

El control biológico del tetrayodofenoltaleinato sódico

POR

J. BARBA GOSÉ

Este análisis tiene por objeto determinar si el mismo producto obtenido en distintos centros industriales presenta diferencias tóxicas apreciables que hagan necesario controlar sistemáticamente estos derivados yodados antes de lanzarlos al comercio.

Las impurezas que determinan la anormal toxicidad del tetrayodo proceden tanto del proceso de su síntesis como de su descomposición por acción del aire y la luz en el transcurso del tiempo.

El tetrayodofenoltaleinato sódico se obtiene a partir del fenol y el anhídrido ftálico, halogenando la fenoltaleína que resulta y convirtiéndola luego en la sal sódica. Tal como se indica a continuación.

Preparación de fenoltaleína, a partir del anhídrido ftálico y el fenol, empleando como agente de condensación el cloruro estánnico, el ácido sulfúrico o el cloruro de zinc.

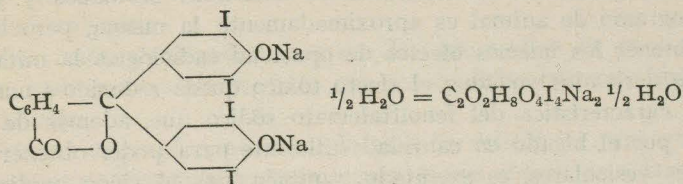
Una solución de doscientas cincuenta partes de anhídrido ftálico en doscientas partes de ácido sulfúrico concentrado se mezclan con ochocientas partes de fenol fundido. Se calienta la mezcla de diez a doce horas a 115-120°. (La solución del anhídrido ftálico en el ácido sulfúrico se hace en caliente, enfriando luego hasta 115°.) Se hierve la mezcla; calienta con agua para separar el fenol del ácido ftálico; se disuelve éste en una solución caliente de sosa cáustica, se acidula con ácido acético, y luego, ligeramente, con ácido clorhídrico.

La fenoltaleína se precipita en forma de un polvo blanco amarillento, que se cristaliza en alcohol caliente. Para obtener de éste el α tetrayodofenoltaleína se pueden seguir distintos procedimientos : (α) se

trata directamente una solución alcalina de fenolftaleína con una solución de yodo en yoduro potásico, o de cloruro de yodo en ácido clorhídrico; (6) por acción del cloruro de yodo sobre una solución de fenolftaleína en ácido acético. (En la industria se usan estos diversos procedimientos según los laboratorios que lo preparan.) Este compuesto tiene como sinónimos los nombres de Nosophen y Yodophen.

Es un polvo insoluble en agua de color castaño, que funde a 255°, desprendiéndose vapores de yodo.

La sal sódica de este compuesto es el tetrayodofenolftaleinato sódico.



Se presenta cristalizado en prismas de color azul pálido, que, mirados al microscopio, son prácticamente incoloros. Se disuelve fácilmente en el agua y en el alcohol, dando soluciones de color azul-morado. Esta coloración se intensifica calentando, volviendo a su color primitivo al enfriarse. La acción de la luz y de los rayos solares actuando directamente decoloran la solución, debido a que se altera el compuesto por oxidación.

Este compuesto fué incorporado entre los productos farmacéuticos en 1923, cuando, después de diversos ensayos y tentativas, se adoptó como una de las mejores substancias para hacer radiológicamente asequible la vejiga biliar.

Los ensayos para el uso de esta substancia tienen su antecedente en los trabajos de Abel y Rowntree en el año 1910, quienes experimentaron la acción de ciertos preparados ftaleínicos y su electividad de eliminación por la bilis, pensando emplearlos para estudiar la capacidad funcional del hígado. Estos trabajos fueron los que sugirieron a Graham, Cole y Copher la idea de que buscando un compuesto fenolftaleinado de peso atómico elevado, tales como los de yodo o de bromo, fuera posible obtener una bilis opaca a los rayos X, y con ello la imagen radiológica de la vejiga biliar.

Los trabajos empezaron en 1923, y la substancia empleada fué el tetrayodofenolftaleinato sódico por vía endovenosa, pero en los primeros ensayos, esta substancia dió resultados poco satisfactorios, ya que, a causa de la toxicidad de la misma, se registraron algunos resultados funestos.

Siendo debida esta anormal y peligrosa toxicidad a impurezas de tetrayodo, se logró obtener esta substancia en mejores condiciones de pureza (1924), siendo entonces los resultados de los ensayos satisfactorios.

Paralelamente a las investigaciones con los derivados yodados, se experimentaron los efectos de los derivados ftaleínicos bromados, y en el mes de enero de 1925, Whitaker y Milliken, en el *Sur. Gynec. and Obs.*, publicaron un trabajo en el que ponen de manifiesto cómo se pueden obtener los mismos efectos radiológicos con los preparados de yodo que con los de bromo, aun empleando aquéllos en mucha menor cantidad.

La toxicidad de ambas series de derivados bromados y yodados, por kilogramo de animal es aproximadamente la misma, pero bastando para obtener los mismos efectos de opacidad radiológica la mitad de la dosis de derivados yodados, el efecto tóxico queda reducido a una mitad.

Es característica del fenolftaleinato sódico que, además de ser excretado por el hígado en cantidad suficiente para poder obtener buenas imágenes vesiculares, es excretado, también, por el riñón, pudiendo ser reconocido colorimétricamente en la orina después de alcalinizarla.

Tienen además la ventaja los derivados de yodo de ser el peso atómico de éste superior a 126'92, y el de bromo, a 79'95, debiendo tenerse en cuenta que la opacidad radiológica está en razón directa del peso atómico de los elementos.

Establecida ya la eficacia y excelencia de esta droga para la radiografía de la vejiga biliar, los únicos escollos están (a) en las dosis (administrar las adecuadas) (b) y en las impurezas (analizar la toxicidad que, debido a cuerpos extraños, puede ser anormal y excesiva).

a) Administrada esta substancia endovenosamente, el perro tolera dosis hasta de 0'2 gr. por kilogramo de animal.

En el hombre puede considerarse un promedio prudente el de 0'1 gr. por kilogramo de peso.

En ratones es difícil apreciar la *dosis tolerada*, ya que no pueden observarse bien los efectos tóxicos y no mortales, pero un promedio de mínima dosis mortal está entre 0'35 y 0'40 gr. por kilogramo de peso.

b) En lo que se refiere a la pureza en función de la toxicidad, pueden verse las curvas obtenidas ensayando muestras mandadas por los laboratorios ingleses Allen & Hanburys, Martindale, British Drug Houses, Boots, Burroughs Wellcome, Southall y Evans.

El procedimiento empleado para estos ensayos es el mismo que emplean para analizar la toxicidad de los salvarsanes en el «Medical Research Council» de la Gran Bretaña.

El animal de experiencia es el ratón, a los cuales se les inyecta la solución de la droga en la vena de la cola, según la técnica y detalles indicados a continuación.

I. *Preparación de la disolución.* — La solución de la droga se hace en agua recientemente destilada en condensador de vidrio (recientemente destilada, a fin de que no pululen microorganismos) (condensador de vidrio para evitar vestigios de metal). La solución se prepara de nuevo cada veinticuatro horas, porque se altera en contacto del aire, procurando, además, que durante la experiencia, el frasco que contiene la sustancia esté protegido de la luz solar directa.

II. La jeringa para inyección es conveniente sea toda de vidrio, como las empleadas para tuberculina, de capacidad total de 1 cm³, dividida en décimas y centésimas. La aguja debe ser fina, como las usadas en odontología.

III. Los ratones más adecuados son los que oscilan de peso entre 15 y 25 gr. y de colores claros, para que sea posible distinguir bien las venas de la cola.

Los ratones se guardan en cajas de tamaño suficiente, para que no estén aglomerados. Durante las veinticuatro horas anteriores a la inyección no se les da alimento.

Siguiendo la operación con algunos detalles, procedemos primero a pesar el ratón, tomando nota de él; luego tomamos nota de algún carácter aparente del animal (color, por ejemplo).

Seguidamente se mete el ratón en un cilindro de cartón que, para ratones de peso entre 15 a 25 gr., debe tener unas dimensiones de 8 cm. de largo por 3 de diámetro. Se tapa con un pedazo de algodón en rama el extremo que corresponde a la cabeza, y con un tapón con una muesca, para que salga y quede libre la cola, el otro extremo.

Este cilindro conteniendo el ratón se sujeta verticalmente a un soporte, de manera que la cola quede sumergida en una vasija conteniendo agua caliente a 50° (esta temperatura puede mantenerse constante en virtud de unas lámparas eléctricas adecuadas) durante un tiempo de unos dos minutos.

Luego se coloca en las pinzas de otro soporte en posición algo inclinada, según sea la más cómoda para el operador.

Se da la inyección, dejando inmediatamente el ratón libre en una jaula con comida. Se pueden poner varios ratones inyectados con iguales dosis en la misma jaula.

Se anota para cada ratón la dosis administrada y el volumen de líquido inyectado.

Se observan las jaulas, para ver los efectos, a las cinco horas de la inyección, a las veinticuatro, a las cuarenta y ocho y a las setenta y dos, anotando cada vez los que se encuentran muertos.

Más tarde de setenta y dos horas ya no hay variación en la mortalidad, como se puede ver en la gráfica que representa la mortalidad en relación con el tiempo.

Teniendo en cuenta que las curvas de toxicidad son tanto más representativas y aproximadas a la verdad cuanto mayor es el número de elementos con los que tenemos los promedios, para cada dosis empleamos treinta ratones, y en cada muestra ensayamos un mínimo de cuatro dosis, lo que representa ciento veinte ratones para cada ensayo.

Como éste que hacemos es un ensayo comparativo, tomamos como punto de referencia para ver las variaciones la dosis que corresponde al 50 por 100 de mortalidad.

Encontrando como resultados los siguientes números:

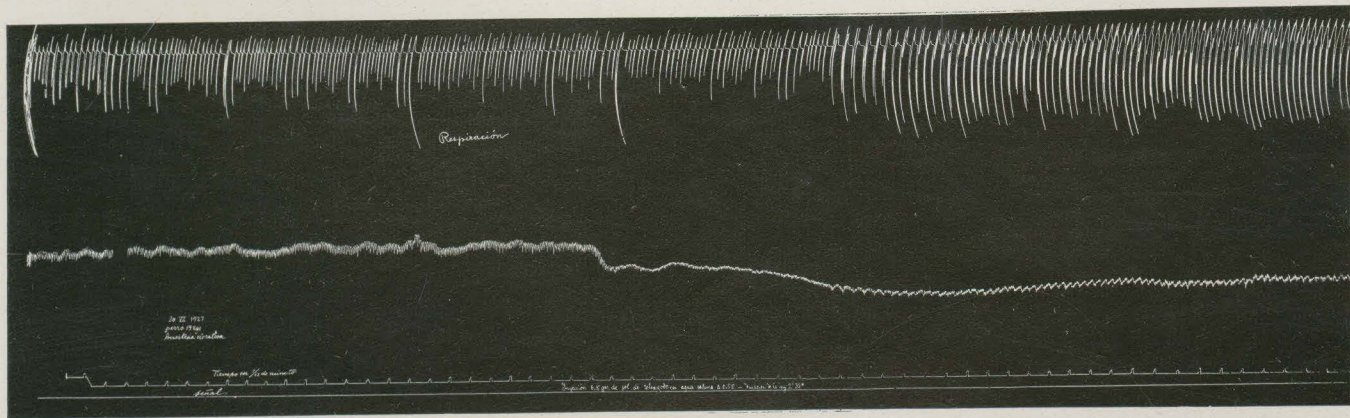
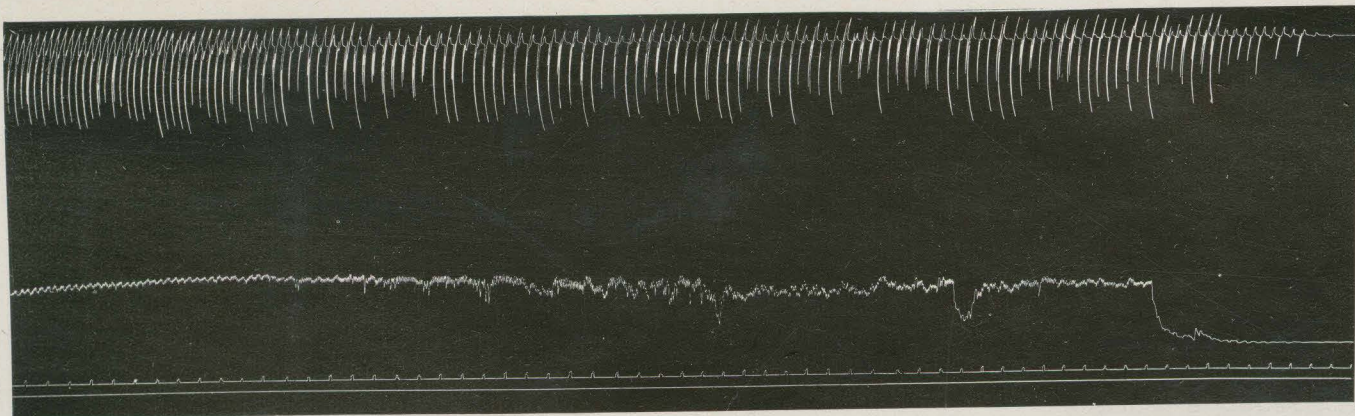
	Miligramos por 20 gs. peso ratón
Allen & Hanburys.....	7'2
Martindale.....	6'7
British Drug Houses.....	5'2
Boots.....	6'5
Burroughs Wellcome.....	5'9
Southall.....	7'1
Evans.....	5'7

Como consecuencias de estos resultados vemos que el promedio de dosis 50 por 100 mortal es 6'3, la desviación standard es $\sqrt{\frac{\sum d^2}{n}} = \sigma = 0'83$,⁽¹⁾ o sea que las dosis usando la fórmula establecida para ver si las diferencias son significativas $\left(\frac{x_1 - x_2}{\sqrt{\sigma_1^2 + \sigma_2^2}} = \geq 3\right)$ ⁽²⁾ aplicada para los valores extraños de la serie de dosis, encontraremos, según el concepto biológico, si la diferencia entre ellos es digna de ser apreciada o no. En nuestro experimento, el valor hallado a la anterior relación es inferior a 3, lo cual indicaría, según aquella y en general, que la diferencia no es significativa; pero, no obstante, si tenemos en cuenta que la forma de las curvas obtenidas es casi vertical en su parte media y, por lo tanto, que dosis muy próximas ocasionan notable diferencia en la mortalidad, cabe, en este caso concreto, tomar en consideración la diferencia, aunque sea pequeña.

Como complemento a estas observaciones de toxicidad, desde el punto de vista del éxito letal, hemos realizado en el Instituto de Fisiología de Barcelona varias observaciones en perros, a fin de estudiar los trastornos y modificaciones producidas por dosis submortales de tetraiodofenoltaleína.

(1) J. H. Burn, *Methods of Biological assays*, pág. 117.

(2) Id., pág. 121.



Efectos circulatorios y respiratorios de la inyección de la solución de tetrayodofenoltaleinato sódico a 10 por 100, isotoniada con cloruro sódico.

Entre los fenómenos circulatorios y la respuesta respiratoria puede observarse una relativa independencia. La vasodilatación precede algunos segundos a la disnea, y ésta puede cesar independientemente de la regularización de la presión arterial, y en ocasiones, a pesar de descender todavía la presión.

Las conclusiones provisionales que pueden deducirse de los cinco experimentos realizados son las siguientes:

A dosis de 2 a 5 gr. en perros de pesos entre 11 y 17 kilos, se observa:

Vasodilatación gradual y sostenida, acompañada algunas veces de taquicardia : aumento de amplitud respiratoria, con aumento de frecuencia de tipo bulbar, hasta llegar a veces a la disnea asfíctica : modificaciones de la coagulabilidad sanguínea, con retardo del tiempo de coagulación y del tiempo de retracción del coágulo.

En las inyecciones practicadas con soluciones de tetrayodo isotoniizadas con CINA, los efectos observados han sido los mismos.

Pharmacological Laboratory
de la Ph. Soc. of Gr. Bri-
tain. Profesor J. H. Burn.