

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA

FACULTAD DE FARMACIA

ENSAYO FITOQUIMICO DE LA ESPECIE
"CISSAMPELOS PAREIRA"

PAREIRA BRAVA

TESIS DE GRADO

PRESENTADA A LA FACULTAD DE FARMACIA PARA OPTAR AL
TITULO DE LICENCIADO EN FARMACIA

RAFAEL ANGEL RAMOS GUERRERO

1962

DEDICATORIA

A mis padres

con todo cariño•

Agradezco a los Profesores Lic. José A. Saénz R. y Lic Jaime Cerdas C la ayuda prestada en la realización de este trabajo.

ENSAYO FITOQUIMICO DE LA ESPECIE CISSAMPPELCS PAREIRA

I INTRODUCCION

A) Descripción Botánica

II PARTE EXPERIMENTAL

A) Material Usado y su recolección

B) Preparación de la Droga

C) Ensayos Preliminares :

para alcaloides

D) Métodos de Extracción

E) Reacciones de Identificación.

III CONCLUSIONES

IV BIBLIOGRAFIA

V RESUMEN

I INTRODUCCION

Entre las plantas de la familia Menispermaceae, una de las más conocidas es la *Cissampelos pareira* L., vulgarmente llamada en nuestro país Pareira brava, Venadero ó Bejuco azul; y muy conocida en medicina popular, como remedio eficaz en afecciones del estómago y cataplasma para heridas. Además se le atribuye a la raíz y al tallo la propiedad de disolver los cálculos renales; también el zumo de las hojas es la base de una preparación empírica contra mordedura de serpientes.

Según el Dr. G. Gaummer (4), está indicada para el tratamiento de la distensión crónica de la vejiga, trastornos de las vías urinarias, leucorrea, hidropesía, reumatismo, ictericia, etc.

Como todos estos usos no han sido científicamente comprobados se ha tratado de hacer un ensayo fitoquímico de esta especie a fin de demostrar la posible presencia de un principio alcaloidal ó glicosídico responsable de la acción farmacológica de la droga.

Con base en esto, los primeros trabajos de laboratorio se hicieron sobre métodos generales para la extracción e identificación de alcaloides, que fueron posteriormente com

probados mediante reactivos que indicaron la presencia de alcaloide en las hojas, tallo y raíz, descartándose las pruebas ulteriores para glicósidos, por lo que el trabajo se continuó única y exclusivamente sobre alcaloides.

A) DESCRIPCION BOTANICA:

Cissampelos pareira L.

Conocida con el nombre de Venadero, Bejuco azul, Pa reira brava y Oreja de ratón .

Pertenece a la familia Menispermaceae, es una planta trepadora, pubescente, de hojas orbiculares, reniformes o cordadas; flores unisexuales; las masculinas regulares y tetrámeras con doble periantio; el androceo es una columna dilatada en la parte superior; las femeninas constan de un sépalo y un pétalo, ovario unilocular con un estigma trifurcado, las flores son de color amarillo verdoso.

En general la familia Menispermaceae está integrada por plantas leñosas trepadoras, con hojas enteras o lobuladas, esparcidas; flores relativamente pequeñas.

Predominan estas plantas en los trópicos y encontramos en esta familia algunas venenosas como el Abuto rubescens (Sudamérica), que se emplea para preparar el Curare, también la Anamirta cocculus ó Coca de levante de la que se utilizan las semillas para envenenar las aguas, con objeto de matar los peces.

Generalmente se usan del Cissampelos pareira L. la raíz seca o la corteza que es de color café, grisácea, rugosa longitudinalmente, con elevaciones transversales, interiormente es leñosa, gris amarillenta, porosa, con anillos concéntricos bien marcados, a veces incompletos y radios medulares; su sabor es al principio dulzón y aromático y después amargo.

Según Fenedle (4), contiene resina blanda, un principio amarillo, principio moreno, fécula, materias albuminoides y sales. Wiggers (4), le asigna además una base alcalina (Cissampelina), análoga a la Suxina según Fluckiger (4).

II PARTE EXPERIMENTAL:

A) MATERIAL USADO Y SU RECOLECCION:

En las diversas experiencias se emplearon hojas, tallo y raíz, material que fué colectado en varias regiones de la meseta central, de preferencia las de clima templado, como: Escazú, (altura media 1100 metros), Santa Ana, (altura media 905 metros) y San José a una altura media de 1142 metros; dicha recolección se hizo en el mes de febrero de 1961.

B) PREPARACION DE LA DROGA:

La muestra se deseca en estufa a temperatura constante de 65°C por 4 días, luego se reduce a polvo fino número 40 y se envasa en frascos de color ámbar, de cierre hermético.

C) ENSAYOS PRELIMINARES:

Pruebas cualitativas para alcaloides terciarios y cuaternarios:

Muestra de raíz:

Se toman 30 gms de muestra de raíz, finamente pulverizada, y se le hace una extracción al reflujo por dos horas,

con 150 cc. de alcohol de 95°. Luego se filtra por succión, y el filtrado alcohólico se evapora hasta consistencia siruposa, a presión reducida; el residuo obtenido se disuelve en solución de hidróxido de amonio al 5%, se pasa a un embudo separador y se agregan 50 cc de éter. La capa etérea obtenida se separa y se extrae con 5 cc. de ácido clorhídrico al 5%, una tercera parte de la capa ácida se ensaya con S.R. Mayer y S.R. Valser.

El contenido de bases alcaloidales es evaluado macroscópicamente por la formación de un precipitado de color blanco grumoso.

Para confirmar la presencia de alcaloides, se satura la capa ácida con NaCl y se filtra, con el fin de eliminar cualquier impureza que diera una falsa prueba positiva; del filtrado se toma una alícuota (5cc), y se prueba con una gota de S.R. de Mayer.

A la porción alcalinizada con NH_4OH , se le hacen dos nuevas extracciones con éter, y se acidifica con el fin de comprobar que se ha realizado la total extracción de alcaloides terciarios.

Una vez hechos los lavados con éter se comprueba la existencia de alcaloides cuaternarios en esa capa, agregando NaCl hasta saturación, se filtra y se agregan los reactivos de Mayer y Valser.

Resultados:

En las dos pruebas realizadas, la precipitación ocurre en forma rápida y en gran cantidad. Los precipitados son de color grumoso.

Ensayos:

- 1) Alcaloides terciarios
- 2) Alcaloides cuaternarios (contenidos en la capa alcalina)

Cuadro N°- 1

	S. R. Mayer	S. R. Mayer más Cloruro Sodio	S. R. Valser
Alcaloides terciarios	Precipitado amarillo	Precipitado crema	Precipitado crema
Alcaloides Cuaternarios (capa alcalina acidificada)	Precipitado amarillo pardusco	Precipitado verde amarillento	Precipitado amarillo pardusco

Probada la existencia de alcaloides, se procedió a buscar un método que diera mayor rendimiento. Con este objeto se hicieron nuevas extracciones; dos utilizando el primer método, modificado simplemente en el menstruo que se cambió de alcohol a cloroformo; una tercera utilizando el método de extracción de la quinina (11) y como muestra la corteza.

En vista de que ninguno de los métodos anteriores dió resultados suficientemente satisfactorios se empleó el método de extracción de la d-tubocurarina modificado (2), basán

dose en el hecho de que éste alcaloide se encuentra presente en algunas especies de la familia Menispermaceae; con ese método se logró separar 3 fracciones fácilmente indentificables, y es el que a continuación se detalla.

D) METODO:

Se hacen extracciones en el tallo y corteza de la raíz, con pequeñas porciones de agua, luego se concentra el extracto acuoso hasta consistencia de masa negra pardusco pastosa que se pone en autoclave a sequedad. El residuo se trata con solución acuosa de ácido tartárico y el extracto obtenido se trata con exceso de subacetato de plomo.

Las sales plúmbicas precipitadas son separadas y después de quitar el plomo soluble en forma de sulfuro, se alcaliniza ligeramente el filtrado y se trata con cloroformo, para extraer otros alcaloides (terciarios y fenólicos). La solución acuosa tratada con cloroformo se acidula con H_2SO_4 hasta pH 3 y se trata con ácido pícrico. Luego se separa el picrato insoluble, se purifica por recristalización en una mezcla de acetona-etanol y se convierte en cloruro por tratamiento con HCl diluido en presencia de tolueno.

El alcaloide se difunde en la capa acuosa ácida y el ácido pícrico en la capa de tolueno. Por enfriamiento cristaliza el producto en la capa ácida y se purifica por recristalización en HCl al 6%.

Como no se logró la cristalización, se procedió a modificar el método, sustituyendo el ácido sulfúrico por ácido clorhídrico y usando como precipitante H_gCl_2 en lugar de ácido pícrico.

Resultados obtenidos:

Al agregar la solución de H_gCl_2 se observa un precipitado de color gris. Se separa por filtración, y se suspende en agua destilada, se satura con H_2S la solución con el fin de separar el H_g en forma de H_gS insoluble.

Luego se calienta para eliminar el H_2S y se evapora, quedando como residuo los alcaloides cuaternarios en forma de un polvo de color gris oscuro. Este se recoge para hacerle algunas pruebas de identificación cualitativa, constantes físicas (solubilidad, punto de fusión, etc.).

Con el extracto clorofórmico se continúa trabajando hasta obtener dos fracciones que representan la posible presencia de alcaloides terciarios (fracción A) y fenólicos (fracción B). La fracción fenólica es de color amarillento y la que contiene los alcaloides terciarios es de color café rojizo, cada una de estas partes se disuelve en alcohol absoluto.

Se procedió a cristalizar las tres fracciones, utilizando alcohol metílico absoluto.

Se obtuvieron cristales de color amarillo con la

fracción fenólica, y cristales negruzcos con las fracciones terciaria y cuaternaria.

Estas fracciones cristalizadas dieron resultados positivos con los reactivos de Mayer y Valser.

Además se efectuaron pruebas cualitativas generales, algunas de ellas empleadas en la identificación de la d-Tubocurarina, utilizando una mezcla de las fracciones A y B (alcaloides terciarios y fenólicos). (3)

Estas pruebas son:

- 1.- Reacción con solución reactivo de cloruro férrico: Produce color verde al emplear una solución saturada del alcaloide en forma de clorhidrato.
El color se intensifica al calentar.
- 2.- Con solución de Carbonato de sodio, se produce un precipitado café amarillento. En esta prueba se usó el alcaloide en solución amoniacal.
- 3.- El alcaloide reduce la plata amoniacal por calentamiento y da un leve precipitado amorfo con solución reactivo de : cloruro de oro, cloruro de platino, yoduro de potasio, tiocianato de potasio, bicloruro de mercurio y ácido perclórico.
- 4.- La adición de bicarbonato de sodio sólido a una solución del alcaloide, produce un precipitado granular amorfo, Este es muy soluble en agua caliente y se separa por enfriamiento. Es también soluble en cáusticos alcalinos.

5.- La solución alcaloidal produce un color rojo con el reactivo de Millon.

A continuación se detallan en un cuadro, las reacciones anteriormente citadas, con los resultados obtenidos:

CUADRO N° 2

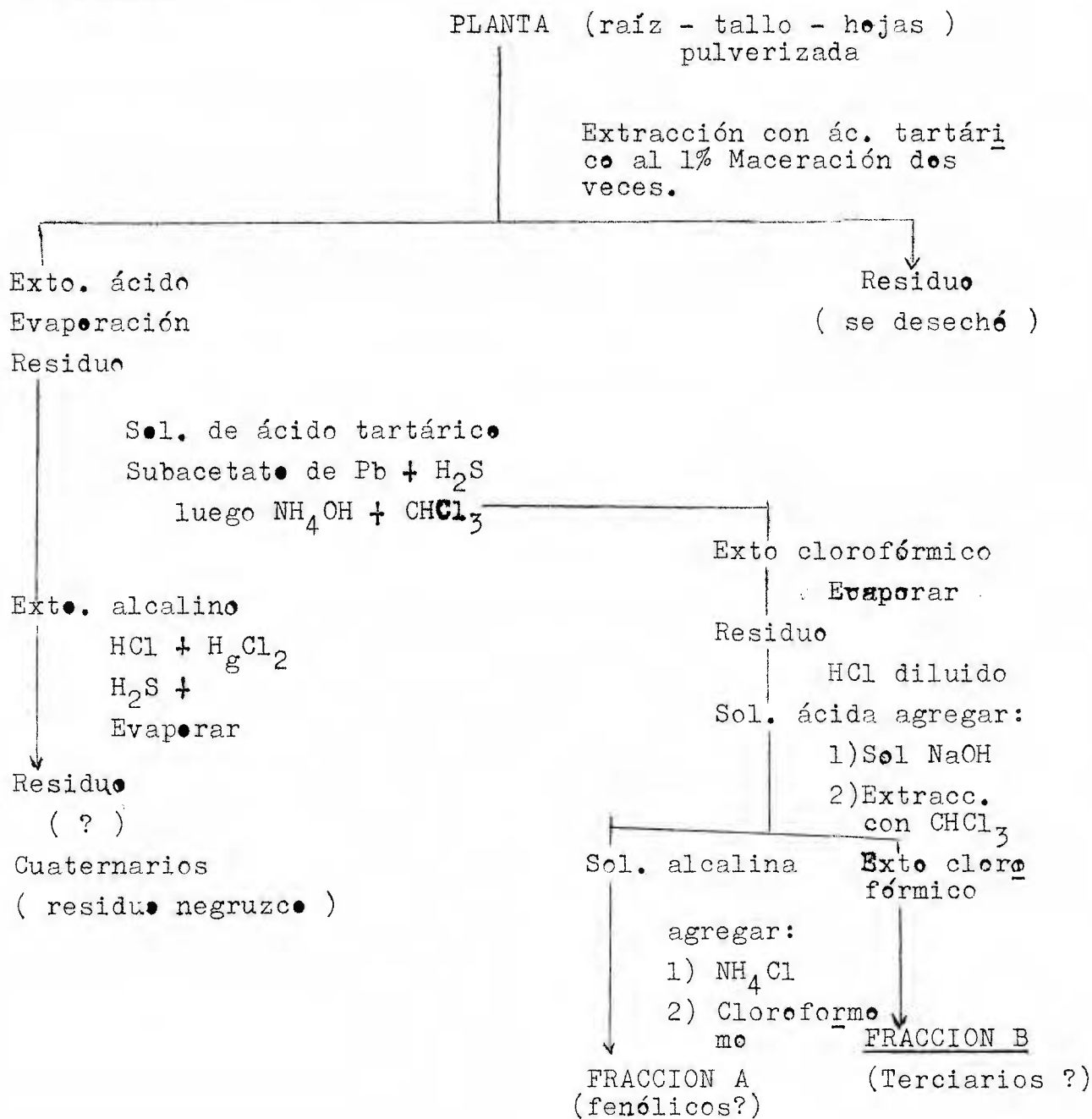
	FeCl ₃ S. R.		Solución Na ₂ CO ₃	KI ó KBr S. R.	NaHCO ₃ sólido			Reactivo de Millon	
	En Frío	En Caliente	En Frío	En Frío	En Frío	En Caliente	En solución NaOH	En Frío	En Caliente
d-tubo Curarina	color verde	Se inten sifica.	Precipitado café-amari- lento	Precipitado grisáceo amorfo	Precip. granular amorfo	Soluble	Soluble	Positivo	Positivo
Muestra	Verde Grisá se	No Varía	Precipitado café-amari- lento	Precipitado grisáceo amorfo	Precip. café oscuro	Insoluble	Insoluble	Negativo	Positivo

Se le hizo también una prueba que se usa para la identificación de la estri^cnicina, y que consiste en: Agregar le a la muestra una gota de H_2SO_4 concentrado y un cristal de $K_2Cr_2O_7$. Aparece a los dos minutos una coloración verdosa que llega hasta verde franco y se produce efervescencia.

Con la estri^cnicina la coloración obtenida es azul.

(1) .

Esquema que representa los diferentes pasos seguidos a partir de la extracción del alcaloide con sol. acuosa de ácido tartárico al 1%



PUNTOS DE FUSION :

de los cristales obtenidos en metanol . (5)

CUADRO N° 3

Fenólicos	Terciarios	Cuaternarios
155- 157 °C	250 - 252 °C	Fué imposible de terminarlo por no poder ser desecado

ANALISIS ELEMENTAL : (5)

Se siguió el método indicado en " La caracterización de Compuestos Orgánicos de Mc Elvain " .

Usando las 3 fracciones anteriores por separado (fenólica, terciaria y cuaternaria).

a) Fusión con sodio metálico

1) Determinación de nitrógeno

(formación de Azul de Prusia insoluble).

2) Determinación de Oxígeno:

a) Iodo en benceno: Prueba falsa, debido a la coloración de las fracciones obtenidas (pardo) (10)

b) Prueba del Ferrox (Exatiocianato ferrato férrico), disuelto en piridina y disuelto en cloroformo.

CUADRO N° 4

	Determinación de Nitrógeno	Determinación de Oxígeno.	
		Disuelto en Piridina	Disuelto en cloroformo
Alcaloides terciarios	Positivo	Positivo	Positivo
Alcaloides Cuaternarios	Positivo	Positivo	
Alcaloides fenólicos	Positivo	Positivo menor decoloración	Positivo

Nota:

De la fracción cuaternaria, solo una parte se disuelve en piridina, pero esa porción disuelta es suficiente para dar positivo el ensayo.

III CONCLUSIONES

El principio activo fué encontrado en hojas, tallo y principalmente en la raíz, en la que se encontró en mayor cantidad.

El método con el que se logró mejor resultado, fué el basado en la obtención de d-tubo Curarina (2) modificado, por tratarse de un método, para alcaloides terciarios y cuaternarios, que nos permitió aislar tres fracciones fácilmente identificables, por los colores típicos que presentaban y en mayor cantidad que la obtenida por los otros métodos. A las tres fracciones fué posible realizarles el Análisis Elemental, evidenciándose su naturaleza nitrogenada.

Para completar el trabajo sería necesario realizar pruebas cromatográficas con el objeto de separar en forma pura las diferentes fracciones contenidas en la planta, para que la pureza de éstas garantizara constantes físicas exactas. Esto no pudo llevarse a cabo debido a las pocas facilidades para el trabajo con que en ese momento contaba el laboratorio.

A pesar de todo se logró demostrar la presencia de tres tipos de alcaloides en la planta Cissampelos pareira L.:

terciarios, cuaternarios y de tipo fenólico. Una mezcla de las fracciones A y B, demostró similitud de reacciones químicas con la d-tubo Curarina por medio de pruebas de coloración y precipitación; sin embargo dichas pruebas no son suficientes para asegurar que ese alcaloide exista en la planta.

BIBLIOGRAFIA

1) Bamford, F.

Poisons Their Isolation and Identification

III Ed.

J & A. Churchill Ltd, London

1951. p: 259 - 260

2) Cook, E. F. & W. Martin

Farmacia Práctica de Remington

X Ed.

Editorial Hispano Americana; Mexico D.F.

1953. p: 1010 - 1171

3) Cromwell, B.T.

The Alkaloids EN K. Paech

y M.V. Tracey (ed)

Modern Methods of plant Analysis

Vol. 4.

Springer - Verlag - Berlin - Gottinger Weidelberj.

1955. p 367 - 516

- 4) Martínez, M.
Plantas Medicinales de Mexico
Ediciones Botas; Mexico D.F.
1939. p 208 - 209

- 5) Mc Elvain, S. M.
La caracterización de Compuestos Orgánicos
Ediciones Aguilar; Madrid - España
1953. p 39 - 41

- 6) Pittier, H.
Ensayo sobre plantas usuales de Costa Rica
II Ed.
Editorial Universitaria; San José, Costa Rica
1957. p 212

- 7) Shellard, E. J.
Practical Plant Chemistry for Pharmacy Students
Pitman Medical Publishing Co Ltda; London
1957. p 124 - 127

- 8) Standley, P. C. & Calderon
Lista Preliminar de las plantas de El Salvador
Tipografía la Unión; San Salvador
1927. p 82

9) Stechter, D.G.

The Merck Index

VII Ed.

Merck & Co. Inc. Rahway; N. J. U.S.A.

1960. p 305

10) Stig Veibel

Identification des Substances Organiques I

Masson et Cie Editeurs, Saint Germain, Paris VI e

1957. p 17

11) Plant Chemistry Laboratory Manual

University of Wisconsin

1958. U.S.A.

12) Wettstein, R.

Tratado de Botánica Sistemática

Editorial Labor; Barcelona, Madrid

1944. p 655

V RESUMEN:

Este trabajo consistió en un ensayo fitoquímico de la especie Cissampelos pareira L.

Se realizaron pruebas preliminares para investigar alcaloides.

Se encontró un principio alcaloidal en hojas, tallo y raíz; esta última mostró tener mayor cantidad de dicho principio.

Haciéndole modificaciones al método de obtención de la d- tubo Curarina (2), fué posible obtener 3 fracciones con alcaloides de tipo terciario, cuaternario y fenólico.

Cabe suponer que cada una de estas fracciones está constituida por mezclas de alcaloides, a las que sería necesario hacerles pruebas cromatográficas; esto no fué posible llevarlo a cabo por las pocas facilidades con que en ese momento contaba el laboratorio.

Se incluyen en el trabajo 4 cuadros con las reacciones y análisis elemental efectuados para la identificación de los 3 alcaloides anteriormente mencionados.