

EXTRACCION DE BOLDINA DE LAS HOJAS DE *Peumus boldus*

JUAN PABLO HINCAPIE HENAO

UNIVERSIDAD DEL QUINDIO
FACULTAD DE CIENCIAS BASICAS
PROGRAMA DE QUIMICA
ARMENIA Q.
2005

EXTRACCION DE BOLDINA DE LAS HOJAS DE *Peumus boldus*

JUAN PABLO HINCAPIE HENAO

Proyecto de investigación
presentado como requisito
para pasantía en la empresa
Vitrofarma s.a. y como requisito
parcial para optar al título de
QUIMICO
Director: Milton Gomez B.

UNIVERSIDAD DEL QUINDIO
FACULTAD DE CIENCIAS BASICAS
PROGRAMA DE QUIMICA
ARMENIA Q.
2005

AGRADECIMIENTOS

A Dora Cristina León León de VITROFARMA S.A., en su memoria, por haber postulado el proyecto ante gerencia para su posterior aprobación.

A la empresa VITROFARMA S.A. por haber creído en mi y en la forma que se desarrolló este proyecto.

A la Universidad del Quindío por haber facilitado las instalaciones de los laboratorios de química y algunos materiales, reactivos y equipos necesarios para el desarrollo de este proyecto.

Al profesor Milton Gomez Barrera de la Universidad del Quindío por haber aceptado ser el director de este proyecto, por su instrucción y amabilidad en el momento de resolver cualquier duda.

A Sonia Rúa de Vitalis S.A. C.I. por servir de mediadora entre la gerencia y el departamento de recursos para la entrega del dinero con el cual se compraron materiales reactivos empleados en el desarrollo de este proyecto.

A Enrique Avella del Grupo Ave por facilitar los recursos necesarios para el desarrollo de este proyecto.

A Martin Emilio Montoya por su colaboración en el préstamo de los materiales de laboratorio.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a Dios por ser el guía en cada paso de mi vida y en el desarrollo de este proyecto.

A mi Madre Esther por ser la fuente de inspiración diaria que me ayuda a seguir adelante pese cualquier obstáculo.

A mi hermana Maria del Pilar quien con su esmero y fortaleza me invita día tras día a enfrentar el mundo, que a pesar de sus adversidades está lleno de fuentes de alegría constantes.

A mi Padre Miguel Angel por su paciencia en cuanto a la consecución de este título.

A mi sobrina Marisol, aquel destello de luz que colma mi vida de felicidad y deseo de vivir.

NOTA DE ACEPTACION

Este trabajo de grado ha sido
aprobado como requisito parcial
para optar al título de QUÍMICO

MILTON GOMEZ BARRERA
Director de Tesis

EUNICE RIOS VASQUEZ
Jurado Calificador

CESAR AGUDELO
Jurado Calificador

FERNANDO AGUDELO
Jurado Calificador

Armenia, 2005

TABLA DE CONTENIDO

	Pag
RESUMEN	
INTRODUCCION	1
1. OBJETIVOS	2
1.1 OBJETIVOS GENERALES	2
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	2
2. ANTECEDENTES	4
3. MARCO TEORICO	7
3.1 DESCRIPCION BOTANICA DE <i>Peumus boldus</i>	7
3.2 PROPIEDADES MEDICINALES DE <i>Peumus boldus</i>	8
3.3 INDICACIONES TERAPEUTICAS	11
3.4 GENERALIDADES SOBRE ALCALOIDES	11
3.5 ALCALOIDES PRESENTES EN <i>Peumus boldus</i>	12
3.6 PRUEBAS PRELIMINARES PARA ALCALOIDES	13
3.6.1 REACTIVOS DE IDENTIFICACION PARA ALCALOIDES	13
3.7 CROMATOGRAFIA EN SEPARACION DE COMPUESTOS	15
3.7.1 CROMATOGRAFIA EN CAPA DELGADA	15
3.7.2 CROMATOGRAFIA EN COLUMNA	16
3.7.3 CROMATOGRAFIA PREPARATIVA	17

	Pg
4. PARTE EXPERIMENTAL	19
4.1 MATERIAL VEGETAL	19
4.2 SECADO	20
4.3 MOLIENDA	20
4.4 TAMIZADO	20
4.5 DESENGRAS	20
4.6 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO CRUDO	21
4.6.1 SELECCIÓN DEL SOLVENTE	21
4.7 CONDICIONES DE LA EXTRACCIÓN	22
4.7.1 ELECCIÓN DE LA TÉCNICA	22
4.7.2 ELECCION DE LA PROPORCION MATERIAL – SOLVENTE	23
4.7.3 ELECCION DEL TAMAÑO DE PARTICULA	23
4.7.4 OBTENCION DEL EXTRACTO ETANOLICO	24
4.8 ANALISIS PRELIMINAR DE ALCALOIDES	25
4.8.1 PREPARACION DEL EXTRACTO PARA PRUEBAS QUIMICAS	25
4.8.2 SEPARACION DE CLOROFILAS	25
4.8.3 OBTENCION DEL EXTRACTO SECO	25
4.8.4 ELECCION DE METODOLOGIA DE EXTRACCION	26
4.9 OBTENCION DEL CRUDO ALCALOIDAL	31
4.10 IDENTIFICACION DE ALCALOIDES POR CCD	31
4.11 SEPARACION DE ALCALOIDES POR CCF	34
4.12 PURIFICACION DE ALCALOIDES POR CCP	34
4.13 IDENTIFICACION DE ALCALOIDES POR TLC	34
4.14 METODO PARA OBTENCION DE BOLDINA	36
4.15 VERIFICACION DE BOLDINA POR TLC	37
4.16 PURIFICACION DE BOLDINA POR PTLC	37
5. MATERIALES Y REACTIVOS	38
5.1 MATERIALES	38
5.2 REACTIVOS	39

	Pg
6. RESULTADOS Y DISCUSION	40
6.1 RESULTADOS DE PRUEBAS FITOQUIMICAS PRELIMINARES	40
6.2 RESULTADOS DE LA METODOLOGIA DE EXTRACCION	41
6.3 RESULTADOS CROMATOGRAFICOS	46
TRABAJO FUTURO	47
CONCLUSIONES	
ANEXOS	
BIBLIOGRAFIA	

LISTA DE FIGURAS

		Pag
Figura N° 1.	<i>Peumus boldus</i>	7
Figura N° 2.	Núcleo Aporfinico	12
Figura N° 3.	Isoboldina	12
Figura N° 4.	Apomorfina	12
Figura N° 5.	Boldina	13
Figura N° 6.	CCD de un estándar de boldina de Naturcol	31
Figura N° 7.	CCD del crudo alcaloidal con un Rf de 0.5 bajo el sistema eluyente de tolueno - acetato de etilo (93:7)	32
Figura N° 8.	CCD del crudo alcaloidal bajo el sistema eluyente cloroformo – acetato de etilo (9:1)	33
Figura N° 9.	TLC del compuesto aislado, aparentemente boldina	46

LISTA DE DIAGRAMAS

		Pag
Diagrama N° 1	Obtención del extracto etanólico total para extracción de alcaloides.	24
Diagrama N° 2	Metodología de extracción para alcaloides con HCl Na ₂ CO ₃ y CHCl ₂	27
Diagrama N° 3	Metodología de extracción para alcaloides con HCl Na ₂ CO ₃ y CHCl ₂	28
Diagrama N° 4	Metodología de extracción para alcaloides con H ₂ SO ₄ Al ₂ (SO ₄) ₃ y CHCl ₂	29
Diagrama N° 5	Metodología de extracción para alcaloides con H ₂ SO ₄ Al ₂ (SO ₄) ₃ y CHCl ₂	30
Diagrama N° 6	Metodología de extracción para boldina	36

LISTA DE TABLAS

		Pag.
Tabla N° 1.	Pruebas fitoquímicas preliminares realizadas a los distintos extractos obtenidos	41
Tabla N° 2.	Valores obtenidos para la estandarización en la metodología de extracción N° 1.	42
Tabla N° 3.	Valores obtenidos para la estandarización en la metodología de extracción N° 2.	43
Tabla N° 4.	Valores obtenidos para la estandarización en la metodología de extracción N° 3.	44
Tabla N° 5.	Valores obtenidos para la estandarización en la metodología de extracción N° 4.	45
Tabla N° 6.	Valores obtenidos para la estandarización en la metodología de extracción N° 5.	46

LISTA DE ABREVIATURAS

λ	Longitud de Onda
°C	Grados Centígrados
$\mu\text{g/mL}$	Microgramo por Mililitro
CCD	Cromatografía de Capa Delgada
CCP	Cromatografía de Capa Preparativa
CIC	Centro Internacional del Comercio
Comision E	División Independiente de la Agencia Federal Alemana de Salud
EEUU	Estados Unidos
FC	Cromatografía Flash
G	Gramos
GC	Cromatografía de Gases
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Resolución
mg	Miligramos
nm	Nanometros
PTLC	Cromatografía Preparativa en Capa Delgada
IR	Infrarrojo
UV	Ultravioleta

RESUMEN

La familia de las monimiáceas es reconocida por su gran aporte a la flora de los metabolitos secundarios más abundantes en las plantas, principalmente medicinales como lo son los alcaloides que están representados por una gran diversidad de estructuras y núcleos; en ésta ocasión dicha familia hace su aparición con el grupo de los alcaloides isoquinoleínicos de núcleo tipo aporfínico presentes en la especie *Peumus boldus* mostrando una particularidad muy peculiar dado que farmacológicamente sólo hay una aporfina que forma parte de la composición de especialidades farmacéuticas, la boldina, objetivo principal de éste trabajo, a éste alcaloide se le atribuyen generalmente las propiedades del boldo y de sus preparaciones galénicas.¹²

Se decidió realizar extracción con un choque de polaridades y cambios bruscos de pH con el fin de precipitar dichos metabolitos dada su característica de poseer propiedades básicas y luego purificar con el empleo de solventes orgánicos de baja polaridad como el Eter Dietílico y cristalizando con solventes de polaridad elevada como el Metanol.

Por último se empleó TLC con el fin de comparar el crudo alcaloidal extraído contra un estándar secundario de Boldina facilitado por la empresa Naturcol, presentándose Rf's idénticos tanto en la muestra como en el estándar, sin embargo el crudo alcaloidal extraído mostraba la presencia de un elevado número de compuestos, posiblemente todos alcaloideos de acuerdo con el método utilizado para su obtención; por tal razón fue necesario emplear PTLC con el fin de raspar la franja del cromatograma que contenía la supuesta boldina de acuerdo con el Rf obtenido de la TLC.¹¹

Estudios posteriores de caracterización que realizará la empresa VITROFARMA S.A. apoyados en la utilización de diversas técnicas espectroscópicas demostrarán si efectivamente el compuesto aislado es efectivamente la Boldina.

INTRODUCCION

La historia de la química abunda en intentos de separar sustancias puras de los vegetales, en el siglo XVIII comenzó la identificación de los ingredientes activos individuales para utilizarlos como drogas aisladas y hoy en día se conocen varias miles de ellas. Estos productos químicos muestran propiedades muy diferentes a las de las hierbas de las que fueron originalmente extraídos.²

Los principales tipos de compuestos químicos a los que pertenecen la mayoría de los principios activos aislados de las plantas corresponden en primer lugar a los alcaloides, el estudio acerca de la composición química y en particular de los alcaloides en nuestra flora es aún insuficiente, debido entre otras causas a su abundancia en especies (alrededor de 7000) y su elevado porcentaje de endemismos.³

El CIC ha hecho énfasis en el resurgimiento del interés por la flora medicinal, ya que en la actualidad se ha direccionado este interés por las plantas medicinales hacia la elaboración de medicamentos, el CIC señala que en EEUU y en la mayor parte de la comunidad europea el 25% de los productos farmacéuticos contienen al menos un principio activo extraído de plantas medicinales.⁵

La especie *Peumus boldus* ha sido objeto de estudio en cuanto a la extracción de boldina, pero no hay una fuente de producción que permita la explotación de esta técnica con fines de exportación ya sea como materia prima o como posible medicamento estéril.¹⁷

1. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL

- Obtención de un extracto vegetal crudo a partir de las hojas de *Peumus boldus*, en fracciones que faciliten la obtención de un compuesto que reporte de acuerdo con la técnica cromatográfica TLC, un indicio de que el alcaloide boldina está presente en dicho extracto.
- Mediante una metodología dada realizar la extracción de alcaloides de la planta con el fin de emplear técnicas cromatográficas como CCD, CCP, FC que permitan la obtención de un compuesto que indique ser la boldina por medio de la TLC.

1.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Reconocimiento del grupo de alcaloides contenidos en el extracto vegetal etanólico de las hojas de *Peumus boldus*, mediante pruebas fitoquímicas preliminares.
- Encontrar el solvente o mezcla de solventes (eluyente) que mejor separe por cromatografía en capa fina los compuestos presentes en el crudo alcaloidal aislado de las hojas de *Peumus boldus*

- Separar, por cromatografía en capa fina, los compuestos contenidos en el crudo alcaloidal del extracto etanólico obtenido de las hojas de *Peumus boldus*.
- Empleando el mejor sistema eluyente encontrado, separar cuantitativamente por cromatografía preparativa, los compuestos presentes en el crudo alcaloidal aislado del extracto de hojas de *Peumus boldus*.
- Extraer los compuestos ubicados en la franja del cromatograma que reporte el Rf característico de la boldina cuando se empleó la CCP y la PTLC para identificación por TLC.

2. ANTECEDENTES

El 28 de mayo de 1979 el hasta entonces quincenario CARETAS comenzó a aparecer semanalmente como consecuencia de una gloriosa huelga de hambre, como diríamos si fuéramos más de izquierda. Resultó, en todo caso, un buen entrenamiento para ciertos rigores posteriores.

El boldo es lo indicado para las huelgas de hambre, por ser un buen antiácido. Boldo con azúcar era lo único que se había acordado ingerir en una primera junta realizada con cierto protocolo de izquierda al iniciar el encierro, porque la mayoría de los colegas participantes en la protesta eran camaradas más rojos que el antiguo logo de CARETAS.¹⁵

En un trabajo dedicado al boldo Dujardin-Beaumetz dice que es una monimiacea originaria de Chile y descrita por Molina en 1782 con el nombre de *Peumus boldus*. Ruíz y Pavón en 1794 ofrecieron también una descripción de la misma y la llamaron *Ruizia fragans*.

En 1807 Persoon la denominó *Peumus fragans*, y A.L. de Jussieu, apoyándose en estos trabajos, la bautizó como *Boldea fragans* en 1809. Tulasne conserva el nombre de boldea, y el *Prodromus* de M. de Candolle retoma el nombre de *Peumus* para el género.

En 1869, en su *Histoire des plantes*, H. Baillon presenta el estudio completo del boldo al que llama *Peumus boldus*. Dujardin dice también que la primera muestra de boldo fue introducida en el comercio francés en 1868 o 1869, por la casa Fabian (de Chile) con la finalidad de que se sometiera a un estudio farmacológico. Se refiere a lo que Bertero, Ruíz y Pavón afirmaron, es decir, que en Chile esta planta se usa como digestiva, carminativa y diaforética, y que Claude Gay da noticia de su uso popular contra las enfermedades del hígado.

Como sucede con la historia de muchas plantas, Dujardin refiere lo que contó Brenier de Montmorand, embajador francés en Chile, acerca de cómo se descubrieron las propiedades del boldo: En las posesiones de un tal Sr. Navarro, en las cordilleras, las ovejas morían en gran cantidad de una enfermedad del hígado. Un día reparó con ramas de boldo las vallas de su campo. Los animales las devoraron con avidez y la epidemia cesó enseguida". Dujardin fue uno de los que estudió en el laboratorio esta planta sin llegar a resultados concluyentes. En la actualidad las hojas del boldo (*Boldea fragans* Juss. o *Peumus boldus* Molina) se usan como hepatoprotectores (efecto de la boldina) y como coleréticas-colagogas (alcaloides sinergizados con los flavonoides y el aceite esencial).¹³

El doctor Bruce Cassel, de la Universidad de Chile, se refirió a algunas investigaciones sobre la química del boldo. Destacó que los primeros estudios chilenos se realizaron en la década de 1980 y demostraron que la corteza contiene concentraciones de boldina mucho mayores que las hojas (alrededor de 6% frente a 0,02-0,1%). Además de otros compuestos ya descritos en las hojas, estructuralmente cercanos a la boldina, estaban presentes dos alcaloides de tipos estructurales distintos: pronuciferina y sinoacutina.

A principios de la década de 1990, se postuló que la boldina debería ser un buen antioxidante, sabiendo que este alcaloide se puede extraer y purificar en grandes cantidades a partir de la corteza de boldo, se inició un programa de investigación que permitió demostrar claramente la hipótesis inicial y, de paso, proponer un mecanismo general que explicaría la actividad antioxidante de alcaloides cercanos estructuralmente a la boldina.

Adicionalmente, el estudio permitió descubrir la presencia de más alcaloides en las aguas madres de la boldina y sintetizar derivados de estos compuestos que demostraron tener actividades farmacológicas más interesantes que las de los productos naturales.¹⁷

Los araucanos se alimentaban de sus bayas y lo tomaban como infusión a modo de tónico, también lo utilizaban para mejorar problemas hepáticos, favorecer la digestión y para ayudar en la expulsión de gases. Desde que aquellos originarios americanos comenzaron a utilizar el boldo para usos medicinales han pasado muchos años, no obstante, los usos no han variado mucho y actualmente el boldo se sigue empleando para tratar afecciones relacionadas con el hígado, el estómago y como remedio para los cálculos biliares.

Las propiedades farmacológicas y sus muchas indicaciones deberían merecer más atención por parte de la comunidad científica ya que está claramente probada su acción hepatoprotectora, aperitiva, digestiva, colerética, colagoga, antiinflamatoria, funguicida y diurética. Además, en dosis elevadas es hipnótico, sedante y anestésico.

Por todo ello, podríamos decir que el boldo está especialmente indicado para tratar estreñimiento, colelitiasis, hepatitis, disquenesia hepatobiliar, dispepsias, cistitis e incluso migrañas relacionadas con disfunciones biliares.

Aunque la forma más habitual de uso es mediante infusión, también se pueden preparar cataplasmas (hojas cocidas envueltas en un paño), baños (cocción de hojas añadidas al agua del baño), vino (macerando hojas machacadas en alcohol de uva y vino blanco) o jugo (torsión de hojas frescas).

Pero, a pesar de sus magníficas propiedades debemos tener presente que está contraindicado si se padece obstrucción de las vías biliares y durante el embarazo y la lactancia. Además, al ser el boldo una planta "fuerte", no deberíamos abusar de ella ni sobrepasar las dosis recomendadas¹⁶

3. MARCO TEORICO

3.1 DESCRIPCION BOTANICA DE *Peumus boldus*



Figura N° 1. *Peumus boldus*

En 1782 el botánico Molina clasificó el boldo. El término "Peumus" le viene del nombre tradicional chileno. La palabra "boldo", está dedicada al botánico español D. Boldo.

FAMILIA: Nonimiáceas

PARTE MEDICINAL UTILIZADA: Las hojas

TIPO DE PLANTA: Arbusto perenne

ORIGEN: Chile

ALTURA: Hasta 6 metros

HOJAS: Opuestas, elípticas, ovaladas, coriáceas, toscas, algo pecioladas. Son de color gris verdoso y muy aromáticas.

FLORES: De color blanquecinas, dioicas y agrupadas en corimbos, insertados en las axilas de las hojas y en el extremo de las ramas, florecen en invierno o primavera.

FRUTOS: Drupa de color negruzco de pequeñas dimensiones.

HABITAT: Aunque originario de Chile se cultiva extensamente en las zonas áridas y cálidas de África del Norte.

El boldo es un arbusto de hoja perenne que crece en las secas y soleadas laderas de las regiones centrales de Chile, este país exporta más de 1000 toneladas de hojas de boldo al año, las hojas de boldo son de forma elíptica, cortamente pecioladas, con los bordes del limbo levemente enrollados, su cara superior muestra numerosas prominencias apreciables a simple vista, formadas por pelos tectores agrupados formando manojos, desecadas, constituyen la droga conocida con el nombre de boldo, se utilizan también las cortezas para la extracción del principio activo, el alcaloide boldina.

El boldo contiene aceite esencial rico en hidrocarburos monoterpénicos: p-cimeno, a-pineno, y monoterpenos oxigenados: ascaridol, cineol o eucaliptol, linalol; alcaloides isoquinoleínicos tipo aporfina (0,25-0,5%): principalmente boldina, acompañado de isoboldina, isocoridina, norisocoridina; contiene además flavonoides, cumarinas y resina.¹²

3.2 PROPIEDADES MEDICINALES DEL BOLDO

El boldo está considerado como un estimulante digestivo, colerético y colagogo (ref. la alcachofa para las consideraciones generales sobre este tipo de actividad). ¿Es la boldina su principio activo?, se ha demostrado que los alcaloides totales son más activos, pero que el extracto alcaloídico purificado (que contiene alcaloides y flavonoides) lo es todavía más. A dosis elevadas se manifiesta cierta toxicidad, que es mucho menos pronunciada con los extractos purificados.

Las hojas de boldo poseen propiedades coleréticas, colagogas y diuréticas (no se sabe exactamente si es un verdadero diurético o simplemente un acuarético), los alcaloides que contiene son estimulantes de la producción de jugos gástricos y de bilis; lo que facilita la digestión, esto es debido principalmente a la boldina, presenta también actividad como estimulante hepático, sedante, demulcente urinario suave y antiséptico. Se ha utilizado en cálculos biliares, disfunciones hepáticas o de la vesícula biliar, en cistitis y en colelitiasis.

Se han efectuado ensayos en animal de experimentación que demuestran la actividad colerética y laxante en ratas; un aumento de la secreción gástrica en perros; efecto protector hepático frente a algún agente hepatotóxico en ratón, etc.

Otros estudios también en animal han mostrado que algunos componentes del boldo relajan el músculo liso y prolongan el tránsito intestinal.

En rata se ha observado un efecto hipotensor y depresor de la actividad miocárdica. La mayor parte de las investigaciones publicadas en la literatura científica se refieren a la boldina, principal componente de las hojas y cortezas de boldo, habiéndose llevado a cabo muy pocos trabajos con los extractos de la droga. De estos últimos destacamos que la administración de extracto seco de boldo prolonga el tiempo del tránsito orocecal en sujetos normales, lo que podría explicar su empleo. La boldina es un eficaz agente antioxidante y hepatoprotector ya que su toxicidad es muy baja.

Se ha comprobado que origina una potente inhibición de la peroxidación en microsomas hepáticos humanos y carece de efecto sobre la actividad del citocromo P450 humano. Asimismo, se ha demostrado, en preparaciones frénico-diafragma de ratón, que la boldina produce un bloqueo en la transmisión neuromuscular y este efecto puede ser debido a una interacción directa con el receptor postsináptico nicotínico.

En cualquier caso, parece ser que el efecto del boldo sobre el flujo biliar no se debe sólo a los alcaloides sino que existe un efecto sinérgico entre los diversos compuestos activos de la droga; diversos ensayos de toxicidad tanto in vivo como in Vitro parecen indicar que la droga carece de toxicidad. Se emplean en terapéutica asociaciones de boldo con otras drogas con actividad laxante como cáscara sagrada o ruibarbo, o con colagogos como la alcachofa y amargos como genciana, en problemas de pérdida de apetito, digestiones difíciles, estreñimiento, etc.⁷

Se utiliza, debido al aceite esencial que contiene (4-terpineol - principio irritante y diurético), en los trastornos gastrointestinales, los dolores abdominales con flatulencia y los trastornos urinarios. El boldo ha demostrado su eficacia especialmente en los síntomas relacionados con el estreñimiento, por lo que se usa como coadyuvante en dichos casos.

La “Comisión E” alemana indica el boldo en el tratamiento de dispepsias así como en espasmos del tracto gastrointestinal; destaca que el aceite esencial de las hojas contiene ascaridol, tóxico, por lo cual no se aconseja el empleo del aceite esencial de boldo. Por tanto, a falta de ensayos de toxicidad crónica, se aconseja no administrar durante el embarazo. no debe emplearse en casos de obstrucción biliar o trastornos hepáticos graves. En litiasis únicamente bajo prescripción facultativa, se emplea por vía oral y durante períodos de no más de cuatro semanas.

La Farmacopea Española exige un contenido en aceite esencial para la droga entera de entre el 2% y el 4% y para la droga fragmentada un mínimo del 1,5%. Además debe contener como mínimo un 0,1% de alcaloides totales expresados como boldina, calculados con referencia a la droga anhidra.

Si se administra en forma de inyección hipodérmica, la boldina (un alcaloide existente en un 0,25%) paraliza los nervios sensoriales y motores, incrementando la frecuencia respiratoria y la emisión de orina. En dosis elevadas puede causar convulsiones y hasta la muerte debido a la parada del centro respiratorio.⁸

La hoja de boldo aumenta la secreción de saliva en personas que padecen sequedad en la boca. Todos los constituyentes se potencian entre ellos. Por este motivo, es conveniente utilizar el polvo total de la hoja, solamente de esta manera se consigue respetar la integridad del aceite esencial y obtener un óptimo resultado; muchos médicos y profesionales de salud conocen perfectamente lo ligada que está la planta del boldo con las afecciones hepáticas, el efecto colerético puede hacer duplicar el flujo de la bilis, por lo que se utiliza en las alteraciones digestivas debidas a un mal funcionamiento del hígado.¹⁴

3.3 INDICACIONES TERAPEUTICAS:

- Estimulante de la secreción biliar
- Insuficiencia hepática
- Sequedad de boca
- Digestión difícil, pesadez

3.4 GENERALIDADES SOBRE ALCALOIDES

La propiedad química más característica de los alcaloides es su basicidad, por lo que los métodos para aislarlos, purificarlos e identificarlos por lo general aprovechan su basicidad. Aunque muchos alcaloides pueden extraerse con disolventes neutros como alcoholes y cloroformo, es frecuente extraerlos con soluciones de ácidos en agua, con lo cual se separan los alcaloides y sus sales.

Atendiendo a su solubilidad, propiedad empleada para extraerlos y purificarlos, los alcaloides se pueden clasificar en cuatro grupos:

- Aminas primarias, secundarias y terciarias
- Alcaloides de amonio cuaternario
- Óxidos de aminas
- Alcaloides fenólicos⁹

3.5 ALCALOIDES PRESENTES EN *Peumus boldus*

Un gran número de alcaloides isoquinolécicos (se conocen más de 450 estructuras), que comprenden las pro-aporfinas, las aporfinas y los derivados de éstas últimas, los aporfinoides, son frecuentes en ciertas familias: Annonaceas, Lauraceas, Magnoliaceas, **Monimiaceas**, Menispermaceas, Papaveraceas, Ranunculaceas, etc.

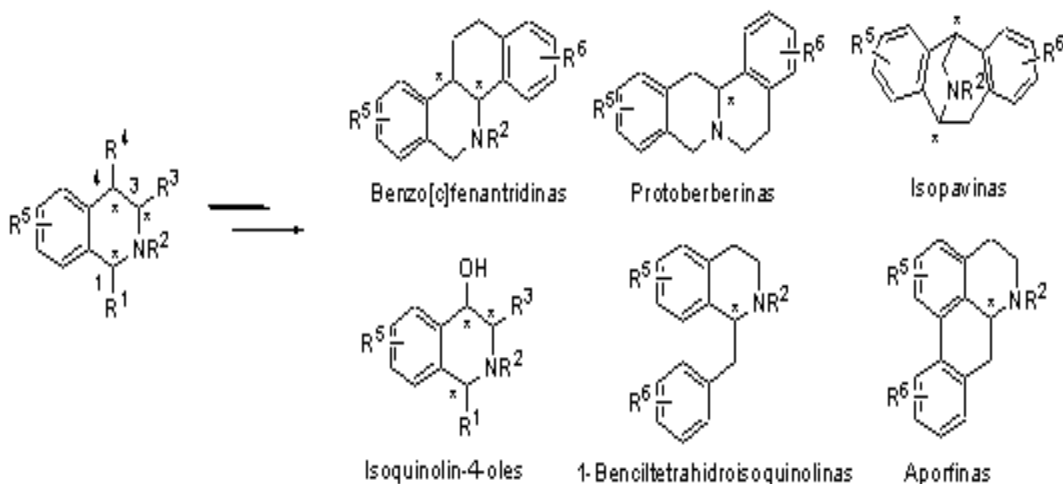


Figura N° 2. Núcleo de los alcaloides presentes en *Peumus boldus*

Las aporfinas (N-metiladas) y las nor-aporfinas, siempre se encuentran sustituidas en las posiciones 1 y 2, por hidroxilos, metoxilos o un metilendioxilo; a menudo llevan sustituyentes en 9,10 y/o 11 y mas raramente en posición 8 y 3.

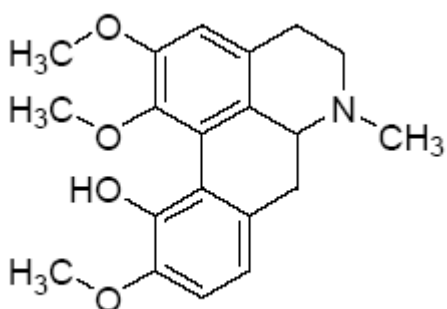


Figura N° 3. Isoboldina

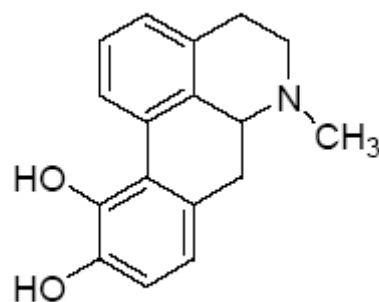


Figura N° 4. Apomorfin

Farmacológicamente sólo hay una aporfina que forma parte de la composición de especialidades farmacéuticas: la boldina, que pertenece al grupo de los alcaloides isoquinolólicos derivados del metabolismo de la fenilalanina y la feniltirosina; a este alcaloide se le atribuyen, generalmente, las propiedades del boldo y de sus preparaciones galénicas.¹

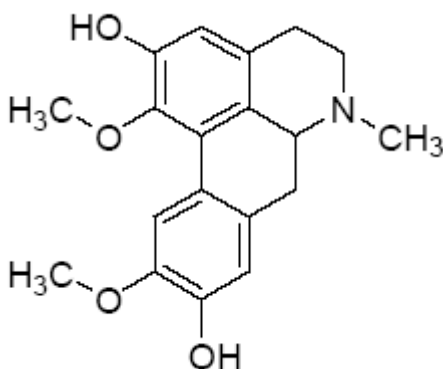


Figura N° 5. la boldina

3.6 PRUEBAS FITOQUIMICAS PRELIMINARES PARA ALCALOIDES

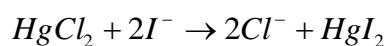
3.6.1 REACTIVOS DE IDENTIFICACION

En el análisis fitoquímico preliminar de los alcaloides se emplean reactivos de precipitación, los reactivos para detectar alcaloides deben manejarse con gran cuidado, porque pueden ocurrir resultados positivos o negativos falsos ya que algunas proteínas dan resultados positivos para alcaloides, aunque muchos aminoácidos no reaccionan. Debido a la gran heterogeneidad de los alcaloides aparecen numerosas reacciones coloridas o de precipitación que sólo son positivas con cierto grupo de alcaloides, aunque no son suficientes para una identificación definitiva. Estos reactivos son:

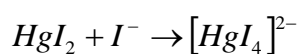
- Reactivo de Dragendorff.
- Reactivo de Wagner
- Reactivo de Mayer
- Reineckato de Amonio

Las reacciones de reconocimiento de los alcaloides se basan en los siguientes comportamientos:

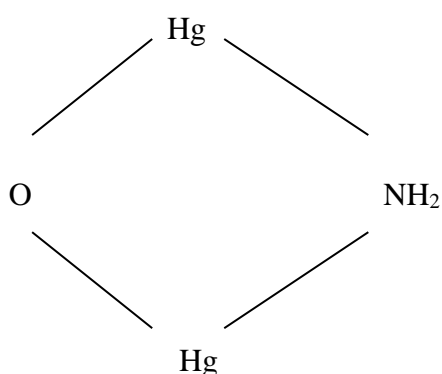
El yoduro potásico cuando reacciona con cloruro mercuríco, forma un precipitado rojo de yodo mercuríco.



Soluble en exceso de iones de yoduro con formación de un anión complejo incoloro:



La solución alcalina de este complejo sirve para descubrir indicios de amoníaco. En esta reacción se forma el compuesto de color pardo.



Oxioduro mercuriamónico, que es soluble en exceso de complejo $[\text{HgI}_4]^{2-}$ alcalino generando intenso color amarillo

Los alcaloides por su carácter nitrogenado pueden comportarse de forma similar al amoníaco, ante estos reactivos muchos alcaloides forman con el bismuto, yoduros dobles insolubles, de forma general $BiI_3 \cdot B.HI$ en la cual B representa la base alcaloidal.⁹

3.7 CROMATOGRAFIA EN LA SEPARACION DE COMPUESTOS

3.7.1 CROMATOGRAFIA EN CAPA DELGADA O CAPA FINA

Para la cromatografía en capa fina (TLC), la fase estacionaria es una capa de partículas de unos milímetros de espesor, fijadas sobre un soporte sólido generalmente de aluminio, plástico o vidrio. Después de aplicar el analito cerca de la parte inferior de la placa seca, el disolvente empieza a producir la separación.

La ventaja principal de la TLC es que se analizan simultáneamente la muestra y el patrón, mientras que en la cromatografía en columna las muestras se analizan individualmente.

Además, las muestras que son difíciles de separar, se pueden resolver utilizando dos disolventes diferentes por desarrollo de la placa en direcciones perpendiculares.

Otra ventaja es que, si los componentes no se pierden en los vapores que rodean la placa, todos estarán en algún lugar de la misma, mientras que en la cromatografía en columna algunos componentes no eluyen y se pierden. Y a esto se suma que la placa de TLC se usa una sola vez, por lo que se pueden utilizar condiciones severas de separación.

La mancha en una placa de TLC se caracteriza por la distancia que recorre con relación a la distancia recorrida por la fase móvil.

El grado de retención en cromatografía plana de superficie se expresa como el factor de retardación, o índice de retención R_f .

$$R_f = \frac{\text{distancia de desplazamiento del soluto}}{\text{distancia de desplazamiento del disolvente}}$$

El frente del disolvente es el límite alcanzado por la fase móvil, en éste se mide la distancia en que se ha desplazado éste. El valor de R_f depende de las mismas condiciones experimentales que el valor de K de la cromatografía en columna: la composición de la fase móvil, el tipo de fase estacionaria, la temperatura y el tipo de compuestos separados.

3.7.2 CROMATOGRAFIA EN COLUMNA

Todas las cromatografías denominadas en columna se caracterizan por tener una fase estacionaria que se encuentra dentro de una columna de vidrio de 5 a 30 mm de diámetro por la que se hace pasar una fase móvil líquida o gaseosa que estará en permanente movimiento. Según la afinidad de las moléculas por la fase móvil o la estacionaria, éstas se separaran. Después de cada cromatografía podremos sacar información del cromatograma tanto cualitativa (para identificar los distintos compuestos de la mezcla) como cuantitativa (para poder obtener la cantidad y composición de las sustancias separadas).

Las fases estacionarias pueden ser de materiales muy distintos, existen derivados de dextranos (sefadex), derivados de agarosa, poliacrilamida, esferas de vidrio, sílice, etc.

A medida que los componentes de la mezcla se van separando, se van formando bandas móviles (o zonas), donde cada una de las bandas tiene un sólo componente. Si la columna es suficientemente larga y los otros parámetros (diámetro de columna, adsorbente, disolvente y velocidad de flujo) se escogen adecuadamente, las bandas se separan una de la otra, dejando bandas libres o de puro eluyente entre ellas.

A medida que cada banda (de soluto y disolvente) van pasando por la parte inferior de la columna, se van recogiendo en distintos frascos, de manera que se separan los distintos componentes de la mezcla de una manera muy efectiva.

3.7.3 CROMATOGRAFIA PREPARATIVA

La fase estacionaria para la cromatografía preparativa en capa está constituida por placas de un espesor mayor que las utilizadas en el trabajo analítico, oscilan entre 50 μ (0.5 mm) y 2000 μ (2.0 mm).

El poder de resolución de estas placas es menor que el de las placas analíticas, pero, en cambio, se considera que la cromatografía preparativa en placa ofrece algunas ventajas sobre la cromatografía preparativa en columna, debido a que en la placa hay mayor reproducibilidad de las condiciones, las separaciones son más nítidas porque el tamaño de las partículas de los sorbentes es menor y las bandas pueden eluirse más rápidamente.

Las placas para la cromatografía preparativa se consiguen en el comercio o pueden elaborarse en el laboratorio con sorbentes especiales para este fin. Con los sorbentes especiales para este fin como la sílica gel 60 GF-254. Con los sorbentes utilizados en la cromatografía analítica se obtiene placas muy delicadas para manejarlas, si el sorbente empleado no tiene adhesivo, o agrietadas o con escamas si el sorbente contiene adhesivo.

Touchstone ha determinado en 100 mg la cantidad máxima de muestra que puede aplicarse en una placa de sílica gel de 20 x 20 cm y 100 μ m de espesor. La cantidad es menor cuando se trata de placas de celulosa o alúmina. En la práctica, es conveniente no sembrar cantidades mayores a 50 mg.

En la aplicación de la muestra es conveniente tener en cuenta que no se debe emplear todo el ancho de la placa porque en los bordes la fase móvil tiende a migrar más rápidamente, con lo cual se producen bandas cóncavas no deseables en la separación. Se sugiere dejar un margen de por lo menos 0,25 cm, tanto a la izquierda como a la derecha de la placa.

Para obtener los compuestos separados en una placa preparativa se puede proceder de varias maneras. La más usada es raspar con una espátula la zona que contiene cada compuesto, transferir a un tubo pequeño; luego, efectuar dos o más extracciones con un solvente polar, agitando y centrifugando cada vez, pipetear cuidadosamente el sobrenadante y evaporar el solvente; también puede usarse colectores especiales para este fin que evitan la pérdida de compuestos.⁶

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1 MATERIAL VEGETAL

La especie vegetal *Peumus boldus* se seleccionó atendiendo a criterios muy acertados como lo son:

- Fácil extracción de los principios activos comercializables.
- El interés medicinal de la planta, conocido por tradición.
- El interés en estudiar especies que contengan un metabolito en particular como los alcaloides aporfínicos presentes en esta planta según los antecedentes reportados por los trabajos realizados.

La parte del material vegetal empleado para este trabajo fueron las hojas de *Peumus boldus*; la cantidad de material recolectada para este trabajo fue de 25 Kg de Boldo importado de Chile para Bogotá y luego traído para Armenia, trabajándose con la mitad, es decir con 12.5 Kg del producto ya que los recursos disponibles para este trabajo no avalaban el uso de toda la planta.

4.2 SECADO

El secado del material vegetal se realizó primero en exposición al medio ambiente y luego en un horno adecuado para tal proceso con unas condiciones de temperatura que no sobrepasaron los 40°C recomendados para evitar la degradación de los metabolitos y conservar la integridad de las hojas.

4.3 MOLIENDA

Luego de haber sido secado el material vegetal se presentó un arduo trabajo ya que el molino de cuchillas tipo Wiley recomendado para este tipo de labor se encontraba descompuesto y lo que se hizo fue utilizar un molino corona tipo casero pero con el cual se pudo obtener el material vegetal pulverizado.

4.4 TAMIZADO

Las partículas pulverizadas obtenidas con este molino tienen un tamaño de partícula diferente, por lo cual fue necesario el empleo de un aparato conocido en el ambiente químico uniuquindiano como un tamizador, el cual contiene cuatro platos con mallas de distinto tamaño ubicadas en orden ascendente (200, 400, 600 y 800 mesh) que permitieron cernir el material con el fin de comparar el rendimiento de obtención de extracto de acuerdo con el tamaño de partícula.

4.5 DESENGRASE

Dos Kilogramos de material vegetal molido y seco fueron objeto de una extracción sólido – líquido tipo Soxhlet denominada desengrase, llevada a cabo durante 24 horas para cada 200 g, capacidad máxima del extractor, para tal proceso se empleó éter de petróleo, solvente que por ser de baja polaridad nos permitió aislar el extracto que se pretende analizar, de sustancias lipídicas que interferirán en el análisis, ya que éstas poseen polaridad semejante al solvente extractor.

Este procedimiento se hizo con el fin de obtener una muestra testigo del material, para analizar los compuestos allí presentes, ya que existía la posibilidad de encontrar alcaloides como bases libres, una forma difícil de encontrar este grupo de compuestos en las plantas, pero como estos son el principal objeto de estudio de éste trabajo no se podía descartar dicho extracto.

4.6 OBTENCION DEL EXTRACTO CRUDO

En todo trabajo de investigación sobre productos naturales es preciso extraer cuidadosamente los componentes del vegetal en estudio para en seguida aislar y purificar los compuestos presentes en los extractos obtenidos.

El proceso de extracción implica el tratamiento de la sustancia bruta con un disolvente apropiado que en caso ideal disuelva sólo el constituyente deseado, permaneciendo sin disolver las demás sustancias. En la práctica se obtiene una mezcla de compuestos solubles en el disolvente empleado y otras arrastradas por co-solubilidad. Este extracto separado del residuo sólido (p.ej.: restos de planta) es filtrado y el disolvente evaporado a presión reducida en un evaporador rotatorio. Al residuo semisólido o aceitoso se lo conoce como extracto crudo. (2)

4.6.1 SELECCION DEL SOLVENTE

Generalmente se estudian compuestos de polaridad media y rara vez metabolitos solubles en agua. Se debe tener mucha precaución con la selección del disolvente de extracción, éste debe disolver los metabolitos de interés, ser fácil de eliminar, no reaccionar con la muestra, no debe ser muy tóxico, ni fácilmente inflamable. Deben ser destilados antes de ser usados ya que algunos pueden contener plastificantes derivados de los envases y tapas de almacenamiento.

Los disolventes empleados con mayor frecuencia son: hexano y éter de petróleo para separar los componentes de menor polaridad; cloroformo, diclorometano y benceno para separar los componentes de polaridad intermedia; acetato de etilo y acetona para los de polaridad mayor y etanol, metanol y agua para los más polares.

El solvente empleado en la obtención del extracto fue Etanol industrial al 96 % v/v. La destilación por arrastre con vapor de agua es ampliamente utilizada para obtener terpenos volátiles o aceites esenciales, sin embargo se ha observado que una caída de pH, a veces hasta 2, se produce cuando se rompen las vacuolas y se producen reacciones no deseadas en compuestos sensibles de este grupo.

El material vegetal que fue objeto de la extracción tipo soxhlet fue secado en horno a 40°C y luego se llevó a cabo un proceso percolación con etanol del 96 % para obtener una muestra de análisis para realizar las diversas pruebas fitoquímicas preliminares con la ayuda de los reactivos de reconocimiento mencionados en el marco teórico.

4.7 CONDICIONES DE LA EXTRACCION

4.7.1 ELECCION DE LA TECNICA

Las técnicas de extracción mas comunes utilizadas en el estudio de las plantas son: maceración, decocción, percolación, extracción ácido – base y extracción continua en Soxhlet, para este trabajo en este caso se escogió la percolación ya que se disponía de un percolador de capacidad para 2 Kg, además resulta que es más efectivo que la lixiviación ya que por la no recirculación del solvente hay un mayor poder de extracción.

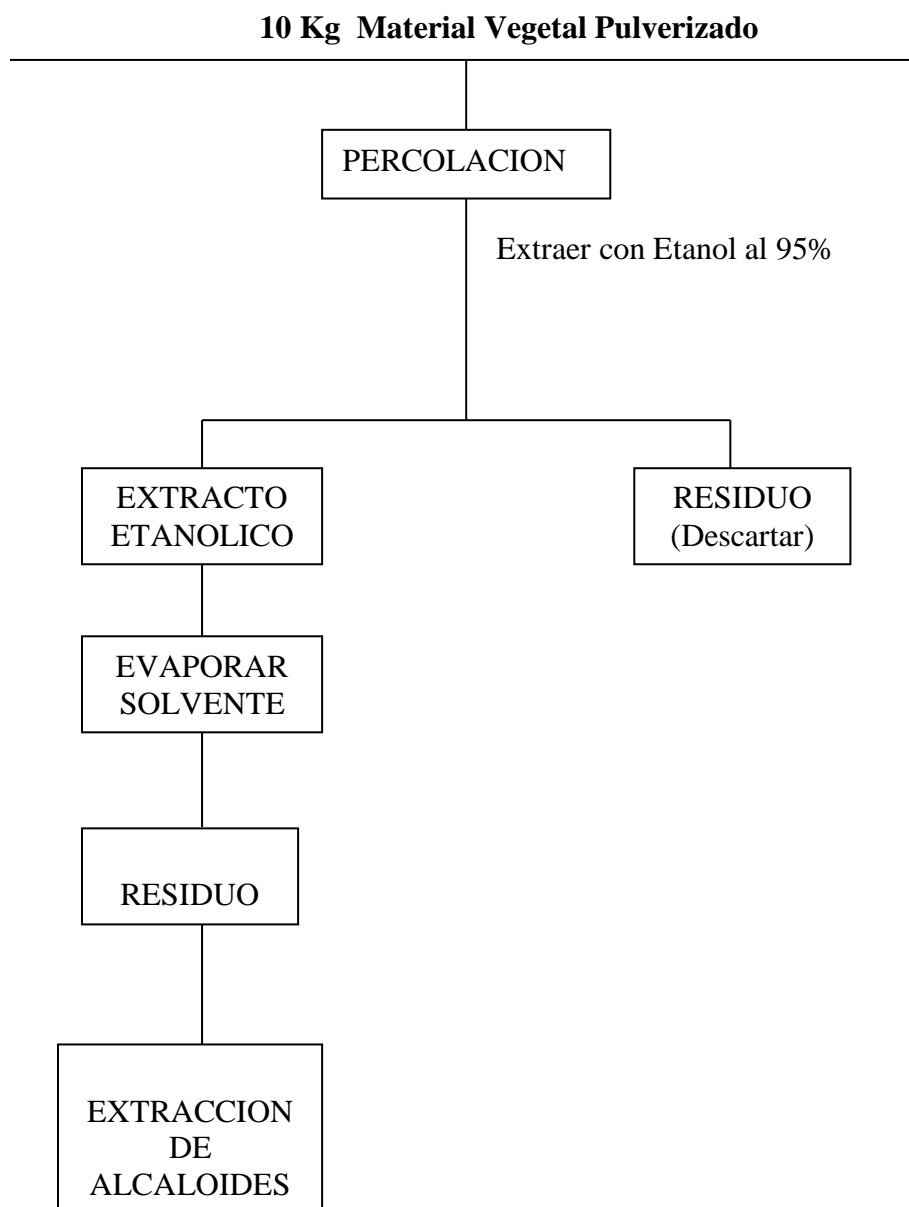
4.7.2 ELECCION DE LA PROPORCION MATERIAL VEGETAL – SOLVENTE

La proporción que se plantea en la mayoría de las literaturas es de 10 mL por cada g de material vegetal, en otras la proporción indicada es 1 a 8, pero como en este caso se emplearon 10.5 Kg, dado que para el desengrase se emplearon 2 Kg, el costo del solvente para ésta proporción era muy elevado por lo cual se realizó una interpolación entre estas dos proporciones y se eligió una proporción de 4 L por cada Kg de material vegetal.

4.7.3 ELECCIÓN DEL TAMAÑO DE PARTICULA DEL VEGETAL PULVERIZADO

Se tomaron 250 g de cada tamaño de partícula y se les realizó el proceso de percolación, obteniéndose 1 L de extracto etanólico de cada uno de los tamaños, después se colocó uno por uno los extractos en un rotavapor hasta llevarlos a sequedad y se comparó de acuerdo con el peso en base seca de cada uno, eligiéndose como el tamaño adecuado el N° 2 de 400 mesh.

4.7.4 OBTENCION DEL EXTRACTO ETANOLICO TOTAL

Diagrama N° 1. Obtención del extracto etanólico total para extracción de alcaloides.⁶

4.8 ANALISIS PRELIMINAR DE ALCALOIDES

Antes de emplear cualquier metodología de extracción para alcaloides, se debe confirmar la presencia de éstos en el extracto obtenido, para así ya comenzar con la extracción y el aislamiento de los alcaloides, enfocándonos en la boldina

4.8.1 PREPARACIÓN DEL EXTRACTO PARA PRUEBAS QUÍMICAS

Las pruebas químicas preliminares con los reactivos de identificación para alcaloides mencionados en el marco teórico, se hicieron con el extracto diluido debido a que su color, sobretodo cuando se trabaja con la parte aérea, dificulta la evaluación de los resultados por ser éstos de coloración y de precipitación, además se deben controlar los resultados repitiendo las pruebas químicas al extracto sin clorofila.

4.8.2 SEPARACIÓN DE CLOROFILAS

Para separar clorofilas del extracto sin concentrar, se agregó carbón activado, se calentó en baño de maría y se filtró al vacío, la temperatura del baño no sobrepasó los 40°C para evitar la degradación del material.

4.8.3 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO SECO

Una vez obtenido el extracto etanólico total o extracto crudo, se llevó a un evaporador de capa fina, facilitado por las instalaciones de planta piloto de la Universidad del Quindío, donde se llevó a cabo el proceso de secado del extracto, el peso total del extracto seco fue de 1.82 Kg.

4.8.4 ELECCION DE LA METODOLOGIA DE EXTRACCION

Se disponía de 4 metodologías de extracción general para el grupo de los alcaloides, ya que hasta el momento no había sido posible encontrar una metodología específica que nos permitiera aislar la boldina, entonces lo que se planeó fue que se realizara una extracción general para los alcaloides, y luego por cromatografía en columna, separar los distintos alcaloides después claro está de buscar el o la mezcla de eluentes que mejor nos separará la mezcla de alcaloides, y luego de recolectar las fracciones emplear la PTLC para purificar los alcaloides extraídos en cada fracción.

Fue necesario tomar cantidades representativas de extracto seco (50 g por cada metodología), cada una por triplicado, esto se realizó con el fin de elegir aquella que nos representara mejores resultados en cuanto a rendimiento y presencia del alcaloide de interés.

A continuación se describirá cada metodología y se presentará su respectivo diagrama de flujo:

- METODOLOGÍA N° 1.

En esta extracción de alcaloides el extracto etanólico es concentrado a consistencia blanda y luego tratado con Na_2CO_3 al 20 % con el fin de liberar los alcaloides en forma de base, luego se extraen con diclorometano para liberar éstas bases, más adelante se hidrolizan éstas bases con HCl al 5 % con el fin de formar las sales alcaloidales y finalmente es objeto nuevamente de una extracción con diclorometano.

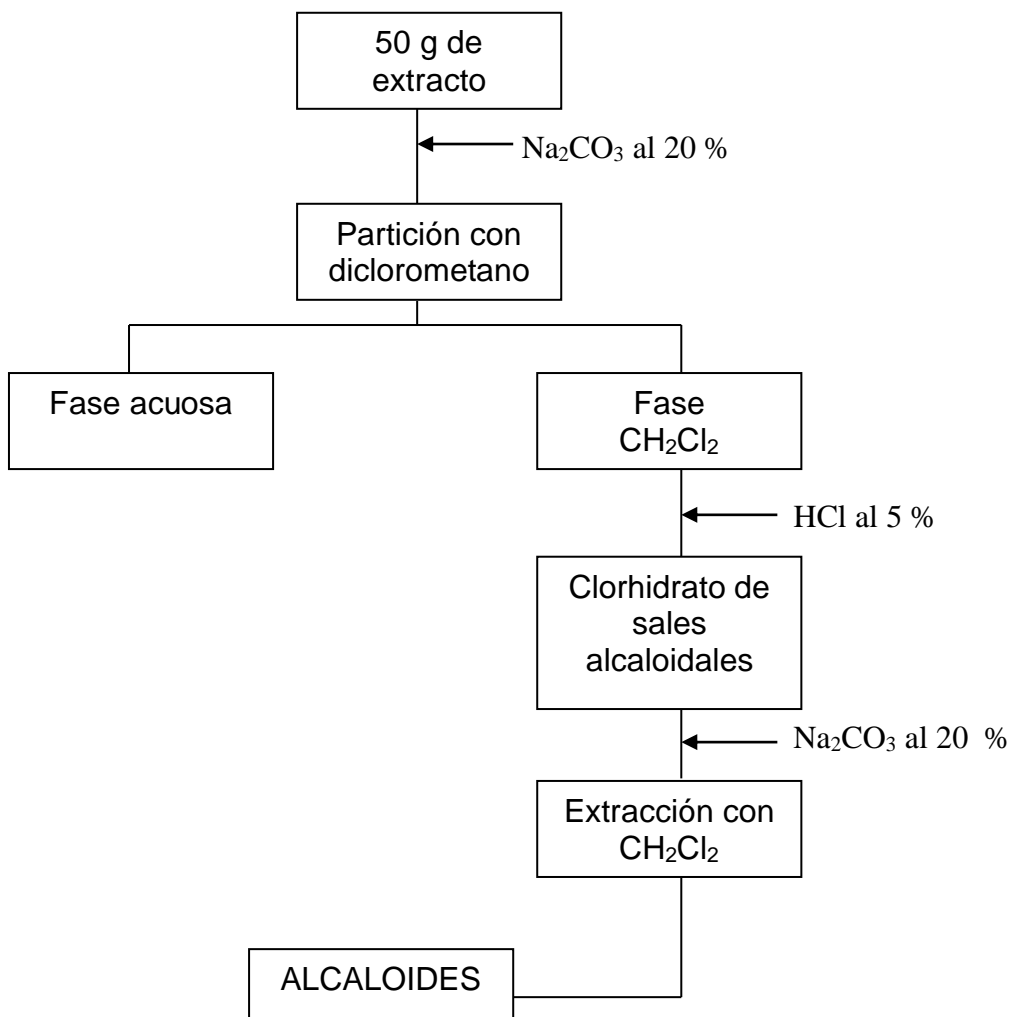


Diagrama N° 2. Metodología general para extracción de alcaloides²

▪ METODOLOGÍA N° 2.

Se trata de la misma forma que la anterior pero en vez de diclorometano se utiliza cloroformo como solvente extractor.

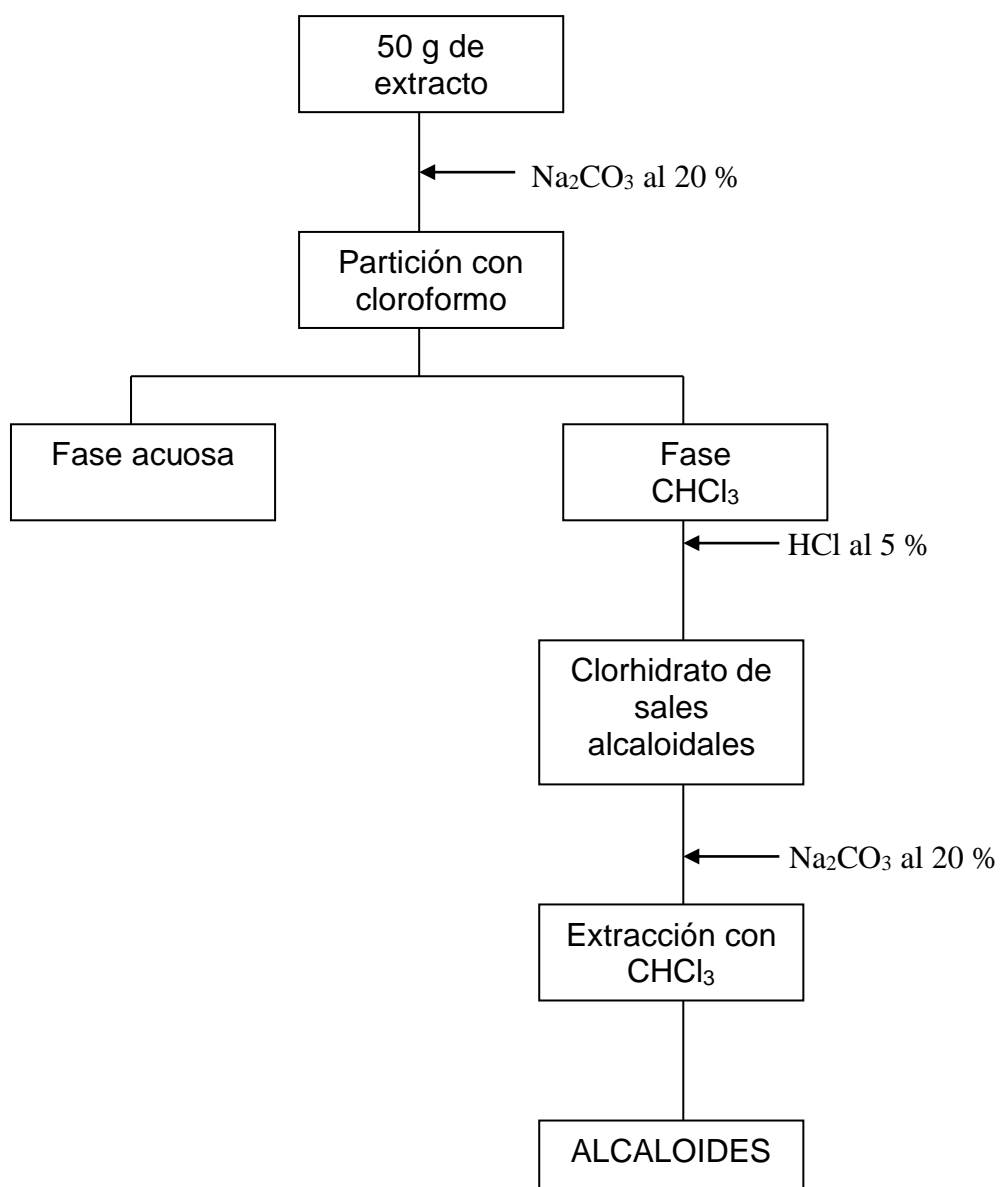


Diagrama N° 3. Metodología general para extracción de alcaloides²

- METODOLOGÍA N° 3.

En esta metodología en vez de acidificar con HCl se trata el extracto con H_2SO_4 al 5%, y se neutraliza con $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ al 5% para su posterior extracción con Diclorometano.

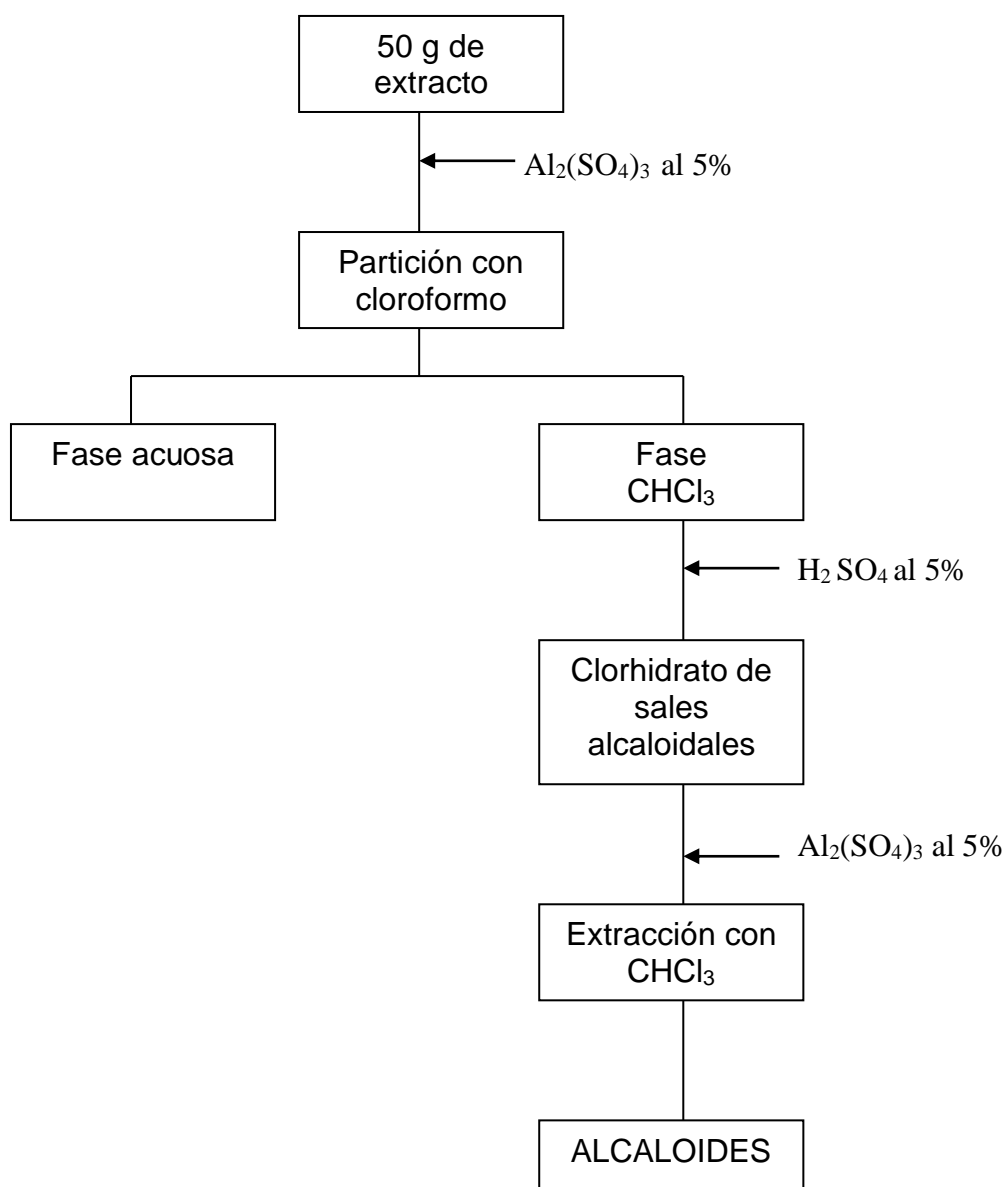


Diagrama N° 4. Metodología general para extracción de alcaloides²

- METODOLOGÍA N° 4.

En esta metodología en vez de acidificar con HCl se trata el extracto con H_2SO_4 al 5%, y se neutraliza con $Al_2(SO_4)_3$ al 5% para su posterior extracción con cloroformo.

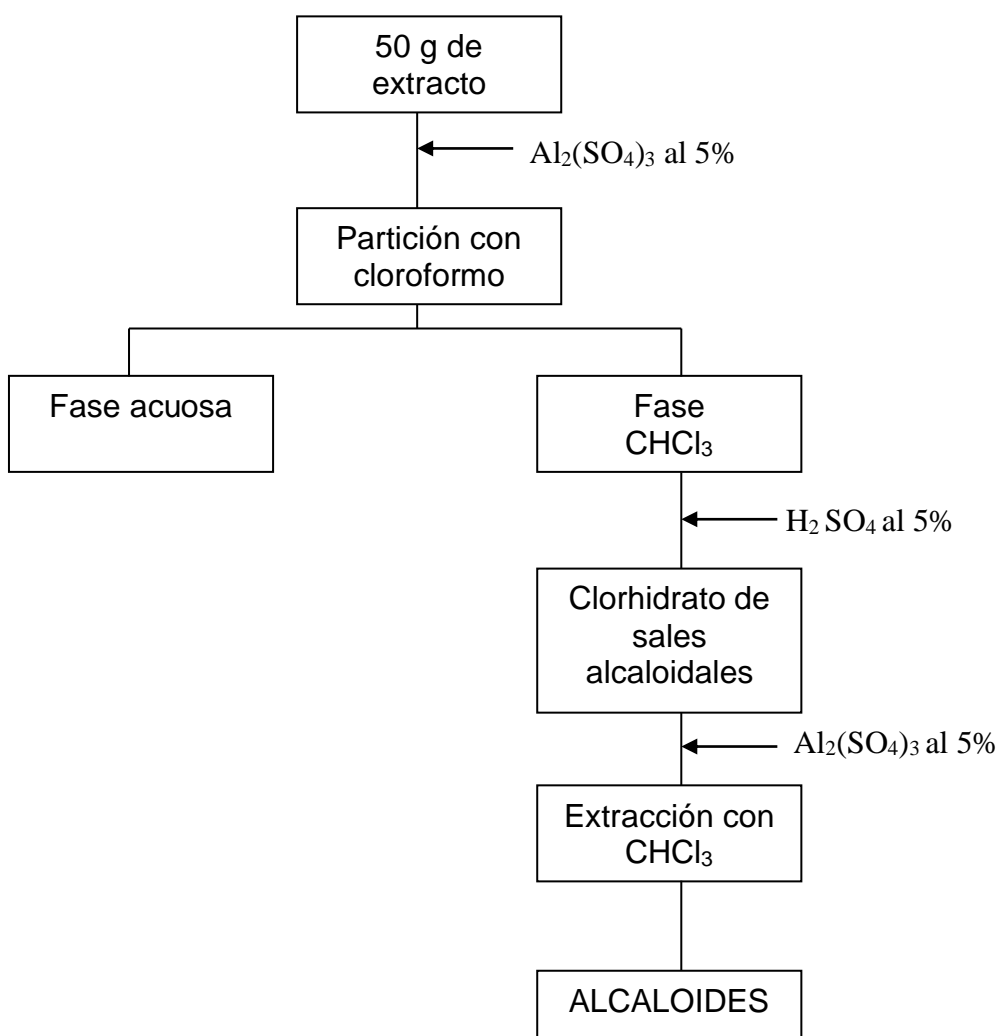


Diagrama N° 5. Metodología general para extracción de alcaloides²

4.9 OBTENCION DEL CRUDO ALCALOIDAL

Una vez escogida la metodología de extracción, que en este caso fue la N° 1, se procedió con la realización de los cálculos para el tratamiento de 1,82 Kg de extracto seco con los solventes empleados en dicha metodología, posteriormente como no se contaba con un recipiente de vidrio que tuviese la capacidad de almacenar las fases, se consiguió un recipiente para agua purificada de capacidad de 20 L, improvisando un embudo de decantación y allí se realizó la operación; después se extrajo la fase orgánica y se concentró tal fase en un rotavapor, donde se obtuvo un crudo alcaloidal representado en 6,2 g.

4.10 IDENTIFICACION DE ALCALOIDES POR CCD.

Una vez obtenido el crudo alcaloidal el paso siguiente consistió en realizar CCD a tal crudo utilizando un sistema eluyente empleado para un estándar donado por el laboratorio Naturcol en donde la muestra (crudo alcaloidal) presentaba un Rf cercano al Rf de la placa enviada por dicho laboratorio.

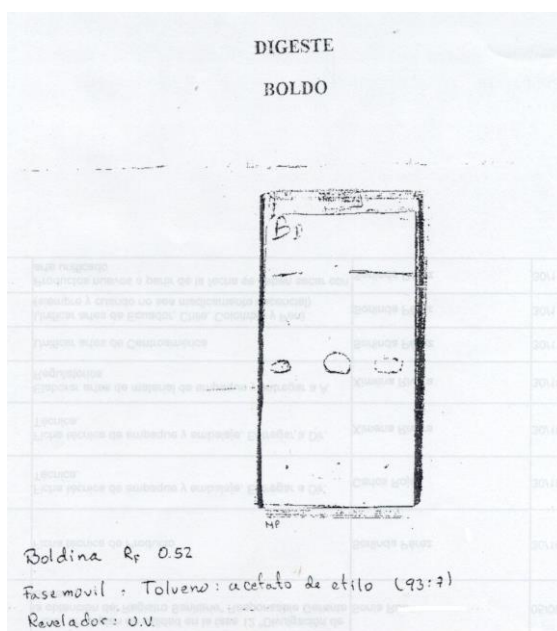


Figura N° 6. CCD de un estándar de boldina de Naturcol



Figura N° 7. CCD del crudo alcaloidal con un Rf de 0.5 bajo el sistema eluyente de tolueno - acetato de etilo (93:7)

Una de las aplicaciones de la cromatografía en capa delgada es establecer algunos parámetros para la cromatografía en columna, gracias a la rapidez, escaso consumo de eluyentes y eficiencia en las separaciones obtenidas en cromatografía en capa delgada.

En muchos casos puede pasarse directamente del método cromatográfico en capa delgada al de columna; por ejemplo, en la separación de alcaloides isoquinoleícos, los cuales resultan ser los extraídos en este trabajo, es conveniente porque se logra mayor estabilidad de éstas. Sin embargo, la mayoría de las veces se tienen en cuenta los resultados de la cromatografía en capa delgada para predecir el comportamiento en columna, de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$r = \frac{Rf_a}{Rf_b + 0.1 Rf_a} > 1$$

En donde R_{f_a} es el valor de R_f de la sustancia que migra más, y R_{f_b} el valor de R_f de la sustancia que migra menos.

Si r es mayor que 1, puede esperarse que las dos sustancias se separen en columna cuando se emplea el mismo sistema cromatográfico usado en la capa delgada. Pero si r es menor que 1 no se logra la separación en la columna, produciéndose superposición de las dos sustancias en el eluido.⁶

De acuerdo con las premisas expuesta anteriormente, después de numerosos ensayos se encontró que la mezcla de cloroformo – acetato de etilo era la mezcla que mejor separaba las manchas de los compuestos presentes en el crudo alcaloidal, dado que después de hechos los cálculos el valor de r era mayor a 1.

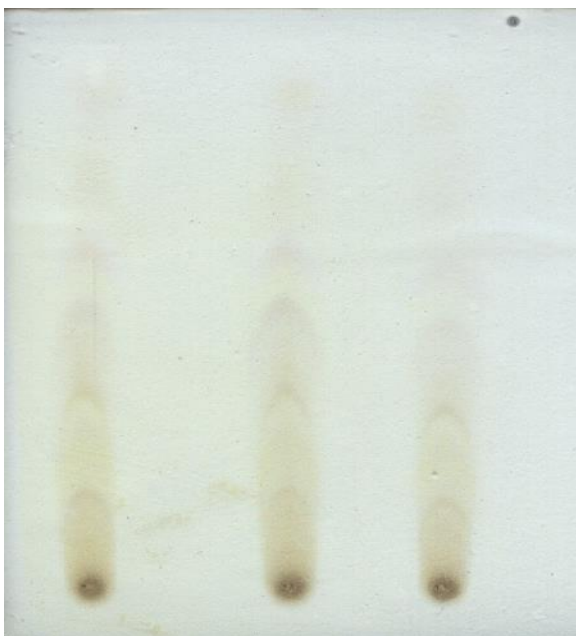


Figura N° 8. CCD del crudo alcaloidal bajo el sistema eluyente cloroformo – acetato de etilo (9:1)

4.11 SEPARACION DE ALCALOIDES POR FC.

Se utilizó la cromatografía en columna tipo flash para separar los alcaloides en fracciones que permitieran el aislamiento y purificación utilizando CCP; se utilizó para dicha técnica seis solventes a saber (eter de petróleo, diclorometano, cloroformo, acetato de etilo, acetona y metanol) empleando un gradiente de polaridades con el fin de lograr una separación adecuada que facilitara la recolección de fracciones en ampollitas previamente esterilizadas.

4.12 PURIFICACION DE ALCALOIDES POR CCP

Una vez se reunieron las fracciones recolectadas de la mezcla cloroformo – acetato de etilo, lo que se hizo fue utilizar la técnica cromatográfica CCP, sembrando con capilares la muestra que contenía el crudo alcaloidal y eluyéndola bajo el sistema eluyente empleado anteriormente, posteriormente se raspó la franja de la placa que revelaba el Rf de 0.52 de la supuesta boldina por lámpara UV con un rango de λ comprendido entre 275 y 375 nm.

4.13 VERIFICACION DE BOLDINA POR TLC

Una vez aislado y purificado el compuesto que supuestamente era la boldina, se procedió con la verificación de tal compuesto por la técnica cromatográfica TLC, dicha labor se realizó en los laboratorios de control de calidad de una empresa QUASFAR M Y F S.A., compañía encargada de realizar tal trabajo a VITROFARMA S.A.

Lo primero que se realizó fue la revisión bibliográfica del método de extracción del alcaloide en la biblioteca y la base de datos de QUASFAR M Y F S.A., encontrándonos con dos métodos para la extracción de la boldina ^{8 y 11}, los cuales se pusieron en marcha para corroborar dicha información frente al estándar de Naturcol y el compuesto aislado por TLC.

Después de haber realizado la extracción por los dos métodos, donde supuestamente estaría la boldina, se prepararon soluciones de una concentración idéntica para cada caso, esta concentración fue de 2 mg/5 mL disueltos en metanol, se sembraron 10 μ L y 20 μ L de cada una de las muestras en el siguiente orden.

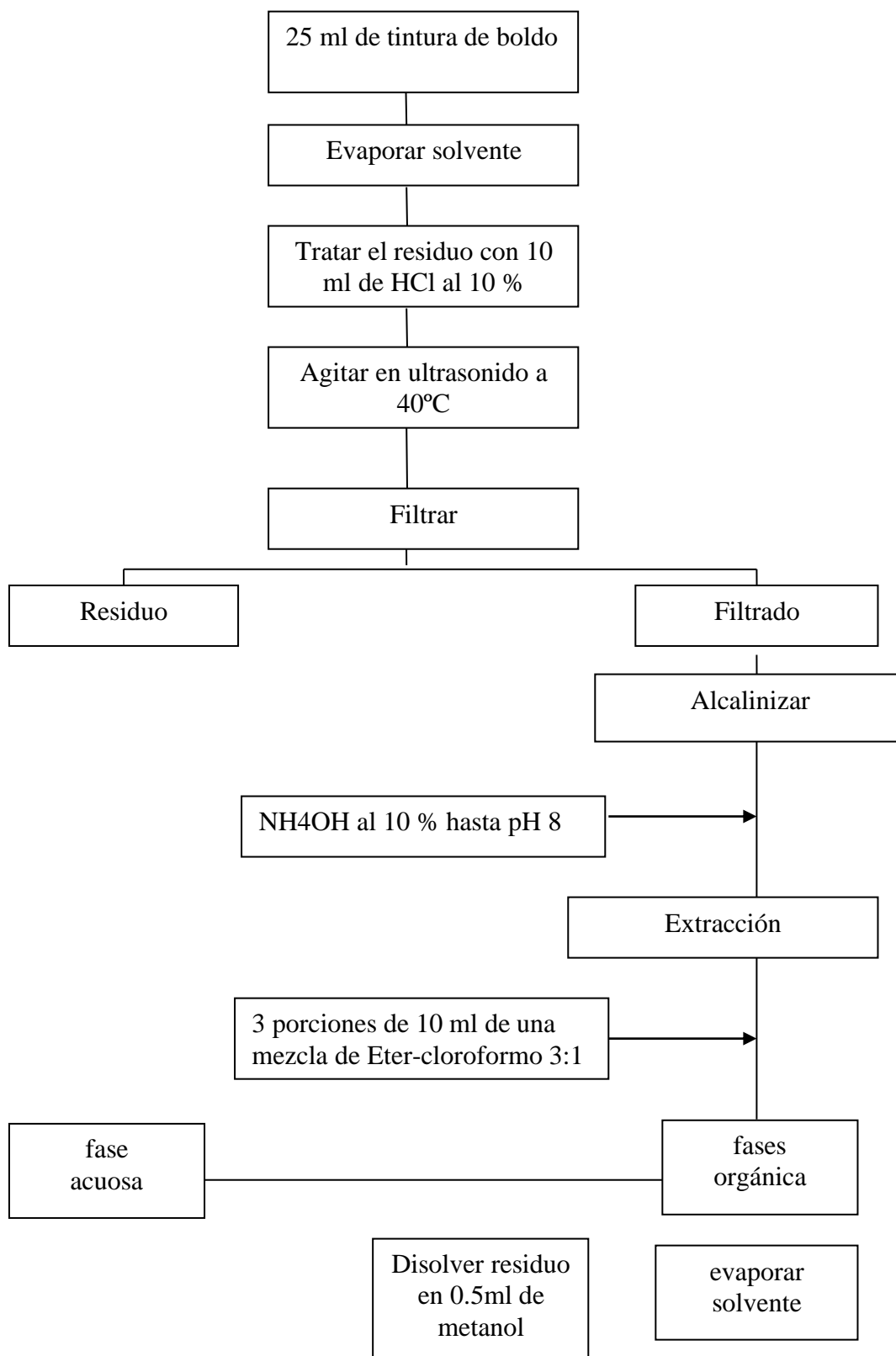
- Estándar secundario Naturcol
- Compuesto extraído según método 1.⁸
- Compuesto extraído según método 2.¹¹
- Compuesto aislado según metodología empleada en UNIQUINDIO.

El sistema eluyente empleado para esta placa fue de 80 volúmenes de Tolueno, 10 volúmenes de Metanol y 10 volúmenes de Dietilamina, reportando un Rf teórico de 0.2 perteneciente a la boldina, con el empleo de luz UV como revelador y una λ de 365 nm.

Después de haber eluido y secado la placa y analizado con lámpara UV se llegó a la conclusión de que el compuesto extraído según la metodología escogida y el compuesto extraído según el método encontrado en la literatura⁸, para tal efecto no presentaron pruebas positivas frente a los otros dos compuestos que reportaron las bandas características.

Dada la incomoda situación, la empresa VITROFARMA S.A. decidió seguir adelante con el proyecto, ya que se conocía la metodología de extracción de la boldina, por esta razón se decidió emplear el método obtenido de la literatura⁸, que mostraba un indicio de que era la boldina la extraída comparada con el estándar secundario.

4.14 OBTENCION DE BOLDINA

Diagrama N° 6. Metodología para extracción de boldina⁸

4.15 VERIFICACION DE BOLDINA POR TLC

Con un extracto contramuestra de 1 L que había sido almacenado, ya que así lo exigía la empresa VITROFARMA S.A., y que representaba 8.2 g de extracto seco, se tomó el procedimiento y se realizaron los cálculos correspondientes para la conversión de la cantidad de solventes.

Luego de haber obtenido 48,75 mg del compuesto se realizó el mismo procedimiento descrito en el numeral 5.13 y el resultado se evidencia con la fotografía tomada a la placa.

4.16 PURIFICACION DE BOLDINA POR TLC

Una vez fue eluída la placa nos dimos cuenta de que el crudo alcaoidal no sólo contenía la supuesta boldina sino que llevaba consigo una gran cantidad de compuestos, por esta razón fue necesario emplear la PTLC para purificar el compuesto que presentaba un R_f de 0.2 y que aparentemente correspondía a la boldina, raspando la franja del cromatograma.

En este momento dicho compuesto se encuentra atrapado en la sílica de la placa, ya que la empresa tiene que importar el estándar primario con el cual se llevará a cabo la caracterización, este trabajo como lo reportó VITROFARMA S.A. será llevado a cabo por personal de esta compañía.

5. REACTIVOS Y MATERIALES EMPLEADOS

5.1 REACTIVOS

Los reactivos empleados para este trabajo fueron en su mayoría reactivos de grado analítico, a continuación se mencionarán éstos:

- Eter de petróleo
- Etanol al 95%
- HCl
- Na_2CO_3
- Diclorometano
- Cloroformo
- Acetato de Etilo
- Acetona
- Metanol
- Tolueno
- Reactivo revelador Dragendorff
- Reactivo identificador Dragendorff

- Reactivo identificador Mayer
- Reactivo identificador Wagner
- Reactivo identificador Valser
- Silica gel 60 H para columna
- Silica gel GF-254 para TLC
- Papel filtro Wathman 11 mm

5.2 MATERIALES

Los equipos y materiales empleados en este trabajo fueron aportados en su mayoría y en calidad de préstamo por la Universidad del Quindío para el desarrollo de este trabajo.

- Horno para secar la planta
- Tamizador
- Percolador de 2 Kg
- Rotavapor Buchi
- Agitador Magnético E y Q. AMPC-1C
- Potenciómetro Mettler Toledo MP 2220
- Embudo Buchner de filtración al vacío
- Bomba de succión
- Embudo de decantación
- Placas de 10 x 20 para TLC
- Columnas cromatográficas
- Cámara de elución
- Aspersor

6. RESULTADOS Y DISCUSION

6.1 RESULTADOS OBTENIDOS DE LAS PRUEBAS FITOQUÍMICAS PRELIMINARES-

	Dragendorff	Mayer	Valsler	Wagner
Extracto 1	-	-	-	-
Extracto 2	++	+	+	++
Extracto 3	+++	++	+	++
Extracto 4	++	+	++	+
Extracto 5	-	-	-	-

Tabla N° 1. Pruebas fitoquímicas preliminares realizadas a los distintos extractos obtenidos, definidos a continuación.

- Extracto 1: extracto acuoso.
- Extracto 2: extracto etanólico sin clorofilas.
- Extracto 3: extracto etanólico crudo obtenido por percolación.
- Extracto 4: extracto etanólico obtenido después de tratar la planta desengrasada.
- Extracto 5: extracto etéreo.

De acuerdo con los resultados obtenidos vemos que el extracto N° 3 es el que presenta mejores resultados en cuanto a la presencia de alcaloides en la planta.

6.2 ESTANDARIZACIÓN DE LA METODOLOGÍA DE EXTRACCIÓN

Para la estandarización de la metodología se tomaron como referencia siete procedimientos encontrados en la literatura para la extracción de alcaloides, cuatro para el grupo de alcaloides en general y una sobre la metodología para la extracción directa del alcaloide boldina, a continuación se reportan los datos obtenidos experimentalmente para una posterior comparación con los datos reportados en la literatura.

METODOLOGÍA N° 1	1	2	3
Peso de extracto g	50	50	50
Volumen de HCl al 5 % (mL)	100	200	300
Tipo de agitación	Magnética	Magnética	Magnética
Tiempo de agitación (min.)	60	60	60
Volumen de Na ₂ CO ₃ al 20 % (mL)	215	335	575
PH	9.5	9.5	9.5
Volumen de diclorometano (mL)	200	200	200
Peso de Alcaloides extraídos(g)	1.02	0.90	0.93

Tabla N° 2. Valores obtenidos para la estandarización en la metodología de extracción N° 1.

METODOLOGÍA N° 2	1	2	3
Peso de extracto g	50	50	50
Volumen de HCl al 5 % (mL)	100	200	300
Tipo de agitación	Manual	Manual	Manual
Tiempo de agitación (min.)	45	45	45
Volumen de Na ₂ CO ₃ al 20 % (mL)	227	348	589
PH	9.5	9.5	9.5
Volumen de cloroformo (mL)	200	200	200
Peso de Alcaloides extraídos(g)	0.91	0.80	0.87

Tabla N° 3. Valores obtenidos para la estandarización en la metodología de extracción N° 2.

METODOLOGÍA N° 3	1	2	3
Peso de extracto g	50	50	50
Volumen de H ₂ SO ₄ al 5 % (mL)	100	200	300
Tipo de agitación	Magnética	Magnética	Magnética
Tiempo de agitación (min.)	60	60	60
Volumen de Al ₂ (SO ₄) ₃ al 5 %	188	312	496
PH	9.5	9.5	9.5
Volumen de Diclorometano (mL)	200	200	200
Peso de Alcaloides extraídos	0.78	0.64	0.77

Tabla N° 4. Valores obtenidos para la estandarización en la metodología de extracción N° 3.

METODOLOGÍA N° 4	1	2	3
Peso de extracto g	50	50	50
Volumen de H ₂ SO ₄ al 5 % (mL)	100	200	300
Tipo de agitación	Manual	Manual	Manual
Tiempo de agitación (min.)	45	45	45
Temperatura	60	60	60
Volumen de Al ₂ (SO ₄) ₃ al 5 %	212	451	558
PH	9.5	9.5	9.5
Volumen de diclorometano (mL)	200	200	200
Peso de Alcaloides extraídos (g)	1.32	1.11	0.96

Tabla N° 5. Valores obtenidos para la estandarización en la metodología de extracción N° 4.

METODOLOGÍA N° 5	1	2	3
Volumen de tintura (mL)	25	25	25
Volumen de HCl al 10 % (mL)	10	10	10
Tipo de agitación	Ultrasonido	Ultrasonido	Ultrasonido
Tiempo de agitación (min.)	20	20	20
Temperatura (°C)	60	60	60
Volumen de NH ₄ OH al 10 %	9.5	9.3	9.6
PH	8	8	8
Volumen de éter-cloroformo 3:1 (mL)	30	30	30
Peso de Alcaloides extraídos (mg)	2.4	1.98	2.17

Tabla N° 6. Valores obtenidos para la estandarización en la metodología de extracción N° 5.

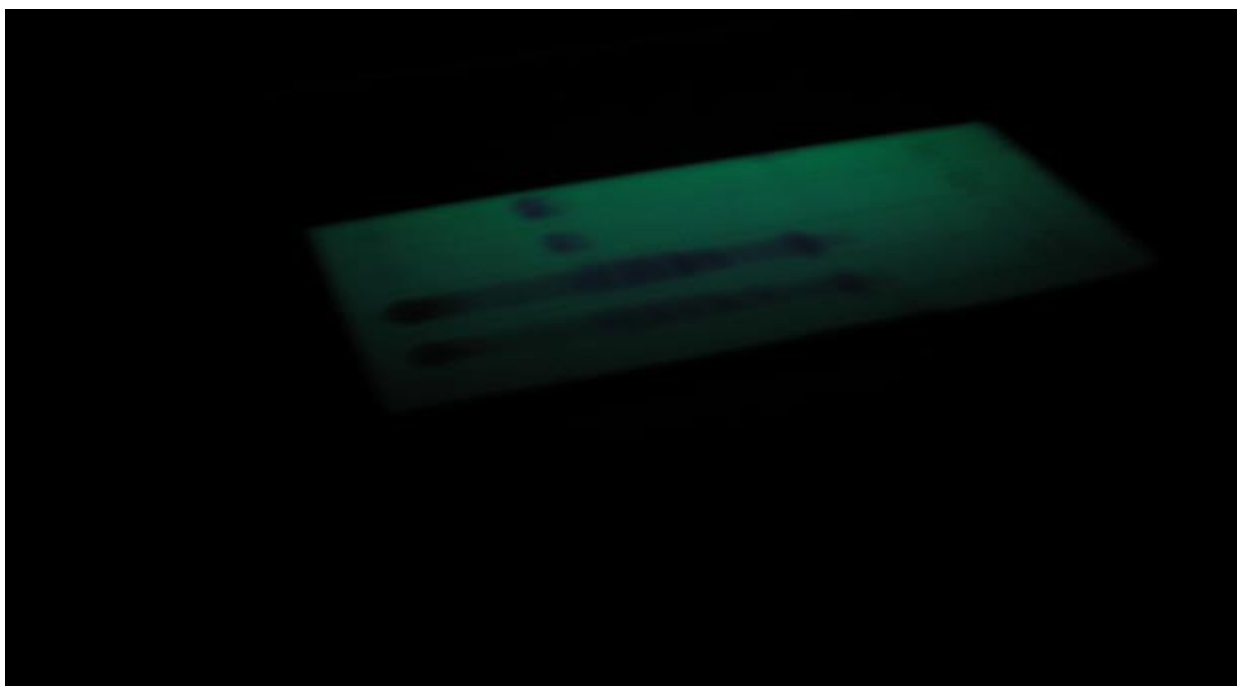
De acuerdo con los resultados obtenidos se eligió la metodología de extracción N° 5, ya que al hacer la conversión del estado de tintura y el peso del extracto blando los rendimientos favorecen dicha metodología, puesto que comparándolos con los pesos de extracto seco y la cantidad de alcaloides extraídos esta optimiza los resultados.

6.3 RESULTADOS CROMATOGRÁFICOS

La fotografía tomada a la placa es el soporte que nos da el indicio de que el compuesto aislado es la boldina de acuerdo con el sistema eluyente reportado en la literatura.

En la parte izquierda de la foto se muestra dos siembras del estándar secundario de boldina facilitado por Naturcol y en la parte derecha dos siembras del crudo alcaloidal aislado.

Figura N° 9. TLC del compuesto aislado, aparentemente boldina



TRABAJO FUTURO

Para la empresa VITROFARMA S.A. es indispensable verificar si el compuesto aislado es efectivamente la boldina, por esta razón dicha empresa se encargará de la caracterización del compuesto obtenido por medio de las técnicas espectroscópicas que están a su alcance, como lo son UV, IR, GC y HPLC, dado que el trabajo planteado en este proyecto sólo se limitaba a la extracción de un compuesto determinado que ofreciera indicios de ser tal por medio de verificación tipo TLC.

Una vez verificada esta información y con el fin de explotar el adiestramiento y la experiencia adquirida, se recomienda tecnificar el proceso de extracción de la boldina ya que es un producto que en este momento está ofreciendo demanda de exportación debido al resurgimiento de los productos naturales en la comunidad Europea.

CONCLUSIONES

- Se identificó la presencia del grupo de alcaloides en general por medio de pruebas fitoquímicas preliminares específicas para tal grupo, utilizando reactivos precipitantes como lo son Dragendorff, Mayer, Valser y Wagner.
- Se emplearon diversas metodologías para la extracción de alcaloides, tanto para el grupo en general como para la boldina, con el fin de compararlas, encontrándose que aquella que optimizaba los resultados en cuanto a rendimiento era la metodología de extracción de la boldina.
- Se empleó la FC para la separación de los compuestos preentes en el crudo alcaloidal obtenido por una metodología general para alcaloides, utilizando seguidamente la CCP para la obtención de un compuesto que reportaba indicios de ser la boldina, pero que después de verificación por medio de TLC no reportó las bandas características de dicho alcaloide.
- Se obtuvo un extracto vegetal crudo a partir de las hojas de *Peumus boldus*, del cual se presentaron fracciones que permitieron la obtención de un compuesto que nos reportó un indicio de ser la boldina por medio de la TLC.

ANEXO

PREPARACION DE REACTIVOS PARA LA IDENTIFICACION DE ALCALOIDES.

- Reactivo de Dragendorff. Disolver 8 g de subnitrato de bismuto en 20 mL de HNO_3 concentrado y añadir lentamente esta solución a una solución concentrada de 27.2 g de KI en 50 mL de agua. Enfriar y decantar para separar los cristales de nitrato de potasio y diluir con agua a 100 mL.

El reactivo forma precipitado naranja – marrón con la mayoría de los alcaloides. Se usa sobre soluciones aciduladas.

- Reactivo de Dragendorff modificado. Solución A : 0.85 g de subnitrato de bismuto disueltos en una mezcla de 10 mL de ácido acético y 40 mL de agua.

Solución B : 8 g de KI disueltos en 20 mL de agua.

Antes de usarse se mezclan 5 ml de solución A, 5 ml de solución B y se añaden 20 ml de ácido acético y se completa a 100 ml con agua.

- Reactivo de Mayer. (Solución de mercuriyoduro de potasio)

Disolver 13.5 g de cloruro mercuríco más 50 g de yoduro de potasio en agua y aforar a un litro. La mayor parte de los alcaloides dan un precipitado blanco. Este reactivo se emplea con soluciones ácidas (HCl o H_2SO_4).

La solución no debe contener ácido acético ni etanol, en los cuales son solubles los precipitados.

Debe agregarse solamente unas gotas de reactivo porque algunos precipitados son solubles en unas gotas de reactivo porque algunos precipitados son solubles en exceso de éste.

BIBLIOGRAFIA

1. CORDELL GEOFFREY A. Introduction to alkaloids “A Biogenetic approach”
University of Illinois. **1946** United States, pages 388 – 409.
2. DOMINGUEZ, Xeorge A. “Tratado de Farmacognosia”, Editorial Valencia, España,
1984.
3. GROSS G Eduardo. Introducción al estudio de los productos naturales. Universidad de
Buenos Aires **1985**.
4. Daniel H, “Plantas Medicinales y un Resumen de Farmacognosia”
Editorial Acribia, **1989**.
5. SECRETARIA EJECUTIVA DEL CONVENIO ANDRES BELLO (SECAB),
Especies vegetales promisorias de los países del convenio Andrés Bello, Tomo editora
Guadalupe Ltda., Bogota **1989**.

6. TORRES DE YOUNG Estela. Introducción a la cromatografía. Editorial Universidad nacional de Colombia **1994**.
7. GOTTELAND M, ESPINOZA J, CASSELS B, SPEISKY H. Effect of a dry boldo extract on orocecal intestinal transit in healthy volunteers. *Rev Med Chil* **1995**, 123 (8): 955-960
8. PHARMACOPEE FRANCAISE.X Edition. 6 Supplément. L'ADRA PHARM **1997**. BOLDO POUR PREPARATIONES HOMEOPATIQUES. Pags. 1 -5
9. BILBAO, Maria del Rosario, “análisis Fitoquímico Preliminar”, Uniquindío, Armenia **1997**, Pags. 15 – 22, 45 – 61
10. MAHABIR. P. Gupta PhD. 270 Plantas Medicinales Iberoamericanas. Convenio Andrés Bello. Editorial Cyted 1ª edición Santa fe de Bogota **1999**.
11. <http://www.uv.es/IHCD/Farmacología/farma19a.htm>
12. <http://www.interhiper.com/medicina/Fitoterapia/boldo.htm>
13. <http://www.caretas.com.pe/1999/1569/caretas/caretas.htm>
14. http://www.elalmanaque.com/Medicina/Curiosidades/infusion_araucana.htm
15. www.fia.cl/difus/boletin/bpm/bpmjunio2004.pdf
16. http://www.elalmanaque.com/Medicina/Curiosidades/infusion_araucana.htm

17. www.fia.cl/difus/boletin/bpm/bpmjunio2004.pdf
18. <http://www.fitoterapia.net/vademecum/plantas/151.html>