

CUANTIFICACIÓN DE T 514 (PEROXISOMICINA A1) EN DOS PLANTAS DEL GÉNERO *KARWINSKIA*

Noemí Waksman de Torres

Adriana Santoyo

Rosalba Ramírez

Alfredo Piñeyro-López

*Depto. de Farmacología y Toxicología, Fac. de Medicina,
Universidad Autónoma de Nuevo León,
Apartado Postal 146, Colonia del Valle,
Garza García, Nuevo León, México*

Rafael Fernández Nava

*Lab. de Botánica Fanerogámica,
Escuela Nacional de Ciencias Biológicas,
Instituto Politécnico Nacional,
Apartado Postal 17-564, 11410, México, D.F. México*

RESUMEN

Se describe la cuantificación de T 514 o peroxisomicina A1, posible agente antineoplásico, en dos plantas del género *Karwinskia*, obtenidas en distintas regiones de México. La mejor fuente de extracción de este compuesto resultó ser *K. parvifolia*, proveniente de Sinaloa y Sonora, por su alto contenido del compuesto en cuestión, su escasa variabilidad estacional y la presencia de pocas sustancias interferentes que pudieran complicar el procedimiento de extracción y purificación.

Palabras clave: *Karwinskia*, Rhamnaceae, peroxisomicina A1, México, antracenas diméricas.

SUMMARY

Quantification of T 514 (peroxisomicine A1), a dimeric hydroxyanthracenone with

potential antineoplastic effect is described, which was accomplished in two species of genus *Karwinskia*, collected in different locations of Mexico. The best source for the extraction of this compound proved to be *Karwinskia parvifolia*. This species was collected in Sinaloa and Sonora; the results showed a high amount of peroxisomicine A1, scarce seasonal variation and the presence of a few number of secondary metabolites which could interfere with the procedure of extraction and purification.

Key words: *Karwinskia*, Rhamnaceae, peroxisomicine A1, México, dimeric anthracenones.

INTRODUCCIÓN

Las plantas del género *Karwinskia* han sido objeto de estudio, tanto químico como toxicológico, debido a la presencia de antracenas fenólicas biológicamente

activas (Dreyer, 1979; Waksman, 1992). De entre todas ellas, la peroxisomicina A1 o T 514 es una antracenona dimérica aislada de las semillas de plantas de dicho género y ha demostrado tener citotoxicidad selectiva *in vitro* en células tumorales (Piñeyro, 1994). Esta sustancia denominada originalmente T 514, mostró una marcada tendencia a destruir peroxisomicina A1. Los experimentos de citotoxicidad realizados en nuestro laboratorio han sido corroborados por la Universidad de Freiburg (Alemania) y más recientemente en las instalaciones del NCI, donde, después de haber pasado la evaluación *in vitro* y un test preliminar *in vitro*, fue seleccionada por el Comité de Evaluación Biológica para continuar con la siguiente fase de evaluación. Ello ha motivado que en los últimos años se hayan estado intensificando las investigaciones farmacológicas para explorar la posibilidad de uso de este compuesto como agente antineoplásico. Debido a esto, nos vimos en la necesidad de optimizar las técnicas de purificación de esta sustancia, para pasar una de las etapas del proceso. Como primer paso, nos planteamos como objetivo organizar una búsqueda de la mejor fuente natural de extracción de la sustancia mencionada.

METODOLOGÍA

En todos los casos se realizaron los siguientes pasos:

Colección del material botánico y examen del mismo para su identificación, secándose los frutos a temperatura ambiente por un lapso de entre una y dos semanas; posteriormente se molieron y tamizaron en un molino con cribas de 2 mm de espesor; los frutos molidos se secaron durante una noche a 40°C. Los extractos obtenidos se evaporaron a presión reducida a tempera-

tura inferior a 40°C. Los extractos concentrados se disolvieron en benceno en placas de gel de sílice (entre 10 y 50 l según el caso y la concentración), junto con los patrones correspondientes (obtenidos en nuestro propio laboratorio). El desarrollo de las placas se llevó a cabo con benceno: metanol (60:6), 0.1% de ácido acético. Los disolventes utilizados en esta etapa fueron Merck, calidad analítica. La cuantificación por reflectancia *in situ* se realizó a 415 nm en un espectrofotómetro MQ III adicionado de Auto minigrator, según metodología propuesta por Guerrero, 1987.

MATERIAL BIOLÓGICO

Los frutos de *Karwinskia humboldtiana* (Roem. & Schult.) Zucc., utilizados para el presente estudio fueron colectados, antes de su maduración, en el año de 1994 entre los meses de agosto y octubre en las siguientes localidades (Fig. 1):

1. 10 km al norte de Ciudad Victoria, Tamaulipas, alt. 100 m.
2. 30 km al suroeste de Ciudad Victoria, Tamaulipas, alt. 150 m.
3. Municipio de Villa de García, Nuevo León.
4. Municipio de Cadereyta, Querétaro, matorral xerófilo, alt. 2,200 m.
5. 8 km al sur de Ixmiquilpan, Hidalgo, matorral xerófilo, alt. 2,100 m.
6. Municipio de Alfajayucan, Hidalgo, cañada profunda en bosque subtropical, alt. 2,050 m.
7. Sierra de La Giganta, cerca de La Paz, Baja California Sur, matorral xerófilo.
8. Ruinas Labna, 8 km al SE de Oxkucab, Yucatán, selva baja caducifolia, alt. 50 m.

Los ejemplares de *Karwinskia parvifolia* Rose, fueron colectadas en las mismas fechas en las siguientes localidades:

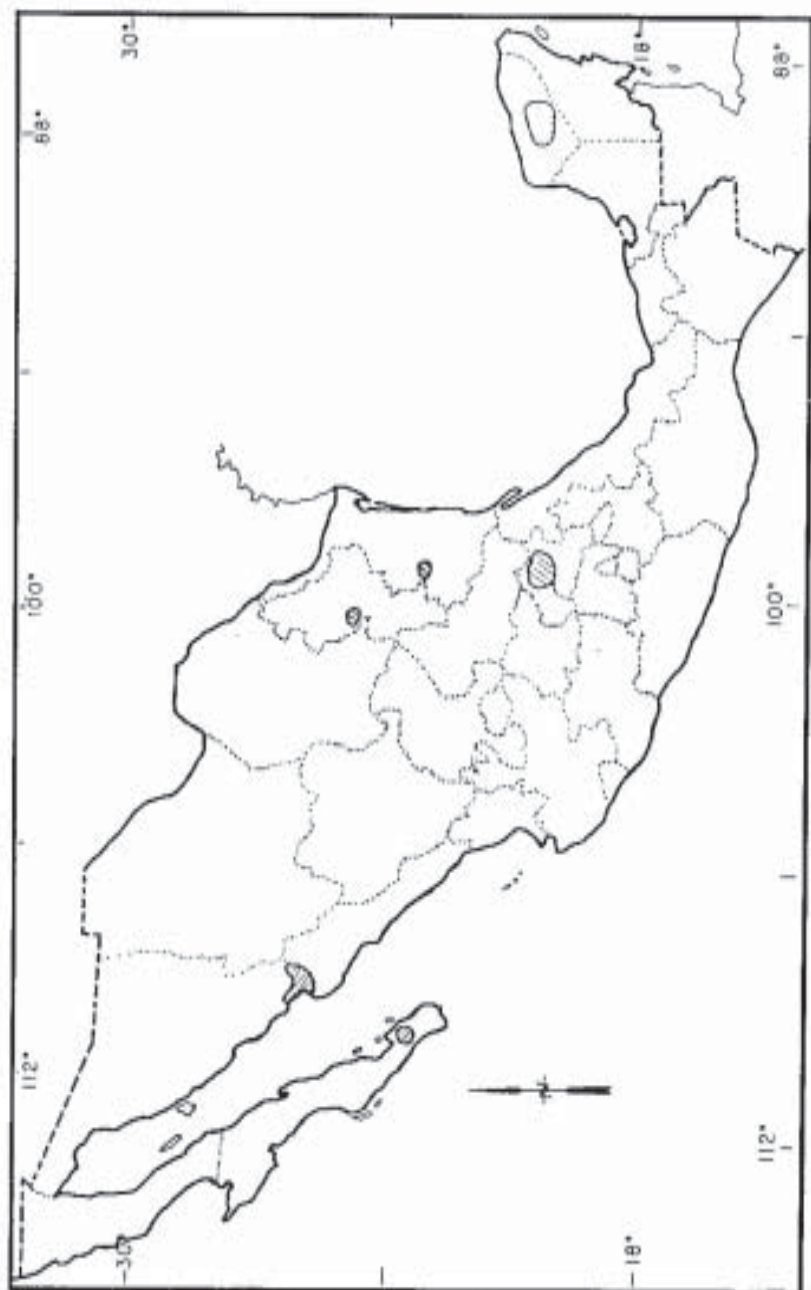


Fig. 1:
● Lugares de recolección de *K. humboldtiana*.
● Lugares de recolección de *K. parvifolia*.

9. Buenavista, 70 km al noroeste de Los Mochis, Sinaloa, alt. 84 m.
10. El Ranchito, idem.
11. Aguazarca, 100 km al noroeste de Los Mochis, Sinaloa, alt. 365 m.
12. El Fuerte, 74 km al noroeste de Los Mochis, Sinaloa, alt. 84 m.
13. Melchor Ocampo, en el municipio de Huatabampo, Sonora, a nivel del mar.
14. Francisco Solís, idem.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La fuente de extracción original de la toxina T 514 (peroxisomicine A1) ha sido la *K. humboldtiana*. Ya se había reportado previamente que el porcentaje de toxinas presente en esta especie varía con la época y lugar de recolección, así como el hecho que el metabolito objeto de nuestro estudio (T 514) está ausente o en muy poca proporción en los frutos maduros (Guerrero, 1987). Este análisis se realizó con frutos provenientes del estado de Nuevo León y la conclusión a que se llegó como resultado de éste y otros estudios similares fue que el mejor lugar para recolección resultaba ser la zona de Villa de García entre los meses de septiembre a noviembre.

En el presente trabajo se analizaron muestras provenientes de distintos estados de la República mexicana (Fig. 1). Los especímenes del uno a 8 se identificaron como *K. humboldtiana*. Esta especie es la más importante del género en términos de área de distribución y en donde las poblaciones son más numerosas. Además, es la que ofrece mayor dificultad para delimitar, ya que presenta polimorfismo a nivel de hojas, flores y frutos. Las características morfológicas que permitieron diferenciarla de las demás especies del género son: hojas mayores de 2.5 cm de largo y de más

de 2 cm de ancho, pubescencia ausente en el envés de las hojas maduras, ápice obtuso, base redondeada u obtusa, pecíolos de menos de 1 cm de largo; pedúnculos florales no bifurcados, glabros; sépalos y pétalos de más de 1 cm de largo; frutos de más de 5 mm de diámetro (Fernández, 1992).

Todas las poblaciones del presente estudio se ajustaron muy bien a la descripción tipo; sin embargo, existen dos zonas donde la especie también prospera, siendo éstas Baja California Sur y la península de Yucatán, donde los individuos presentan ligeras variantes morfológicas principalmente en cuanto a tamaño y forma de las hojas, lo cual dio indicios de la posibilidad de realizar mayor cantidad de estudios para proponer una segregación a nivel de variedades de la misma.

Para realizar las extracciones se reemplazó el cloroformo (solvente reportado en la literatura hasta el momento para este objetivo) por acetato de etilo; después de comprobar que los resultados obtenidos eran similares y por razones de toxicidad y costos decidimos efectuar este cambio. El eluyente utilizado para la cromatografía también se seleccionó como aquel que proporcionara mejor resolución de los productos a cuantificar; bajo las condiciones reportadas los R_f de los productos cuantificados fueron: 0.147 para la T514; 0.282 para la T 544 y 0.377 para la T 496.

Tal y como se señalara en estudios anteriores, en las condiciones de extracción empleadas se observan tres metabolitos secundarios principales, que de acuerdo a la nomenclatura establecida por Dreyer y col, se llamaron T 514, T 544 y T 496. La valoración cuantitativa del contenido de estos compuestos se reportan en la Tabla I. Aquí

TABLA I

Cuantificación de toxinas en *Karwinskia humboldtiana*

LUGAR DE PROCEDENCIA	PORCENTAJES DE		
	T514	T544	T496
1	0.20	0.30	-
2	0.35	0.40	1.10
3	0.70	0.90	1.20
4	0.33	0.30	-
5	0.38	0.78	0.80
6	0.28	0.70	1.00
7	0.38	2.00	1.38
8	0.67	0.70	1.06

TABLA II

Cuantificación de toxinas en *Karwinskia parvifolia*

LUGAR DE PROCEDENCIA	PORCENTAJES DE	
	T 514	T 496
9	0.50	1.20
10	1.03	1.33
10 (fruto maduro)	0.78	0.90
11	1.00	1.25
11(fruto maduro)	0.88	1.15
12	0.75	0.90
12 (fruto maduro)	0.70	0.80
13	0.83	1.25
14	0.55	1.08

es posible observar que solo la especie proveniente de Villa de García (N.L.), de Yucatán y de las cercanías de Ciudad Victoria (Tamaulipas) (muestras 2, 3 y 8), presentan una cantidad considerable de T 514. En los otros ejemplares de *K. humboldtiana* cuantificados, se pudo observar un metabolito con Rf semejante al de la T514, pero que presenta distintas propiedades de fluorescencia; la falta de identidad de este metabolito con la T 514, fue comprobado por análisis por HPLC (Salazar, 1996).

También existen reportes previos de la existencia de otras dos especies del género *Karwinskia*, cuyo contenido en T 514 resultó elevado: *K. subcordata* y *K. parvifolia* (Waksman, 1989). En el presente trabajo decidimos realizar una valoración cuantitativa del contenido de peroxisomicina A1 (T 514) en varios ejemplares de *K. parvifolia*, proveniente de los estados de Sinaloa y Sonora y compararlos con los obtenidos para *K. humboldtiana*. Dicha especie fue evaluada morfológicamente para su clasificación, con base en las consideraciones establecidas previamente, que permiten diferenciarla claramente de *K. humboldtiana* por tener hojas, sépalos, pétalos y frutos mucho más pequeños (Fernández Nava, 1992).

Los resultados de la cuantificación se observaron en la Tabla II.

De acuerdo con los resultados aquí presentados se puede concluir que la especie *K. parvifolia* es mejor fuente de extracción de la peroxisomicina que *K. humboldtiana* por lo siguiente:

a) Menor cantidad de otras antracenas isómeras en la matriz del extracto; esto unido a la ausencia del compuesto llamado T 544 haría más sencilla la purificación de

la peroxisomicina A1.

b) Menor variación en el contenido de T 514 para especímenes recolectados en distintas zonas (Tabla II).

c) Semejanza en el patrón cromatográfico entre el fruto maduro y el inmaduro, lo cual hace menos complicada la colecta del mismo. Ya se había señalado la ausencia total de T 514 en el fruto maduro de *K. humboldtiana*.

Debido a la lejanía del lugar de origen de esta especie con respecto a nuestro laboratorio, se sugirió con estos resultados la posibilidad de iniciar un estudio agrónomico experimental de trasplante de la misma en nuestra región y evaluar su proceso de adaptación, fructificación y producción del compuesto del interés. Esto se está llevando a cabo actualmente con muy buenos resultados.

LITERATURA CITADA

- Dreyer A., Arai., Bachman C., Anderson Jr. W., Smith R. y Daves G.D. 1975. Toxins causing noninflammatory paralytic neuropathy. Isolation and Structure determination. *J. Amer. Chem. Soc.*, 97:4985-4990.
- Fernández Nava. 1992. Nombres comunes y distribución geográfica del género *Karwinskia* (Rhamnaceae) en México. *Anales Ins. Biol. Univ. Nac. Autón. México, Ser. Bot.*, 63:1-23.
- Guerrero M., Piñeyro A. and Waksman N. 1987. Extraction and quantification of toxins from *Karwinskia humboldtiana* (Tullidora). *Toxicon*, 25:565-568.
- Piñeyro López A., Martínez de Villerreal L. and González Alanís R. 1994. *In vitro*

- selective toxicity of Toxin T 514 from *Karwinskia humboldtiana* (buckthorn) plant on varios human tumor cells lines. *Toxicology*, 92: 217-227.
- Salazar Ma. L., Piñeyro A. and Waksman N. 1996. A reverse phase HPLC method for quantification of Peroxisomicine and other Anthracenomic compounds. *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.*, 19-9:1391-1403.
- Sepúlveda Saavedra J., Ida Van Der Klei, Ineke Kaiser, Piñeyro-López Alfredo, Win Harder and Marten Veenhuis, 1992. Studies on the effect of toxin T 514 on the integrity of peroxisomes in methylotrophic yeasts. *Fems Microbiology Letters*, 91: 207-212.
- Waksman N., L. Martínez L. y R. Fernández. 1989. Chemical and Toxicological screening in genus *Karwinskia*. *Rev. Latinoamer. Quím.*, 20: 20-29.
- Waksman N. and Ramírez R., 1992. Isolation of a new dimeric anthracenone from *Karwinskia parvifolia*, *Rev. Latinoamer. Quím.*, 23: 25-27.