

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 371 598**

51 Int. Cl.:
G01N 31/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **02712239 .9**
96 Fecha de presentación: **31.01.2002**
97 Número de publicación de la solicitud: **1402253**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **31.03.2004**

54 Título: **UN PROCESO PARA EL AISLAMIENTO DE UN OXIDANTE PRINCIPAL PERJUDICIAL DEL HUMO DE CIGARRILLO.**

30 Prioridad:
22.06.2001 IN DE07012001

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
05.01.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
05.01.2012

73 Titular/es:
**COUNCIL OF SCIENTIFIC AND INDUSTRIAL
RESEARCH
RAFI MARG
NEW DELHI 110 001, IN**

72 Inventor/es:
CHATTERJEE, Indu, Bhusan

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 371 598 T3

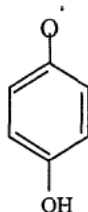
Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Un Proceso para el Aislamiento de un Oxidante Principal Perjudicial del Humo de Cigarrillo

Campo de la Invención

La presente invención se relaciona con un proceso para el aislamiento de p-benzosemiquinona de la fórmula 1:



5

un oxidante principal perjudicial del humo de cigarrillo. Más particularmente la presente invención proporciona un proceso para el aislamiento de p-benzosemiquinona, un oxidante principal perjudicial del humo de cigarrillo, que es responsable del daño oxidativo de las proteínas y el ADN.

Antecedentes de la Invención

10 La exposición al humo de cigarrillo es la causa principal de enfermedades mortales como bronquitis, enfisema, otras enfermedades del tracto respiratorio, enfermedades cardíacas coronarias, cáncer de pulmón y otros tumores malignos [1-5]. De hecho, el humo del cigarrillo es la causa principal de cáncer de pulmón, ahora el cáncer más común a nivel mundial. Dado que los métodos para dejar el consumo del tabaco por las campañas de salud pública y las leyes contra el tabaquismo aprobadas por los Gobiernos locales han tenido éxito limitado, el método más viable es la prevención de los efectos perjudiciales provocados por el humo del cigarrillo. Se sabe que el humo del cigarrillo contiene aproximadamente 4000 componentes, de los cuales aproximadamente 3000 componentes están presentes en la fase de gas y aproximadamente 1000 componentes en la fase de alquitrán [6]. Los oxidantes en la fase de gas, tales como O_2 , H_2O_2 , NO, el radical peroxi son extremadamente inestables [7]. Si se pasa la fase de gas en regulador de fosfato y la solución resultante se agrega a solución de albúmina, no ocurre oxidación de la proteína (7). Evidentemente, se espera que cualquier daño provocado por la fase de gas se restrinja a la cavidad bucal y el tracto respiratorio superior [8]. Por otra parte, los oxidantes presentes en el alquitrán son bastante inestables y estos son evidentemente responsables de producir daño oxidativo en el pulmón, corazón y otros órganos [7,9]. Aproximadamente 48% de los componentes de alquitrán son solubles en agua [10] y se sabe que el extracto acuoso de alquitrán produce daño oxidativo de las macromoléculas biológicas que incluyen las proteínas y el ADN [7, 11, 12]. Sin embargo, es sorprendente imaginar cómo muchos de los componentes presentes en el extracto acuoso de alquitrán son responsables de producir daño oxidativo en el sistema biológico. Hasta ahora, entre los muchos componentes del humo de cigarrillo, se ha sugerido que están implicados tres clases de compuestos como agentes causantes en el desarrollo del cáncer y enfermedades degenerativas, a saber, (i) hidrocarburos aromáticos policíclicos (ii) nitrosaminas y (iii) radicales libres.

30 Dentro de los hidrocarburos policíclicos, el benzo [a] pireno es de hecho el mejor estudiado. Pero este no es un carcinógeno y requiere activación metabólica a través del sistema de citocromo P450 para llegar convertirse en el carcinógeno final, epóxido de benzo [a] pireno diol. Más aún, la concentración de benzo [a] pireno en humo de cigarrillo es escasa, aproximadamente 10 a 40 ng por cigarrillo [13] y el benzo [a] pireno no puede explicar el daño oxidativo de la proteína producida por el humo de cigarrillo.

35 Entre las nitrosaminas específicas de tabaco (TSNA), las más estudiadas son N1-nitrosomicotina (NNN) y 4-(metilnitrosamino) -1- (3-piridil) -1- butanona (NNK). De nuevo los TSNA no son carcinógenos directos y también sus concentraciones en el humo de tabaco varían ampliamente. El rango observado para NNN es 0.004 μg a 1.35 μg y para NNK, <0.004 μg a 1.75 μg por cigarrillo. Se concluye que el TSNA en el humo de cigarrillo no es un índice suficiente para el potencial carcinógeno del humo del cigarrillo [14]. De nuevo el TSNA no puede explicar el daño oxidativo de las proteínas.

Otro aspecto del componente perjudicial del humo de cigarrillo es el radical libre. Pryor y sus colegas realizaron estudios considerables sobre la química de radical libre del humo de cigarrillo y sus implicaciones toxicológicas. Estos autores sugieren que el radical libre relativamente estable principal en alquitrán de cigarrillo puede ser un complejo de quinona / hidroquinona que es un sistema de oxidorreducción activo y que este sistema de oxidorreducción es capaz de reducir el oxígeno molecular para producir superóxido, que puede dar lugar a peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilo [15], que pueden conducir eventualmente a daño oxidativo de las macromoléculas biológicas pero observamos que el daño oxidativo de las proteínas producidas por los radicales de alquitrán estables

45

no se inhibe por SOD o el catalizador indica que el daño oxidativo no está mediado por el radical de superóxido o peróxido de hidrógeno. Los solicitantes han observado adicionalmente que los radicales de alquitrán oxidan las proteínas en atmósfera de nitrógeno y en la ausencia de oxígeno molecular, lo que indica una interacción directa de los radicales de alquitrán con las micromoléculas biológicas. Sin embargo, estos autores admiten que en el radical principal han identificado en el alquitrán que actualmente no es un monorradical y probablemente no es una especie única (16). ellos también admiten que el alquitrán del cigarrillo es una mezcla increíblemente compleja y debido a que los radicales de alquitrán no se han aislado e identificado sin ambigüedades, cualquier conclusión que se relacione con la química o la bioquímica de los radicales de alquitrán se debe considerar como provisional [15].

En el documento Chemical Research in Toxicology, vol. 11, no. 5, páginas 441-448, 00-00-1998, W.A. PRYOR: "Fractionation of aqueous cigarette tar extracts: fractions that contain the tar cause DNA damage", Pryor reporta el fraccionamiento de los extractos acuosos del alquitrán de cigarrillo preparados a partir de alquitrán de cigarrillo maduro en fracciones utilizando separación de columna Sephadex. Las fracciones se analizan mediante UV y espectroscopía de resonancia paramagnética electrónica (EPR) y cromatografía de gas/espectrometría de masa (GC/MS). Pryor identifica los radicales o- y p-benzosemiquinona, sin embargo, el radical p-benzosemiquinona no se aísla ni se caracteriza en forma separada.

En el documento Free Radical Biology and Medicine, vol. 27, no. 9-10, páginas 1064-1079, 00-00-1999, Koustubh Panda: "Vitamin C prevents cigarette smoke induced oxidative damage of proteins and increased proteolysis", existe una discusión de que el extracto de humo de cigarrillo contiene oxidantes estables que oxidan las proteínas de plasma humano, albúmina de suero bovino, homopolímeros de aminoácido y también provoca degradación oxidativa extensa de las proteínas microsómicas y que la vitamina C evita los oxidantes de proteínas inducidos por el humo del cigarrillo. No se ha divulgado información con respecto al aislamiento y caracterización de oxidantes perjudiciales a partir de extracto acuoso del humo de cigarrillo.

Vale la pena mencionar que en la década de 1960, la industria del tabaco en general demostró en su propio laboratorio que el alquitrán del cigarrillo provoca cáncer en animales [17]. A lo largo de la década de 1960 los investigadores de las empresas trataron de descubrir los elementos tóxicos en el humo de cigarrillo con la convicción que si se pueden identificar los componentes tóxicos, estos agentes se pueden retirar o eliminar y se puede crear un cigarrillo "seguro", que suministraría nicotina sin suministrar sustancias tóxicas [17]. Pero a finales de la década de 1970, la industria del tabaco abandonó esta investigación particular, debido a que el objetivo probado resultó ser inalcanzable. Este es un problema técnicamente difícil de resolver y resultó ser intratable [17].

Muy recientemente, hemos observado que el extracto acuoso del humo de cigarrillo / alquitrán completo contiene un oxidante principal perjudicial en cantidad relativamente alta, aproximadamente $190 \pm 10 \mu\text{g}$ por cigarrillo. Los solicitantes han aislado el oxidante, han determinado la estructura y encontrado que es p-benzosemiquinona. El oxidante casi cuantitativamente representa el daño oxidativo de las proteínas producidas por el extracto acuoso del humo de cigarrillo / alquitrán completo. El oxidante también es responsable de la oxidación del ADN. Nagata et al. (18) ha mostrado que los radicales semiquinona se unen al ADN y lo dañan. También se sabe que el daño oxidativo del ADN está implicado con mutación y cáncer. El oxidante es relativamente estable. Su vida útil en el estado sólido a temperatura ambiente es aproximadamente 48 horas. La presencia del oxidante estable en el humo de cigarrillo explicaría los efectos nocivos del humo colateral y tabaquismo pasivo (7). El oxidante está ausente en el tabaco no fumado y se produce durante el quemado del cigarrillo (7). Los solicitantes han identificado un número de compuestos / agentes químicos aquellos desactivan el oxidante y se pueden utilizar como antidotos.

Objetos de la Invención

El objeto principal de la presente invención se relaciona con el aislamiento y caracterización de un oxidante principal perjudicial de extracto acuoso de humo de cigarrillo / alquitrán completo, que es principalmente responsable del daño oxidativo de las macromoléculas biológicas que incluyen proteínas y ADN.

Otro objeto de la invención es proporcionar un método para el ensayo cuantitativo del oxidante de humo de cigarrillo (cs) presente en la solución de cigarrillo completa.

Todavía otro objeto de la invención es la identificación de compuestos / agentes químicos aquellos desactivarán el oxidante y actuarán como antidotos para combatir el efecto perjudicial del oxidante.

Resumen de la Invención

Se ha aislado un oxidante perjudicial principal relativamente estable del extracto acuoso de humo de cigarrillo / alquitrán completo y se purifica al grado de >99% mediante extracción diferencial del solvente, cromatografía de capa delgada y HPLC preparativa. El rendimiento es aproximadamente 16 g por cigarrillo, que es aproximadamente 8.4% de la cantidad ($\approx 190 \mu\text{g}$) presente en el humo de un cigarrillo. Se obtienen resultados comparables de doce marcas diferentes de cigarrillos comerciales. El oxidante purificado se cristaliza en cristales amarillos muy pálidos

con forma de aguja fina de una solución en acetona. Se ha encontrado que la estructura del oxidante es p-benzosemiquinona como se evidencia por análisis elemental, espectro de masa, UV, fluorescencia, IR, H-RMN, C-RMN y espectroscopía ESR así como también mediante propiedades químicas. El oxidante se puede medir cuantitativamente mediante espectroscopía de absorción UV o HPLC.

- 5 En la p-benzosemiquinona, el electrón no pareado se traslada sobre una estructura principal aromática que contiene heteroátomos que conducen a diferentes formas mesoméricas, a saber, formas aniónicas, neutras y catiónicas (Fig.1, ver ref. 19). Esta resonancia explicaría la estabilidad de la semiquinona. La vida útil del oxidante almacenado en estado sólido a temperatura ambiente en aire y bajo oscuridad es aproximadamente 48 horas como se determina por su capacidad de oxidar el ácido ascórbico. En solución acuosa a pH 7.4, la vida útil es aproximadamente 1.5
- 10 horas. Utilizando la oxidación de BSA o la degradación oxidativa de proteínas microsómicas de pulmón de conejillo de indias como sistemas modelo, el oxidante representa cuantitativamente el daño oxidativo producido por el extracto acuoso del humo de cigarrillo completo. El oxidante cs también es responsable de la oxidación del ADN.

Se ha identificado un número de compuestos / agentes químicos que inactivan el oxidante y actúan como antídotos.

Descripción Detallada de la Invención

- 15 De acuerdo con lo anterior, la presente invención proporciona un proceso para el aislamiento de p-benzosemiquinona de acuerdo con las etapas de la reivindicación 1.

Las modificaciones adicionales se establecen en las reivindicaciones dependientes.

La presente invención se describe con referencia a los ejemplos aquí adelante.

Breve Descripción de los Dibujos Acompañantes

- 20 Figura 1 muestra formas Mesoméricas de p-benzosemiquinona, a) aniónicas, b) y c) neutras y d) catiónicas;

Figura 2. Banda de cromatografía de capa delgada de la solución de metanol después de liofilización – indica la banda del oxidante cs.

Figura 3. Perfil HPLC del extracto de butanol después de TLC. El oxidante cs (etapa 6) eluye como un pico principal en el tiempo de retención de 8.808 min. La cantidad de oxidante cs eludido es ~12 µg.

- 25 Figura 4. Perfil HPLC del oxidante cs puro, eludido en el tiempo de retención de 8.808 min.

Figura 5. Cromatografía de capa delgada del oxidante cs puro ($R_f = 0.26$).

Figura 6a. Perfil espectroscópico de fluorescencia del oxidante cs en metanol. La excitación es a 293 nm y se mide el barrido de emisiones de 300 nm a 800 nm. Las emisiones máximas están a 329.6 nm y a 651.4 nm.

- 30 Figura 6b. Perfil espectroscópico de fluorescencia del oxidante cs en metanol. La excitación es a 224 nm y se mide el barrido de emisiones 225 nm a 800 nm. Las emisiones máximas son a 329.6 nm y a 652.6 nm.

Figura 7a. Perfil espectroscópico de fluorescencia del oxidante cs en metanol. La emisión es a 330 nm y se mide el barrido de excitación de 220 nm a 325 nm. Las excitaciones máximas son a 228.2 nm y 293.8 nm.

Figura 7b. Perfil espectroscópico de fluorescencia del oxidante cs en metanol. La emisión es a 651 nm y se mide el barrido de excitación de 220 nm a 650 nm. Las excitaciones máximas son a 229.2 nm y a 294.8 nm.

- 35 Figura 8. Estructura de cristal del oxidante cs puro.

Figura 9. Perfil espectrofotométrico UV del oxidante cs en metanol. Este tiene dos absorciones máximas uno a 293.4 nm y otro a 223.0 nm.

Figura 10. Estabilidad del oxidante sólido mantenido a 25°C bajo oscuridad. La estabilidad se determina por su capacidad de oxidar el ácido ascórbico. Se mide el ácido ascórbico mediante análisis HPLC a 254 nm.

- 40 Figura 11. Curva estándar de ácido ascórbico con base en análisis HPLC a 254 nm.

Figura 12. Estabilidad del oxidante cs en regulador de fosfato de potasio 50 mM a 25° C medido por su potencia de oxidar el ascorbato como se evidencia por el área HPLC.

Figura 13. Reducción cuantitativa de ferricitocromo c mediante el oxidante cuando se mide mediante la formación de ferrocitocromo c con tiempo a 550 nm. La reacción se lleva a cabo en regulador de fosfato de potasio 50 mM, pH 7.4, mantiene la concentración final de ferricitocromo c a 100 μ M. Un nmol del oxidante reduce 0.71 nmoles de ferricitocromo c.

Figura 14. Curva estándar del oxidante sobre la base del área HPLC a 294 nm. Se utilizan diferentes cantidades del oxidante cs que varían de 10 ng a 100 ng en 20 μ l de solvente móvil.

Figura 15. Curva estándar del oxidante sobre la base de la reducción del citocromo c al utilizar diferentes cantidades del oxidante que varían de 1 μ g a 5 μ g.

Figura 16. Espectro de masa del oxidante cs puro.

Figura 17. Perfil espectrofotométrico UV de hidroquinona en metanol. Este tiene dos absorciones máximas, uno a 293.8 nm y otro a 224.2 nm.

Figura 18. Perfil espectrofotométrico UV del oxidante cs almacenado a temperatura ambiente en la oscuridad durante 8 días. Los dos absorciones máximas están a 293.6 nm y a 224.4 nm.

Figura 19. Perfil espectrofotométrico UV de mezcla equimolar de p-benzoquinona e hidroquinona en metanol. Hay un hombro de cerca de 242 nm (el λ_{\max} de p-benzoquinona).

Figura 20. Perfil espectroscópico de fluorescencia de hidroquinona en metanol. La excitación es a 294 nm y se mide el barrido de emisiones 300 nm a 800 nm. Las emisiones máximas son a 329.4 nm y a 651.6 nm.

Figura 21. Perfil espectroscópico FTIR del oxidante cs.

Figura 22. Perfil espectroscópico FTIR de hidroquinona.

Figura 23. Perfil espectroscópico de H-RMN del oxidante cs en CD_3COCD_3 .

Figura 24. Perfil espectroscópico de H-RMN de hidroquinona en CD_3COCD_3 .

Figura 25. Perfil espectroscópico comparativo de los H-RMN de (a) oxidante cs y (b) hidroquinona.

Figura 26. Perfil espectroscópico de H-RMN del oxidante cs después de reducción con ditionita de sodio.

Figura 27. Perfil espectroscópico de C-RMN del oxidante cs en CD_3COCD_3 .

Figura 28. Perfil espectroscópico de C-RMN de la hidroquinona en CD_3COCD_3 .

Figura 29. Espectro EST a temperatura ambiente de oxidante cs, frescamente preparado de 100 cigarrillos. El espectro se registra en un espectrómetro JES-REIX ESR (Tokyo, Japón). Los parámetros espectrales son como sigue: frecuencia de microondas, 9.4356 GHz; potencia, 2 mW; ancho de modulación de campo, 0.4 mT; frecuencia modulada, 100 kHz; constante de tiempo, 0.3 seg; índice de barrido, 2.5 mT/seg.

Figura 30. Espectro ESR a temperatura ambiente del oxidante cs maduro (10 días), preparado de 400 cigarrillos.

Figura 31. Perfil HPLC de la solución cs completa analizada en columna de sílice (LiChrospherR Si 60, Merck) – indica el tiempo de retención, el área y la concentración (13.6682 %) del oxidante cs.

Figura 32. Perfil HPLC de la solución cs de extracto acuoso analizada en columna de sílice (LiChrospherR Si 60, Merck) – indica el tiempo de retención, el área y la concentración (13.6682 %) del oxidante cs.

Figura 33. Perfil HPLC de la solución cs completa analizada en la columna ODS (Shim-pack CLC-ODS, Shimadzu). El oxidante cs se eluye a 13.467 min.

Figura 34. Perfil HPLC del oxidante cs puro analizado en la columna CLC-ODS (Shim-pack CLC-ODS, Shimadzu) se eluye en el tiempo de retención de 13.458 min.

Figura 35a. SDS-PAGE de las proteínas microsómicas de pulmón de conejillo de indias tratadas con la solución cs completa y el oxidante cs. Línea 1, microsomas no tratados; línea 2, microsomas tratados con 50 μ l de la solución cs; línea 3, microsomas tratados con 100 μ l de la solución cs; línea 4, microsomas tratados con 10 μ g de oxidante cs; línea 5, microsomas tratados con 20 μ g de oxidante cs.

5 Figura 35b. Barrido densitométrico de las bandas de proteína de diferentes líneas como en la Figura 35a.

Descripción Detallada de las Tablas

Tabla 1. Estimación de potencia oxidativa en diferentes etapas de purificación del oxidante cs.

Tabla 2. Oxidación BSA mediante las fracciones de la solución cs en diferentes etapas de purificación

10 Realizaciones de la invención. Aislamiento y purificación de un componente perjudicial principal (oxidante cs) de alquitrán de cigarrillo o solución de humo de cigarrillo completa.

(i) Se montan cinco cigarrillos comerciales con filtro marca Indian (74 mm) con un contenido de alquitrán de 25 mg cada uno se montan en tubos de vidrio que penetran el agujero en el tapón de vidrio de un matraz de vidrio Erlenmeyer de un litro con un brazo lateral y terminado aproximadamente 2 cm de distancia de la parte inferior del matraz. El matraz se sumerge en una mezcla de hielo y sal y el brazo lateral se conecta a una bomba de agua. Los cigarrillos se encienden y el alquitrán se deja condensar y se deposita en el fondo del matraz. En total se recolecta el alquitrán de veinte cigarrillos. El frasco se lleva a temperatura ambiente y se extrae el alquitrán con 20 ml de regulador de fosfato de potasio 50 mM pH 7.4. La solución se filtra a través de un filtro Millipore de 0.45 μ m. El pH del filtrado se ajusta a 7.4 con la adición de 20 μ l de 2N solución de NaOH. El color de la solución es amarillo parduzco. Esta solución se ha denominado solución de alquitrán. En lugar de aislar el oxidante cs del alquitrán del cigarrillo, este se puede aislar del humo de cigarrillo completo. En este caso, el humo de 20 cigarrillos en lotes de 5 se pasa directamente en 20 ml de regulador de fosfato de potasio 50 mM, pH 7.4, y el resto del procedimiento es similar a aquel utilizado en el alquitrán. La solución obtenida después de pasar el cs completo en el regulador se ha denominado como la solución cs completa. El rendimiento del oxidante cs es similar independiente de si se utiliza solución de alquitrán o solución cs completa como el material de partida.

25 (ii) La solución de alquitrán filtrada obtenida en la etapa 1 se extrae tres veces con 15 ml de cloruro de metileno. La capa de cloruro de metileno inferior se descarga y la capa acuosa de color amarillo superior se recolecta y se llama extracto acuoso de humo de cigarrillo.

(iii) La capa acuosa de la etapa 2 se extrae dos veces con 10 ml de n-butanol saturado con agua y el extracto de butanol amarillo agrupado luego se liofiliza en el liofilizador Lyolab a -55°C bajo vacío. Se extrae el material liofilizado dos veces con 1 ml de acetona grado HPLC y la solución de acetona se seca en un Speed Vac (Savant, SC 100) y se disuelve en 120 μ l de metanol grado HPLC.

(iv) La solución de metanol obtenida en la etapa 3 luego se somete a TLC de banda utilizando placas de sílice de 10-cm x 10 cm no fluorescentes de 0.2- mm de espesor (láminas de aluminio TLC, Gel de sílice 60, MERCK, No 1.05553). El material de 5 cigarrillos (\approx 30 μ l de solución de metanol) se descubre a lo largo de la línea aproximadamente 1.5 cm por encima de la parte inferior. La placa se desarrolla utilizando tolueno: acetato de etilo (80 : 20) durante 15 min. Cuando la parte frontal del solvente desarrollada está a 0.5 cm de distancia de la parte superior, la placa se toma y se seca a temperatura ambiente utilizando un secador. Después de secado, se cortan tiras de 0.5 cm del lado derecho y el lado izquierdo de la placa y se mantienen en una cámara de yodo durante 3 minutos para la ubicación de las bandas. La banda que corresponde a Rf 0.26 (Fig. 2) se raspa de cada placa, se toma en un tubo eppendorf de 1.5 ml y se extrae durante 30 min con 600 μ l de acetona grado HPLC con agitación ocasional. Los tubos luego se centrifugan durante 10 min a temperatura ambiente a 12000 rpm. La capa de acetona sobrenadante se toma cuidadosamente con otro tubo eppendorf. El extracto de acetona agrupado se seca finalmente en un tubo eppendorf en una centrifuga.

(v). Al material seco obtenido en la etapa 4, que aparece como agujas amarillas pálidas, se agrega 200 μ l de agua milli Q y a estos 200 μ l se agrega n-butanol saturado con agua y se centrifuga durante 5 min seguido por centrifugación durante 5 min a 12000 rpm a temperatura ambiente. La capa superior de n-butanol se retira cuidadosamente y se seca en un tubo de vidrio pequeño en una centrifuga. Rendimiento \approx 400 μ g de 20 cigarrillos. En esta etapa, el oxidante cs es 98.5% puro como se evidencia por análisis HPLC.

(vi) La muestra total obtenida después de la etapa 5 se disuelve en 400 μ l del solvente móvil y 20 μ l de esta solución (\approx 20 μ g de oxidante) se inyecta en un instrumento Shimadzu 10AVP HPLC con una columna de sílice Merck de 25 cm de fase normal (LiChrospher® Si 60) utilizando el detector UV y un chromatopac C-R6A adherido. Se realizó un total de 20 inyecciones en diferentes lotes. Las otras condiciones mantenidas son como sigue. Absorbancia: 294 nm

ES 2 371 598 T3

(El λ_{\max} del oxidante en metanol es 293.4 nm como se evidencia por barrido espectrofotométrico UV, ver Fig. 9)
Solvente móvil: cloruro de metileno: metanol (90:10).

	Índice de flujo:	0.5 ml/min
	Presión:	29 kg/cm ²
5	Temperatura:	25° C
	Tiempo de retención del oxidante:	8.808 min

El oxidante se eluye como un pico principal en tiempo de retención de 8.808 min (Fig. 3). El efluente HPLC agrupado obtenido de diferentes lotes de inyección se recolecta en un beaker de vidrio de 25 ml y se seca en la centrifugadora. El oxidante aparece como cristales con forma de aguja amarillos muy débiles. El oxidante purificado con HPLC, cuando se inyecta bajo condiciones idénticas, aparece como un pico único en el perfil HPLC en un tiempo de retención de 8.808-min (Fig. 4), que indica 100% de pureza. Rendimiento \approx 300 μ g de 20 cigarrillos.

(vii) Sobre la base de la cantidad de muestra cargada y el área pico correspondiente (arbitraria) del oxidante cs obtenido en el análisis HPLC, el porcentaje de recuperación del oxidante activo de la solución cs completa se calcula como sigue. Se diluye cuatro μ l de la solución completa cs filtrada (ver etapa 1) en 80 μ l con solvente móvil y se inyecta 20 μ l en la columna HPLC.

El área arbitraria del oxidante en 20 μ l, que corresponde al tiempo de retención 8.808 min, es 340583. Por lo tanto, el área en 80 μ l \equiv 1362332 \equiv 4 μ l de la solución cs completa.

Así, el área arbitraria del oxidante en un ml de la solución cs completa \equiv 3.4 X 10⁸.

Debido a que un ml de la solución cs completa es equivalente a un cigarrillo (ver etapa 1), el área del oxidante cs por cigarrillo = 3.4 X 10⁸.

El rendimiento del oxidante puro después de purificación de HPLC de 20 cigarrillos = 300 μ g.

Así, el rendimiento de un cigarrillo = 15 μ g = 15000 ng.

A partir de la curva estándar (ver figura 14), el área pico HPLC de 100 ng del oxidante cs puro = 190000.

Por lo tanto, el área pico de 15000 ng, equivalente a un cigarrillo = 2.85 X 10⁷.

Así la recuperación del oxidante cs puro de la solución cs completa es (2.85 X 10⁷ X 100) / 3.4 X 10⁸ = 8.4%.

(viii) La potencia oxidativa del oxidante cs en diferentes etapas de purificación se determina al medir la oxidación de albúmina de suero bovino (BSA). Los resultados se presentan como nmoles de la proteína carbonilo formada por mg de BSA (Tabla 1). En diferentes etapas de purificación, como se indica bajo el 'Procedimiento de aislamiento y purificación' anterior, se utiliza una cantidad del material equivalente a un veinteavo de un cigarrillo (solución de 50 μ l) en casos en solución de alquitrán (etapa 1), extracto acuoso (etapa 2) y extracto de butanol (etapa 3). En el caso del extracto de butanol, se toma 50 μ l de la solución de butanol, el butanol se evapora en una centrifuga, el residuo seco se pesa y se utiliza directamente para la oxidación del BSA. Para los materiales obtenidos en la etapa 4 (TLC) y etapa 6 (HPLC), las cantidades utilizadas con 15 μ g y 10 μ g respectivamente.

(ix) Criterios de pureza del oxidante cs

(a) TLC: Se obtiene una única mancha en TLC, Rf 0.26, utilizando tolueno: acetato de etilo (80:20) como se desarrolla el solvente (Fig. 5).

(b) HPLC: Se obtiene un pico único mediante análisis HPLC. El tiempo de retención es 8.808 min utilizando el solvente móvil, cloruro de metileno: metanol (90:10) (Fig. 4).

(c) Punto de fusión: El compuesto se funde a 162°C.

(d) Espectroscopía de fluorescencia:

El barrido espectrofotométrico UV del oxidante cs (5 mg en 1 ml de metanol) produce dos absorciones máximas a 293.4 nm y a 223.0 nm (ver fig. 9). Se realiza espectroscopía de fluorescencia en solución de metanol como se utiliza para barrido espectrofotométrico UV. Cuando se excita a 293 nm, el barrido de emisiones se monitorea de 300 nm a 800 nm y cuando se excita a 224 nm, se monitorea el barrido de emisiones de 225 nm a 800 nm. Cuando se excita a 293 nm, la máxima emisión observada es a 329.6 nm y 651.4 nm (Fig. 6a). Cuando se excita a 224 nm, la máxima emisión observada es a 329.6 nm y a 652.6 nm (Fig. 6b). Cuando el barrido de excitación se monitorea manteniendo la emisión a 330 nm, la máxima excitación observada es a 228.2 nm y a 293.8 nm (fig. 7a). De nuevo, cuando la emisión se mantiene a 651 nm y se monitorea el barrido de excitación, la máxima excitación observada es a 229.2 nm y a 294.8 nm (Fig. 7b). Los perfiles espectrales observados indican que dos absorciones máximas vienen del mismo compuesto y se atribuyen a la pureza del oxidante cs aislado.

Ensayo cuantitativo de daño de la proteína al medir el contenido de carbonilo.

El sistema de incubación contiene 1 mg de BSA y 50 μ l de la solución cs o sus cantidades equivalentes obtenidas en diferentes etapas de purificación en un volumen final de 200 μ l de regulador de fosfato de potasio 50 mM, pH 7.4. La incubación se lleva a cabo a 37°C durante 1 hora. Se mide la proteína carbonilo mediante reacción con 2, 4 - dinitrofenil hidrazina (DNPH) siguiendo el método de Levine et al (Methods Enzymol. 186: 464-478, 1990) similar a aquel hecho antes en nuestro laboratorio (Panda et al., Free Radic. Biol. & Med. 27: 1064-1079, 1999). Después de la incubación de BSA con la solución cs de fase completa, el extracto acuoso de cs o el oxidante cs (volumen final 200 μ l), las proteínas se precipitan con 200 μ l de 20 % de solución de ácido tricloroacético seguido por un lavado con 200 μ l de 10 % de solución de ácido tricloroacético para liberar el glóbulo de los componentes cs. A este glóbulo lavado luego se agrega 500 μ l de solución DNPH 10 mM en HCl 2M y se incuba a 37 °C durante 1 h con centrifugación ocasional. Después de esto, la proteína se precipita de nuevo con 500 μ l de 20% de solución de ácido tricloroacético fría y el glóbulo primero se lava con 500 μ l de 10% de solución de ácido tricloroacético seguido por tres lavados sucesivos con 1 ml de una mezcla de etanol: acetato de etilo (1:1, v/v). Finalmente, se disuelve el precipitado lavado en 1 ml de clorhidrato guanidío 6M (pH 2.3) y se mide la absorbancia a 390 nm utilizando un espectrofotómetro Hitachi de doble rayo modelo U 3020 contra un blanco de reactivo de HCl 2M. Los resultados se expresan como n moles de fenilhidrazonas formadas por miligramo de proteína utilizando un coeficiente de extinción molar de 22,000. A partir de los valores fenilhidrazona brutos obtenidos después de incubación de BSA con el oxidante cs, los valores de fenilhidrazona de aquellos obtenidos con BSA no tratado se deducen para obtener los valores de la proteína carbonilo pura formada. Los resultados se dan en la tabla 1.

El oxidante cs purificado solo representa cuantitativamente la oxidación de la proteína producida por la solución de humo de cigarrillo completa.

Utilizando la oxidación del BSA como un sistema modelo, la declaración hecha anteriormente se ha sostenido mediante las siguientes observaciones.

(i) La oxidación del BSA producida por la solución cs completa como se evidencia mediante la formación de carbonilo, se retiene en el oxidante cs purificado (uno estable). Los componentes de la solución cs completa se descargan en las diversas etapas de aislamiento y purificación del oxidante tal como extracción de solvente, el TLC y HPLC no producen oxidación de BSA. Por ejemplo, en la etapa de extracción de solvente, la oxidación de BSA es prácticamente nula mediante el extracto de cloruro de metileno (Etapa 2, bajo aislamiento y purificación).

(ii) El TLC del material liofilizado (Etapa 4, bajo aislamiento y purificación) produce seis bandas que incluyen la banda del oxidante cs a $R_f = 0.26$ como se muestra en la Fig. 2. Se recolectan los extractos de todas las bandas separadamente como se describió anteriormente y se utilizan para oxidación de BSA. La oxidación de BSA solo se produce mediante el extracto de la banda que corresponde a $R_f = 0.26$ que contiene el oxidante cs. Los extractos de todas las otras bandas que tienen $R_f = 0.12, 0.14, 0.16, 0.30, 0.80$ así como también que forman los valores iniciales, cuando se utilizan separadamente o en conjunto, no producen oxidación de BSA.

(iii) Durante el HPLC del extracto de butanol en la penúltima etapa de purificación (Etapa 6, bajo aislamiento y purificación), solo el efluente del pico principal (tiempo de retención 8.808 min, Fig. 3b) que corresponde al oxidante cs produce la oxidación de BSA. Otros picos menores que tienen tiempos de retención que varían de 4.55 min a 7.25 min no producen oxidación de BSA.

(iv) El análisis de la solución cs completa utilizando la columna de sílice indica la presencia de diversos picos que tienen tiempos de retención que varían de 5.717 min a 17.782 min que incluyen un pico principal de oxidante cs que tiene tiempo de retención 8.813 min (Fig. 31). Cuando en lugar de la solución cs completa, se utiliza el extracto acuoso de cs, el oxidante se eluye en un tiempo de retención de 8.808 min (Fig. 32), que es idéntico al pico del oxidante cs que tiene tiempo de retención de 8.808 min como se revela mediante análisis HPLC del oxidante cs puro (Fig. 4). Solo el efluente del pico que corresponde al oxidante cs (tiempo de retención 8.813 min) produce la oxidación de BSA. Los efluentes de otros picos separadamente o en conjunto no oxidan al BSA.

(v) El análisis de HPLC de la solución cs completa también se lleva a cabo utilizando columna ODS. Los parámetros utilizados son:

Columna: Shim-pack CLC-ODS (M)

Solvente móvil: agua: metanol (95:5)

5 Índice de flujo: 0.8 ml/min

Presión: 147 kgf/cm²

Temperatura: 25°C

Absorbancia: 288 nm (X max del oxidante cs en agua)

10 El análisis HPLC de la solución cs completa utilizando la columna ODS producida aproximadamente 13 picos que incluyen un pico principal a 13.467 min (Figura 33), que es el pico del oxidante cs como se evidencia por el análisis HPLC del oxidante cs puro (tiempo de retención 13.46 min, figura 34). Bajo esta condición también, como se observa utilizando la columna de sílice como se indicó anteriormente, solo el efluente del pico que corresponde al oxidante cs (tiempo de retención 13.46 min) produce la oxidación de BSA. Los efluentes de los otros picos separadamente o en conjunto no oxidan el BSA.

15 Se debe mencionar que aunque la resolución obtenida utilizando la columna ODS es mejor que aquella de la columna de sílice, la columna ODS no se puede utilizar de forma rutinaria para analizar la solución de humo de cigarrillo o el oxidante cs. Después de unas pocas series con solución cs completa, el extracto acuoso de cs o el oxidante cs, la columna ODS experimenta degeneración como se evidencia mediante contrapresión incrementada y pérdida de la capacidad de resolución.

20 Los resultados anteriores indican que solo el oxidante cs es responsable de la oxidación de BSA. Ningún otro componente de la solución cs completa puede oxidar el BSA. Esto se confirma adicionalmente mediante los resultados presentados en la Tabla 2. La tabla muestra que cuando se utiliza la solución cs completa, un área pico de 17030×10^3 que corresponde al oxidante cs (tiempo de retención, 8.813 min) produce 7.53 nmoles de carbonilo, que es equivalente a 4.42×10^{-7} nmol de carbonilo por área unitaria. La tabla (Tabla 2) muestra adicionalmente que
25 cuando en lugar de la solución cs completa, se utiliza el oxidante cs purificado con HPLC, un área pico de 19010×10^{13} que tiene un tiempo de retención de 8.808 min produce 9.56 nmoles de carbonilo, que es equivalente a 5.03×10^{-7} nmol de carbonilo por área unitaria. Los resultados indican que la oxidación de BSA producida por la solución cs completa se reproduce casi cuantitativamente en forma separada mediante el oxidante puro solo cuando el último se utiliza en cantidad que corresponde a aquella presente en la solución cs completa.

30 El oxidante cs no solo representa cuantitativamente el daño oxidativo de las proteínas originadas por la solución cs completa, sino que también es un componente perjudicial principal del humo de cigarrillo como se evidencia por su contenido. A partir del análisis HPLC (p.8, bajo recuperación del oxidante cs), se observa que el oxidante cs presente en un ml de la solución cs completa (equivalente a un cigarrillo) da un área arbitraria de 3.4 ± 108 . A partir de la curva HPLC estándar, 100 ng del oxidante cs puri da un área de 190000. El contenido del oxidante cs en la
35 solución cs completa de un cigarrillo es aproximadamente $190 \pm 10 \mu\text{g}$. Se obtienen rendimientos comparables de 12 marcas diferentes de cigarrillos comerciales con o sin filtros estándar. Se debe mencionar que el oxidante cs no está presente en tabaco sin humo pero se forma durante el quemado del cigarrillo.

El oxidante cs purificado representa cuantitativamente el daño oxidativo de las proteínas producidas por la solución cs completa se evidencia adicionalmente mediante SDS-PAGE de las proteínas microsómicas de pulmón de
40 conejillo de indias tratado con la solución cs completa así como también el oxidante cs (figura 35a). La figura muestra que comparado con microsomas no tratados (línea 1), se produce daño sustancial mediante 50 μl de la solución cs (línea 2) y 100 μl de la solución cs (línea 3) respectivamente. Cuando la solución cs se reemplaza por el oxidante cs puro en cantidades presentes en la solución cs, el daño es aún mayor como se describe en la línea 4 (10 μg del oxidante cs) y línea 5 (20 μg del oxidante cs). La Figura 35b muestra el barrido desitométrico de las bandas
45 de proteína de diferentes líneas (línea 1-5), que indican la representación gráfica del grado comparativo de daño producido por la solución cs y el oxidante cs en cantidades presentes en la solución cs.

El oxidante cs induce el daño oxidativo del ADN.

Se ha reportado que la solución de humo de cigarrillo produce el daño del ADN como se evidencia mediante rompimiento de hebra individual y formación de 8-hidroxiguanosina. También se muestra que el daño del ADN está
50 implicado con mutación y cáncer. Aproximadamente 80% del cáncer de pulmón en el mundo se origina por el humo

de cigarrillo. Ahora los solicitantes producen datos para indicar que el daño oxidativo inducido por el humo de cigarrillo del ADN se origina por el oxidante cs.

- 5 Se incuban dos mg de ADN de plásmido con 15 µg del oxidante cs en regulador de fosfato de potasio 50 mM, pH 7.4 a 37° C durante una hora en un volumen final de 200 µl. Se mantiene un sistema de incubación de control sin oxidante cs. Después de incubación, se precipita el ADN con 500 µl de etanol, se centrifuga, se lava libre de sal con 70% de etanol, se liofiliza, se almacena a -70°C y se analiza posteriormente para daño oxidativo. El daño del ADN se mide mediante la producción de 8-hidroxiguanosina y 5-hidroxi-6-metil hidantoina utilizando masa GC. Los resultados muestran que el oxidante cs induce la formación de 24 nmoles de 8-hidroxiguanosina y 121 nmoles de 5-hidroxi-6-metil hidantoina por 10⁶ bases de ADN.

10 Tabla 1. Estimación de la potencia oxidativa en diferentes etapas de purificación del oxidante cs

Etapa	Etapa de purificación	Oxidación de BSA (nmoles de carbonilo / para mg de BSA)	Cantidad del material utilizado para oxidación de BSA	Actividad específica** (nmoles de carbonilo / mg de peso seco)
1. Solución cs completa o solución de alquitrán	1	7.53 ± 0.34	0.6 mg*	12.55
2. Extracto acuoso de cs	2	8.16 ± 0.24	0.4 mg *	20.4
3. Fracción de butanol	3	7.80 ± 0.20	0.11 mg*	70.90
4. extracto de acetona después de TLC	4	9.23 ± 0.14	0.015 mg	615.3
5. Extracto puro después de HPLC	6	9.56 ± 0.14	0.010 mg	956.0
* Peso actual después de deducir el peso seco de la sal presente en 50 µl de solución de regulador de fosfato de potasio.				
** Los valores medios se dan, D.E. < 5% (n =10)				

Tabla. 2 Oxidación de BSA mediante fracciones de la solución CS en diferentes etapas de purificación

Fracciones	Cantidad utilizada	Tiempo de retención (min) del pico de oxidante cs	Área arbitraria del pico	Nmoles de carbonilo producido / mg de BSA	Nmoles de carbonilo por área unitaria del oxidante x 10 ⁷
1. Completo como solución*	50 µl (600 µg)	8.813	17030 x 10 ³	7.53 ± 0.34	4.42 ± 0.20
2. Extracto acuoso de cs	50 µl (400 µg)	8.808	14785 x 10 ³	8.16 ± 0.24	5.52 ± 0.16
3. Oxidante cs purificado por TLC	10 µl (15 µg)	8.808	19063 x 10 ³	9.23 ± 0.14	4.84 ± 0.07

(continuación)

Fracciones	Cantidad utilizada	Tiempo de retención (min) del pico de oxidante cs	Área arbitraria del pico	Nmoles de carbonilo producido / mg de BSA	Nmoles de carbonilo por área unitaria del oxidante x 10 ⁷
4. Oxidante cs purificado por HPLC	10 µl (10 µg)	8.808	19010 x 10 ³	9.56 ± 0.14	5.03 ± 0.07
* Se obtienen resultados similares cuando la solución cs completa se reemplaza por cantidad igual de solución de alquitrán.					

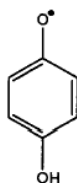
REFERENCIAS

- 5 1. Bartecchi, C.E.; Mackenzie, T.D. and Schier, R.W. The human costs of tobacco use. N.Engl. J. Med. 330:907-912; 1994
2. Frank, E. Benefits of stopping smoking. West J. Med. 159:83-87; 1993
3. U.S. Surgen General's Report. Department of Health, Education and Welfare; Department of Health and Human Services, USA; 1985
4. Shah, P.K.; Helfant, R.H. Smoking and coronary artery disease. Chest 94:449-452; 1988
- 10 5. Sherman, C.B. Health effect of cigarette smoking. Clin. Chest Med. 12:643; 1991, J.N.; Green, C.R.; Best, F.W. and Newell, M.P. Smoke composition: an extensive investigation of the water-soluble portion of cigarette smoke. J. Agric. Food Chem. 25:310-320; 1977
6. Cross, C.E. Moderator. Oxygen radicals and human disease. Ann. Intern. Med. 107:526-545; 1987
- 15 7. Panda, K.; Chattopadhyay, R.; Ghosh, M.K.; Chattopadhyay, D.J.; and Chatterjee, I.B. Vitamin C prevents cigarette smoke-induced oxidative damage of proteins and increased proteolysis. Free Radic. Biol. Med. 27:1064-1079; 1999
8. Eiserich, J.P.; Vossen, V.; O'Neill, C.A.; Halliwell, B.; Cross, C.E.; and Van der Vliet. A molecular mechanism of damage by excess nitrogen oxides : nitration of tyrosine by gas phase cigarette smoke. FEBS Lett. 353:53-56; 1994
- 20 9. Panda, K.; Chattopadhyay, R.; Chattopadhyay, D.J.; and Chatterjee, I.B. Vitamin C prevents cigarette smoke-induced oxidative damage in vivo. Free Radic. Biol. Med. 29,115-124, 2000
10. SchumacherNakayama, T.; Kaneko, M.; Kodama, M. and Nagata, C. Cigarette smoke induces DNA single strand breaks in human cells. Nature 314:462-464; 1985
11. Nakayama, T.; Kaneko, M.; Kodama, M. and Nagata, C. Cigarette smoke induces DNA single strand breaks in human cells. Nature 314:462-464; 1985
- 25 12. Borish, E.T.; Cosgrove, J.P.; Chirch, D.F.; Deutesch, W.A. and Pryor, W.A. Cigarette tar causes single-strand breaks in DNA. Biochem. Biophys. Res. Commun. 133:780-786; 1985
13. Denissoenko, M.F.; Pao, A.; Targ, M-S. and Pfeifer, G.P. Preferential formation of benzo [a] pyrene adducts at lung cancer mutational hotspots in P53. Science, 274:430-432; 1996
- 30 14. Fischer, S.; Spiegelhalder, B. and Preussmann, R. Tobacco specific nitrosamines in European and USA cigarettes. Arch. Geschwulstforsch, 60:169-177; 1990
15. Church, D.F. and Pryor, W.A. Free radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implications. Environ. Health Perspect. 64:111-126; 1985

16. Pryor, W.A., Hales, B.J., Premovic, P.I. and Church, D.F. The radical in cigarette tar : Their nature and suggested physiological implication. *Science* 220 : 425-427, 1983.
17. Glantz, S.A.; Slade, J.; Bero, L.A.; Hanauer, P. and Barnes, D.E. *The cigarette papers*. University of California Press, Berkely, USA, 1996.
- 5 18. Nagata, C.; Kodama, M. and Ioki, Y. In *Polycyclic Hydrocarbons and Cancer*, Gelboin, H.V. and P.O.P. Ts'o, Eds. (Academic Press, New York), 1: 247; 1978.
19. Wertz, J.E. and Bolton, J.R. *Electron spin resonance, elementary theory and practical applications*. McGraw- Hill Book company, New York, 1972, p- 213.

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para el aislamiento de p-benzosemiquinona de la fórmula 1,



(Fórmula I)

que comprende las etapas de:

(a) pasar el humo de cigarrillo completo recolectado del cigarrillo con filtro convencional que tiene un contenido de alquitrán de 20-30 mg por cigarrillo en regulador de potasio 30-60 mM a pH 7.4-7.8, filtrar la solución anterior a 0.45 μm de filtro de Millipore, ajustar el pH del filtrado que varía entre 7.4 a 7.6 al agregar solución de NaOH para obtener la solución de humo de cigarrillo deseada (solución cs);

(b) extraer dicha solución cs anterior tres veces con igual volumen de cloruro de metileno, descargar la capa de cloruro de metileno inferior y recolectar la capa acuosa de color amarillo superior denominada como extracto acuoso de humo de cigarrillo;

(c) extraer dicha capa acuosa anterior de humo de cigarrillo dos veces con igual volumen de n-butanol saturado con agua, liofilizar el extracto de butanol amarillo agrupado en un liofilizador Lyolab en una temperatura que varía entre -50° C a -60° C bajo vacío seguido por la extracción del material liofilizado dos veces con acetona grado HPLC y secar la solución de acetona bajo vacío y disolver en dicho extracto de acetona con metanol grado HPLC;

(d) someter dicha solución de metanol anterior a TLC de banda utilizando placas de sílice no fluorescentes, desarrollar dichas placas de sílice utilizando una mezcla de tolueno y acetato de etilo en una relación de 80:20, sacar la placa y secar de aproximadamente 25°C a 30°C utilizando un secador, cortar pequeñas tiras que contienen el material desarrollado desde ambos lados de las placas y mantenerlas en una cámara de yodo para la ubicación de la banda que corresponde a Rf 0.26, raspar la banda y extraer el material de banda con acetona grado HPLC seguido por recolección de la capa de acetona y secarla bajo vacío;

(e) disolver dicho extracto de acetona anterior que aparece como agujas amarillas pálidas al agregar volumen igual de agua milli Q, extraer la solución acuosa con igual volumen de n-butanol saturado con agua grado HPLC seguido por secado de la capa superior de n-butanol en pequeños tubos de vidrio bajo vacío para obtener el oxidante cs principal con una pureza de 98-99% y rendimiento de 18-22 μg por cigarrillo; y

(f) purificar dicho oxidante cs anterior como se obtiene en la etapa e al disolverlo en un solvente móvil que comprende una mezcla de cloruro de metileno y metanol en una relación de 90:10 (v/v) e inyectarlo en un instrumento HPLC con una columna de sílice de 25 cm de fase normal utilizando un detector uv a 294 nm en un índice de flujo de 0.5 ml/min, en una temperatura de aproximadamente 25° C, en una presión de aproximadamente 29 kgf/cm² y recolectar el efluente que aparece como un pico único en un tiempo de retención de 8.808 min con una pureza de 100% y rendimiento de 8.4% del oxidante cs total presente en la solución cs progenitora.

2. Un proceso para el aislamiento de p-benzosemiquinona de acuerdo con la reivindicación 1 en donde el alquitrán o la solución cs se obtiene al encender un cigarrillo y recolectar el humo en un matraz de vidrio sumergido en una mezcla de hielo y sal que deja condensar el alquitrán y se deposita en el fondo del matraz, y se lleva a cabo la extracción con dicho matraz anterior a temperatura ambiente.

3. Un proceso como se reivindica en las reivindicaciones 1 a 2, en donde p-benzosemiquinona presente en la solución cs se evalúa cuantitativamente mediante HPLC con un detector UV utilizando una columna ODS de fase inversa de 25 cm y utilizando una mezcla de agua y metanol (95:5 v/v) como una fase móvil, en una longitud de onda de 288 nm, índice de flujo de 0.8 ml/min, en una temperatura de aproximadamente 25°C y en una presión de aproximadamente 147 Kgf/cm² y que tiene un tiempo de retención de 13.46 min.

4. Un proceso como se reivindica en la reivindicación 1, en donde el daño de las proteínas originado por p-benzosemiquinona presente en la solución cs se determina cuantitativamente al medir la formación de carbonilo de

proteína al hacer reaccionar la proteína con p-benzosemiquinona obtenida de la solución cs, seguido por reacción con 2,4 dinitrofenil hidrazina (DNPH) y finalmente medir la absorbancia en una longitud de onda de 390 nm.

5. Un proceso como se reivindica en la reivindicación 1, en donde el daño de las proteínas originado por p-benzosemiquinona presente en la solución cs se determina cuantitativamente al medir la degradación oxidativa de proteínas microsómicas de tejido de conejillo de indias al hacer reaccionar dicha proteína con p-benzosemiquinona presente en la solución cs seguido por SDS-PAGE y barrido densitométrica.
6. Un proceso como se reivindica en la reivindicación 5, en donde la proteína utilizada para el ensayo de daños oxidativos de la proteína se selecciona del grupo que consiste de BSA y proteínas microsómicas de pulmón de conejillo de indias.
- 10 7. Un proceso como se reivindica en la reivindicación 1, en donde dicho método se utiliza para la determinación cuantitativa de p-benzosemiquinona oxidante cs en cigarrillos con base en el contenido de alquitrán de la marca comercial particular del cigarrillo.
- 15 8. Un proceso como se reivindica en la reivindicación 1, en donde dicho método se utiliza para la determinación cuantitativa de p-benzosemiquinona oxidante cs en cigarrillos con base en el nivel de toxicidad de la marca comercial particular del cigarrillo.
9. Un proceso como se reivindica en la reivindicación 1, en donde la cantidad de p-benzosemiquinona aislada de cigarrillo de diferentes marcas comerciales de cigarrillos quemados se utiliza para determinar el índice de toxicidad de una marca particular de cigarrillo con base en la cantidad de p-benzosemiquinona presente.

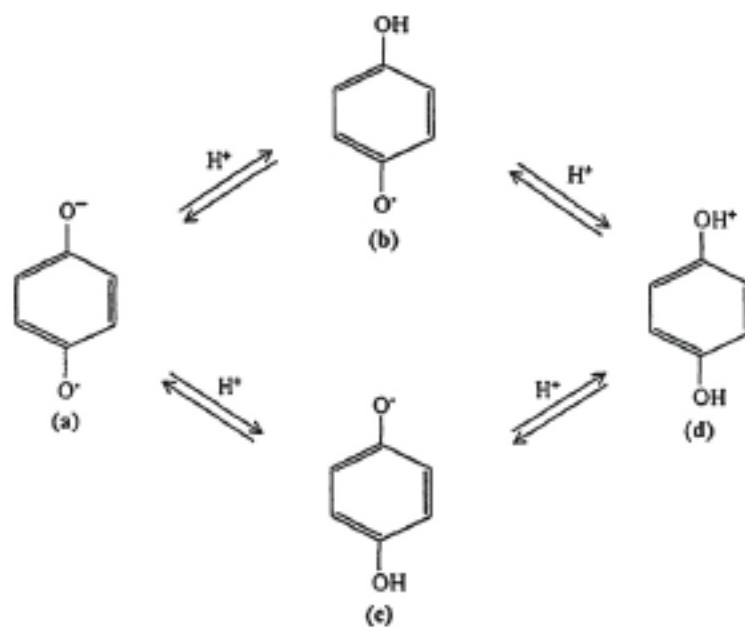


Fig. 1. Formas Mesoméricas de p-benzoquinona. (A) aniónicas; (b),(c) neutras; (d) catiónicas.

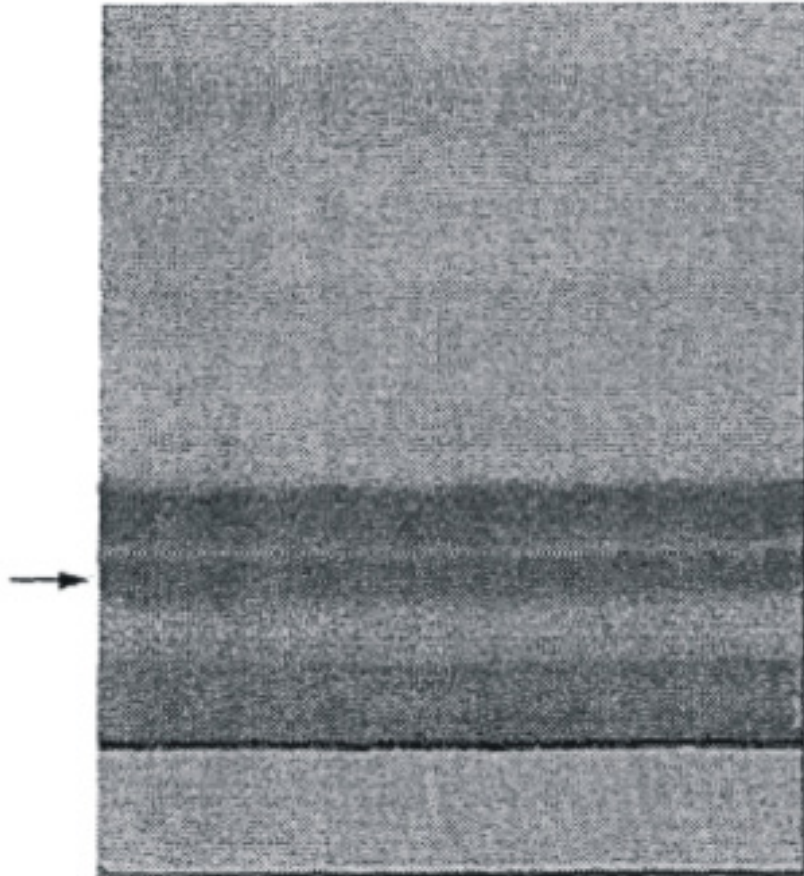


Fig. 2. Banda de cromatografía de capa delgada de la solución de metanol después de liofilización (etapa 5). → indica la banda de oxidante cs



Fig. 3. Perfil HPLC del extracto de butanol después de TLC. El oxidante cs (etapa 6) eluye como un pico mayor en el tiempo de retención de 8.808 min. La cantidad de oxidante cs eluido es $\approx 12\mu\text{g}$

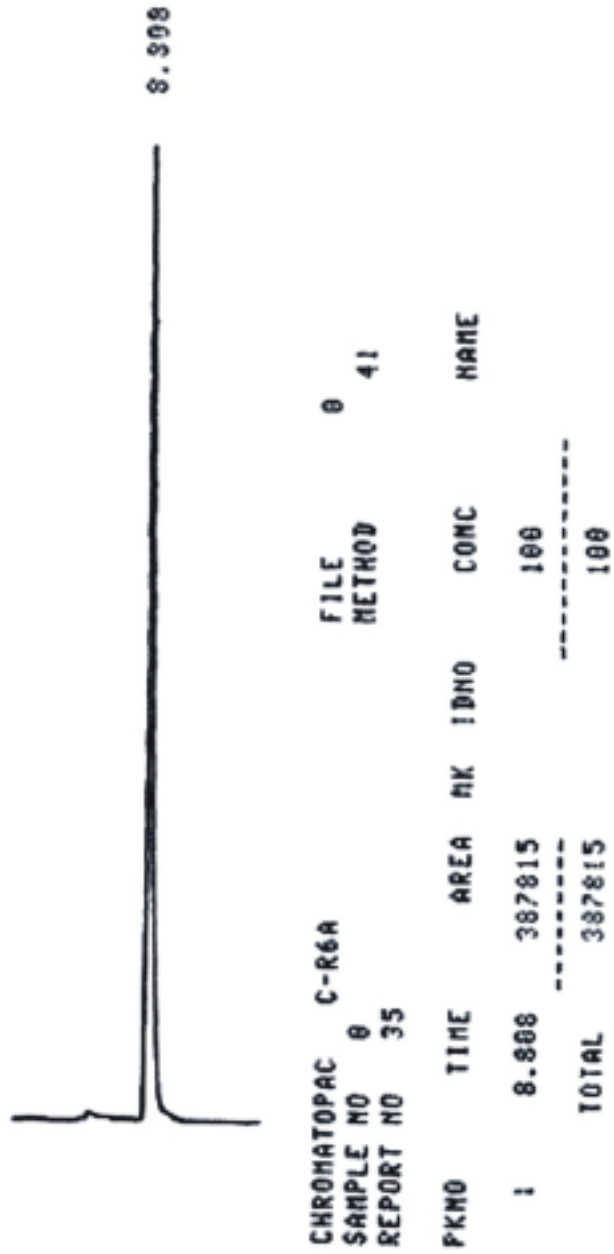


FIG. 4. Perfil de HPLC del oxidante cs puro, eluido en el tiempo de retención de 8.808 min



Fig. 5. Cromatografia de capa delgada de oxidante cs puro ($R_f=0.26$)

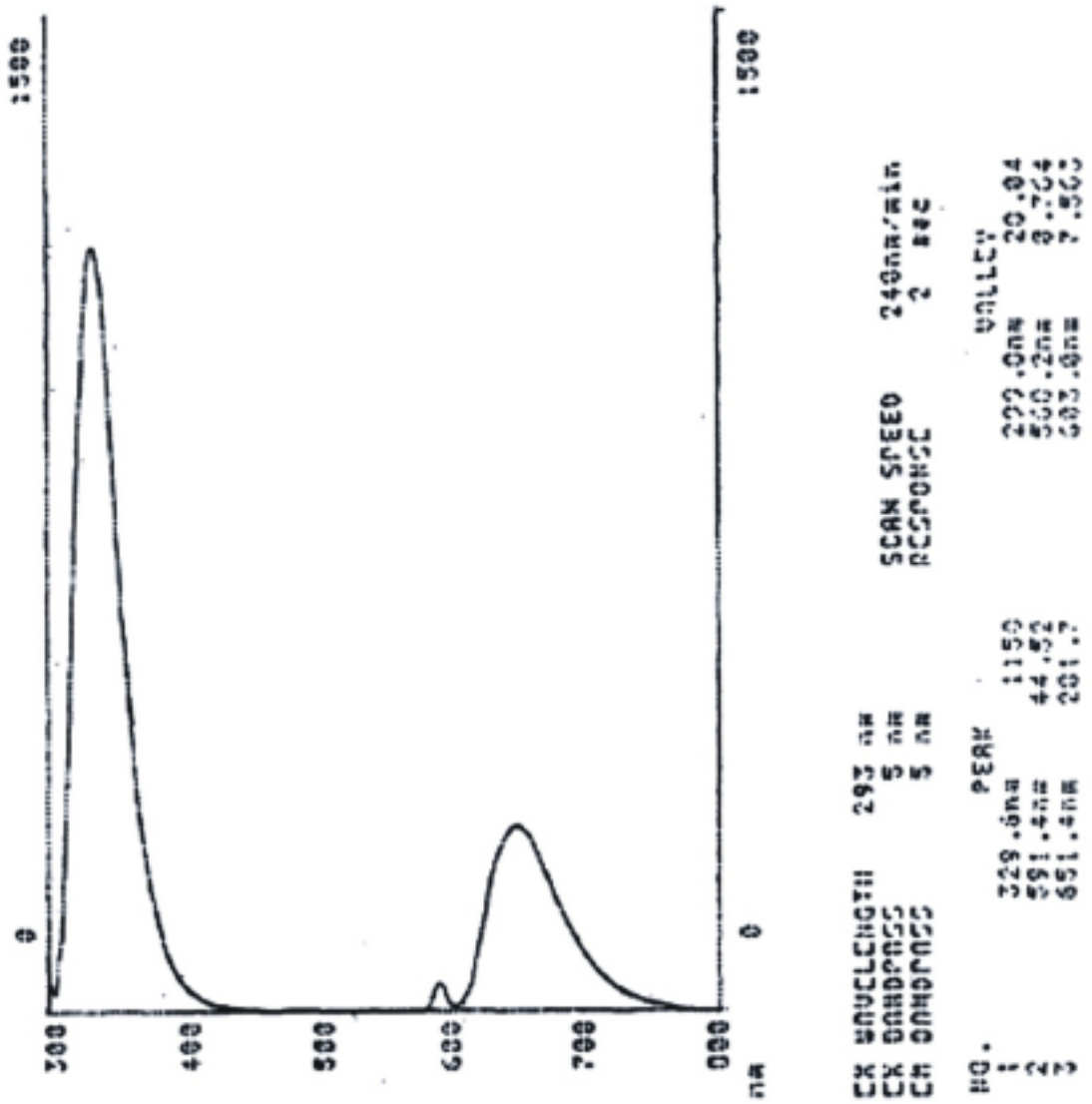


Fig. 6a. Perfil espectroscópico de fluorescencia del oxidante cs en metanol. La excitación está en 293 nm y el barrido de emisión se mide de 300 nm a 800 nm. La máxima emisión fue a 329.6 nm y a 651.4 nm.

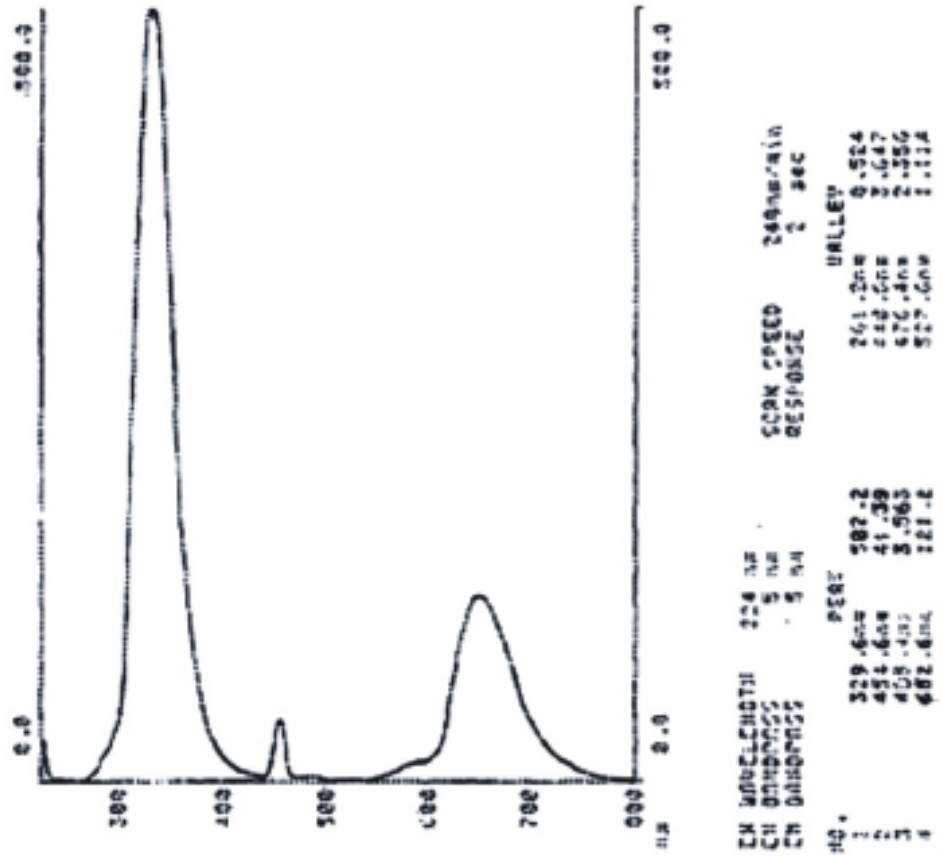


Fig. 6b. Perfil espectroscópico de fluorescencia del oxidante cs en metanol. La excitación está en 224 nm y el barrido de emisión se mide de 225 nm a 800 nm. La máxima emisión fue en 329.6 nm y en 652.6 nm.

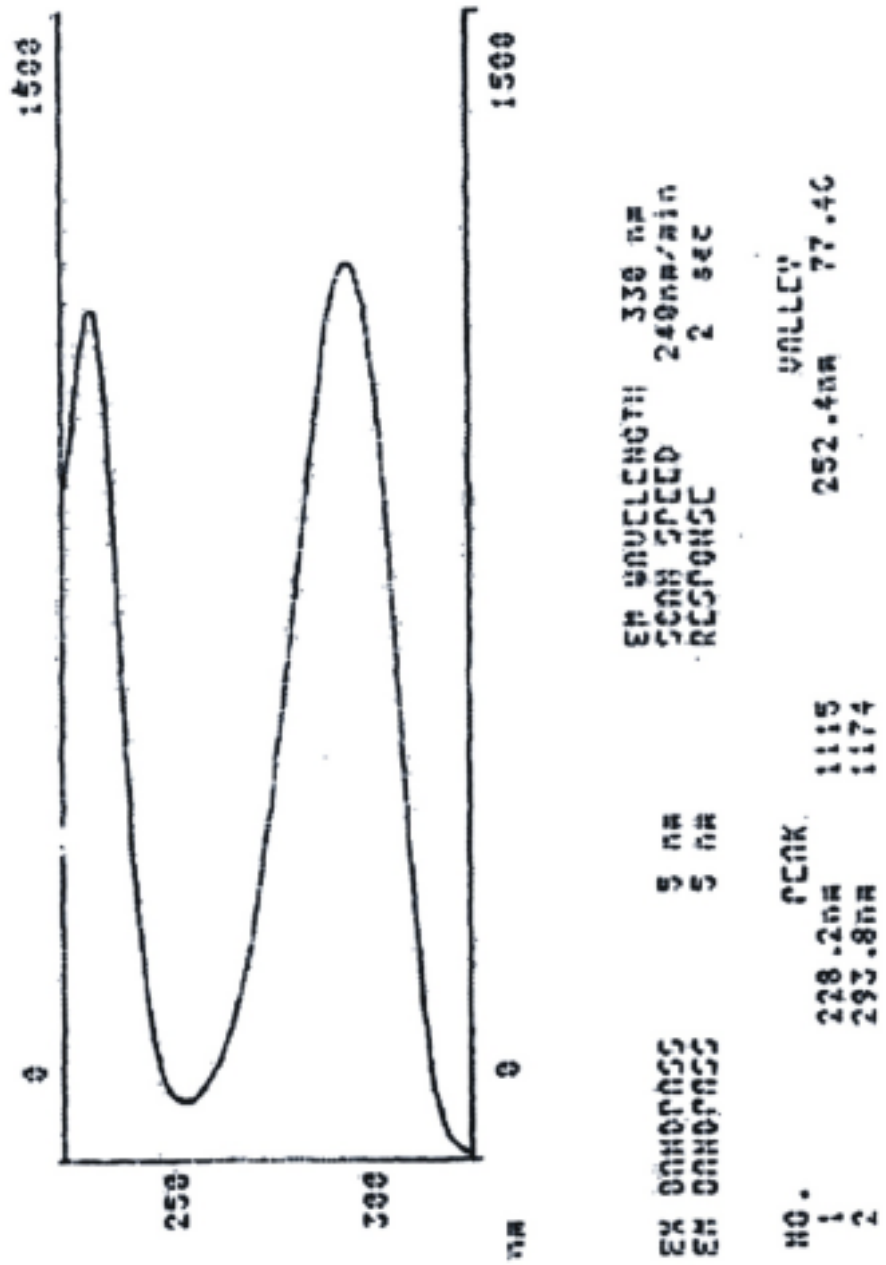


Fig. 7a. Perfil espectroscópico de fluorescencia del oxidante cs en metanol. La emisión está en 330 nm y el barrido de emisión se mide de 220 nm a 325 nm. La máxima excitación fue en 228.2 nm y en 293.8 nm.

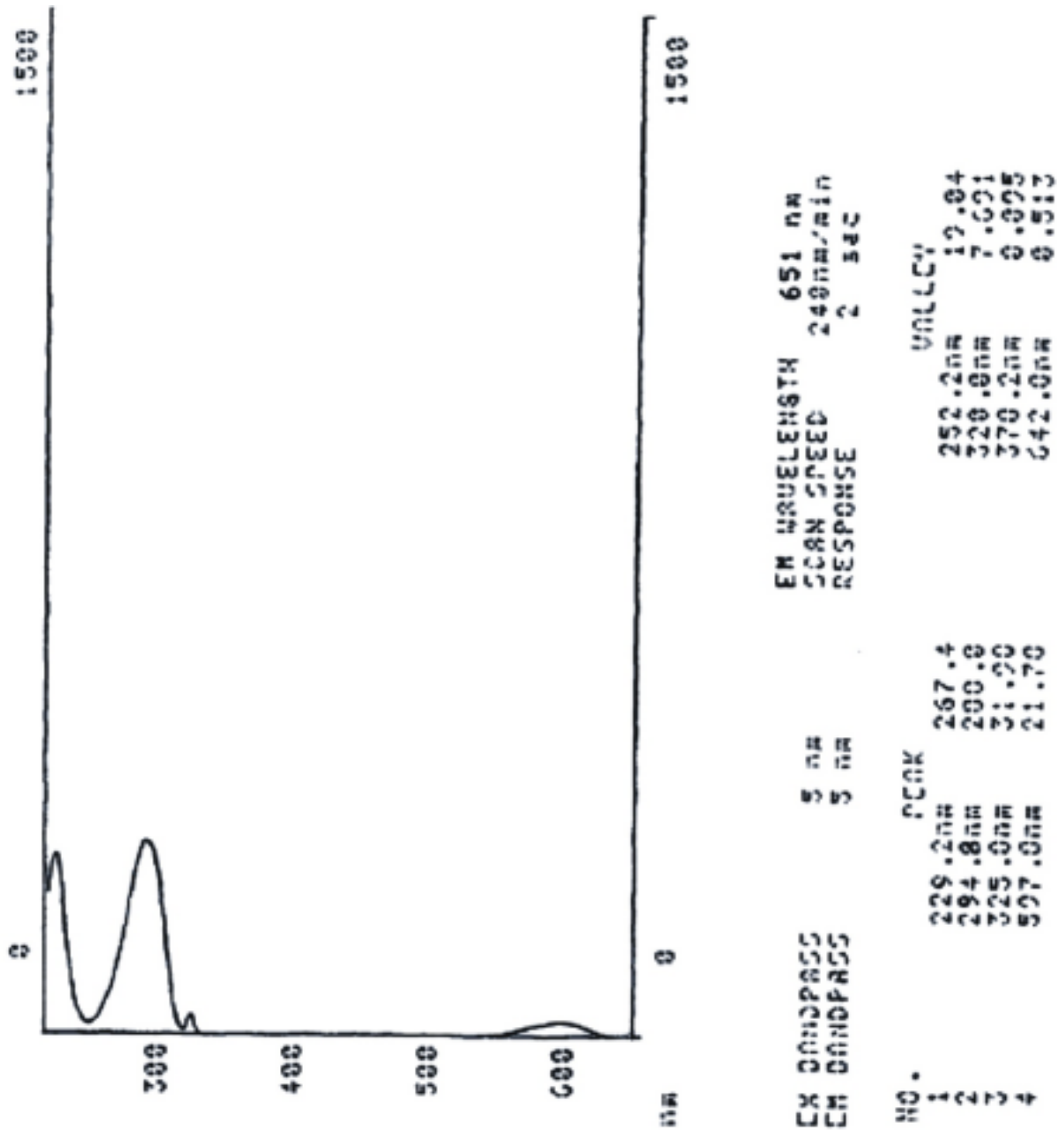


Fig. 7b. Perfil espectroscópico de fluorescencia del oxidante cs en metanol. La excitación está en 651 nm y el barrido de emisión se mide de 220 nm a 650 nm. La máxima excitación fue en 229.2 nm y en 294.8 nm.



Fig. 8. Estructura de cristal del oxidante cs puro

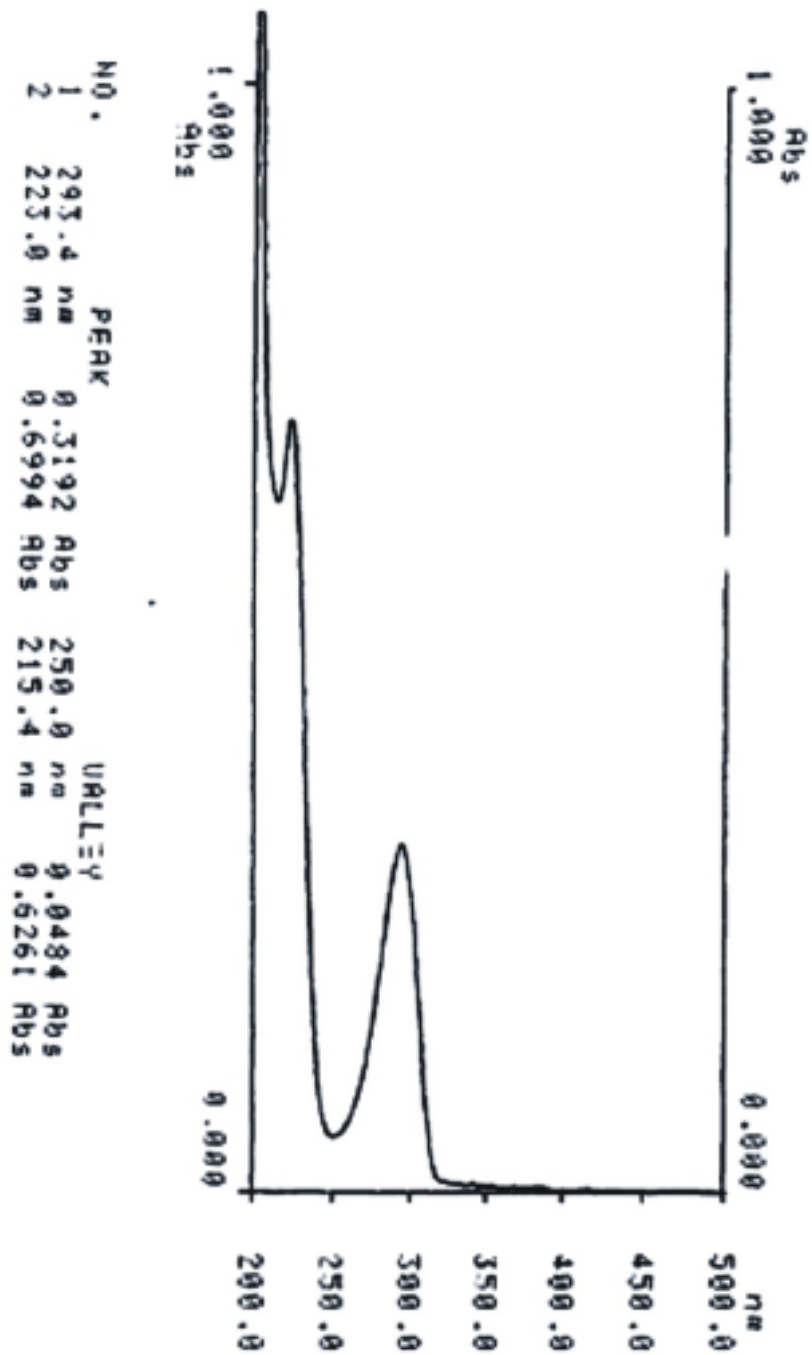


Fig. 9. Perfil espectrofotométrico UV del oxidante cs en metanol. Tiene dos absorciones máximas, una en 293.4 nm y otra en 223.0 nm.

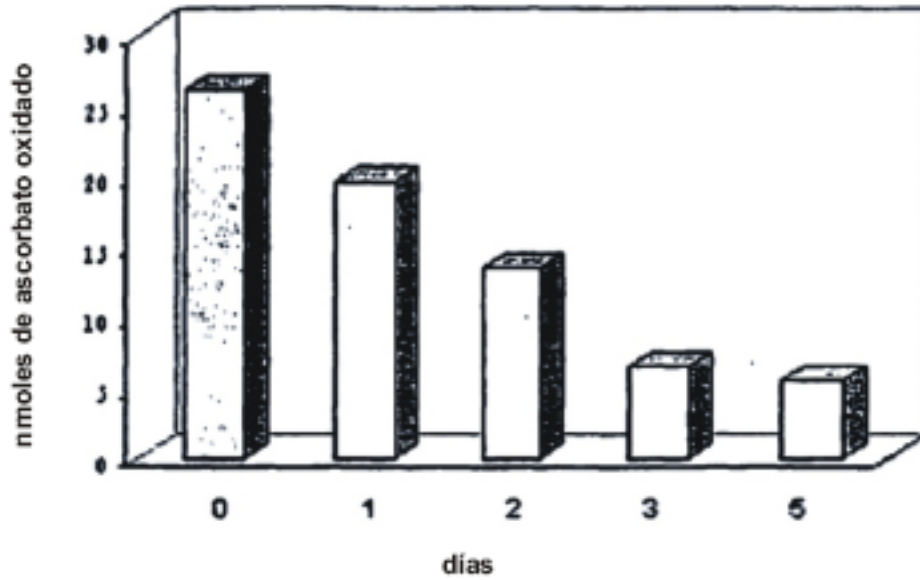


Fig.10. Estabilidad del oxidante sólido mantenido a 25°C bajo oscuridad. La estabilidad esta determinada por su capacidad de oxidar el ácido ascórbico. El ácido ascórbico se mide mediante análisis HPLC a 254 nm

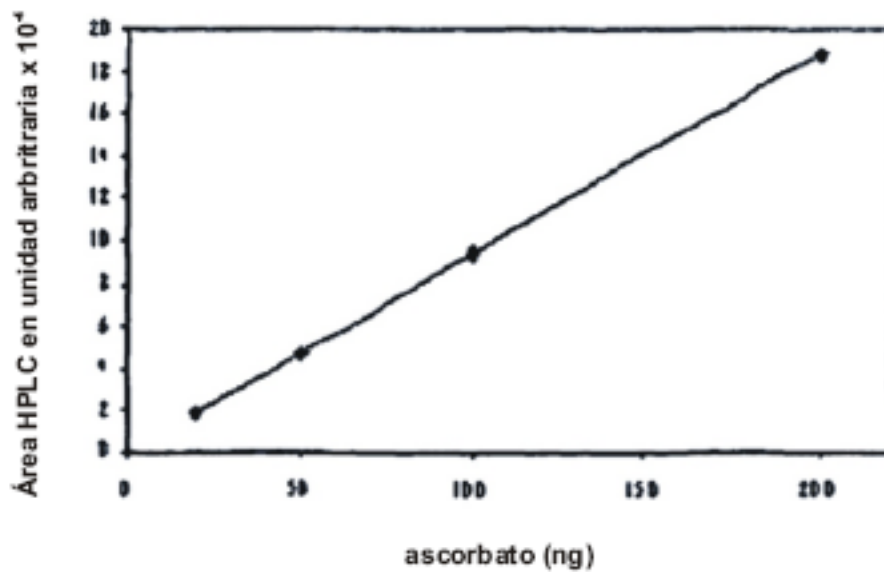


Fig. 11. Curva estándar de ácido ascórbico con base en análisis HPLC en 254 nm

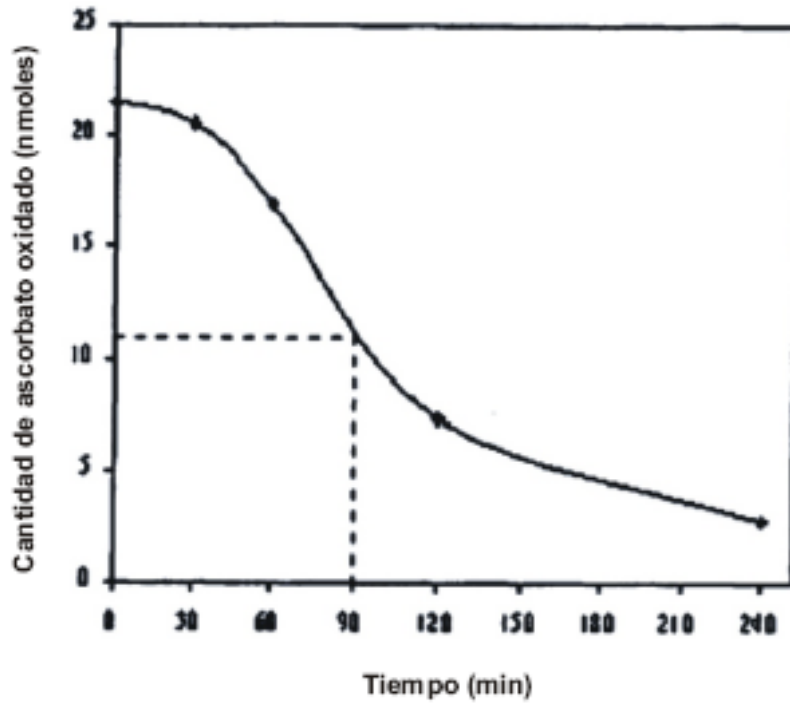


Fig.12. Estabilidad del oxidante cs en 50 nM de regulador de fosfato de potasio a 25°C medido por su potencia para oxidar el ascorbato como se evidencia por área de HPLC

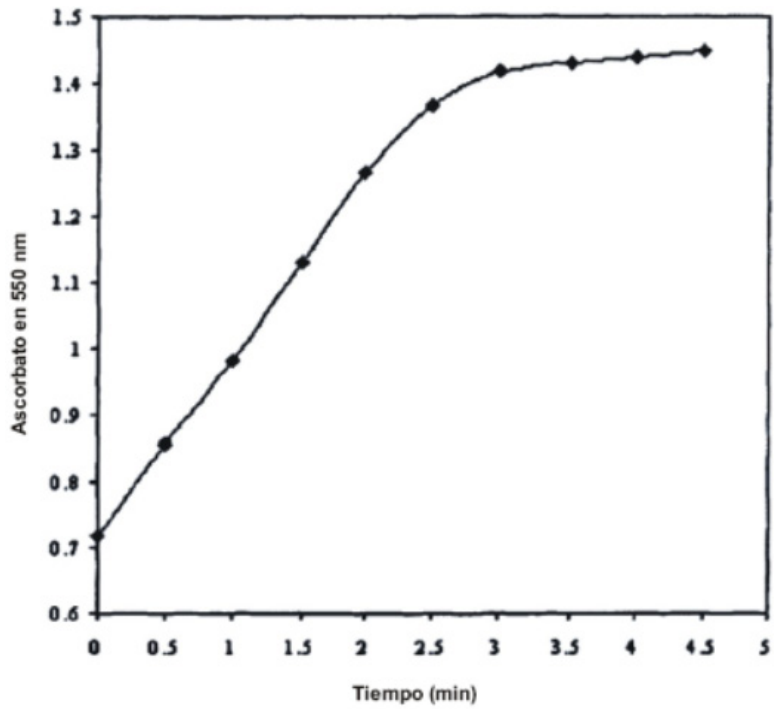


FIG.13. Reducción cuantitativa de ferritocromo c mediante el oxidante según se mide por la formación de ferritocromo c con tiempo en 550nm. La reacción se lleva a cabo en 50 mM de regulador de fosfato y potasio, pH 7.4, manteniendo la concentración final de ferritocromo c en 100 μ M nmol del oxidante reducido 0.71 nmoles de ferritocromo c.

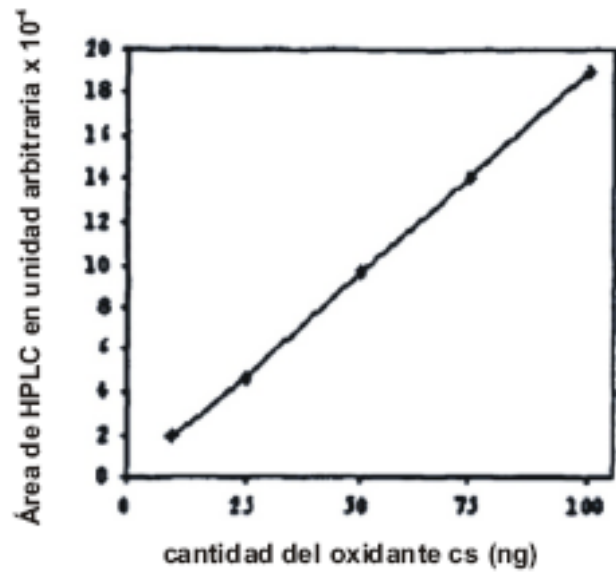
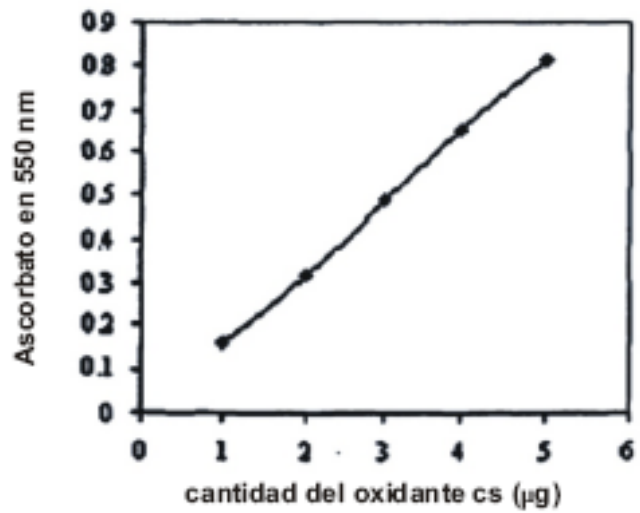


Fig. 14. Curva estándar del oxidante sobre la base de HPLC a 294nm. Se utilizan diferentes cantidades del oxidante cs que varían de 10 ng a 100ng en 20µl de solvente móvil.



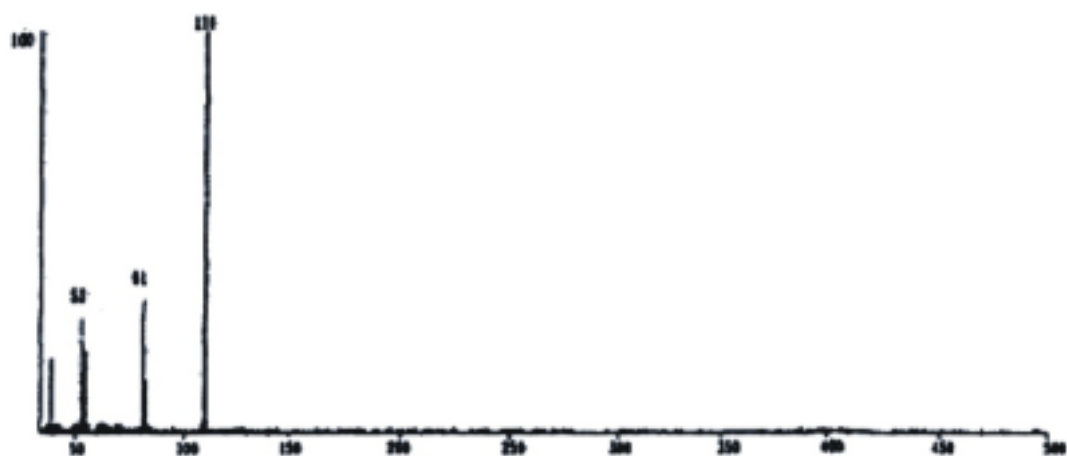


Fig. 16. Espectro de masa del oxidante cs puro

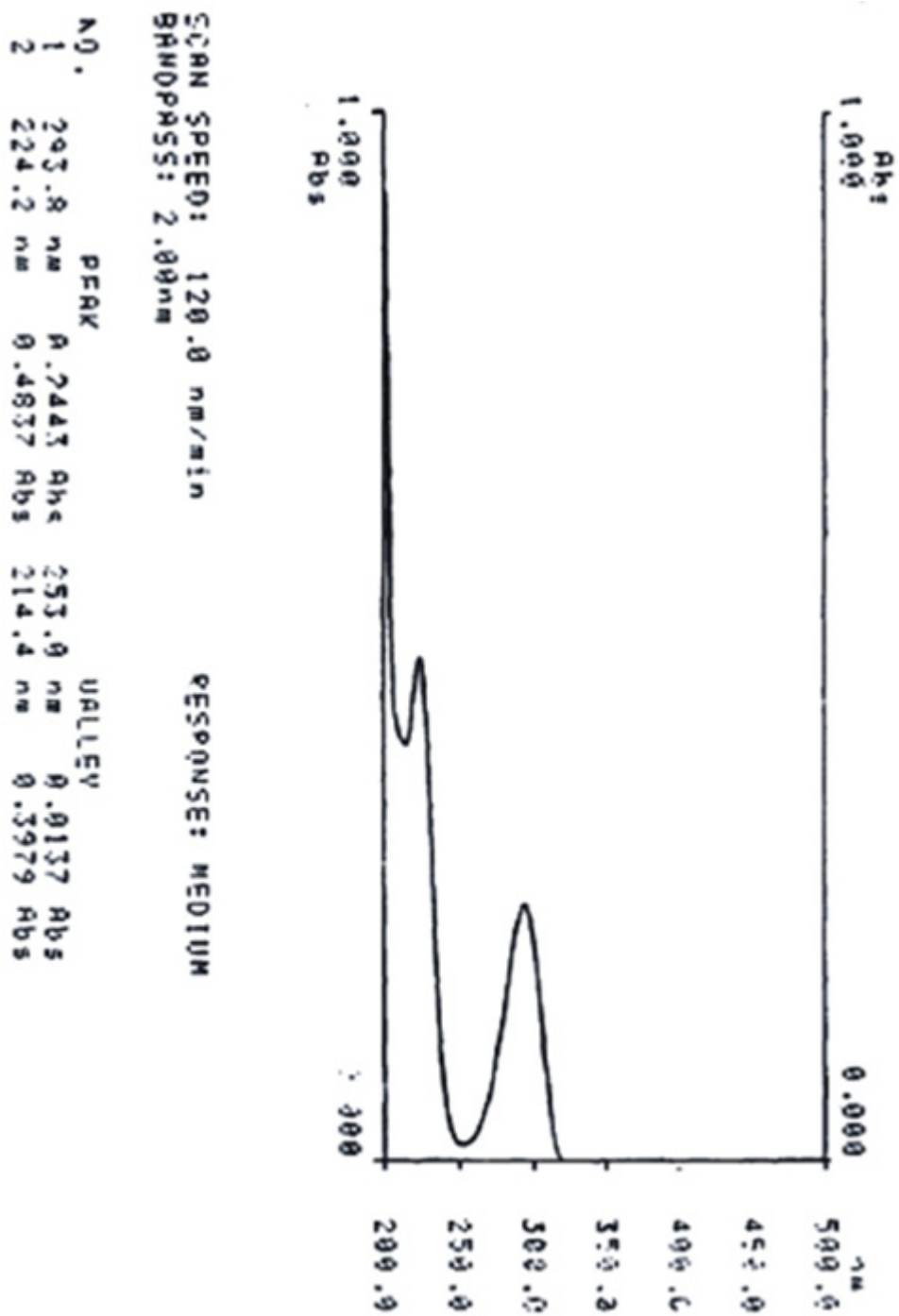


Fig. 17. Perfil espectrofotométrico UV de hidroquinona en metanol. Tiene dos absorciones máximas, una en 293.8 nm y otra en 224.2 nm.

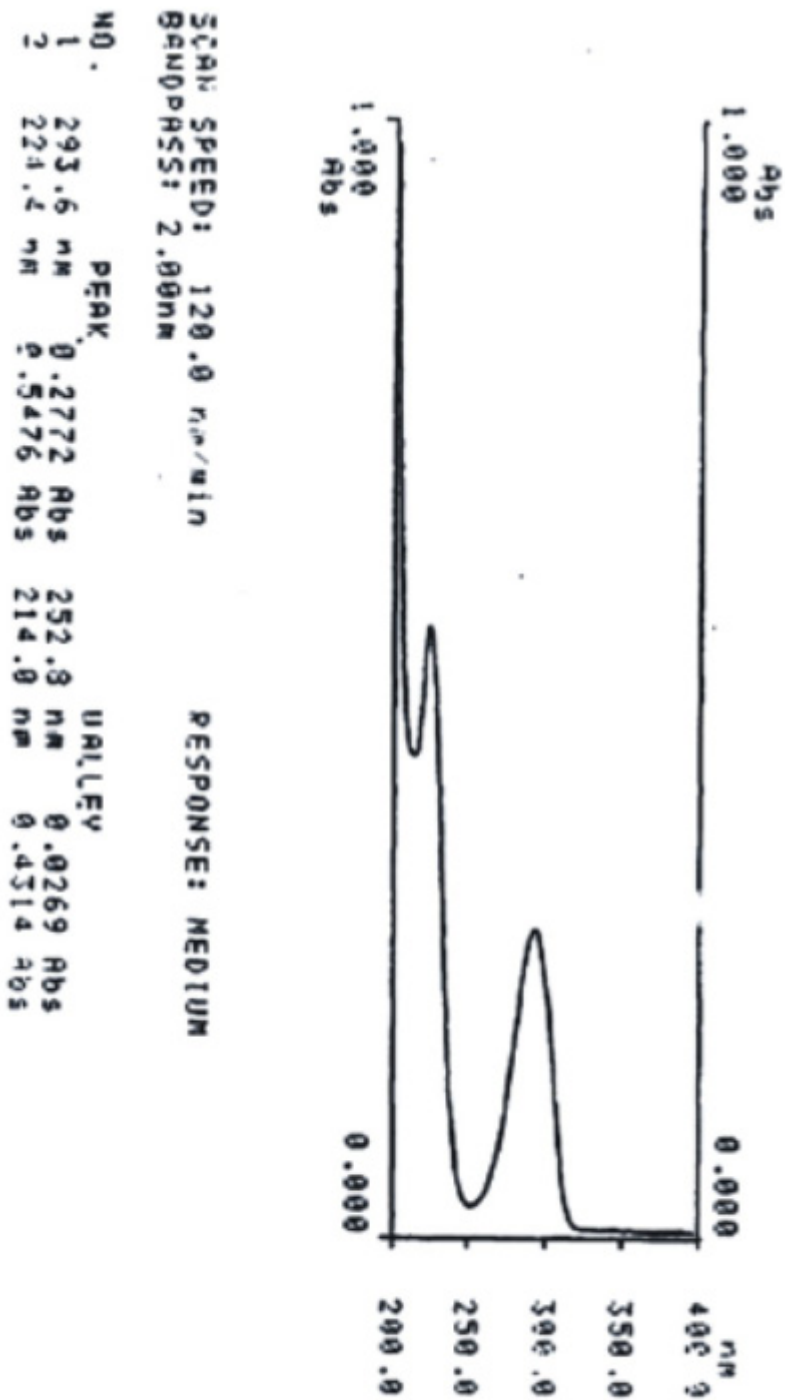


Fig. 18. Perfil espectrofotométrico UV del oxidante cs almacenado a temperatura ambiente en la oscuridad durante 8 días. Tiene dos absorciones máximas, que están en 293.6 nm y en 224.4 nm.

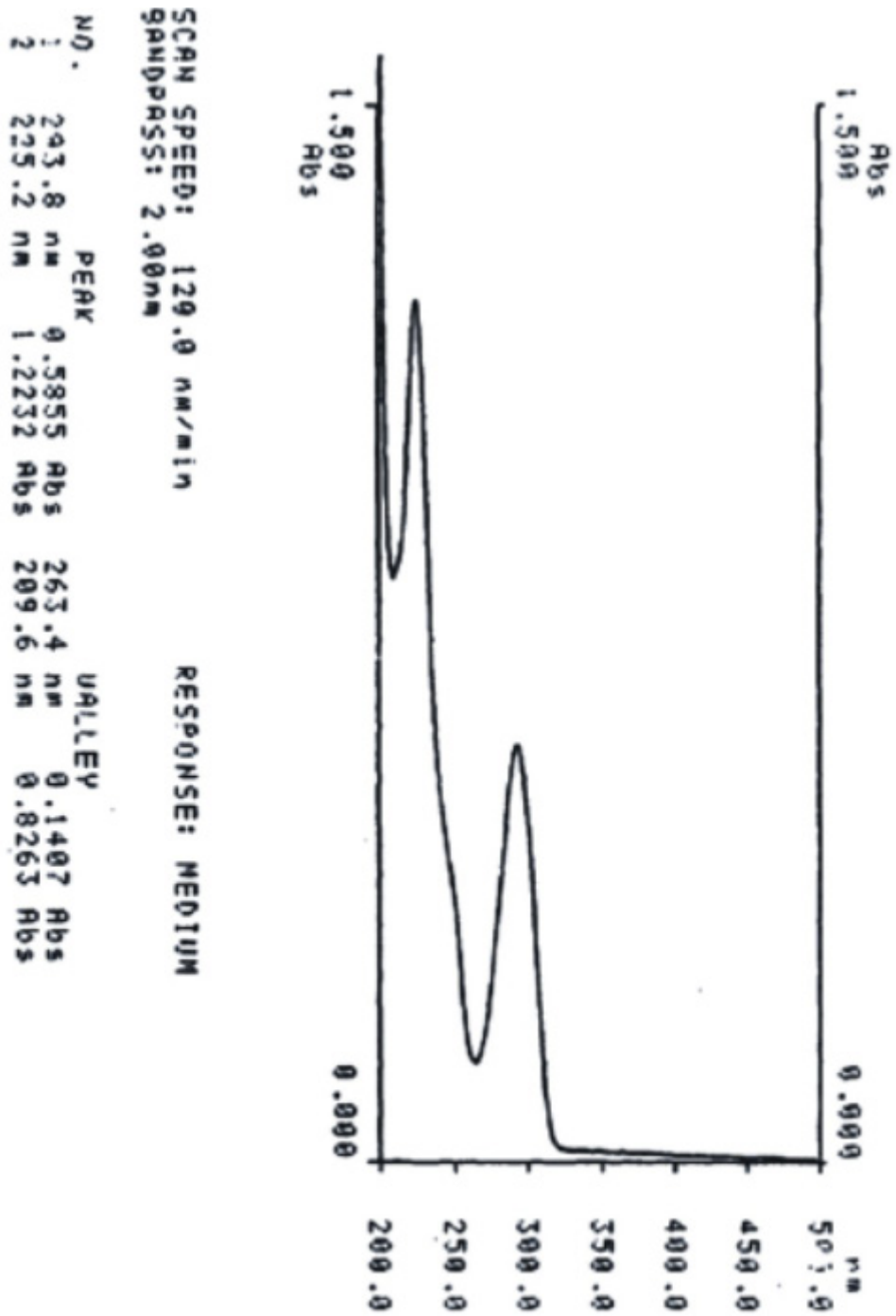


Fig. 19. Perfil espectrofotométrico UV de mezcla equinolar de p-benzoquinona e hidroquinona en metanol, hay un hombro cerca de 242nm (el λ_{max} de p-benzoquinona)

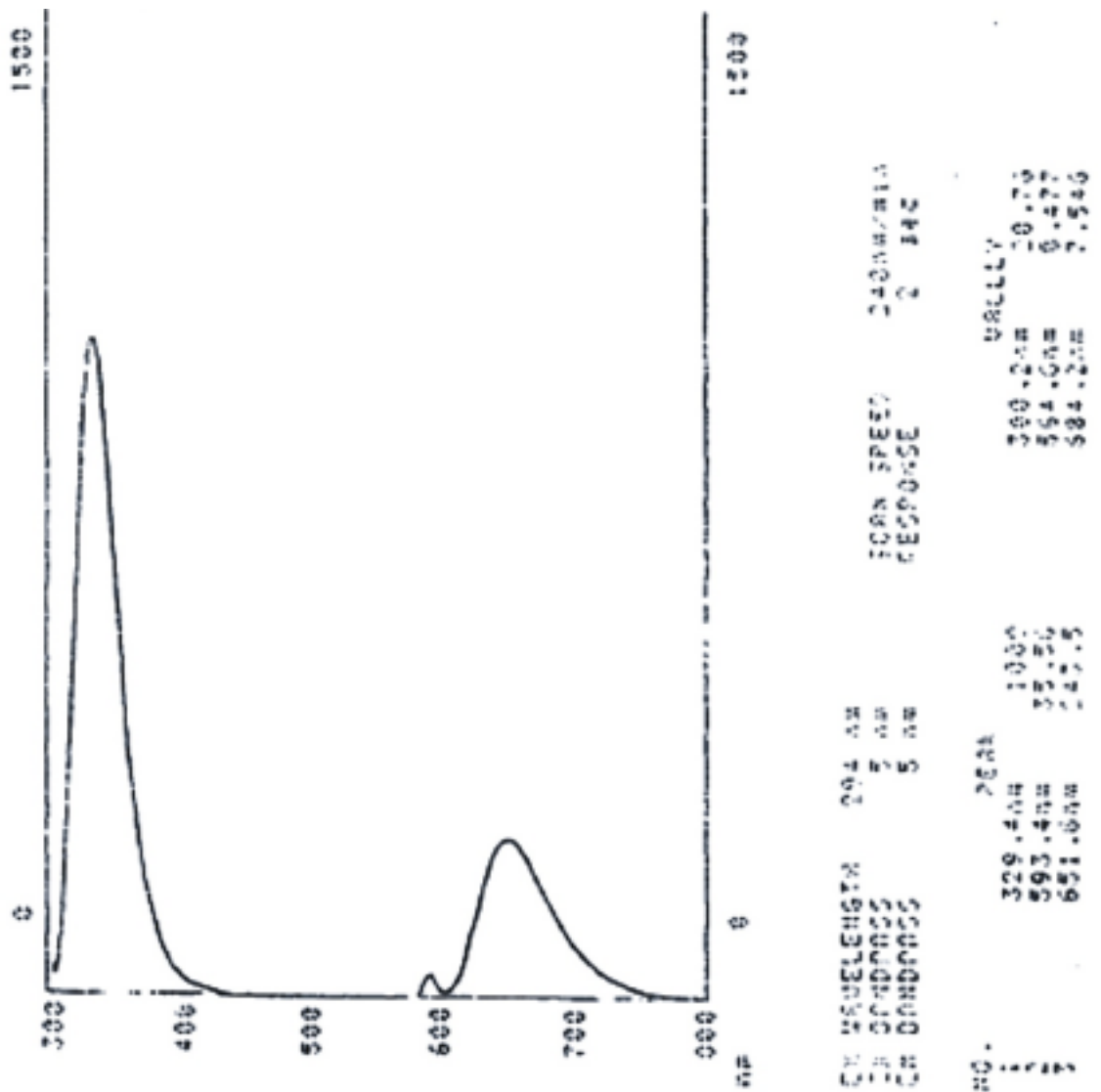


Fig. 20. Perfil espectroscópico de fluorescencia de la hidroquinona en metanol. La excitación está en 294 nm y el barrido de emisión se mide de 300 nm a 800 nm. La máxima emisión fue a 329.4 nm y a 651.6 nm.

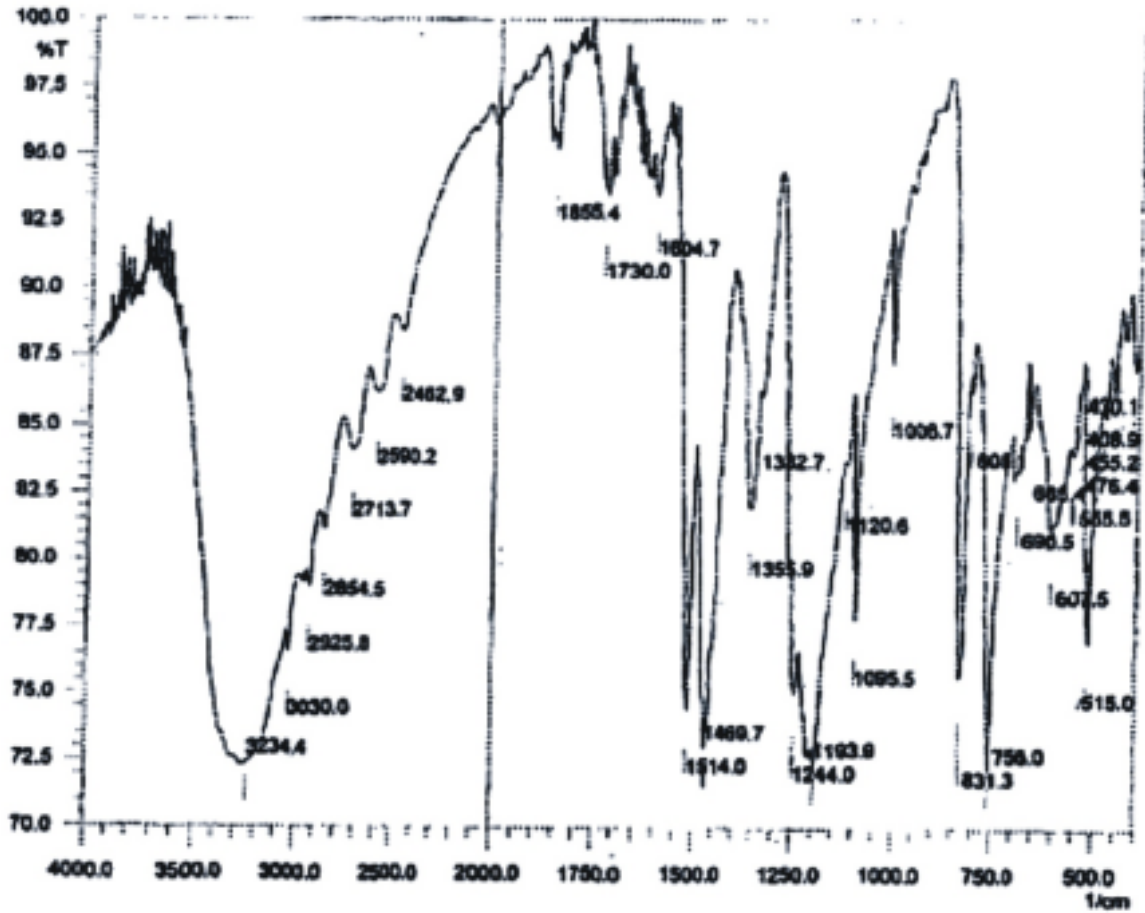


Fig. 21. Perfil espectroscópico FTIR del oxidante cs

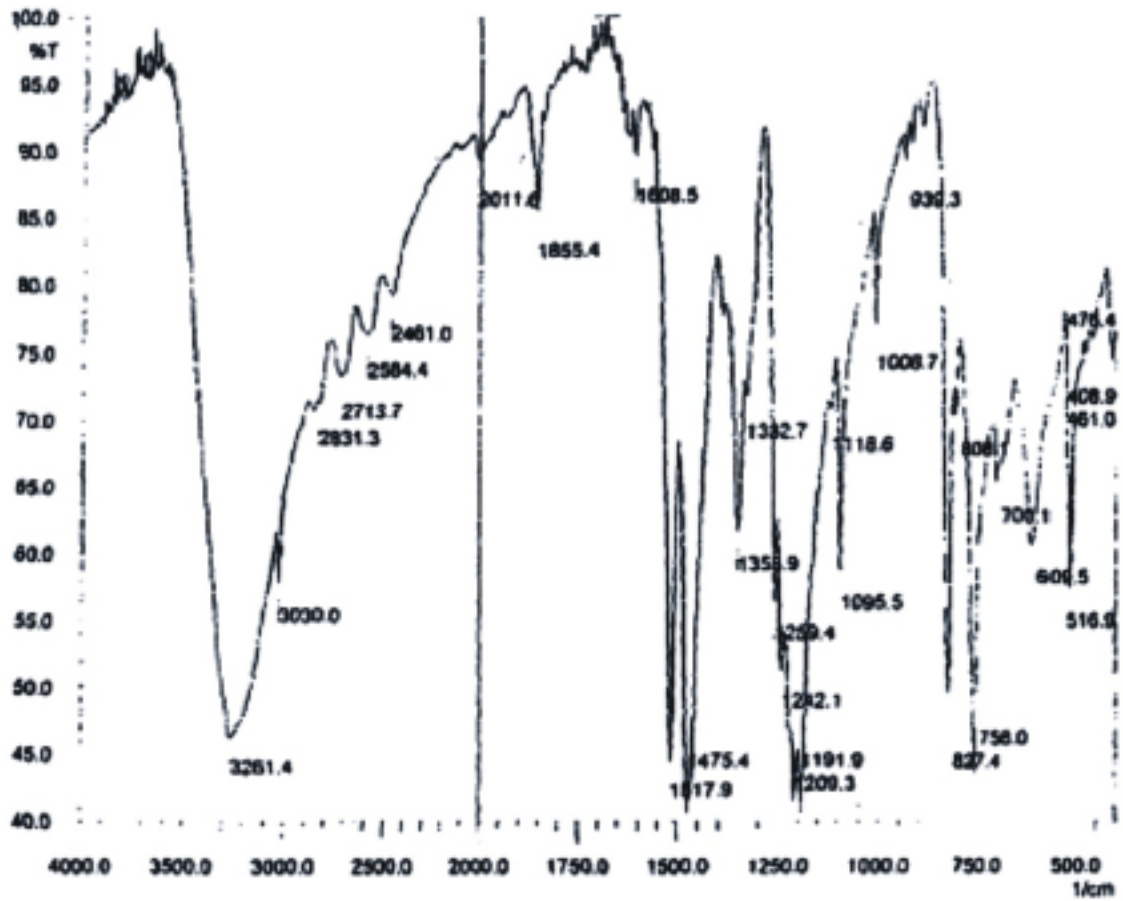


Fig. 22. Perfil espectroscópico FTIR de hidroquinona

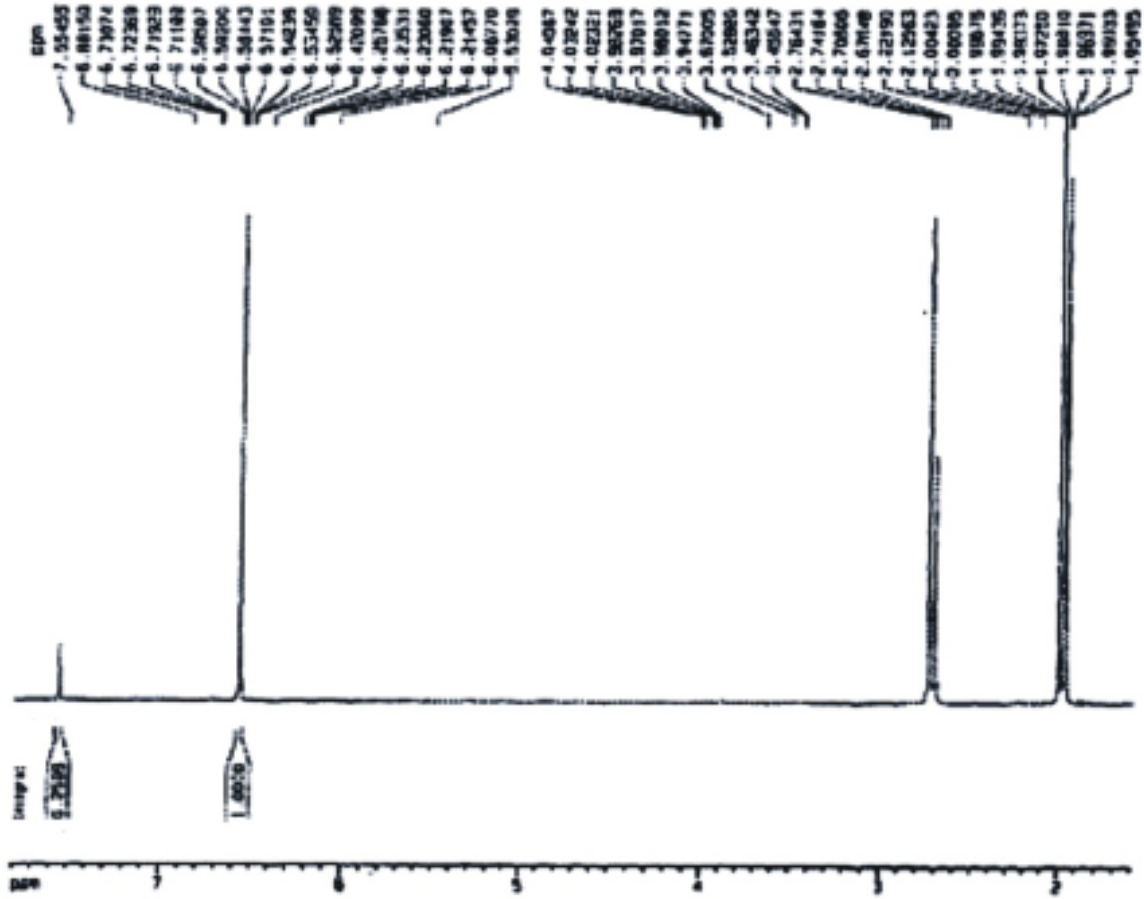


Fig. 23. Perfil espectroscópico H-RMN del oxidante cs en CD_3COCD_3

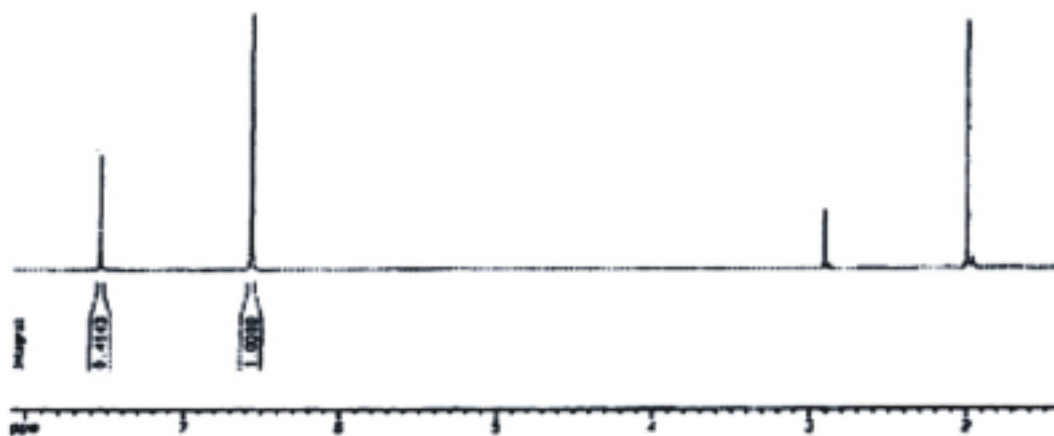


Fig. 24. Perfil espectroscópico H-RMN de hidroquinona en CD_3COCD_3 .

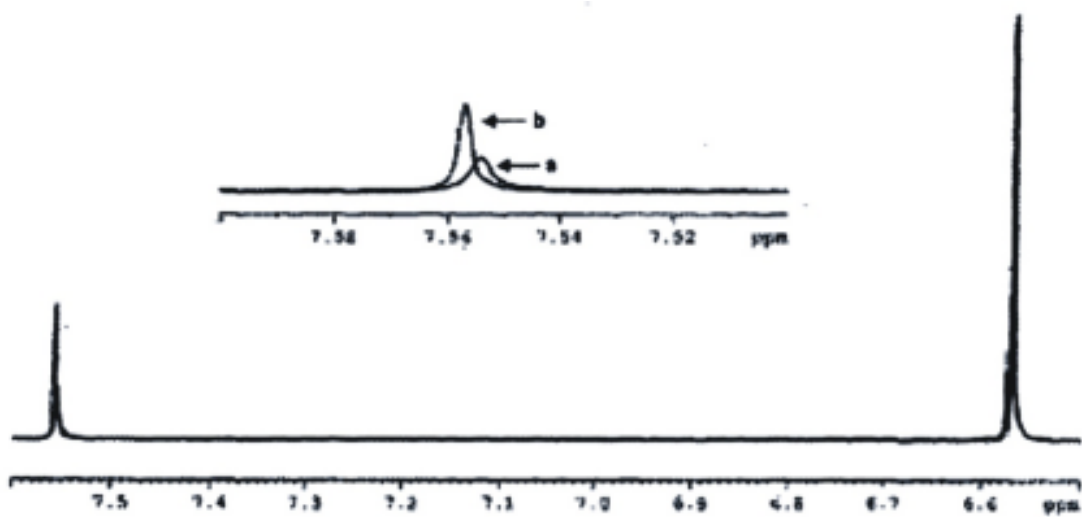


Fig. 25. Perfiles espectroscópicos de H-RMN comparativos de (a) oxidante cs y (b) hidroquinona

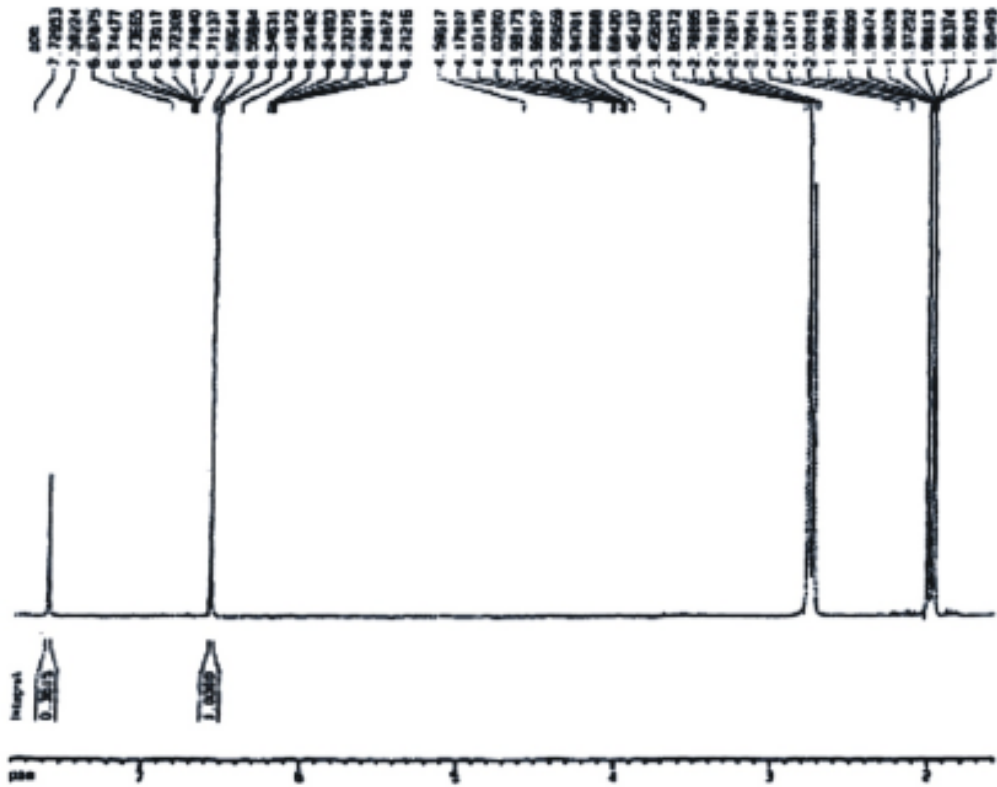


Fig. 26. Perfil espectroscópico de H-RMN del oxidante cs después de reducción con ditionito de sodio

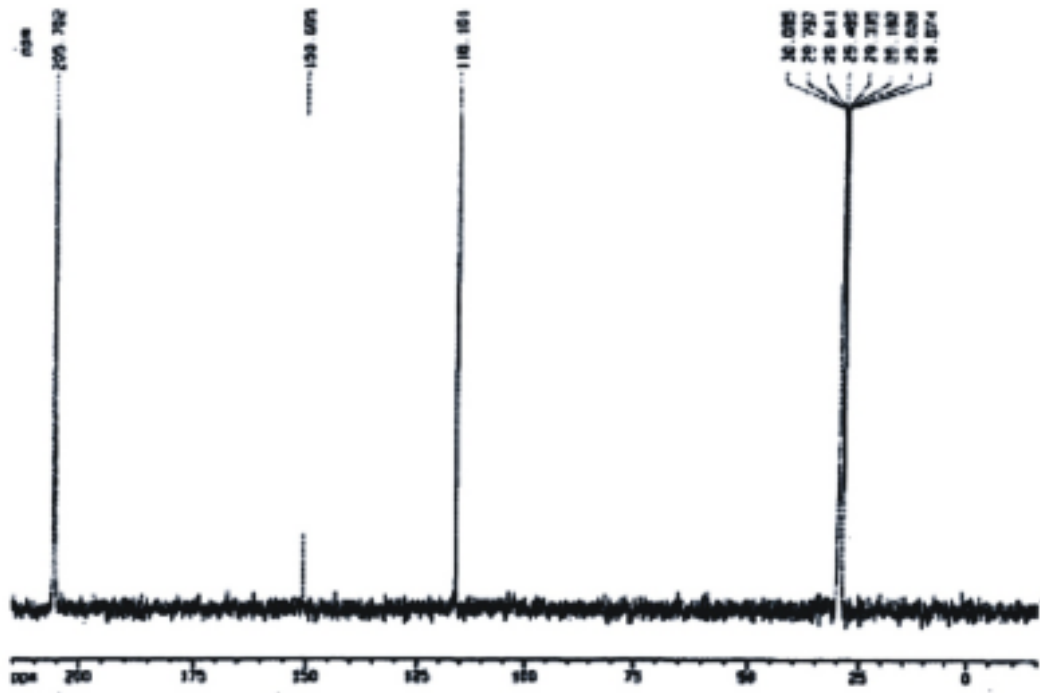


Fig. 27. Perfil espectroscópico C-RMN de oxidante cs en CD₃COCD₃

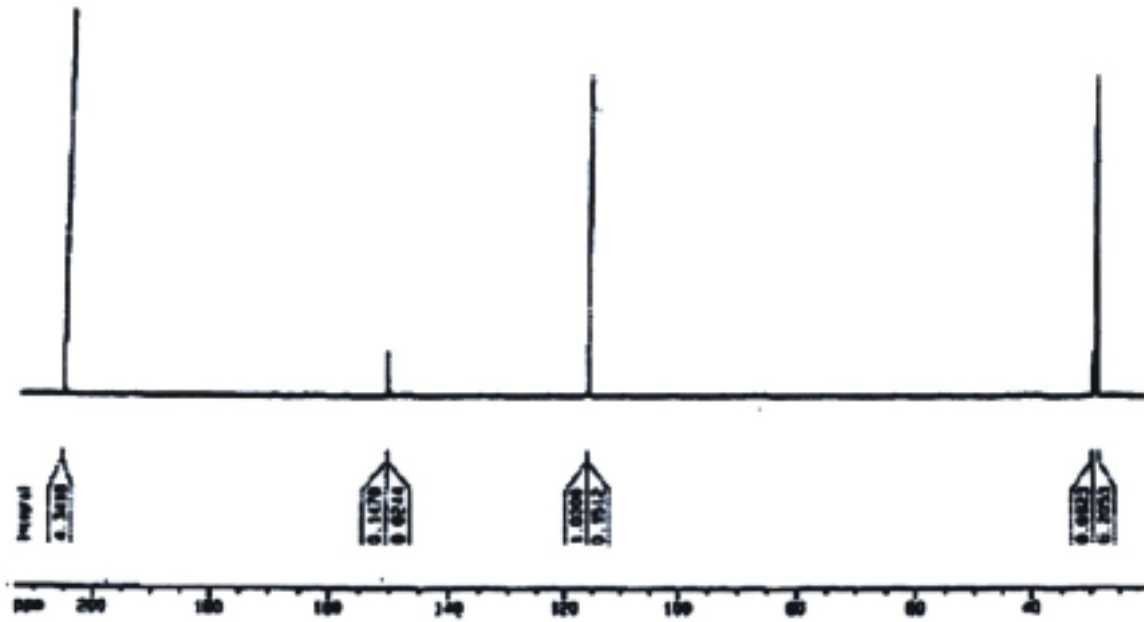


Fig. 28. Perfil espectroscópico C-RMN de hidroquinona en CD₂COCD₃

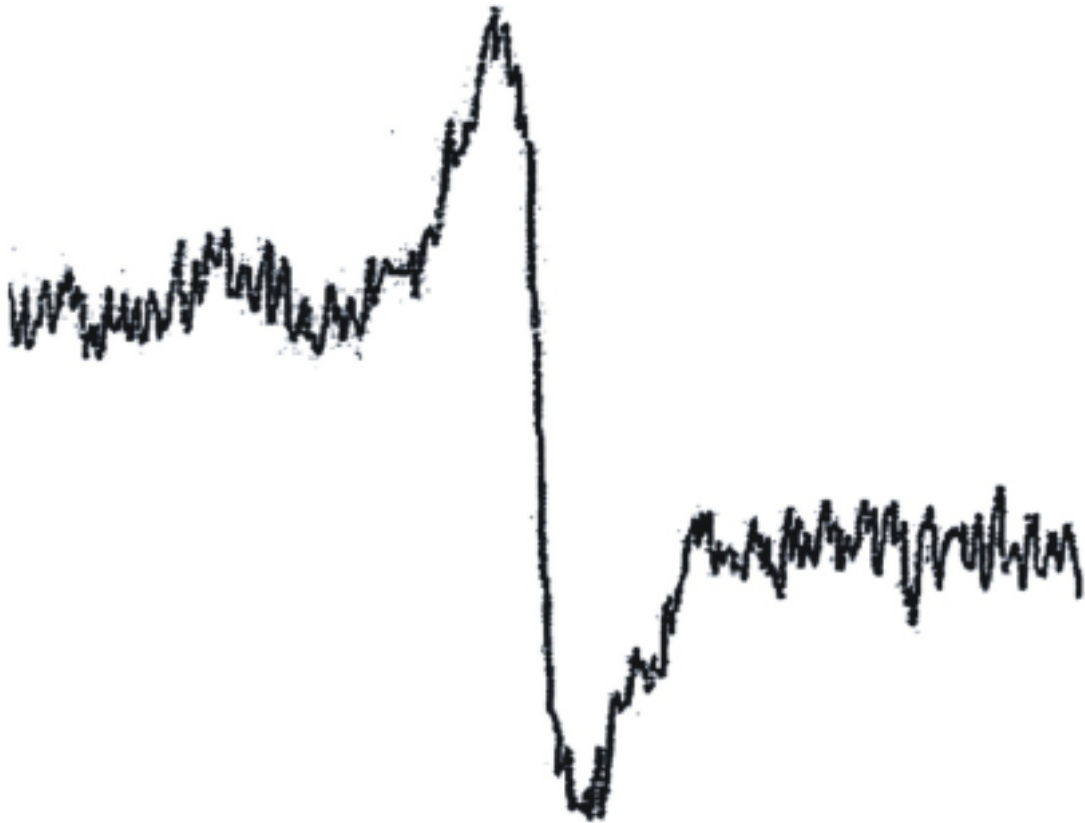


Fig. 29. Espectro ESR a temperatura ambiente del oxidante CS, frescamente preparado de 100 cigarrillos. El espectro se registra en un espectrómetro JES-REIX ESR (Tokio, Japón). Los parámetros espectrales son como sigue: frecuencia de microondas, 9.435 Ghz; potencia, 2m W; amplitud de modulación de campo, 0.4mT; frecuencia modulada, 100kHz, constante de tiempo, 0,3 seg; índice de barrido, 2.5mT/seg

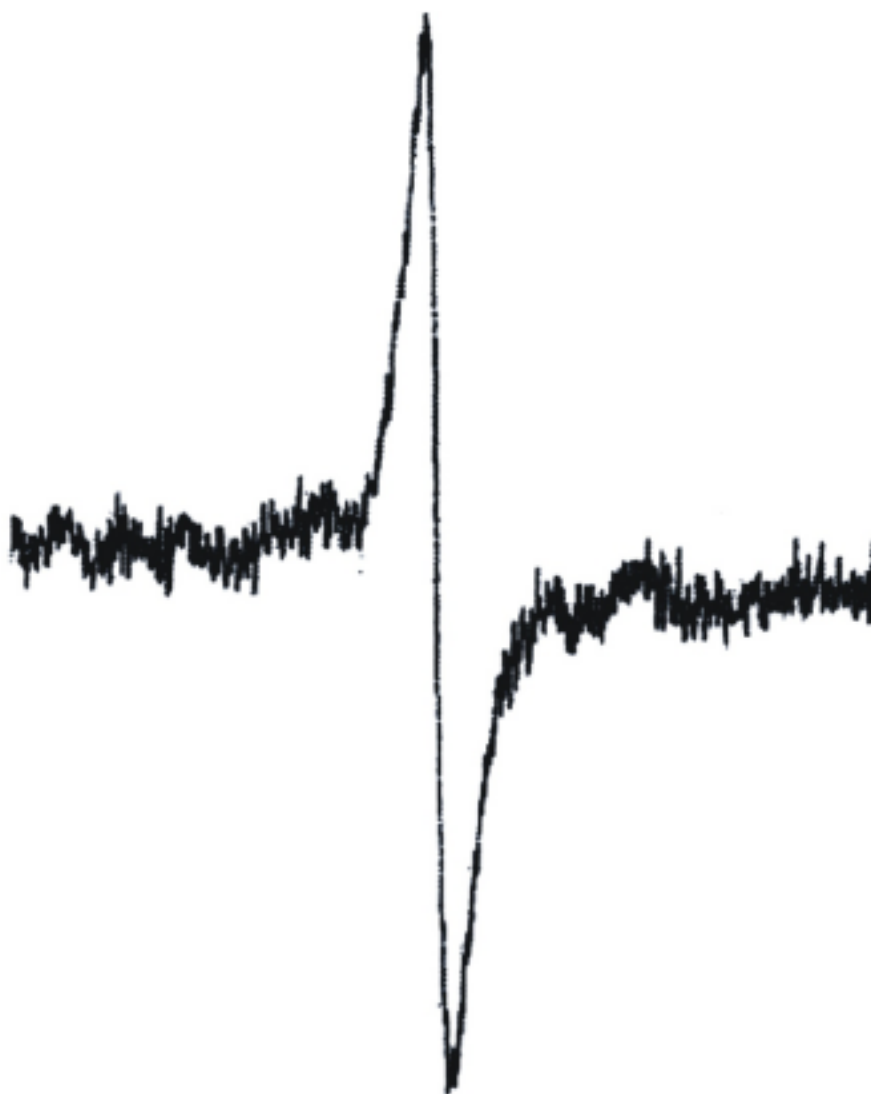


Fig.30. Espectro ESR a temperatura ambiente de oxidante cs maduro (10 días), preparado a partir de 400 cigarrillos.

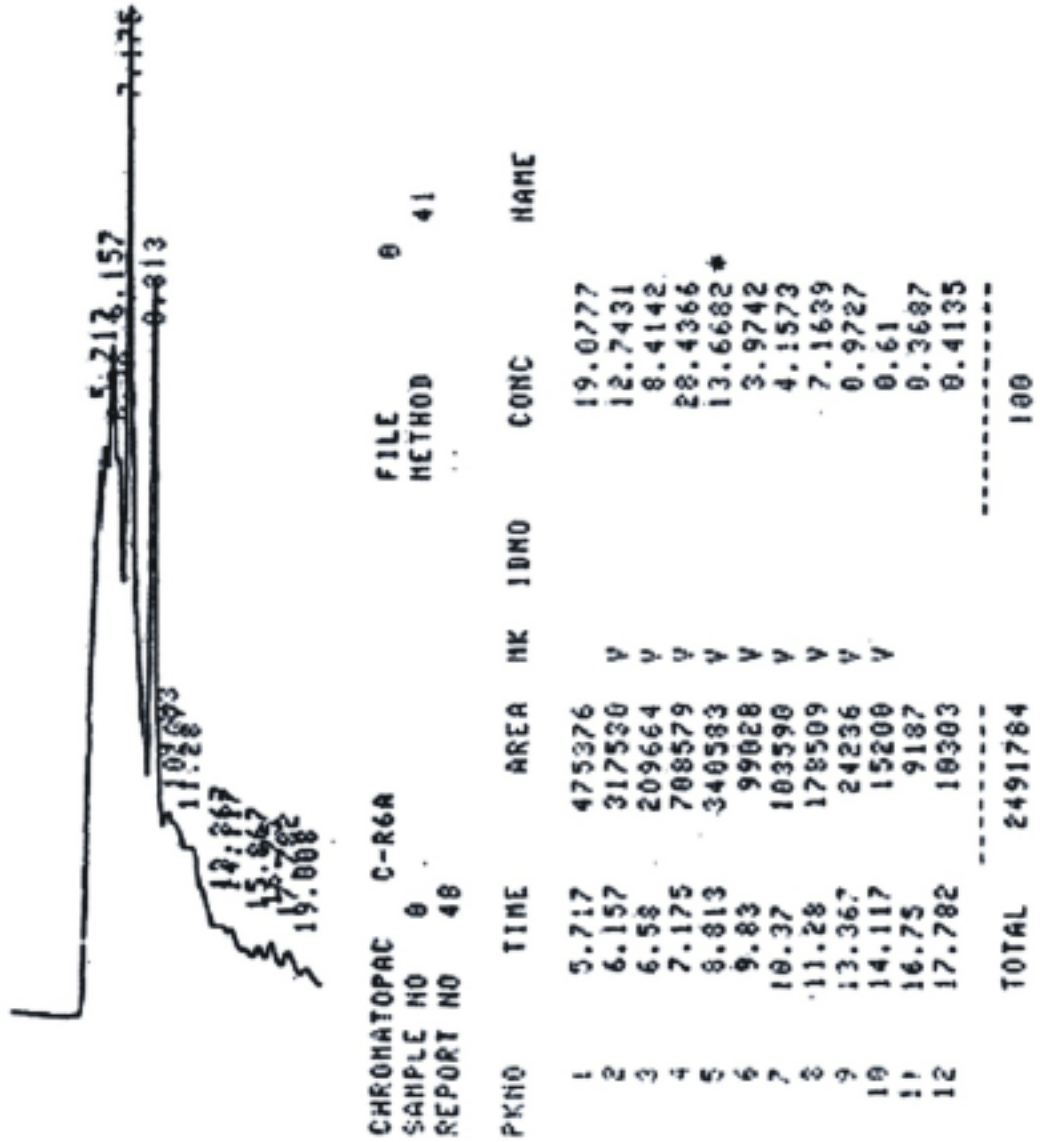


Fig. 31. Perfil HPLC de la solución cs completa analizada en la columna de sílice (Lichospher® Si 60, Merck).

*Indica el tiempo de retención, el área y la concentración (13.6682%) del oxidante cs

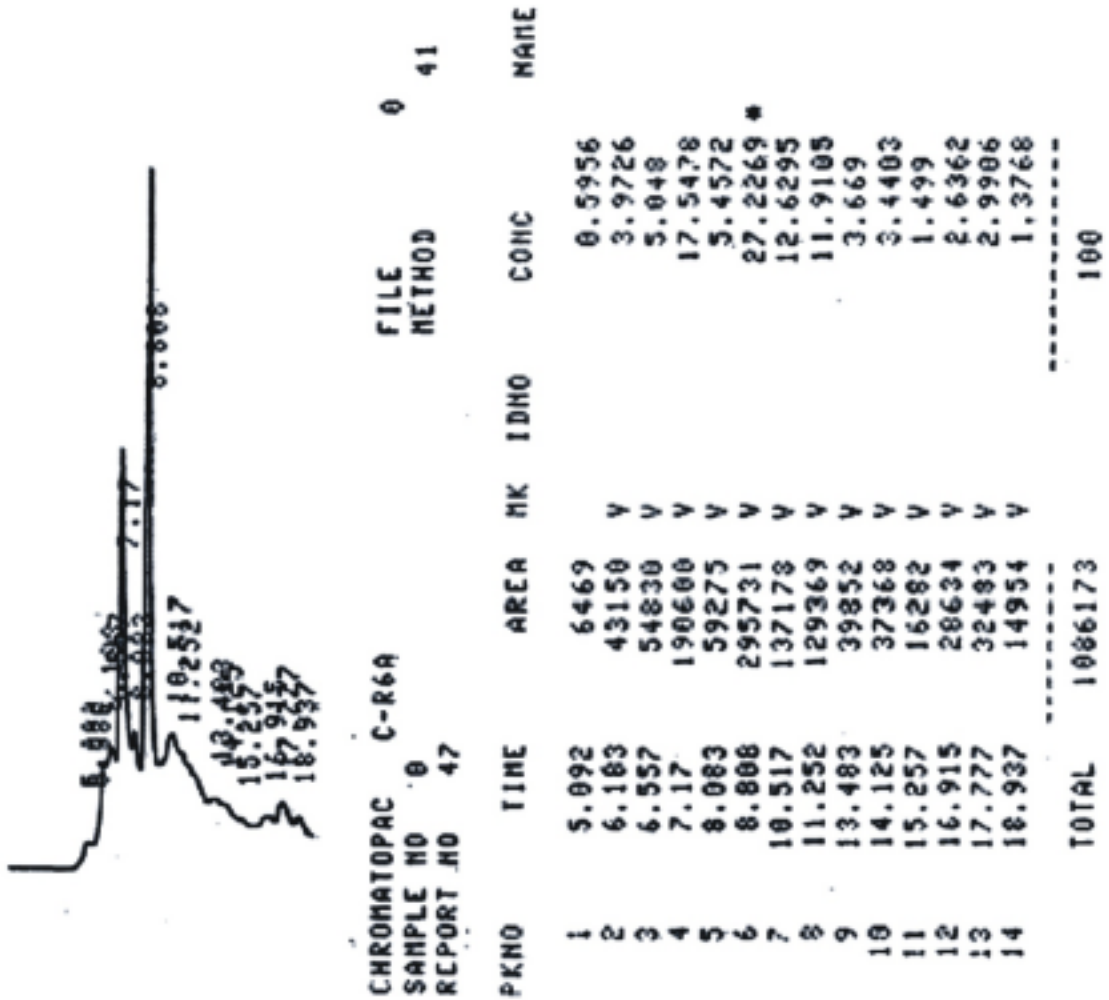
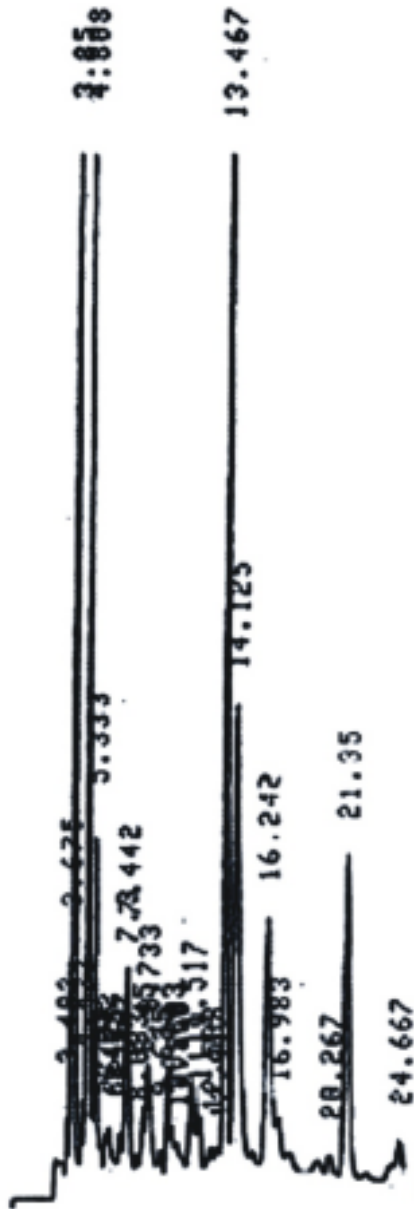


Fig. 32. Perfil HPLC del extrato acuoso de la solución cs analizada en la columna de sílice (Lichorspher® Si 60, Merck).

*Indica el tiempo de retención, el área y la concentración (27.2269%) del oxidante cs



CHROMATOPAC C-R6A
 SAMPLE NO 0
 REPORT NO 8

FILE 0
 METHOD 41

PKNO	TIME	AREA	MK	IDNO	CONC	NAME
1	3.85	80549	V		20.8618	
2	4.808	41290	V		14.7947	
3	13.467	61513	V		22.0400	
4	14.125	43000	V		16.1239	
5	16.242	23567			8.4444	
6	21.35	27167			9.7344	
TOTAL					279087	:00

Fig. 33. Perfil HPLC de la solución cs completa analizado en la columna ODS (Shim-pack CLC-ODS, Shimadzu). El oxidante cs se eluye a 13.467 min

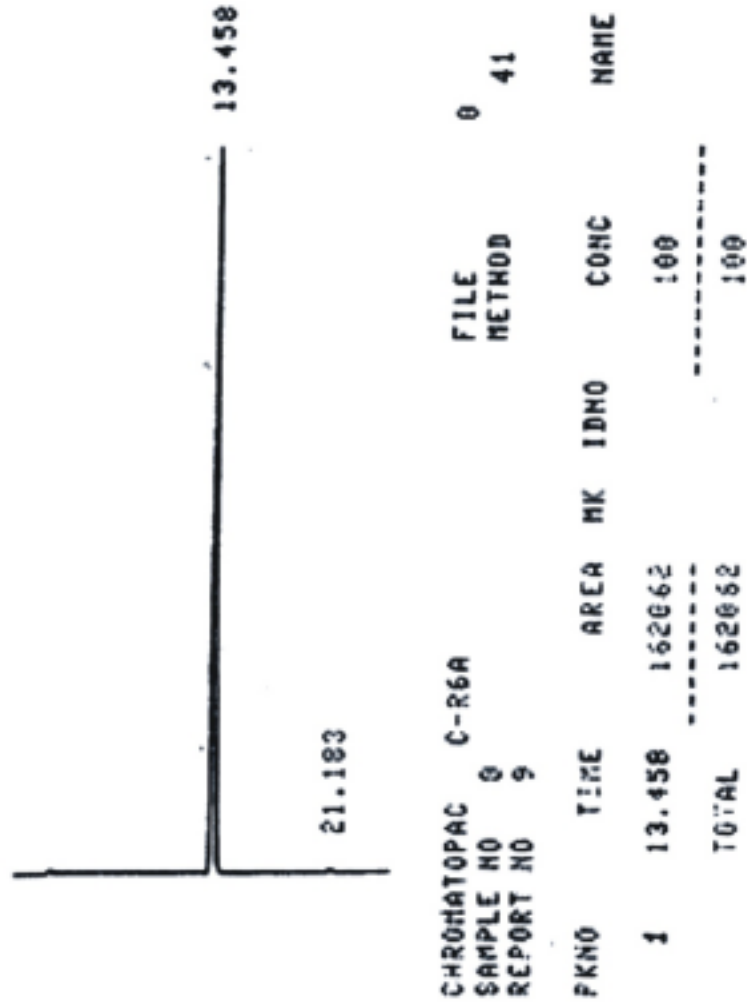


Fig. 34. Perfil HPLC del oxidante cs puro, analizado en la columna ODS (Shim-pack CLC-ODS, Shimadzu) eluido en el tiempo de retención de 13.458 min

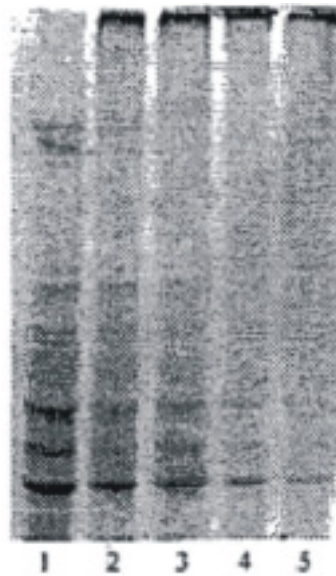


Fig. 35a. SDS-PAGE de proteínas microsómicas de pulmón de conejillo de indias tratadas con solución cs completa y con el oxidante cs. Línea 1, microsomas no tratados, línea 2, microsomas tratados con 50 μ l de solución cs; línea 3, microsomas tratados con 100 μ l de solución cs; línea 4, tratados con 10 μ g de oxidante cs; línea 5, microsomas tratados con 20 μ g oxidante cs.

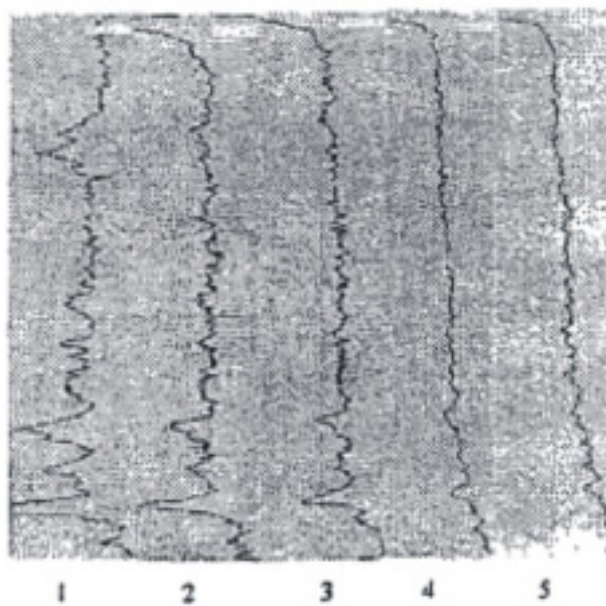


Fig. 35b. Barrido densitométrico de las bandas de proteína de diferentes líneas como en Fig. 35a.