

Reg. 18



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

Escuela Nacional de Estudios Profesionales
"ZARAGOZA"

OBTENCION DE CARDIOTONICOS A
PARTIR DE RECURSOS NATURALES
NACIONALES (Digitalis purpurea).

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
Químico Farmacéutico Biólogo
P R E S E N T A:
REBECA LOPEZ MARTINEZ



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

C O N T E N I D O

CAP.		PAGS.
	INTRODUCCION	1
I	FUNDAMENTACION DEL TEMA	4
II	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	26
III	OBJETIVO E HIPOTESIS	33
IV	MATERIALES Y METODOS	34
V	RESULTADOS Y DISCUSION	56
	CONCLUSIONES	75
	BIBLIOGRAFIA	78

INDICE DE FIGURAS

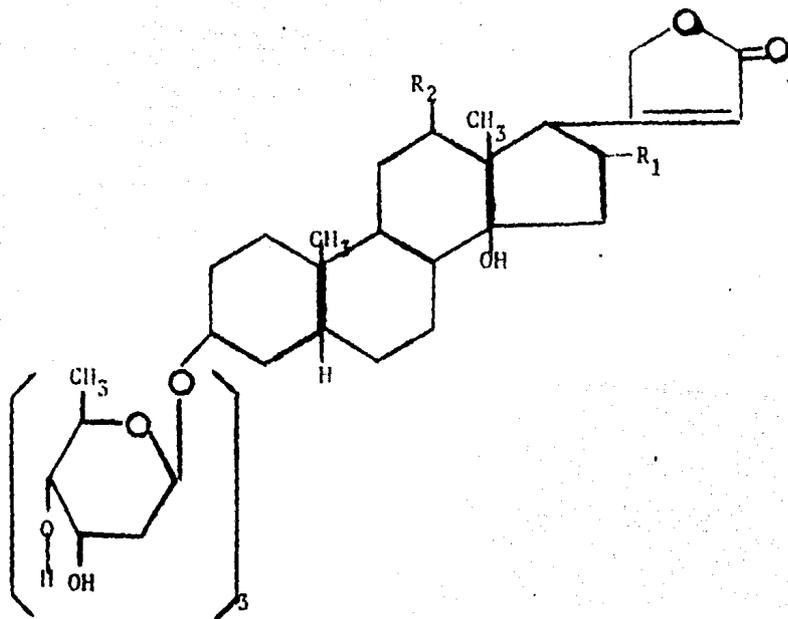
FIG.		PAG.
1	Estructura básica de un glucósido digitálico.	2
2	<u>Digitalis purpurea.</u>	5
3	Principales glucósidos en <u>D.purpurea</u> y <u>D.lanata</u>	7
4	Digitoxigenina C-20 marcada.	12
5	% de mortalidad global mundial % de mortalidad por enfermedades cardiovasculares.	27
6	% de morbilidad por enfermedades cardiovasculares.	28
7	% de mortalidad por enfermedades cardiovasculares.	29
8	Métodos de extracción I y IA con cloroformo.	42
9	Método de extracción II con etanol.	45
10	Curva estandar de Digitoxina y Digoxina.	54
11	Curva estandar de Digitoxina y Digoxina.	55
12	Purificación y cuantificación de glucósidos cardíacos del extracto clorofórmico.	63
13	Identificación cromatográfica de Digitoxina, Digoxina y Gitoxina en los extractos E, X, Y y las fracciones EF-1, EF-2.	65
14	Purificación y cuantificación de glucósidos cardíacos del extracto etanólico.	66
15	Espectros en infrarrojo de Digitoxina.	71
16	Espectros en infrarrojo de Digoxina	72

INDICE DE TABLAS.

TABLA		PAG.
1	Valores farmacocinéticos y dosis promedio para glucósidos cardíacos.	30
2	Potencia de glucósidos cardíacos.	31
3	Sistemas de disolventes ensayados.	48
4	Análisis de la hoja <u>D. purpurea</u> .	56
5	Sistemas de disolventes para separación de cardiotónicos.	61
6	Glucósidos cardíacos separados en Sephadex LH-20, cuantificados por picrato alcalino.	68
7	Glucósidos cardíacos separados en placa preparativa de Kieselgel GF ₂₅₄ , cuantificados por picrato alcalino.	70
8	Asignación de las señales en los espectros I.R. de la Digoxina y Digitoxina.	74

INTRODUCCION

Los fármacos más útiles en el control de padecimientos cardiovasculares son los glucósidos cardiacos incluidos en el grupo de los cardenólidos, compuestos constituidos por una genina o aglucona en unión glucósidica con un sacárido. Los más importantes glucósidos cardiacos son obtenidos de hojas del género digitalis; se caracterizan por una estructura básica de ciclopentanoperhidrofenantreno sustituido en las posiciones 10, 13 y 14 por grupos metilo e hidroxilo respectivamente; enlazado en el carbón 3 con una tri-digitoxosa, y al carbón 17 con un anillo α, β -insaturado γ -lactona (buténolido) el cual le confiere su propiedad farmacológica.



$R_1=R_2=H$ Digitoxina

$R_1=OH$ $R_2=H$ Gitoxina

$R_1=H$ $R_2=OH$ Digoxina

$R_1=R_2=OH$ Diginatina

$R_1=O-CHO$

Gitaloxina

$R_2=H$

FIG. 1.- Estructura básica de un glucósido digitálico

Los glucósidos digitálicos con actividad cardiotónica se forman como productos de hidrólisis de la acción de enzimas endógenas a partir de glucósidos primarios, lanatósidos en D. lanata y purpurósidos o purpurea glucósidos en D. purpurea. Los lanatósidos contienen un grupo acetilo y una glucosa unida a la última digitoxosa, mientras que los purpurea glucósidos solo contienen una glucosa.

La D. purpurea L., especie originaria de Europa y Asia es introducida en nuestro país como planta de ornato, actualmente se localiza en los Estados de Hidalgo, Puebla, Veracruz, Guerrero y Chiapas. No obstante la importancia de explotar este recurso natural, son pocos los estudios sobre la implementación del cultivo y el aislamiento de principios activos que contienen estas plantas. En base a estos antecedentes es necesario establecer un método de extracción que permita aislar los glucósidos digitálicos más activos de la D. purpurea.

El cuadro básico de medicamentos del país (Diario Oficial 1984) incluye a la digitoxina, digoxina y lanatósido C, los cuales son importados en su totalidad (Instituto de Comercio Exterior) y representan \$ 18,059,000.00

I. FUNDAMENTACION DEL TEMA

Descripción Botánica

La Digitalis purpurea pertenece a la familia de las Escrofulariáceas; es una planta bienal y a veces perennizante, durante el primer año forma un rosetón de hojas a ras del suelo, en el segundo año el tallo se hace prominente y aparece un vástago que puede alcanzar hasta 2 metros de altura.

Las hojas tienen forma variable, generalmente entre ovaladas y lanceoladas, o más ancha aovada y abruptamente contraída en su rabillo, o por el contrario, más estrecha, con los bordes festonados, dentados o casi enteros. La consistencia de las hojas es blanda y con nervadura realzada en el envés, más o menos vellosas. Las flores forman un ramillete en la sumidad del tallo, todas sobre un lado de él y colgantes, cada una con su rabillo, formando un racimo unilateral; su tamaño va de 3 a 5 cm., tubulosas, dilatadas y en la mitad superior de la corola, con los labios poco manifiestos de color purpúreo, con manchas más intensas en la parte dilatada del tubo, generalmente orladas de blanco (23).



FIG. 2.- *Digitalis purpurea* L.

Constituyentes de la hoja

La mayor parte de los reportes coinciden en abocarse a la descripción de los glucósidos digitálicos, sin tomar en cuenta los otros componentes de la hoja, como serían lípidos, cenizas, compuestos nitrogenados, fibra cruda etc.

Se considera que los glucósidos más importantes en D. purpurea (16) son digitoxina 0.2-0.3%, púrpurea glucósido A y B, digitalina, gitalina, gitoxina, glucogitaloxina; otros tipos de digitóxidos, así como saponina, digitonina; un aceite volátil que contiene un estearopteno, digitalosmina, ácido antirrínico, una enzima oxidasa (en hojas recién secadas) una pequeña cantidad de ácido tánico y un total de cenizas de 7 a 12%.

En el caso de D. lanata (13) se ha reportado la presencia de 5 series de glucósidos primarios o lanatósidos, designados como A, B, C, D y E; dependiendo del grado de hidrólisis se llegará a productos secundarios o hasta las genninas correspondientes.

Con el objeto de ilustrar de una forma más clara los principales glucósidos en D. purpurea y D. lanata se presenta la fig. 3

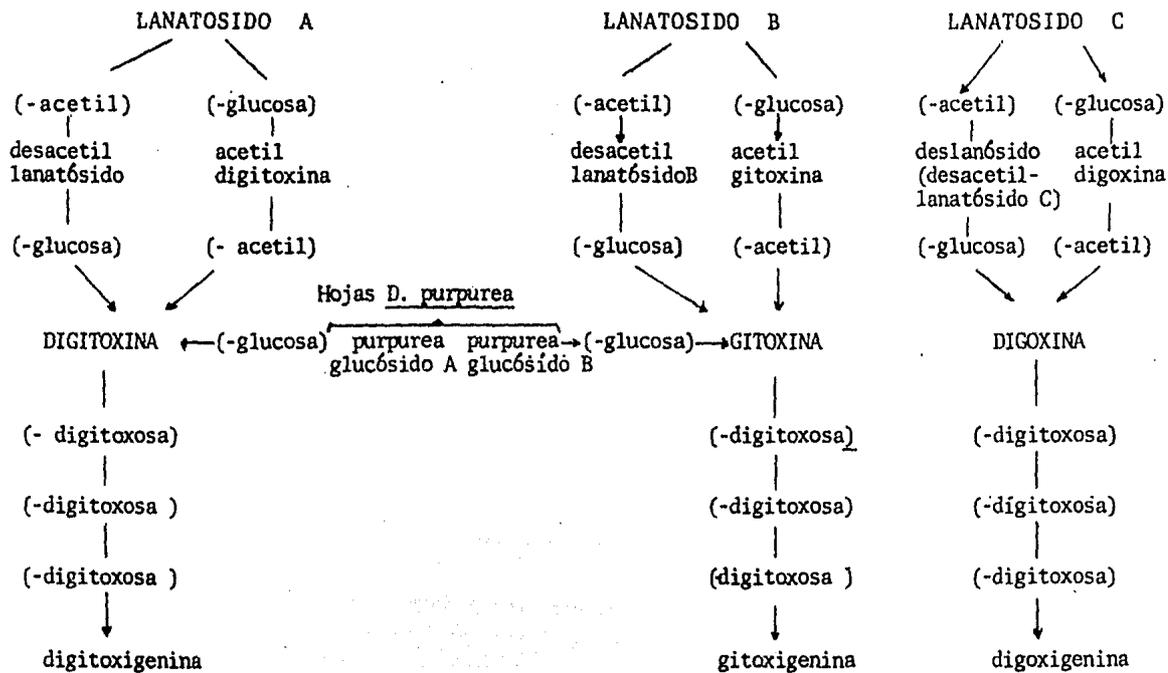


Fig. 3.- Principales glucósidos en D. purpurea y D. lanata

Estructura química

Los glucósidos digitálicos están constituidos por un esteroide, el cual en la posición del carbono 3 está unido por medio de un enlace glucosídico a una o más digitoxosas, las cuales a su vez pueden o no tener un grupo acetilo o glucosa dependiendo de la fuente de extracción.

Por su estructura básica, aglucona o genina; se clasifican en el grupo de los cardenólidos, que son esteroides de 23 carbonos, conteniendo en la posición del carbono 17 un anillo butenólido α, β insaturado γ lactona.

La digitoxigenina es la aglucona más simple aislada hasta el momento de fuentes naturales, con acción cardiotónica..

Relación estructura-actividad

La estereoquímica de los cardenólidos fué descrita por Tam y Chem (43) los cuales propusieron un esqueleto esterooidal 14 hidroxilado en el cual los anillos A/B están unidos en configuración cis, B/C en trans y C/D en configuración cis; además el esqueleto esterooidal contiene una lactona insaturada en posición 17 con orientación β y un grupo

funcional oxigenado en orientación 3 β (grupo hidroxilo o un-ion glucosídica). Tam considera que los grupos hidroxil adicionales son de menor importancia para el efecto cardiaco, ya que considera que la distancia entre el carbonilo de la lactona y la función oxígeno en C-3 es un valor crítico para la actividad (7, 10) esta distancia exactamente definida por los dos polos electronegativos y el esqueleto rígido del esteroide debe estar relacionado con las propiedades del receptor digitálico.

La actividad de los glucósidos cardiacos reside en la genina. No obstante las moléculas de azúcar participan modificando la solubilidad y las propiedades de enlace. En general los efectos de las geninas son de corta duración comparada con los glucósidos cardiacos y por lo tanto no son adecuados para uso terapéutico. La afinidad de los glucósidos cardiacos por el músculo cardiaco esta dada por los enlaces glucosídicos con una o más azúcares (12).

Efectos farmacológicos

Los digitálicos actuan directamente en el miocardio para producir un aumento en la contractibilidad (efecto inotrópico positivo), en el corazón dilatado disminuye su tama-

ño y aumenta el rendimiento cardiaco. El efecto inotrópico de los digitálicos se manifiesta tanto en corazón sano como en el dañado incrementando la compensación fisiológica. Estos compuestos también aumentan la excitabilidad cardiaca y automaticidad, e incrementan el periodo refractario del miocardio.

Dosis tóxicas de digitalicos producen efecto electrofisiológico paradójico, en el cual hay una disminución en la excitabilidad, bloqueando o disminuyendo el periodo refractario, lo cual puede causar arritmias y fibrilación.

En lo que se refiere al desarrollo de métodos sintéticos, a pesar del avance en el campo de los esteroides, no fué sino hasta 1962 en que Sondheimer et Al (41) reportaron que la síntesis de estos compuestos presenta muchas dificultades debido a la naturaleza débil del hidroxilo en C-14 de la genina, el cual es facilmente removido por los ácidos para dar anhídrido geninas.

Fritsch et Al., sintetizaron digitoxigenina a partir de 15 hidroxicortisona (22). En 1974 Kruger (32) reportó la síntesis de 3 β ,14 β -19 oxigenado y de 3 β -19 oxigenado-14, 15 dihidrocardenólido de acetato de pregnenolona. Por otra parte, Martelli (33) preparó el 3 acetato de 6 α -metil digi-

toxigenina a partir de 21-hidroxi-preg-4-eno-3, 20 diona en 18 pasos, el cual presentó una actividad cardiotónica equivalente al 3 acetato de digitoxigenina (prueba efectiva en corazón de cuyo).

Estos intentos nos muestran la complejidad de la síntesis del grupo cardenólido, y es por esto que a la fecha se siguen obteniendo los glucósidos cardiacos a partir de productos naturales.

Biosíntesis

El conocimiento de la biosíntesis de cardiotónicos es necesario para comprender el control celular o interpretar la función biológica de estos compuestos, así como sus requerimientos nutricionales.

Se ha establecido que el núcleo esteroidal se origina a partir de ácido mevalónico vía escualeno (14), dicho ácido se obtiene a su vez de acetyl Co-A, la cual puede ser obtenida por varias rutas metabólicas (degradación de ácidos grasos, ciclo de Krebs).

Reichstein (37) encontró que el suministro de ácido mevalónico 3-¹⁴C a plantas de Digitalis, producía digitoxigenina C-20 marcada. (Fig. 4)

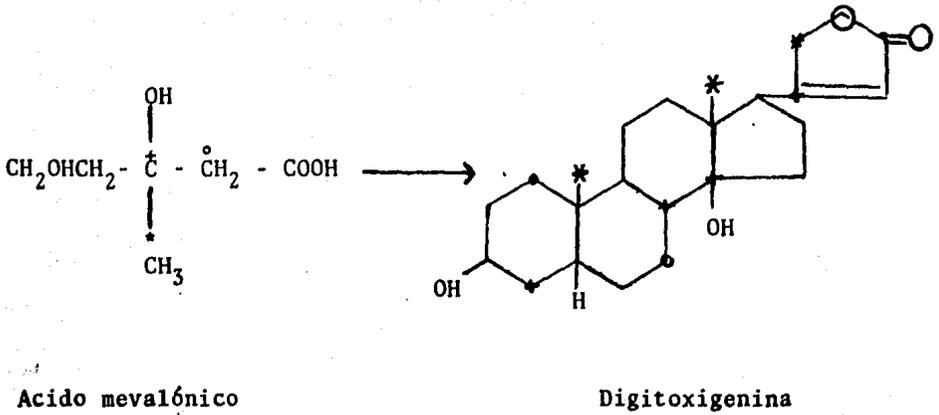


FIG. 4 Digitoxigenina C-20 marcada

Los estudios más recientes han mostrado que el colesterol (1) la progesterona y la pregnenolona marcados (1, 46) también producen cardiotónicos marcados.

Tshesch et Al (46) han encontrado que los esteroides de 21 carbonos con un grupo ceto en C-20 son precursores específicos de los cardiotónicos en las plantas.

Condiciones de cultivo, recolección y almacenamiento
de Digitalis purpurea

Como ya ha sido señalado, esta especie es nativa de Europa Central y Asia, y los países donde es extensamente cultivada son Inglaterra, Estados Unidos, Holanda, Canada, Inglaterra y algunos otros.

El control de las condiciones de crecimiento, recolección y secado son en extremo importantes, ya que aseguran obtener hojas con mayor contenido de glucósidos (16).

Los factores a tomarse en cuenta son la preparación del suelo para las semillas germinadas, las cuales son transplantadas a las 8-9 semanas. Si estas fueron germinadas en agosto-septiembre deben transplantarse hasta marzo para asegurar un buen nivel de hojas durante el primer año.

La recolección de hojas debe hacerse anualmente du-

rante los meses de septiembre a noviembre después del mediodía y manualmente para asegurar su limpieza, eliminar hojas deterioradas y material extraño.

Posterior al proceso de recolección, el manejo de las hojas es sumamente importante. Las hojas recolectadas deben ser inmediatamente colocadas en cámaras especiales con control de temperatura y humedad. La temperatura óptima de secado no debe exceder 60°C para asegurar la retención del color verde natural característico de la planta fresca.

Algunos autores (34) mencionan que después de la recolección se debe efectuar un lavado de las hojas, picado, secado y embalaje al vacío.

Procedimientos de extracción

La Digitalis aparece en la London Pharmacopeia hacia 1650, e incrementa su popularidad en 1785 con los trabajos del Dr. Withering, quien demuestra exitosamente su eficacia como un tónico para el corazón. En 1799 John Ferriar atribuye a la digital una acción primaria en el corazón, sin embargo el empleo de preparaciones galénicas (extractos) a partir de esta planta, causó problemas debido al uso indiscriminado de la droga, ya que se ignoraba cual era la dosis

adecuada.

En 1867, el laboratorio de Fisiología del Museo de Historia Natural inicia un experimento comparativo sobre ranas con digitalina en polvo de Homolle-Quevenne y digitalina amorfa de Nativelle y una digitalina cristalizada del mismo Nativelle; los resultados demostraron que la digitalina cristalizada era la más activa. En 1871 Nativelle obtiene la digitalina cristalizada pura. Stoll en 1935, logra aislar de hojas de *D. lanata* tres sustancias químicamente puras, conocidas como lanatósidos A, B y C las cuales por hidrólisis alcalina pierden el grupo acetilo para dar lugar a los deacetil lanatósidos A, B y C. Asimismo demuestra que las hojas contienen una enzima capaz de liberar una glucosa del lanatósido y obtener acetilglucósidos; de esta manera concluye que la hidrólisis alcalina y enzimática (o viceversa) de los lanatósidos dan lugar a la formación de digitoxina, gitoxina y digoxina.

Gisvold y Bay en 1948, sugieren que los glucósidos primarios de digitalis al ser solubles en agua, podían ser extraídos de la planta fresca si esta era desintegrada en pequeñas partículas. Así con aplicación de calor coagulaban las clorofilas y otro material proteínico al mismo tiempo que ocurría la inactivación de las enzimas. Sin embargo en años

posteriores se demuestra que la extracción en agua caliente aunque inhibe la degradación enzimática, produce derivados altamente activos como el 16 formiloxi de gitaloxina en D. purpurea. De ahí que generalmente se prefiera el uso de alcohol al 70% para D. lanata y D. purpurea.

Este fué el inicio de la búsqueda de métodos de extracción y aislamiento de glucósidos de la digitalis, particularmente de la digitoxina en forma pura con buenos rendimientos, lo cual resulta un poco difícil debido a que las hojas contienen solo de 0.2 a 0.4% de digitoxina muy poco soluble en agua y mezclada con otros glucosidos, taninos y material extraño.

En 1940 Emil Wolf (46) patenta un método de extracción de glucósidos digitálicos de D. lanata. El método comprende la eliminación de lípidos con benceno en ebullición (8 a 10 veces) secado a temperatura ambiente, amasado de la muestra con óxidos metálicos alcalinoterreos (MgO , Al_2O_3 , ZnO) en presencia de agua y hielo granulado (para evitar incrementos de temperatura) extracción (3 a 4 veces) con disolventes conteniendo oxígeno, tal como cetonas alifáticas y ésteres de bajo punto de ebullición (acetato de propilo, metil etil cetona, alcohol etílico) en una relación de 10 a 20 veces la cantidad de hoja; filtración, evaporación y tratamien-

to con benceno o éter.

Otro método de extracción y aislamiento de digitoxina en hojas de D. purpurea concierne a la patente de Harry Rosen (1948). En este caso se emplea la maceración durante 24 horas con alcoholes de C₁ a C₄ (metílico, etílico e isopropílico) al 60%. Como agentes precipitantes de taninos y materiales inertes, compuestos de metales divalentes como plomo, fierro, cobre, estaño y cromo en forma de acetatos, cloruros o carbonatos (en forma sólida, suspensión acuosa o soluciones de una concentración al 30%) reposo durante 1 hora y centrifugación. El exceso de acetato de plomo se elimina con carbonato de sodio monohidratado y una corriente de ácido sulfhídrico. Después de filtrar y concentrar la solución (a presión reducida) se extrae 5 veces con una mezcla de cloroformo-éter amílico, se extrae 4 veces con una solución de carbonato de sodio monohidratado al 10%. La fase orgánica se seca sobre sulfato de sodio anhidro, se concentra la solución (a presión reducida y temperatura de 75° a 80° C) hasta un volumen de 25 c.c. se enfría a temperatura ambiente y se mezcla con 4 volúmenes de éter de petróleo, se deja reposar 1 hora. El precipitado amorfo oscuro se filtra y se lava con éter de petróleo para remover los residuos de lípidos. El precipitado se disuelve en 100 c.c. de etanol (1:1), se fil-

tra, el filtrado se alcaliniza con hidróxido de amonio al 10% nuevamente se agrega acetato de plomo y se repite el procedimiento de eliminación del exceso de esta sal.

El método canadiense aplicado por O. Keel en 1953 (24) es el único antecedente que se tiene en nuestro país de los intentos por establecer un método de extracción de digíttoxina y digipuratum Knoll (como producto secundario) a partir de D. purpurea localizada en Huachinango Pue. Este procedimiento contempla la inhibición de enzimas hidrolíticas de glucósidos por medio de una primera maceración con bicarbonato de sodio al 10% durante 24 horas, seguida de maceración continua con cloroformo por 4 días durante los cuales se colecta un extracto cada 24 horas y se repone el volumen con cloroformo nuevo.

Los dos primeros extractos se juntan y concentran a presión atmosférica hasta eliminar todo el cloroformo, el residuo se disuelve con metanol a reflujo. A esta solución se le agrega agua fría y se procede a la clarificación agregando con fuerte agitación una pasta de hidróxido de plomo recién preparada y suficiente metanol de 75 a 80%. Después de una segunda clarificación al filtrado se le agrega metanol y una solución de fosfato monosódico, posteriormente se filtra la solución se deja reposar y al día siguiente se tie-

ne una primera parte de digitoxina cruda, la cual es purificada con carbón activado.

En años recientes se han buscado alternativas para incrementar los rendimientos de extracción de glucósidos, en 1967 Baumgarter Guentener reportó una extracción convencional de glucósidos cardiacos de D. purpurea, la cual se lleva a cabo con una mezcla de agua-etanol o acetato de etilo, para posteriormente ser purificados con etanol al 35-55% por percolación en poliamida. Estos extractos son concentrados y extraídos con cloroformo.

En 1969, Creanga extrae los glucósidos con alcohol monohídrico a partir de hojas secas con un rendimiento de 0.3-0.4% de mezclas de lanatósidos A, B y C.

Separación y cuantificación de cardenólidos

La introducción de métodos cromatográficos en el análisis de glicósidos cardiacos por Reichstein (27) Kaiser (1955) han dado un enorme avance en el conocimiento de la química y bioquímica de estos productos naturales en los últimos 30 años. No obstante que más del 95% de los glucósidos y geninas fueron identificados por cromatografía en papel (CP) el desarrollo en cromatografía en capa delgada

(CCD) ha venido a reemplazar a la primera, debido a su mayor simplicidad y rapidez. Sin embargo, ambos métodos son adecuados para analizar por cromatografía toda clase de glucósidos cardíacos, desde los menos polares hasta los más polares. En general, con buenos sistemas de CCD y CP la calidad de separación y reproducibilidad es igualmente satisfactoria, aunque se ha demostrado que el rango de polaridad se duplica en sistemas en CCD usando como adsorbente sílica gel, con lo cual es posible separar glucósidos primarios y secundarios de las hojas de Digitalis en un mismo cromatograma. Otra ventaja de CCD es la alta resolución entre la capacidad límite superior, es decir que la substancia detiene su corrimiento sin dejar restos (colas) a lo largo de su desarrollo lo que permite límites de detección bajos entre glucósidos menores a bajas concentraciones y glucósidos mayores a altas concentraciones. Esta misma característica ha permitido el uso de la cromatografía preparativa en capas gruesas de sílica gel.

Son numerosos los autores que se han dedicado al desarrollo de sistemas de disolventes para la separación de glucósidos cardíacos por CCD. Nover (35) en su estudio comparativo con diferentes sistemas, señalan como característica el uso de placas de sílica gel desactivadas y sistemas con un

contenido de 1 a 5% de agua, asimismo evita el uso de disolventes clorados por su difícil recuperación. Los sistemas que recomienda son: tolueno-acetato de etilo-piridina (20:70:10) con 2.8% de agua; acetato de etilo-piridina (9:1) con 2.7% de agua; n-heptano-acetato de etilo-ácido acético (15:65:20) con 3.5% de agua.

Carvalhas y Figueira en 1973, reportaron la separación de principios activos de sus metabolitos; observaron que existe una mayor resolución de la digitoxina respecto a sus metabolitos usando una mezcla de ciclohexano-acetona-ácido acético (49:49:2) y cloroformo-isopropanol-acetona (85:5:15) en 2 corrimientos de 17cm., lo relevante de este trabajo es la disminución del tiempo de separación.

La aplicación de la cromatografía en columna para la separación de glucósidos cardiacos ha sido desarrollada en forma paralela a las técnicas de cromatografía en papel y en capa delgada. En 1958 William reporta la separación de digitoxina y glucósidos primarios usando una columna con polvo de celulosa; este método fué posteriormente reinvestigado por Bhatt y col. con el propósito de recuperar los productos separados y cuantificarlos por un método colorimétrico.

Kaiser en 1966, reporta la recuperación de 23 frac-

ciones separadas en una columna cromatográfica de sílica gel impregnada con agua y eluida con una mezcla de benceno- acetato de etilo y etanol.

En años recientes, Züllich y col (1975) con el objeto de lograr una mejor separación con propósitos de cuantificación, han empleado una columna de Sephadex LH-20 con diferentes sistemas de disolventes; diferenciándose unos por tener tolueno como principal componente y otros hexano o ciclohexano, con lo cual se invierte el comportamiento de separación de las agluconas respecto a los glucósidos cardiacos.

Es evidente la importancia de una buena resolución cromatográfica para la identificación de los diferentes componentes de una mezcla, sin embargo esta debe ir acompañada de un buen sistema de detección, el cual debe estar basado en reacciones de color altamente específico, sensibles y reproducibles. La sensibilidad que presentan los glucósidos cardiacos y sus geninas desde el punto de vista químico, es la base de numerosas reacciones de color desarrolladas para su identificación; de los 49 reactivos reportados, la mayoría han sido aplicados para cromatografía en papel, no obstante estos pueden ser usados para cromatografía en capa delgada, si bien el límite de detección en esta última es 10

veces más bajo.

Los reactivos empleados en la detección de glucósidos cardiacos pueden ser divididos en cuatro grupos:

- 1.- Reactivos basados sobre la reactividad del anillo butenólido de los cardenólidos.
- 2.- Reactivos que atacan el nucleo esteroidal.
- 3.- Reactivos que reaccionan con la parte carbohidrato.
- 4.- Reactivos con puntos múltiples de ataque.

Al grupo 1 pertenecen los compuestos nitroaromáticos (ác. 3,5-dinitrobenzoico) que en medio alcalino dan un color rojo a violeta con los cardenólidos; esta reacción depende del grupo metileno activado del anillo butenólido.

La cloramina T-Ácido tricloroacético puede ser clasificado en el grupo 2 pues en presencia de glucósidos y genninas con una función oxígeno en el C-16 da los derivados correspondientes 14,16 dianhidro con intensa fluorescencia azul en luz U.V. (365nm).

Un reactivo característico del grupo 3 es el Xanthidrol que reacciona con los 2-deoxiazúcares dando un color rojo carmín.

Finalmente, aunque la forma de acción de los reac-

tivos del grupo 4 no es tan clara como los anteriores, su valor para la detección de glucósidos cardiacos es altamente especifica y se caracterizan por el hecho que la formación de color procede bajo condiciones fuertemente acidas y oxidativas. Ejemplo de este grupo es el ácido tricloroacético-cloramina T. La formación de productos fluorescentes bajo luz ultravioleta involucra reacciones de oxidación y deshidratación del nucleo esteroidal. En luz visible se obtienen manchas azul gris de azúcares 2 deoxi libres o enlazadas.

Respecto a la cuantificación de glucósidos cardiacos, actualmente existen una serie de técnicas con alto poder resolutivo que van desde la Polarografía, Cromatografía de gaseosa, Cromatografía líquida de alta presión hasta Radioinmunoensayo y Ensayos enzimáticos. Sin embargo es importante senalar el uso de técnicas colorimétricas, debido a su simplicidad de manipulación y mínimos requerimientos de equipo. La cuantificación colorimétrica de los glucósidos cardiacos se puede basar en las reacciones coloridas de la genina, que de acuerdo a Frerejaque y de Graeve (21) se clasifican en reacciones en medio ácido y en medio básico. Las reacciones en medio ácido son específicas para el anillo esteroidal de la genina, siendo el reactivo principal el ácido sulfúrico.

Las reacciones coloridas en medio básico son específicas para la lactona α : β insaturada (butenólido) debido a que el metileno activo en dicho medio forma complejos de Meisenheimer en presencia de un compuesto nitroaromático según las investigaciones de Kovar y col (31).

De los compuestos nitroaromáticos más empleados está el ácido pícrico cuya reacción fué descrita por Baljet en 1918. Esta técnica ha sido objeto de diversos estudios y en la actualidad aparece como el método oficial para la cuantificación de digitoxina en diversas Farmacopeas.

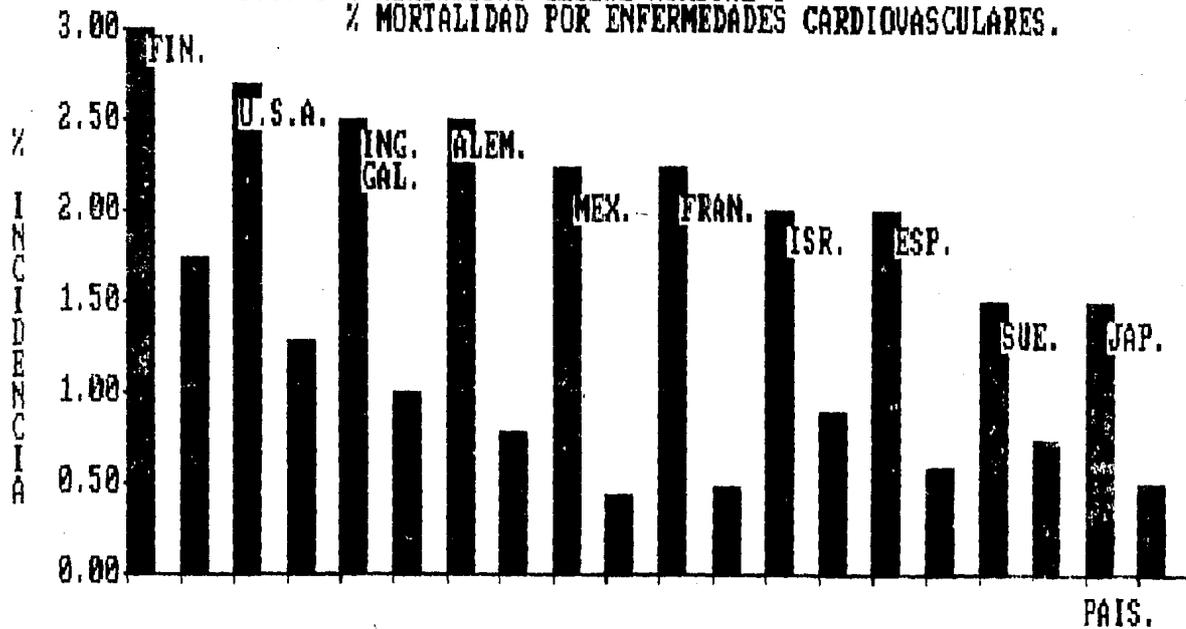
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Uno de los principales problemas, en el área de la salud en México, es el referente a las enfermedades cardiovascular, según datos recientes del Instituto Nacional de Cardiología, (Figs. 5, 6 y 7). En los cuales se observa que México se encuentra dentro de los 10 países con mayor mortalidad por enfermedades cardiovasculares. Aunque el mayor índice aparece en la población de edad más avanzada, no es menos grave en la población joven.

El grupo de fármacos que se utiliza para los problemas de insuficiencia cardiaca, es el de los cardiotónicos (digitoxina, digoxina y lanatósido, C), los cuales están incluidos en el Cuadro Básico de Medicamentos. Los glucósidos cardiacos también son ampliamente usados en otros padecimientos como son; cardiopatía hipertensiva o aterosclerótica, cardiopatías reumáticas, luética y congénita, fibrilación y aleteo auricular.

Todos los glucósidos cardiacos tienen el mismo tipo de acción inotrópica positiva, por lo tanto la elección del preparado depende simplemente de la rapidez de acción y la duración del efecto que se busque. (Tablas 1 y 2)

FIG. 5 % MORTALIDAD GLOBAL MUNDIAL Y
% MORTALIDAD POR ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES.



Fuente: INC

FIG. 6. % MORBILIDAD POR ENFERMEDADES
CARDIOVASCULARES.

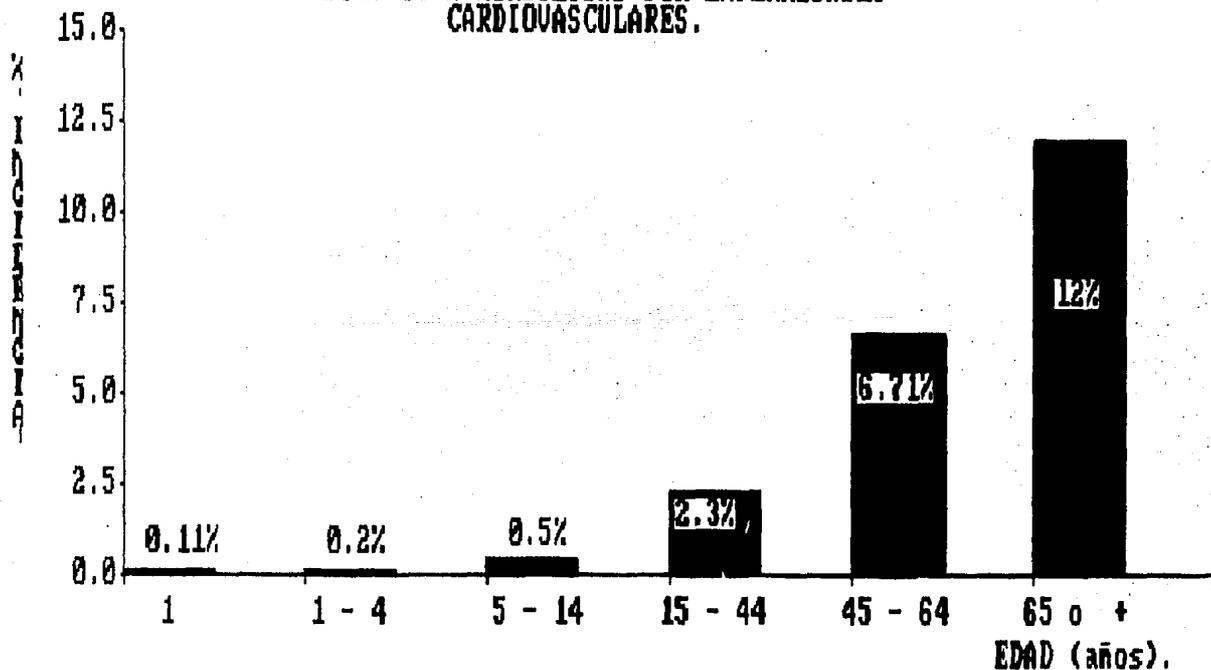


FIG. 7. % MORTALIDAD POR ENFERMEDADES
CARDIOVASCULARES.

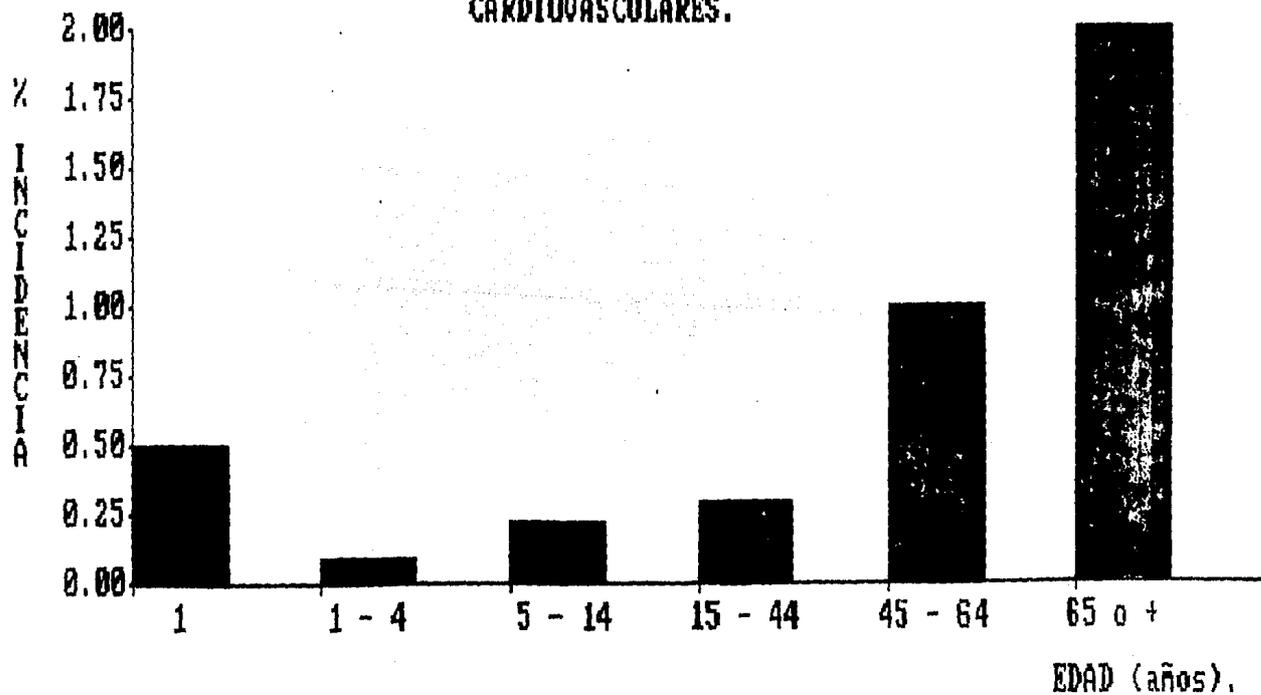


TABLA 1.- VALORES FARMACOCINETICOS Y DOSIS PROMEDIO PARA GLUCOSIDOS CARDIACOS

	DIGITOXINA	DIGOXINA	DESLANOSIDO	UABAINA
Absorción gastrointestinal	90 a 100 %	60 a 85 %	No confiable	No confiable
Comienzo de la acción *	½ a 2 horas	15 a 30 min.	10 a 30 min	5 a 10 min.
Efecto máximo *	4 a 12 horas	1 a 5 horas	1 a 2 horas	½ a 2 horas
Concentración plasmática, ng/ml				
Terapéutica	14 - 26	0.8 - 1.6		
Tóxica	34	2.4		
Semivida plasmática *	5 - 7 días	36 horas	36 horas	21 horas
Vía de excreción	Hepática Renal	Renal	Renal	Renal
Dosis total de digitalización (adultos) †				
Bucal	1.2 - 1.6 mg ++	2-3 mg ‡		
Intravenosa	1.2 - 1.6 mg ++	0.75 - 1.5 mg §	1.2 - 1.6 mg #	0.25 - 0.5 mg **
Dosis diaria de mantenimiento	0.05-0.2 mg	0.25- 0.75 mg		

* Todos los valores cronológicos se fundan en la administración intravenosa de una sola digitalización.

** La Uabaina a menudo se emplea de preferencia a otros glucósidos para uso intravenoso en casos de urgencia.

† Los valores enunciados representan dosis promedio o límites para digitalización completa; las necesidades de pacientes individuales pueden apartarse mucho de estas cifras. Para la mayoría de los pacientes, sólo debe darse inicialmente una fracción de la dosis de digitalización, seguida de dosis fraccionadas ulteriores con intervalos adecuados, según esté indicado para cada fármaco.

++ La digitoxina puede administrarse como una sola dosis, pero suele darse en varias. Para digitalización rápida -- por vía bucal, cabe administrar inicialmente 0.6 mg, seguidos de 0.4 mg a las cuatro a seis horas hasta lograr digitalización completa.

‡ La dosis inicial corriente de digoxina es de 0.75 mg a 1.5 mg por vía bucal, seguida de 0.25 mg a 0.5 mg con intervalos de seis horas hasta lograr digitalización. La digitalización suele obtenerse en términos de una semana administrando 0.5 mg de digoxina al día, sin dosis inicial de cebamiento. (ver Mason, 1974)

§ Cuando es indispensable la digitalización rápida, la dosis intravenosa inicial de digoxina es de 0.5mg a 1 mg, seguida de 0.25 mg a 0.5 mg con un intervalo de seis horas hasta lograr digitalización. El glucósido también puede darse por vía intramuscular.

Para estados de urgencia que exigen digitalización rápida, el fármaco puede administrarse en dos dosis de 0.6 mg a 0.8 mg cada una, por vía intravenosa ó intramuscular.

TABLA 2. POTENCIA DE GLUCOSIDOS CARDIACOS

P O T E N C I A *

Digoxina 10

Lanatócido C 8.9

Digitoxina 5.1

* Determinada con respecto a digitoxigenina
en aurícula de pichón.

El abastecimiento de glucósidos cardíacos, proviene principalmente de las hojas de digitalis, a nivel mundial. Los intentos de síntesis no han podido competir económica -- mente, de aquí que la obtención a partir de fuentes natura -- les sea de suma importancia.

Existen pocos estudios sobre la digitalis que se encuentra en México; de aquí la importancia de tratar de im -- plementar campos experimentales para su cultivo y de esta manera contribuir con el Plan Nacional de Desarrollo, en el rubro de farmoquímicos, ya que dichas sustancias se impor -- tan en su totalidad (I.M.C.E.).

La importancia del presente trabajo consiste en e -- valuar el contenido de glucósidos cardíacos, extraídos de las hojas de D. purpurea, recolectada en México, estableci -- endo un método de extracción y purificación.

III. OBJETIVO E HIPOTESIS

1. OBJETIVO

Implementación de un método de extracción e identificación de carditónicos a partir de hojas de Digitalis purpurea, recolectadas en México.

2. Hipotesis

Con el método de extracción que se desarrolle se logrará el primer paso en el Desarrollo Tecnológico del proceso de obtención de digitoxina y digoxina.

IV. MATERIALES Y METODOS.

IV.1. Material

IV.1.1. Equipo

Balanza analítica marca BOSCH S 2000

Balanza granataria marca OHAUS

Refrigerador marca FRILATI Mod. RF 200

Rotavapor marca BUCHI 133833

Recirculador de agua

Bomba de vacío de aceite FE-1400

Parrilla con agitación SYBRON

Juego de filtros y lámpara UV/VIS WATO 78001

Estufa

Espectrofotómetro Perkin-Elmer

Molino Filtz Patrick-T 400 y T 316

Espectrofotómetro I.R. PYE-UNICAM. Mod. SP1050

IV.1.2. Material de vidrio y otros

Material de vidrio de laboratorio marca PYREX

Equipo de vidrio con boca esmerilada 24/40 CORNING

Cámaras de cromatografía

Columnas cromatográficas 30cm x 2.2cm, 30cm x 1.2cm

Cromatoplasmas de sílica gel₆₀ y GF₂₅₄

(20cm x 20cm x 0.2 cm) MERCK

Aspersor de vidrio, SIGMA CHEM

Desecador

Extractor Soxhlet marca PYREX

El material empleado para la realización de este trabajo, hojas de Digitalis purpurea, proviene de los contornos de la "Presa Necaxa", Puebla y de Tlepetlixpa, Edo. de México (obtenida de semillas de la Presa Necaxa).

IV.1.3 Reactivos

Digitoxina	Sigma
Digoxina	Sigma
Gitoxina	Sigma
Dicloroetano G.P.	Sigma
Sephadex LH-20	Sigma
Cloramina T	Sigma
Oxido de plomo R.A.	J.T. Baker
Fosfato monosódico	J.T. Baker
Acido pícrico	J.T. Baker
Hidróxido de sodio	J.T. Baker
Carbonato de sodio	J.T. Baker

n-propanol	J.T. Baker
Diclorometano	Sargent-Welch
Tierra de diatomáceas	Merck
Gel de sílice 60 para col.	Merck
Acido tricloroacético	Merck
Acido acético	Merck
Cloroformo	Merck
Benceno	Merck
Acetona	Merck
Tolueno	Merck
Bencina de petróleo	Merck
Dimetilformamida	Merck
Etanol	Merck
Formamida	Merck
Etilmetilcetona	Merck
Acetato de plomo, sintetizado en el Lab. 327	
Hidróxido de plomo, sintetizado en el Lab. 327	
Bicarbonato de sodio	T.Q.

IV.2. METODOS

IV.2.1. Preparacion del material foliar.

Los primeros ensayos se llevaron a cabo en lotes de hojas de D.purpurea, colectadas en los contornos de la "Presa Necaxa", Puebla. Este material fué secado en un cuarto de herbario a 40°C en un tiempo de 20 a 30 días. Posteriormente se usaron hojas de plantas de D.purpurea cultivadas en Tlepetlixpa, Edo. de México (obtenidas de semillas de la Presa Necaxa) y secadas como en el caso anterior.

Reducción de tamaño.

La hoja seca se sometió a una reducción de tamaño en un molino de cuchillas (Filtz Patrick T-400 y T-316), con el objeto de aumentar la superficie de contacto entre el material y el disolvente. Para realizar el análisis químico de la hoja, se efectuó una segunda molienda al material en un molino de martillo malla # 40.

IV.2.2. Análisis químico de la hoja en polvo.

Métodos recomendados por Association of Official Agrucultural Chemist. (3)

- Determinación de humedad
- Determinación de cenizas
- Determinación de extracto étereo
- Determinación de fibra cruda
- Determinación de nitrógeno proteico

IV.2.3. Procedimientos de extracción de glucósidos cardiacos.

Los diferentes métodos de extracción de cardiotónicos incluyen en su procedimiento la eliminación de lípidos y clorofilas, cuya presencia ocasiona problemas de manipulación y recuperación de los activos. Así mismo el tratamiento alcalino suave permite inhibir alguna acción enzimática remanente.

Debido a que estos tratamientos son iguales en todos los casos, estos se describen de manera separada pero comun para cada método.

a) Extracción con éter de petróleo

Lotes de 500 g de hoja seca y molida se colocan en frascos de boca ancha (4 l) con tapa; se adicionan 2 lts. de éter de petróleo por frasco, se cierran y dejan macerar a temperatura ambiente por 24 hrs.; al cabo de este tiempo se

drena todo el líquido. Se agrega nuevo éter de petróleo y se repite la operación el número de veces necesario, hasta que el líquido sea prácticamente incoloro. Terminada la extracción el éter se recupera de lípidos y clorofila por destilación; el material folial se ventila y seca.

b) Maceración con bicarbonato de sodio al 10%

Un lote de material desengrasado se coloca en un frasco de boca ancha con tapa, se agregan 500 ml de solución de bicarbonato de sodio al 10% y se deja macerar a temperatura ambiente durante 24 hrs.

Método de extracción I. (25)

Extracción con cloroformo

Terminada la maceración de la muestra con bicarbonato de sodio, adicionar 2 lts. de cloroformo (relación disolvente/hoja 4:1) y macerar a temperatura ambiente por 24 horas, al término de este tiempo se colecta 1 lt. de extracto, se repone este volumen con cloroformo, nuevamente se macera por 24 hrs., etc.; la operación se repite hasta recuperar 4 lts. de extracto, el cual se concentra por evaporación a presión reducida hasta sequedad.

Clarificación

El residuo se disuelve a reflujo con 30 ml de metanol y en caliente se agregan con agitación 20 ml de agua para proceder a la primera clarificación por adición con fuerte agitación de 10 g de pasta de hidróxido de plomo (recién preparada).

La solución se filtra con aplicación de vacío; el residuo se extrae 2 veces a reflujo con metanol, se filtra y los filtrados se juntan para proceder a la segunda clarificación por adición de 10 g de pasta de hidróxido de plomo.

La pasta de hidróxido de plomo se prepara con 10 g de acetato de plomo cristalizado, se disuelven en 10 ml de agua caliente y se precipita el hidróxido de plomo con un exceso ligero de una solución de sosa cáustica al 20%, se filtra y se lava con agua hasta reacción neutra del filtrado. La torta se suspende en suficiente metanol al 75% para obtener una pasta fluida.

Precipitación de digitoxina.

Después de separar los sólidos por filtración, la solución se neutraliza con fosfato monosódico, se concentra por evaporación (presión reducida) y el extracto se deja re-

posar toda la noche en refrigeración para obtener la primera digitoxina precipitada.

La fig. 8 presenta el diagrama del Método de extracción I.

Método de extracción IA (modificación a O.Kell)

Este método es prácticamente igual al anterior, excepto la adición de la pasta de hidróxido de plomo (agente clarificante) la cual se substituyo por 75 ml de acetato de plomo al 15%. El acetato de plomo se preparó con 50g de óxido de plomo los cuales se disuelven calentando en ácido acético al 30%, se filtra en caliente y se deja cristalizar en lugar frio. Se lava con la mínima cantidad de ácido acético diluido.

El uso de acetato de plomo fuén base a los resultados obtenidos por el método original. (Fig. 8)

Método de extracción II

(Derivado de Harry Rosen 1950)

El procedimiento citado por este autor no menciona los tratamientos de desengrase y maceración con bicarbonato de sodio, sin embargo en el presente trabajo se llevaron a

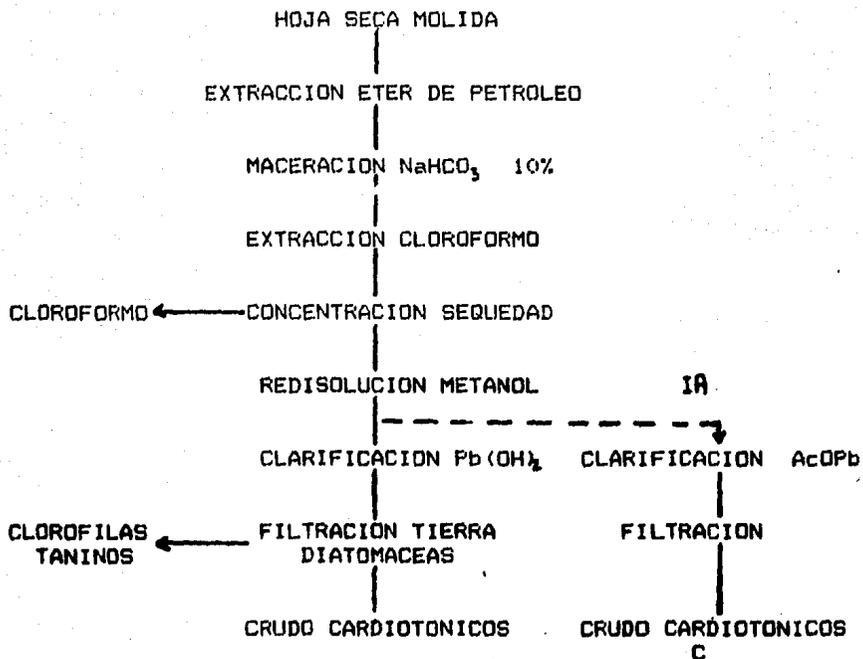


FIG. 8 METODOS DE EXTRACCION I Y IA CON CLOROFORMO.

cabo para todas las muestras.

Clarificación-Extracción

Terminada la maceración de la muestra con bicarbonato de sodio, se agregan 500 ml de acetato de plomo al 15%, homogenizar y dejar reposar 1 hr., Adicionar enseguida 500ml de etanol al 50%, al término de otra hora de reposo cubrir la muestra con suficiente etanol al 50% y macerar durante 24 horas.

El extracto de maceración se decanta; el residuo se lava con etanol al 50%, este licor se junta con el extracto; a continuación se elimina el etanol del extracto; la fase acuosa se extrae 3 veces con cloroformo.

Separación de Digitoxina

Los extractos clorofórmicos se concentran por evaporación a presión reducida hasta sequedad; el residuo se disuelve con una mezcla de metanol-agua (1:1), la solución se transfiere a un embudo de separación, se extrae 2 veces con mezcla de tolueno-hexano (1:1) y posteriormente se extrae 3 veces con dicloroetano (selectivo para digitoxina).

Los extractos de dicloroetano se juntan y evaporan a

sequedad (bajo presión reducida). Este residuo se disuelve con mezcla cloroformo-metanol (1:1) y se afora a 25 ml con la misma mezcla; a esta muestra se le denominó E.

La fase acuosa residual de la extracción con dicloroetano se extrae 3 veces con cloroformo el cual se recupera y evapora a sequedad como en el caso anterior. El residuo se disuelve en mezcla cloroformo-metanol (1:1) y se afora a 25 ml; esta muestra se denominó X.

Finalmente los lavados de Na_2CO_3 al 1% también se extraen con cloroformo y se prosigue como en las muestras E y X. Esta última se denominó muestra Y.

La figura 9, muestra el Método de extracción II.

IV.2.4. Purificación de extractos de glucósidos cardiacos.

Este procedimiento se efectuó sólo con las muestras de los experimentos del Método I.

...Al no observar precipitación de digitoxina en el extracto acuoso dejado en refrigeración (Mét I), se procede a extraer éste con cloroformo (2 a 3 veces). Los extractos clorofórmicos se juntan y evaporan hasta un volumen de 5 a 10 ml los cuales se adsorben en 5.5 g de tierra de diatomá -

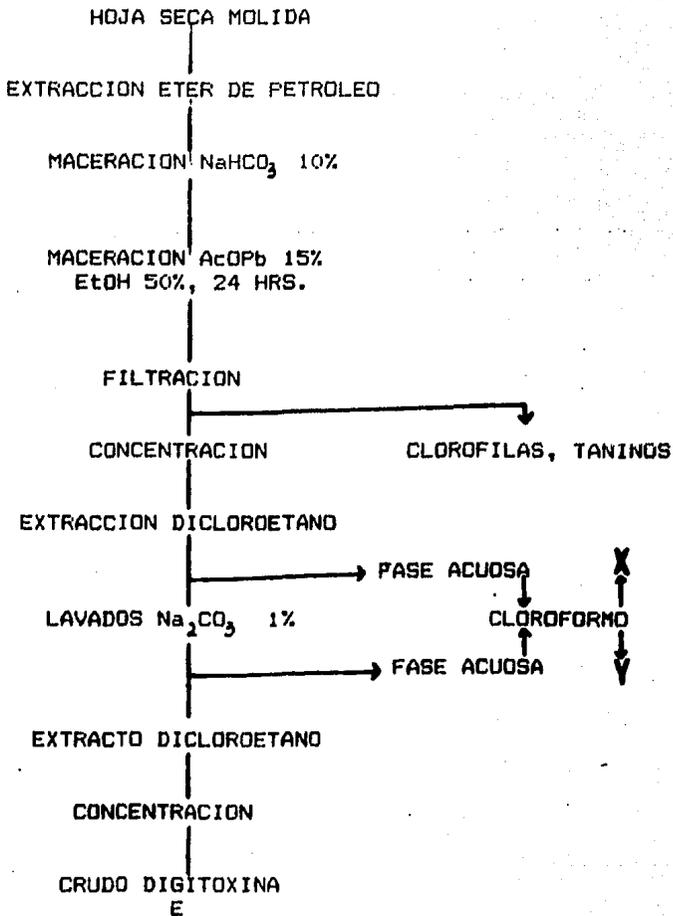


FIG. 9 METODO DE EXTRACCION II CON ETANOL

ceas y se deja secar toda la noche. La tierra con el extracto adsorbido se coloca en un cartucho para Soxhlet y se extrae con eter de petróleo durante 7 hrs., al cabo de las cuales se cambia el disolvente por nuevo y se continúa la extracción por 10 horas. Enseguida se elimina el eter de petróleo, se seca el cartucho con tierra-muestra para extraer en Soxhlet pero ahora con cloroformo-metanol (1:1) durante 30 horas.

IV.2.5. Separación cromatográfica de glucósidos cardiacos

a) Cromatografía en capa delgada.

Esta técnica es interesante en razón de la rapidez con la que se obtienen resultados.

Para la separación e identificación de cardenólidos se utilizan cromatofolios de sílica gel (20cm x 20cm x 0.2cm) como reactivo de detección una mezcla de 8 volúmenes de ácido tricloroacético al 25% en etanol con 2 volúmenes de cloramina-T al 1% en agua; calentamiento a 100 C por 10 minutos y observación en luz U.V..

TABLA 3 SISTEMAS DE DISOLVENTES ENSAYADOS

COMPONENTES	PROPORCION
1.- Tolueno-acetato de etilo-n,propanol	20:66:14
2.- Acetona-acetato de etilo	60:40
3.- Cloroformo-benceno	1:3
4.- Acetato de etilo-cloroformo	80:20
5.- Etilmetilcetona con 5.4% de agua	
6.- Benceno-acetato de etilo-metanol	2:7.5:0.5
7.- Benceno-acetato de etilo-metanol	60:40:7
8.- Cloroformo con 4% etanol	
9.- Cloroformo-etanol	98:2
10.- Benceno-acetato de etilo	40:60
11.- Cloroformo-etanol	9:1
12.- Cloroformo-metanol	9:1
13.- Diclorometano-metanol-formamida	90:9:1

b) Cromatografía en columna

En esta técnica la eficacia de la separación depende de factores como la naturaleza química de los componentes a separar, del disolvente, la geometría de la columna, la velocidad y el flujo de la disolución y del disolvente utilizado en el desarrollo del cromatograma. Las características de las columnas empleadas fueron las siguientes:

longitud = 30cm

diametro interno = 2.2cm

adsorbente = sílica gel o albúmina

velocidad de flujo = 1 ml/min

volumen de fracción = 20ml

La resolución de la separación por cromatografía en columna se siguió por cromatografía en capa delgada de cada una de las fracciones.

A continuación se indica el tratamiento de los adsorbentes:

Sílica gel (44), se mezclan 150g de sílica gel con 1 lt de HCl 3N, se lleva a ebullición por 10 min; una vez que se ha enfriado la mezcla, se filtra y lava con agua hasta pH neutro. Se seca a 105°C durante la noche, enseguida se calcina a 500°C por 2 horas.

La columna cromatográfica se empaqueta de la siguiente manera:

en un matraz de 100 ml se mezclan 2 g de adsorbente (tratado) con 1 ml de agua, cuando la mezcla es blanda y uniforme se vierte en el tubo de cromatografía. Simultáneamente se mezclan otros 6 g de sílica gel con 4 ml de dimetilformamida y suficiente agua para obtener una suspensión, la cual se vierte a la columna para terminar de empacarla. La muestra disuelta en 1 ml de cloroformo se deposita en la superficie de la columna y se procede a la elución con benceno-cloroformo (3:1).

Alúmina. Se activan 15 g de alúmina a 120°C durante 90 min enseguida esta alúmina se desactiva por suspensión en acetona por 30 min (26). La columna se empaqueta con 10 g de alúmina, se lava con 18 ml de mezcla cloroformo-ácido acético (19.5:0.5) drenando este disolvente; se procede a aplicar la muestra disuelta en 2 ml de mezcla cloroformo-ácido acético y se inicia la elución con el primer sistema 150 ml de cloroformo + 1% de etanol, segundo sistema 100 ml de cloroformo + 4% de etanol, tercer sistema 150 ml de cloroformo + 40% de etanol.

Alúmina. Sin tratamiento pero con los mismos sistemas de elución que el caso anterior.

Silica gel. Sin tratamiento, se suspende la sílica gel en hexano-acetato de etilo (1:1). El primer sistema de elución es hexano-acetato de etilo (1:1), segundo sistema metanol al 5% en acetato de etilo.

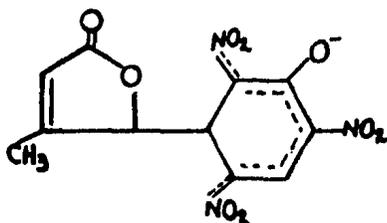
Sephadex LH-20. La ventaja de usar este adsorbente es poder conjugar su característica de tamiz molecular a la polaridad de los disolventes usados.

Una columna de vidrio de 30cm x 1.2cm, se empaqueta con 7.0 g de Sephadex previamente hinchado en el sistema de disolventes tolueno-ciclohexano-cloroformo-metanol (40:40:20:10). Se equilibra la columna durante 4 hrs. con un flujo de 25 ml/h, se aplica la muestra disuelta en 0.5 ml del sistema de elución, una vez adsorbida se inicia la elución con la mezcla de disolventes seleccionada.

IV.2.6. Determinación de glucósidos cardíacos con el Reactivo Alcalino de Picrato.

Esta técnica está basada en la reacción de la lactona alfa, beta insaturada del cardenólido con el compuesto nitroaromático en medio básico (31), formando un cromóforo anaranjado cuya intensidad es tomada como medida del contenido de cardenólidos a 495 nm.

Cromóforo resultante:



Procedimiento:

Solución A.- Acido pícrico al 0.6% en agua (P/V)

Solución B.- Hidróxido de sodio al 3% (P/V)

Reactivo Alcalino de Picrato.- En un matraz aforado de 100 ml depositar 20 ml de solución A y 10 ml de solución B, completar hasta el aforo con agua destilada; este reactivo se prepara antes de cada determinación. Las soluciones estándar y los extractos se preparan por disolución de las muestras respectivas en una mezcla cloroformo-etanol (1:1) de las cuales se toma 1 ml de alícuota, se evapora a sequedad (calentamiento suave) en un vaso deprecipitado de 50 ml.

Al residuo obtenido se adicionan 5 ml de etanol al 96%, mezclar perfectamente y agregar 5 ml de reactivo alcalino de picrato en un lugar protegido de la luz; dejar reposar durante 30 min y medir la absorbancia a 495 nm respecto a un blanco que contenga 5 ml de alcohol y 5 ml de reactivo tratado de manera semejante.

Para efectuar la cuantificación se establecen 3 cur-

vas tipo con soluciones estandar de digitoxina, digoxina y digitoxina-digoxina respectivamente a concentraciones de 0.004-0.036 mg/ml y 0.04-0.36 mg/ml. (Figs. 10 y 11)

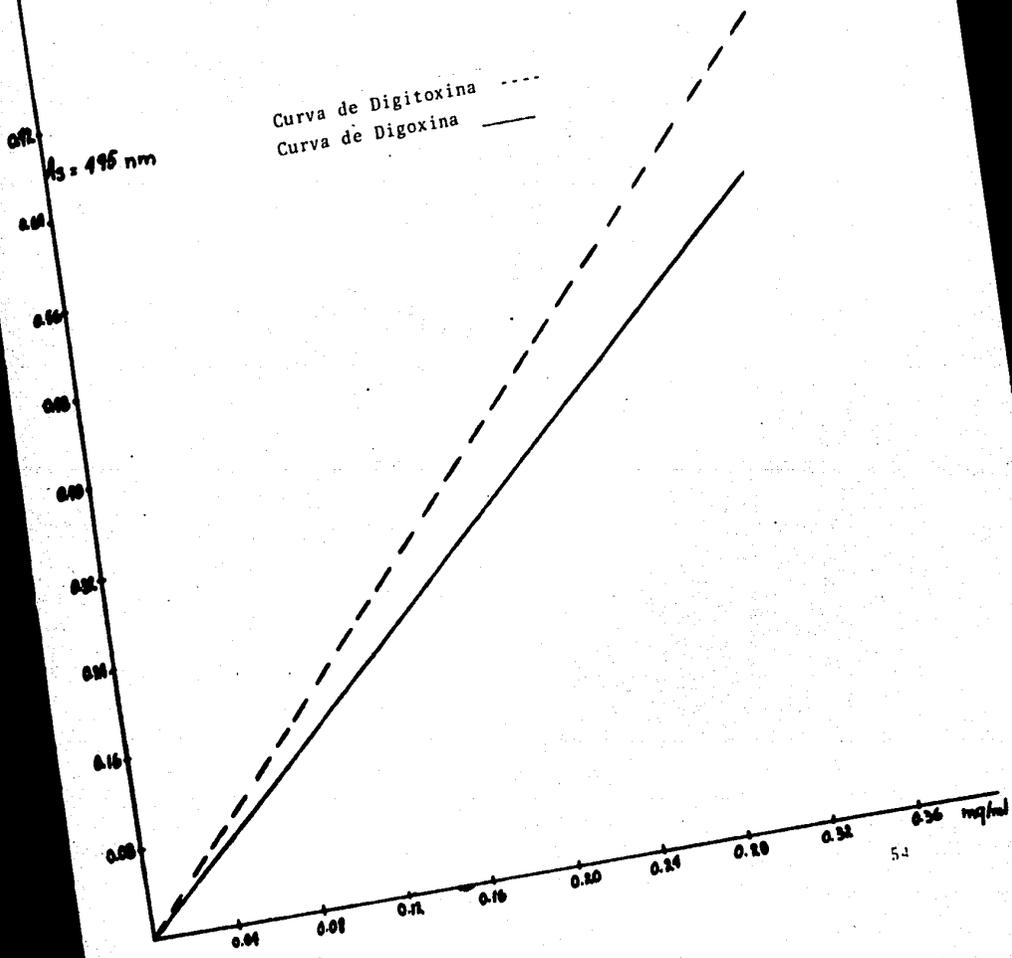
IV.2.7. Espectros en I.R. de digitoxina y digoxina

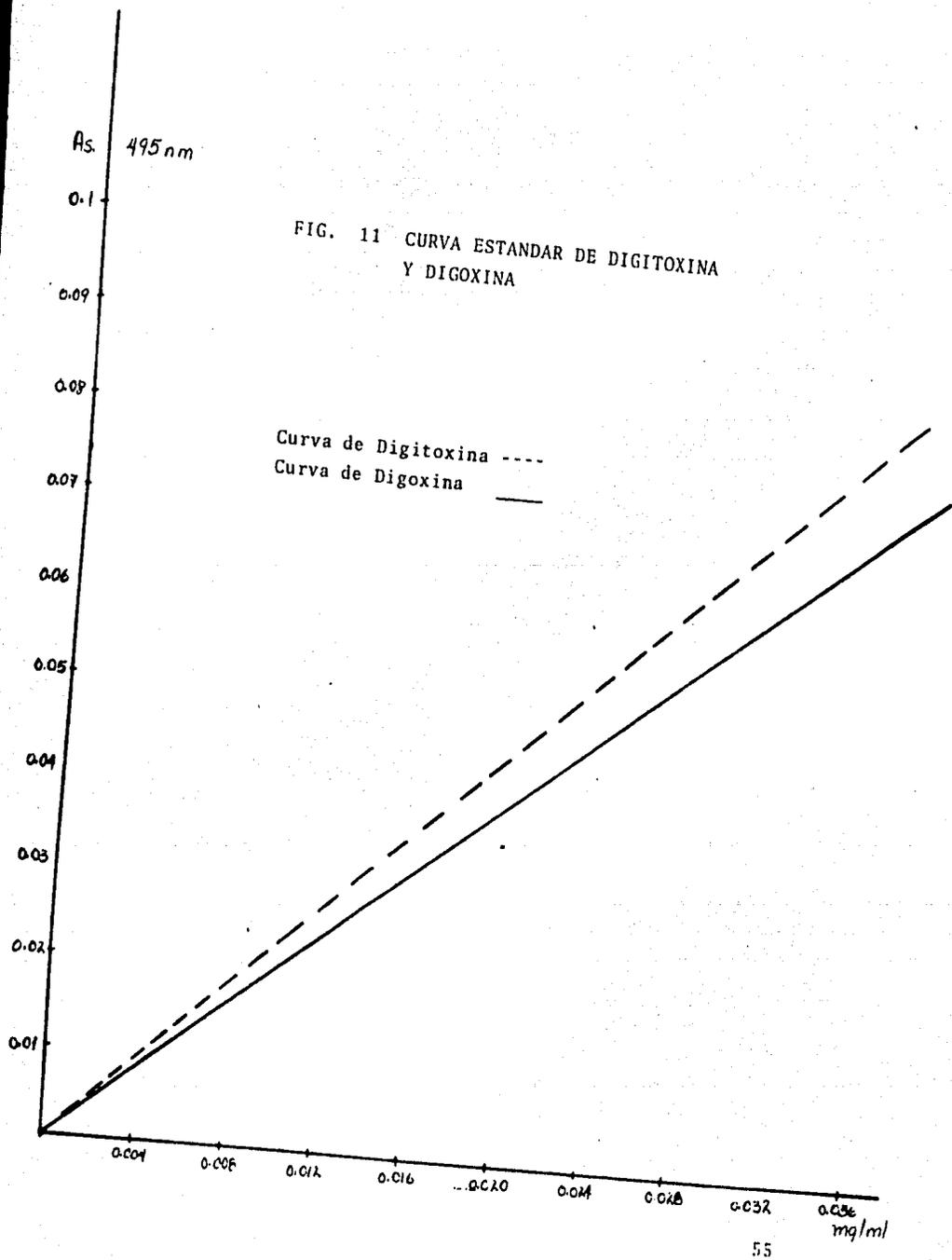
Los espectros de las muestras de digitoxina y digoxina se determinaron en un espectrofotometro de infrarojo (PYE-UNICAM.Mod. SP1050). En el caso de los estandares se prepara una pastilla a una presión de 10 Ton/cm que contiene:

1 mg de muestra y 200 mg de KBr, se mezclan en un agitador eléctrico.

La absorción de la muestra se registra desde 4000 - 600 cm^{-1} (2.5 - μ).

FIG. 10 CURVA ESTANDAR DE DIGITOXINA Y DIGOXINA.





V. RESULTADOS Y DISCUSION

V.1. Análisis químico de la hoja D. purpurea

En la tabla No. 4 se presentan los análisis efectuados a la hoja de Digitalis purpurea.

TABLA No. 4 ANALISIS DE LA HOJA
D. purpurea

Análisis	%
Humedad	83.00
Proteínas	27.30
Extracto etéreo	4.36
Fibra cruda	11.41
Extracto no nitrog.	48.52
Cenizas	8.41

El objetivo de este análisis fué principalmente el de conocer el contenido de lípidos en la hoja, usando para la extracción eter etílico de acuerdo al A.O.A.C. y comparar la eficiencia de eliminación de estos compuestos en el proceso de extracción para cardiotónicos con eter de petróleo. Como se observa en la tabla 4 el contenido total de lípidos fué de 4.36% y la cantidad de lípidos que se logró eliminar con éter de petróleo fué de 1.03%.

Por otra parte el contenido de cenizas concuerda con lo reportado en la literatura.

V.2. Método de extracción I

Los resultados obtenidos en los experimentos llevados a cabo con el método de extracción I fueron negativos, ya que el extracto contenía bastantes lípidos y clorofilas. Por esta razón los extractos se sometieron a un proceso de purificación (inciso 4) que fué la extracción con eter de petróleo en Soxhlet durante 17 hrs. para eliminar las sustancias antes mencionadas. El extracto obtenido en las primeras 7 hrs mostró un color verde intenso y la cromatografía en capa delgada no detectó presencia de activos. Al término de 10 hrs más de extracción con eter de petróleo renovado, el disolvente tenía un color amarillo verdoso y la cromato -

grafia de este extracto tampoco mostró presencia de activo. Terminada la eliminación de clorofilas y lípidos la muestra se extrajo durante 30 hrs; con cloroformo-metanol (1:1) con el fin de remover los activos adsorbidos en la tierra de diatomeas. La solución presento un color anaranjado la cual se analizó por C.C.D. haciéndose evidente la presencia de digitoxina y digoxina-gitoxina, sin embargo de acuerdo al cromatograma, se puede deducir que la pérdida de activos fué mayor.

Por otra parte los extractos obtenidos por el Método de extracción I y purificado por medio de precipitaciones sucesivas (cuatro) con hidróxido de plomo, mostraron una pérdida de activos todavía mayor que en el caso anterior; esto se comprobó por C.C.D.

V.3. Método de extracción IA

Este método es una variación del método I, debido a una simple sustitución de la pasta de hidróxido de plomo por acetato de plomo al 15% como agente defecante y la eliminación del filtro ayuda.

Con el hidróxido de plomo se tenía una precipitación incompleta de sustancias contaminantes, y cuando se procedía a purificar aumentando el número de precipitaciones se

perdían los activos. Por otra parte la preparación del hidróxido de plomo requiere el doble de plomo y el procedimiento es más largo.

El extracto obtenido de la precipitación con acetato de plomo mostró mayor contenido de glucósidos cardiacos, los cuales fueron detectados por cromatografía en capa delgada y cuantificados con el Reactivo Alcalino de Picrato después de ser fraccionados en una columna cromatográfica.

V.4. Método de extracción II

El método II que consistió en emplear etanol al 50% para la extracción de glucósidos cardiacos en presencia de acetato de plomo al 15% y posterior recuperación de estos compuestos con dicloroetano; resultó ser un método adecuado debido a que el contenido de clorofilas y lípidos se disminuyó, esto se debe a que estas sustancias son menos solubles en etanol que en cloroformo y la recuperación de glucósidos cardiacos después de eliminar el etanol es mejor. El uso de dicloroetano para extraer los glucósidos digitálicos permitió observar una selectividad parcial de este disolvente para la digitoxina tal como lo muestran los resultados por cromatografía en columna de Sephadex LH-20. (Tabla No. 3)

V.5. Separación de glucósidos por CCD de Kieselgel GF₅₄

La mejor resolución cromatográfica que tuvieron los testigos digitoxina, digoxina y gitoxina a una concentración de 0.5 mg/ml en los diferentes sistemas de elución se muestran en la Tabla No. 5. De acuerdo a la reproducibilidad de Rfs, el mejor sistema de separación fué con cloroformo-metanol (9:1). Cuando se usaron 2 sistemas de disolventes en nuestros problemas; 1. cloroformo-metanol (9:1) y 2. diclorometano-metanol-formamida (90:9:1) la separación fué mejor ya que se separan muchas impurezas.

Los cardiotónicos de extractos obtenidos por el Método de extracción I fueron separados por C.C.D. donde se detectó la presencia de digitoxina y digoxina-gitoxina. Debido a la pequeña cantidad de muestra no se procedió a la cuantificación de estos compuestos.

TABLA 5 SISTEMAS DE DISOLVENTES PARA
SEPARACION DE CARDIOTONICOS

Disolventes	Relacion	Rf Digitoxina	Rf Digoxina	Rf Gitoxina
AcOEt-CHCl ₃ -CH ₂ COOH	90:5:5	0.27	0.14	0.15
Tolueno-AcOEt- n,propanol	20:66:14	0.47	0.42	---
Cloroformo-metanol	90:1	0.52	0.38	---
Cloroformo-etanol	90:1	0.49	0.35	---

V.6. Cromatografía en columna

De los diferentes sistemas (adsorbente-eluyente) ensayados por cromatografía en columna, sólo el Sephadex LH-20 con eluyente tolueno-hexano-cloroformo-metanol (40:40:20:10) dió buenos resultados.

Los extractos obtenidos por el Método de extracción IA y II fueron separados en este tipo de columna. Del extracto clorofórmico IA se obtuvieron 100 fracciones, cuya composición en cuanto a cardiotónicos se analizó por C.C.D. que indicó la presencia de digitoxina en las fracciones nos. 8 a 40 denominadas CF-1 y digoxina-gitoxina en las fracciones nos. 41 a 100 asignadas como CF-2. No obstante de encontrarse una separación entre estos compuestos se observa la presencia de otras sustancias, por lo cual estas fracciones CF-1 y CF-2 fueron respectivamente separadas en placa preparativa con el objeto de aislar digitoxina y digoxina-gitoxina, estas muestras corresponden a las subfracciones CS₁ y CS₂ de acuerdo al diagrama de purificación en la Fig. 12

Del extracto etanólico II se obtuvieron las muestras E, X y Y. La muestra E corresponde al extracto de dicloroetano, el cual se dice selectivo para digitoxina. La muestra X se obtuvo de extraer con cloroformo la fase acuosa residual del dicloroetano con el objeto de verificar que car -

cuencia anterior.

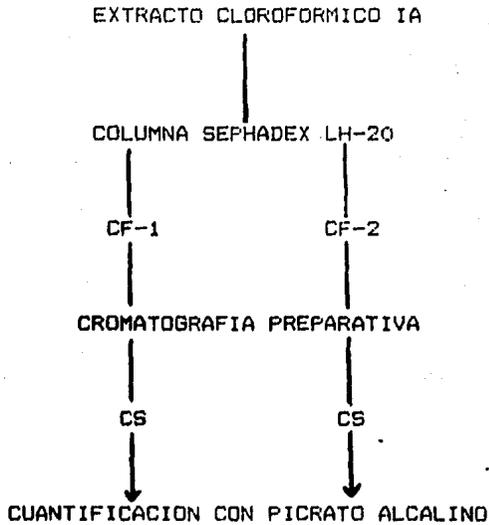


FIG. 12 PURIFICACION Y CUANTIFICACION DE GLUCOSIDOS CARDIACOS DEL EXTRACTO CLOROFORMICO.

diotónicos restaban en dicha fase. Finalmente la muestra y resultó de la extracción con cloroformo de la solución de carbonato de sodio al 1% usada para lavar la solución E de dicloroetano, en este caso la extracción también fué con el objeto de saber si se perdían principios activos.

La separación por cromatografía en columna de Sephadex LH-20 sólo se realizó con la muestra E de la cual se obtuvieron 90 fracciones que fueron analizadas por cromatografía en capa delgada indicando que de las fracciones número 11 a la 42 contenían digitoxina y de las fracciones 43 a la 90 contenían digoxina-gitoxina; estas fracciones se denominaron EF_1 y EF_2 respectivamente. (Fig. 13).

El análisis cromatográfico en capa delgada de las muestras X y Y mostró la presencia de digoxina-gitoxina.

En base a éstos resultados se procedió al aislamiento de estos compuestos por cromatografía en placa preparativa en las muestras EF_1 ; EF_2 ; X y Y, en los cuatro casos se recuperaron dos subfracciones que correspondían a digitoxina y digoxina-gitoxina de acuerdo a los testigos. Estas subfracciones se denominaron e_1 , e_2 en EF_1 ; e'_1 , e'_2 , en EF_2 ; x_1 , x_2 en X e y_1 , y_2 en Y.

En la figura 14 se presenta el diagrama de la se -

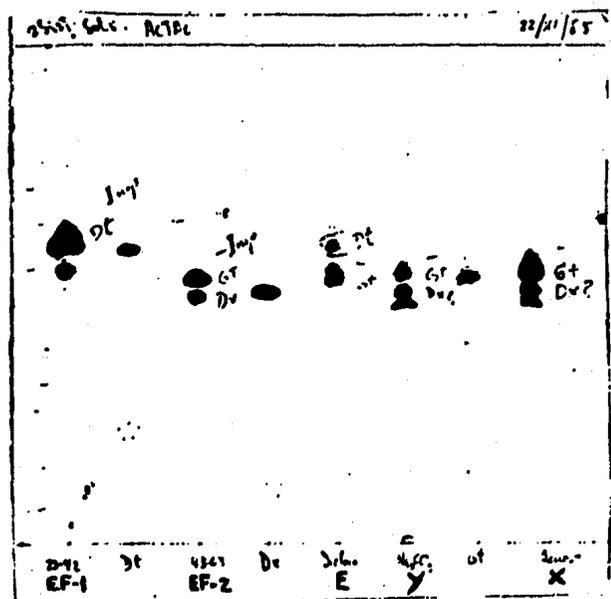


FIG. 13 Identificación cromatográfica de Digitoxina, Digoxina y Gitoxina en los extractos E, X, Y, y las fracciones EF-1, EF-2.

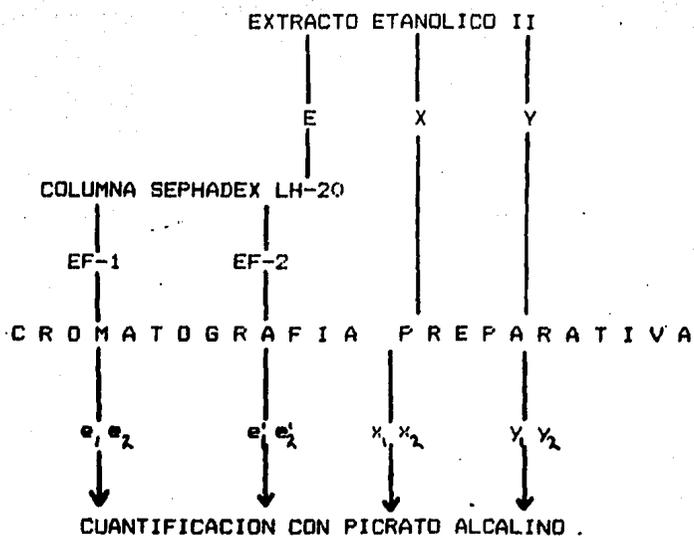


FIG. 14 PURIFICACION Y CUANTIFICACION DE GLUCOSIDOS CARDIACOS DEL EXTRACTO ETANOLICO

V.7. Cuantificación de glucósidos cardíacos

Con el fin de determinar que método de extracción de cardiotónicos era más adecuado, se procedió a cuantificar el contenido de digitoxina y digoxina-gitoxina en las diferentes muestras (tabla 6).

En el caso del extracto clorofórmico IA después de haber sido separado en columna se encontró un total de 0.039% donde CF-1 contenía 0.0185% de digitoxina y 0.0203% de mezcla digoxina-gitoxina. Estos resultados son buenos si se comparan con el rendimiento 0.04% reportado por O.Kell y si se considera que en este caso las muestras son más puras.

Los valores de cuantificación de digitoxina en CS_1 y digoxina-gitoxina en CS_2 fueron 0.003% y 0.0033%; estos datos y la observación de cromatogramas permiten señalar la presencia de otros compuestos difíciles de eliminar (tabla 7)

Respecto al extracto etanólico II, el contenido total de cardiotónicos fué de 0.0618% integrado por las fracciones EF-1 y EF-2 (obtenidas por separación en columna cromatográfica de E) con un valor de 0.0129% para digitoxina y 0.0134% de digoxina-gitoxina respectivamente. Las muestras X e Y contenían solamente digoxina-gitoxina en 0.020% y 0.0155% respectivamente. Los valores de digitoxina y digoxina-gitoxina determinados en las subfracciones e_1 e_2 ;

TABLA 6 GLUCOSIDOS CARDIACOS SEPARADOS EN SEPHADEX LH-20
 CUANTIFICADOS POR PICRATO ALCALINO

MUESTRA	%DIGITOXINA	%DIGOXINA-GITOXINA	% TOTAL
CF-1	0.0185		
CF-2		0.0203	
			0.0389
EF-1	0.0129		
EF-2		0.0134	
X		0.020	
Y		0.0155	
			0.0618

$e_1' e_2'$; $x_1 x_2$ e $y_1 y_2$ (tabla 7), muestran que $e_1 e_2$ solo contenían digitoxina, mientras que $e_1' e_2'$, $x_1 x_2$ e $y_1 y_2$ contenían digoxina-gitoxina; por lo tanto EF-1 contiene básicamente digitoxina , EF-2, X, Y digoxina-gitoxina.

Si comparamos los porcentajes de cardiotónicos obtenidos con el método de extracción IA y II, es evidente que la extracción de estos compuestos es mejor con el método de extracción II.

V.8 Espectros en I.R. de digitoxina y digoxina (Fig. 15)

La comparación del espectro en IR del estandar digitoxina con el estandar digoxina conduce a las siguientes observaciones :

Ambos espectros son prácticamente idénticos; presentan siete bandas características correspondientes a: O-H, C-H, y lactona α, β insaturada, C=C, C-O, alcoholes terciarios, deformación C-H.

Es evidente que la diferencia entre estos compuestos un hidroxilo en el C-12 para digoxina no es detectable por espectroscopía IR.

La comparación de los espectros de digoxina y digitoxina (aisladas en el laboratorio) con sus respectivos es-

TABLA 7 CLUCOSIDOS CARDIACOS SEPARADOS EN PLACA PREPARATIVA DE KIESELGEL GF₂₅₄, CUANTIFICADOS POR PICRATO ALCALINO.

MUESTRA	%DIGITOXINA	%DIGOXINA-GITOXINA	%TOTAL
CS ₁	0.003		
CS ₂		0.0033	
			0.0063
e ₁	0.0044		
e ₂		0.00046	
e ₁ '	0.00026		
e ₂ '		0.0018	
x ₁	0.00013		
x ₂		0.001	
y ₁	0.00013		
y ₂		0.0019	
			0.01

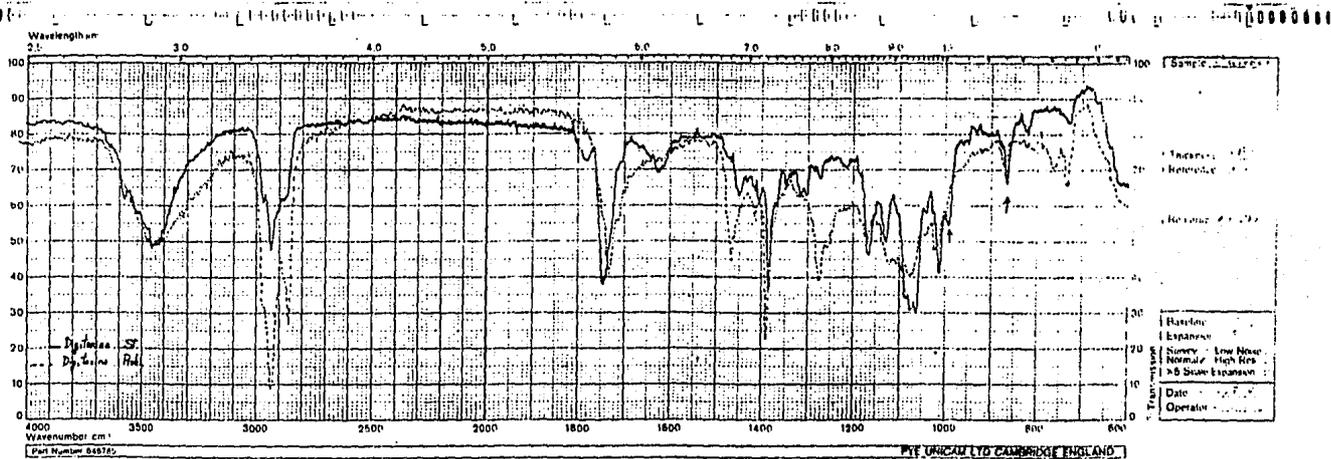


FIG. 15 Espectro Infrarrojo de Digitoxina

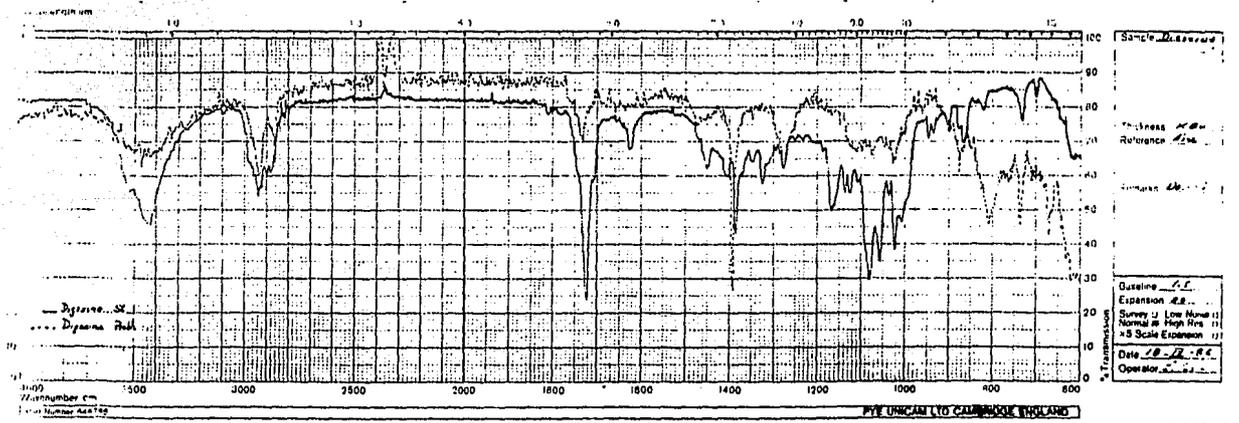


FIG. 16 Espectro infrarrojo de Digoxina

tándares muestran la presencia de las siete bandas características asignadas a estos compuestos.

Cabe señalar una diferencia en el espectro IR de la digoxina aislada respecto a su estándar; ésta es la banda a 1275 cm que puede ser debida a una impureza.

TABLA B ASIGNACION DE LAS SEÑALES EN LOS ESPECTROS
 EN I.R. DE LA DIGOXINA Y DIGITOXINA DE
Digitalis purpurea

FRECUENCIA cm ⁻¹	INTENSIDAD DE ABSORCION (BANDA)	ENLACES O GRUPOS
3680-3060 3450	f	Vibración longitudinal O-H hidrógeno unido intermo- lecularmente, asociación polimérica.
2962-2853 2940	f	Vibración longitudinal C-H, alcano, ν_{as} , ν_s .
1760-1740 1745	f	Vibraciones longitudinales de ésteres y lactona α, β insaturada.
1680-1620	m	Vibración longitudinal del enlace múltiple C=C, al- queno no conjugado.
1485-1445	m	Deformación C-H, ν_{as} , CH ₂ tijera, alcano -CH ₂ -
1410-1310	f	Vibraciones de deforma- ción O-H y estiramiento C-O alcoholes terciarios.
1150(1170)	f	"
1150(1130)	f	Vibración longitudinal C-O, alcoholes terciarios.

f=fuerte
 m=medeta

CONCLUSIONES.

De los diferentes procedimientos de extracción el método II basado en la disolución de cardiotónicos con etanol dió un rendimiento de 0.062%, superior al porcentaje obtenido con el método IA y al reportado por O.Kell de 0.04% con la característica adicional de tener un mayor grado de pureza.

Sin embargo, si se comparan estos resultados con los reportados en la literatura (Claus, P.E.), que son de 0.2 a 0.6%, los valores encontrados en este trabajo son muy bajos. La explicación a este respecto deriva esencialmente de las condiciones de secado a las que sometió la hoja (un mes a 40°C) es evidente que los cardiotónicos fueron degradados por las enzimas hidrolíticas presentes en el material. Desafortunadamente esto fue inevitable debido a:

- 1o. Porque la colecta de hojas sólo puede efectuarse una vez al año.
- 2o. Debido a la infraestructura con la que se contaba para el secado y,
- 3o. Porque había que esperar un año para coleccionar nuevo material y someterlo a las condiciones adecuadas de secado.

La extracción de lípidos con éter de petróleo representa sólo un 23% del total de estos compuestos, los cuales debido al uso de otros disolventes durante el proceso de extracción de cardiotónicos son arrastrados creando problemas para la purificación de activos. Por lo cual es necesario usar otro tipo de disolvente para la eliminación de lípidos, como serían heptano o hexano.

El uso de etanol al 50% como disolvente de cardiotónicos permite disminuir los costos de extracción respecto al empleo de cloroformo.

Los resultados de cuantificación de las diferentes muestras indican el efecto del dicloroetano para separar la digitoxina de otros cardiotónicos sólo es parcial, puesto que el carbonato de sodio extrae digoxina-gitoxina y todavía queda un remanente en la fase de dicloroetano; sin embargo el remanente quizá se pueda eliminar aumentando el número de extracciones con carbonato de sodio.

La cromatografía en columna de Sephadex LH-20 mostró ser un buen sistema de purificación de cardiotónicos.

La cuantificación de glucósidos cardíacos con el reactivo de picrato alcalino sólo es válida para muestras ya aisladas como digitoxina o digoxina.

Los espectros de IR realizados en las muestras de digoxina y digitoxina aisladas de los extractos obtenidos en el laboratorio, indican que efectivamente se trata de digoxina y digitoxina como se esperaba.

El presente trabajo se realizó a escala de laboratorio con lotes de 500 g de hojas, a este nivel se estudiaron algunos métodos de extracción de cardiotónicos que se permitieran aislar principalmente digitoxina; sin embargo es necesario llevar a cabo la optimización del proceso de extracción de estos compuestos en lotes más grandes (5 a 10 Kg) que permitan la recuperación de activos.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Aberhart, D.J., J.G. Loyd., and E. Caspi. 1973. Biosynthesis of cardenolides in *Digitalis lanata*. *Phytochemistry*. 12:1065-1071.
- 2.- Alcántara, P.A. 1982. Desarrollo de una técnica colorimétrica para la cuantificación de Tevetósidos cardiotónicos. Tesis para obtener el título de Q.F.B ENEP-Zaragoza, UNAM. México, D.F.
- 3.- Association of Official Agricultural Chemist. Official methods of analysis (10th. ed.) The Association: Whashington, D.C. (1965). Horowitz W. Ed. et al.
- 4.- Baljet, H. 1918. *Pharm Weekbl.* 55:457.
- 5.- Baumgarten, G., R. Reisbrodt. *Ger (East)*, 61845, 20 May 1968, *Appl.* 26 April 1967.
- 6.- Bay, G., and O. Gisvold. 1948. *Digitalis*, a preliminary investigation. *J. Amer. Pharm. Ass.* 37:314.
- 7.- Bhagiath, S., and R.P. Rastogi. 1970. Cardenolides-glycosides and genins. *Phytochemistry*. 9:315-331
- 8.- Bhat, B.K., and P.N. Pandita. *Digitalis*, a medicinal plant. Regional Research Laboratory (Branch) Srinagar, Jammu and Kashmir. 26-27.
- 9.- Bhatt, J.G., H. Brindle, and A.D. MacDonald. 1961. The chemical assay of *digitalis*. *J. Pharm. Pharmacol.* 13:283-289.
- 10.- Black, D.B., and E.G. Lovering. 1977. Estimation of the degree of crystallinity in digoxin by X-ray and infrared methods. *J. Pharm. Pharmac.* 29:684-687.
- 11.- Boletín Médico (IMSS), 1978. Marzo-Abril 20(2).

- 12.- Bowman, W.C., M.J. Rand. 1973. Textbook of pharmacology. Ed. Blackwell Scientific Publication.
- 13.- Burger's Medicinal Chemistry. 1980. Vol. III. Ed. Manfred E. Wolff.
- 14.- Capstack, E., D.J. Baisted., W.W. Newschwander., G. Blondin., N.L. Rosin., and W.R. Nes. 1962. The biosynthesis of squalene in germinations seeds of Pisum sativum. Biochemistry. 1(6):1178-1183.
- 15.- Carvalhas, M.L., and M.A. Figueira. 1965. Comparative study of thin-layer chromatographic techniques for separation of digoxin and their main metabolites. J.Chomatography. 86:254-260.
- 16.- Claus, E.P., E. Varro., and J.L. Tyler. 1967. Pharmacognosy. Ed. Les Febiger.
- 17.- Cuadro Básico de Medicamentos del Sector Público, México, 1985.
- 18.- Dyer, J.R. 1973. Aplicaciones de espectroscopia de absorción en compuestos orgánicos. Ed. Prentice Hall Internacional.
- 19.- Estadísticas del Instituto Mexicano de Comercio Exterior 1974-1983.
- 20.- Estadísticas del Instituto Nacional de Cardiología. 49:1-2. México, 1974.
- 21.- Frerejacque, M., and P. de Graeve. 1963. Ann. Pharm. Franc. 21(6)509.
- 22.- Fritsch, W., W. Haeede., and H. Roschig. 1974. Justus Liebigs. Ann. Chem. 621.
- 23.- FontQuer, P. 1980. Plantas Medicinales (el dioscoride renovado) Ed. Labor.
- 24.- Giral, F., and O.Kell. Recopilación de su trabajo cuando se establecieron campos de cultivo experimental en 1958. (Comunicación personal)

- 25.- Giral, F. 1979. Episodios ejemplares en la historia de la Farmacia XI. Un farmacéutico parisino, hijo de una yerbera: Nativelle y la digital. Rev. Mex. Ciencias Farm. 5:40-43.
- 26.- Hauser, W., T. Kartning, and G. Verdino. 1969. Sci. Pharm; 37:149.
- 27.- Kaiser, F., 1955. Chem. Ber. 88:556.
- 28.- Kaiser, F., 1966. Arch. Pharm. 299:263.
- 29.- Karel, M., 1972. Pharmaceutical Application of thin layer and paper chromatography. Printer Elsevier Publishing Co.
- 30.- King, E.R., and O. Gisvold. 1950. Some extraction studies on digitalis. J. Amer. Pharm. Ass. 39:109-112.
- 31.- Kovar, K., A. Francas, and G. Seidel. 1977. Arch. Pharm. 310(1):40.
- 32.- Kruger, G., et Al. 1974. Can. J. Chem. 52(24):4139-42.
- 33.- Martelli, R.P., and C. Tam. 1959. Helv. Chim. Acta. 47:711.
- 34.- Monojit, M.D., N.M. Khanna., and L-Dhar Moti. 1958. Indian. 62:497.
- 35.- Nover, L., G. Baumgarten, and M. Luckner. 1969. J. Chromatography. 302:321-326.
- 36.- Pérez, M.A., 1982. Síntesis de cardiotónicos modificados. Tesis para obtener el título de Q.F.B. ENEP-Zaragoza, UNAM. México, D.F.
- 37.- Reichstein, T., and E. Bon. 1964. Helv. Chim. Acta. 47:711.
- 38.- Rodríguez, R. 1982. Obtención de digitoxigenina a partir de semilla de Thevetia. Tesis para obtener el título de Q.F.B. ENEP-Zaragoza, UNAM. México, D.F.

- 39.- Rosen, Harry, et al USA pat. 255796. 19 June 1951,
Appl 31, July 1948.
- 40.- Sondheiner, O., and T. Reichstein. 1956.
Helv. Chim. Acta. 39:1876.
- 41.- Sondheiner, F., N. Danieli., and Y. Mazur. 1962.
J. Amer. Chem. Soc. 84:875-876.
- 42.- Stahl, E. 1965. Thin layer chromatography.
Academic Press.
- 43.- Tam, C., and G. Chem. 1955.
Helv. Chim. Acta. 38:147.
- 44.- The United States Pharmacopeia. XX
- 45.- The National Formulary XV.
- 46.- Tserche, R., and G. Grimmer. 1960.
Chem. Ber. 93:1477.
- 47.- Wolf, Emil., et al. USA pat. 2224804,
10 Decem, 1940, Appl. 7 Feb. 1938.
- 48.- Zulich, G., K.H. Damm, and B.P. Lisboa. 1975.
Behaviour of cardiac glycosides and cardenolides
related to digitoxigenin on Sephadex LH-20.
J. Chromatography. 115:117-121.