

RAUWOLFIA CANESCENS VAR. GLABRA.

Investigación del alcaloide Reserpina en su raíz.

Tesis de grado, presentada ante la Facultad de Farmacia de la
Universidad Nacional de Costa Rica, 1958.

Dora Sancho Bolaños.

S U M A R I O

	Página
Introducción	3
Generalidades sobre la Rauwolfia serpentina	4
Parte botánica	11
a). Clasificación	11
b). Otras especies existentes en nuestro territorio	13
Alcaloides	14
a). Estado natural	15
b). Propiedades	16
c). Identificación	17
d). Métodos de obtención	18
Parte experimental	21
a). Investigación del alcaloide Reserpina en la raíz	21
b). Ensayo de su actividad fisiológica en el conejo	37
Resumen y conclusiones	39
Bibliografía	41

INTRODUCCION

Considerando la gran importancia que ha llegado a adquirir la Rauwolfia serpentina y su principal alcaloide la Reserpina, y sus utilísimos usos en medicina, es que se pensó en llevar a cabo este trabajo sobre una de las especies de Rauwolfia existentes en nuestro país, la Rauwolfia canescens var. glabra.

Mi más sincero agradecimiento para todas aquellas personas que me brindaron su valiosa ayuda en la realización del mismo, en especial al Dr. Rafael L. Rodríguez C., Lic. Ennio Rodríguez Z., Lic. Jesús M. Jiménez, Lic. Reinaldo Monge; al Dr. Ettore de Girolami y Lic. Pedro Morera de la Sección de Histología de la Universidad Nacional, quienes tomaron las fotografías a color, de las reacciones de precipitación y las microfotografías que aparecen en esta tesis; al Lic. Pedro Vieta de la Facultad de Microbiología, pues fué en ella y con su valiosísima ayuda, que se llevó a efecto el ensayo en conejos y la toma de las fotografías correspondientes.

GENERALIDADES SOBRE LA RAUWOLFIA SERPENTINA

Cuando el gran médico y botánico alemán Leonardo Rauwolf publicó su famosa monografía sobre las plantas medicinales de Asia y Africa en 1582, se hallaba lejos de suponer que años después, un género de plantas de la familia de las Apocináceas, fuese llamado "Rauwolfia" en su honor, y que una milagrosa droga, que por sus cualidades terapéuticas ayuda a mitigar los síntomas de dos enfermedades graves, fuese extraída de esta planta que crece espontáneamente en la India, en Ceilán, en Rumanía y en la Malasia, desde tiempos remotos.

Se trata de un arbusto que se desarrolla en las regiones tropicales y semi-tropicales nombrado Rauwolfia serpentina. La ciencia médica moderna tiene una deuda de gratitud con las generaciones de hindúes y malayos que practicaron la medicina indígena y que durante siglos recetaron raíz de Rauwolfia a sus pacientes. Estos precursores de la terapia con la raíz de Rauwolfia realizaron para la medicina moderna, quizás sin saberlo, un ensayo clínico de proporciones y duración sorprendentes.

La Rauwolfia ha sido empleada aproximadamente durante 29 siglos. Desde estos tiempos antiguos ha sido usada indistintamente como un antídoto contra las picaduras y mordeduras de insectos y reptiles venenosos, como un estimulante de las contracciones uterinas, como febrífugo y para combatir el insomnio. En los casos de locura se la empleó más extensamente. El gran líder re-

ligioso Mahatma Gandhi, según se ha informado, tomaba ocasionalmente un té preparado con las raíces de este arbusto, para combatir el insomnio. Los éxitos que se decía haber obtenido con la raíz de Rauwolfia, atrajeron finalmente la atención de los escritores de Materia Médica en la India. En 1885 apareció, en la segunda edición del libro de Dymock "Materia Médica de la India Occidental", una descripción de la raíz de Rauwolfia y algunas anotaciones breves sobre su estructura microscópica. Desde entonces, otros escritores comenzaron a incluir la Rauwolfia en sus trabajos sobre Materia Médica. La raíz de Rauwolfia se convirtió en la India en una forma generalmente aceptada de terapia para los casos mentales. Luego, más o menos desde mediados de 1930, la acción hipotensora de la raíz de Rauwolfia llamó la atención de los médicos hindúes. Obtuvieron una cantidad de la preparación de raíz cruda y la administraron a sujetos hipertensos, observando que la droga producía una reducción de la presión arterial, tanto de la sistólica como de la diastólica, en muchos de ellos. Durante los 10 años subsiguientes, la Rauwolfia se empleó tan extensamente para el tratamiento de la hipertensión, que de acuerdo con el Dr. R. J. Vakil, casi no había un hipertenso en la India, que no hubiera sido tratado con alguna forma de Rauwolfia.

A pesar de la amplia aceptación de la Rauwolfia en la India, la droga era desconocida para la ciencia médica del mundo occidental, hasta que el Dr. R. J. Vakil publicó en el British Heart Journal, en 1949, un informe sobre su experiencia clínica con la raíz cruda de Rauwolfia. El Dr. H. W. Wilkins leyó este informe y se interesó en la Rauwolfia como medicamento para la hiperten-

sión. En 1952 presentó un informe preliminar ante la New England Cardiovascular Society, acerca de los resultados obtenidos.

Otros investigadores realizaron después ensayos clínicos, y pronto el empleo de la Rauwolfia se había extendido a todo el mundo occidental. Fue entonces cuando los neurólogos comenzaron a interesarse en la acción ataráxica o tranquilizante de la Rauwolfia como coadyuvante en el tratamiento de las psiconeurosis y de los trastornos psíquicos.

De esta planta, los científicos modernos han preparado un medicamento que consiste en la raíz íntegra de Rauwolfia, fármaco que prescriben los médicos para la presión arterial alta y en ciertos casos de enfermedades mentales. Esta acción hipotensora no se produce en los sujetos normotensos, pero éstos experimentan también el efecto tranquilizante. Afortunadamente, es eficaz para combatir la presión arterial alta de origen desconocido. Un diez por ciento de las personas que sufren de hipertensión pueden curarse porque hoy día se conoce la causa del mal. Sin embargo, en más del noventa por ciento de los casos, la razón por qué se eleva la presión arterial y permanece alta, aún sigue en misterio. Por suerte para los pacientes, las drogas derivadas de la Rauwolfia son más efectivas en las personas cuya presión arterial alta es de causas desconocidas; el paciente se siente más calmado, comienza a dormir mejor por las noches y encuentra su mente despejada. Los médicos observan una reducción gradual, hacia un nivel normal en la presión sanguínea y una disminución en la frecuencia del pulso. Estos efectos sedativos facilitan la labor del cora-

zón. Los estados de intranquilidad, nerviosismo, ansiedad y otros síntomas similares, comienzan a desaparecer. El efecto favorable que ejercen las drogas obtenidas de la Rauwolfia, en la mayoría de los casos de trastornos mentales, ha abierto un nuevo camino lleno de esperanzas en el campo de la neuro-psiquiatría. Se ha comprobado que dicho fármaco no produce reacciones peligrosas, ni otras que pudieran considerarse molestas o desagradables. Se le puede administrar con confianza a los pacientes que padecen de una hipertensión benigna e inconstante, enfermos cuyos males no justifican el riesgo, los efectos secundarios y los inconvenientes de otros agentes terapéuticos.

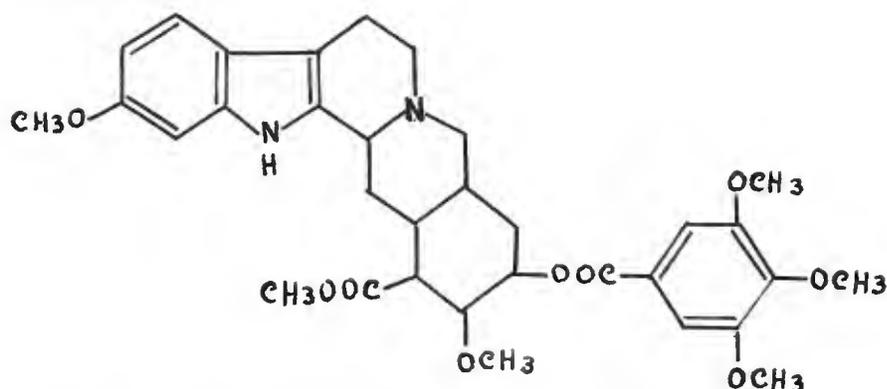
De la Rauwolfia serpentina han sido identificados los siguientes alcaloides:

- Ajmalina
- Ajmalicina
- Ajmalinina
- Isoajmalina
- Isorauhimbina
- Neoajmalina
- Rauhimbina
- Raupina
- Rauwolfina
- Rescinamina
- Reserpina
- Reserpinina
- Sarpagina
- Serpentina
- Serpentinina

Yohimbina

delta-Yohimbina

La RESERPINA es el principal alcaloide de la Rauwolfia, y hasta la fecha parece ser el único que aislado de la droga cruda, reproduce en todos sus aspectos la acción que tiene la raíz completa.

Fórmula estructural:

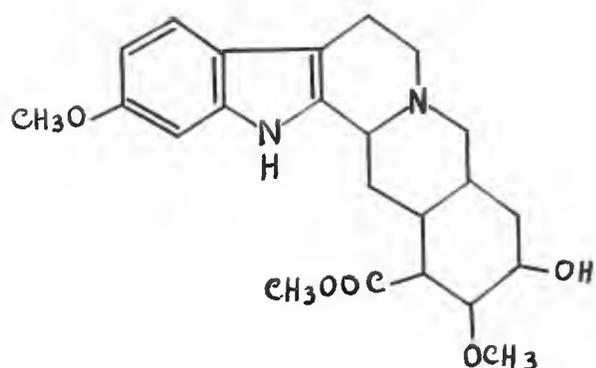
Fórmula bruta: $C_{33} H_{40} O_9 N_2$

Aspecto: Cristales cuyo color varía del blanco al café claro.

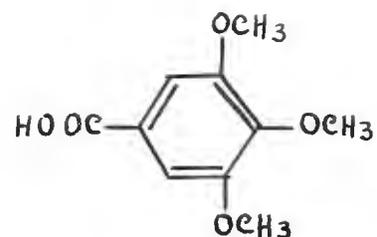
Punto de fusión: Los puntos de fusión de la Reserpina encontrados por diferentes autores, varían entre límites muy amplios:

Mueller y Col. encontraron 262-263°C; Neuss y Col. dan como punto de fusión de la Reserpina 264-265°C; mientras que Dorfman encontró 277-277,5°C.

El punto de fusión de la Reserpina sufre una depresión muy marcada cuando se mezcla con Acido Resérpico (alrededor de 20°C), o Acido Trimetoxibenzoico (aproximadamente 80°C), lo que demuestra que el punto de fusión es un índice muy útil para conocer la existencia o ausencia de productos de descomposición de la Reserpina y otros alcaloides.



Acido Resérpico (aminoácido).



Acido Trimetoxibenzoico.

Farmacología: Los efectos farmacológicos se relacionan con el Sistema Nervioso Central y el Sistema Cardio Vascular. De todos los alcaloides aislados de la Rauwolfia, la Reserpina es la que produce casi todo el efecto hipotensor y calmante del Sistema Nervioso Central, que tienen los preparados de la raíz completa.

El Dr. Geoffrey W. Rake, ha descubierto que la droga elaborada con la Rauwolfia serpentina actúa directamente sobre el cerebro, amortiguando las sensaciones de ansiedad, y tranquilizando los centros emotivos del cerebro.

Síntesis de la Reserpina: La ciencia norteamericana ha dado un gran paso en el terreno de la química; este paso, como lo revela la revista de la Sociedad de Química de Estados Unidos, es la síntesis de la Reserpina, lograda por el profesor de la Universidad de Harvard, Robert B. Woodward, en colaboración con los químicos suizos doctores F. E. Bader, H. Bickel y A. F. Frey, y el canadiense R. W. Kiestead.

Esta síntesis tiene enorme valor práctico, al independizar al país de las fuentes extranjeras de Reserpina, y es extraordinaria

pues se logró cuando sólo había transcurrido un año después del descubrimiento de la estructura de la Reserpina. Estas síntesis tardan con mucha frecuencia años en ser logradas, como sucedió por ejemplo con el colesterol, cuya estructura fué identificada en 1932 y su síntesis hecha en 1951.

PARTE BOTANICA

a). Clasificación.

Pertenece a la familia Apocináceas (6), rica ésta, en especies que contienen alcaloides y glicósidos generalmente venenosos que actúan sobre el corazón.

Rauwolfia canescens var. glabra. Muell. Arg. Cohataco, Guataco,
R. hirsuta Jacq. R. heterophylla R. & S.

Frecuente en los matorrales o lugares incultos en tierra caliente del Pacífico; en Guanacaste. Se le encuentra de México a las Antillas, y al norte de Sur América. Es un arbusto ramificado, por lo general de un metro de alto o menos; las hojas son verticiladas, desiguales, de peciolo muy cortos; membranosas, oblongo-ovadas o anchamente obovadas, la mayor parte de 5 - 12 cm. de largo, redondeadas, agudas o cortamente acuminadas en la punta, agudas u obtusas en la base, glabras o algunas veces con vellos esparcidos por debajo; flores blanco verdosas, en corimbos muy pequeños, densos, más o menos vellosos; cáliz de lóbulos redondos, ciliados, de más o menos 1,5 cm. de largo; corola blanco verdosa, en capullo es redondeada en la punta, no alargada; los pétalos definitivamente más cortos que el tubo; fruto de 5 - 7 mm. de diámetro, al principio de un rojo brillante, finalmente negros. El arbusto es común en muchas partes de Centro América. El fruto tiene reputación de ser venenoso, lo cual puede ser exacto, pues muchas plantas de la familia son conocidas por poseer propiedades venenosas. El jugo del fruto es algunas veces empleado como sustituto de la tinta.



Figura N^o1. Rama de *Rauwolfia canescens* var. *glabra*, con frutos.



Figura N^o2. Base del tallo y parte de la raíz, de la *Rauwolfia canescens* var. *glabra*.

b). Otras especies existentes en nuestro territorio. (6)

Rauwolfia indecora. Woodson, Ann. Mo. Bot. Gard. 24:12. 1937.
Catalina, Guanacaste, 600 metros. Colectada en la misma región
también por Brenes; endémica.

Rauwolfia mollissima. Markgraf, Repert. Sp. Nov. 20:19. 1924.
Forests of Ticoya, Tonduz 13940. En los materiales de tierra
caliente del Pacífico. En Colombia.

Rauwolfia sarapiquenses. Woodson, Skutch 3556. Vara Blanca.

Rauwolfia Woodsoniana. Standl., sp. nov.

La Calera de San Ramón, Abril, 1929, Brenes 6801 (type in Herb.
Field Mus.).

ALCALOIDES (9)

Los alcaloides constituyeron al principio, una familia natural de sustancias orgánicas nitrogenadas, de origen vegetal, cuyos miembros se caracterizaban por su parecido con los álcalis o bases minerales, y por sus enérgicas propiedades tóxicas o medicamentosas.

En un momento dado se creyó que los alcaloides se caracterizaban por contener en su molécula, un núcleo heterocíclico, como pirídico, pirrólico, quinolínic, etc., pero luego se descubrieron alcaloides desprovistos de aquellas estructuras y que en cambio derivaban de núcleos aromáticos, bencénicos o fenantrénicos, y hasta más simplemente aún, de los compuestos alifáticos de cadena abierta.

Actualmente es imposible dar una definición suficientemente amplia y capaz de abarcar a todos los cuerpos que se designan como alcaloides, porque en primer lugar, dicho término no es distintivo de ninguna función química, ni de ninguna serie funcionalmente definida de sustancias orgánicas, y en segundo, porque se ha dado en llamar alcaloides a las más diversas sustancias poseedoras de propiedades químicas, venenosas o curativas, que recuerden o imitan las de los primitivos alcaloides naturales.

a). Estado natural. (9)

La mayoría de los alcaloides vegetales se encuentran en las Dicotiledóneas, siendo raros en las Gimnospermas y Criptógamas. Por otra parte, los alcaloides parecen hallarse sólo en un pequeño número de familias botánicas, y principalmente en las: Papaveráceas (alcaloides del opio).

Rubiáceas (alcaloides de las quinas y de la ipecacuana).

Solanáceas (alcaloides de la belladona, estramonio, tabaco, patatas).

Ranunculáceas (alcaloides de los acónitos y del Hydrastis canadensis).

Apocináceas (alcaloides del quebracho, del pao-perreiro).

Eritroxiláceas (alcaloides de las cocas).

Estrícneas (alcaloides de la nuez vómica, del haba de San Ignacio, del curare).

El número de alcaloides vegetales es grande : más de 500 han sido descritos con seguridad y esa cifra va creciendo continuamente a medida que progresen las técnicas de extracción y de análisis.

La mayoría de los alcaloides no se encuentran al estado libre, sino que están salificados con ácidos orgánicos, del tipo del cítrico, málico, tartárico, oxálico, etc. Algunos alcaloides se hallan salificados con ácidos característicos: fumárico, verátrico, mecónico, quínico, aconítico, etc. No siempre es posible establecer cuál es el ácido que en la planta salifica a un alcaloide determinado.

Algunos raros alcaloides se hallan combinados con restos azucarados, constituyendo verdaderos glicósido-alcaloides, como por ej. : la solanina.

Los alcaloides se encuentran principalmente en las cortezas, hojas, raíces y frutos de las plantas y su contenido en alcaloides puede variar dentro de grandes límites según la estación del año, la edad del vegetal, el cultivo racional, etc.

b). Propiedades. (8)

La mayor parte de alcaloides son compuestos sólidos y cristalizados; algunos son amorfos y no susceptibles de cristalización. En menor número son líquidos a la temperatura ordinaria (nicotina, conina, esparteína, higrina).

Los alcaloides sólidos presentan generalmente un determinado punto de fusión, pero se descomponen por prolongado calentamiento y no son destilables. Algunos pueden sublimar a la presión atmosférica, o mejor en el vacío, sin descomposición (morfina, estriocnina). Todos son inodoros en frío. En cambio, los alcaloides líquidos destilan sin descomponerse.

Las soluciones de todos los alcaloides, así como las de sus sales, se distinguen por su fuerte sabor: en general los alcaloides sólidos son de sabor amargo; los líquidos de sabor picante y ardiente.

Un número reducido de alcaloides presenta en estado libre, o en forma de sal, un color notable (amarillo o rojo: berberina, sanguinarina, sinapina). Gran número de ellos presenta característicos espectros de absorción, o fenómenos de fluorescencia (quinina, cocaína, sanguinarina).

En cuanto a sus solubilidades, los alcaloides presentan las mayores discrepancias. En general son solubles en alcohol, algo menos en éter, cloroformo, tetracloruro de carbono, alcohol amílico, benzol, y aún menos en éter de petróleo. Solubles en agua sólo lo son las bases más sencillas, y especialmente las de constitución análoga a la betaina.

La mayor parte de alcaloides posee actividad óptica, siendo casi todos levógiros. Entre los que carecen de acción sobre la luz polarizada están: cafeína, papaverina, betaina, cuyas moléculas no contienen átomos de carbono asimétrico; atropina, laudanina, que forman compuestos racémicos.

Con tornasol y otros indicadores, los alcaloides se manifiestan alcalinos. Algunos (cafeína, betaina, colchicina, tienen reacción neutra. Otros (cocaína, morfina, cafeína, pilocarpina, poseen al mismo tiempo débiles propiedades ácidas y se disuelven en los álcalis cáusticos.

c). Identificación. (8)

La identificación de los distintos alcaloides se lleva a cabo por:

Su análisis elemental y la determinación de sus constantes físicas, si la cantidad de que se dispone lo permite.

La investigación microscópica de sus cristales.

El comportamiento espectroscópico de sus soluciones.

La observación de la acción fisiológica.

El empleo de reactivos de coloración especiales: la mayoría de los alcaloides, en contacto con ciertos reactivos, da origen a coloraciones, cuya causa química todavía se desconoce, pero que

son características para la correspondiente base, y sirven como reacciones de identidad.

d). Métodos de obtención. (8)

Los métodos para aislar los alcaloides de las correspondientes plantas u órganos vegetales, varían según las propiedades del alcaloide que se va a obtener, y con la forma en que se halla contenido en la planta. Que el material vegetal, antes de pasar a la separación del alcaloide, debe ser convenientemente desmenuzado, no es preciso decirlo. Como en general los alcaloides presentan propiedades básicas, sólo excepcionalmente se encuentran libres en las plantas; casi siempre están combinados con distintas sustancias ácidas.

1ª. De estas combinaciones salinas pueden ser puestos en libertad mediante sustancias más fuertemente básicas, como lejías alcalinas, lechada de cal, amoníaco, magnesia calcinada, etc., para ser luego extraídos mediante disolventes adecuados. Si son volátiles con vapor de agua, pueden también obtenerse por destilación.

2ª. Por otro método, se procede a la obtención de los alcaloides, extrayendo con agua u otros disolventes sus compuestos salinos tal como están contenidos en las plantas, y tratando luego del modo descrito las soluciones obtenidas.

3ª. Un tercer método de aislamiento consiste en agitar las partes vegetales con agua o alcohol diluido, acidificado por adición de un ácido mineral fuerte (ácido sulfúrico, ácido clorhídrico). Los alcaloides son separados por estos ácidos fuertes de los ácidos orgánicos, relativamente débiles, con que se ha-

llan unidos en las plantas, y convertidos en sulfatos o clorhidratos solubles, entran en disolución acuosa o hidroalcohólica, de la cual se pueden luego volver a separar mediante bases energicas. Si para la extracción se ha empleado una solución alcohólica diluida, hay que expulsar previamente por destilación el alcohol. Si, como casi siempre ocurre, los alcaloides libres son también notablemente solubles en agua (y no volátiles con vapor de agua), se separan convirtiéndolos en sales o sales dobles poco solubles. Como precipitantes entran en consideración, p. ej.: tanino, yoduro mercurico-potásico, etc.

Para la obtención de otros alcaloides se exprimen las partes vegetales, y del zumo exprimido se separan las bases del modo expuesto.

En la obtención de los alcaloides presenta grandes dificultades separar de las bases vegetales, grasas, resinas, albúmina, etc., que durante la extracción entran parcialmente en disolución. También es difícil la separación de los alcaloides entre sí (de las plantas se extraen casi siempre mezclas de alcaloides) y exige la máxima atención, así como experiencia y pericia especiales.

La F.B.U. Ed. XIII (2) emplea el primer método mencionado, para la extracción y valoración de alcaloides.

En el Chemist's Year Book (1) se encuentra un método semejante al tercero anteriormente anotado: la materia a examinar se extrae con una solución alcohólica de ácido tartárico. Se elimi-

na el alcohol por evaporación y se disuelve la sal alcaloidal en agua. Esta solución acuosa se alcaliniza con solución de soda cáustica para liberar los alcaloides, que luego se extraen con éter sulfúrico.

PARTE EXPERIMENTAL

a). Investigación del alcaloide Reserpina en la raíz de la Rauwolfia canescens var. glabra.

Método empleado : Extracción continua en extractor de Soxhlet, de la F.E.U. Ed. XIII.

Material usado : El polvo fino, de raíces cortadas en trozos, desecadas por exposición en un sitio moderadamente caliente, y finalmente molidas.

Para humedecerlo se usó la misma proporción de disolventes que en la valoración del beleño: Soc de S.R. de amoníaco concentrado, 10 cc de alcohol y 20 cc de éter, por cada 25 gms. de droga. Esta mezcla se dejó en maceración 12 horas, procediéndose entonces a la extracción con éter sulfúrico, durante 12 horas.

Purificación: Se efectuó en un embudo separador.

1ª. Extracción con ácido, de los alcaloides contenidos en los disolventes orgánicos: Se usaron porciones de 10 cc de ácido sulfúrico, al 5% en el primer lavado, y al 2% en los cuatro siguientes. Estos lavados ácidos se recogieron en otro embudo separador y una parte se probó con los reactivos generales de precipitación para alcaloides de la F.E.U. Ed. XIII:

S.R. de Yoduro Mercúrico-Potásico (Reactivo de Mayer): precipitado crema-celestoso.

S.R. de Yoduro Mercúrico (Reactivo de Valser): precipitado amarillento.

S.R. de Yodo (Reactivo de Wagner): precipitado pardo-rojizo.

S.R. de Acido Pítrico : precipitado amarillo.

S.R. de Acido Tánico : precipitado pardo.

2ª. Extracción con disolventes orgánicos, de los alcaloides contenidos en la solución ácida: Esta se alcalinizó con S.R. de Amoniaco y se agitó con 5 porciones sucesivas de éter sulfúrico. Esta solución etérea se sometió a evaporación al bañomaría hasta quedar reducido su volumen a una tercera parte; el resto se dejó volatilizar a temperatura ambiente. El residuo, de color amarillo rojizo, aspecto resinoso y adherido al beaker, no mostró la presencia de cristales al ser examinado al microscopio.

Segunda y tercera extracciones.

Siguiendo este mismo método se efectuaron dos extracciones más, empleando doble y triple cantidad de droga respectivamente. El resultado fué el mismo: un residuo resinoso adherido al beaker y exento de cristales.

Cuarta extracción.

Variando el método se efectuó ésta, y en un extractor montado a manera de extractor de Soxhlet, con el objeto de efectuarla de una mayor cantidad de material, considerando la pequeña proporción en que están contenidos los alcaloides en las drogas.

La variación que se hizo fué, emplear cloroformo para humedecer y para extraer. En este caso se obtuvo un extracto final más rico en resinas y materias colorantes, que en las extracciones anteriores. Muestras de él se observaron al microscopio sin indicar presencia de cristales. Días después, a simple vista se notaban formaciones de cristales, solubles en agua, que analiza-

dos mostraron ser de una sal de amonio.

Quinta extracción.

Esta se efectuó con una diferencia de la anterior: el extracto, antes de la purificación, se mezcló con carbón activado con la idea de clarificarlo, y así se obtuvo una vez filtrado. Se procedió entonces a la purificación en un embudo separador; una parte de los lavados ácidos reunidos, fué ensayada con los reactivos de precipitación para alcaloides, sin observarse turbiedad alguna. Fué suspendido el proceso, al quedar los productos alcaloidales retenidos junto con las resinas, materias colorantes, y demás sustancias extraídas por el solvente.

Sexta extracción.

El método fué aún más modificado; se suprimió la alcalinización previa a la extracción, es decir se maceró y se extrajo con cloroformo puro, por la suposición de que el alcaloide, en la forma como se encuentra en la droga, podría ser extraído por este solvente. La mitad del extracto se sometió a los lavados ácidos, y estos líquidos ensayados con los reactivos de precipitación, observándose sólo turbiedad. Quiere decir, que en esta forma la extracción es pobre. El resto del extracto se concentró por evaporación al bañomaria y luego se dejó a la temperatura ambiente, obteniéndose un residuo resinoso adherido al beaker; su observación microscópica no reveló presencia de cristales.

Método del Chemist's Year Book. (1)

Siguiendo el método, y luego introduciendo modificaciones sucesivas, se realizaron numerosas extracciones sin obtenerse un producto cristalizado; esto se logró, al efectuarse la extracción en la forma siguiente:

Extracción con alcohol acidificado. En un balón de vidrio, provisto de refrigerante a reflujo y calentado a bañomaria, se colocaron 250 gms. de droga en polvo fino y se sometió a extracción durante 12 horas, con un litro de alcohol de 95% adicionado de 1% de ácido tartárico. Una porción de extracto alcohólico filtrado, se probó con los reactivos para alcaloides observándose abundante precipitación.

Eliminación del alcohol por destilación al vacío. Le fueron agregados 250 cc de agua destilada y sometido a destilación al vacío, con la idea de que al irse eliminando el alcohol, la sal alcaloidal permanecería disuelta en el agua. Este alcohol destilado estaba libre de alcaloides, lo que se comprobó por el ensayo con los reactivos. La solución acuosa fué alcalinizada con hidróxido de sodio al estado sólido, agitando constantemente y usando papel tornasol como indicador.

Extracción con cloroformo. Procedióse entonces a la extracción con cloroformo, operación que se realizó por agitación en un embudo separador, con dos porciones sucesivas de 300 cc y 200 cc, de dicho disolvente. Una pequeña parte de este extracto cloroformico, fué agitada con porciones de ácido sulfúrico al 2%, y este líquido de lavado dió abundante precipitación con los reactivos.

Concentración del extracto clorofórmico. Se realizó en un frasco Claissen por destilación al vacío, hasta obtener un residuo muy espeso que fué vaciado a un beaker pequeño; el frasco Claissen se lavó con dos pequeñas porciones sucesivas de alcohol puro de 95°, que se agregaron luego al extracto.

El cloroformo que destiló fué agitado con ácido sulfúrico al 2% y este lavado se probó con los reactivos, no observándose turbiedad alguna, indicando así estar exento de alcaloides.

El extracto fué conservado al abrigo de la luz y a temperatura ambiente, hasta que el alcohol se hubo volatilizado; al extracto, seco y duro, se le agregó nueva porción de alcohol puro de 95°, y se mantuvo en reposo y observación hasta que, una vez suavizado y por inclinación del beaker, el líquido dejó ver en el fondo, abundantes cristallitos aciculares finos y brillantes.

Purificación. El líquido se decantó, y nueva porción de alcohol puro de 95° le fué agregada; se decantó otra vez y estos lavados se repitieron tres veces más, obteniéndose entonces los cristales bastante limpios. Para purificar más, fueron disueltos en metanol caliente y la solución filtrada y recogida en un vidrio de reloj grande, se dejó evaporar al ambiente, notándose que al irse evaporando el solvente quedaban abundantes granitos muy blancos, que al ser observados al microscopio mostraron ser agrupaciones de cristales aciculares dispuestos semejando rosetas.

Las extracciones en esta forma, se repitieron hasta reunir la cantidad de sustancia necesaria para los ensayos posteriores.



Figura N°3. Agrupaciones de cristales semejando rosetas.

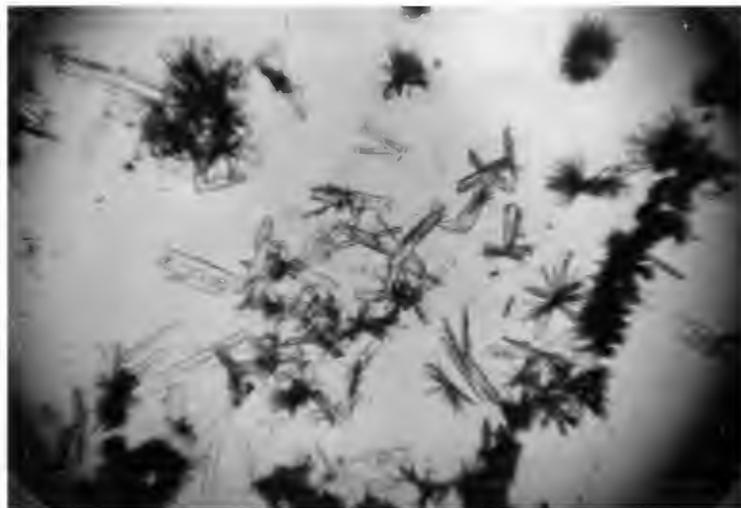


Figura N°4. Cristales de rosetas que fueron despedazadas.



Figura N°5. Cristales triturados.

Solubilidad. Cristales solubles en cloroformo, ácido acético glacial; aplicando calor se disuelven en ácido acético diluido, metanol, etanol. Insolubles en éter sulfúrico, bencina.

Punto de fusión. Siguiendo el método que recomienda la F.E.U. Ed. XIII para los compuestos de la clase I, una muestra de la sustancia dió un punto de fusión de 276.06°C.

Análisis elemental cualitativo.

1°. Nitrógeno, Azufre y Halógenos.

Se siguió el método de fusión con sodio (3), que al descomponer la sustancia convierte estos elementos de las moléculas orgánicas, en formas iónicas que los ponen de manifiesto por medio de las reacciones utilizadas en el análisis inorgánico cualitativo. La técnica seguida es la misma que recomienda el método, empleando la muestra sólida.

a). Prueba del azufre. Negativa.

No se formó precipitado negro de sulfuro de plomo, al acidular y agregar solución de acetato de plomo.

b). Prueba del nitrógeno. Positiva.

La precipitación de azul de Prusia fué abundante.

c). Prueba de halógenos. Negativa.

No se produjo precipitado al agregar nitrato de plata.

2°. Carbono e Hidrógeno. Positiva.

Se aplicó el método de LIEBIG, (5) calentando la mezcla de 3 gms. de óxido cúprico seco y pulverizado, y 0.1 gr. de la muestra a examinar seca, en el aparato que describe el método. Se

observó la formación de gotitas de agua en el extremo frío del tubo de ensayo y en el tubo de desprendimiento; se demuestra así el contenido de hidrógeno en la muestra, que al combinarse con el oxígeno del óxido cúprico, produce vapor de agua que se condensa en la parte superior fría del tubo. La presencia en la muestra, de carbono, quedó demostrada al observarse burbujas de dióxido de carbono en la solución de hidróxido de calcio, y lechosisidad, por la precipitación de carbonato de calcio.

3º. Oxígeno. Positiva.

El método (7) se funda en el hecho, de que las soluciones de yodo, en los compuestos líquidos que no contienen oxígeno, tienen color violeta, mientras que las soluciones en líquidos oxigenados (sea el disolvente o algún otro cuerpo disuelto en cantidad suficiente) tienen color pardo.

En un tubo de ensayo se preparó la solución de yodo en cloroformo puro: color violeta; en otro se disolvió la sustancia a examinar también en cloroformo puro, obteniéndose una solución transparente e incolora. Al mezclar ambas soluciones, el color cambió a pardo.

REACCIONES DE PRECIPITACION

Estas reacciones se llevaron a efecto, empleando una solución al 0.1% de la sustancia extraída en ácido acético diluido, y otra solución de Reserpina pura en el mismo disolvente y a igual concentración. Se usaron los reactivos generales de precipitación para alcaloides de la F.E.U. Ed. XIII.

Sol. sustancia extraída.

Sol. Reserpina pura.



Figura N°6. S.R. de Yoduro Mercúrico- Potásico. Reactivo de Mayer.

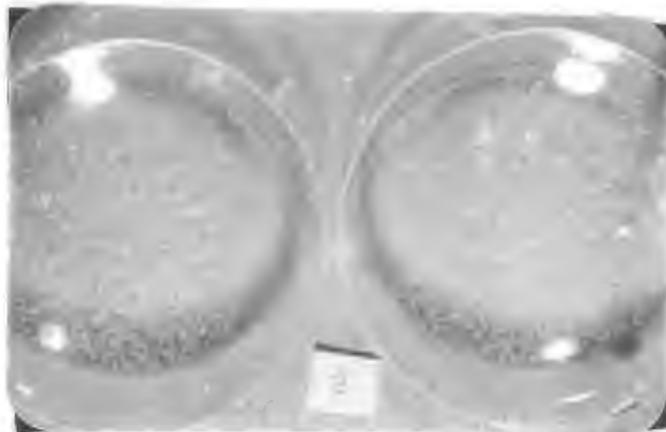


Figura N°7. S.R. de Yoduro Mercúrico. Reactivo de Valsler.

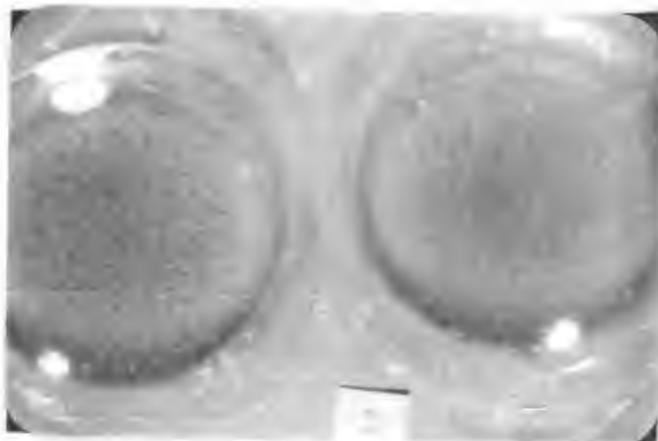


Figura N°8. S.R. de Yodo. Reactivo de Wagner.

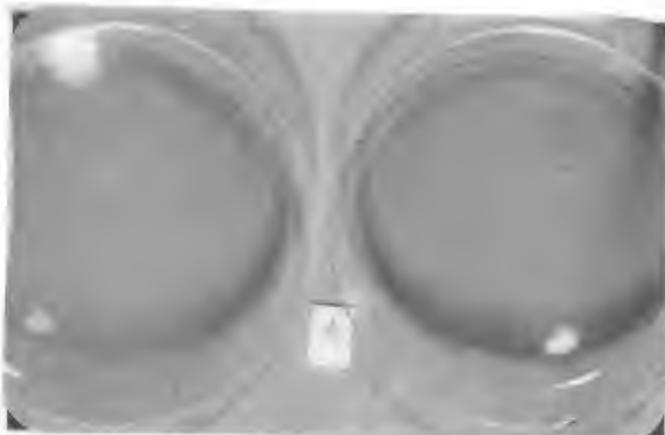


Figura N^o9. S.R. de Acido Pícrico.



Figura N^o10. S.R. de Acido Tánico.

REACCIONES DE COLORACION

También se efectuaron reacciones con los reactivos especiales de coloración para alcaloides. (4).

Sol. sustancia extraída.

Sol. Reserpina pura.



Figura N°11. Reactivo de Fröhde. (Acido Sulfomolibdico).

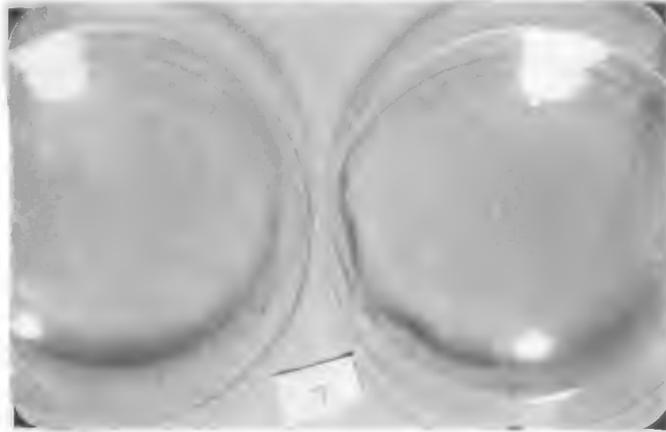


Figura N°12. Reactivo de Eardmann.



Figura N°13. Reactivo de Marquis.

RECRISTALIZACIONES

Estas se efectuaron con soluciones de la sustancia extraída, y con soluciones de Reserpina pura.



Figura N°14. Sustancia extraída disuelta en metanol caliente, y evaporando éste por medio de calor.

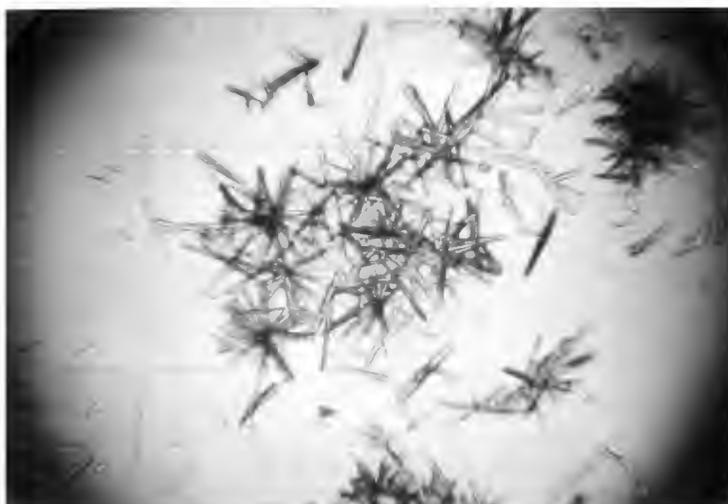


Figura N°15. Reserpina pura disuelta en metanol caliente, y evaporando éste por medio de calor.



Figura N°16. Sustancia extraída disuelta en metanol caliente, y dejando evaporar a temperatura ambiente.

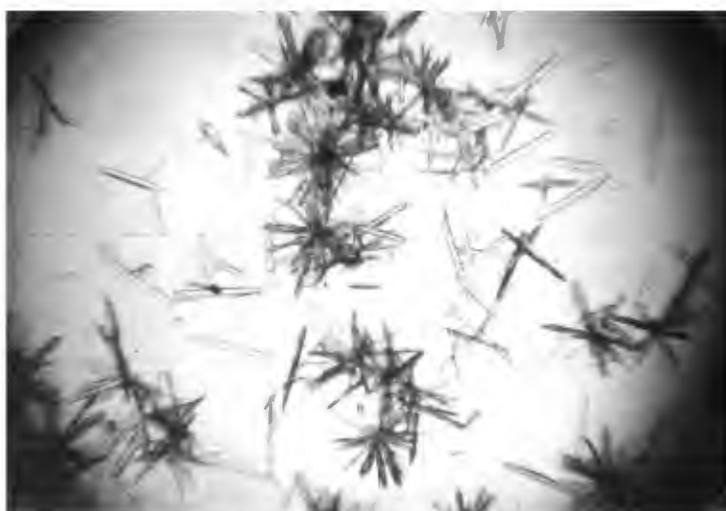


Figura N°17. Reserpina pura disuelta en metanol caliente, y dejando evaporar a temperatura ambiente.

b). Ensayo de su actividad fisiológica en el conejo.



Figura N°18. La membrana nictitante del ojo del conejo está contraída y casi invisible.



Figura N°19. Conejo al que se administraron 5 miligramos de Reserpina pura, en una capsulita que se le hizo tra-

gar.

La membrana nictitante está dilatada y cubre la córnea del ojo, demostrando la influencia calmante sobre el Sistema Nervioso Simpático; la pupila está contraída.

La foto fué tomada 4 horas después de la administración.



Figura N^o20. Conejo al que se administraron 5 miligramos de la sustancia extraída, en una capsulita que se le hizo tragar.

La membrana nictitante está dilatada y cubre la córnea del ojo; la pupila está contraída.

La foto fué tomada 4 horas después de la administración.

RESUMEN Y CONCLUSIONES

Considerando la gran importancia, que en medicina ha llegado a adquirir la *Rauwolfia serpentina* y su principal alcaloide la Reserpina, se hizo el estudio de una de las especies de *Rauwolfia* que existen en nuestro país, la *Rauwolfia canescens* var. *glabra*.

- 1^a. Siguiendo un método para extracción de alcaloides se aisló una sustancia cristalizada.
- 2^a. Las solubilidades observadas, indican que tal sustancia puede considerarse semejante al alcaloide Reserpina.
- 3^a. El punto de fusión obtenido, está comprendido entre las temperaturas de fusión anotadas por distintos investigadores.
- 4^a. El análisis elemental cualitativo de la sustancia, mostró que es cuaternaria: C - H - O y N.
- 5^a. Las reacciones de precipitación y las reacciones de coloración, efectuadas con solución de Reserpina pura como testigo, y con solución de la sustancia obtenida en este trabajo, se observaron prácticamente iguales.
- 6^a. Las recristalizaciones, de soluciones de Reserpina pura y de soluciones de la sustancia extraída, dieron cristales muy parecidos, en la forma y en la manera de disponerse formando agrupaciones semejantes a rosetas.
- 7^a. Los ensayos fisiológicos en conejos, con Reserpina pura y con sustancia extraída, demostraron que ésta tiene actividad fisioló-

gica, al producir también la acción característica que la Reserpina tiene sobre la membrana nictitante del ojo del conejo, y sobre la pupila del mismo.

8º. De acuerdo con las observaciones anotadas, es posible suponer que la sustancia extraída de la raíz de la *Rauwolfia canescens* var. *glabra*, sea igual a la Reserpina, alcaloide principal de la *Rauwolfia serpentina*.

BIBLIOGRAFIA

- 1). Chemist's Year Book, The. 1946.
1255 pp. John Sherratt, Son & Co. Park Road Timperley.
- 2). Farmacopea de los Estados Unidos, 1949.
Décimatercera revisión. XCIII más 1000 pp.
- 3). Mc. Elvain, S. M. 1945.
Análisis Orgánico Funcional. Versión española por Fontan Yanes,
J. & Martin Mauricio, A. 232 pp. Aguilar. S. A. Ediciones Madrid.
- 4). Paech, K. & Tracey, M. V. 1955.
Modern Methods of Plant Analysis. Vol. IV. 766 pp.
Editorial Springer-Verlag. Berlin. Göttingen. Heidelberg.
- 5). Porter and Stewart, 1943.
Organic Chemistry for the Laboratory. Ginn and Company.
- 6). Standley, P. C. 1938.
Flora of Costa Rica. Vol. XVIII, Part. III. Publication 420.
783 pp., 1133 pp. Field Museum of Natural History.
- 7). Tacher-Clarke.
Manual de Análisis Orgánico cualitativo y cuantitativo.
- 8). Ullman, F. Dr. 1950.
Enciclopedia de Química Industrial. 2ª Ed. Secc. III. Tomo IV,
876 pp. Barcelona, Editorial Gustavo Gili, S. A. Calle Enrique
Granados. 45.
- 9). Zapni, E. V. Dr.
Tratado de Química Orgánica. 2ª Ed. Tomo VI. Cap. XXX.