0.05% (acetona:agua 1:2) + una gota de NaOH 0.1N se aforaron a 10 ml con acetona-agua 50% .

3) T496

i) 125 μ l de T496 al 0.1% en acetona + 3 ml de acetona + una gota de HCl conc. se aforaron a 10 ml con acetona-agua 50%

ii) 125 μ l de T496 al 0.1% en acetona + 3 ml de acetona + una gota de NaOH 0.1N se aforaron a 10 ml con acetona-agua 50%

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

b) DETERMINACION DEL pK_a

1) T544

Se preparó una solución de T544 al 0.05% (acetona-agua 50%).

PROCEDIMIENTO:

i) 500 μ l de la solución + una gota de HCl conc. se aforaron a 10 ml con acetona-agua (1:1).

ii) 500 μ l de la solución + una gota de NaOH 0.1N se aforaron a 10 ml con acetona-agua (1:1).

iii) 500 μ l de la solución se aforaron a 10 ml con el buffer correspondiente. Se trabajó con buffer de fosfatos ($\mu = 0.04$) de pH 7.6, 7.79, 8.4 y 8.6. La concentración de las soluciones finales fue de 4.6×10^{-5} M. Se midió la absorbancia a 410, 425 y 435 nm.

2) T514

Se preparó una solución de T514 al 0.05% (acetona-agua 1:2).

PROCEDIMIENTO:

i) 250 μ l de la solución + una gota de HCl conc. se aforaron a 10 ml con (acetona-agua 1:2).

ii) 250 μ l de la solución + una gota de NaOH 0.1N se aforaron a 10 ml con (acetona-agua 1:2).

iii) 250 μ l de la solución se aforaron a 10 ml con el buffer correspondiente. Se trabajó con buffer de fosfatos ($\mu = 0.04$) de pH 7.25, 7.8 y 7.85. La concentración de las soluciones finales fue de 2.4×10^{-5} M. Las absorbancias se midieron a 410, 421 y 430 nm .

3) T496

Se preparó una solución de T496 al 0.25% en acetona.

PROCEDIMIENTO:

i) 100 μ l de la solución + una gota de HCl conc. se aforaron a 10 ml con una solución de NaCl ($\mu = 0.05$).

ii) 100 μ l de la solución + una gota de NaOH 0.1N se aforaron a 10 ml con una solución de NaCl ($\mu = 0.05$).

iii) 100 μ l de la solución se aforaron a 10 ml con el buffer correspondiente. Se trabajó con buffer de tetraborato de sodio ($\mu = 0.05$) de pH 10.57, 10.77, 10.91 y 10.98. La concentración de las soluciones finales fue de 5×10^{-5} M. Se midió la absorbancia a 380, 400 y 425 nm.

C) METODO DE PARTICION.

DETERMINACION:

1) T544

De una solución de 1 mg/ml en octanol se colocaron 50 μ l en tubos Eppendorf y se llevaron a 500 μ l con octanol, se agitó con 500 μ l de buffer y se centrifugó por 10 min.; se tomó 0.3 ml de la fase orgánica, se llevó a 2.6 ml con octanol y se leyó la absorbancia a 415 nm. Se trabajó a una concentración inicial de 1.8×10^{-4} M.

2) T514

De una solución de 0.5 mg/ml en octanol se colocaron 100 μ l en tubos Eppendorf y se llevaron a 500 μ l con octanol, se agitó con 500 μ l de buffer y se centrifugó por 10 min.; se tomó 0.3 ml de la fase orgánica, se llevó a 2.6 ml con octanol y se leyó la absorbancia a 402 nm. Se trabajó a una concentración inicial de 1.9×10^{-4} M.

Para ambas determinaciones se utilizaron buffer de fosfatos de pH 6.1, 6.8, 7.6, 8 y 8.3 ($\mu = 0.04$).

En ambos casos las curvas de calibración correspondientes se realizaron con las toxinas puras disueltas en octanol.

Nota: El octanol y los buffers se saturaron uno con el otro antes de realizar la partición.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

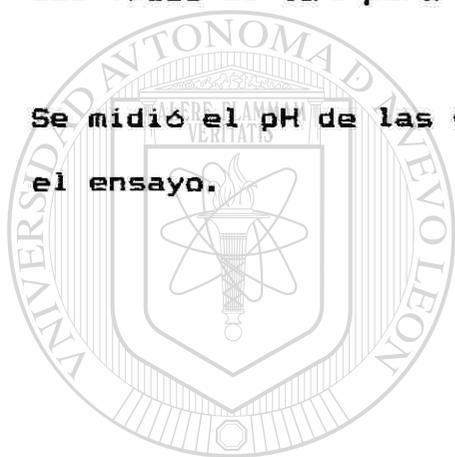
4) DEGRADACION DE LAS TOXINAS EN SOLUCIONES ACUOSAS

A partir de una solución de 0.025% (en acetona) de la toxina, se colocaron 100 μ l (0.025 mg) en tubos de vidrio 13 x 100 mm, se agregó 1 ml del buffer correspondiente, se agitó y se tapó.

El estudio se llevó a cabo a 25°, 37° y 70°C y en condiciones de luz y oscuridad; se utilizaron buffer de fosfatos ($\mu = 0.2$) de pH 2.5, 6, 9 y 12.

A distintos intervalos de tiempo se retiraron los tubos de los baños de temperatura controlada, se agregó 1 ml de CHCl_3 , se agitó por 30 seg. y se separó la fase orgánica, la cual se evaporó con N_2 ; se llevó a un volumen conocido en benceno. La toxina remanente se cuantificó en CCF por reflectancia. Todos los estudios cinéticos se realizaron hasta tiempos mayores de dos veces el $t_{1/2}$ para cada una de las condiciones.

Se midió el pH de las soluciones durante todo el tiempo que duró el ensayo.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

RESULTADOS

Todos los resultados presentados en las siguientes tablas son promedio de por lo menos tres determinaciones, con excepción de la determinación de solubilidad, para la cual se realizó una medición única.

I) SOLUBILIDAD (18).

Los resultados de la prueba de solubilidad se muestran en la tabla I.

II) COEFICIENTE DE PARTICION APARENTE (Kpa) LIPIDO/AGUA (19).

Los resultados de los coeficientes de partición aparentes se muestran en la tabla II a, b y c.

III) CONSTANTE DE ACIDEZ (K_a).

Se utilizaron dos métodos distintos para hacer las determinaciones. En ambos casos era necesario conocer previamente el rango dentro del cual estaba el pK_a de cada una de las toxinas. Para ello se midió el pH de soluciones de concentración conocida de cada una de ellas en acetona-agua y, por medio de la ecuación de Henderson Hasselbalch, se calcularon los valores que figuran en la Tabla III. Con ello se pudo conocer el rango de pH al cual se iba a trabajar para hacer las determinaciones.

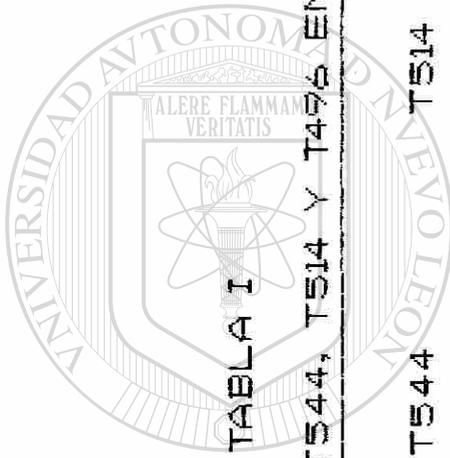


TABLA I
SOLUBILIDAD DE T544, T514 Y T496 EN mg/ml

SOLVENTES	T544	T514	T496
CLOROFORMO	100	20	10
METANOL	33	1	0.125
DIMETILSULFOXIDO	100	50	25
n-HEXANO	0.09	0.09	0.085
n-HEPTANO	0.064	0.001	-
OCTANOL	10	10	20
AGUA	0.006	0.01	0.002
BUFFER PH 2.5	0.006	0.008	0.002
BUFFER PH 6	0.005	0.018	0.002
BUFFER PH 9	0.008	0.087	0.005*
BUFFER PH 12	0.012	-	-

- NO DETERMINADO Buffer de fosfatos (μ = 0.2)

* DATO NO FIDEDIGNO

En todos los casos se empleó 1 mg de toxina

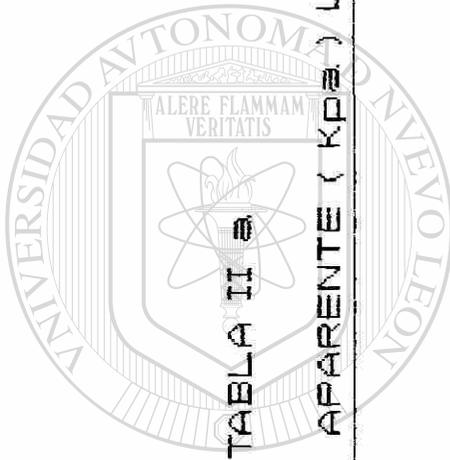


TABLA II

COEFICIENTE DE PARTICION APARENTE (K_{PA}) LIPIDO/AGUA DE T544

BUFFER PH	C	n-H	B
2.5	> 100	1.000 ± 0.4	10.0 ± 2
6	> 100	1.000 ± 0.4	4.0 ± 0.8
9	19 ± 3	0.460 ± 0.2	3.0 ± 0.5
12	4 ± 0.7	0.015 ± 0.007	2.1 ± 0.4

C = CLOROFORMO

n-H = n-HEXANO

B = BUTANOL

- NO DETERMINADO

* DATO NO FIDEDIGNO

Concentración inicial = 0.025 mg/ml

Volumen de solvente de extracción utilizado = 1 ml

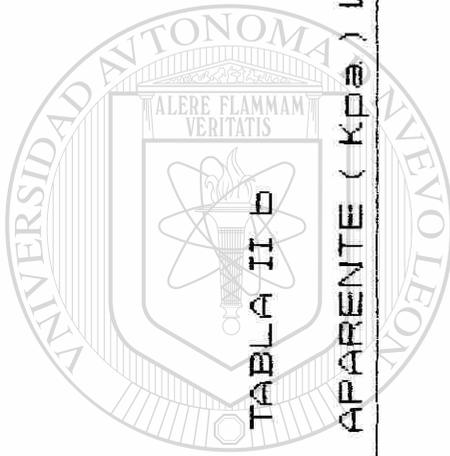


TABLA II b

COEFICIENTE DE PARTICIÓN APARENTE (K_p) LÍPIDO/AGUA DE T514

BUFFER PH	C	n-H	B
2.5	19.000 ± 3	1.500 ± 0.6	4.570 ± 0.9
6	4.500 ± 0.7	1.000 ± 0.4	4.000 ± 0.9
9	1.850 ± 0.5	0.005 ± 0.002	1.560 ± 0.3
12	0.064 ± 0.01	-	0.007 ± 0.002

C = CLOROFORMO

n-H = n-HEXANO

B = BUTANOL

- NO DETERMINADO

* DATO NO FIDEDIGNO

Concentración inicial = 0.025 mg/ml

Volumen de solvente de extracción utilizado = 1 ml

TABLA II C
 COEFICIENTE DE PARTICION APARENTE (K_{PA}) LIPIDO/AGUA DE T496

BUFFER PH	C	n-H	B
2.5	> 100	0.85 ± 0.33	> 100
6	> 100	0.77 ± 0.20	> 100
9	15*	0.30*	-
12	7*	0.27*	-

C = CLOROFORMO

n-H = n-HEXANO

B = BUTANOL

- NO DETERMINADO

* DATO NO FIDEDIGNO

Concentración inicial = 0.025 mg/ml

Volumen de solvente de extracción utilizado = 1 ml

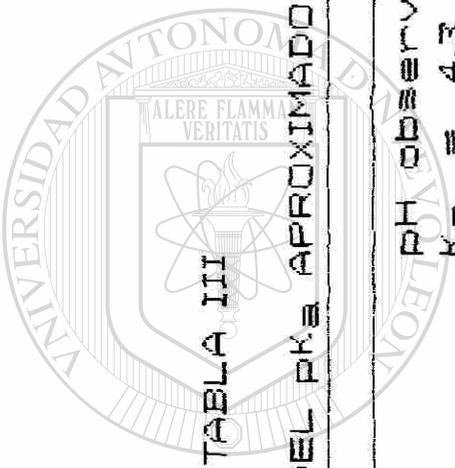


TABLA III
CALCULO DEL PK_a APROXIMADO

T544 = 1.15 mM	PH observado = 5.65
	K _a = 4.3 x 10 ⁻⁹
	PK _a calculado = 8.37
T514 = 0.97 mM	PH observado = 5.4
	K _a = 1.6 x 10 ⁻⁸
	PK _a calculado = 7.8
T496 = 1.26 mM	PH observado = 6.78
	K _a = 2.18 x 10 ⁻¹¹
	PK _a calculado = 10.66

UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



1) METODO ESPECTROFOTOMETRICO.

El método espectrofotométrico para la determinación del pK_a ha sido ampliamente utilizado para conocer el pK de otros fármacos. Hurwitz (18) lo utilizó para determinar el pK_a de estrógenos.

La ecuación empleada para calcular el pK_a por este método se deduce a partir de la ecuación de Henderson-Hasselbalch.

$$pK_a = pH - \log \frac{(A) - (Aa)}{(Ab) - (A)} \quad (1)$$

Donde:

A = absorbancia de una solución al pH considerado y a una dada λ .

Aa = absorbancia de la misma solución a la misma λ y a un pH ácido.

Ab = absorbancia de la misma solución a la misma λ y a un pH básico.

Aa y Ab se deben medir alejadas un mínimo de dos unidades de pK para que toda la sustancia esté en forma ionizada y no ionizada respectivamente. Además, otro requisito para que se cumpla la ecuación 1, es que exista variación en el espectro UV-Visible para la forma ionizada y no ionizadas de estas moléculas. Por ello fue necesario realizar previamente el espectro UV-Visible de cada uno de los compuestos. (Fig. 7. a, b y c).

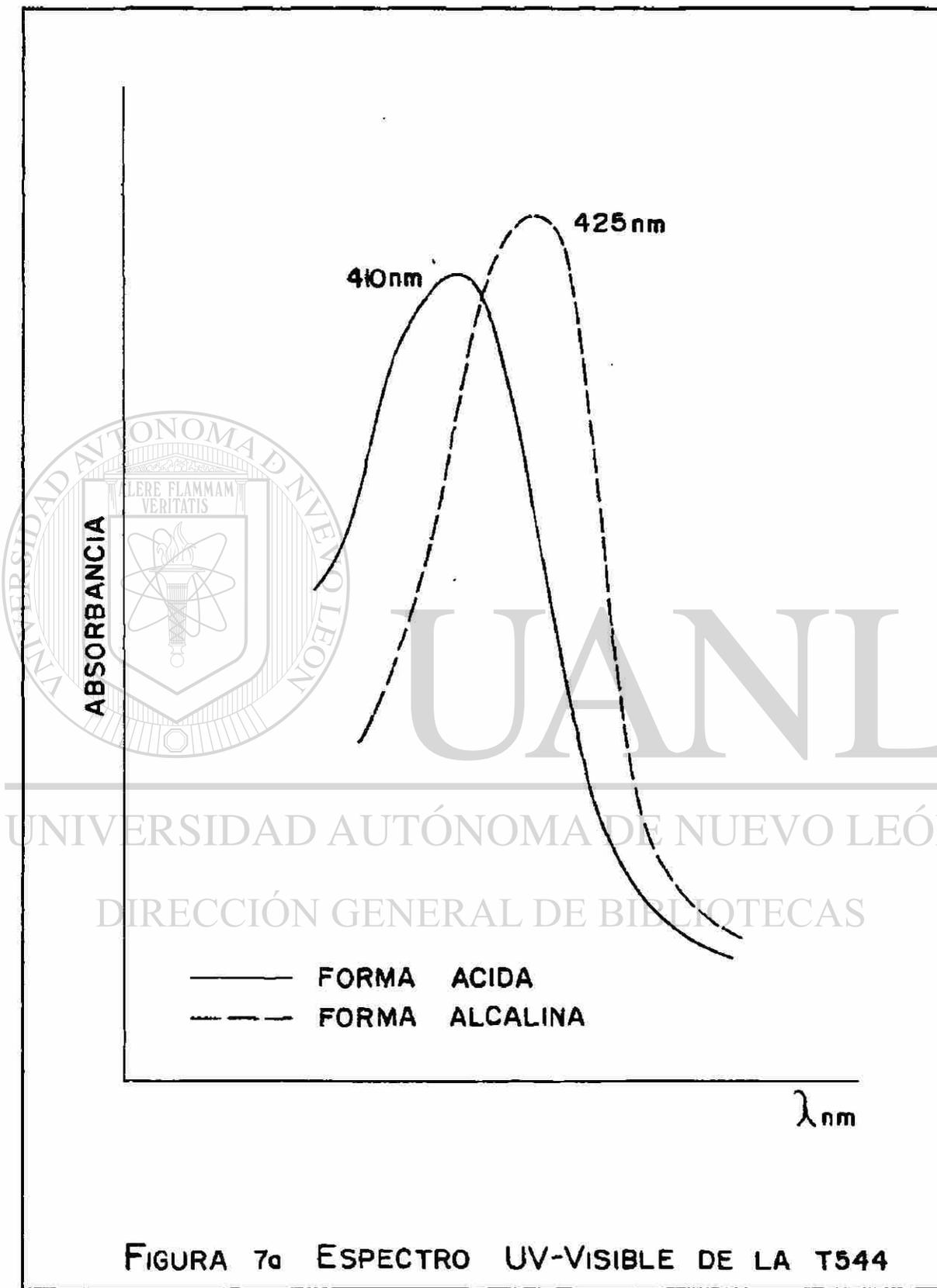


FIGURA 7a ESPECTRO UV-VISIBLE DE LA T544



FIGURA 7b ESPECTRO UV-VISIBLE DE LA T514

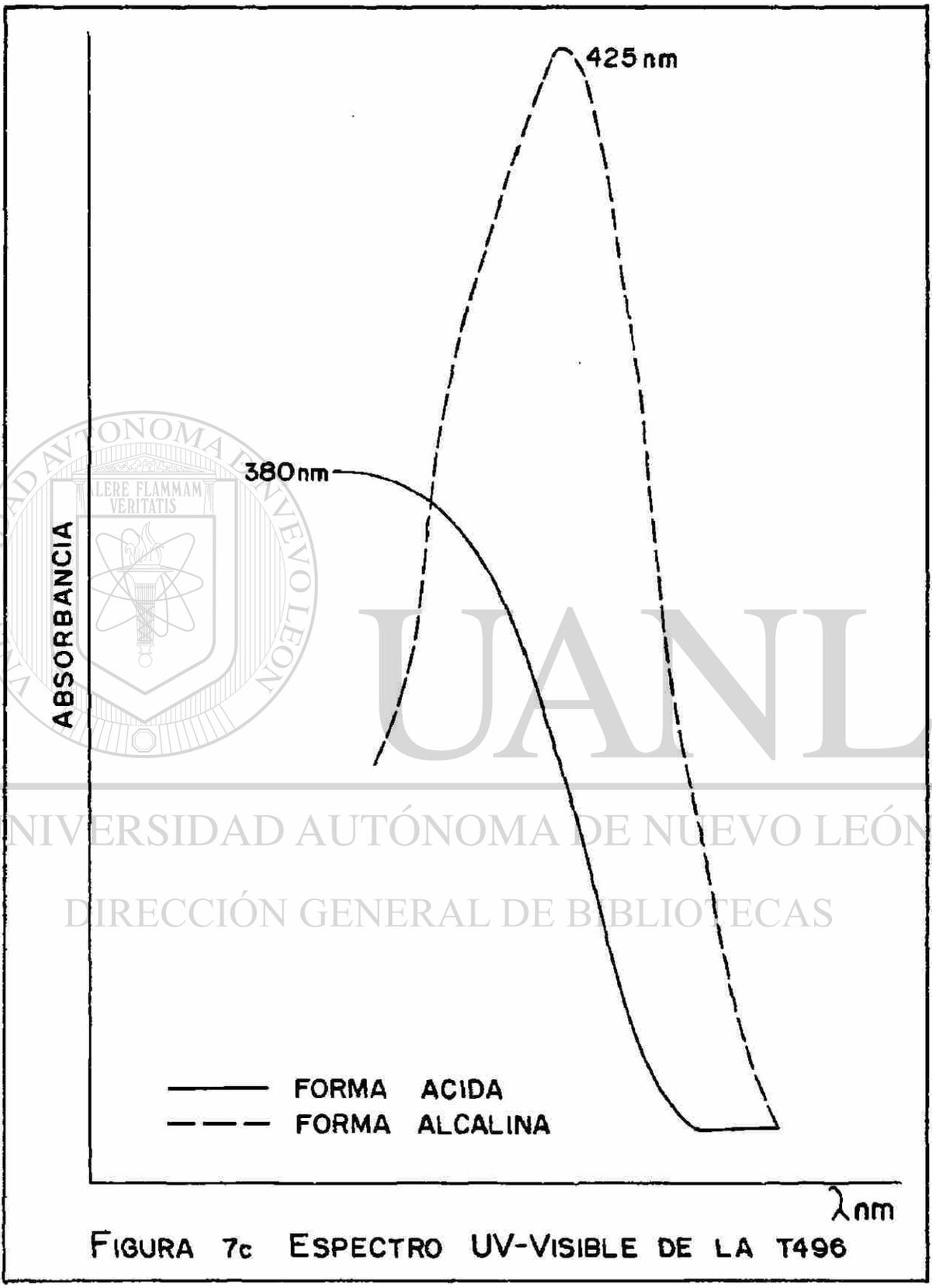


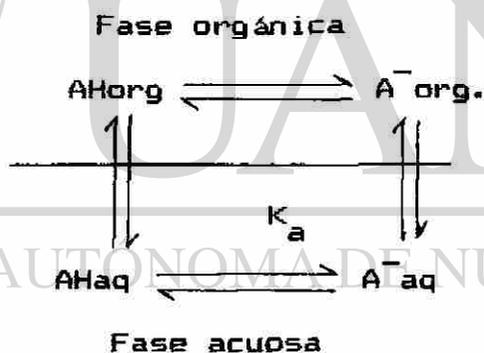
FIGURA 7c ESPECTRO UV-VISIBLE DE LA T496

Para sacar un promedio del valor del pK_a se determinaron las absorbancias de las soluciones a 3 λ diferentes, la λ de absorbancia máxima para la forma básica, para la ácida y otra λ intermedia. (Tabla IV a, b y c).

2) METODO DE PARTICION.

Ezumi (19) utilizó este método para determinar el pK_a de algunos fármacos, aunque el equilibrio correspondiente había sido descrito en 1953 (20).

Si consideramos el siguiente equilibrio:



$$K_a = \frac{[H_3O^+ aq] [A^- aq]}{[AHaq]} \quad (2)$$

Y considerando que a un pH cercano al $pK_a (A^-)_{org} = 0$, los coeficientes de reparto que se calcularon (Tabla II) fueron aparentes y dependieron del pH de la fase acuosa.

$$K_{pa} = \frac{(AHorg)}{(AHaq) + (A^- aq)} \quad (3)$$

TABLA IV
 CALCULO ESPECTROFOTOMETRICO DEL PK_a DE TS44

λ	435 nm		425 nm		410 nm	
	A	PK _a	A	PK _a	A	PK _a
2	0.385	-	0.475	-	0.51	-
7.6	0.45	8.27	1.52	8.45	0.55	8.57
7.79	0.485	8.23	0.62	8.42	0.585	8.23
8.4	0.59	8.3	0.66	8.38	0.62	8.59
8.6	0.6	8.47	0.68	8.58	0.66	8.47
10	0.76	-	0.84	-	0.79	-

PK_a = 8.47 ± 0.16

A = ABSORBANCIA
 λ = LONGITUD DE ONDA

Concentración inicial = 4.6×10^{-5} M

Buffer de fosfatos (μ = 0.04)

TABLA IV b
 CALCULO ESPECTROFOTOMETRICO DEL PK_a DE TS14

λ	430 nm		421 nm		410 nm	
	A	PK _a	A	PK _a	A	PK _a
	0.33	-	0.39	-	0.39	-
7.25	0.44	7.14	0.465	7.22	0.455	7.34
7.8	0.47	7.39	0.5	7.30	0.48	7.24
7.95	0.48	7.32	0.505	7.26	0.475	7.39
10	0.525	-	0.535	-	0.535	-

PK_a = 7.27 ± 0.09

A = ABSORBANCIA
 λ = LONGITUD DE ONDA

Concentración inicial = 2.4 × 10⁻⁵ M
 Buffer de fosfatos (L) = 0.04

TABLA IV C
 CALCULO ESPECTROFOTOMETRICO DEL PK_a DE T496

λ	425 nm		400 nm		380 nm	
	A	PK _a	A	PK _a	A	PK _a
2	0.490	-	0.580	-	0.490	-
10.57	0.870	10.03	0.790	10.02	0.590	10.17
10.77	0.900	10.06	0.830	9.67	0.590	10.37
10.91	0.905	10.16	0.835	9.75	0.580	10.65
10.98	0.930	10.03	0.840	9.75	0.610	10.20
12	0.980	-	0.850	-	0.630	-

PK_a = 10.05 ± 0.29

A = ABSORBANCIA
 λ = LONGITUD DE ONDA

Concentración inicial = 5×10^{-5} M
 Buffer de tetraborato de sodio ($\mu = 0.05$)

El coeficiente de distribución verdadero (KD) es el que interesa en los estudios fisicoquímicos y está directamente relacionado con la K_a .

$$KD = \frac{(AHorg)}{(AHaq)} \quad (4)$$

Relacionando las ecuaciones 2, 3 y 4 llegamos a la ecuación 5 donde:

$$Kpa = KD - K_a \frac{Kpa}{[H^+]} \quad (5)$$

Por lo tanto graficando Kpa para distintos pH contra $Kpa/[H^+]$ se debe obtener una línea recta de cuya pendiente se calcula K_a y KD de la ordenada al origen.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Las gráficas que obtuvimos en nuestro caso se muestran en la Fig. 8. Los valores de KD y pK_a para la T544 fueron de 11.4 ± 0.15 y 8.42 ± 0.3 respectivamente y para la T514 de 8.2 ± 0.12 y 7.26 ± 0.25

IV) DEGRADACION DE LAS TOXINAS EN SOLUCIONES ACUOSAS.

Para poder calcular la vida media de las toxinas, necesitábamos conocer la constante de velocidad de la reacción, la cual obtuvimos al determinar el orden de reacción.

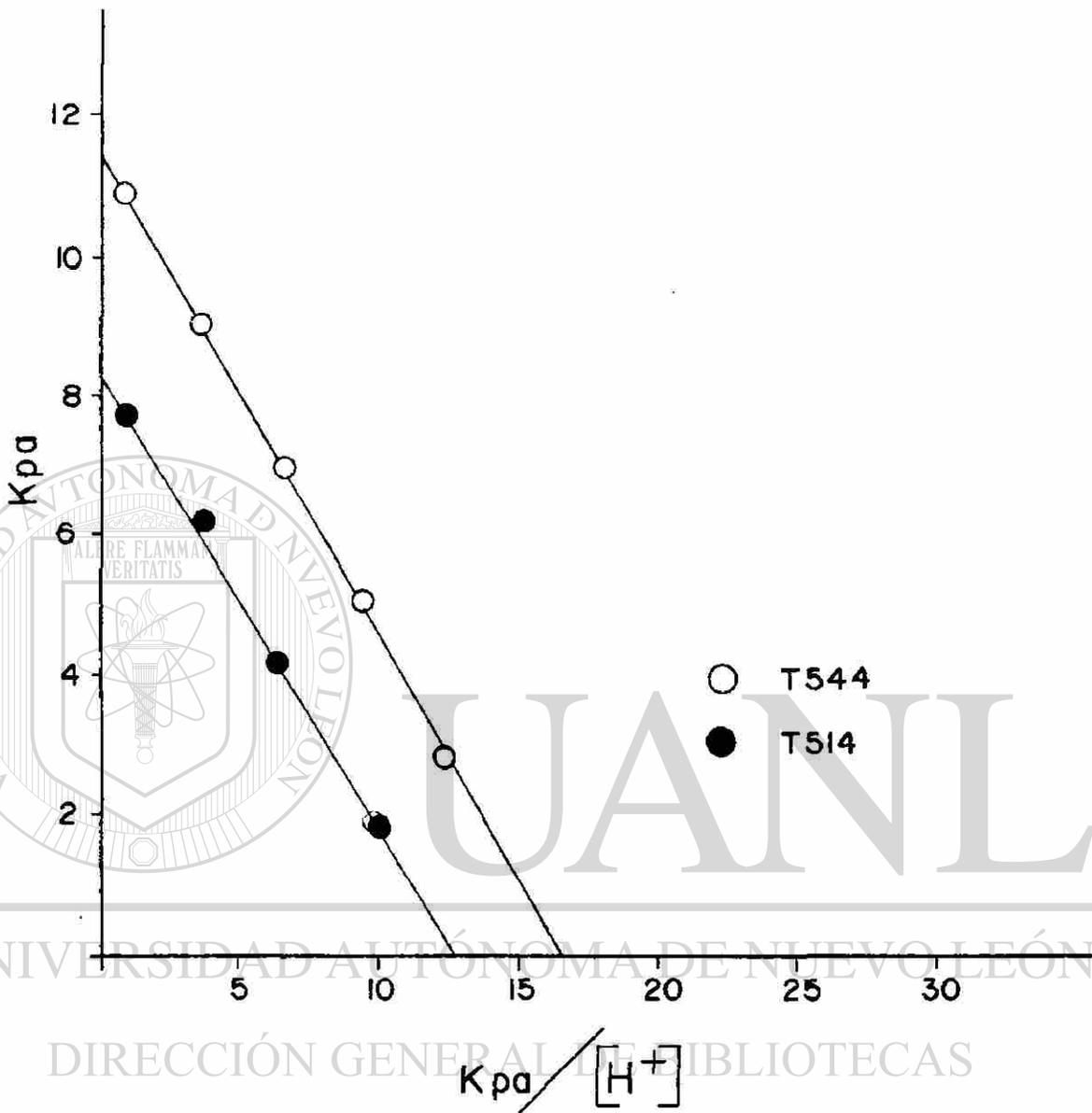


FIGURA 8 GRAFICA DE Kpa vs $Kpa/[H^+]$
 PARA CALCULAR KD Y Ka

CONCENTRACION INICIAL DE T544 = 1.8×10^{-4} M. (415nm)

CONCENTRACION INICIAL DE T514 = 1.9×10^{-4} M. (402 nm)

SOLVENTES: OCTANOL Y BUFFERS DE FOSFATOS

pH 6.1, 6.8, 7.6, 8 Y 8.3 ($\mu = 0.04$)

Empleamos el método gráfico (21) para averiguar la cinética de degradación que siguen las toxinas. Para cada orden de reacción existe una ecuación de velocidad (Tabla V). La linealidad, ya sea de C, LnC o 1/C en función del tiempo nos indica la cinética de la reacción. De la pendiente de la recta se calcula la constante de velocidad y ésta se sustituye en la ecuación de vida media correspondiente para el orden de reacción encontrado (Tabla V).

La cinética de degradación que siguieron las toxinas T544 y T514 fue de primer orden (Figs. 9a y b). Aquí se muestran algunas de las gráficas obtenidas para las diferentes condiciones del estudio; todas fueron semejantes.

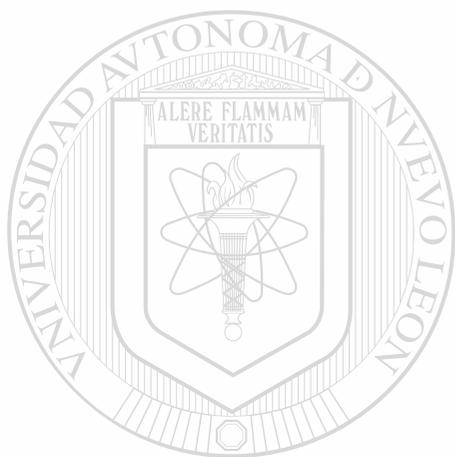
~~No hubo variación significativa del pH de las soluciones al cabo del tiempo.~~

Empleamos la ecuación $t_{1/2} = 0.693/k$ para calcular la vida media de cada una de las toxinas (Tabla VI).

Un ejemplo del efecto del tiempo y la temperatura sobre la T514 se puede observar en las figuras 10 y 11.

Para la T496 a 25° y 37°C y a pH ácidos se presentó también una cinética de primer orden (Fig. 12) y se calculó su vida media (Tabla VII), pero a pH básicos no fue posible calcular su

cinética ya que la T496 se transforma en otro compuesto en un tiempo relativamente corto, alrededor de 5 minutos (Figs. 13 y 14). A pH ácido y a 70°C aparece también el mismo compuesto. En la Fig.15 se presenta la cinética que siguió la T496 en dichas condiciones.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

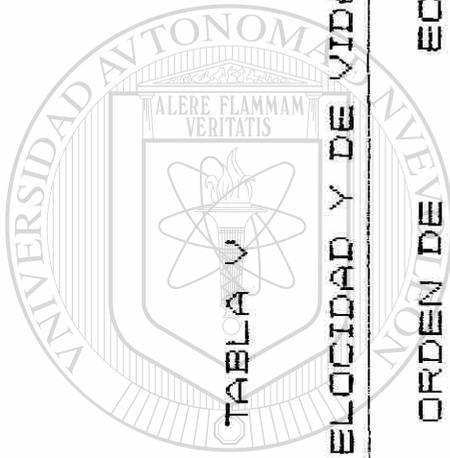


TABLA V

ECUACIONES DE VELOCIDAD Y DE VIDA MEDIA

EQUACION INTEGRADA DE VELOCIDAD	ORDEN DE REACCION	EQUACION DE VIDA MEDIA
$C = C^0 - kt$	0	$T_{1/2} = C^0 / 2k$
$\ln C = \ln C^0 - kt$	1	$T_{1/2} = 0.693 / k$
$1 / C = 1 / C^0 + kt$	2	$T_{1/2} = 1 / C^0 k$

$$C = C^0 - kt$$

$$\ln C = \ln C^0 - kt$$

$$1 / C = 1 / C^0 + kt$$

0

1

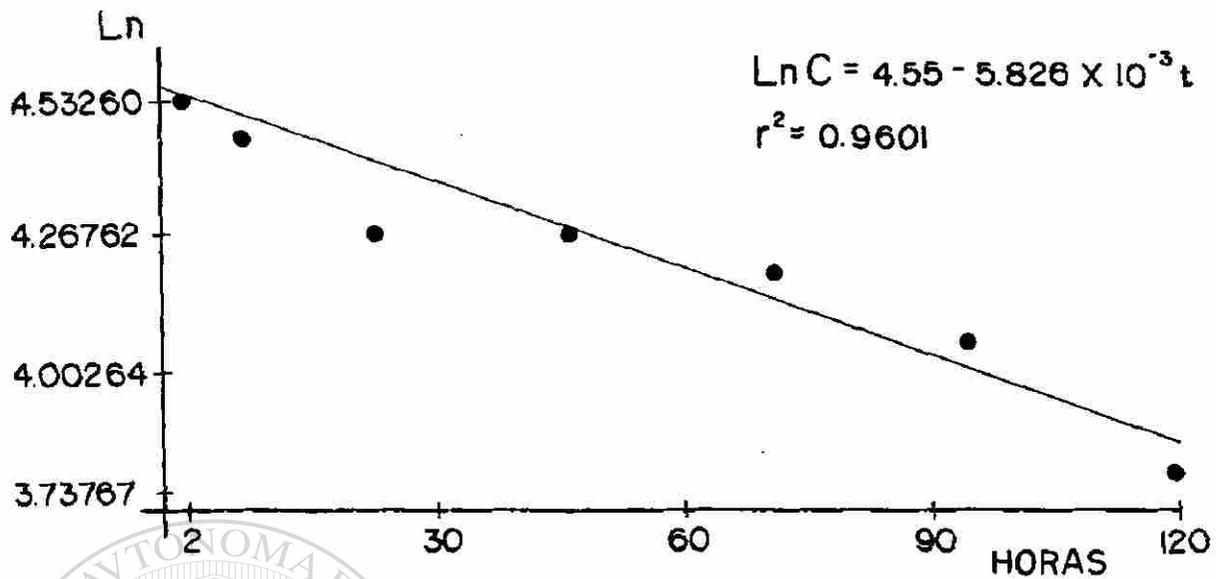
2

$$T_{1/2} = C^0 / 2k$$

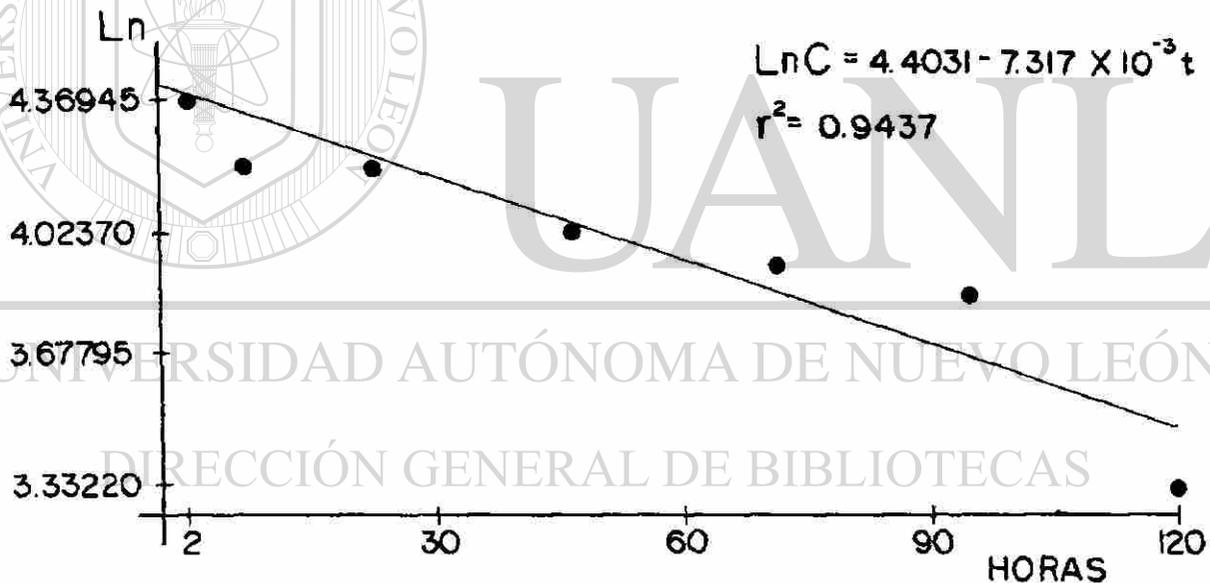
$$T_{1/2} = 0.693 / k$$

$$T_{1/2} = 1 / C^0 k$$

C^0 = CONCENTRACION INICIAL
 C = CONCENTRACION DESPUES DE UN TIEMPO t
 k = CONSTANTE DE VELOCIDAD
 t = TIEMPO

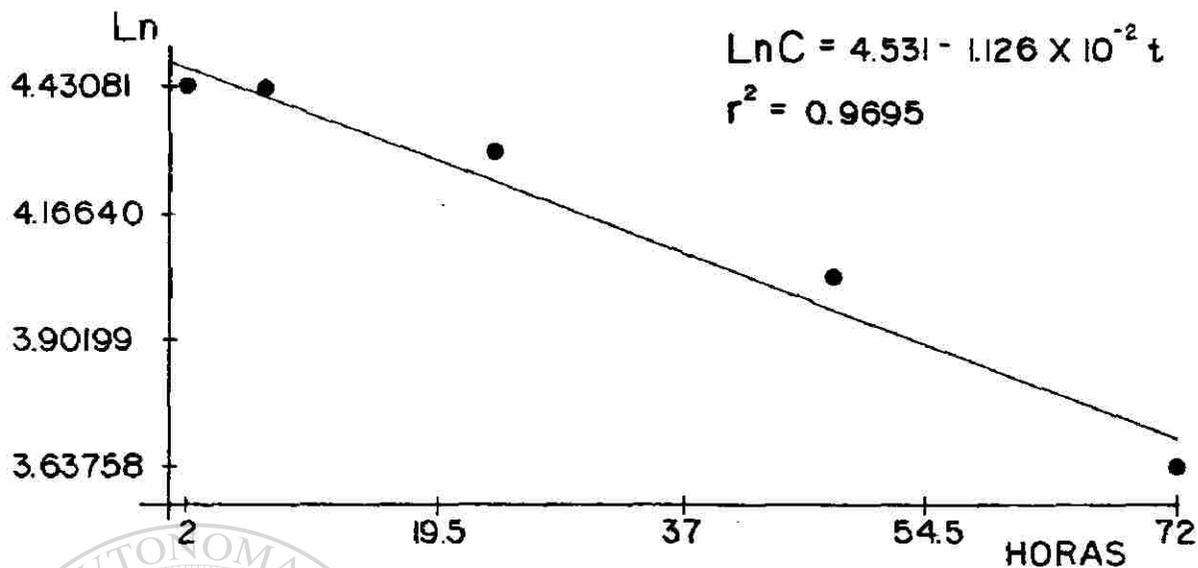


T544 LUZ I pH 25 25° C

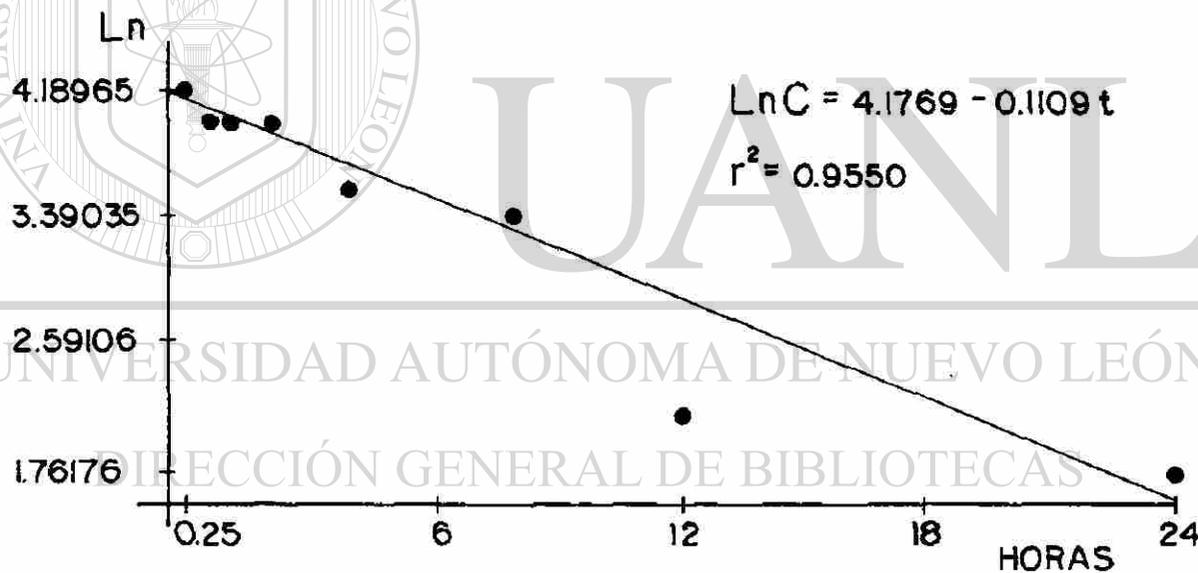


T544 OSCURIDAD I pH 25 70° C

FIGURA 9a GRAFICAS DE Ln T544 VS TIEMPO
 CONCENTRACION INICIAL = 0.025 mg/ml
 BUFFER DE FOSFATOS (μ = 0.2)



T514 LUZ 2 pH 9 25° C



T514 LUZ 2 pH 9 70° C

FIGURA 9b GRAFICAS DEL Ln T514 VS TIEMPO
CONCENTRACION INICIAL = 0.025 mg./ml.
BUFFER DE FOSFATOS (μ = 0.2)

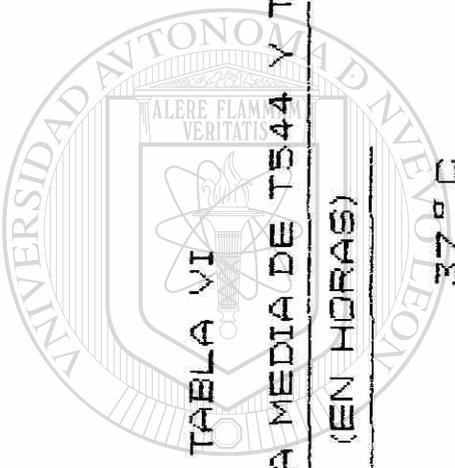


TABLA VI
 TIEMPO DE VIDA MEDIA DE T544 Y T514
 (EN HORAS)

70° C

37° C

25° C

BUFFER	L		D		L		D		L		D	
	*	**	*	**	*	**	*	**	*	**	*	**
2.5	119	123	490	213	153	148	140	158	87	59	188	59
6	96	85	181	149	97	60	138	70	64	24	102	23
9	53	61	141	129	43	25	108	45	12	6.2	34	6.5
12	34	-	56	-	10	-	27	-	37	-	5	-

L = LUZ

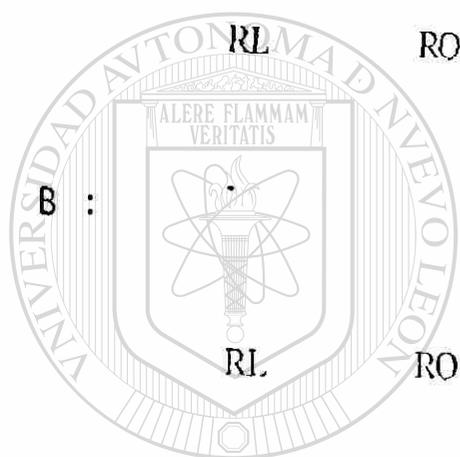
D = OSCURIDAD

* T544

** T514

- NO DETERMINADO

A :



RO

SL

SO

QL

QO

B :

RL

RO

SL

SO

OL

QO

UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Figura 10. Efecto del tiempo. A: 2 hr

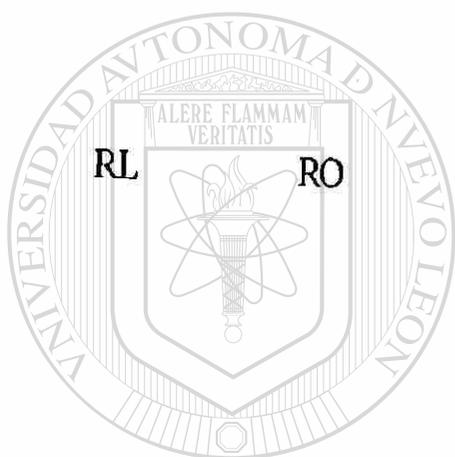
B: 8 hr

Cromatograma de T514 a pH2 (buffer de fosfatos $\mu = 0.2$);
25°C (R), 37°C (S) y 70°C (Q); luz (L) y oscuridad (O).

Concentración inicial: 0.025 mg/ml.

Adsorbente: Sílica gel G 60 Merck, espesor de capa 0.2 mm.

Sistema de solvente: B/A 3/1.



SL SO QL QO

UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Figura 11. Efecto de la temperatura.

Cromatograma de T514 a pH 2 (buffer de fosfatos $\mu = 0.2$); tiempo de incubación 8 hr, 25^oC (R), 37^oC (S) y 70^oC (Q); luz (L) y oscuridad (O).

Concentración inicial: 0.025 mg/ml.

Adsorbente: Sílica gel G 60 Merck, espesor de capa 0.2 mm.

Sistema de solvente: B/A 3/1

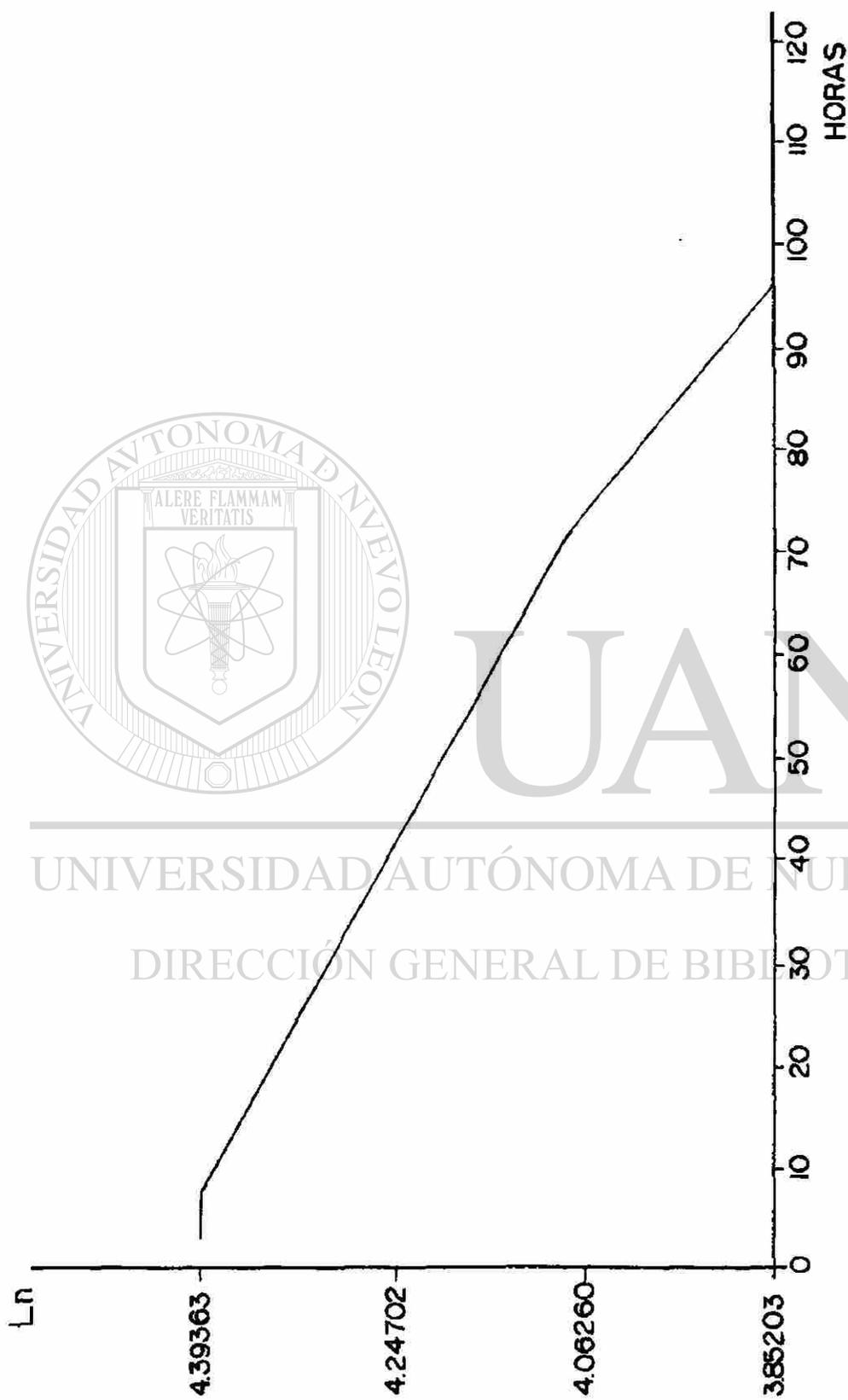
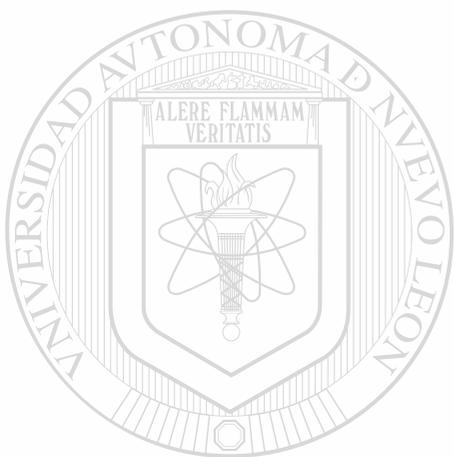


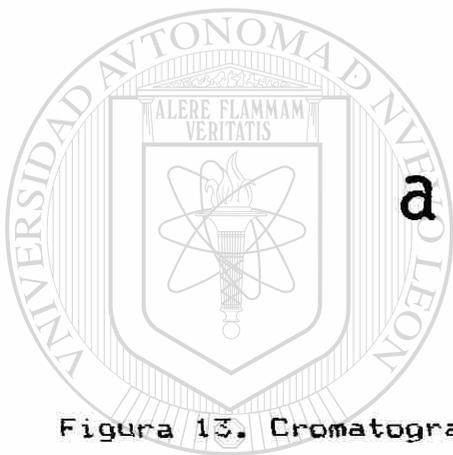
FIGURA 12 GRAFICA DE Ln T496 VS TIEMPO a 25° C, pH 2, LUZ.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

UANL

®



a b c d e

UANL

Figura 13. Cromatograma de T496 a distintos pH.

Condiciones: 24 hr, 37°C, luz.

Concentración inicial: 0.025 mg/ml.

Adsorbente: Sílica gel G 60 Merck, espesor de capa 0.2 mm.

Sistema de solvente: B/A 5/1.

a: Estándar de T496

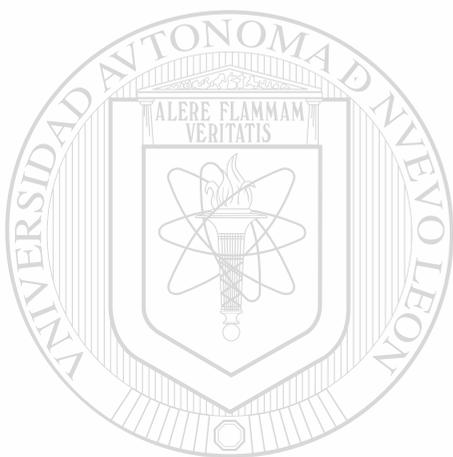
b: pH 2

c: pH 6

d: pH 9

e: pH 11.5

Buffer de fosfatos ($\mu = 0.2$).



a b c

UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Figura 14. Cromatograma de T496 a diferentes tiempos; luz, [®]
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS
pH9 (buffer de fosfatos $\mu = 0.2$).

Concentración inicial: 0.025 mg/ml

Adsorbente: Sílica gel G 60 Merck, espesor de capa 0.2 mm.

Sistema de solvente: B/A 5/1.

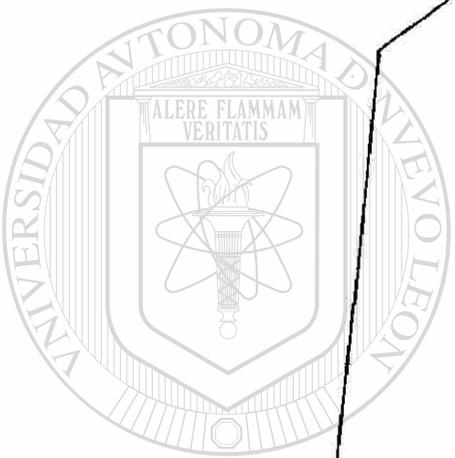
a: 0 minutos

b: 3 minutos

c: 5 minutos



FIGURA 15 GRAFICA DE Ln T496 VS TIEMPO a 70° C. PH 2, LUZ.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

DISCUSION

No existe ningún dato cuantitativo en la literatura con respecto a la solubilidad de las toxinas, aunque ya se tenía una idea de su liposolubilidad (8).

Este tipo de compuestos posee sustituyentes hidrófilos en su estructura antracénica (Fig. 4), lo que le confiere una liposolubilidad intermedia; como consecuencia de ello no son muy solubles ni en solventes polares ni en solventes no polares.

Las toxinas en medios alcalinos tienden a ionizarse debido a que son ácidos débiles, por eso presentan una mayor solubilidad en medios acuosos alcalinos que en medios acuosos ácidos (Tabla I).

Existe una diferencia estructural importante en el sistema antracénico no común. La T514 posee un grupo oxhidrilo alcohólico, lo cual la hace más polar que la T496 (Fig. 4).

La mayor polaridad de la T514 se ve claramente en su solubilidad en el agua y en los sistemas acuosos a diferentes pH (Tabla I) con respecto a las otras dos toxinas.

Además, comparando la solubilidad de la T514 a pH 2.5 y 6 (Tabla I) con los datos correspondientes de T496 y T544 se observa un aumento de solubilidad solamente para la primera al

aumentar el pH. Se podría pensar que esta tendencia se corresponde con los pK_a encontrados (ver más adelante).

La T544 presenta escasos grupos polares en la estructura no común (Fig. 4) por lo que posee una mayor solubilidad en los solventes no polares y de polaridad intermedia.

En general se confirman los resultados obtenidos en la determinación de solubilidad con los valores encontrados para el coeficiente de partición aparente (K_p) lípido/agua para las tres toxinas (17):

- El coeficiente de partición aparente es mayor en cloroformo que en n-hexano y butanol, lo cual reafirma la mediana liposolubilidad de estos compuestos.

- En medios acuosos ácidos se presenta un mayor coeficiente de partición aparente que en medios acuosos alcalinos, ya que en estos últimos existe ionización y, como señalamos anteriormente, mayor solubilidad en la fase acuosa.

- La toxina menos soluble en medios acuosos ácidos (T496) presenta el mayor coeficiente de partición aparente en cloroformo mientras que la más soluble (T514) presenta el menor coeficiente de partición aparente.

La titulación potenciométrica, comúnmente utilizada para la determinación del pK_a , no fue posible aplicarla en nuestro caso debido a la escasa solubilidad que presentan las toxinas en agua y por la cantidad de sustancia requerida para el estudio (aproximadamente 50 mg) si se realizara en solventes no acuosos (22).

Para la determinación del pK_a empleamos dos métodos indirectos (espectrofotométrico y de partición). Estos métodos se basan en los cambios químicos que presentan estos tipos de compuestos al variar el pH, lo cual origina especies ionizadas y no ionizadas. Cada una de ellas muestra propiedades físicas diferentes, lo cual las hace propicias para su determinación.

La base de la medición por el método espectrofotométrico, radica en las absorbancias diferenciales que presentan las distintas especies (ionizadas y no ionizadas) a distintas λ .

Se calcula el pK_a por medio de la ecuación 1 (Resultados). En este caso para que dicha ecuación se cumpla debemos de trabajar a los pH adecuados.

El método de partición para la medición del pK_a se fundamenta en la diferencia de solubilidad que existe entre las formas ionizadas y no ionizadas a los distintos pH empleados; tomando en cuenta los diferentes equilibrios que existen en solución, se

llega a la ecuación 5 (Resultados), a través de la cual se obtiene la K_a .

Para esta determinación se utiliza de preferencia n-heptano debido a que la disociación iónica es menor en este solvente. En nuestro trabajo no fue posible emplearlo dada la escasa solubilidad que presentan las toxinas en el mismo (Tabla I). En su lugar usamos n-octanol, el cual también ha sido reportado como solvente útil para determinar la K_a de algunos compuestos (19). En este caso se hace necesario saturar las fases entre sí antes de realizar la partición, para obtener una mejor separación de las mismas.

La cuantificación en este caso no se llevó a cabo por cromatografía en capa fina, a pesar de ser más sensible que la espectroscopía UV-Visible, debido a la degradación que presentaban las toxinas al evaporar con N_2 el octanol.

La T514 presentó la mayor acidez, le siguió la T544 y por último la T496. Este orden correlaciona bien con los datos de solubilidad (Tabla I). Observamos que la T514 con un pK_a alrededor de 7.2 (Tabla IVb) aumenta su solubilidad al pasar de pH 2 a 6, en el cual ya está parcialmente ionizada. Esto no sucede con las otras dos toxinas. Para la T544 con un pK_a alrededor de 8.4 (Tabla IVa) sucede lo mismo pero al cambiar de pH 6 a 9 (Tabla I).

Las ventajas que presentan estos métodos para la medición de la K_a es su sencillez, sensibilidad y confiabilidad; por lo cual recomendamos su uso. La posible diferencia en la eficiencia de ambos métodos se determinó mediante la prueba t de Student dando una p no significativa.

Con anterioridad a este trabajo, suponíamos que las toxinas fueran inestables, pero no conocíamos sus características. El evaluar la degradación de estos compuestos a diferentes condiciones de pH, temperatura e iluminación, nos permite una mejor manipulación en el aislamiento, purificación, almacenamiento y medios de reacción (23, 24, 25 y 26).

La mayoría de los procesos observados en la naturaleza siguen una cinética de primer orden (27). La T544 y T514 siguieron este tipo de cinética para su degradación en las diferentes condiciones empleadas.

Tanto la T544 como la T514 fueron más inestables en medios alcalinos, en la luz y al aumentar la temperatura (Fig. 11). En general la T514 presentó menor estabilidad que la T544.

Cabe aclarar que la degradación de la T514 a pH 12 (Tabla VI) no se llevó a cabo debido a que la extracción con cloroformo no fue posible. Esto se explica porque la toxina está totalmente ionizada a ese pH ($pK_a = 7.27 \pm 0.09$, $K_{pa} \text{ CHCl}_3/\text{pH } 12 = 0.064$).

La influencia del pH en la degradación que presentaron las toxinas se debe a su estructura fenólica. En medios alcalinos, este tipo de compuestos se transforma en su base conjugada; ésta es muy inestable y reactiva, dando lugar a diversos productos de oxidación (28).

La oxidación de fenoles se puede llevar a cabo por auto-oxidación a través de radicales libres (29). En nuestro caso, las toxinas presentan este tipo de estructura; la degradación que observamos con la luz, se podría explicar por este mecanismo. Además, se conoce que el aumento de temperatura acelera los procesos de oxidación.

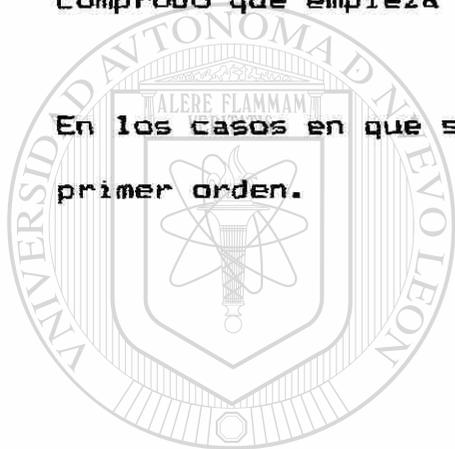
Los resultados obtenidos con la T496 los consideramos aparte por presentar un comportamiento distinto de las otras toxinas.

Este compuesto fue (en general) más inestable que los otros en todas las condiciones empleadas.

Como ya se mencionó anteriormente (Resultados), la T496 se transforma a otro compuesto a pH alcalino (Fig. 13) y a todas las temperaturas estudiadas (a pH ácidos solamente a 70°C), en un tiempo corto. Debido a esto no se pudo determinar su solubilidad, coeficiente de partición aparente lípido/agua y su degradación a pH 9 y 12.

Por el mismo motivo, la determinación del pK_a se llevó a cabo sólo por el método espectrofotométrico. A pesar de que ambos métodos (espectrofotométrico y de partición) se realizaron a pH alcalino, sólo se usó el primero debido a que su tiempo de análisis fue de 3 minutos. El análisis para el segundo no fue posible realizarlo en menos de 5 minutos, tiempo en el cual se comprobó que empieza la transformación de la T496 (Fig. 14).

En los casos en que se pudo medir, la cinética de T496 fue de primer orden.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CONCLUSIONES

1) La T514 resultó ser la menos liposoluble y la más ácida de las toxinas.

2) La T496 fue la más inestable en todas las condiciones.

3) Se podría pensar en una mayor absorción de la T496 en el organismo debido a su mayor coeficiente de distribución aparente lípido/agua. Sin embargo al pH gástrico las tres toxinas estarán no ionizadas y se podrán absorber sin dificultad.

4) Las tres toxinas se podrían depositar en grasa dada su liposolubilidad.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

BIBLIOGRAFIA

- 1) Fernández Nava, R. Comunicación Personal (1987).
- 2) Montoya, M., López, G. y Hernández, A. Intoxicación por *Karwinskia humboldtiana*. Conceptos actuales. Rev. Méd. I.M.S.S. 20 6, 707 (1982).
- 3) Padrón, F. Velázquez, T. Patología Experimental y Clínica de la Parálisis por *Karwinskia humboldtiana*. Revista Mexicana de Pediatría, 25, 225. (1956).
- 4) Puértolas, M., Nava, O., Medina, H., López, F. y Oyervides, J. Polirradiculoneuritis por *Karwinskia humboldtiana*. Informe de seis casos. Rev. Méd. I.M.S.S. (México), 22, 25, (1984).
- 5) Domínguez, X.A., Temblador, S. y Cedillo, M.E. Estudio Químico de la Raíz de la Tullidora (*Karwinskia humboldtiana*, Zucc). Rev. Latinoamer. Quím., 7, 46, (1976).
- 6) Guerrero, M., Piñeyro, A. and Waksman, N. Extraction and Quantification of Toxins from *Karwinskia humboldtiana* (Tullidora). Toxicon, 25, 5, 565, (1987).
- 7) Padrón Puyou, F. Estudio Clínico Experimental de la Parálisis por *Karwinskia humboldtiana* ("Tullidora") en Niños. Gaceta Med. México, 81, 299, (1951).

8) Escobar, A y Nieto, D. Aspectos Neuropatológicos de la Intoxicación con *Karwinskia humboldtiana*. Estudio Experimental. Gaceta Med. México, 95, 2, 163, (1965).

9) Kim, H. and Camp, B. Isolation of a Neurotoxic Substance from *Karwinskia humboldtiana* Zucc. (Rhamnaceae). Toxicon, 10, 83, (1972).

10) Dreyer, D., Arai, I., Bachman, C., Anderson, W., Smith, R. and Daves, D. Jr. Toxins Causing Noninflammatory Paralytic Neuronopathy. Isolation and Structure Elucidation. J. Am. Chem. Soc., 97, 4986, (1975).

11) Weller, R., Mitchell, J. and Daves, D. Jr. Buckthorn (*Karwinskia humboldtiana*) toxins. In: Experimental and Clinical Neurotoxicology, p. 336 (Williams and Wilkins, Eds.) Baltimore. (1980).

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

12) Mitscher, L., Gollapudi, S., Oburn, D., and Drake S. Antimicrobial agents from higher plants: Two dimethylbenzisochromans from *Karwinskia humboldtiana*. Phytochemistry, 24, 8, 1681 (1985).

13) Charlton, K. and Pierce K. A Neuropathy in Goats Caused by Experimental Coyotillo (*Karwinskia humboldtiana*). Poisoning (III). Pathology Veterinary, 7, 408 (1970).

14) Mitchell, J., Weller, R.O., Evans, H., Arai, I. and Daves G. D. Jr. Buckthorn Neuropathy: Effects of Intraneural Injection of *Karwinskia humboldtiana* toxins. *Neuropath. Appl. Neurobiol.*, 4, 85, (1978).

15) Bermúdez, M. V. Toxicidad aguda de la *Karwinskia humboldtiana* en diferentes especies de animales. Tesis Doctoral. (1989). Facultad de Medicina, U.A.N.L.

16) Bermúdez, M.V., González Spencer, D., Guerrero, M., Waksman, N. and Pifeyro A. Experimental Intoxication with fruit and purified toxins of Buckthorn (*Karwinskia humboldtiana*). *Toxicol.*, 24, 1091, (1986).

17) Vogel A.; Determination of Physical Constants. Textbook of Practical Organic Chemistry. 4th Edition p.227. Longman Scientific and Technical. (1978).
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

18) Hurwitz, A.R., and Liu S.T. Determination of Aqueous Solubility and pK_a Values of Estrogens. *Journal of Pharmaceutical Sciences.*, 66, 624, (1977).

19) Ezumi, K. and Kubota T. Simultaneous Determination of Acid Dissociation Constants and True Partition Coefficients by Analyses of the Apparent Partition Coefficients. *Chem. Pharm Bull.*, 28, 85, (1980).

20) Martin, A.N. Distribución de solutos entre disolventes no miscibles. Principios de Fisico-química para Farmacia y Biología. p.400. Editorial Alhambra. (1967).

21) Martin, A.N. Cinética de los procesos químicos y biológicos. Principios de Fisico-química para Farmacia y Biología. p.482. Editorial Alhambra. (1967).

22) Cookson, R.F. The Determination of Acidity Constants. Chemical Reviews. 74, 5 (1974).

23) Johnson, D.M.; Taylor, W.F.; Thompson G.F.; Pritchard R.A. Degradation of Fenprostalene in Aqueous Solution. Journal of Pharmaceutical Sciences 72 B (1983).

24) Hashimoto, N.; Tasaki, T. and Tanaka, H. Degradation and Epimerization Kinetics of Moxalactam in Aqueous Solution. Journal of Pharmaceutical Sciences 73 3 (1984).

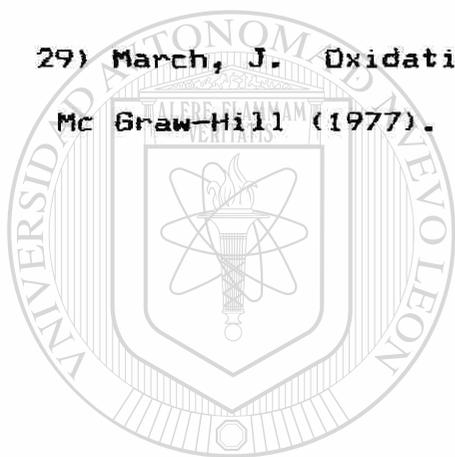
25) Miyamoto, E.; Odashima, S.; Kitagawa, I.; Tsuji A. Stability Kinetics of Ginsenosides in Aqueous Solution. American Pharmaceutical Association. 73 3 (1984).

26) Bakar, S. K.; Niazi, S. Stability of Aspirin in Different Media. American Pharmaceutical Association 72 9 (1983).

27) Banker, G.S. and Rhodes, C.T. Principles of First-Order Kinetics. Modern Pharmaceutics 7 p.88. Marcel Dekker Inc. (1979).

28) Reusch, W. H. Reacciones de los fenoles. Química orgánica. p.310 Mc Graw-Hill (1979).

29) March, J. Oxidations. Advanced Organic Chemistry p.1084. Mc Graw-Hill (1977).



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

UANI

