



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
ZARAGOZA

68  
m

“ CARACTERIZACION DE LA ACTODIGINA “

T E S I S

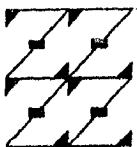
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

LEONARDO DEL VALLE MONDRAGON

DIRECTOR DE TESIS : Q. CARLOS S. VALADEZ SANCHEZ.

ASESOR DE TESIS : Q. Ma. GUADALUPE MIRANDA J.



LO HUMANO  
ES  
DE NUESTRA REFLEXION

México, D. F.

1996

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**E**l presente trabajo de investigación, fue desarrollado en las instalaciones de la sección de Materias Primas y Síntesis de Medicamentos, e Investigación, de la Facultad de Estudios Superiores "Zaragoza"; y en el Departamento de Bioestructuras del Instituto de Química, ambas instancias pertenecientes a la Universidad Nacional Autónoma de México; así como en el Departamento de Farmacología del Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez" de la Secretaría de Salubridad y Asistencia.

**SE AGRADECE CORDIALMENTE LA  
COLABORACION EN EL DESARROLLO DE ESTA  
TESIS A :**

**PROPIEDADES ORGANOLEPTICAS**

**Q.F.B. María Carmina Yahamm Solio.  
Q. Teresa de Jesús Mora Meyers.**

**PROPIEDADES ESTRUCTURALES**

**Dr. Manuel Soriano García.  
Dr. Mubjhy Suamnadhja Gambiaa.  
M. en C. Lourdes Castillo Granada.**

**PROPIEDADES FISICOQUIMICAS**

**I.Q. Raúl Román Cisneros.  
Q.F.B. Mauro Arrieta Sánchez.**

**ANALISIS QUIMICO Y REACTIVIDAD FUNCIONAL**

**Q. Carlos Salvador Valadez Sánchez.  
Q. María Guadalupe Miranda Jimeno.  
Q. Francisco Silva Flores.  
Q. Olmaya Vienay Flores.  
Q. Silvia de la Paz Hittzman.**

**DESARROLLO Y VALIDACION**

**Q.F.B. Carlos Morán Lunada.  
Q.F.B. Adolfo Priado de la Mata.**

**ASPECTOS FARMACOLOGICOS**

**Dr. Gustavo Pastelín Hernández.**

**ASESORIA EN INFORMATICA**

**Ing. Javier Solana Miravalles.  
Ing. Miguel de Soto Montaner.  
Ing. León Pérez Ortiz.**

**INSTALACIONES, SERVICIOS Y REACTIVOS EN LA F.E.S. ZARAGOZA**

**M. en C. Magdalena Ordoñez Resendiz.**

**\***

**\***

**\***

**LA DIRECCION DE LA FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES "ZARAGOZA", NOMBRO COMO SINODALES  
DEL EXAMEN PROFESIONAL A :**

**PRESIDENTE Q. MIKI OTANI IMURA.**

**VOCAL Q. CARLOS SALVADOR VALADEZ SANCHEZ.**

**SECRETARIO Q. GUADALUPE MIRANDA JIMENO.**

**SUPLENTE Q.F.I. MA. DEL CARMEN NIÑO DE RIVERA O.**

**SUPLENTE Q. MARTHA OLIVEROS GARCIA.**

**CARACTERIZACION**  
**DE LA**  
**ACTODIGINA**

## I N D I C E

	<u>PAGINA</u>
INTRODUCCION.....	1
ANTECEDENTES.....	4
GENERALIDADES.....	15
FUNDAMENTACION.....	70
OBJETIVOS.....	72
HIPOTESIS.....	73
MATERIAL Y EQUIPO.....	74
REACTIVOS.....	77
METODOS.....	80
1.- PROPIEDADES ORGANOLEPTICAS.....	80
1.1.- APARIENCIA.....	80
1.1.1.- HOMOGENEIDAD.....	80
1.1.2.- CRISTALINIDAD.....	80
1.2.- COLOR.....	82
1.2.1.- ANALISIS HALOCROMICO.....	83
1.2.2.- ANALISIS HALOFLUORESCENTE.....	84
1.3.- OLOR.....	85
1.4.- SABOR.....	86
2.- PROPIEDADES ESTRUCTURALES.....	87
2.1.- ESPECTROFOTOMETRIA DE INFRARROJO.....	87



---

2.2.- ESPECTROFOTOMETRIA DE ULTRAVIOLETA.....	88
2.3.- CRISTALOGRAFIA POR DIFRACCION DE RAYOS X.....	89
3.- PROPIEDADES FISICOQUIMICAS.....	90
3.1.- ANALISIS CROMATOGRAFICO.....	90
3.1.1.- DESARROLLO DE METODO DE SEPARACION CROMATOGRAFICA EN CAPA FINA.....	90
3.1.2.- SISTEMA REVELADOR DE ANILLO ESTEROIDAL.....	91
3.1.3.- SISTEMA REVELADOR DE D-GLUCOSA.....	92
3.1.4.- SISTEMA REVELADOR DE GLUCOSIDO CARDIACO.....	93
3.1.5.- SISTEMA REVELADOR DE LACTONA.....	94
3.2.- INDICE DE REFRACCION DE LA ACTODIGINA.....	95
3.3.- INDICE DE REFRACCION DE DISOLUCIONES DE INTERES BIOLOGICO.....	96
3.4.- pH DE DISOLUCIONES DE INTERES BIOLOGICO.....	97
3.5.- PUNTO DE FUSION.....	98
3.6.- SOLUBILIDAD.....	99
4.- PROPIEDADES QUIMICAS.....	100
4.1.- ANALISIS RESIDUAL.....	100
4.1.1.- ANALISIS PARA BROMO ELEMENTAL RESIDUAL.....	100
4.1.2.- ANALISIS PARA BROMO ORGANICO RESIDUAL.....	101
4.1.3.- DETERMINACION DE HUMEDAD.....	102
4.1.4.- PERDIDA POR IGNICION.....	104
4.1.5.- PERDIDA POR SECADO.....	105

---

4.1.6.- RESIDUOS DE IGNICION.....	106
4.2.- REACTIVIDAD FUNCIONAL.....	108
4.2.1.- GLUCOSIDO CARDIACO.....	108
4.2.2.- GRUPO ETER.....	109
4.2.3.- GRUPO D-GLUCOSA.....	110
4.2.4.- GRUPO HIDROXILO ESTEROIDAL.....	113
4.2.5.- GRUPO LACTONA.....	114
4.3.- PRUEBAS RAPIDAS DE IDENTIFICACION.....	115
4.3.1.- FORMACION DE COMPLEJOS DE FIERRO-III.	106
4.3.2.- FORMACION DE COMPLEJOS DE FOSFORO-V Y RODAMINA BASE SI.....	116
5.- DESARROLLO DE UN METODO ESPECTROFOTOMETRICO PARA DETERMINACION CUANTITATIVA DE ACTODIGINA.....	117
5.1.- REACCION DE COLOR.....	117
5.2.- ESTABILIDAD FISICA DE LA REACCION.....	118
5.2.1.- PERMANENCIA DE COLOR.....	118
5.2.2.- EFECTO DE DISOLUCION.....	119
5.2.3.- EFECTO DE LUZ.....	120
5.2.4.- EFECTO DE AIRE.....	121
5.3.- DETECCION DE LONGITUD DE ONDA DE MAXIMA ABSORCION.....	122
5.4.- ESTABILIDAD ESPECTROFOTOMETRICA DE LA REACCION.....	123
5.5.- VALIDACION DEL METODO.....	124
5.5.1.- LINEALIDAD DEL SISTEMA.....	124
5.5.2.- LINEALIDAD DEL METODO.....	127

---

5.5.3.- EXACTITUD DEL METODO.....	130
5.5.4.- PRECISION DEL METODO.....	132
RESULTADOS.....	134
1.- PROPIEDADES ORGANOLEPTICAS.....	134
1.1.- APARIENCIA.....	134
1.1.1.- HOMOGENEIDAD.....	134
1.1.2.- CRISTALINIDAD.....	134
1.2.- COLOR.....	135
1.2.1.- ANALISIS HALOCROMICO.....	135
1.2.2.- ANALISIS HALOFLUORESCENTE.....	136
1.3.- OLOR.....	137
1.4.- SABOR.....	137
2.- PROPIEDADES ESTRUCTURALES.....	138
2.1.- ESPECTROFOTOMETRIA DE INFRARROJO.....	138
2.2.- ESPECTROFOTOMETRIA DE ULTRAVIOLETA.....	139
2.3.- CRISTALOGRAFIA POR DIFRACCION DE RAYOS X.....	139
3.- PROPIEDADES FISICOQUIMICAS.....	140
3.1.- ANALISIS CROMATOGRAFICO.....	140
3.1.1.- DESARROLLO DE METODO DE SEPARACION CROMATOGRAFICA EN CAPA FINA.....	140
3.1.2.- SISTEMA REVELADOR DE ANILLO ESTERIDAL.....	144
3.1.3.- SISTEMA REVELADOR DE D-GLUCOSA.....	147
3.1.4.- SISTEMA REVELADOR DE GLUCOSIDO CARDIACO.....	149
3.1.5.- SISTEMA REVELADOR DE LACTONA.....	152

---

3.2.- INDICE DE REFRACCION DE LA ACTODIGINA.....	153
3.3.- INDICE DE REFRACCION DE DISOLUCIONES DE INTERES BIOLÓGICO.....	153
3.4.- pH DE DISOLUCIONES DE INTERES BIOLÓGICO.....	153
3.5.- PUNTO DE FUSION.....	153
3.6.- SOLUBILIDAD.....	153
4.- PROPIEDADES QUIMICAS.....	154
4.1.- ANALISIS RESIDUAL.....	154
4.1.1.- ANALISIS PARA BROMO ELEMENTAL RESIDUAL.....	154
4.1.2.- ANALISIS PARA BROMO ORGANICO RESIDUAL.....	154
4.1.3.- DETERMINACION DE HUMEDAD.....	154
4.1.4.- PERDIDA POR IGNICION.....	154
4.1.5.- PERDIDA POR SECADO.....	154
4.1.6.- RESIDUOS DE IGNICION.....	154
4.2.- REACTIVIDAD FUNCIONAL.....	155
4.2.1.- GLUCOSIDO CARDIACO.....	155
4.2.2.- GRUPO ETER.....	155
4.2.3.- GRUPO D-GLUCOSA.....	156
4.2.4.- GRUPO HIDROXILO ESTEROIDAL.....	157
4.2.5.- GRUPO LACTONA.....	157
4.3.- PRUEBAS RAPIDAS DE IDENTIFICACION.....	158
4.3.1.- FORMACION DE COMPLEJOS DE FIERRO-III.	158
4.3.2.- FORMACION DE COMPLEJOS DE FOSFORO-V Y RODAMINA BASE S1.....	159

---

5.- DESARROLLO DE UN METODO ESPECTROFOTOMETRICO PARA DETERMINACION CUANTITATIVA DE ACTODIGINA.....	160
5.1.- REACCION DE COLOR.....	160
5.2.- ESTABILIDAD FISICA DE LA REACCION.....	162
5.2.1.- PERMANENCIA DE COLOR.....	162
5.2.2.- EFECTO DE DISOLUCION.....	162
5.2.3.- EFECTO DE LUZ.....	163
5.2.4.- EFECTO DE AIRE.....	164
5.3.- DETECCION DE LONGITUD DE ONDA DE MAXIMA ABSORCION.....	165
5.4.- ESTABILIDAD ESPECTROFOTOMETRICA DE LA REACCION.....	165
5.5.- VALIDACION DEL METODO.....	166
5.5.1.- LINEALIDAD DEL SISTEMA.....	166
5.5.2.- LINEALIDAD DEL METODO.....	167
5.5.3.- EXACTITUD DEL METODO.....	171
5.5.4.- PRECISION DEL METODO.....	172
ANALISIS DE RESULTADOS.....	174
CONCLUSIONES.....	180
ANEXOS.....	182
PROPUESTAS.....	208
BIBLIOGRAFIA.....	210

## I N T R O D U C C I O N

Desde la aparición del hombre sobre la faz de la tierra hasta la actualidad, éste ha descubierto y generado a través del tiempo, un sin fin de productos químicos tanto orgánicos como inorgánicos de procedencia natural, semisintética y sintética, de los cuales, todos ellos, es necesario conocer a ciencia cierta la precisa determinación de las características físicas, químicas y fisicoquímicas muy particulares de cada uno de estos, para facilitar en extremo su preciso manejo y óptima aplicación a cualquier tipo y nivel de investigación, por lo cual, se han generado en el transcurso de los últimos años, una diversidad de estudios denominados de caracterización, los cuales evidencian las propiedades muy particulares de cada compuesto que es analizado bajo estos estudios.

Por lo general, una caracterización va desde el análisis físico de la muestra hasta la evaluación de su reactividad funcional; análisis que deben ser objetivos y prácticos, con carácter cualitativo y cuantitativo a niveles de macro y/o microescala, propiciando así la tipificación precisa de las sustancias químicas.

Dentro de la gran gama de compuestos descubiertos por el hombre, los glucósidos cardiacos que en su mayoría son sustancias de origen natural, y que ejercen una intensa acción sobre el corazón, aumentando la contractilidad del músculo cardiaco en la insuficiencia cardiaca congestiva, y que pueden ser altamente tóxicos y mortales en dosis no controlada. A través de los siglos, ha sido necesario conocer su efecto y mecanismo de acción preciso sobre el músculo cardiaco, para aumentar su efecto y minimizar su toxicidad, llegando a descubrir hoy en día, que las propiedades conformacionales y funcionales son importantes para alcanzar el máximo efecto terapéutico y minimizar la respuesta toxicológica en este tipo de sustancias. Así, una extensa generación de estudios de efecto-estructura, realizados en el Instituto Nacional de Cardiología " Ignacio Chávez " de la Ciudad de México, muy particularmente en el Departamento de Farmacología, bajo la dirección y diseño de los Drs. Méndez, Pastelin y Kabela, y con la colaboración de Wiesner en la Universidad de Brunswick en Canadá, desarrollaron un glucósido cardiaco completamente sintético, cuya funcionalidad resultó ser análoga a otros glucósidos ya existentes y cuyos efectos terapéuticos eran máximos con niveles de toxicidad mínimos, casi nulos, dando con ello grandes expectativas a pacientes con insuficiencia cardiaca, a tal producto se le nombró Actodigina y

dado que era necesario el conocer más a fondo a dicho glucósido, se realizó el presente trabajo de investigación, en la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, de la Universidad Nacional Autónoma de México, el cual se abocó a efectuar la caracterización del mismo para delimitar con mayor precisión su naturaleza física, química y fisicoquímica, basando todo ello en el microanálisis. En esta caracterización efectuada, se encuentra contenida la evaluación de sus propiedades organolépticas, análisis estructural, propiedades fisicoquímicas básicas, análisis residual y reactividad funcional así como la implementación de un método de separación cromatográfica en capa fina y algunos sistemas de revelado cromatográfico, además del desarrollo y validación de un método espectrofotométrico para la determinación cuantitativa del glucósido cardiaco, lo cual, permite conocer más a fondo a la Actodigina.

Tal aportación al ámbito de la investigación, agilizará en extremo, estudios posteriores en el área farmacológica y en la farmacéutica así como todo estudio relacionado en torno a este activo que forma parte de un grupo de medicamentos de sumo interés en cardiología.



## ANTECEDENTES

---

Los glucósidos cardiacos son sustancias que ejercen intensa acción sobre el corazón, en concentraciones terapéuticas, todos actúan aumentando la contractilidad del músculo cardiaco y son la base del tratamiento medicamentoso de la insuficiencia cardiaca congestiva. En muchas de las enfermedades del corazón, el miocardio no tiene la suficiente fuerza para vaciar los ventriculos completamente; por lo tanto, la sangre bombeada a los diferentes órganos es insuficiente para mantener su funcionamiento normal. En un intento por satisfacer las demandas de oxígeno y nutrientes del organismo, el miocardio se contrae con mayor rapidez, ocasionando un agrandamiento del músculo cardiaco ( hipertrofia ), a pesar de lo cual no se logra un gasto cardiaco normal (26,42).

Los cardiotónicos estimulan al músculo cardiaco para que se contraiga con mayor fuerza, y así bombee más sangre al organismo con el objeto de mantener las funciones de los diferentes órganos. Como consecuencia, la frecuencia cardiaca vuelve a cifras normales, y al aumentar la circulación a los riñones, los glucósidos cardiacos aumentan la diuresis y corrigen

el edema, frecuentemente asociado con la insuficiencia cardiaca (26,41,42,43).

Los glucósidos cardiacos modifican el transporte de electrólitos a través de la membrana miocárdica. Su efecto principal es un aumento en la salida de potasio y en la entrada de sodio y calcio. Se piensa que estos cambios influyen sobre la contractilidad del miocardio, dando como resultado una mayor fuerza de contracción (41,42).

Cuando los glucósidos se emplean para el tratamiento de determinadas alteraciones del latido cardiaco (arritmias), frecuentemente ejercen su efecto, disminuyendo la velocidad de conducción a través del nodo auriculoventricular (42).

Estos fármacos, constituyen un grupo de compuestos químicamente similares, obtenidos de fuentes naturales, y se hallan entre las drogas más viejas que la humanidad ha conocido; se han utilizado no sólo como medicinas sino también como venenos (26,41).

Los glucósidos cardiacos más importantes, por lo menos en Europa y Estados Unidos, se obtienen de las hojas de la dedalera ( Digitalis purpurea ), que crece salvaje en tierras no

cultivadas de latitudes nórdicas, incluyendo el Reino Unido; y de la dedalera austriaca ( Digitalis lanata ), que es indígena en el centro y sur de Europa (41,42).

Hablando con propiedad, el término digital, sólo se refiere a los extractos y preparados de hojas de especies de Digitalis, pero de hecho, frecuentemente se utiliza en sentido genérico para todos los glucósidos cardíacos y preparados que los contienen. Además, existen otros términos que derivan de éste; así, un paciente sometido a tratamiento con un glucósido cardíaco puede decirse que está "digitalizado" y uno que muestra signos de dosificación excesiva, está "hiperdigitalizado" (41).

En la naturaleza existen diversos glucósidos cardíacos como la Escila, que es un preparado de las porciones internas del bulbo de la Urginea maritima, o sea la cebolla de mar, cuyo uso medicinal data desde los egipcios y romanos, quienes lo empleaban como tóxico cardíaco y en el tratamiento del edema. Estos activos, tienen muy poca aplicación en el efecto digitálico sobre el corazón ya que se absorben mal a nivel del tubo digestivo, y son menos potentes que los glucósidos de la especie Digitalis. Sin embargo, el Meproscileno, que es un semisintético de la Escila prosilaridin, resulta prometedora en ciertos casos clínicos (41,42).

Los Bufadienólidos, son otros glucósidos cardiacos de origen natural, pues se extraen del veneno de las glándulas de la piel del renacuajo del género Bufo; entre los más empleados se encuentra la Bufalina (41.80).

El Estrofanto, es un preparado de las semillas desecadas de Strophantus kombé, que fue introducido en la medicina en 1890; en la actualidad, aún se siguen utilizando para tratar algunas insuficiencias cardiacas, siendo la Estrofantidina la más utilizada. La Ouabaina o Estrofantidina "G", es un glucósido cardiaco extraido de las semillas de Strophantus gratus o de la madera de la Acokanthera ouabaio, o bien, de la Acokanthera schimperi, tiene una potencia muy superior al resto de los digitálicos naturales y semisintéticos; hoy en día, tiene una gran aplicación en padecimientos cardiacos severos (41.42).

Los glucósidos de digital, directamente extraidos de *D. purpurea* y *D. lanata*, tienen una gran aplicación, entre los cuales, los más empleados son Digitalina, Digitoxina, Digoxina y Lanatósido "C".

Por lo general, todos estos fármacos tienen una estructura muy semejante, ya que son cicloacetales mixtos de azúcares y un esteroide alcohólico. La porción de la molécula sin

azucres se denomina aglicona o genina. Todas las geninas de los glucósidos cardiacos tienen grupos hidroxilo en la posición C3 y C14, un grupo metilo en C10 y C13, un aldehído o hidroximetilo en serie y un anillo de lactona insaturada en C17 de la base esteroidal (Fig. 1) (41,42,43). Algunas geninas más complejas, pueden tener además grupos metilo, hidróxilo o aldehído en otras posiciones. El núcleo esteroidal difiere del

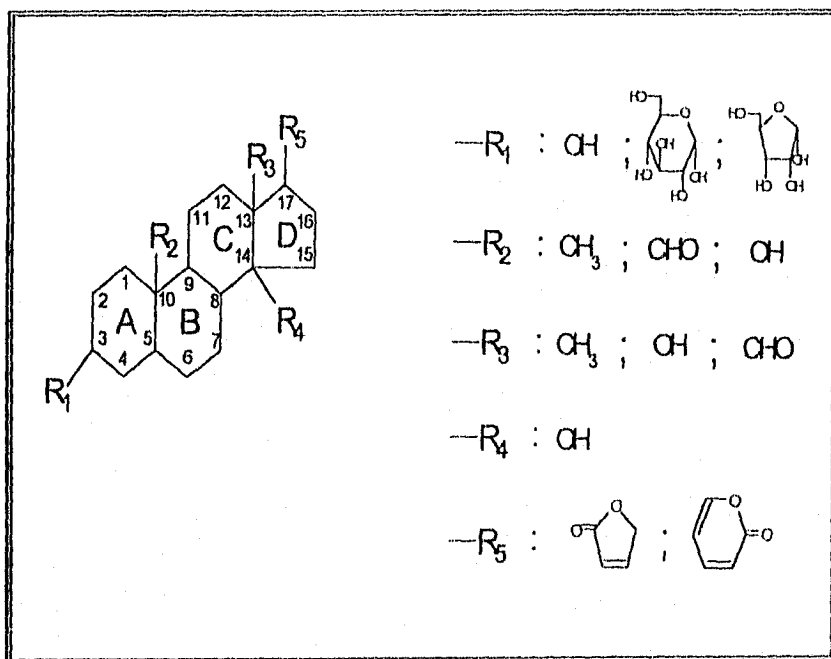


Fig. 1 : Fórmula general de un glucósido cardíaco.

grupo de las hormonas sexuales y corticosuprarrenales, debido a la fusión cis-trans-cis de los anillos A-B, B-C y C-D, respectivamente; lo cual propicia que cada anillo fusionado del esteroide adquiera una conformación de silla, ocasionando que la molécula no sea plana o parcialmente plana, como en las hormonas y corticosuprarrenales que tienen una fusión cis-trans-trans. El grupo metilo o demás sustituyentes en C10 y C13, el hidróxilo en C14 y el anillo de lactona en C17, todos están orientados arriba del plano del anillo esteroideal ( configuración Beta ). Los sustituyentes en C3, por lo general, suelen estar también orientados en posición Beta. El anillo lactánico o éster cíclico, puede tener cinco o seis miembros, con uno o dos enlaces dobles, respectivamente, y tienen una estructura plana debido a la presencia de enlaces dobles (41,42,43,44).

La porción azúcar del glucosido, puede ser constituida por una o cuatro porciones o unidades monosacáridas. Se han aislado unos 16 monosacáridos diferentes como producto de hidrólisis de glucósidos cardiacos, tales como glucosa, ramnosa y fructosa, además de variaciones poco comunes de aldohexosas metoxi y desoxiladas entre otras (45).

La actividad farmacológica de los glucósidos cardiacos depende de la porción genina. Sin embargo, las moléculas de

azúcar, modifican la solubilidad y propiedades de fijación, lo cual influyen en la distribución de la droga. En general, los efectos de las geninas son de breve duración en comparación con los efectos del glucósido; por lo que, las geninas no son adecuadas para empleo terapéutico (2,41,42).

Los glucósidos, tienen particular valor cuando hay insuficiencia cardiaca por disfunción crónica del músculo o por sobre carga de los ventrículos a causa de hipertensión, enfermedad coronaria arteroesclerótica, alguna cardiomiopatía, defectos congénitos y lesiones valvulares, y a veces, en el choque dependiente de infarto de miocardio (41,42).

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

Asimismo, estos medicamentos sólo logran acción eficaz sobre el corazón que falla, cuando sus concentraciones en los tejidos se acercan a las concentraciones que originan efectos tóxicos. Por lo tanto, la dosificación debe controlarse cuidadosamente en cada paciente, sobre todo, teniendo en cuenta la semidesintegración prolongada de la mayor parte de

glucósidos (2,26,41,43,60).

Aunque los glucósidos cardiacos aumentan el gasto cardiaco, disminuyen el volúmen del corazón, la presión venosa, el volúmen sanguíneo, y producen diuresis aliviando el edema; en dosis mayores, pueden producir disritmias auriculares que constituyen el efecto tóxico más grave, ello es a consecuencia de un aumento en el impulso simpático y vagal del corazón, así como de una inhibición de la actividad de la Na/K-ATPasa a nivel de membrana. Entre otros efectos tóxicos secundarios se encuentra la anorexia, náuseas y vómitos que suelen ser signos tempranos y frecuentes de dosificación excesiva de digital. La diarrea y necrosis intestinal son señales de dosis excesiva, además de que un paciente hiperdigitalizado, puede presentar trastornos en el sistema nervioso central, tales como fatiga, debilidad, letargia, estupor, coma, amnesia, afasia, inquietud, irritabilidad, vértigo, excitación, euforia, depresión, alucinaciones, ilusiones, confusión, delirio, convulsiones, y diversos tipos de dolor como cefalea, dolor de muelas y dolores faciales, musculares y de piernas. Asimismo, dentro de la toxicidad, los glucósidos pueden causar efectos o trastornos visuales como fotofobia, visión borrosa, escotomas, sensaciones de centelleo, deslumbramiento y trastornos en la percepción del color. Además de que tratamientos prolongados con glucósidos



cardiacos, pueden producir alteraciones endocrinas de tipo estrogénico, como ginecomastia, disminución en la secreción de gonadotrofina hipofisaria en mujeres posmenopáusicas y maduración de las células epiteliales planas de la vagina en mujeres posmenopáusicas. Este último efecto, puede interferir con el diagnóstico citológico de carcinoma del endometrio (42).

Valorando todos los beneficios y problemáticas que ocasionan los glucósidos cardiacos para obtener una digitalización óptima del paciente con trastornos cardiacos, los doctores R. Méndez, G. Pastelin y E. Kabela, del Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez" de la Ciudad de México, trabajaron arduamente en el diseño molecular de un glucósido cardiaco completamente sintético, el cual propiciara tanto una respuesta terapéutica rápida, así como un margen de seguridad amplio para mantener sin efectos tóxicos al paciente digitalizado, y en el caso de que los hubiese, estos fueran fácilmente revertidos; así pues, desarrollaron en base a arduos estudios de efecto-estructura, la molécula AY-22,241 cuya síntesis quedó a cargo de Karel Wiesner y Thomas Y. R. Tsae, del Centro de Investigación de Productos Naturales de la Universidad de New Brunswick, en Brunswick Canadá (1,2).

Una vez sintetizado el producto AY-22,241 ( fig. 2 ), los

doctores Méndez, Pastelín y Kabela, desarrollaron los estudios farmacológicos al producto, encontrando que posee una gran rapidez de acción ( mayor a la de la Ouabaina ) y un margen de seguridad notablemente mayor al de todos los glucósidos cardiacos conocidos, además de que sus efectos tóxicos eran fácilmente revertidos (2).

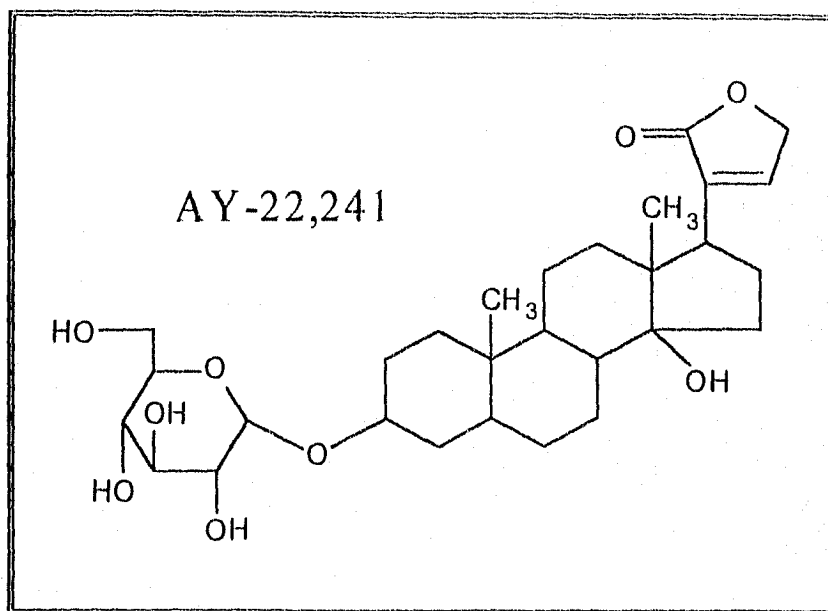


fig. 2 : Estructura del AY-22,241.

En base a la suma rapidez con la cual el producto AY-22,241 genera un efecto terapéutico, sus creadores le dieron el nombre de Actodigina, ya que este glucósido cardíaco sobrepasa en extremo a todos los demás fármacos de su género.

A pesar de que la Actodigina es un análogo estructural de la Digitoxina, los efectos farmacológicos entre ambos son asombrosamente diferentes, por lo cual, Méndez, Pastelín y Kabela en México, Karl Wiesner en Canadá y por separado D. Fullerton y R. Thomas en los Estados Unidos, encontraron que la Actodigina debe su rapidez a la meso lactona que posee en su estructura, la cual difiere de los demás glucósidos cardíacos; esta variación estructural, le permite tener una fijación nula a las lipoproteínas, que son las causantes del efecto terapéutico lento ( en diferente grado ), del margen de seguridad estrecho, y por lo cual, de los efectos tóxicos en el resto de los digitálicos tanto naturales, como semisintéticos y sintéticos. Así pues, la Actodigina pasa a ser el glucósido cardíaco ideal en el tratamiento de pacientes con trastornos cardíacos, pero este digital, aún se encuentra en estudio, para en un futuro próximo, emplearlo como una herramienta de precisión en el campo de la Medicina, muy particularmente en el Área de Cardiología.

## GENERALIDADES

### CARACTERIZACION

La caracterización de productos químicos tanto naturales, como semisintéticos y sintéticos, comprende la determinación precisa de los atributos físicos, químicos y fisicoquímicos muy particulares de cada una de las sustancias que se desean estudiar; por lo cual, la principal herramienta de trabajo en una caracterización de sustancias desconocidas, es el análisis cualitativo, el cual debe ser objetivo y rápido, considerando siempre la parte económica, ya que ésta, debe estar encaminada a obtener los requerimientos mínimos en tiempo, espacio, equipo, material y reactivos, sin que esto limite la precisa identificación del producto en estudio. Por lo cual, se debe hacer empleo del microanálisis; como consecuencia de ello, cada sustancia desconocida, resulta ser un gran desafío, ya que en la actualidad, las perspectivas del microanálisis no son tan amplias y favorables como en el macroanálisis, por lo cual, la mayoría de las veces, se debe diseñar un esquema analítico práctico, o bien, adoptar uno ya diseñado por otros investigadores y tratar de acondicionarlo a las necesidades de detección para la sustancia en estudio, ya que con un esquema diseñado adecuadamente, se puede proceder a una caracterización mucho más rápida, aunque por lo general, ocurren fallas aparentes que deben modificarse sobre la marcha. A consecuencia de ello, hoy en día, no ha sido posible establecer un esquema aplicable universalmente a toda la gama de compuestos caracterizados y próximos a caracterizar (10.00).

Es preciso establecer una buena caracterización en base a la reactividad de los grupos funcionales, debido a que estos, son la base primordial en todo tipo de análisis, pues a partir de ellos, se generan las particularidades físicas, químicas y fisicoquímicas de cada uno de los compuestos generados o en vías de generación, considerando siempre, que tanto los resultados negativos como los positivos, proporcionan una valiosa información, lo cual, está estrechamente ligado a lo que implica una caracterización de sustancias químicas.

**PROPIEDADES ORGANOLEPTICAS**

Las propiedades organolépticas de una sustancia química ya sea natural, semisintética o completamente sintética, van estrechamente relacionadas con las características físicas ( líquido, sólido o gas ) y la naturaleza química de las sustancias ( ya sea ácido, base, compuesto aromático, nitrado, esterooidal, etc. ); por lo cual, para la realización de este tipo de análisis, se efectúan tanto pruebas físicas básicas de apariencia, cristalinidad, homogeneidad y color, así como las sensitivas de olor y sabor, las cuales en su totalidad son poco objetivas, ya que van estrechamente ligadas a la capacidad sensitiva y de apreciación del analista (10).

Por otra parte, para la realización óptima de un estudio organoléptico, deberán tomarse muy en cuenta las propiedades químicas y toxicológicas del producto en cuestión, principalmente en las pruebas de olor y sabor, debido a que puede suscitarse una irritabilidad en los tejidos epiteliales, tanto dérmicos como mucoides, además de posibles intoxicaciones ligeras, manifestadas por escosor, adormecimiento, ardor, temperatura o eritematosis en la región afectada (10,27,30).

Cuando del producto a caracterizar organolépticamente, no se conoce ningún tipo de información, o sea, que la sustancia es de reciente descubrimiento, se deberán tomar en cuenta las propiedades químicas y toxicológicas de sus posibles análogos tanto estructurales como biológicos (27,30,74).

Las propiedades organolépticas bien determinadas, son muy particulares a la sustancia química de la que proceden, por lo cual, pueden ser consideradas como identificadores indirectos en el análisis de una sustancia (10,27,30,74).

**APARIENCIA**

La determinación de apariencia, de una sustancia química, se basa única y exclusivamente en un análisis del aspecto físico de la misma, ya sea sólido o líquido, aunque en raras ocasiones se efectuó a un gas (10,27,30).

La prueba para sólidos, se realiza a nivel de macro y microanálisis visual, en relación a su homogeneidad y

crystalinidad; en tanto que para sustancias liquidas, se sustituye la prueba de cristalinidad por la de transparencia y consistencia. En cualesquiera de los casos, el aspecto fisico de una sustancia, puede ser considerado como una propiedad muy particular de productos quimicamente puros; la cual, puede estimarse como una prueba indirecta de análisis, debido a que depende de la capacidad visual y de apreciación del analista, por lo cual, resulta poco objetiva pero de gran importancia en la caracterización fisica de una sustancia, a consecuencia de la información muy particular que genera (27,30,74).

#### HOMOGENEIDAD

La determinación de homogeneidad en una sustancia sólida, es meramente una prueba fisica, que se basa en un análisis visual a nivel macro y microscópico, para delimitar si existe o no una uniformidad en el tamaño y geometría de las partículas de un determinado producto en estudio (27,74).

#### CRISTALINIDAD

La cristalinidad, es una prueba fisica que se emplea para delimitar si una determinada sustancia es o no cristalina (22).

Por lo general, el análisis se basa en la observación microscópica de partículas de un determinado compuesto en estudio, suspendidas uniformemente en un medio líquido viscoso, en donde se verifica tanto su forma geométrica, así como sus características de cristal, mediante la presencia de birrefringencia, que es una particularidad muy especial de los productos cristalinos, cuando se les hace incidir un haz de luz.

#### COLOR

Un análisis fisico de color, se basa en la impresión visual que genera una fuente luminosa al reflejarse sobre un cuerpo y

ser detectada por la retina; por lo cual, este tipo de prueba, debe realizarse primordialmente bajo luz blanca, debido a que la mayoría de compuestos orgánicos sólidos son incoloros, además de que deberá efectuarse a nivel macro y microscópico para delimitar el color físico del producto en estudio (27.30).

Por otra parte, en un análisis de este tipo, habrá que observar la presencia, variación y pérdida del color (halocromía), al entrar en contacto determinada sustancia con algunos líquidos orgánicos, ácidos y bases, así como al diluir las soluciones en agua, ya que una persistencia del color, los cambios de tonalidad, o bien, la desaparición del mismo, es en algunos casos de gran valor, debido a que estas variaciones son específicas para un determinado compuesto, además de proporcionar información práctica para subsecuentes análisis químicos (74).

En la prueba de color físico y halocrómico, conviene examinar la muestra a la luz ultravioleta de baja y alta frecuencia, para determinar propiedades fluorescentes, así como posibles variaciones en la misma (halofluorescencia), lo cual, genera información muy particular para ciertas sustancias (74).

En un análisis halocrómico, los fenómenos o efectos de presencia, variación y pérdida de la coloración, químicamente no han sido aclarados satisfactoriamente, ya que en algunos casos, se debe a la formación de subproductos al reaccionar una determinada sustancia, ya sea con un líquido orgánico, ácido, base o con la misma agua; y en otros, se debe a efectos muy particulares de los salvos coloreados, de los compuestos moleculares en disolución o bien, a la presencia de estos dos fenómenos. Casos muy similares ocurren en el fenómeno de halofluorescencia, debido a que ésta, puede verse afectada o favorecida por la formación de subproductos y por la solvatación de los mismos; además, cuando se llevan a cabo pruebas halofluorescentes, conviene tener presente que el estado de agregación influye en demasía, debido a que no todos los compuestos fluorescen tanto en estado sólido como en solución, pues en algunos casos, la fluorescencia se muestra únicamente en estado sólido y en otros, en estado líquido y muy raramente en estado gaseoso (27).

Tanto la halocromía como la halofluorescencia, son pruebas químicas que acompañan al análisis físico de color, para establecer una buena caracterización a una sustancia determinada (10.74).

### OLOR

La determinación de olor para una sustancia pura en estudio, depende de la percepción sensitiva del analista, por lo cual es poco objetiva, pero genera una característica física odorífera muy particular, que define indirectamente la naturaleza del producto, ya que la gran mayoría de los compuestos orgánicos son inodoros (19).

En algunas ocasiones, el tipo de olor depende de la cantidad o de la concentración de la sustancia, por lo cual, una comparación de olor de un producto a caracterizar, con el de una pequeña cantidad de un compuesto análogo estructural puro, puede servir de orientación (19).

La temperatura es un factor importante, ya que en la determinación de olor, esta favorece la evaporación del mismo, facilitando así su percepción (19).

Entre los compuestos que exhiben olores característicos, figuran compuestos tales como alcoholes y fenoles, mercaptanos, ácidos grasos, aminas, ácidos carboxílicos, alicíclicos, ácidos nafténicos y sus amidas y ésteres, aldehídos, ésteres de naftol, indol y sus derivados, nitrilos e isonitrilos, cumarina y compuestos alílicos entre otros. Por lo general, pueden ser de carácter atractivo o repelente (20).

Por otra parte, algunos materiales inodoros pueden ser corticoesteroides, piranosidos, esteroides, esterinas, ilionas, dianilos, rodacilos, esterodipiroles, tetralonas y tetrasolatos además de otros (20).

Las pruebas de olor indican a veces, la presencia de pequeños contaminantes o impurezas en los materiales inodoros, aunque en raras ocasiones, materiales odoríferos ligeros, pueden ser inodoros, debido a algunas sustancias contaminantes o impurezas que inhiben el olor (19).

Entre la amplia gama de olores producidos por sustancias orgánicas, se tienen los siguientes ejemplos (19):



OLOR	EJEMPLO DE SUSTANCIAS QUE LO PRESENTAN
Etereo	Acetato de etilo, etanol, acetona y eter etílico.
Aromáticos	
* Amigdalino	Nitrobenceno y benzaldehido.
* Canfórico	Alcanfor, timol, safrol y eugenol.
* Limonado	Citral y acetato de linalol.
Balsámicos	
* Floral	Antranilato de metilo, terpineol y citrorelos.
* Liláceo	Heliotrópina y estirona.
* Vainillado	Vainillina y anisaldehido.
* Almiscado	Almizcle y muscona.
* Cacodílico	Cacodilo y trimetilamina.
Empironeumático	Benceno, anilina, cresol y guayacol.
Rancio	Acido caproico y ácido valérico.
Narcótico	Piridina y pulegona.
Nauseabundo	Indol y estacol.
Altamente nauseabundo	Putrefacina y cadaverina.

### SABOR

La determinación de sabor, es sin duda una prueba física organoléptica poco común en una caracterización de compuestos orgánicos, pues sólo se realiza en casos muy especiales y bajo propio riesgo del analista, ya que una gran parte de compuestos, producen efectos tóxicos y corrosivos en distinto grado, pero con todo y ello, una buena proporción de sustancias, pueden ser sometidas a esta prueba sin ocasionar ningún tipo de problema.

Al igual que las pruebas físicas de apariencia, cristalinidad, homogeneidad, color y olor, el análisis de sabor es poco objetivo, ya que depende de la capacidad gustativa del analista; pero aún así, los resultados generados deben ser considerados como una particularidad muy especial de las sustancias, debido a que el sabor, se encuentra estrechamente ligado a la naturaleza química del producto, por lo que se puede encontrar desde sabores dulces como el del glicerol y cloroformo, hasta afrutados como el del citralinio e ilanetol, sin dejar de apreciar sabores ácidos, acres, causticos, agrios y amargos entre otros. Por otra parte, no todos los compuestos orgánicos presentan sabor, ya que existen sustancias insaboras; aunque, una prueba con resultados de tal indole, no es tan particular, y puede pasar a formar parte de un análisis complementario en la caracterización física de un producto determinado (10,74).

### PROPIEDADES ESTRUCTURALES

Un análisis de propiedades o características estructurales de un determinado compuesto orgánico, es completamente crucial para la precisa caracterización del mismo, dado que de él se deriva la definición exacta de la molécula y por subsecuente, toda la gama de posibles análisis, tanto químicos como fisicoquímicos que resultan del análisis de ésta, para así, poder delimitar al compuesto en estudio, dentro de una categoría muy particular de sustancias (4).

Para este tipo de estudio, se debe considerar siempre, el obtener de manera precisa y confiable, la conformación de la estructura en base a métodos que delimiten la presencia de grupos funcionales, así como métodos que describan la disposición espacial de la molécula, para lo cual, se recurre en

primera instancia al análisis espectrofotométrico en la región infrarroja, además del de resonancia magnética nuclear y de masas (4.2, 16.22).

En la actualidad, estos análisis estructurales se han visto desplazados por un método más preciso, específico y confiable, el cual delimita perfectamente la conformación espacial tanto de la molécula de interés, como de sus respectivos isómeros por separado. Este novedoso análisis, es la cristalografía por difracción de rayos X computarizada, la cual es herramienta suficiente para efectuar una precisa caracterización estructural de una sustancia determinada. En un análisis cristalográfico, es conveniente efectuar previamente un estudio espectrofotométrico en la región infrarroja, para verificar que la presencia de los sustituyentes funcionales del producto que se va a analizar, son los deseados (14.71, 72).

Por otra parte, un análisis infrarrojo determina la presencia de grupos funcionales en la molécula, ya sean estructurales o sustituyentes, mientras que un análisis resonante magnético nuclear, define los acoplamientos moleculares de los diversos grupos funcionales constitutivos; en tanto que un estudio de masas, sólo proporciona el peso molecular de cada una de las fracciones estructurales funcionales y de la molécula misma (4.2, 16.22, 72).

Otro análisis que puede aunarse en un estudio de conformación estructural como complemento del mismo, es la espectrofotometría en la región ultravioleta, el cual de manera muy somera, delimita la presencia de un compuesto, en base a su categoría química, es decir, que ciertas clases de sustancias, siguen un patrón espectrofotométrico (en la región ultravioleta) muy semejante, además de ser la pauta primordial para el desarrollo cualitativo y cuantitativo de métodos espectrofotométricos posteriores (4.10).

#### ESPECTROFOTOMETRIA DE INFRARROJO

Dentro de una caracterización de sustancias químicas, el análisis en la región infrarroja es de gran importancia, ya que al ser aplicado a una sustancia pura en particular, éste revela la presencia de los sustituyentes funcionales que conforman la estructura molecular del mismo ( alcanos, alquenos, aromáticos,

alcoholes, fenoles, éteres, aminas, carbonilos, etc. ), mediante la verificación de bandas de absorción específicas a determinada frecuencia; por lo cual, éste tipo de prueba espectrofotométrica, se basa en la medición de absorción de luz, producida por la interacción de los grupos funcionales con energía radiante, en el rango infrarrojo, en función de la longitud de onda (4.6.7<sup>a</sup>).

Para que ello ocurra, se debe asumir que la molécula de una sustancia dada, no es una estructura rígida, sino que, a temperatura ambiente, presenta distintas formas vibracionales ( estiramiento lineal a lo largo del enlace y deformación en la variación de la posición de los átomos con respecto al eje del enlace original ) a través de los átomos que la constituyen; estas oscilaciones, tienen un valor de frecuencia muy alto y específico al tipo de vibración de los átomos involucrados, y al tipo de enlace existente entre ellos. La absorción de energía se producirá, cuando la radiación electromagnética tome los mismos valores de frecuencia que las oscilaciones vibracionales de la molécula; al suceder esto, se observará una ampliación de la excitación en alguna de las formas vibracionales presentes, siendo la radiación infrarroja, la que cuenta con valores de frecuencia semejantes para afectar considerablemente la energía vibracional natural de una molécula, sin que ello implique la ruptura estructural de la misma (4.17.7<sup>a</sup>).

También debe tomarse en cuenta, que al ocurrir un cambio en la vibración molecular, se suscita una variación en el momento dipolar eléctrico, al absorber energía radiante en la región infrarroja; siendo el momento dipolar de las moléculas, la característica crucial en el análisis infrarrojo, ya que si no ocurre un cambio en éste, no podrá absorber radiación infrarroja electromagnética, tal como ocurre con el H<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, F y CH<sub>2</sub>=CH<sub>2</sub> entre otros. De lo que se deduce, que solamente aquellas moléculas que presenten cambios en su momento dipolar, durante sus movimientos vibracionales, absorberán en el infrarrojo; las que no presenten momento dipolar o éste permanezca constante, sin variaciones en su módulo, sentido y dirección, no absorberán en el infrarrojo (4.7<sup>a</sup>).

Por otra parte, en el caso de moléculas grandes que contienen sistemas de tres átomos en orientación al plano X, Y, Z, se deben asumir cuatro modalidades de la vibración lineal entre átomos, que son la deformación o tijereteo ( los dos átomos conectados a un átomo central, se mueven acercándose y alejándose uno del otro con deformación del ángulo de valencia ), balanceo o flexión plana ( la unidad estructural se inclina alternadamente de un lado hacia el otro, dentro del

plano de simetría molecular ), oscilación o flexión espacial ( la unidad estructural se inclina alternadamente de un lado hacia el otro en un plano perpendicular a la simetría de la molécula ) y torsión ( la unidad estructural gira alternadamente en dos direcciones alrededor del plano de simetría de la molécula ), por lo cual, las moléculas grandes, no sólo dependen de la pura vibración lineal ( alargamiento sobre el eje de enlace y deformación ), sino que estas otras cuatro variaciones vibracionales, propician sobre tonos muy característicos que al involucrarse con el resto de las vibraciones de la molécula, generan una vibración armónica, la cual varía en intensidad al ser incidida por energía radiante infrarroja a diferentes frecuencias, generando diversos niveles de absorción, los cuales, al ser detectados, se obtiene gráficamente una serie de bandas muy características y complejas de los estados de excitación máxima de cada una de las estructuras funcionales constitutivas de una determinada molécula (4,72).

En si, de la suma de energías moleculares, la energía radiante infrarroja, actúa directamente tanto sobre la energía vibracional, como en el momento dipolar y de manera indirecta, afecta las energías rotacionales pero no así las de transición electrónica y de inversión de espín.

La mayoría de estos análisis, se realizan en una región estrecha y bien definida del espectro electromagnético, que es la región infrarroja, que va de los 0.7 a 500  $\mu\text{m}$ , o en número de onda, de los 14000 a 20  $\text{cm}^{-1}$ ; esta región, se subdivide en tres zonas, la infrarrojo cercano ( 0.7 a 2.5  $\mu\text{m}$  ó 14000 a 4000  $\text{cm}^{-1}$  ), infrarrojo normal ( 2.5 a 15  $\mu\text{m}$  ó 4000 a 667  $\text{cm}^{-1}$  ) e infrarrojo lejano ( 15 a 500  $\mu\text{m}$  ó 667 a 20  $\text{cm}^{-1}$  ). Para generar dichas zonas, normalmente se emplean lámparas con filamento de "Narnst", formado de una mezcla de óxidos de tierras raras, circonio, torio y cerio, y calentado eléctricamente hasta los 1700 °C; o bien, pueden emplearse fuentes de "Globar", que se elaboran con una pequeña barra de carburo de silicio, calefaccionado eléctricamente hasta una temperatura de incandescencia de 1200 °C (4,72).

De las tres zonas en que se divide el espectro de infrarrojo, en la región normal ( 2.5 a 15  $\mu\text{m}$  ó 4000 a 667  $\text{cm}^{-1}$  ), es donde se obtienen los resultados más importantes en el trabajo de identificación de estructuras, ya que en esta zona, se presentan las magnitudes de energía radiante necesarias para generar estados vibracionales que son fácilmente detectados, obteniéndose gráficamente bandas de absorción complejas y muy particulares de la molécula en estudio (4).

Por lo cual, la espectrofotometría de infrarrojo, en la región normal, es utilizada como herramienta primordial en estudios de caracterización de sustancias (4,19,72).

### ESPECTROFOTOMETRIA DE ULTRAVIOLETA

Dentro de la espectrofotometría de absorción, que se basa en la medida de la absorptividad por las diferentes sustancias, de una radiación electromagnética de longitud de onda situada en una banda definida y estrecha, esencialmente monocromática, la ultravioleta (100 a 390 nm), tiene un alto grado de especificidad, sin embargo, su aplicación primordial estriba en los análisis cuantitativos y muy escasamente en los cualitativos, aunque ello no implique, que un espectro en la región ultravioleta para un determinado compuesto, pueda generar una banda o bandas características, que definan indirectamente, en base a su comportamiento, la categoría química del mismo; lo cual, dentro de una caracterización de sustancias no es tan relevante, pero sí complementario para definir las particularidades específicas de un determinado compuesto en estudio (4).

Por regla general, la absorción de energía en la región ultravioleta, por una sustancia dada, dependerá de su estructura electrónica; pues estando esta perfectamente cuantizada, generará una transferencia de electrones de los orbitales de menor energía o estado fundamental a orbitales de mayor energía llamados también de antienlace, lo cual, está íntimamente relacionado con la frecuencia de la radiación electromagnética.

Por otra parte, recordando que en el caso de un simple enlace entre átomos, por ejemplo el etano, el enlace C-C y el enlace C-H, los electrones de valencia estarán describiendo un orbital de enlace de tipo sigma ( $\sigma$ ), que es un orbital de menor energía que los orbitales atómicos de los átomos que lo originaron; pero al formarse el enlace  $\sigma$ , se forma un orbital de antienlace ( $\sigma^*$ ) de mayor energía que el  $\sigma$  y de los mismos orbitales atómicos que lo originan (4,10,11).

En el caso de un doble enlace, además de tener un enlace  $\sigma$ , se tiene un orbital  $\pi$ , que también tendrá asociado un orbital de antienlace  $\pi^*$ , generando una transición electrónica de  $\pi$  a  $\pi^*$  al sufrir una excitación por efecto de absorción de energía (4).

Además, se observa una forma variante de excitación, cuando algunos de los átomos de la molécula presentan un par de electrones no enlazados, por lo cual, se tiene un estado orbital de no enlace, que no estará asociado a un orbital de antienlace, esto es en el caso de orbitales atómicos del oxígeno, azufre, nitrógeno y halógenos, por lo cual, la transición electrónica por excitación energética, en estos casos, se llevará de un orbital de no enlace a uno de antienlace ya sea del tipo  $\sigma^*$  o bien, del tipo  $\pi^*$  (4.10.11).

Es entonces que al absorber una cantidad suficiente de energía, se produce la transferencia de un electrón, desde el orbital de enlace al de antienlace, o bien, de no enlace a antienlace  $\sigma^*$  o  $\pi^*$ , disminuyendo por lo tanto la densidad electrónica entre los dos átomos; por lo cual se dice, que absorbe energía para alcanzar dicho estado de excitación electrónica, y en base a ello, es como se puede registrar gráficamente las diferentes magnitudes de absorción energética a diferentes longitudes de onda, con una fuente de energía radiante de alta intensidad, como la provista por fuentes luminosas de hidrógeno o bien de deuterio, mediante el empleo de detectores (4.10).

Para un buen uso de la espectrofotometría de ultravioleta, hay que considerar que esta, se divide en dos regiones denominadas ultravioleta cercano o de cuarzo, a la zona comprendida entre los 200 y 390 nm, y ultravioleta lejano o de vacío, a la zona de 100 a 200 nm. Esta división corresponde a los problemas de tipo experimental que se presentan, dado que en el primer caso, la atmósfera es transparente a la radiación ultravioleta en ese rango, y se trabaja con celdas de cuarzo ( $\text{SiO}_2$ ) que es un material que no presenta problemas ópticos en esa zona. Para la segunda instancia, el aire (especialmente  $\text{O}_2$  y  $\text{CO}_2$ ), absorbe fuertemente en la zona de 185 a 200 nm, por lo que se debe eliminar su presencia en los instrumentos de medición, al momento de llevar a cabo la determinación; así pues, la aplicación del vacío, propicia que se pueda trabajar sin problema alguno la zona de 100 a 200 nm ya que se evita completamente el efecto de absorción de los gases que conforman el aire ambiental (4).

El conocer que la radiación ultravioleta presenta dos variantes, es de vital importancia para llevar a cabo el análisis de sustancias, debido a que los hidrocarburos saturados, parafinas y compuestos que tienen comprometidos todos sus electrones de valencia en la formación de enlaces simples, absorben en la región ultravioleta lejana, por lo cual, generalmente son utilizados como disolventes en el análisis de

ultravioleta en la zona cercana. Por consiguiente, compuestos insaturados y saturados con pares de electrones de no enlace, tales como alcanos, alquinos, aminas, haluros, tioles y sulfuros entre otros, absorben en la región del ultravioleta cercano (4).

Con todo ello, los análisis de absorción en la región ultravioleta, se llevan a niveles moleculares y no a niveles funcionales tan específicos como la resonancia magnética nuclear, espectrofotometría de masas e infrarrojo, debido a que la energía global de la molécula sólo se ve afectada directamente a nivel de la excitación energética electrónica a lo largo de toda la serie de enlaces simples, dobles y triples así como a los pares electrónicos libres, que puede presentar una estructura determinada; y de manera indirecta, afecta las energías vibracionales y rotacionales, pero no así la de inversión de espín; por lo cual, un análisis en la región ultravioleta puede considerarse como estructural molecular y no como estructural funcional, pero aún con todo y ello, la información cualitativa que genera, es de gran consideración en el estudio de caracterización de sustancias (4,14).

#### CRISTALOGRAFIA POR DIFRACCION DE RAYOS "X"

La difracción, no es un fenómeno nuevo ya que fue citado por Leonardo da Vinci en el siglo XV; sin embargo, su asociación con la naturaleza ondulatoria de la luz fue explicada en primer lugar por Fresnel, en el siglo XIX. La aplicación de esta técnica a la estructura química, tuvo que esperar hasta el descubrimiento de radiaciones de longitud de onda del mismo orden de magnitud que las distancias interatómicas, del orden de un Angstrom ( $1 \text{ \AA} = 10^{-8} \text{ cm}$ ) (Röntgen, 1895). Friedrich, Knipping y Lave en 1912, demostraron la difracción de rayos X en los monocristales, lo que constituye el punto de partida de la nueva ciencia, la cristalografía por difracción de rayos X. Los Bragg, padre e hijo, la adoptaron inmediatamente y demostraron de forma inequívoca la relación entre un patrón de difracción y la estructura del cristal, consiguiendo determinar la primera estructura cristalina, la del cloruro de sodio (22).

A partir de entonces se sucedieron las aplicaciones a compuestos iónicos, confirmando los supuestos teóricos que tenían de sus estructuras y dando validez absoluta a las leyes de Dalton y Avogadro (22,40).



Las teorías de la cristalografía clásica y las especulaciones de Haüy ( 1784 ) sobre la naturaleza interna de los cristales se vieron confirmadas. A medida que se afinaron las técnicas, se fueron aplicando a un número creciente de sales y minerales (122).

En los últimos 50 años, la cristalografía de rayos X ha revolucionado las ciencias biológicas, químicas y físicas, ya que los resultados obtenidos con esta valiosa técnica, han permitido establecer en forma definitiva y absoluta la estructura y, en algunos casos, la fórmula correcta de cientos de miles de moléculas orgánicas e inorgánicas. Por ejemplo, la confirmación de la estructura plana del benceno, el esqueleto correcto de los esteroides, la estructura de la penicilina, de la vitamina B<sub>12</sub>, la estructura de la hemoglobina, la del ADN, la lisozima, etc. (122,40).

Las únicas técnicas que proporcionan información estructural a una resolución atómica, son: la cristalografía de rayos X y la resonancia magnética nuclear bidimensional y multinuclear. Los análisis estructurales por difracción de rayos X proporcionan en una forma única, la estructura tridimensional completa y detallada de las moléculas, sin embargo, se requiere de cristales para llevar a cabo estudios cristalográficos, mientras que los efectuados por resonancia magnética nuclear, tienen la ventaja de examinar la estructura de las moléculas en disolución (40).

Por otra parte, los rayos X, son una forma de la radiación electromagnética, así como lo es la luz visible. La primera, se distingue por su longitud de onda relativamente pequeña y por su habilidad de propagarse a través de la materia casi en línea recta. La longitud de onda de la radiación de rayos X que se emplea en la determinación de la estructura cristalina de moléculas orgánicas e inorgánicas y de macromoléculas, es del orden de 1 Å y comparable con la longitud de enlace carbono-carbono simple, 1.54 Å. El fenómeno de difracción de rayos X por cristales, se debe a la interferencia constructiva de las ondas dispersadas por los diferentes átomos que contiene la muestra cristalina y dependiente del arreglo atómico tridimensional de las moléculas en el cristal. Desafortunadamente, al hacer uso de la radiación de rayos X, no se obtiene directamente la imagen de las moléculas, como sucede cuando la luz visible es dispersada por un objeto, colectada por el ojo humano, y de esta forma, obteniéndose la imagen. La razón es la siguiente: la propagación de las ondas de la radiación de rayos X no es afectada por ningún medio transparente ( su índice de refracción es muy cercano a 1.0 ), ni tampoco por

campos magnéticos o eléctricos. Esto significa que las lentes ópticas no desvían ni enfocan esta radiación, que son condiciones necesarias para la formación de imágenes. Las imágenes de los objetos que reflejan la radiación de rayos X, pueden ser reconstruidas computacionalmente empleando la información experimental ( intensidades difractadas ) obtenida a partir de los patrones de difracción y procedimientos matemáticos (40, 41).

El objetivo del análisis de un patrón de difracción de rayos X, es generar un mapa de densidad electrónica tridimensional a partir de las intensidades observadas que permiten dilucidar la estructura de un compuesto. El mapa se genera a partir de las magnitudes de los factores de estructura, el contenido electrónico de la celda unitaria, el grupo espacial, tipo de red cristalina, conjugación de distancias interatómicas, etc. (22, 40, 41).

Hoy en día los cristalógrafos computarizados, como el sistema HI-STAR de Syntex y VULKAN de Kattzner, son los más avanzados en la resolución de la conformación estructural de compuestos, tanto orgánicos como inorgánicos, de bajo, mediano y alto peso molecular, para lo cual, integran en sus procesadores las ecuaciones matemáticas que describen de manera precisa y confiable a una sustancia a nivel tridimensional, dichas ecuaciones son (40):

- a) Ecuación de densidad electrónica.
- b) Ecuación de factor de estructura.
- c) Síntesis de Patterson.

Por lo cual, la cristalografía por difracción de rayos X computarizada, resulta ser una herramienta primordial en la óptima caracterización estructural de un determinado compuesto en estudio.

#### PROPIEDADES FISICOQUIMICAS

La determinación de ciertas propiedades bajo pruebas fisicoquímicas dentro de la caracterización de sustancias, juega un papel muy importante ya que estas, permiten delimitar

cualidades muy particulares de un compuesto dado, mediante la diversificación de respuestas químicas bajo estímulos físicos y viceversa; o de manera alterna, de estímulo físico a respuesta física y muy raramente, bajo efectos químicos, respuestas químicas. Así, el análisis bajo pruebas fisicoquímicas permite evaluar diversos aspectos de una sustancia, desde los netamente fisicoquímicos como punto de fusión, punto de ebullición, índice de refracción, viscosidad, densidad, solubilidad, etc., hasta variaciones de las mismas, ya sea con más carácter químico que físico o bien, físico que químico, permitiendo determinar de manera directa o indirecta alguna peculiaridad específica o bien proximal para una determinada sustancia, tal es el caso del análisis cromatográfico, estudios polarográficos, pH de disolución y análisis termográfico entre otros (10,11).

En sí, el análisis fisicoquímico permite conocer más íntimamente a un compuesto incognito, ya que con el análisis estructural (espectroscopia), que es otra modalidad del estudio fisicoquímico, sólo se obtiene la definición del "cuerpo", más no cómo se comporta en su entorno y ante situaciones cruciales; por lo cual, un análisis fisicoquímico, permite conocer parte del entorno y situaciones que afectan a una sustancia, siendo inherente a su propia naturaleza a determinar; lo cual, se complementa con el análisis de reactividad química (12).

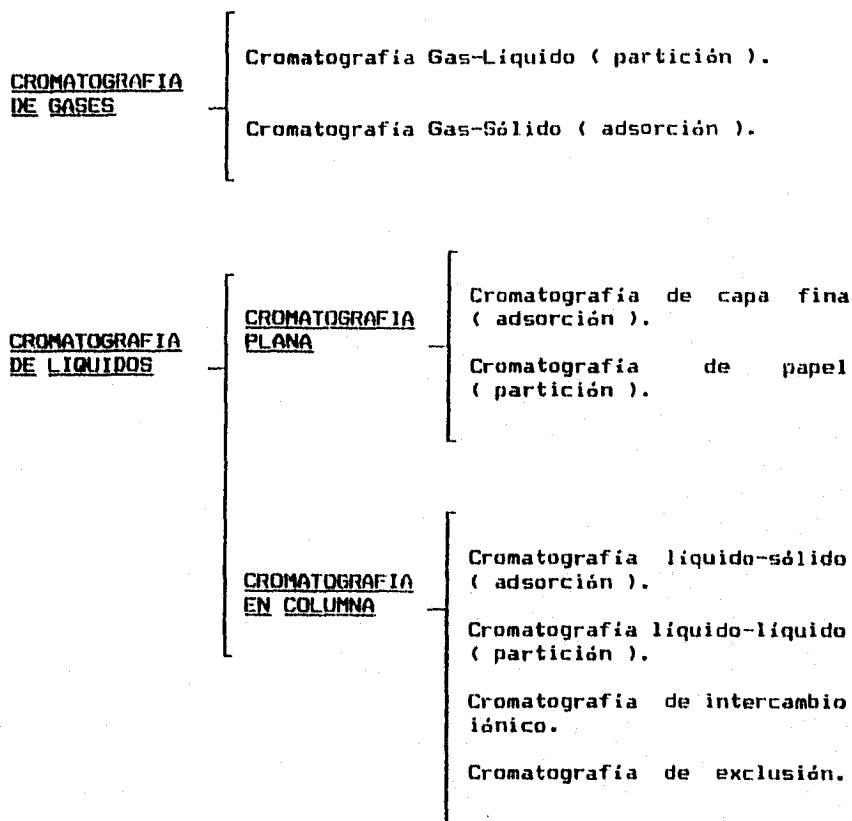
La información tanto positiva como negativa que genera una serie de pruebas fisicoquímicas, es netamente una huella indeleble que identifica a un determinado compuesto y lo engloba con aquellos que le son muy parecidos; por lo cual, la caracterización utiliza como herramienta de trabajo, tanto pruebas fisicoquímicas netas, así como las basadas en ellas, para dar una identificación plena y consisa en el análisis de sustancias desconocidas (10,13).

### ANALISIS CROMATOGRAFICO

La cromatografía, es una técnica desarrollada a principios de siglo, que permite la separación de sustancias que se encuentran en una mezcla. El nombre cromatografía, se debe a que las primeras separaciones se llevaron a cabo con pigmentos coloridos de plantas, los cuales se observan como bandas de color, generando grafías coloridas (10,14).

En general, la cromatografía es un proceso de migración diferencial, en el cual, los componentes de una mezcla son transportados por una fase móvil, gaseosa o líquida, y retenidos selectivamente por efectos de polaridad por una fase estacionaria que puede ser líquida o bien sólida y en algunos casos gaseosa, esta última, en la cromatografía de gases (10, 11, 14, 27, 28).

De acuerdo a la naturaleza de las fases involucradas y a los mecanismos de separación, la cromatografía se divide en:



De todas las variantes cromatográficas, la de capa fina es la más importante, ya que de los estudios efectuados en ésta, se puede proceder a un escalamiento sin problema alguno, a cualquier nivel cromatográfico, excepto en la de papel; además de ser la más empleada dentro de la investigación analítica, ya que permite efectuar seguimientos y pruebas diversas a una gran variedad de sustancias tanto sólidas como líquidas, ya sean coloridas o incoloras, de origen natural, semisintético o sintético; además de ser rápida y de fácil manejo. Por lo cual, es la herramienta de trabajo diario dentro de la investigación de sustancias y componentes (10).

En sí, la técnica de cromatografía en capa fina o delgada, es una variante de la cromatografía de adsorción, que consiste en un adsorbente sólido ( fase estacionaria ), ya sea alúmina o gel de sílice, distribuido uniformemente sobre una superficie plana, generalmente de vidrio. Este adsorbente presenta cierta capilaridad, dada por las partículas finamente divididas, las cuales permiten que la fase móvil pase entre ellas (10, 11).

La separación ocurre cuando uno de los componentes de la mezcla, es retenido en mayor grado por la fase estacionaria bajo efectos de polaridad, entre ésta, el componente y la fase móvil. La fase estacionaria, puede modificarse de acuerdo a las necesidades de separación aunque, el factor más importante para ésta, es la modificación de la fase móvil (10, 10).

El movimiento de cada sustancia en un determinado sistema, es característico y puede ser un dato valioso en la identificación de ella. Esta característica se conoce con el nombre de  $R_f$  ( relación de frente ) y representa la distancia recorrida por el compuesto, en relación a la distancia recorrida por la fase móvil, por lo que sus valores, siempre oscilan entre cero y uno. Una variante de esta cualidad, el  $R_x$  ( relación de standard ) el cual representa la distancia recorrida por una sustancia desconocida, en relación a la distancia recorrida por una sustancia de referencia, siempre presenta valores de uno. Ambas propiedades (  $R_x$  y  $R_f$  ), son de gran importancia en el campo del estudio analítico, ya que cuando se desarrollan perfectamente, generan una particularidad muy específica para identificar una determinada sustancia, siempre y cuando, se considere un buen sistema cromatográfico, con relación primordial a las características del soporte ( fase estacionaria ) y a la composición del eluyente ( fase móvil ).

Por otra parte, no todas las sustancias pueden observarse, esto es, que algunas o la gran mayoría de ellas son incoloras, por lo que en varias ocasiones, es necesario someter la placa

cromatográfica a un proceso de revelado, el cual deja al descubierto la presencia de sustancias incoloras. Dentro de los sistemas de revelado, se encuentran los destructivos y no destructivos, que como su nombre lo indica, van o no a alterar la estructura química de la molécula en estudio, para generar un color y poder observar su presencia. Entre los no destructivos, el más utilizado es el revelado bajo luz ultravioleta, en donde se obtiene una fluorescencia del compuesto, siempre y cuando éste sea capaz de emitirla; en los casos en que ésta no se presenta, se utiliza una fase estacionaria ( sílica gel ) preparada con un medio de contraste, el cual es capaz de emitir fluorescencia bajo luz ultravioleta, dejando zonas incoloras no fluorescentes, que ponen al descubierto la presencia de sustancias (10.11.10.20).

Entre los destructivos, los más utilizados son los vapores de yodo, ácidos, bases y agentes quelantes entre otros (10).

Con todo ello, la cromatografía es de gran utilidad en la caracterización de sustancias a nivel de desarrollo de sistemas y en el seguimiento de la reactividad funcional entre otros, ya que permite delimitar ciertas características que identifiquen a un compuesto del cual se desconoce su naturaleza.

#### DESARROLLO DE METODO DE SEPARACION CROMATOGRAFICA

El desarrollar un método, implica realizar una serie de estudios previos ya sean físicos, químicos o fisicoquímicos, los cuales van a delimitar la aplicación precisa y específica del mismo sobre una sustancia determinada. Por lo cual, el desarrollo de un método de separación cromatográfica se basa en la realización de pruebas de elución en diversos disolventes tanto polares como no polares y de polaridad media, analizando su comportamiento a nivel de disgregación o reparto a lo largo del soporte, y evaluando los respectivos  $R_f$ 's (10.70).

Cuando el producto a estudiar se dice que es semisintético o completamente sintético, por lo general, para obtener un buen sistema de cromatografía, se procede a preparar mezclas de análogos estructurales y/o biológicos puros, con la sustancia en estudio, tratando de simular un extracto de origen natural, o simplemente una mezcla problema; en estos casos, los métodos cromatográficos generados, son metodologías piloto o esquemas de diseño, que permiten en un momento dado, el tratar de aplicarlos

directamente sobre problemas reales, facilitando en la mayoría de las veces, la resolución de éstos, lo cual se logra mediante un buen diseño de separación de la mezcla, por estudios diversos en la selección del sistema eluyente (10,11).

La realización de un método cromatográfico, no sólo implica ( en el caso de sustancias incoloras ) la separación precisa de los componentes, sino también, el realizar un sistema de revelado que identifique perfectamente a cada una de las sustancias que conforman la mezcla problema, o cuando menos, que la sustancia de interés revele de manera diferente al resto de los componentes (11,12).

En sí, el desarrollo de un método de esta naturaleza, tiene gran aplicación dentro de la caracterización de sustancias, debido a que la información que se genera ( Rf's y coloración de revelado ) bajo un sistema bien elaborado, es muy particular, y en la mayoría de los casos, específica para una sustancia dada.

SISTEMAS REVELADORES

Dentro del análisis cromatográfico a nivel de capa fina, la obtención de un buen revelado es importante para identificar a uno o varios productos, sean estos o no análogos, facilitando con ello, los estudios en torno a una sustancia dada, ya sea a nivel de síntesis o caracterización entre otros (10,37).

Para diseñar un buen sistema de revelado, por regla general se utilizan reveladores "destructivos", los cuales les van a modificar la estructura original de la molécula, para formar compuestos derivados coloridos, ya sea por formación de sustancias que manifiesten físicamente alguna tonalidad, o bien, por formación de complejos de coordinación con átomos metálicos, los cuales presentan color. Aunque en algunos casos, se propicia la formación de derivados capaces de emitir fluorescencia bajo luz blanca o bien, ante luz ultravioleta.

Para poder efectuar un sistema apropiado de revelado, es necesario conocer a ciencia cierta, cuáles y cuántos son los grupos funcionales que conforman la molécula de una sustancia dada, pues en base a la reactividad funcional, es como se lleva a cabo el desarrollo de sistemas de revelado, los cuales pueden ser sencillos o complejos, permitiendo generar una particularidad colorida muy especial por formación de derivados específicos (10,11,18).

Así pues, los esteroides de tipo alcohólico por lo general, forman derivados coloridos y hasta en algunos casos fluorescentes, al reaccionar ante ácidos tales como el clorosulfónico, acético glacial, fosfórico y tricloroacético entre otros, a diferentes temperaturas que varían de los 80 a los 130 °C. La gran mayoría de los derivados esteroidales son incoloros, pero emiten fluorescencia, por lo cual, se puede utilizar un segundo revelador que reaccione, generando un compuesto colorido; para ello, se recurre a la formación de complejos de coordinación octahédrica, principalmente con el aluminio, debido a que este metal, forma fácilmente enlaces de coordinación con los átomos de una molécula, los cuales contengan pares electrónicos libres, principalmente con el oxígeno, halógenos y nitrógeno. El color generado, está estrechamente relacionado al número de ligandos coordinados con el aluminio, así como a la naturaleza química y estructural de los mismos (10,47,54,78).

Para revelar azúcares, se puede recurrir a la formación de colorantes polimetínicos o bien naftenodiónicos; estos últimos,



son compuestos que emiten fluorescencia a la luz del día, la cual se intensifica ante luz ultravioleta. En tanto que para lactonas, la formación de un ácido hidroxámico ligado a un átomo metálico de coordinación octahédrica, como el fierro, genera un revelado muy característico y particular a este tipo de compuestos (10,66).

Por otra parte, para moléculas de complejidad media, como los glucósidos cardíacos, los cuales tienen en su estructura grupos funcionales muy reactivos como las lactonas y la D-glucosa, en la mayoría de las veces, se emplean métodos de revelado que reaccionen con estas dos partes funcionales, aunque algunas ocasiones, se prefiere reaccionar a la base esteroidal. Cualquiera que sea el caso, la precisión y la especificidad en el revelado para un glucósido cardíaco, se encuentra en la formación de complejos de fósforo (cuya geometría de coordinación es bipiramidal trigonal), los cuales generan coloraciones características y muy particulares entre la diversidad de glucósidos cardíacos existentes (60).

En sí, el desarrollo de un buen sistema de revelado es crucial para el preciso desarrollo de un análisis cromatográfico y por ende, para la óptima caracterización de una sustancia en estudio.

#### INDICE DE REFRACCION

Cuando un rayo de luz pasa oblicuamente de un medio, hacia otro de densidad diferente, su dirección cambia al atravesar la superficie que los separa. A esto se le llama refracción. Si el segundo medio es ópticamente más denso que el primero, el rayo resultará más perpendicular a la superficie divisoria. El ángulo entre el rayo en el primer medio y la perpendicular de la superficie divisora, se llama ángulo de incidencia ( $i$ ), en tanto el ángulo correspondiente en el segundo medio, se le denomina ángulo de refracción ( $r$ ). El seno de  $i$  y el seno de  $r$  son directamente proporcionales a la velocidad de la luz en los dos medios. La proporción  $\text{sen } i$  entre  $\text{sen } r$ , se llama índice de refracción ( $n$ ) (10,11,14).

Si el rayo incidente está en el medio más denso, el índice de refracción será menor de uno; si está en el menos denso, será mayor que uno. Por lo general, se considera que el índice de refracción es mayor que uno, cuando el rayo pasa del medio

ópticamente menos denso ( generalmente aire ) hacia el más denso (11.30).

El índice de refracción de dos medios dados, varía con la temperatura y con la longitud de onda de la luz, y también con la presión, cuando se trata de un gas. Si estos factores se mantienen invariables, el índice de refracción, es una característica constante para el medio considerado y se emplea en la identificación y determinación de la pureza de sustancias, en la caracterización de las mismas y para el análisis de la composición de mezclas binarias homogéneas de constituyentes conocidos (11.40).

El índice de refracción de una sustancia transparente, disminuye en forma gradual, al aumentar la longitud de onda, excepto en las regiones de absorción donde el índice de refracción varía abruptamente. Al cambio de la refracción con la longitud de onda, se le llama dispersión. Debido a la dispersión, al expresar índices de refracción, es necesario especificar la longitud de onda. El símbolo " $n$ " con una "D" y un número "20", denota el índice de refracción para líneas D del sodio ( el doblete amarillo a 5890 / 5896 Å, evaluadas a 20 °C ) (10.40).

Los valores del índice de refracción para líquidos orgánicos, varía entre 1.2 y 1.8, mientras que los sólidos orgánicos fluctúan entre 1.3 y 2.5; por lo cual, la dispersión también es útil en algunos casos para la identificación de compuestos, ya sean líquidos, sólidos o gases (40).

#### pH

La escala de pH, es una serie de números que expresan el grado de acidez ( o alcalinidad ) de una solución, en comparación con la cantidad total de ácido o base de algún material previamente determinado, por medio de una titulación acidimétrica ( o alcalimétrica ). Tal como lo definió Sorensen, a quien se le debe la introducción del término (10.11.30).

Esta prueba se basa en la determinación de la cantidad de iones hidrógeno, empleando un instrumento potenciométrico, con sensibilidad para reproducir valores de pH de 0.05 unidades, usando un electrodo indicador de vidrio y un electrodo de referencia apropiado. El aparato debe detectar el potencial en

milivolts y en unidades de pH, a través del par de electrodos. El pH, se define convencionalmente como el logaritmo negativo de la actividad del ión hidrógeno (20).

Para la medición de pH, se utiliza ampliamente el electrodo de vidrio de alta calidad, elaborado con silicatos de litio con adición de iones lantano y bario. Estos iones, actúan como "tensores" de la red cristalina para retardar la hidrólisis del silicato y reducir la movilidad de los iones alcalinos, especialmente los de sodio. Los iones litio, son los principales portadores de carga móvil al aplicarse un campo eléctrico. Después de sumergir la membrana en agua, la capa superficial queda carente de  $\text{Li}^+$ , que son reemplazados por  $\text{H}^+$ . Practicamente, todos los centros aniónicos de la superficie del silicato, son neutralizados por iones  $\text{H}^+$ . El contenido de  $\text{H}^+$  disminuye en una forma compleja al aumentar la distancia hacia el interior de la membrana, mientras que la suma de iones positivos, portadores de carga y otros cationes, balancea la supuesta concentración uniforme de centros fijos.

La actividad del agua en la solución, parece tener un papel importante en el desarrollo de la respuesta al pH de una membrana de vidrio. Si la fuerza iónica es extremadamente alta, o si esta presenta una relación directa entre la higroscopicidad del vidrio y la respuesta al pH. Todos los electrodos de vidrio, deben acondicionarse por algún tiempo, sumergiéndolos en agua o en una solución reguladora diluida, a pesar de que después, pueden utilizarse en un medio que sólo sea parcialmente acuoso (20).

Como el mecanismo de este electrodo no implica un cambio de electrones, resulta ser el único electrodo sensible a los iones hidrógeno, al cual no perturban los agentes de oxidación o de reducción. Como los valores de pH dependen de la temperatura, las mediciones se deben efectuar a una determinada temperatura constante (10,11).

Como calibrador se emplea una solución reguladora, la cual puede definirse como una solución que mantiene casi constante su valor de pH, a pesar de la adición de cantidades sustanciales de ácido o base. Por lo general, un regulador consiste de una mezcla de ácido incompletamente disociado y su base conjugada. En la selección de un determinado regulador, deben considerarse tres características, el valor regulador, el valor de dilución y la variación de pH con cambios de temperatura.

En si, un análisis de medición de pH de una solución acuosa de un fármaco, es poco objetivo dentro de una caracterización de

sustancias a nivel de categorías tanto físicas como químicas y fisicoquímicas; pero no así, cuando la caracterización se desarrolla en vías de una evaluación farmacológica, en donde es necesario conocer, controlar y modificar el pH de toda sustancia que entra en un organismo vivo (10,30).

### PUNTO DE FUSION

El punto de fusión se define convencionalmente como la temperatura o intervalo de temperatura, a la cual una sustancia sólida se colapsa y funde completamente; en sí, es la temperatura a la cual se da una transición de un estado sólido a uno líquido, bajo el equilibrio de las presiones parciales de las respectivas fases coexistentes, debido al incremento en el choque molecular en la fase sólida al absorber energía térmica.

El punto de fusión, puede ir acompañado o no de la descomposición parcial o total de la sustancia misma, en estos casos, se debe reportar tal fenómeno (10,11,30).

Este estudio, puede ser considerado como una prueba de pureza siempre y cuando el producto no descomponga o bien, si su descomposición es constante, es decir, que siempre se manifieste de la misma manera a un cierto intervalo constante de temperatura (10,30).

Dentro de la caracterización de sustancias, el punto de fusión, es un parámetro de identificación si no primordial, si muy importante, ya que éste, es inherente a la naturaleza estructural y geométrica de cada compuesto en estado sólido.

### SOLUBILIDAD

La cantidad de una sustancia que se disuelve en otra, depende tanto de la naturaleza del soluto, así como del disolvente, de la temperatura y la presión. En general, el efecto de temperatura es muy pronunciado, por lo cual, su dirección depende del calor de solución. Si una sustancia se disuelve hasta la saturación con desprendimiento de calor (exotérmico), la solubilidad disminuye con el aumento de la

temperatura. Ahora bien, si una sustancia se disuelve con absorción de calor ( endotérmico ), la solubilidad se incrementa cuando se eleva la temperatura (10,14,18).

Por otra parte, los compuestos de carácter químico o funcional análogo, son más fácilmente solubles entre sí, que los de carácter diferente. Cuando entre dos sustancias existe semejanza química, la solución de ambas, guarda un agrupamiento no muy distinto de aquél de las sustancias puras, y ambas, guardan un equilibrio entre sí en solución. Cuando la naturaleza química de las dos sustancias es considerablemente diferente, no hay equilibrio y por lo tanto hay poca tendencia a la disolución, esto es debido a los efectos de atracción eléctrica como lo son la formación de puentes de hidrógeno y las fuerzas de Van der Waals, que aunadas al momento dipolar, propician que el efecto polar, sea el precursor primordial en el proceso de solubilidad, ya que lo semejante disuelve lo semejante, es decir, una sustancia sólida de características polares, será más probable solubilizarla en un medio polar que en uno no polar o de polaridad media y viceversa (10,14,20).

En si, la solubilidad se define como la capacidad que tienen los solutos para ser disociados en un medio de disolución, y se expresa como la cantidad de soluto dispersa por unidad de masa, en una determinada cantidad de disolvente por unidad de volumen (20).

Dentro del análisis de solubilidad para una óptima caracterización de una sustancia en estudio, se debe considerar la naturaleza de los disolventes, por lo cual, se hace una distinción entre los inertes y aquellos que son químicamente activos. En el caso de los inertes, el material disuelto no sufre cambios, mientras que con los disolventes activos, se observa un subproducto o subproductos del proceso de disolución. En ambos casos, la adición de un soluto produce solvatos, es decir, compuestos aparentes formados por moléculas de solventes más moléculas o iones del material disuelto, lo cual es posible mediante una unión parcial inducida por efectos de atracción eléctrica, como lo son las fuerzas de Van der Waals y en algunos casos, la formación de puentes de hidrógeno, siempre y cuando el soluto pueda formarlos. Las cuales contribuyen al proceso de solubilidad en la medida de que tan fácil y rápidamente se formen éstas (20).

Por lo tanto, obviamente cabe esperar, que se pueden obtener conclusiones útiles con respecto a la estructura molecular y la presencia de ciertos grupos, por el comportamiento de un material orgánico hacia una serie de

disolventes seleccionados, primordialmente inactivos y posteriormente activos. Estos últimos, para un análisis de solubilidad dentro de una caracterización de sustancias, resulta ser poco práctico, ya que la finalidad de la prueba de solubilidad en este caso, es el encontrar el medio o medios de disociación en donde el producto como tal, no sufra ningún tipo de alteración a nivel estructural y por ende a nivel químico; lo cual es importante para análisis subsecuentes en medios de disolución. Aunque desde otro punto de vista, resulta práctico el empleo de disolventes activos, para generar información básica para estudios específicos de reactividad química y halocromía entre otros (19,14).

### PROPIEDADES QUIMICAS

Dentro de un estudio de caracterización, después del análisis de definición y confirmación estructural (espectrofotometría de infrarrojo y cristalografía por difracción de rayos X), el desarrollo de la evaluación de propiedades químicas, es lo más importante, ya que estas permiten conocer la naturaleza química de una determinada molécula, además de que genera la información de reactividad necesaria para subsecuentes estudios, ya sea en desarrollo analítico, químico o biológico entre otros (20,24).

Una evaluación de propiedades químicas, está estrechamente ligada a las características de los grupos funcionales (ácidos carboxílicos, alcoholes, fenoles, aminas, iminas, amidas, carbamidas, tioles, furanos, hexosas, lactonas, éteres, esteroides, terpenos, quinonas, etc.), así, algunos pueden tener características ácidas, básicas, anfólicas, oxidantes o bien, reductoras entre otras; por lo cual, en base a estas propiedades, es como se debe diseñar un buen análisis de evaluación funcional, los cuales por lo general se realizan mediante reacciones específicas y de fácil detección, como lo es, la obtención de derivados de reacción de tipo colorido o bien, por formación de complejos de coordinación con átomos metálicos, y algunas veces, la combinación de ambos (sin que ello implique el no poder utilizar otro método de detección) de manera tal que permita evaluar físicamente mediante una manifestación o variación de color, las características químicas funcionales de cada uno de los sustituyentes de una molécula dada (24,27).

Por otra parte, dentro de la evaluación de propiedades químicas, de manera alterna, se debe considerar la reactividad de posibles sustancias residuales o contaminantes en un determinado compuesto, ya que estos pueden falsear los resultados de la experimentación; para evitar ello, es necesario el realizar un estudio de posibles contaminantes generados en el proceso de síntesis de una sustancia sintética o semisintética, y del proceso de extracción, en el caso de una de origen natural; los cuales, muchas de las veces, no se eliminan del todo debido a un mal proceso de purificación o bien, a que el producto es muy difícil de purificar (9,27).

También como contaminante se debe tomar en cuenta a la humedad ( $H_2O$ ) ya que en el mayor de los casos, se encuentra aún en sustancias purificadas exhaustivamente, a consecuencia de su higroscopicidad, y a que en algunos casos, esta interfiere en determinados procesos de análisis químico; para lo cual, se debe evaluar la presencia de ella, para verificar si la cantidad residual de humedad, puede o no interferir en el proceso; además de evaluar posibles sustancias volátiles, como disolventes orgánicos residuales (9,24,27).

En sí, tanto un análisis de residuos, como un análisis de reactividad funcional, son de gran importancia para la evaluación de las propiedades químicas de una sustancia dada y por lo consiguiente, para la óptima caracterización de la misma.

#### ANALISIS RESIDUAL

Un análisis de este tipo, comprende un estudio minucioso de posibles materiales residuales, los cuales son contaminantes en una determinada sustancia. Estos, pueden provenir del proceso mismo de obtención a consecuencia de una técnica inadecuada de purificación, o bien, que se hayan acumulado por un mal manejo del compuesto, así como por una inadecuada preservación de la misma (10,24,27).

Se debe considerar como material residual, a todo aquel compuesto ya sea orgánico o bien inorgánico, el cual es ajeno a la naturaleza física y química de la sustancia de interés. Así pues, el agua se considera como un contaminante en un compuesto dado, siempre y cuando no se halle formando hidratos; por lo cual, tanto el análisis de agua residual como el de sustancias orgánicas e inorgánicas entre otros, son pruebas alternativas en

la caracterización de un producto, las cuales permiten evaluar la naturaleza de posibles productos de interferencia, así como de la pureza de una sustancia en estudio (10,11,12).

#### ANALISIS DE BROMO RESIDUAL

El bromo elemental que ha sido producido durante la reacción de oxidación de los compuestos orgánicos, por el ácido cromosulfúrico, puede ser detectado directamente y en cantidades mínimas, por reacción con el p-aminofenol, ya que forma un producto azul, el cual es soluble en agua. La base de la reacción de color estriba en que el producto de la oxidación inicial, es una p-quinonimina, que reacciona con el p-aminofenol inalterado para formar una indamina (13,14).

El color azul de la indamina formada es específico para el bromo, ya que con el cloro no hay presencia de color y con el yodo, reacciona formando un color pardo (15).

Esta prueba química, es de las más socorridas cuando no se cuenta con el equipo necesario para detectar al bromo, por el método de absorción atómica.

#### DETERMINACION DE HUMEDAD

El método más usual para determinar el contenido de agua de un sólido, consiste en secar en la estufa, un peso de muestra y a continuación, estimar gravimétricamente el agua liberada, ya sea por la pérdida de peso de la muestra o gracias al aumento de peso de un absorbente del agua. La principal ventaja de este método estriba en su sencillez; por desgracia, esta sencillez no se extiende necesariamente a la interpretación de los datos obtenidos por ese procedimiento, ya que con el aumento de la temperatura, pueden ocurrir otros procesos diferentes además del desprendimiento de agua, tales como volatilización de otros componentes; descomposición de uno o más participantes para dar productos gaseosos, o incluso oxidación de algún compuesto de la muestra por el aire. Los dos primeros efectos causan disminución del peso de la muestra; la oxidación lo aumenta si los productos de reacción no son volátiles, y lo disminuye



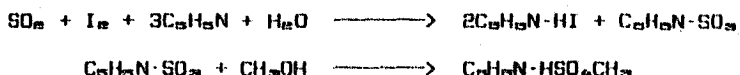
cuando lo son. La superposición de estos inconvenientes, origina una incertidumbre sobre la temperatura adecuada para conseguir eliminar totalmente el agua. El calentamiento a 105 °C expulsará la humedad adsorbida y a veces, también el agua esencial. Por otro lado, a esta temperatura suele ser bastante incompleta la supresión del agua absorbida y la ocluida. Muchos minerales, así como sustancias tales como la alúmina y la sílice, necesitan temperaturas de 1000 °C o más, para eliminar todo vestigio de agua (10.11.4a).

Así pues, viendo los inconvenientes de esta técnica, se han diseñado métodos por destilación, los cuales operan muy prácticamente para determinar agua en materiales que se oxidan fácilmente en el aire, utilizándose ampliamente para compuestos orgánicos tales como grasas, aceites, ceras, cereales, productos vegetales y alimentos (10.4a).

La cromatografía gas-líquido, ha sido otro diseño para determinar el contenido de agua en sustancias líquidas. Así también, los métodos espectrofotométricos en la región infrarroja, se utilizan para detectar agua en productos tales como miel, patatas, frutas, café y harinas entre otros, mediante una dispersión de la muestra en dimetilsulfóxido, el cual extrae casi por completo la humedad, y posteriormente, evaluada su absorbividad en la región infrarroja (10.4a).

Pero en sí, los métodos químicos son los más socorridos para la determinación de humedad; así, se han descrito muchos métodos químicos para determinar el agua. Sin lugar a dudas, el más importante de éstos, consiste en emplear el reactivo de Karl Fisher, que es bastante específico para el agua.

El reactivo de Karl Fisher consta de yodo, dióxido de azufre, piridina y metanol. Al añadir éste reactivo al agua, se desarrollan las siguientes reacciones cuantitativas (10.11.2a):



Después de que el agua ha reaccionado con el yodo libre en la solución, produce un cambio de color suficientemente intenso para poder establecer visualmente el punto final. El cambio de color, va desde el amarillo característico de los productos de reacción, al pardo del exceso de reactivo. El punto final de la titulación, se puede determinar alternadamente mediante el

empleo de electrodos polarizables y utilizando un microamperimetro (10.11.44.45).

Este método tiene una gran aplicación en un gran número de sustancias. Aunque la variación de la técnica depende directamente de la solubilidad del material, la forma en la cual se encuentra retenida el agua y el estado físico de la muestra. Si puede disolverse ésta en metanol, resulta factible una determinación rápida y directa. Si no es posible disolver la muestra en este reactivo, la valoración directa da una reacción incompleta. Sin embargo, se logran a menudo resultados satisfactorios añadiendo un exceso de reactivo y valorando por retroceso con una disolución patron de agua en metanol, tras un tiempo de reacción adecuado (10.11.45).

También se presentan dificultades en el análisis de la humedad sorbida y del agua ligada fuertemente como hidrato. Para estas, se recurre a técnicas de extracción, las cuales suelen ser efectivas (10.11).

En sí, la determinación de humedad en una sustancia dada, ya sea por cualquier método, es de gran importancia dentro de la caracterización, ya que ésta, es una particularidad en determinados compuestos con características hidrofílicas.

#### PERDIDAS POR SECADO E IGNICION

Tanto la pérdida por secado como la pérdida por ignición, para sustancias sólidas, son pruebas térmicas cuya finalidad primordial es determinar el porcentaje de materia volátil, generalmente agua residual, contenida en una muestra, bajo condiciones bien establecidas. Para lograr ello, se recurre a los métodos por secado en estufa u horno y raramente en muflas, estimando gravimétricamente la liberación de la o las sustancias volátiles, mediante la pérdida de peso al someter la muestra a un proceso de calentamiento constante, durante un margen prolongado de tiempo (10.11.47).

La mayoría de las veces, un estudio de pérdida por secado, involucra un tratamiento térmico aproximadamente de 10 a 50 °C por arriba de la temperatura de ebullición del agua, para asegurar la eliminación de ésta, durante un determinado tiempo de exposición. En tanto que para la pérdida por ignición, por regla general, se efectúa a una temperatura de 5 a 10 °C por

abajo del punto de fusión o sublimación del compuesto en estudio; lo cual implica que esta prueba, está restringida sólo para compuestos con punto de fusión o de sublimación muy por arriba de la temperatura de ebullición del agua (27.30).

Ambos métodos son aplicables, siempre y cuando la sustancia en estudio no sea susceptible de sufrir alteraciones por el proceso de exposición prolongada a la temperatura, con acceso directo de aire, lo cual se ve favorecido en la pérdida por ignición, ya que a pesar de no ser una prueba destructiva, en un gran número de casos, ciertas sustancias, pueden sufrir una transformación por efecto térmico, como por ejemplo, la generación de un anhídrido, o bien, en ambos procesos, puede suscitarse la volatilización de productos de descomposición térmica, además de generar productos de oxidación. Ambos casos propician alteraciones en la determinación del porcentaje de material volátil, debido a que el primer efecto puede ocasionar una elevación en la determinación de sustancias volátiles, y si lo son, puede incrementar desmesuradamente la evaluación (10).

Estas técnicas, son de gran aplicación en una caracterización de un determinado compuesto, siempre y cuando éste, no sea termolabil; ya que de manera directa, generan información en cuanto al porcentaje constitutivo de sustancias volátiles residuales y por lo consiguiente, contaminantes en una sustancia dada; pero de manera indirecta, puede reportar cierto grado de afinidad a retener agua, cuando el estudio de caracterización va encaminado hacia ese fin (27.30).

#### REACTIVIDAD FUNCIONAL

Uno de los conceptos más importantes de la química orgánica es el de grupo funcional. Un grupo funcional, es un agregado de uno o más átomos que conforman una molécula cuya presencia confiere a ésta, cualquiera que sea el resto de su estructura, un comportamiento químico único, y sobre todo específico, lo cual es característico de un grupo funcional. Para ilustrar esto, considerese los tres compuestos A, B y C de la figura 4.2.A.. Todos contienen el grupo formilo ( $-CH=O$ ), el cual es característico de los aldehídos, y presenta un comportamiento químico similar. Por ejemplo, se puede reducir (H) al grupo formilo en cada uno de los casos (A, B y C) para obtener miembros representativos de otra clase de compuestos llamados alcoholes, todos los cuales contienen al grupo  $-OH$  como

grupo funcional. De manera similar, se puede oxidar ( O ) cada aldehído al correspondiente ácido carboxílico que contiene la función -COOH. Por último, cada aldehído puede reaccionar con hidroxilamina ( H<sub>2</sub>N-OH ), para dar los miembros de una clase de compuestos llamados oximas, cuyo grupo funcional es -CH=N-OH.

Se ve en seguida que cada una de las transformaciones químicas anteriores, es completamente independiente del grupo unido a la función -CH=O. Por lo cual, se infiere que las

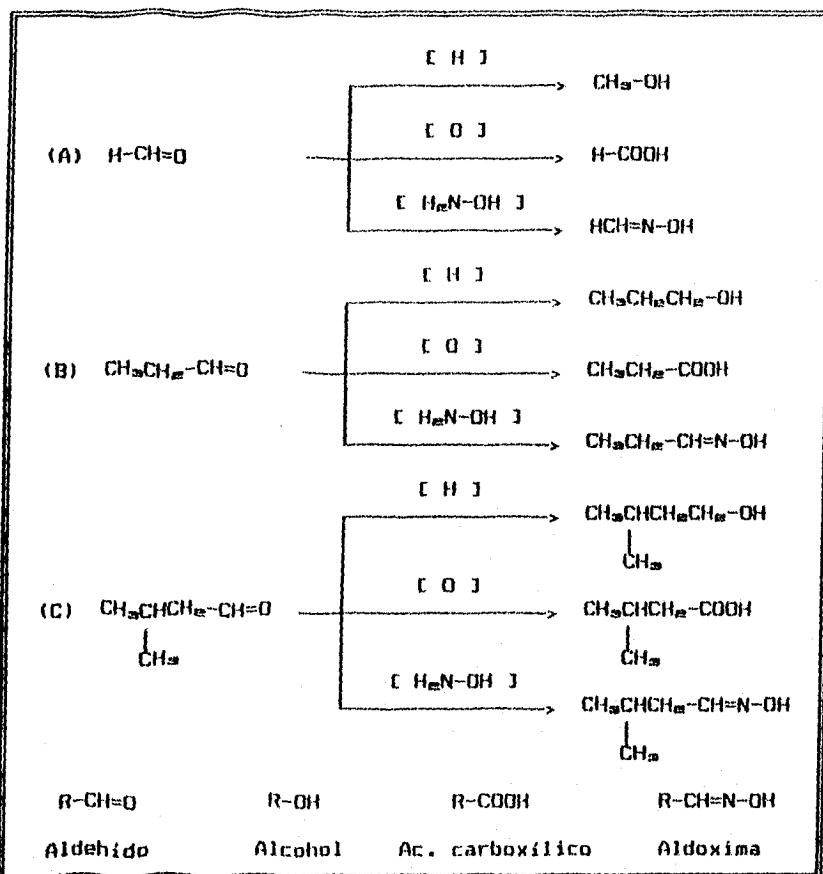


Fig. 4.2.A. Ejemplos de reactividad de un grupo funcional.

características químicas comunes compartidas por los aldehidos, se deben al comportamiento del grupo formilo y no al resto de la molécula. De la misma manera, los alcoholes, ácidos carboxílicos y oximas, muestran sus propiedades químicas específicas, determinadas en cada caso sólo por el comportamiento característico de los grupos funcionales  $-OH$ ,  $-COOH$  y  $-CH=N=OH$  respectivamente. El comportamiento químico distinto de los diferentes grupos funcionales da origen a las diversas clases de compuestos orgánicos. Así, los miembros de cada clase comparten unas propiedades químicas comunes, las cuales están determinadas por el grupo funcional común y que difieren de las propiedades características de otras clases.

Puesto que el comportamiento químico de las distintas clases es esencialmente independiente del esqueleto de carbono unido al grupo funcional, a menudo resulta conveniente el realizar un estudio descriptivo general de las diversas clases de compuestos. En la serie alifática, se emplea el símbolo "R" para designar un grupo alquilo, el cual se obtiene al eliminar un átomo de hidrógeno de la fórmula de un hidrocarburo alifático. En la serie aromática, "Ar" designa un grupo arilo, obtenido al eliminar un átomo de hidrógeno de la fórmula de un hidrocarburo aromático. Así, en la serie alifática, los aldehidos, alcoholes, ácidos carboxílicos y oximas, se pueden generalizar por  $R-CH=O$ ,  $R-OH$ ,  $R-COOH$  y  $R-CH=N-OH$ , respectivamente mientras que en la serie aromática, estas clases se designan  $Ar-CH=O$ ,  $Ar-OH$ ,  $Ar-COOH$  y  $Ar-CH=N-OH$ . No obstante, debemos hacer hincapié en que en ciertos casos específicos, las propiedades de determinados grupos funcionales se pueden modificar en alguna extensión por la naturaleza del grupo R o Ar al que están unidos, y en algunos casos, estos efectos pueden ser considerables (13, 27, 24, 25).

De manera similar, ocurre con toda la gama existente de grupos funcionales, por lo cual, la evaluación de la reactividad de los mismos es de suma importancia en la caracterización de sustancias, ya que en sí, el análisis de reactividad funcional es esencial para que ésta se efectúe satisfactoriamente, debido a que de ello depende tanto la precisa definición de los mismos, como de toda la serie de estudios analíticos posteriores que delimiten la naturaleza de un determinado componente en estudio.

GLUCOSIDOS CARDIACOS

Los glucósidos cardiacos, tienen una estructura muy semejante entre si, ya que son cicloacetales mixtos de azúcares y un esteróide alcohólico. La porción de la molécula sin azúcares, se denomina aglicona o genina. Todas las geninas de los glucosidos cardiacos tienen grupos hidroxilo en las posiciones carbón-3 y carbón-14, un grupo metilo en C-10 y C-13, un aldehído o hidroximetilo en serie y un anillo de lactona insaturado en el carbón-17 de la base esteroidal. Algunas geninas más complejas, pueden tener además grupos metilo, hidroxilo o aldehído en otras posiciones. El núcleo esteroidal difiere del grupo de las hormonas sexuales y corticosuprarrenales, debido a la fusión cis-trans-cis de los anillos A y B, B y C, así como de C y D, respectivamente, lo cual propicia que cada anillo fusionado del esteróide, adquiera una conformación de silla, ocasionando que la molécula no sea plana o parcialmente plana como en las hormonas y corticosuprarrenales que tienen una fusión cis-trans-trans. El grupo metilo o demás sustituyentes en C-10 y C-13, el hidroxilo en C-14 y el anillo lactónico en C-17, todos, están orientados arriba del plano del anillo esteroidal ( configuración  $\beta$  ). Los sustituyentes en C-3, por lo general, suelen estar orientados en posición  $\beta$ , sin que ello implique que no los haya en posición  $\alpha$ . El anillo de lactona, que es un éster cíclico, puede tener cinco o seis miembros con uno o dos enlaces dobles, respectivamente, y tienen una estructura plana debido a la presencia de los enlaces dobles (7.7.13.10).

La porción azúcar del glucósido, puede ser constituida por una o cuatro porciones o unidades monosacáridas, tales como glucosa, ramnosa y fructosa entre otras (84.00).

Como se puede observar, los glucósidos cardiacos, son sustancias con una variedad considerable de grupos funcionales, por lo cual, su reactividad se evalúa en función de los sustituyentes más activos que lo conforman, como es el caso de la porción azúcar y del éster cíclico ( lactona ), aunque en pocas de las veces, un análisis de reactividad se encamina a los hidróxilos esteroidales, hidroximetilos, aldehídos o bien, a cualquier otro sustituyente, pero casi nunca, va orientado hacia los grupos metilo, debido a que estos son sumamente estables.

Así pues, al evaluar la reactividad de un glucósido cardíaco por la porción azúcar, por lo general, se emplean reacciones de sustitución nucleofílica para insertar grupos específicos que permitan delimitar, mediante reacciones

secundarias, la presencia o ausencia del glucósido mediante la evaluación de la porción genina.

Por otra parte, se puede llevar a cabo una reacción en el anillo lactónico, formando hidroxamatos, entre otros productos, los cuales al ser acomplejados con iones metálicos como fierro ( III ), se obtienen compuestos de coordinación específicos, los cuales por lo general, presentan coloraciones muy particulares; o bien, se puede combinar la reactividad de la lactona con la del azúcar para aumentar la especificidad en la evaluación de la reactividad de un glucósido cardíaco (10,87).

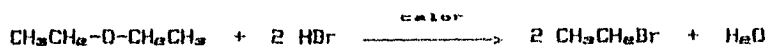
Con relación a los hidroxilos, estos suelen tener un comportamiento de tipo alcohólico, por lo cual, pueden sufrir reacciones de alcoholes secundarios o terciarios, según la posición de donde se encuentre unido, ya sea en el carbón-15 o bien en el 14 de la base esteroideal, respectivamente. Cuando se evalúa la reactividad por un grupo hidroxilo esteroideal, se debe considerar la actividad del azúcar y de la lactona ante ciertos medios, debido a que estos son mucho más reactivos que el hidroxilo de interés; para lo cual, se deben emplear reacciones selectivas, o bien, bloquear a dichos grupos funcionales para neutralizar su actividad (84,88,87).

En sí, la evaluación de la reactividad de un glucósido cardíaco a nivel global, es sumamente tediosa, por lo cual, se recurre al desarrollo de métodos que actúen por la porción azúcar y/o la porción lactona y en algunos casos, hasta la combinación de azúcar, lactona e hidroxilo esteroideal (7,9,10).

Por otra parte, la determinación de la reactividad de un glucósido cardíaco, es de gran importancia cuando se caracteriza a éste tipo de sustancias, ya que ello, permite poner en evidencia la presencia o ausencia del mismo (10).

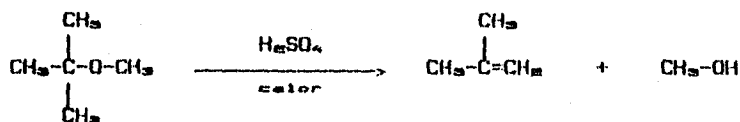
GRUPO ETER

Los éteres son relativamente inertes a casi todos los reactivos. Son estables ante bases, la hidrogenación catalítica y la mayoría de los demás agentes reductores. También son estables con ácidos diluidos; pero reaccionan con ácidos concentrados calientes. Por ejemplo, el HBr o HI fuertes, producen su separación (84).

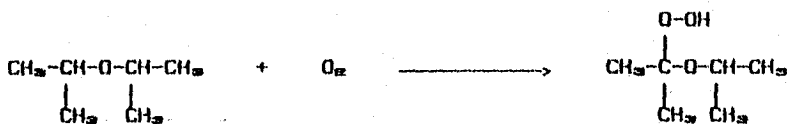


El mecanismo de la reacción comprende un desplazamiento de tipo  $\text{S}_{\text{N}}2$  realizado por el ión bromuro en el éter protonado. El alcohol producido reacciona posteriormente con HBr para producir más bromuro de alquilo (84,85).

En los éteres secundarios y terciarios, participan los iones carbonio y las reacciones tienden a ser más complejas. Al calentar estos éteres con un ácido fuerte, la principal reacción conduce casi siempre a la eliminación (86).



Por otra parte, una de las reacciones más importantes de los éteres es hasta cierto punto inconveniente, es decir, la reacción con el oxígeno atmosférico para formar peróxidos y perácidos (autooxidación) (84,87).



La autooxidación se produce debido a un mecanismo de radicales libres (84,87).



Casi todos los éteres que se exponen a la atmósfera durante cierto tiempo, contienen invariablemente peróxidos. Los peróxidos y los hidroperóxidos, son peligrosos debido a que se descomponen violentamente a temperaturas elevadas y pueden producirse explosiones severas (25.97).

Una prueba sencilla para identificación de peróxidos, consiste en agitar un volumen pequeño del éter con una solución acuosa de KI. Si hay peróxidos presentes, oxidarán el  $I^-$  a  $I_2$ . La coloración morada del  $I_2$  denota la presencia de peróxidos (27).

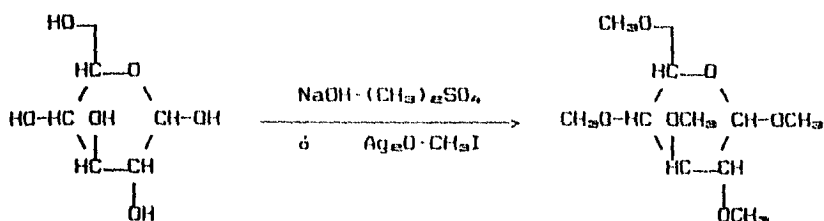
En sí, la determinación de la reactividad de un grupo éter, es de gran importancia cuando se caracteriza a una determinada sustancia, ya que mediante ésta, se pone de manifiesto la presencia o ausencia del mismo en un determinado compuesto.

#### GRUPO D-GLUCOSA

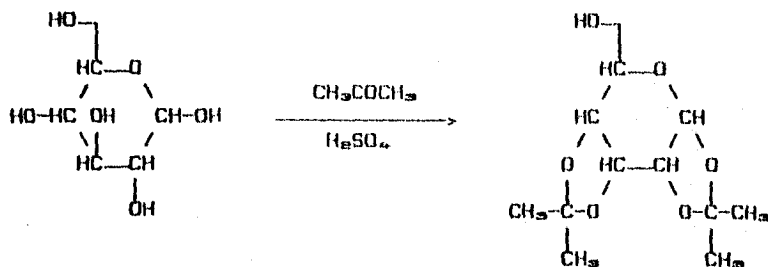
El término carbohidrato, se utiliza de una manera muy vaga para caracterizar un grupo general de productos naturales relacionados con azúcares simples. Dicho nombre se empleó inicialmente, debido a que este tipo de azúcares, como por ejemplo la glucosa ( $C_6H_{12}O_6$ ), poseen fórmulas moleculares que parecen ser "hidratos de carbono", esto es,  $C_6H_{12}O_6 = (C \cdot H_2O)_6$ . Aunque las investigaciones estructurales subsecuentes pusieron de manifiesto que este concepto simplista era erróneo, pero aún así, persistió el uso del término carbohidrato (24.22).

Los azúcares, llamados también sacáridos, son el tipo más simple de carbohidratos, como por ejemplo, la glucosa, que es el hemiacetal cíclico de uno de los diastereómeros del 2,3,4,5,6-pentahidroxihexanal; el cual, en solución parece estar en equilibrio con una cantidad diminuta de la forma no cíclica del pentahidroxialdehído (25.27).

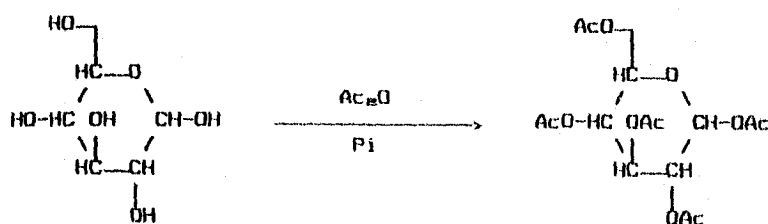
La D-glucosa por ser un monosacárido, su reactividad no es tan compleja como en el caso de oligosacáridos (moléculas constitutivas de 2 a 8 monómeros) y polisacáridos (unidades constitutivas de más de 8 monómeros). Así, el monómero de D-glucosa puede sufrir reacciones de formación de éter, mediante la síntesis de Williamson (24.22).



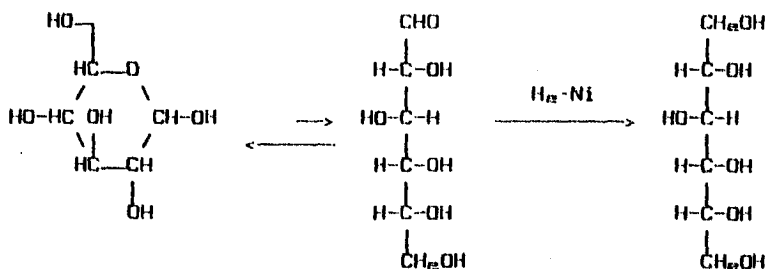
También pueden sufrir reacciones de formación de acetales y cetales cíclicos. El mecanismo se complica a menudo debido al hecho de que el tamaño del anillo del producto no es el mismo que el del azúcar libre (24).



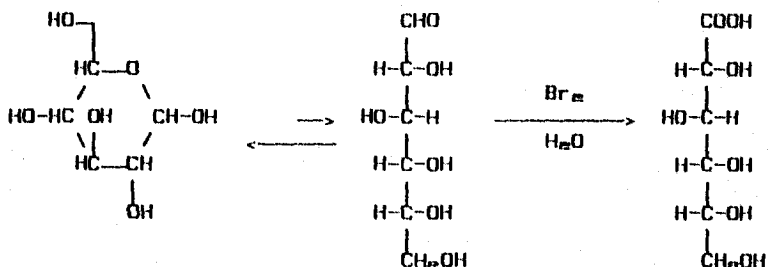
Los grupos oxhidrilo de los azúcares, se esterifican para formar acetatos, mediante el empleo de anhídrido acético y un catalizador básico suave, por ejemplo, acetato de sodio o piridina (24).



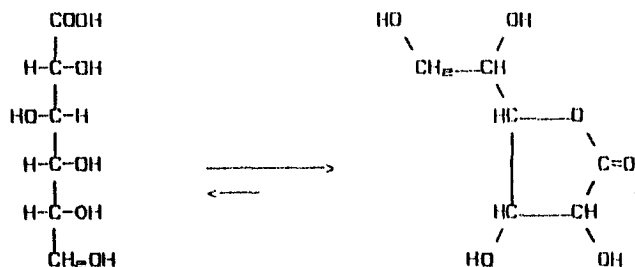
Mediante la aplicación de diversos métodos, los monosacáridos se reducen a polialcoholes correspondientes, que constituyen una clase denominada alditoles. La reducción de la D-glucosa da D-glucitol que también se conoce como D-sorbitol. La reducción ocurre en la pequeña cantidad de la forma de cadena abierta que está presente en equilibrio con la forma cíclica. A medida que la forma de cadena abierta se va substrayendo con este método, el equilibrio varía continuamente hasta que se reduce todo el azúcar (85,87).



Los azúcares se oxidan siguiendo diferentes métodos, entre los más comunes está el empleo de bromo en una solución tamponada a un pH de 5 a 6 (84,87).

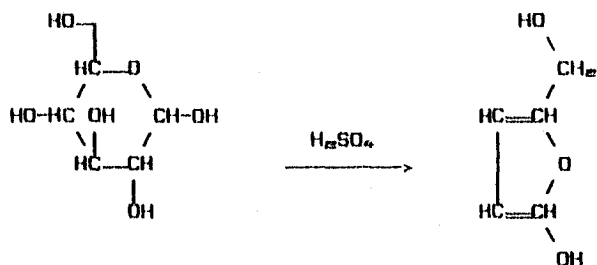


En vista de que el producto obtenido es un ácido 4-hidroxiácido, este ácido, se lactoniza con extrema facilidad. Aunque en principio se pueden formar lactonas de cinco o seis miembros, siendo las más estables las de cinco miembros (84,88).



Entre otros agentes oxidantes, se pueden emplear  $\text{Cu}(\text{OH})_2$ ,  $\text{AgOH}$ ,  $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{HIO}_4$  (64).

Por último, los azúcares en medio ácido fuerte bien controlado, sufren una deshidratación, para posteriormente condensarse y generar un furano, el cual es poco estable en



medio ácido ya que tiende a la polimerización si éste no se encuentra debidamente regulado (64,67).

En general, la determinación de la reactividad de un grupo D-glucosa, es de suma importancia, cuando lo que se desea es caracterizar a un determinado compuesto, debido a lo cual, se pone en evidencia la presencia o ausencia de un grupo D-glucosa, en una determinada sustancia.

GRUPO HIDROXILLO ESTEROIDAL

Los hidróxilos esteroidales de tipo digital, siguen un comportamiento de reactividad muy parecido al de un alcohol de tipo secundario o bien terciario (35.04).

Los alcoholes son clases muy importantes de compuestos orgánicos, debido a que el grupo hidróxilo se convierte con facilidad, casi en cualquier otro grupo funcional (34.05.07).

La oxidación de los alcoholes, conduce a las cetonas, aldehídos y ácidos carboxílicos. Estos grupos funcionales, a su vez, participan en una gran variedad de reacciones. Por esta razón, la oxidación de los alcoholes, es la reacción orgánica más común (04).

Los alcoholes secundarios se oxidan fácilmente para dar rendimientos excelentes de cetonas. En general, el empleo de ácido crómico constituye el procedimiento más eficiente para oxidar alcoholes secundarios, formando una cetona, en tanto que un primario origina un aldehído; mientras que un alcohol terciario, al no tener átomos de hidrógeno enlazados al átomo de carbono del alcohol, no puede sufrir una oxidación sin que se sucite una ruptura de los enlaces carbono-carbono, por lo cual, la oxidación de un alcohol terciario, requiere de condiciones drásticas, además, de que se produce una mezcla de compuestos. Entre otros oxidantes, se puede emplear permanganato de potasio o bien, óxido cúprico (04.00).

La reducción de alcoholes a alcanos, no es una reacción que se lleve a cabo con frecuencia, ya que elimina un grupo funcional, dejando pocas opciones para reacciones posteriores. Entre los agentes reductores más comunes, esta el LiAlH<sub>4</sub> con cloruro de aluminio o bien, cloruro de titanio. También puede emplearse para reducir un alcohol, cloruro de tosilo en piridina y posteriormente el tetrahidruro de litio-aluminio (15.04).

Uno de los motivos por los cuales, los alcoholes son intermediarios químicos versátiles, es debido a que el grupo hidróxilo, puede reducirse mediante diversos grupos funcionales. En general, esto se puede llevar a cabo de dos formas. Un alcohol, es un nucleófilo débil; los electrones no enlazantes en el átomo de oxígeno, pueden atacar un electrófilo fuerte. Por ejemplo, un alcohol ataca un carbocatión, o bien, el alcohol puede convertirse en el ión alcóxido que es un nucleófilo fuerte que ataca a electrófilos débiles (7.15.10).

Un alcohol es un mal electrófilo, porque el grupo hidroxilo es un mal grupo saliente. El grupo hidroxilo, se puede convertir en un buen grupo saliente ya sea por tosilación o por protonación (B4.03,07).

En solución ácida, un alcohol está en equilibrio con su forma protonada. La protonación, convierte al grupo hidroxilo, que era un pésimo grupo saliente, en un buen grupo saliente. En su forma protonada, el grupo hidroxilo puede eliminarse como una molécula de agua. Una vez que se protona el alcohol, son posibles todas las reacciones normales de sustitución y eliminación, dependiendo de la estructura del alcohol, es decir, si es primario, secundario o terciario (B4.04).

Los alcoholes también son susceptibles de sufrir reacciones de esterificación de tipo Fischer, entre otras variaciones de reacciones específicas (B4.07).

En si, la determinación de la reactividad de un grupo hidroxilo esteroideal, es de gran utilidad cuando se caracteriza un determinado compuesto, ya que mediante ello, se pone de manifiesto, la presencia o ausencia de un grupo funcional de esta naturaleza, en una determinada sustancia.

#### GRUPO LACTONA

Las lactonas, son ésteres de carboxilato formadas intramolecularmente a partir de un ácido oxhidrónico, por lo cual, son consideradas como ésteres cíclicos. En función de la cadena alquímica ciclada en el ácido oxhidrónico, las lactonas se clasifican en alfa ( $\alpha$ ), beta ( $\beta$ ), gamma ( $\gamma$ ) y lambda ( $\delta$ ) (Fig. 4.2.5.A.). Las  $\alpha$ -lactonas, son compuestos inestables con anillos de tres miembros. las  $\beta$ -,  $\gamma$ - y  $\delta$ -lactonas, tienen anillos de cuatro, cinco y seis miembros respectivamente, y son más estables que las de tipo  $\alpha$ -, principalmente las de tipo  $\gamma$  y  $\delta$ , debido a que las  $\beta$ , por lo general, son muy difíciles de formar (B4.07).

De todas las reacciones que pueden sufrir las lactonas, la hidrólisis tanto ácida como básica y la formación de complejos de hierro III, coordinados con el ácido hidroxámico, resultan de la aminólisis de una lactona, son las reacciones más importantes en la evaluación de reactividad funcional de ésteres cíclicos, constitutivos en una molécula en vías de caracterización (17).

Así pues, las lactonas al igual que los ésteres acíclicos, son hidrolizados por ácidos o bases acuosas, para producir un ácido carboxílico más un alcohol, lo cual ocurre en los ésteres acíclicos, y en las lactonas, se forma un ácido oxhidrílico de tipo  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  o  $\delta$ , según la naturaleza del éster cíclico que lo

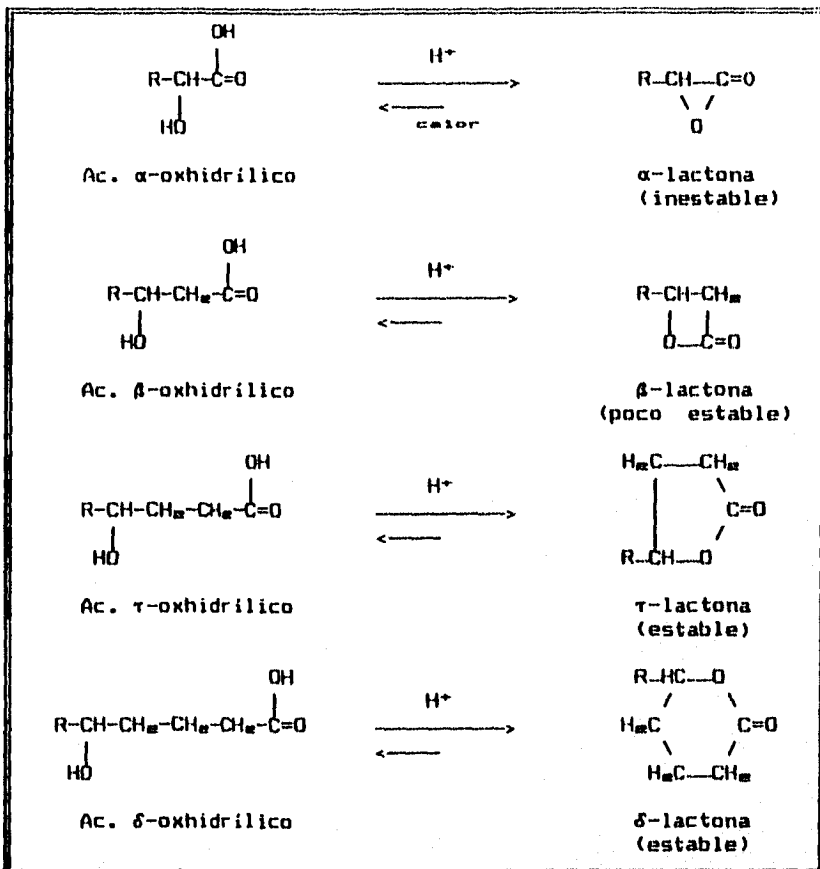


Fig. 4.2.5.A. Clasificación de lactonas en base a la naturaleza del ácido oxhidrílico que las forma.

origina. La hidrólisis ácida de ésteres, puede ocurrir por más de un camino, dependiendo de la estructura del sustrato; sin embargo, el camino usual es justamente el inverso de la reacción de esterificación de Fischer. En tanto que una hidrólisis básica, ocurre por la vía típica de sustitución nucleofílica directamente al acilo, en el cual, el ión hidróxilo (nucleófilo) se une al grupo carbonilo del éster para formar un intermediario tetraédrico. La pérdida del ión alcóxido produce entonces un ácido carboxílico, que es desprotonado para formar la sal de carboxilato. El ácido libre se obtiene al adicionar un ácido mineral en medio acuoso, para protonar el carboxilato (10,27).

Por otra parte, las lactonas reaccionan formando ácido hidroxámico, por efecto de la hidroxilamina en medio alcalino, lo cual es posible mediante un ataque típico de sustitución nucleofílica en el acilo, para producir el hidroxamato respectivo (17,24).

Los ácidos hidroxámicos, son sustancias capaces de formar rápidamente complejos coloridos con el ión hierro III en medio ácido, generando tonalidades muy particulares, las cuales varían en función de la naturaleza estructural, ya sea alquímica o bien arílica, unidas al ácido hidroxámico ligado al ión  $Fe^{+3}$  (10,17).

#### FORMACION DE COMPLEJOS METALICOS

Un complejo metálico es el resultado de la coordinación de un ión metálico con una especie que tenga uno o más pares electrónicos no enlazantes, disponibles para ser compartidos. A la especie donadora de electrones se le llama ligando (del latín "ligare", unir) o formador de complejos. Al ión metálico del complejo se le llama ión central. El ligando puede tener uno o más grupos donadores de electrones en cada molécula, por lo cual, se clasifican en uni-, bi-, tri-, tetra-,..., multidentados (del latín "dentatus", con dientes). Al número máximo de ligandos unidentados que pueden coordinarse con un cierto ión central, se le llama número máximo de coordinación de dicho ión. La carga de un complejo es igual a la suma algebraica de la carga del ión central y de los ligandos. Por consiguiente, un complejo metálico puede ser neutro o de carga positiva o negativa (17,27).

Cuando un ligando es multidentado, esto es, cuando tiene dos o más grupos donadores en una sola molécula, existe la





posibilidad de que se forme una estructura anular con el ión central. A estas estructuras se les llama esferas de coordinación o anillos quelados. El término resulta muy apropiado, pues el ión central está sostenido en el anillo como en las tenazas de un cangrejo. A la totalidad del complejo multidentado se le llama complejo quelado o simplemente quelato (del griego "chele", tenazas de cangrejo). La estabilidad de una esfera de coordinación llega a su máximo cuando tiene 5 a 6 miembros en la estructura (7.17).

Cabe hacer notar, que todos los iones metálicos en solución acuosa están presentes en forma de complejos, al menos como complejos acuo. El átomo de oxígeno de la molécula de agua, actúa como donante electrónico. Por ejemplo, el ión hierro III en agua, existe como  $\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6^{+3}$  aunque al escribir se haga, por simplicidad, en la forma no solvatada, esto es,  $\text{Fe}^{+3}$ , a menos que se quiera especificar la solvatación (7.17.27).

La mayor parte de los complejos de coordinación, solo son estables en disolución, ya que al sufrir ésta una variación en su composición, los esqueletos se rompen formando nuevas coordinaciones que no corresponden al punto objetivo del análisis inicial. Aunque existen esferas de coordinación sumamente estables, aún fuera del medio que las genera, siempre y cuando se les de una idónea preservación, y ello se debe a que ciertas sustancias donadoras de pares electrónicos, se ligan más fuertemente a un determinado átomo metálico que otras; tal es el caso de las clorofilas y hemoglobina, que son complejos muy especiales de coordinación cuyo ión central es el  $\text{Fe}^{+2}$ , así también, los anillos quelados de E.D.T.A., con átomo central de plomo o bien de calcio, entre otras especies de quelatos (7.2).

Los complejos de coordinación no sólo pueden ser formados por átomos metálicos ya que especies como fósforo V, pueden formar con facilidad una gran gama de quelatos, desde monodentados hasta multidentados, siendo mas estables unos que otros, según la afinidad a la naturaleza estructural del o los ligandos (17).

Para todo estudio de formación de complejos de coordinación, es necesario conocer a ciencia cierta, la disposición espacial del átomo central, ya que en base a ello, es posible el determinar la estructura del esqueleto, así como del número y la distribución de los ligandos, debido a que en ello es como se generan las diversas tonalidades características en cada caso. Por lo general, la mayoría de esferas de coordinación presentan coloraciones muy particulares. Por lo tanto, se debe asumir que átomos metálicos como por ejemplo, el

Aluminio III y Hierro III, adquieren una distribución espacial de tipo octaédrico, en tanto que el cobre II, la adquiere cuadrada planar y el fósforo V, bipiramidaltrigonal (14.17.84).

Por otra parte, el color del complejo de coordinación, o bien la ausencia de este, va a depender, para un mismo átomo central, del número y la naturaleza estructural del ligando y es en base ello, por lo cual, la formación de complejos de coordinación es muy utilizada tanto en los estudios de reactividad funcional, como en los sistemas reveladores en cromatografía de capa fina, delimitando con ello la presencia de un determinado tipo de compuesto; por lo cual, es considerada como una herramienta de trabajo, la cual es de gran utilidad en la caracterización de sustancias (14.17.84).

#### EFFECTOS AMBIENTALES EN LAS REACCIONES

Aunque el oxígeno es el elemento más abundante, no fue reconocido como tal, sino hasta fines del siglo XVIII (84).

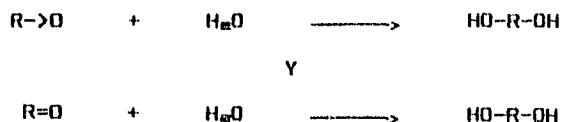
El oxígeno se presenta abundantemente en la tierra ya que la atmósfera contiene un 23.08 % en peso de oxígeno, que constituye un 20.99 % de su volumen; el agua pura, está formada por un 88.81 % de oxígeno y la de mar, una disolución salina, por un 85.79 %; y los numerosos minerales y rocas constituyentes de la corteza terrestre contienen sobre un 46.46 % de oxígeno. En la parte accesible de la tierra, existe un 49.40 % de oxígeno, siendo el elemento más abundante, y únicamente en la composición calculada de todo nuestro planeta, es sobrepasado por el hierro, con un 39.76 %, frente a un 27.71 % para el oxígeno (14.18).

A temperatura ambiente, el oxígeno es bastante inactivo pero a temperaturas elevadas, especialmente si es puro y en presencia de algún catalizador, se combina con la mayoría de los otros elementos para formar óxidos. La estructura electrónica supuesta ( $O=O$ ), con dos pares de electrones compartidos explica este comportamiento, ya que la reactividad del oxígeno va unida a su disociación previa en átomos, lo que exige la absorción de una gran cantidad de calor, igual a 118.32 Kcal/mol (14.18.17.84).

Por otra parte, la mayor parte de óxidos reaccionan con el agua y dan lugar a ácidos o bases. Los óxidos que originan

ácidos se denominan óxidos ácidos o anhídridos y los que forman bases se designan como óxidos básicos. En general, los óxidos de los elementos no metálicos, son anhídridos y los de los metales son bases, pero este comportamiento depende de la estructura molecular o iónica del óxido y, por lo tanto, del radio y de la carga del átomo del elemento unido al oxígeno.

Los óxidos moleculares que reaccionan con el agua son anhídridos y la fuerza del ácido que resulta depende de la mayor fuerza del enlace entre el elemento y el oxígeno respecto a la del enlace entre el oxígeno y el hidrógeno. Si se representa uno de los enlaces entre el elemento y el oxígeno, las ecuaciones correspondientes a la hidratación del óxido son (14):



- \* Enlace covalente dativo (  $\rightarrow$  ).
- \* Enlace covalente doble ( = ).

El enlace covalente dativo y el doble enlace covalente, se rompen en cada caso para dar lugar a dos enlaces covalentes sencillos (14,18).

El dióxido de silicio (  $\text{SiO}_2$  ), se forma por deshidratación del ácido y es por tanto un anhídrido, pero no reacciona con el agua por formar un cristal covalente (14,18).

La ecuación correspondiente a la reacción entre un óxido iónico de carácter básico y el agua es (18):



El concepto de ácido y base de Lewis, explica también el carácter de un óxido como ácido o como base. Si poseen un par de electrones no compartidos que pueden ceder el ión oxígeno ( $\text{O}^-$ ), son bases y si aceptan este par de electrones, son ácidos (18).

Los ácidos que pueden obtenerse a partir de un anhídrido y agua se denominan oxiácidos en oposición a los ácidos que no

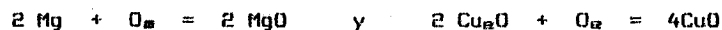
tienen oxígeno, y por tanto, no dan anhídrido que se denominan hidrácidos (84).

Si un anhídrido se hidrata distintamente y forma varios ácidos, el más hidratado se denomina ácido orto y el menos hidratado, ácido meta. Así, del anhídrido fosfórico o pentóxido de fósforo,  $P_2O_5$ , se origina el ácido metafosfórico  $HPO_3$  ( $P_2O_5 + H_2O = HPO_3$ ) y el ácido ortofosfórico,  $H_3PO_4$  ( $P_2O_5 + 3 H_2O = 2 H_3PO_4$ ). El ácido fosfórico obtenido a partir de una molécula de anhídrido y dos de agua, origina el ácido pirofosfórico  $H_4P_2O_7$  (14.84).

Por otra parte, la unión de una sustancia con el oxígeno, o sea, el aumento del contenido de este elemento en un cuerpo se denomina oxidación, y la disminución de oxígeno en un compuesto se conoce como reducción. En forma particular, se habla de oxidación cuando el proceso de unión con el oxígeno es lento y el calor que se desprende durante el mismo se disipa en el medio ambiente sin que aumente la temperatura del cuerpo que se oxida, pero si el proceso es rápido va acompañado de un gran aumento de combustión. La corrosión del hierro o la putrefacción de la madera son procesos lentos de oxidación pero cuando el carbón se quema o arde el alcohol, el proceso es en cada caso muy rápido y constituye una combustión. Asimismo, la transformación del óxido férrico ( $Fe_2O_3$ ), en óxido ferroso ( $FeO$ ), con un menor contenido en oxígeno, o la de estos óxidos en hierro metálico, es una reducción (84.85.87).

Si la oxidación de un cuerpo se efectúa de manera que el calor se pierde más lentamente que como se produce, la temperatura aumentará gradualmente lo que a su vez acelerará la oxidación y llegará un momento en que al alcanzar el punto de inflamación, el material se enciende espontáneamente. Este fenómeno se conoce como combustión espontánea (14.18.19).

Desde el punto de vista electrónico, se ha definido la oxidación como la combinación de una sustancia con el oxígeno y la reducción como el proceso inverso de disminución del contenido de este elemento en un compuesto. Las ecuaciones



en que el magnesio se transforma en óxido magnésico y el óxido cuproso se convierte en óxido cúprico, corresponden a procesos de oxidación y las ecuaciones:



en que el óxido de zinc se reduce a metal y el óxido férrico se transforma en óxido ferroso corresponden a procesos de reducción. Puesto que si un átomo pierde electrones otro átomo debe ganarlos, todo proceso de oxidación va unido necesariamente a uno de reducción; el proceso global es, por tanto, de oxidación-reducción. Para que un cuerpo se oxide otro tiene que reducirse. Las dos transferencias se verifican en la misma extensión la cual depende, conjuntamente, de la tendencia de cada una de las sustancias. El cuerpo que se oxida obliga al otro cuerpo a reducirse y reciprocamente, por lo cual, el que se oxida se conoce como reductor y el que se reduce como oxidante.

Ahora bien, aunque en muy pequeño número, ciertas reacciones químicas son aceleradas o incluso promovidas por acción de la luz y, en general, de la energía radiante. Dejando aparte la acción de las radiaciones de alta energía ( rayos  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , neutrones, etc. ) que pueden originar procesos químicos muy diversos; es de gran interés el considerar la naturaleza de las reacciones causadas por absorción de luz, principalmente visible y ultravioleta, o de las regiones que al verificarse a temperatura ambiente emiten energía luminosa. Estas reacciones reciben el nombre de reacciones fotoquímicas (17.24).

La absorción de luz consiste sencillamente en la captura de fotones cuya energía, depende de la frecuencia. Un fotón de luz de 2000 a 8000 Å de longitud de onda tienen una energía de 6.2 a 1.55 electrón-volts, o sea 143 a 35.75 Kcal/mol, muy superior o comparable a la energía de los enlaces atómicos por lo que, en este aspecto, el proceso químico podrá fácilmente producirse.

El fotón absorbido por la molécula activada puede transferir su exceso localizado de energía como energía de vibración de un determinado enlace que puede, en consecuencia, romperse, pero esto es muy poco frecuente y, en general, dicho exceso de energía se pierde como energía cinética al chocar con otras moléculas ( que pueden quedar a su vez activadas ), y en algunos casos se emite de nuevo como energía radiante de igual o casi siempre menor frecuencia, cuando el electrón excitado vuelve directamente o por saltos a su nivel normal en la molécula. Este fenómeno se denomina fluorescencia. Como la vida de la moléculas activadas es enormemente pequeña, inferior a la millonésima de segundo, la fluorescencia se produce simultáneamente a la irradiación y la substancia emite luz durante un cierto tiempo después de haber sido excitada; el fenómeno se denomina entonces fosforescencia (14.10.24.24).

En sí, la luz puede efectuar reacciones de diversa índole según ejersa su activación en las moléculas orgánicas, así, se tienen reacciones de sustitución, saturación, ruptura de enlaces, trasposición, reducción, oxidación, etc.; por lo cual, es importante el considerar siempre en todo proceso de análisis de sustancias, los efectos de la luz natural, así como de algunas fuentes luminosas, además de las posibles reacciones de óxido-reducción que se suscitan en algunos componentes al entrar en contacto con el aire ambiental, bajo efectos térmicos; teniendo conocimiento de ello, se podrá efectuar de la manera más propicia un seguimiento de reactividad enfocado primordialmente a la estabilidad de una determinada sustancia en estudio, lo cual es importante considerar cuando se procede a una caracterización de compuestos tanto naturales como semisintéticos (14,24,27).

Dentro de la caracterización de sustancias, además de considerar las reacciones fotoquímicas de las fuentes luminosas y las oxido-reductoras del aire circundante, en un proceso de evaluación de reactividad y estabilidad, es importante el considerar además los efectos de disolución, ya que ésta puede favorecer dichos fenómenos, dependiendo claro esta de que si el medio es orgánico, acuoso o bien orgánico-acuoso, en donde en cada uno de los casos se deberá conocer experimental o teóricamente los posibles efectos del proceso de disolución.

Algunos medios tanto orgánicos como acuosos, pueden acelerar procesos fotoquímicos en algunas sustancias orgánicas que sean susceptibles, además de que también un medio mal seleccionado puede producir acelerar el proceso óxido-reductor de la misma sin que el experimentador lo contemple dentro de su estudio; aunque estas dos reacciones involuntarias en ciertos compuestos orgánicos, ocupan un porcentaje muy bajo de la gran cantidad de productos existentes, aunque ello no implique que se deba despreciar tal posibilidad, y menos cuando se está en vías de caracterización de sustancias de reciente descubrimiento.

Los análisis de estabilidad ante luz, aire y medios de disolución, son de gran importancia en la identificación de sustancias y sobre todo cuando se desea generar métodos analíticos para detección de las mismas o bien, cuando se emprende un estudio de formulación o de otra índole, en la cual, se desee conocer a ciencia cierta la estabilidad de un producto ante estos factores desestabilizantes (14,16,17,24).

VALIDACION

Una parte muy importante en el desarrollo de un método analítico es la validación del mismo, esto implica que se deberá probar que el método es efectivo. La validación de manera general, incluye el evaluar la linealidad del método, su exactitud, precisión y especificidad, así como la linealidad del sistema (10, 11).

La validación es un proceso por medio del cual queda establecido, mediante análisis en el laboratorio, que el método tienen la capacidad de satisfacer los requerimientos para la o las aplicaciones analíticas deseadas (11, 12).

Dentro de una caracterización de sustancias desconocidas o de reciente diseño, donde aún no se tienen o conocen los productos de degradación, basta con aplicar la linealidad, exactitud y precisión, omitiendo la especificidad cuando se da por hechos comprobables ( desarrollo de estudios de reactividad química ) que el método es aplicable únicamente a la sustancia en estudio; y que además, éste, no se aplique a nivel de fluidos biológicos en primera instancia (10, 11, 12).

La linealidad de un sistema o método analítico, se refiere a su habilidad para asegurar que los resultados analíticos, los cuales se pueden obtener directamente o por medio de una transformación matemática bien definida, son proporcionales a la concentración de la sustancia dentro de un intervalo determinado, el cual está definido por las concentraciones comprendidas entre los niveles de concentración superior e inferior de la sustancia, en el cual se ha demostrado que el método o el sistema son lineales (10, 11).

La linealidad de un sistema se determina construyendo una curva de calibración ( concentración contra respuesta ) utilizando cuando menos cinco diluciones preparadas a partir de una misma solución patrón y haciendo el análisis cuando menos por duplicado para cada dilución. El intervalo entre las concentraciones a analizar dependerá del propósito del método.

Como criterios, se deben considerar los siguientes parámetros para aceptar que el sistema es lineal (10, 11, 12).



- \* Coeficiente de variación ( CV )  $\leq$  1.5 %
- \* Coeficiente de correlación lineal ( r )  $\geq$  0.99
- \* Coeficiente de determinación lineal ( r<sup>2</sup> )  $\geq$  0.98

( LAS ECUACIONES APARECEN EN LOS METODOS RESPECTIVOS )

Por otra parte, la linealidad del método se determina a partir de placebos adicionador de cuando menos tres diferentes cantidades de la sustancia de interés, cada uno de manera independiente, haciendo los análisis por triplicado (10.04).

Las concentraciones que se manejen en los placebos cargados deberán ser las adecuadas para que utilizando el método propuesto, las concentraciones de las soluciones finales a analizar, estén dentro del intervalo de la linealidad del sistema, incluyendo siempre el correspondiente 100 % (10.04).

Como criterios de aceptación, se consideran los siguientes parámetros (10.04).

- \* Promedio de recobro ( PR ) = 98 - 102 %
- \* Coeficiente de variación ( CV )  $\leq$  2 %
- \* Coeficiente de correlación lineal ( r )  $\geq$  0.99
- \* Coeficiente de determinación lineal ( r<sup>2</sup> )  $\geq$  0.98
- \* Pendiente ( m ) = 1
- \* Ordenada al origen ( b ) = 0

( LAS ECUACIONES APARECEN EN LOS METODOS RESPECTIVOS )

Ahora bien, la exactitud, es la concordancia entre un valor de referencia. Se expresa como el porcentaje de recobro. Aquí se adiciona una cantidad conocida del compuesto de interés y se determina de cuando menos 6 placebos cargados de manera independiente con la cantidad necesaria para obtener la

concentración del 100 %, utilizando el método propuesto. Los análisis se deben realizar bajo las mismas condiciones de operación y por el mismo analista, empleando los siguientes parámetros como criterio de aceptación de la exactitud del método (10.02.06):

$$* \text{ Promedio de recobro ( PR ) } = 98 - 102 \%$$

$$* \text{ Coeficiente de variación ( CV ) } \leq 2 \%$$

( LAS ECUACIONES APARECEN EN LOS METODOS RESPECTIVOS )

Con relación a la precisión, se tienen que ésta, es el grado de concordancia entre los resultados analíticos individuales, cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes muestreos de una determinada cantidad homogénea del producto. Generalmente se expresa en términos de desviación estándar o del coeficiente de variación. La precisión es una medida del grado de reproducibilidad y de repetibilidad del método analítico bajo las condiciones normales de operación.

La precisión se determina por el análisis sextuplicado de una misma solución estándar correspondiente al 100 % establecido en la linealidad. Como criterio de aceptación, se emplea el siguiente parámetro (10.11.06):

$$* \text{ Coeficiente de variación ( CV ) } \leq 1.5 \%$$

( LA ECUACION APARECE EN EL METODO RESPECTIVO )

Por otra parte, se debe tener en cuenta que la repetibilidad es la precisión de un método analítico expresado como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes bajo las mismas condiciones de analista, laboratorio, equipo, reactivos, etc..

En tanto que la reproducibilidad, es la precisión de un método analítico expresado como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas bajo condiciones diferentes ( diferentes analistas, en el mismo y/o en diferente

laboratorio, en diferentes días, utilizando el mismo y/o diferente equipo, etc. ). En sí, la precisión-reproducibilidad, se debe determinar de una muestra homogénea cercana al 100 % de la concentración teórica, analizada cuando menos por dos analistas, en dos días diferentes con diferentes equipos y por triplicado. Pero para los fines de un diseño de método en una caracterización, el cual debe ser rápido y objetivo, basta con aplicar la precisión como tal, expresada en términos de desviación estandar o de coeficiente de variación, mediante un análisis por sextuplicado de una misma solución patrón, abarcando cuando menos tres niveles de concentración, en lo estipulado en la linealidad del sistema, así, esta precisión vendrá a ser la precisión del sistema, lo cual es requisito mínimo para completar un estudio de validación de sustancias, más aún cuando éstas son costosas o bien no se cuenta con ellas en abundancia, el analista no puede darse el lujo de emplear grandes cantidades del producto para desarrollar una validación exhaustiva al diseño de método propuesto, por lo cual se debe ajustar al mínimo de parámetros necesarios para considerar una validación, los cuales son (10,11,12):

- \* Linealidad del sistema.
- \* Linealidad del método.
- \* Exactitud del método.
- \* Precisión del sistema y/o del método.

En sí, estos cuatro parámetros son básicos, además de ser los mínimos necesarios para efectuar un proceso de validación, el cual no es objetivo primordial en la caracterización de sustancias, pero sí complementario en el aspecto de análisis químico, efectuado a un determinado compuesto en estudio, para una finalidad determinada.

## FUNDAMENTACION

Dentro del contexto científico, siempre ha existido la presencia de sustancias químicas, de las cuales es necesario conocer a ciencia cierta, la diversidad de propiedades que presentan, así como el comportamiento de las mismas, por ello, los estudios de caracterización de sustancias tanto naturales, como semisintéticas y sintéticas, en su mayoría, son de gran importancia, ya que su aplicación, permite optimizar, agilizar y prever entre otras cosas, los efectos y procesos diversos a los cuales estas sean sometidas; lo cual es vital para el ámbito profesional del Químico Farmacéutico Biólogo, Bioquímico, Químico, Médico, Ingeniero Químico y Bioquímico entre otros.

Por tal motivo, la caracterización de sustancias químicas ha sido, es y será, una de las herramientas más importantes y fundamentales en el diseño y desarrollo científico.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Tratando de encontrar un fármaco con mejor actividad inotrópica cardíaca que la digital, donde la toxicidad (producida por los digitálicos naturales) no se manifieste o bien se vea minimizada, y que además proporcione un amplio margen de seguridad, Karel Wiesner y Thomas Y. R. Tsae <sup>(1)</sup> del Centro de Investigación de Productos Naturales de la Universidad de New Brunswick, en Brunswick Canadá, lograron sintetizar la Actodigina, bajo diseño molecular del Departamento de Farmacología del Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez" de la Ciudad de México, en donde se desarrollaron los estudios farmacológicos correspondientes, a cargo de los doctores R. Méndez, G. Pastelin y E. Kabela <sup>(2)</sup>. Estos investigadores describieron que la Actodigina, que es un análogo sintético de la digitoxina; posee a diferencia de esta, una gran rapidez de acción (más rápido que la Ouabaina) y un margen de seguridad notablemente mayor que el de todos los digitálicos conocidos, además de una rápida reversibilidad de efectos tóxicos.

Por tal motivo, se hace necesaria la caracterización física, química y fisicoquímica de la Actodigina, ya que esta permitirá conocer con mayor precisión al producto, facilitando en extremo los estudios farmacológicos posteriores; además de que en un futuro próximo, generará una aportación importante en el desarrollo farmacéutico, así como en toda investigación realizada en torno a este activo, que forma parte de un grupo de medicamentos de gran interés en cardiología.

## OBJETIVOS

- \* Caracterizar a la Actodigina, empleando métodos de análisis que permitan evaluar tanto sus propiedades físicas, así como sus propiedades químicas y fisicoquímicas.
  
- \* Evaluar la apariencia, color, olor y sabor de la Actodigina.
  
- \* Realizar una serie de estudios espectrales así como de cristalografía por difracción de rayos X, al activo.
  
- \* Determinar mediante diversos análisis, las características fisicoquímicas del producto.
  
- \* Llevar a cabo estudios de reactividad funcional y ensayos de identidad.
  
- \* Desarrollar y validar un método analítico que permita cuantificar al activo.

## H I P O T E S I S

Si se obtiene una caracterización apropiada de la Actodigina en base a un análisis bien definido de la conformación estructural, así como de sus propiedades físicas de organolépsia, químicas y fisicoquímicas, centrando su mayor importancia en la reactividad funcional, se obtendrá la información fundamental para el diseño y desarrollo científico de nuevos campos de aplicación directa de la Actodigina.

## MATERIAL Y EQUIPO

---

- \* Adaptadores, pinzas e implementos especiales, así como soportes.

Marca : Diversas.  
Modelo : Diversos.

- \* Balanza analítica digital.

Marca : Ains Worth.  
Modelo : L-11402-10 / AO-250.

- \* Cristalería básica.

Marca : Kimax y Pyrex.  
Modelo : Diversos.

- \* Cristalería para microanálisis.

Marca : Pyrex, Endox y Quifith.  
Modelo : Diversos.

- \* Desecador con sistema de vacío.

Marca : Ains Worth.  
Modelo : Dd-002 / P.

- \* Difractor automático de rayos X, cristalógrafo.

Marca : Syntex.  
Modelo : HI-STAR / COMP.

- \* Equipo para cromatografía en capa fina.

Marca : Diversas.  
Modelo : Diversos.

- \* Equipo para determinación de punto de fusión.

Marca : Kimmer / Fisher-Jhonss.  
Modelo : AK109 / Hot Stage / Digital.



---

\* Equipo para microanálisis de humedad.

Marca : SINNERNNER.  
Modelo : MK2.200F / Automatizado.

\* Estufa de secado.

Marca : Dakton.  
Modelo : MM-450 / Digital.

\* Espectrofotómetro de infrarrojo.

Marca : Syntex.  
Modelo : IR / H-12 / Computarizado.

\* Espectrofotómetro de UV-VIS.

Marca : SIM-AMINCO.  
Modelo : DW.2000 / Computarizado.

\* Lámpara de cuarzo con arco de deuterio, para análisis halofluorescente.

Marca : LINHER.  
Modelo : CD 104.

\* Lámpara de luz de sodio, para análisis halocrómico.

Marca : LINHER.  
Modelo : S 420 / 100 W.

\* Lámpara de luz ultravioleta de doble longitud de onda.

Marca : Cole-Palmer. ; RANHWAR.  
Modelo : CV 420 / 2. ; 1040-D2.

\* Mechero fisher con punta de abanico sesgado.

Marca : IMIG.  
Modelo : 0420 / P.

\* Micropipeta tipo TC con display digital.

Marca : CALPETTE.  
Modelo : 24600 seriales HD-01 a HD-22.

## \* Microscopio biológico.

Marca : Zeiss.  
Modelo : K7.

## \* Microscopio estereoscópico.

Marca : Nerlen.  
Modelo : T110.

## \* Mufla.

Marca : IMIG.  
Modelo : MT141.

## \* Potenciómetro.

Marca : Dakton.  
Modelo : pH / mV / Temp / Benchtop M-D.

## \* Recirculador.

Marca : Cole-Palmer.  
Modelo : 01267-62.

## \* Refractómetro de Abbé.

Marca : Baush and Lomb.  
Modelo : At-041.

## \* Refractómetro para sólidos.

Marca : Baush and Lomb / Syntex.  
Modelo : SSR-0A41 D2M.

## \* Termómetros, Varios.

Marca : Taylor ; Cole-Palmer ; Gissons.  
Modelo : 041-IT ; ADT-D10/B90 ; T100-A2.  
039-IP ; ADT-H10/100 ; G200-A2.  
C10A-41.

## \* Ultramicrobalanza digital.

Marca : CANN.  
Modelo : RS-232-C-31 / 1250.

## REACTIVOS

( LÍQUIDOS )

* Acetona .....	( R.A. )	... J. T. Baker.
* Acetato de etilo .....	( R.A. )	... J. T. Baker.
* Acido acético .....	( R.A. )	... J. T. Baker.
* Acido acético glacial .....	( R.A. )	... J. T. Baker.
* Acido clorhídrico .....	( R.A. )	... J. T. Baker.
* Acido clorosulfónico .....	( R.A. )	... T. Química.
* Acido cromosulfónico .....	( R.A. )	... Aldrich.
* Acido o-fosfórico .....	( R.A. )	... J. T. Baker.
* Acido nítrico .....	( R.A. )	... Merck.
* Acido p-toluensulfónico .....	( R.A. )	... J. T. Baker.
* Acido sulfúrico .....	( R.A. )	... Merck.
* Agua bidestilada .....	( Análisis )	... Sigma.
* Agua de bromo .....	( G.R. )	... Sigma.
* Agua destilada .....	( Análisis )	... Sigma.
* Anilina .....	( R.A. )	... Aldrich.
* Benceno .....	( R.A. )	... Merck.
* Cloroformo .....	( H.P.L.C. )	... Merck.
* Difenilamina .....	( R.A. )	... J. T. Baker.
* Etanol .....	( Q.P. )	... Merck.
* Eter etílico .....	( R.A. )	... T. Química.
* Formamida .....	( R.A. )	... T. Química.
* Glicerol .....	( R.A. )	... Merck.
* Hidróxido de amonio 50 % .....	( G.R. )	... J. T. Baker.
* Metanol .....	( Q.P. )	... J. T. Baker.
* Monobromonaftaleno [ STD ] .....	( Q.P. )	... Aldrich.
* N,N-dimetilformamida .....	( R.A. )	... Merck.
* p-anisaldehído .....	( R.A. )	... Merck.
* Parafina líquida .....	( Q.P. )	... Aldrich.
* Peróxido de hidrógeno 30 % .....	( G.R. )	... Sigma.
* Piridina .....	( R.A. )	... Merck.
* Reactivo de Karl-Fisher .....	( R.A. )	... Sigma.
* Solución reguladora de pH 5 .....	( Reg. )	... Sigma.
* Solución reguladora de pH 7 .....	( Reg. )	... Sigma.
* Solución reguladora de pH 9 .....	( Reg. )	... Sigma.
* Solución de control-prueba de pH ...	( Reg. )	... Biomeriux.

( SÓLIDOS )

* Acido tricloroacético .....	( R.A. ) ..	J. T. Baker.
* Acido 2,4,6-trinitrobenzónico .....	( R.A. ) ..	Merck.
* Acido 3,5-dinitrobenzónico .....	( R.A. ) ..	Merck.
* Acetato de cobre .....	( R.A. ) ..	J. T. Baker.
* Actodigina .....		Proporcionado por el I.N.C. de la S.S.A.
* Bromuro de potasio .....	( Q.P. ) ..	Aldrich.
* Carbonato de sodio .....	( R.A. ) ..	J. T. Baker.
* Cloruro de bencidina .....	( R.A. ) ..	Merck.
* Cloruro de calcio anhidro .....	( G.R. ) ..	J. T. Baker.
* Cloruro de hidroxilamina .....	( R.A. ) ..	J. T. Baker.
* Cloruro férrico .....	( R.A. ) ..	J. T. Baker.
* Cloruro ferroso .....	( G.R. ) ..	T. Química.
* Cloruro de trifeniltetrazolium .....	( R.A. ) ..	Merck.
* D-glucosa .....	( R.A. ) ..	Sigma.
* Difenilamina .....	( R.A. ) ..	Merck.
* Digitoxigenina .....	( R.A. ) ..	Sigma.
* Digitoxina .....	( R.A. ) ..	Sigma.
* Estríol-3-sulfato-16-glucoronido ...	( R.A. ) ..	Barthox.
* Estrofantidina .....	( R.A. ) ..	Sigma.
* Fenacetina .....	( Q.P. ) ..	Aldrich.
* Fenoftaleína .....	( R.A. ) ..	Sigma.
* Fluoresceína .....	( R.A. ) ..	Sigma.
* Fosfato de sodio monobásico .....	( R.A. ) ..	J. T. Baker.
* Hidróxido de potasio .....	( R.A. ) ..	J. T. Baker.
* Hidróxido de sodio .....	( R.A. ) ..	J. T. Baker.
* Metilestrieno-3-propil-16-etilo ....	( G.R. ) ..	Sigma.
* Metiletilrodamina .....	( R.A. ) ..	Minhnoss.
* Nitrato de plata .....	( R.A. ) ..	T. Química.
* p-bromoanilina .....	( R.A. ) ..	Merck.
* Pentacloruro de antimonio .....	( R.A. ) ..	J. T. Baker.
* Permanganato de potasio .....	( G.R. ) ..	J. T. Baker.
* Poliestireno, film .....	( Q.P. ) ..	Minhnoss.
* Rodamina base tipo 1A .....	( R.A. ) ..	Aldrich.
* Rodamina base tipo 2A .....	( R.A. ) ..	Aldrich.
* Sacarosa .....	( G.R. ) ..	Sigma.
* Silica gel 60 para capa fina, con reveador para UV .....	( Q.P. ) ..	Merck.
* Sodio metálico .....	( R.A. ) ..	J. T. Baker.
* Sulfato de sodio anhidro .....	( R.A. ) ..	J. T. Baker.
* Tartrato de sodio dihidratado .....	( R.A. ) ..	J. T. Baker.
* Tiosulfato de sodio .....	( R.A. ) ..	J. T. Baker.
* Trifenilamina .....	( R.A. ) ..	J. T. Baker.
* Trinitrofenol .....	( G.R. ) ..	Merck.

---

* Vaselina .....	( Q.P. ) ..	Aldrich.
* Yodo resublimado .....	( R.A. ) ..	J. T. Baker.
* Yoduro de potasio .....	( R.A. ) ..	J. T. Baker.
* 2-aminofenol .....	( R.A. ) ..	Merck.
* 3-aminofenol .....	( R.A. ) ..	J. T. Baker.
* 3-lactona-3'-hidroxidifenilo .....	( R.A. ) ..	Merck.
* 5-hidroximetil furfural .....	( G.R. ) ..	Merck.
* 5-hidroxi-1-tetralona .....	( G.R. ) ..	Sigma.
* 2,4,2',4'-tetranitrodifenilo .....	( R.A. ) ..	Merck.
* N-bromosuccinimida .....	( G.R. ) ..	Merck.
* N,N-rodamina base S1 .....	( R.A. ) ..	Minhons.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

# **METODOS**

1.- PROPIEDADES ORGANOLEPTICAS1.1.- APARIENCIA1.1.1.- HOMOGENEIDAD

Colocar 10 mg del producto Actodigina sobre un portaobjetos perfectamente limpio y seco; dispersar uniformemente y observar al microscopio bajo objetivos 10X y 40X.

Por separado, dispersar 50 mg del producto Actodigina sobre un vidrio de reloj perfectamente limpio y seco; observar bajo luz blanca.

En ambos casos, la prueba de homogeneidad es positiva si se observa uniformidad en el tamaño de partícula.

**1.1.2.- CRISTALINIDAD**

Suspender unas cuantas partículas de Actodigina en parafina líquida de alta pureza, sobre un portaobjetos perfectamente limpio y seco. Observar la muestra bajo un microscopio provisto con lentes condensadores de luz, a objetivos 10X y 40X, para observar birrefringencia y forma geométrica de las partículas.

Posteriormente, agregar una gota de etanol absoluto, dejar reposar durante 30 segundos y observar nuevamente a objetivos 10X y 40X, para verificar birrefringencia en las partículas. Reportar si el producto es o no cristalino, además de su forma geométrica.



### 1.2.- COLOR

Dispersar uniformemente 50 mg del producto Actodigina, sobre un portaobjetos de silvina perfectamente limpio y seco; observar bajo luz blanca el color que presenta el producto.

Posteriormente, colocar el portaobjetos en un microscópio con fuente de luz blanca y observar el color a objetivos 10X y 40X.

Reportar el color observado, el cual debe ser el mismo en ambos casos, así como la uniformidad de este.

#### NOTAS:

- \* La luz del microscópio debe ser blanca, ya que una luz amarillenta o azulosa, puede falsear los resultados.
- \* Se recomienda emplear portaobjetos de silvina, debido a que este material evita interferencias de color por descomposición de la luz incidente, que suele ocurrir con el vidrio de algunos portaobjetos comunes, o bien, puede emplear portaobjetos elaborados con vidrio de buena calidad.
- \* Puede sustituir el microscópio biológico por uno estereoscópico.

1.2.1.- ANALISIS HALOCROMICO

Colocar 10  $\mu$ l de cada uno de los siguientes ácidos y bases, conforme al cuadro siguiente, en microtubos de ensayo.

<u>TUBO</u>	<u>ACIDO</u>	<u>BASE</u>
1	Acético	.....
2	Tricloroacético	.....
3	Fosfórico	.....
4	Nítrico	.....
5	Perclórico	.....
6	Clorhídrico	.....
7	Clorosulfónico	.....
8	Sulfúrico	.....
9	.....	Hidróxido de amonio
10	.....	Anilina
11	.....	Piridina
12	.....	Trietanolamina

Posteriormente, adicionar 0.1 mg de Actodigina a cada uno de los tubos, mezclar perfectamente, dejar reposar 15 minutos y observar bajo luz blanca de sodio.

Reportar la coloración en cada uno de los casos. A continuación, agregar 10  $\mu$ l de agua bidestilada a cada uno de los tubos, mezclar perfectamente y anotar los cambios ocurridos.

NOTAS:

- \* Tanto ácidos como bases, se emplearán concentrados y puros.
- \* Se recomienda emplear para el análisis, luz de sodio de 100 W.

1.2.2.- ANALISIS HALOFLUORESCENTE

Colocar 10 µl de cada uno de los siguientes ácidos y bases, conforme al cuadro siguiente, en microtubos de ensayo.

TUBO	ACIDO	BASE
1	Acético	.....
2	Tricloroacético	.....
3	Fosfórico	.....
4	Nitríco	.....
5	Perclórico	.....
6	Clorhídrico	.....
7	Clorosulfónico	.....
8	Sulfúrico	.....
9	.....	Hidróxido de amonio
10	.....	Anilina
11	.....	Piridina
12	.....	Trietanolamina

Posteriormente, adicionar 0.1 mg de Actodigina a cada uno de los tubos, mezclar perfectamente e incubar a 30 °C ± 1 °C durante 15 minutos, dejar enfriar a temperatura ambiente y aplicar 2 µl de cada una de las disoluciones a 2 placas de gel de sílice 60, en capa de 0.25 mm ± 0.01 mm de espesor, y con medio de contraste. Una de las placas, se pulveriza con agua bidestilada hasta transparencia y ambas se observan bajo luz ultravioleta de baja y alta frecuencia, reportar los casos en los cuales hay fluorescencia.

Posteriormente, colocar las placas en un horno de secado a 100 °C durante una hora. Observar nuevamente bajo luz ultravioleta de baja y alta frecuencia, reportar los cambios ocurridos.

NOTAS:

- \* Tanto los ácidos como las bases, deberán emplearse concentrados y puros.
- \* Para evitar falsos positivos por efecto fluorescente de algunos ácidos y bases, preparar placas control, utilizando 2 µl de cada uno de los ácidos y bases, las cuales, se corren simultáneamente con los problemas.

**1.3.- OLOR**

Colocar aproximadamente de 2 a 3 mg de Actodigina sobre una placa de vidrio previamente calentada a 37 °C, frotar suavemente con el dedo índice, previamente protegido con un dedal de celofán-nylón ( inodoro ) y percibir el tipo de olor que despide el producto.

Por separado, colocar 10 mg de Actodigina en un microcrisol y calentar en una estufa de secado a 100 °C durante 10 minutos, retirar el crisol de la estufa y tratar de detectar posibles aromas estando aún caliente el producto.

Reportar si en ambos casos hay o no la presencia de algún olor, o bien, si desaparece o es reemplazado por otro tipo de olor, después de someter al producto a ambas pruebas.

**NOTAS:**

- \* Si no cuenta con dedal de celofán-nylón, se puede emplear un dedal de cualquier otro material de las mismas características, pero que sea inodoro.
- \* No efectuar la prueba sin dedal, ya que el producto se absorbe fácilmente por la piel, y además, el propio olor de la piel puede interferir en el análisis.

**1.4.- SABOR**

Cubrir tanto el dedo indice como pulgar con dedales de celofán-nylón ( insaboro ), posteriormente, colocar aproximadamente 1 mg de Actodigina sobre la yema del dedo indice, frotar suavemente con el pulgar y proceder a degustar o saborear el producto, únicamente con la punta de la lengua y frotando suavemente esta sobre el paladar, sin generar hipersalivación. Repetir la prueba con 1 mg del producto, pero en esta ocasión, sin frotar entre ambos dedos.

Reportar si en ambos casos percibe o no algún tipo de sabor.

**NOTAS:**

- \* Si no cuenta con dedales de celofán-nylón, emplear dedales de cualquier otro material de las mismas características, pero que sea insaboro.
- \* No efectuar la prueba sin dedales, ya que el producto se absorbe fácilmente por la piel, además, habría interferencia en la detección del sabor, por efecto del propio sabor de la piel.

## 2.- PROPIEDADES ESTRUCTURALES

### 2.1.- ESPECTROFOTOMETRIA DE INFRARROJO

Triturar 3 mg de Actodigina ( previamente secada a 100 °C, durante 1 hora ) hasta polvo muy fino, en un mortero de agata. Agregar 400 mg de bromuro de potasio ( secado a 110 °C, durante 5 horas ), moler y mezclar perfectamente ambos materiales, colocar el polvo homogéneo en una matriz cilíndrica de acero inoxidable y comprimir con prensa hidráulica a vacío, durante 4 minutos, a una presión de 1700 Kg/cm<sup>2</sup>. Preparar otra pastilla, únicamente de bromuro de potasio, bajo las mismas condiciones de prensado, la cual se empleará como blanco.

Colocar ambas pastillas en los respectivos porta celdas del espectrofotómetro de infrarrojo de doble as ( blanco y problema ), seleccionar una velocidad de barrido de 10 cm<sup>-1</sup>/seg en un rango de 4000 a 500 cm<sup>-1</sup>, seleccionar ajuste automático a cero de absorvancia y 100 % de trasmitancia, voltaje y sistema de lámparas, así como ajuste automático a cero de absorbancia, rejillas, sistema de detección y demás, en el modo preescan. Ya verificados los ajustes, proceder a registrar el espectro de absorción del producto.

Reportar la gráfica del espectro y el análisis del mismo.

#### NOTAS:

- \* Todo el material a emplear debe estar libre de humedad, ya que el bromuro de potasio es soluble en agua.
- \* Tanto la muestra a analizar como el bromuro de potasio, deben estar perfectamente secos. Además, el bromuro de potasio debe ser de una calidad aceptable para análisis de infrarrojo.
- \* Emplear como calibrador una película de poliestireno de 0.05 mm de espesor, cuyas bandas características se comparan con las del proveedor, bajo las mismas condiciones estipuladas por éste.
- \* Recuperar el producto con etanol anhidro.

**2.2.- ESPECTROFOTOMETRIA DE ULTRAVIOLETA**

Disolver 3 mg de Actodigina en 2 ml de metanol absoluto, mezclar perfectamente y pasar la disolución a una celda de cuarzo; emplear como blanco 2 ml del mismo disolvente, colocados en una celda de las mismas especificaciones a la de la muestra. Colocar ambas en los respectivos portaceldas del espectrofotómetro de ultravioleta de doble as (blanco y problema). Seleccionar ajuste automático de cero de absorvancia y 100 % de trasmittancia, cromadores y voltaje de lámparas, así como el rango de barrido de 200 a 390 nm, con incrementos de 1 nm/seg; con fuentes de luz de deuterio y filtros de óxido de olmio. Correr el sistema en modo preescan para verificación y ajuste de los parámetros seleccionados.

Posteriormente, efectuar el registro del espectro de absorción de la muestra.

**NOTA:**

\* Aún para equipos con autocalibrado, conviene efectuar una calibración previa con vaselina líquida, cuyas bandas de absorción características, se comparan con las especificadas por el proveedor, bajo las mismas condiciones estipuladas por éste, para así, verificar el buen funcionamiento del equipo.

### 2.3.- CRISTALOGRAFIA POR DIFRACCION DE RAYOS "X" \*

En un sistema de difusión de gota para obtención de macrocristales, colocar 15 mg de Actodigina, emplear como medio de difusión acetato de etilo, variar los rangos térmicos de 20 a 40 °C, a intervalos de 5 minutos, durante 6 horas. Sobresaturar el sistema con vapores de acetato de etilo y dejar reposar a temperatura ambiente, hasta formación de macrocristales. Seleccionar un cristal de forma bien definida de cuando menos 4 mg de peso, secarlo a 60 °C durante 1 hora, verificando que no sufra fracturas, posteriormente, colocarlo en un cristalógrafo computarizado, el cual se ha programado previamente con la información del espectro de infrarrojo, conformación estructural y peso molecular teóricos. Seleccionar análisis por difracción de rayos X para sustancias orgánicas de peso molecular pseudoelevado. Correr el sistema y registrar la conformación tridimensional de la molécula, así como las distancias interatómicas y ángulos de torsión espacial.

#### NOTAS:

- \* Seguir cuidadosamente las indicaciones de operación, establecidas por el fabricante, tanto para el sistema de difusión de gota, así como para el cristalógrafo.
- \* Recuperar el producto, recristalizando en etanol o metanol absolutos.
- \* Es de suma importancia que el cristal no presente fracturas, lo cual se verifica bajo análisis microscópico.

\* Fuente tomada de "A Crystallographic, Conformational Energy, and Biological Study of Actodiglin (AY-22,241) and Its Genin": Fullerton, U.S.; Yoshida, K. et al:



### 3.- PROPIEDADES FISICOQUIMICAS

#### 3.1.- ANALISIS CROMATOGRAFICO

##### 3.1.1.- DESARROLLO DE METODO DE SEPARACION CROMATOGRAFICA EN CAPA FINA

Seleccionar un minimo de 3 componentes que tengan características estructurales y funcionales muy parecidas a la Actodigina. Efectuar un análisis cromatográfico en capa fina con los diversos disolventes orgánicos, en los cuales son solubles, poco solubles e insolubles, cada una de las sustancias a utilizar; considerar aquellos eluyentes donde se obtengan RF's de 1.0, 0.5 y 0.0. Preparar una muestra problema, mezclando la Actodigina con los compuestos seleccionados, en una proporción ( 1:1 ). Efectuar pruebas de elusión con la muestra problema, para evaluar el comportamiento en cada caso. Realizar mezclas de los eluyentes que generan prospectos de una buena separación cromatográfica, hasta encontrar proporciones que den una resolución aceptable. Desarrollar pruebas piloto, para verificar el buen funcionamiento del sistema, haciendo todas las modificaciones que considere propicias.

Al mismo tiempo de efectuar el análisis para selección del sistema eluyente, desarrollar un método o métodos de revelado cromatográfico para cada uno de los componentes que constituyen el problema. Aplicarlo a la mezcla, considerando que cada uno de los elementos que la componen, deberá revelar de manera diferente, para ser identificados sin problema alguno.

Reportar sistema eluyente, sistema de soporte, sistema de revelado, composición del problema y metodología.

**3.1.2.- SISTEMA REVELADOR DE ANILLO ESTEROIDAL**

Desarrollar un sistema de revelado cromatográfico, para identificación del anillo esteroidal de la molécula de Actodigina, mediante la formación de compuestos o complejos metálicos coloridos. Basar el diseño en la reactividad de los sustituyentes funcionales del esteroide digitálico; considerar que el revelado deberá ser rápido y de fácil aplicación.

Para tal efecto, se deben realizar aplicaciones de 2 µl de una solución metanólica de Actodigina a una concentración de 5 µg/µl, sobre una serie de placas cromatográficas, elaboradas con gel de sílice, con y sin medio de contraste. Preparar las soluciones reactivas que se emplearán como reveladores químicos; aspersar uniformemente las placas y posteriormente, someterlas a los tratamientos térmicos más convenientes para que la reacción química se efectúe, y quede de manifiesto el revelado característico que identifica al anillo esteroidal.

**3.1.3.- SISTEMA REVELADOR DE D-GLUCOSA**

Considerar que la Actodigina posee, en su conformación estructural, una molécula de D-glucosa cíclica. Asumir que este tipo de compuestos son susceptibles de reaccionar en medio ácido. En base a ello, desarrollar un sistema de revelado cromatográfico para la hexosa, mediante la formación de compuestos o complejos metálicos coloridos; considerar que el revelado deberá ser rápido y de fácil aplicación.

Para lo cual, se deben realizar aplicaciones de 2  $\mu$ l de una solución metanólica de Actodigina, a una concentración de 5  $\mu$ g/ $\mu$ l, sobre una serie de placas cromatográficas, elaboradas con gel de sílice, con y sin medio de contraste. Preparar la o las soluciones reactivas que se emplearán como reveladores químicos. Aspersar uniformemente las placas bajo el tratamiento más adecuado, para que la reacción química se efectúe, y quede al descubierto, el revelado característico que indentifica a la D-glucosa, en la molécula de Actodigina.

**3.1.4.- SISTEMA REVELADOR DE GLUCOSIDO CARDIACO**

Dado que la Actodigina es un glucósido cardiaco, desarrollar un sistema de revelado cromatográfico por formación de compuestos o complejos metálicos coloridos. Basar el diseño en la reactividad de la molécula, considerando que el revelado deberá ser rápido y de fácil aplicación.

Para tal fin, se deben realizar aplicaciones de 2 a 5  $\mu$ l de una solución etanólica de Actodigina, a una concentración de 5  $\mu$ g/ $\mu$ l, sobre una serie de placas cromatográficas, elaboradas con gel de sílice, con y sin medio de contraste. Preparar la o las soluciones reactivas, las cuales se emplearán como reveladores químicos; aspersar uniformemente las placas bajo el tratamiento más adecuado, para que la reacción química se efectúe y se pueda observar el revelado característico, el cual identifica a la molécula de glucósido cardiaco, la cual corresponde a la conformación estructural de la Actodigina.

**3.1.5.- SISTEMA REVELADOR DE LACTONA**

Desarrollar un sistema de revelado cromatográfico, para identificación de la lactona ( ester cíclico ) constitutiva de la Actodigina, mediante la formación de compuestos o complejos metálicos coloridos. Basar el diseño en la reactividad de la lactona en medio ácido, considerando que el revelado deberá ser rápido y de fácil aplicación.

Para lo cual, se realizan aplicaciones de 2 a 5  $\mu$ l de una solución etanólica de Actodigina, a una concentración de 5  $\mu$ g/ $\mu$ l, sobre una serie de placas cromatográficas, elaboradas con gel de sílice, con y sin medio de contraste. Preparar la o las soluciones reactivas, las cuales se emplearán como reveladores químicos; aspersar uniformemente las placas bajo el tratamiento más adecuado, para que la reacción química se efectúe y quede de manifiesto el revelado característico que identifica la presencia del ester cíclico, en la molécula de Actodigina.

**3.2.- INDICE DE REFRACCION DE LA ACTODIGINA**

( Método de film )

Disolver de 4 a 5 mg de Actodigina en un mínimo de etanol absoluto; colocar la disolución sobre el prisma contenedor de un refractómetro para sólidos, dejar evaporar el disolvente para formar una película fina y uniforme; cerrar con cuidado el panel de prismas, verificar que la temperatura del sistema sea de  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.2\text{ }^{\circ}\text{C}$ , la cual se controla con un recirculador; ajustar la fuente de luz de sodio sobre el prisma de incidencia, así como monocromadores, para visualizar un campo claro y un oscuro, perfectamente delimitados y centrados. Una vez efectuados los ajustes, proceder a realizar la lectura. Obtener un mínimo de 3 lecturas por muestra y reportar el promedio.

**NOTAS:**

- \* Emplear como calibrador 4 a 5 mg de un estándar de glucosa o bien de urea.
- \* El límite para la diferencia de resultados entre cada lectura para una misma muestra, no debe ser mayor de 0.0002

**3.3.- INDICE DE REFRACCION DE DISOLUCIONES DE INTERES BIOLOGICO**

Colocar sobre el prisma contenedor de un refractómetro de Abbe, 100 a 150  $\mu$ l de la disolución de Actodigina, cerrar con cuidado el panel de prismas, verificar que la temperatura del sistema sea de  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.2\text{ }^{\circ}\text{C}$ , la cual se controla con un recirculador; ajustar la fuente de luz de sodio sobre el prisma primario de incidencia, así como los monocromadores, para visualizar un campo claro y un oscuro perfectamente delimitados y centrados. Una vez efectuados los ajustes, proceder a realizar la lectura. Obtener un mínimo de 3 lecturas por muestra y reportar el promedio.

**NOTAS:**

- \* Emplear como calibrador primario, un estándar de monobromonaftaleno y como calibrador secundario, agua bidestilada.
  
- \* El límite para la diferencia de resultados entre cada lectura para una misma muestra, no deberá ser mayor de 0.0002

**3.4.- pH DE DISOLUCIONES DE INTERES BIOLÓGICO**

Efectuar la determinación a  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Calibrar el equipo cuando menos, con dos soluciones reguladoras certificadas, cuya diferencia de pH no exceda de 4 unidades, ya calibrado, efectuar pruebas de funcionamiento con una solución de control-prueba de pH, debidamente certificada. Verificado el buen funcionamiento del equipo, proceder a determinar el pH de cada una de las disoluciones de Actodigina; realizar el análisis por triplicado para cada muestra y reportar el promedio.

**NOTAS:**

- \* El límite para la diferencia de resultados entre cada lectura, para una misma muestra, no deberá ser mayor de 0.5
  
- \* Emplear agua bidestilada para lavar perfectamente el electrodo y termómetro, entre cada determinación.



**3.5.- PUNTO DE FUSION**

Depositar unos cuantos cristales de Actodigina en la platina térmica de un equipo para determinación de punto de fusión, en donde se ha colocado previamente un contenedor de vidrio para la muestra. Efectuar los ajustes necesarios y proceder a realizar un calentamiento gradual. Observar el intervalo de temperatura en el cual el producto se funde, realizar un mínimo de 3 determinaciones y reportar el promedio.

**NOTAS:**

- \* Calibrar el equipo con un estándar de fenacetina, o bien, cualquier otro calibrador para determinación de punto de fusión.
  
- \* El límite para la diferencia de resultados entre cada lectura, para una misma muestra, es cuando más 0.5 °C.
  
- \* Se recomienda que el calentamiento gradual, sea con incrementos de 5 °C/min en la primera determinación y de 10 °C/min, en las subsecuentes.

**3.6.- SOLUBILIDAD**

( Micrométodo )

Depositar 1 mg de Actodigina en cada una de las 10 posas de una placa Hoetch para microdisolución. Colocar la placa bajo un microscopio estereoscópico y proceder a evaluar la solubilidad del producto a temperatura ambiente, con 10 µl de cada uno de los siguientes disolventes.

- a) Acetato de etilo.
- b) Acetona.
- c) Agua destilada.
- d) Benceno.
- e) Cloroformo.
- f) Cloruro de metileno.
- g) Dimetilsulfóxido.
- h) Etanol.
- i) Eter etílico.
- j) Eter de petróleo.
- k) Metanol.
- l) Piridina.

Reportar el disolvente o disolventes en los cuales el producto es soluble, poco soluble e insoluble.

**NOTAS:**

- \* Los disolventes a emplear, deberán ser de una alta pureza, para minimizar residuos contaminantes, al momento de recuperar el producto.
- \* Para recuperar el producto, colocar la placa Hoetch ( la cual debe ser de vidrio refractario ), en una estufa de secado a 80 °C ± 2 °C durante 1 hora; recristalizar en etanol.
- \* Para confirmar la insolubilidad, adicionar 100 µl más del disolvente en cada caso.
- \* Estandarizar el método con Cafeína, Fenacetina, Digitoxina o algún otro compuesto orgánico, del cual se conozca sus propiedades de solubilidad.

4.- PROPIEDADES QUIMICAS4.1.- ANALISIS RESIDUAL4.1.1.- ANALISIS PARA BROMO ELEMENTAL RESIDUAL

Colocar 3 mg de Actodigina en un microtubo de ensayo, agregar 0.5 ml de etanol absoluto, mezclar perfectamente y calentar suavemente a 30 °C durante 5 minutos; transcurrido el tiempo, adicionar 1 ml de una solución saturada de p-aminofenol en etanol absoluto, continuar el calentamiento a 30 °C.

La prueba es positiva, si hay la presencia de un color azul-violeta al cabo de 1 a 3 minutos.

**NOTA:**

\* Emplear como control positivo, una disolución de agua de bromo, la cual contenga 3 µg/ml de bromo elemental.

**4.1.2.- ANALISIS PARA BROMO ORGANICO RESIDUAL**

Colocar 3 mg de Actodigina en un microtubo de ensayo y agregar 5 a 6 gotas de ácido cromosulfúrico, mezclar perfectamente, cubrir el extremo abierto del tubo con un disco de papel filtro impregnado con una solución saturada de p-aminofenol en etanol y calentar en un baño de agua hirviendo.

La prueba es positiva, si hay la presencia de un color azul-violeta en el papel filtro, al cabo de 1 a 3 minutos.

**NOTAS:**

- \* Emplear como control positivo 5  $\mu$ l de una solución de p-bromoacetanilida, o bien,  $\alpha$ -bromonaftaleno a una concentración de 5  $\mu$ g/ $\mu$ l.
- \* Eliminar con sumo cuidado el disolvente empleado en la preparación de la solución control positivo, antes de efectuar el análisis.

**4.1.3.- DETERMINACION DE HUMEDAD**

( Microdeterminación por Karl-Fisher )

**VALORACION DEL REACTIVO DE KARL-FISHER**

Colocar en un microvaso de titulación alrededor de 3.6 ml de metanol y suficiente reactivo de Karl-Fisher para neutralizar el agua que pudiera contener el metanol.

Posteriormente, adicionar rápidamente 0.25 a 2.50 mg de tartrato de sodio dihidratado pesado exactamente, y valorar hasta el punto final con reactivo de Karl-Fisher. Calcular el factor de equivalencia del agua ( F ), bajo la siguiente ecuación.

$$F = 2 \frac{\boxed{18.02}}{\boxed{230.08}} \frac{\boxed{P}}{\boxed{V}}$$

Donde:

F : Factor de equivalencia del agua.

P : Peso del tartrato de sodio dihidratado.

V : Volumen de reactivo utilizado.

2 : No. de moléculas de agua presentes en cada molécula de tartrato de sodio.

18.02 : Peso molecular del agua.

230.08 : Peso molecular del tartrato de sodio dihidratado.

VALORACION DIRECTA DE LA ACTODIGINA

Colocar 3 a 4 ml de metanol en el microvaso de reacción y neutralizar el agua que pudiera contener, con el reactivo de Karl-Fisher. Rápidamente, agregar 10 mg de Actodigina, agitar vigorosamente y titular con el reactivo de Karl-Fisher.

Calcular el contenido de humedad (% H), en base a la siguiente ecuación.

$$\% H = S \frac{F}{P} 100 \%$$

Donde:

% H : Porcentaje de humedad contenida en la muestra.

S : Volúmen de reactivo de Karl-Fisher.

F : Factor de equivalencia de agua del reactivo.

P : peso de la muestra.

NOTAS:

- \* No considerar para los calculos, el gasto de reactivo de Karl-Fisher empleado para neutralizar el agua que pudiera contener el metanol.
- \* Se recomienda emplear un reactivo de Karl-Fisher comercial, si la calidad de sus reactivos no es la adecuada para su preparación.
- \* Valorar el reactivo de Karl-Fisher momentos antes de la determinación del producto.

**4.1.4.- PERDIDA POR IGNICION**

En un microcrisol perfectamente tarado, colocar 10 mg de Actodigina; efectuar un calentamiento gradual en una estufa de secado, hasta alcanzar los  $100\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ , mantener la temperatura por espacio de 15 minutos; continuar el calentamiento gradualmente hasta alcanzar  $225\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ , mantener la temperatura durante 1 hora e inmediatamente después, colocar el crisol perfectamente tapado en un desecador, en donde se mantiene por un espacio de 2 horas.

Posteriormente, pesar el microcrisol y determinar el porcentaje de pérdida por ignición, mediante las siguientes ecuaciones.

$$PPI = P_i - P_f$$

$$\% PI = \left[ \frac{PPI}{P_i} \right] 100 \%$$

Donde:

PPI : Peso perdido durante la ignición.

P<sub>i</sub> : Peso inicial de la muestra.

P<sub>f</sub> : Peso final de la muestra.

% PI : Porcentaje de pérdida por ignición.

**NOTAS:**

- \* Manipular durante todo el proceso con guantes y pinzas para microcrisol.
- \* Tarar el crisol bajo las mismas condiciones en las que se efectuará la prueba.

**4.1.5.- PERDIDA POR SECADO**

En un pesafiltro para microanálisis, perfectamente tarado bajo condiciones de secado a 100 °C durante 3 horas y 1 hora en desecador, colocar 10 mg de Actodigina, distribuyendo el producto tan uniformemente como sea posible; colocar el pesafiltro en una estufa de secado, teniendo cuidado de quitar la tapa del pesafiltro, desecar a 100 °C ± 1 °C durante 3 horas. Posteriormente, abrir la estufa de secado, tapar inmediatamente el pesafiltro y pasarlo a un desecador, en el cual permanece por espacio de 1 hora. Trascurrido el tiempo, pesar el pesafiltro y proceder a calcular la pérdida por secado, bajo las siguientes ecuaciones.

$$Ps = Pi - Pf$$

$$\% Ps = \left[ \frac{Ps}{Pi} \right] 100 \%$$

Donde:

Ps : Peso perdido durante el secado.

Pi : Peso inicial de la muestra.

Pf : Peso final de la muestra.

% Pi : Porcentaje de pérdida por secado.

**NOTA:**

\* Manipular durante todo el proceso con guantes y pinzas para micropesafiltro.



4.1.6.- RESIDUOS DE IGNICION

Colocar 15 mg de Actodigina en un crisol para microensayo, previamente llevado a peso constante.

Posteriormente, con la ayuda de un mechero Fisher con punta de abanico sesgado, calentar suavemente el crisol; aumentar gradualmente la intensidad de calentamiento hasta combustión total de la muestra. Enfriar a temperatura ambiente y humedecer el residuo con 10 µl de ácido sulfúrico concentrado de alta pureza, calentar suavemente hasta emisión de vapores blancos, aumentar el calentamiento cuidando de que no haya proyecciones del material; una vez terminada la emisión de vapores blancos, aumentar el calentamiento cuidando de que no haya proyecciones del material; terminada la emisión de vapores, colocar el crisol en una mufla y calentar a 800 °C ± 25 °C durante 2 horas. Enfriar en un desecador durante 1 hora, pesar el crisol y proceder a determinar el porcentaje de residuos de ignición, mediante la siguiente ecuación.

$$\% \text{ RI} = \frac{\text{Pr}}{\text{Pi}} 100 \%$$

Donde:

% RT : Porcentaje de residuos de ignición.

Pr : Peso del residuo.

Pi : Peso inicial de la muestra.

Una vez determinado el porcentaje de residuos de ignición, suspender los residuos con 5 a 6 gotas de agua bidestilada, centrifugar a 3500 rpm durante 4 minutos; agregar de 1 a 2 gotas de una solución indicadora de fenoftaleina, homogenizar suavemente, y la prueba resulta positiva para carbonatos alcalinos, si se observa una coloración rosa.

**NOTAS:**

\* Si observa partículas que no sucumben completamente a la combustión, dejar enfriar y humedecer los residuos con 1 a 2 gotas de peróxido de hidrógeno concentrado, o bien, con ácido nítrico concentrado; en ambos casos, llevar a sequedad y continuar la calcinación.

\* Si emplea ácido nítrico concentrado, el cual es aún más efectivo que el peróxido, se debe tener cuidado en la cantidad que se utiliza, ya que un exceso forma nitratos alcalinotérreos con destrucción de los carbonatos, óxidos y haluros, lo cual altera el cuadro real de residuos de ignición para una sustancia dada.

4.2.- REACTIVIDAD FUNCIONAL4.2.1.- GLUCOSIDO CARDIACO

Disolver perfectamente 1 mg de Actodigina en 2 ml de reactivo de color. Posteriormente, adicionar muy lentamente 1 ml de ácido sulfúrico concentrado y mezclar muy suavemente. Una coloración rojiza inmediata que vira gradualmente a azul ciená, verifica la reactividad del glucósido cardíaco.

NOTAS:\* REACTIVO DE COLOR

Adicionar 0.5 ml de una solución acuosa al 5 % de cloruro férrico, a 100 ml de ácido acético glacial. Proteger de la luz.

\* Emplear diversos glucósidos cardíacos, para observar su color de reacción respectivo.

\* Emplear geninas de los glucósidos cardíacos para observar variaciones en las reacciones.

\* Utilizar como control positivo digitoxina.

#### 4.2.2.- GRUPO ETHER

Colocar 1 mg de Actodigina en un microtubo de ensayo, agregar 10  $\mu$ l de metanol y 2 ml de cloroformo, mezclar perfectamente y colocar en el extremo abierto del tubo, un disco de papel filtro impregnado de una mezcla en proporción ( 1:1 ) de dos soluciones acuosas saturadas, una de cloruro de bencidina y la otra de acetato de cobre. Introducir el tubo en un baño de glicerol a 230 °C durante 1 minuto. La reactividad del grupo eter se manifiesta mediante un cambio gradual del color azul palido del papel filtro, a un azul intenso.

#### NOTAS:

- \* Es importante que tanto el metanol como el cloroformo a emplear, sean de una buena calidad, para evitar interferencia de impurezas.
- \* Emplear como control positivo 5  $\mu$ l de eter etilico.
- \* Emplear como control negativo 1 mg de estrofantidina, o cualquier otra sustancia que no contenga grupo eter en su estructura.

**4.2.3.- GRUPO D-GLUCOSA****( Método I )**

Disolver 1 mg de Actodigina en 50  $\mu$ l de metanol absoluto, adicionar 20  $\mu$ l de una solución acuosa de cloruro de trifeniltetrazolium al 0.5 %, mezclar perfectamente y agregar 10  $\mu$ l de hidróxido de sodio 0.5 N. Homogenizar y ebulir la muestra durante 1 a 2 minutos. Un color o precipitado rojo manifiesta la reactividad del grupo D-glucosa.

**NOTAS:**

- \* Todos los reactivos empleados, deben ser de una buena calidad, para favorecer la reacción y evitar así interferencia por impurezas.
- \* Emplear como control negativo 1 mg de cloruro de hidroxilamina.
- \* Emplear como control positivo 1 mg de ácido ascórbico o D-glucosa.

## ( Método II )

Disolver perfectamente 1 mg de Actodigina en 50  $\mu$ l de etanol, agregar 10  $\mu$ l de una solución alcohólica al 0.1 % de 5-hidroxi-1-tetralona, mezclar perfectamente y agregar 50  $\mu$ l de ácido sulfúrico concentrado, homogenizar suavemente y colocar en un baño de agua hirviendo durante 30 minutos; enfriar a temperatura ambiente y agregar 1 ml de agua destilada.

Se comprueba la reactividad del grupo D-glucosa, mediante la presencia de una fluorescencia de color verde.

**NOTAS:**

- \* Los reactivos empleados, deberán ser de buena calidad para evitar interferencia por impurezas.
  
- \* Emplear como control negativo, 1 mg de lactosa.
  
- \* Emplear como control positivo, 1 mg de dextrosa.

( Método 111 )

1 mg de Actodigina, se disuelve perfectamente en 1 ml de etanol y 5 µl de ácido sulfúrico concentrado; posteriormente, adicionar 1 ml de una solución de 2.23 mg/ml de anilina en ácido acético glacial al 10 % en solución acuosa, mezclar perfectamente, y calentar a 40 °C durante 5 minutos.

Una coloración rosa intensa, pone de manifiesto la reactividad del grupo D-glucosa.

**NOTAS:**

\* Si la calidad de los reactivos no es muy aceptable, puede haber la presencia de una coloración y precipitado rojo ladrillo, lo cual, también puede considerarse como prueba positiva.

\* Emplear como control positivo, 0.5 mg de 5-hidroximetilfurfural.

**4.2.4.- GRUPO HIDROXILO ( ESTEROIDAL )**

En un sistema para reacciones anhidras, provisto con termómetro y agitación continua, colocar 2 ml de ácido acético glacial, 2 mg de Actodigina y 3.1 mg de N,N-rodamina base SI, mezclar suavemente y dejar reposar durante 5 minutos; transcurrido el tiempo, calentar a  $80\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  con agitación vigorosa durante 30 minutos. La presencia de una coloración o precipitado negruzco, indica que la reacción se ha llevado satisfactoriamente. A continuación, dejar enfriar a temperatura ambiente y adicionar 0.25 ml de una solución acuosa al 5 % de cloruro de aluminio y 0.25 ml de ácido sulfúrico concentrado, homogenizar perfectamente, dejar reposar 30 minutos. La presencia de una coloración escarlata brillante, ratifica la reactividad del grupo hidroxilo esteroideal.

**NOTAS:**

- \* El ácido acético glacial, se emplea recién destilado bajo condiciones anhidras.
- \* Secar previamente a la Actodigina y a la N,N-rodamina base SI, a  $110\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 2 horas.
- \* La reacción inicial debe llevarse estrictamente en condiciones anhidras.
- \* El calentamiento debe estar perfectamente controlado para alcanzar rápidamente los  $80\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  y mantenerlos durante 30 minutos.
- \* Emplear como control negativo, metilestrieno-3-propil-16-etilo.



**4.2.5.- GRUPO LACTONA**

Disolver 0.02 g de cloruro de hidroxilamina en 0.2 ml de etanol al 75 %. Por separado, disolver 0.10 g de hidróxido de potasio, en 1 ml de etanol al 90 %. Mezclar ambas disoluciones y filtrar el precipitado de cloruro de potasio que se forma. A la mezcla reactiva filtrada, adicionar 1 mg de Actodigina, solubilizar perfectamente y dejar reposar 10 minutos a temperatura ambiente, posteriormente adicionar una mezcla previamente preparada de 0.01 g de cloruro férrico en 0.02 ml de ácido clorhídrico y 0.2 ml de eter etílico; homogenizar suavemente y dejar reposar 15 minutos.

Un color café que vira gradualmente a púrpura, manifiesta la reactividad del grupo lactona.

**NOTAS:**

- \* Emplear como control positivo, 3-lactona-3'-hidroxi difenilo.
- \* Utilizar como control negativo, estriol-3-sulfato-16-glucuronido.
- \* Las disoluciones etanólicas, 75 % y 90 %, son en medio acuoso.

#### 4.3.- PRUEBAS RAPIDAS DE IDENTIFICACION

##### 4.3.1.- FORMACION DE COMPLEJO DE FIERRO III

Desarrollar una prueba rápida para identificación de la actodigina, mediante la formación de un complejo colorido de  $Fe^{+++}$  en medio ácido. Basar el diseño en la reactividad de los grupos funcionales D-glucosa y lactona, así como del estudio holocrómico efectuado al digital en estudio. Considerar que la prueba debe ser rápida, fácil de realizar y específica en relación a la tonalidad del complejo formado.

**4.3.2.- FORMACION DE COMPLEJO DE FOSFORO V - RBI**

Diseñar una prueba de identificación rápida para Actodigina, mediante la formación de un complejo colorido de P<sup>V</sup>-RBI en medio ácido. Basar la formación del complejo, en la reactividad del grupo funcional D-glucosa y lactona. Considerar que la reacción debe ser rápida, fácil de realizar y sobre todo, específica para la Actodigina, en relación a la tonalidad del complejo formado.

**NOTA:**

\* RBI : Rodamina base S1.

**5.- DESARROLLO DE UN METODO ESPECTROFOTOMETRICO PARA LA DETERMINACION CUANTITATIVA DE ACTODIGINA****5.1.- REACCION DE COLOR**

( Formación de complejo de hierro III )

En un tubo de ensayo, colocar 1 mg de Actodigina, agregar 3 ml de ácido acético glacial; mezclar perfectamente y adicionar 0.1 ml de una solución acuosa de cloruro férrico al 5 % y 0.25 ml de ácido sulfúrico concentrado. La reacción deberá virar gradualmente de un color rojizo a un tono azul cieno bien definido.

**NOTAS:**

\* Los reactivos a emplear, deberán ser de buena calidad para evitar posibles interferencias por efecto de impurezas.

\* La coloración rojiza, se forma en el momento de agregar el ácido sulfúrico.

**5.2.- ESTABILIDAD FISICA DE LA REACCION****5.2.1.- PERMANENCIA DE COLOR**

En el momento de adicionar el último reactivo a la mezcla de reacción ( método sección 5.1. ), homogenizar perfectamente y cronometrar el tiempo que tarda en virar el color rojo a un tono azul ciena, y posteriormente, el tiempo en el cual éste permanece constante, indicando si declina o se intensifica dicha coloración. Reportar el primer intervalo de tiempo cronometrado como el tiempo de reacción, y el segundo, como el tiempo de estabilidad colorida de reacción. Efectuar como mínimo 3 pruebas y reportar el promedio en cada caso.

**NOTA:**

- \* Efectuar el análisis bajo un fondo blanco, con la finalidad de apreciar perfectamente los cambios coloridos en la reacción.

**5.2.2.- EFECTO DE DISOLUCION**

A cada uno de 4 tubos de ensayo ( marcados del 1 al 4 ), colocar 1 mg de Actodigina, posteriormente, agregar 1 ml de etanol al tubo "1", 1 ml de metanol al tubo "2", 1 ml de acetato de etilo al tubo "3", y al "4", 1 ml de una mezcla de agua-etanol-metanol ( 1:1:1 ). Solubilizar perfectamente el producto y adicionar 3 ml de ácido acético glacial , 0.1 ml de cloruro férrico al 5 % en agua y 0.25 ml de ácido sulfúrico concentrado a cada tubo, homogenizar suavemente.

Reportar en qué casos no se observa el vire de una coloración roja a una azul ciena. Realizar la prueba por duplicado.

**NOTA:**

- \* Todos los reactivos empleados deberán ser de buena calidad, para evitar interferencia de impurezas en el análisis.

5.2.3.- EFEECTO DE LUZ

En seis tubos de ensayo, numerados del 1 al 6, colocar 0.2 mg de Actodigina, posteriormente, agregar a cada tubo 0.6 ml de ácido acético glacial, 20  $\mu$ l de una solución acuosa de cloruro férrico al 5 % y 50  $\mu$ l de ácido sulfúrico concentrado, homogenizar suavemente y colocar los tubos en exposición a diferentes fuentes luminosas, según el cuadro siguiente:

TUBO	FUENTE DE LUZ
1	Mercurio ( 100 W )
2	Neón ( 10 W )
3	Sodio ( 100 W )
4	Tungsteno ( 100 W )
5	Solar
6	Oscuridad total

Evaluar el efecto de las diferentes fuentes luminosas, sobre los tiempos de reacción y de estabilidad colorida, así como en el vire de rojo a azul ciena.

**NOTAS:**

- \* Para mayor precisión en los resultados, efectuar el análisis por duplicado.
- \* En la prueba de oscuridad total, establecer intervalos cortos y rápidos de lectura visual, para evaluar los efectos sobre el tiempo de reacción y estabilidad de color; una vez preestablecidos estos, correr nuevamente la prueba por duplicado, bajo los tiempos determinados en el primer análisis

**5.2.4.- EFECTO DE AIRE**

En cada uno de tres tubos de ensayo colocar 0.2 mg de Actodigina, a continuación, adicionar a cada uno 0.6 ml de ácido acético glacial, 20  $\mu$ l de una solución acuosa de cloruro férrico al 5 % y 50  $\mu$ l de ácido sulfúrico concentrado; homogenizar suavemente; colocar un tapón de goma a dos de los tubos, de los cuales a uno de ellos se le extrae el aire. Posteriormente, evaluar los tiempos de reacción y de estabilidad de color en cada caso. Correr la prueba por duplicado.

**NOTA:**

\* Se extrae el aire de uno de los tubos, por medio de un sistema extractor a vacío, teniendo cuidado de emplear tubos de pared gruesa, para evitar rupturas al momento de generar el vacío.



**5.3.- DETECCION DE LONGITUD DE ONDA DE MAXIMA ABSORCION**

Colocar 1 mg de Actodigina en un tubo de ensayo, agregar 3 ml de ácido acético glacial y mezclar perfectamente; adicionar 0.1 ml de una solución acuosa al 5 % de cloruro férrico y 0.25 ml de ácido sulfúrico concentrado, homogenizar suavemente y dejar reposar 30 minutos, protegiendo la reacción del aire y la luz directa. Preparar al mismo tiempo y bajo las mismas condiciones, un blanco de ácido acético glacial, cloruro férrico y ácido sulfúrico. Transcurrido el tiempo de reacción, trasvasar las soluciones blanco y problema a celdas de cuarzo; colocar ambas en los respectivos portaceldas de un espectrofotómetro UV-Vis de doble as; seleccionar ajuste automático a cero de absorbancia, ajuste de cromadores y voltaje de lámparas, así como un rango de barrido de 190 a 1000 nm, con un incremento en la longitud de onda de 1 nm/seg; con fuentes de luz de deuterio y tungsteno-iodo, además de seleccionar filtros de óxido de olmio. Correr el sistema en modo preescan para verificación y ajuste de los parámetros seleccionado, posteriormente, efectuar el registro de absorción a diferentes longitudes de onda; denotar en base a él, la longitud de onda de absorción máxima.

**NOTA:**

- \* Para verificar el buen funcionamiento del equipo, calibrar el mismo con un estándar de vaselina líquida, cuyas bandas de absorción características se comparan con las especificadas por el proveedor, bajo las mismas condiciones estipuladas por éste.

5.4.- ESTABILIDAD ESPECTROFOTOMETRICA DE LA REACCION

Denotar una celda de cuarzo como problema y otra como blanco, colocar 1 mg de Actodigina en la celda problema, adicionar a ambas celdas 3 ml de ácido acético glacial, 0.1 ml de una solución acuosa de cloruro férrico al 5 % y 0.25 ml de ácido sulfúrico concentrado; cubrir ambas celdas con tapones de teflón y mezclar suavemente por inversión, evitando la formación de burbujas; colocar rápidamente las celdas blanco y problema en los respectivos porta celdas de un espectrofotómetro de UV-Vis de doble as, el cual se ha ajustado previamente bajo los siguientes parámetros:

Ajuste de cromadores = <u>Automático.</u>
Ajuste de voltaje de lámparas = <u>Automático.</u>
Ajuste a cero de absorvancia = <u>Automático.</u>
Fuente de luz = <u>Tungsteno-iodo.</u>
Filtros = <u>Oxido de olmio.</u>
Longitud de onda = <u>556 nm.</u>
Tiempo de preincubación = <u>10 min.</u>
Tiempo de exposición = <u>100 min.</u>
Intervalos de lectura = <u>cada 5 seg.</u>

Efectuar el registro de estabilidad de la reacción.

**NOTA:**

- \* La reacción se debe efectuar rápidamente y bajo una gran precisión, para obtener lo más exacto posible el tiempo de reacción.

5.5.- VALIDACION DEL METODO5.5.1.- LINEALIDAD DEL SISTEMA

Disolver 12.5 mg de Actodigina en 20 ml de metanol absoluto, mezclar perfectamente y aforar a 50 ml con el mismo disolvente.

Preparar una curva estandar en base al cuadro siguiente:

<u>TUBO</u>	<u>SOLUCION DE ACTODIGINA</u>	<u>CONCENTRACION EN CADA TUBO</u>
BLANCO	0.0 ml	0.000 mg
1	4.0 ml	1.000 mg
2	3.5 ml	0.875 mg
3	3.0 ml	0.750 mg
4	2.5 ml	0.625 mg
5	2.0 ml	0.500 mg
6	1.5 ml	0.375 mg
7	1.0 ml	0.250 mg
8	0.5 ml	0.125 mg
9	0.4 ml	0.100 mg
10	0.3 ml	0.075 mg
11	0.2 ml	0.050 mg
12	0.1 ml	0.025 mg

Posteriormente, eliminar con sumo cuidado el exceso de disolvente en cada uno de los tubos, secar a 100 °C durante 1 hora, enfriar a temperatura ambiente y adicionar a cada tubo 3 ml de ácido acético glacial, 0.1 ml de una solución acuosa al 5 % de cloruro férrico y 0.25 ml de ácido sulfúrico concentrado, homogenizar suavemente y dejar reposar 30 minutos, protegiendo del aire y la luz directa. Leer a 556 nm, ajustando a cero de absorvancia con el blanco. Efectuar el análisis por duplicado.

Evaluar la linealidad del sistema, en base a los siguientes parámetros:

$r \geq 0.99$
$r^2 \geq 0.98$
$CV \leq 1.5 \%$

Bajo las siguientes ecuaciones:

$$r = \frac{\sum XY}{\sqrt{(\sum X^2)(\sum Y^2)}}$$

$$r^2 = \frac{(\sum XY)^2}{(\sum X^2)(\sum Y^2)}$$

$$S = \frac{\sqrt{(\Sigma (X - \bar{X})^2)}}{\sqrt{(n - 1)}}$$

$$CV = (S / \bar{X}) 100 \%$$

Donde:

r : Coeficiente de correlación lineal.

r<sup>2</sup> : Coeficiente de determinación lineal.

CV : Coeficiente de variación.

S : Desviación estandar muestral.

$\bar{X}$  : Media muestral ( aritmética ).

5.5.2.- LINEALIDAD DEL METODO

Preparar por triplicado, cuatro placebos cargados con Actodigina, en base al cuadro siguiente:

<u>TUBO</u>	<u>CANTIDAD ADICIONADA DE ACTODIGINA</u>
BLANCO	0.00 mg
1	0.15 mg
2	0.40 mg
3	0.65 mg
4	0.90 mg

Posteriormente, adicionar a cada tubo 3 ml de ácido acético glacial, 0.1 ml de una solución acuosa al 5 % de cloruro férrico y 0.25 ml ácido sulfúrico concentrado, homogenizar suavemente y dejar reposar 30 minutos protegiendo del aire y la luz directa. Leer a 556 nm, ajustando a cero de absorbancia con el blanco.

Evaluar la linealidad del método en base a los siguientes criterios:

CANTIDAD ADICIONADA vs CANTIDAD RECUPERADA
$m = 1$
$b = 0$
$r \geq 0.99$
$r^2 \geq 0.98$
$CV \leq 2 \%$
$PR = 98 - 102 \%$

Bajo las siguientes ecuaciones:

$$m = \frac{Y_2 - Y_1}{X_2 - X_1}$$

$$b = \frac{\Sigma Y - (m \Sigma X)}{n}$$

$$r = \frac{\Sigma XY}{\sqrt{(\Sigma X^2)(\Sigma Y^2)}}$$

$$r^2 = \frac{(\Sigma XY)^2}{(\Sigma X^2)(\Sigma Y^2)}$$

$$CV = (S / \bar{X}) 100 \%$$

$$S = \frac{\sqrt{(\sum (X - \bar{X})^2)}}{\sqrt{(n - 1)}}$$

$$PR = \frac{Cr}{Ca} 100 \%$$

Donde:

m : Pendiente.

b : Ordenada al origen.

r : Coeficiente de correlación lineal.

r<sup>2</sup> : Coeficiente de determinación lineal.

CV : Coeficiente de variación.

S : Desviación estandard muestral.

$\bar{X}$  : Media muestral ( aritmética ).

PR : Por ciento de recobro.

Cr : Cantidad recuperada.

Ca : Cantidad adicionada.



## 5.5.3.- EXACTITUD DEL METODO

Preparar 10 placebos cargados, distribuyendo aproximadamente y con precisión la Actodigina, en 10 tubos de ensayo, en base al cuadro siguiente:

<u>TUBO</u>	<u>CANTIDAD ADICIONADA DE ACTODIGINA</u>
BLANCO	0.000 mg
1	0.002 mg
2	0.009 mg
3	0.019 mg
4	0.985 mg
5	0.450 mg
6	0.727 mg
7	0.905 mg
8	0.210 mg
9	0.059 mg
10	0.027 mg

Posteriormente, adicionar a cada tubo 3 ml de ácido acético glacial, 0.1 ml de una solución acuosa al 5 % de cloruro férrico y 0.25 ml de ácido sulfúrico concentrado, homogenizar suavemente y dejar reposar 30 minutos protegiendo del aire y la luz directa. Leer a 556 nm, ajustando a cero de absorbancia con el blanco.

Evaluar la exactitud del método en base a los siguientes criterios:

<u>CANTIDAD ADICIONADA vs CANTIDAD RECUPERADA</u>
PR = 98 - 102 %
CV ≤ 2 %

Bajo las siguientes ecuaciones:

$$PR = \frac{Cr}{Ca} 100 \%$$

$$CV = ( S / \bar{X} ) 100 \%$$

$$S = \frac{\sqrt{(\sum (X - \bar{X})^2)}}{\sqrt{(n - 1)}}$$

Donde:

PR : Por ciento de recobro.

Cr : Cantidad recuperada.

Ca : Cantidad adicionada.

S : Desviación estandard muestral.

$\bar{X}$  : Media muestral ( aritmética ).

**NOTA:**

\* Si no cuenta con ultramicrobalanza para registrar pesos del orden de 0.0001 mg, puede emplear disoluciones metanólicas con la cantidad de Actodigina deseada; se elimina el exceso de disolvente, secar posteriormente a 100 °C durante 30 minutos, y proceder a efectuar el estudio, verificando previamente por análisis espectrofotométrico, que la alícuota utilizada, realmente contiene la cantidad de muestra requerida, o bien, trabajar con placebos cargados del orden de 0.1 mg en adelante.

**5.5.4.- PRECISION DEL METODO**

Trabajar por sextuplicado cada una de las siguientes cantidades de Actodigina, 0.027, 0.487 y 0.974 mg. Distribuir las muestras en tubos de ensayo, adicionar a cada uno de ellos 3 ml de ácido acético glacial, 0.1 ml de una solución acuosa de cloruro férrico al 5 % y 0.25 ml de ácido sulfúrico concentrado, homogenizar suavemente, dejar reposar 30 minutos protegiendo del aire y la luz directa. Preparar al mismo tiempo y bajo las mismas condiciones, un blanco de ácido acético glacial, cloruro férrico y ácido sulfúrico. Trascurrido el tiempo de reacción, leer a 556 nm, ajustando a cero de absorbancia con el blanco.

Evaluar la precisión del método en base al siguiente criterio:

<u>CANTIDAD ADICIONADA</u> vs <u>CANTIDAD RECUPERADA</u>
PR = 98 - 102 %
CV ≤ 1.5 %

Bajo las siguientes ecuaciones:

$$PR = \frac{Cr}{Ca} 100 \%$$

$$CV = ( S / \bar{X} ) 100 \%$$

$$S = \frac{\sqrt{(\sum (X - \bar{X})^2)}}{\sqrt{(n - 1)}}$$

Donde:

PR : Por ciento de recobro.

Cr : Cantidad recuperada.

Ca : Cantidad adicionada.

S : Desviación estandard muestral.

$\bar{X}$  : Media muestral ( aritmética ).

# RESULTADOS

**1.- PROPIEDADES ORGANOLEPTICAS****1.1.- APARIENCIA****1.1.1.- HOMOGENEIDAD**

La prueba de homogeneidad para la Actodigina fue positiva, ya que se observó en ambos casos ( análisis microscópico y macroscópico ) una uniformidad en el tamaño de partícula.

**1.1.2.- CRISTALINIDAD**

La Actodigina presentó una estructura amorfa, la cual exhibe una alta birrefringencia, con lo cual se verificó que el producto es cristalino.

1.2.- COLOR

En ambos análisis (macroscópico y microscópico), se observó que la Actodigina presenta un color blanco brillante de apariencia uniforme.

1.2.1.- ANALISIS HALOCROMICO

El análisis halocrómico de la Actodigina ante ácidos y bases, generó la siguiente tabla de resultados:

TUBO	ACIDOS (10 µl)	BASES (10 µl)	COLOR	AGUA	COLOR
1	CH <sub>3</sub> COOH	██████████	.....	10 µl	.....
2	CCl <sub>3</sub> COOH	██████████	.....	10 µl	amarillo
3	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	██████████	.....	10 µl	.....
4	HNO <sub>3</sub>	██████████	amarillo	10 µl	amarillo
5	HClO <sub>4</sub>	██████████	.....	10 µl	.....
6	HCl	██████████	.....	10 µl	.....
7	HClSO <sub>3</sub>	██████████	ambar	10 µl	ambar
8	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	██████████	amarillo	10 µl	amarillo
9	██████████	NH <sub>3</sub> OH	.....	10 µl	.....
10	██████████	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> NH <sub>2</sub>	.....	10 µl	.....
11	██████████	C <sub>5</sub> H <sub>5</sub> N	amarillo	10 µl	amarillo
12	██████████	(HOC <sub>2</sub> H <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> N	.....	10 µl	.....

C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>NH<sub>2</sub> : Anilina  
 C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>N : Piridina  
 (HOC<sub>2</sub>H<sub>4</sub>)<sub>3</sub>N : Trietanolamina

## 1.2.1.- ANALISIS HALOFLUORESCENTE

Al someter la Actodigina a un análisis halofluorescente en presencia de ácidos y bases, se generó la siguiente tabla de resultados:

TUBO	ACIDOS (10 µl)	BASES (10 µl)	P1 T1	P2 T2	P1 T3	P2 T3
1	CH <sub>3</sub> COOH	██████████	( - )	( - )	( - )	( - )
2	CCl <sub>3</sub> COOH	██████████	( - )	( - )	( - )	( - )
3	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	██████████	( + )	( + )	( + )	( + )
4	HNO <sub>3</sub>	██████████	( - )	( + )	( - )	( + )
5	HClO <sub>4</sub>	██████████	( - )	( - )	( - )	( - )
6	HCl	██████████	( - )	( - )	( - )	( - )
7	HClSO <sub>3</sub>	██████████	( + )	( - )	( - )	( - )
8	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	██████████	( + )	( + )	( + )	( + )
9	██████████	NH <sub>4</sub> OH	( + )	( - )	( + )	( - )
10	██████████	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> NH <sub>2</sub>	( - )	( - )	( - )	( - )
11	██████████	C <sub>5</sub> H <sub>5</sub> N	( - )	( - )	( - )	( - )
12	██████████	(HOC <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>3</sub> N	( - )	( - )	( - )	( - )

C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>NH<sub>2</sub> : Anilina  
 C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>N : Piridina  
 (HOC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>3</sub>N : Trietanolamina

\* P1 T1 : Cromatoplaça 1 sin tratamiento de pulverizado con agua y exposición a la luz UV.

\* P2 T2 : Cromatoplaça 2 con tratamiento de pulverizado con agua y exposición a la luz UV.



- \* P1 T3 : Cromatoplaca 1 sin tratamiento de pulverizado con agua, activada a 100 °C durante 1 hora y exposición a la luz UV.
- \* P2 T3 : Cromatoplaca 2 con tratamiento de pulverizado con agua, activada a 100 °C durante 1 hora y exposición a la luz UV.
- \* ( + ) : Presencia de fluorescencia bajo luz UV.
- \* ( - ) : No hay presencia de fluorescencia bajo luz UV.

### 1.3.- OLOR

Después de tratar a la Actodigina bajo procesos térmicos de baja y alta temperatura, se detectó que el producto no presenta ningún tipo de olor, por lo tanto se verifica que el producto es inoloro.

### 1.4.- SABOR

Tras someter a la Actodigina a un análisis de sabor, se encontró que este digital no presenta ninguno, por lo cual, se asume que el producto es insaboro.

## 2.- PROPIEDADES ESTRUCTURALES

### 2.1.- ESPECTROFOTOMETRIA DE INFRARROJO

En el espectro de infrarrojo efectuado a la Actodigina ( Anexo 01 ; pag. 182 ), a los  $1736.101\text{ cm}^{-1}$ , se detecta la señal característica del grupo carbonilo, perteneciente al éster cíclico o lactona y, a los  $1649.1\text{ cm}^{-1}$  se encuentra la banda que identifica la insaturación de la meso lactona.

Entre  $3600$  y  $3200\text{ cm}^{-1}$ , se encuentra la banda vibracional que indica la presencia de hidroxilos libres y asociados constitutivos de una azúcar, lo cual se corrobora mediante las señales a  $950.9$  y  $839\text{ cm}^{-1}$ , ya que éstas, son características de una  $\alpha$ -D-glucopiranosas; entre los  $840$  y  $700\text{ cm}^{-1}$  se observa una banda muy particular, la cual pone de manifiesto la presencia de una piranosas; así mismo, entre los  $1150$  y  $1040\text{ cm}^{-1}$  se localiza otra banda de absorción característica de los cuatro hidróxilos constitutivos de una D-glucopiranosas; en tanto que el sobretono para el hidroxilo esteroideal, aparece a los  $1020.3\text{ cm}^{-1}$  lo cual se ratifica a los  $599.8\text{ cm}^{-1}$ .

Por otra parte, entre  $3030$  y  $2600\text{ cm}^{-1}$ , se localiza la señal que pone en evidencia la presencia de un anillo esteroideal del tipo alcohólico. El eter alifático se verifica a los  $1168.8\text{ cm}^{-1}$ . En tanto que a  $1448.5$  y  $1352\text{ cm}^{-1}$ , se observa la presencia de metilos en posición alfa a un alcano cíclico, lo cual se ratifica a  $599.8\text{ cm}^{-1}$ .

Así pues, mediante el espectro de infrarrojo efectuado, se observó la presencia de un grupo D-glucosa, un eter alifático, un anillo esteroideal de tipo alcohólico, la presencia del hidroxilo esteroideal, una meso lactona insaturada y la evidencia de grupos metilo; los cuales, todos ellos, son constitutivos estructurales de la molécula de Actodigina.

### 2.2.- ESPECTRO DE ULTRAVIOLETA

En el espectro efectuado a la Actodigina en la región ultravioleta cercano ( 200 a 390 nm ) ( Anexo 02 ; pag. 183 ), se puede observar una banda de absorción típica de los glucósidos cardiacos, del tipo estructural de la digitáxina (lacto-dimetilhidroxiesterol-monodigitohexosa); en donde además, se observa que la actodigina presenta una absorción máxima a 270 nm.

### 2.3.- CRISTALOGRAFIA POR DIFRACCION DE RAYOS X

En base a los estudios cristalográficos por difracción de rayos X efectuados a la Actodigina, se obtuvo la definición de la molécula, mediante la determinación de las distancias interatómicas ( Anexo 03 ; pag. 184 ) y los ángulos de torsión espacial ( Anexo 04 ; pag. 185 ), generando con ello, la conformación tridimensional real de la Actodigina ( Anexo 05 ; pag. 186 ).

\* Fuente tomada de " A Crystallographic, Conformational Energy, and Biological Study of Actodigin (AY-21241) and Its Genin "; Fullerton, D.S.; Yoshida, K. et al; *Molecular Pharmacology*, 17:41-51:1980.

3.- PROPIEDADES FISICOQUIMICAS3.1.- ANALISIS CROMATOGRAFICO3.1.1.- DESARROLLO DE METODO DE SEPARACION CROMATOGRAFICA EN CAPA FINASISTEMA ELUYENTA:

- 1.- Benceno-tolueno (1:1).
- 2.- Metanol.
- 3.- Propilenglicol.
- 4.- Formamida.

MUESTRAS PROBLEMA:

- |                        |  |
|------------------------|--|
| * Actodigina 1 mg.     | } En disolución<br>etanólica.<br>(0.6 ml)    |
| * Digitoxigenina 1 mg. |  |
| * Digitoxigenina 1 mg. |  |
| * Estrofantidina 1 mg. | } En disolución<br>clorofórmica.<br>(0.4 ml) |
| * Estrona 1 mg.        |  |

SISTEMA DE REVELADO:

- 1.- Nitrato de plata alcalino.
- 2.- Tiosulfato de sodio al 5 %.
- 3.- Cloruro de trifeniltetrazolium alcalino.
- 4.- Yodo-yoduro de potasio.
- 5.- Permanganato de potasio 0.2 %.

SISTEMA DE SOPORTE:

- \* Placas de 5x25 cm, elaboradas de gel de sílice 60 Merck, con espesor de 0.25 mm  $\pm$  0.01 mm sin medio de contraste, preparada en agua destilada y secada a 150 °C durante 2 horas.

METODO

A cada una de cuatro placas cromatográficas colocarle dos aplicaciones de 6  $\mu$ l cada una de la solución etanólica problema, teniendo cuidado de distribuir perfectamente a lo ancho y a 0.5 cm de la base de la placa, dejar evaporar el disolvente a temperatura ambiente y aplicar 4  $\mu$ l de la disolución clorofórmica problema sobre cada una de las aplicaciones de la disolución inicial, dejar evaporar el disolvente y eluir las cuatro placas en el sistema benceno-tolueno, posteriormente secar a 40 °C durante 10 minutos; ya secas, efectuar una segunda elución en metanol, secar a 40 °C durante 10 minutos y efectuar una tercera elución en propilenglicol, secando posteriormente a 60 °C durante 20 minutos, y por último, eluir en formamida eliminando el eluyente a 60 °C durante 10 minutos.

Una vez secas las placas, proceder a revelarlas, para lo cual primeramente se pulverizan las cuatro con la solución alcalina de nitrato de plata, hasta transparencia de las mismas, dejar secar bajo corriente de aire seco y reportar las coloraciones de revelado.

A continuación, sólo dos placas se pulverizan hasta transparencia con la solución de tiosulfato de sodio, secar a 60 °C durante 1 hora y observar el revelado. Las otras dos placas restantes, se atomizan con la solución de trifeniltetrasolium, hasta transparencia, secar bajo corriente de aire seco y observar el revelado.

Posteriormente, de las dos placas tratadas con tiosulfato de sodio, una se atomiza con la solución de yodo-yoduro de potasio y la otra con la de permanganato de potasio, se dejan secar a temperatura ambiente y se observan los respectivos revelados. De manera idéntica, se trabajan las dos placas tratadas con trifeniltetrasolium y se observan los revelados.

Reportar Rf's y serie de revelado para la Actodigina.

**NOTAS:**

\* Como control, emplear 4 placas cromatográficas, colocando en cada una de ellas 5 aplicaciones de 3 µl de cada uno de los 5 componentes que conforman el problema.

\* NITRATO DE PLATA ALCALINO:

A 10 ml de nitrato de plata 0.1 N, se le adicionan 10 gotas de hidróxido de amonio al 50 % y 5 ml de una solución al 10 % de hidróxido de sodio. Preparar la solución momentos antes de su empleo.

\* TIOSULFATO DE SODIO AL 5%

Se prepara en solución acuosa.

\* CLORURO DE TRIFENILTETRAZOLIUM

Preparar una solución acuosa al 0.2 % de trifeniltetrazolium y mantenerla protegida de la luz. Momentos antes de emplearla, mezclar 2 partes de la solución con 1 parte de una solución de hidróxido de sodio al 10 %.

\* YODO-YODURO DE POTASIO

Preparar una solución al 0.3 % de yodo resublimado con una solución acuosa de yoduro de potasio al 5 %. Proteger de la luz.

\* PERMANGANATO DE POTASIO

Preparar la solución al 0.2 % de permanganato de potasio con una solución acuosa de carbonato de sodio al 5 %. Proteger de la luz.

COMPONENTE	Rf	SECUENCIA DE REVELADO
Actodigina.	0.7708	<pre>           INCOLORO          /      \         /         \     AMARILLO /         \ AZUL-VERDOSO            /            \              /            \        AMARILLO MARRON   CAFE  OCRE         </pre>
Digitoxina.	0.8083	<pre>           INCOLORO          /      \         /         \     AMARILLO /         \ GRIS-AZUL            /            \              /            \        AMARILLO CAFE   PARDO  OCRE         </pre>
Digitoxigenina.	0.7333	<pre>           INCOLORO          /      \         /         \     AMARILLO /         \ VERDE            /            \              /            \        AMARILLO GRIS-CAFE  AMARILLO OCRE         </pre>
Estrofantidina.	0.3433	<pre>           INCOLORO          /      \         /         \     VERDE /         \ AZUL          /            \            /            \        AMARILLO GRIS   VERDE  OCRE         </pre>
Estrona.	0.5271	<pre>           INCOLORO          /      \         /         \     VERDE /         \ VERDE          /            \            /            \        AMARILLO CAFE   VERDE  OCRE         </pre>

3.1.2.- SISTEMA REVELADOR DE ANILLO ESTEROIDAL

( METODO I )

SOLUCIONES DE REVELADO

- 1.- Acido clorosulfónico-ácido acético glacial.
- 2.- Trióxido de aluminio al 5 %.
- 3.- Hidróxido de amonio al 50 %.

METODO

Antes de proceder a revelar la placa que contiene a la Actodigina, colocarla a 60 °C durante 20 minutos, posteriormente y antes de que se enfríe, aspersar la placa hasta transparencia con la solución reveladora (1); calentar de 5 a 10 minutos a 130 °C y evaluar la fluorescencia bajo luz ultravioleta de onda larga. A continuación, aspersar con la solución reveladora (2) hasta transparencia, e inmediatamente después con la solución reveladora (3). La prueba es positiva si hay fluorescencia y el revelado químico genera una coloración verde-azulosa. La reacción que se efectúa es la siguiente ( ver anexo 06 ; pag. 187 ).

NOTAS:

- \* Emplear silica gel sin medio de contraste ya que puede interferir en la reacción.
- \* ACIDO CLOROSULFONICO-ACIDO ACETICO GLACIAL  
Se agregan enfriando 5 ml de ácido clorosulfónico a 10 ml de ácido acético glacial.
- \* TRIOXIDO DE ALUMINIO AL 5%  
Se prepara con agua bidestilada y libre de gases.
- \* Es importante que el calentamiento a 130 °C no tenga una variación de cuando más 2 °C, ya que la reacción se lleva a cabo satisfactoriamente a esta temperatura.



( METODO II )

SOLUCION DE REVELADO

\* Acido o-fosfórico al 15 % en metanol.

METODO

Pulverizar la placa que contiene la Actodigina con la solución reveladora, hasta transparencia de la misma; calentar a  $85\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 25 a 30 minutos. La prueba es positiva si se observa una coloración amarilla después del tratamiento. La reacción que se efectúa es la siguiente ( ver anexo 07 ; pag. 188 ).

NOTAS:

- \* No emplear silica gel con medio de contraste ya que interfiere en el análisis.
- \* Preparar la solución de revelado momentos antes de emplearse.
- \* Es importante mantener el rango de temperatura estipulado, para que se efectúe idóneamente la reacción.

( METODO III )

SOLUCION DE REVELADO

\* Acido tricloroacético-cloroformo- peróxido de hidrógeno.

METODO

Aspersar minuciosamente la placa que contiene a la Actodigina con la solución reveladora; calentar a  $121\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 5 a 10 minutos. La prueba es positiva si se observa una tonalidad parda. La reacción que se efectúa es la siguiente ( ver anexo 08 ; pag. 189 ).

NOTAS:

\* ACIDO TRICLOROACETICO-CLOROFORMO-PEROXIDO DE HIDROGENO

Disolver 3.3. g de ácido tricloroacético en 10 ml de cloroformo, mezclar perfectamente y agregar 20  $\mu\text{l}$  de peróxido de hidrógeno. Preparar momentos antes de su empleo.

\* El rango de temperatura es vital para que se lleve a cabo la reacción.

\* No utilizar silica gel con medio de contraste ya que interfiere en el análisis.

**3.1.3.- SISTEMA REVELADOR DE D-GLUCOSA**

( METODO I )

**SOLUCION DE REVELADO**

\* o-aminofenol-ácido fosfórico.

**METODO**

Pulverizar minuciosamente la placa que contiene a la Actodigina con la solución reveladora, dejar secar a temperatura ambiente y observar el revelado. La prueba es positiva si se observa una coloración café. La reacción que se efectúa es la siguiente ( ver anexo 09 ; pag. 190 ).

**NOTAS:**\* **o-AMINOFENOL-ACIDO FOSFORICO**

Disolver 0.15 g de o-aminofenol en 20 ml de etanol, mezclar perfectamente y agregar 10 ml de una solución acuosa de ácido fosfórico al 50 %. Preparar la solución poco antes de su empleo.

\* No utilizar silica gel con medio de contraste ya que puede interferir en el análisis.

( METODO II )

SOLUCION DE REVELADO

\* Anilina-difenilamina-ácido fosfórico.

METODO

Aspersar la placa que contiene a la Actodigina con la solución reveladora, hasta transparencia de la misma, posteriormente, calentar a  $85\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos; observar la coloración de revelado para D-glucosa. La prueba es positiva si se observa una tonalidad gris-azulosa. La reacción que se efectúa es la siguiente ( ver anexo 10 ; pag. 191 ).

NOTAS:\* ANILINA-DIFENILAMINA-ACIDO FOSFORICO

Disolver 4 g de difenilamina en 20 ml de ácido fosfórico, posteriormente, agregar 4 ml de anilina, mezclar perfectamente y adicionar 200 ml de acetona. Conservar la solución protegida de la luz y en refrigeración.

\* Mantener el rango de temperatura estipulado para que se efectúe satisfactoriamente la reacción.

**3.1.4.- SISTEMA REVELADOR DE GLUCOSIDO CARDIACO**

( METODO I )

**SOLUCIONES REVELADORAS**

- 1.- Acido 3,5-dinitrobenzico al 2 % en metanol anhidro.
- 2.- Hidróxido de potasio al 5.7 % en metanol anhidro.

**METODO**

Pulverizar suavemente a la placa que contiene la Actodigina con la solución reveladora (1) e inmediatamente después con un exceso de la solución reveladora (2). La prueba es positiva si se observa una coloración violeta-azulado. La reacción que se efectúa es la siguiente ( ver anexo 11 ; pag. 192 ).

**NOTAS:**

- \* Es importante el emplear metanol anhidro, ya que el agua puede afectar la reacción, generando una tonalidad parda o azul-grasoso.
- \* De preferencia no utilizar silica gel con medio de contraste, ya que puede interferir en la reacción.

( METODO II )

SOLUCIONES DE REVELADO

- 1.- Acido 2,4,6-trinitrobenzico al 0.1 %, en dimetilformamida y agua (1:1).
- 2.- Carbonato de sodio al 5 %.
- 3.- Fosfato monobasico de sodio al 5 %.

METODO

Pulverizar la placa que contienen la Actodigina con la solución reveladora (1), dejar secar a temperatura ambiente y pulverizar nuevamente con (1), e inmediatamente después con la solución de revelado (2); calentar a  $95\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 4 a 5 minutos, dejar enfriar a temperatura ambiente y pulverizar con la solución (3). La prueba es positiva si se observa una coloración naranja rojiza. La reacción que se efectúa es la siguiente ( ver anexo 12 ; pag. 193 ).

NOTA:

- \* El rango de temperatura es importante para llevar a cabo la reacción.

( METODO III )

SOLUCIONES DE REVELADO

- 1.- 2,4,2',4'-tetranitrodifenilo saturado en benceno libre de tiófeno.
- 2.- Hidróxido de potasio al 10 % en metanol acuoso al 50 %.

METODO

Aspersar la placa que contiene a la Actodigina con la solución (1), dejar secar a temperatura ambiente y aspersar la placa con la solución (2). La prueba es positiva si se observa un revelado de color azul. La reacción que se efectúa es la siguiente ( ver anexo 13 ; pag. 194 ).

NOTAS:

- \* Es importante que el benceno esté libre de tiófeno ya que puede alterar la reacción.
- \* Para verificar si el benceno está libre de tiófeno, efectuar la prueba de la isatina.

**3.1.5.- SISTEMA REVELADOR DE LACTONA****SOLUCIONES DE REVELADO**

- 1.- Hidroxilamina-hidróxido de potasio.
- 2.- Cloruro férrico-ácido clorhídrico.

**METODO**

Pulverizar la placa que contiene la Actodigina con la solución de revelado (1) hasta transparencia; secar brevemente a temperatura ambiente y proceder a pulverizar con la solución (2). La prueba es positiva si inicialmente se observa una coloración café que vira gradualmente a púrpura. La reacción que se efectúa es la siguiente ( ver anexo 14 ; pag. 195 ).

**NOTAS:****\* HIDROXILAMINA-HIDROXIDO DE POTASIO**

Solución A : 20 g de cloruro de hidroxilamina se disuelven en 50 ml de agua, mezclar perfectamente y aforar a 200 ml con etanol; conservar la solución en refrigeración.

Solución B : Disolver perfectamente 50 g de hidróxido de potasio en el mínimo de agua, posteriormente aforar a 500 ml con etanol.

Para preparar la solución de revelado, mezclar un volumen de A con dos volúmenes de B. El cloruro de potasio precipitado se filtra, y la solución resultante se mantiene en refrigeración, en donde se mantienen en estable por dos semanas en recipiente de P.V.C..

- \* Es importante que los reactivos sean de buena calidad para evitar posibles interferencias por efecto de impurezas.



**3.2.- INDICE DE REFRACCION DE LA ACTODIGINA**

El índice de refracción determinado para la Actodigina fue de 1.7055, evaluado como sólido a 22 °C y con línea D de sodio.

**3.3.- INDICE DE REFRACCION DE DISOLUCIONES DE INTERES BIOLÓGICO**

El índice de refracción determinado para cada una de las disoluciones de Actodigina, a 22 °C y con línea D de sodio fue el siguiente:

- a) Solución stock ( 1mg/ml )..... = 1.3255
- b) Dosis terapéutica ( 0.015 µmol/Kg corazón )... = 1.3240
- c) Dosis letal ( 3.46 µmol/Kg corazón )..... = 1.3250

**3.4.- pH DE DISOLUCIONES DE INTERES BIOLÓGICO**

El pH determinado para cada una de la disoluciones de Actodigina, a 25 °C fue el siguiente:

- a) Solución stock ( 1 mg/ml )..... = 6.085
- b) Dosis terapéutica ( 0.015 µmol/Kg corazón ).... = 7.061
- c) Dosis letal ( 3.46 µmol/Kg corazón )..... = 7.023

**3.5.- PUNTO DE FUSION**

El punto de fusión determinado para la Actodigina fue de 236 a 237 °C con descomposición del producto.

**3.6.- SOLUBILIDAD**

Tras efectuar las pruebas de solubilidad a la Actodigina a nivel de microanálisis, se encontró que el activo es soluble en metanol, etanol y dimetilsulfóxido; y es poco soluble en acetato de etilo y piridina.

**4.- PROPIEDADES QUIMICAS****4.1.- ANALISIS RESIDUAL****4.1.1.- ANALISIS PARA BROMO ELEMENTAL RESIDUAL**

La prueba dió como resultado negativo, con lo cual se verifica que la Actodigina no contiene bromo elemental residual en su constitución.

**4.1.2.- ANALISIS PARA BROMO ORGANICO RESIDUAL**

Al someter a la Actodigina a la prueba, el resultado fue negativo, por lo cual, se determina que no contiene bromo orgánico residual en su constitución.

**4.1.3.- DETERMINACION DE HUMEDAD ( METODO DE KARL-FISHER )**

Mediante el micrométodo de Karl-Fisher se determinó para la Actodigina, una humedad del 0.401 %.

**4.1.4.- PERDIDA POR IGNICION**

La Actodigina no pierde por ignición más de 0.41 % en peso.

**4.1.5.- PERDIDA POR SECADO**

La Actodigina no pierde por secado más del 0.40 % en peso.

**4.1.6.- RESIDUOS DE IGNICION**

Los residuos de ignición para la Actodigina fueron insignificantes, de aproximadamente 0.0007 % en peso.

La prueba de fenoftaleína, detectó trazas de carbonatos alcalinos.

**4.2.- REACTIVIDAD FUNCIONAL****4.2.1.- GLUCOSIDO CARDIACO**

La prueba generó inicialmente una coloración rojiza, la cual viró gradualmente a una tonalidad azul ciena, con lo cual, se verifica la reactividad de la Actodigina como glucósido cardíaco. La reacción que se efectuó es la siguiente ( ver anexo 15 ; pag. 196 ).

**4.2.2.- GRUPO ETER**

La reactividad del grupo eter constitutivo de la Actodigina, quedó verificada mediante un cambio gradual del color azul palido del papel filtro a un tono azul intenso, el cual es característico del azul de bencidina. La reacción que se efectuó es la siguiente ( ver anexo 16 ; pag. 197 ).

Se confirmó la presencia del peróxido mediante una prueba rápida con sulfato ferroso, la cual dió positiva.

4.2.3.- GRUPO D-GLUCOSA

( METODO I )

Se verificó la reactividad del grupo D-glucosa constitutivo de la Actodigina, mediante la formación de una coloración roja. La reacción que se efectuó es la siguiente ( ver anexo 17 ; pag. 198 ).

( METODO II )

Mediante la presencia de una fluorescencia verde, característica de la bensonftenodiona, la cual se intensifica bajo luz ultravioleta, se comprobó la reactividad del grupo D-glucosa funcional de la Actodigina. La reacción efectuada es la siguiente ( ver anexo 18 ; pag. 199 ).

( METODO III )

La reactividad del grupo D-glucosa constitutivo de la Actodigina, se verificó mediante la presencia de una coloración café-grisasea intensa, característica de los compuestos dianilo. La reacción que se efectuó es la siguiente ( ver anexo 19 ; pag. 200 ).

**4.2.4.- GRUPO HIDROXILO ( ESTEROIDAL )**

La presencia de una coloración escarlata brillante, ratifica la reactividad del grupo hidróxilo esteroidal constitutivo de la Actodigina. La reacción que se efectúa es la siguiente ( ver anexo 20 ; pag. 201 ).

**4.2.5.- GRUPO LACTONA**

La reactividad de la lactona funcional de la Actodigina, se verificó mediante la presencia de un color café que vira gradualmente a púrpura. La reacción efectuada es la siguiente ( ver anexo 21 ; pag. 202 ).

#### 4.3.- PRUEBAS RAPIDAS DE IDENTIFICACION

##### 4.3.1.- FORMACION DE COMPLEJO DE FIERRO-III

En un tubo de ensayo, colocar 2 ml de reactivo de color, adicionar aproximadamente 1 mg de Actodigina, mezclar perfectamente y adicionar 1 ml de ácido sulfúrico concentrado; homogenizar suavemente, la formación de una coloración rojiza que vira gradualmente a un tono azul ciena, indica la presencia del glucósido cardiaco. La reacción que se efectúa es la siguiente ( ver anexo 22 ; pag. 203 ).

##### NOTAS:

###### \* REACTIVO DE COLOR

Disolver perfectamente 25 mg de cloruro férrico en 100 ml de ácido acético glacial. Proteger de la luz.

\* En el caso de disoluciones de Actodigina, ya sean orgánicas o acuosas, tomar una alícuota, eliminar el exceso de disolvente, secar a 110 °C durante 1 hora y realizar la prueba. La reacción no se lleva a cabo satisfactoriamente estando el digital en solución.

\* La coloración azul ciena es específica para Actodigina, ya que al efectuar la prueba con otros glucósidos cardiacos, se observó que generan una tonalidad azul muy diferente a la desarrollada por la Actodigina, tal es el caso de Digitoxina que generó una tonalidad azul claro y Bufalina, una coloración azul-verdoso.

\* Para observar mejor la coloración, emplear una fuente de luz blanca, para lo cual se recomienda utilizar una lámpara de luz de sodio de 100 W, para análisis halocrómico.

\* Entre más puros sean los reactivos, se podrá diferenciar mejor la coloración característica de la Actodigina.

**4.3.2.- FORMACION DE COMPLEJO DE FOSFORO-V-RB1**

Disolver perfectamente 3 mg de Actodigina en 1 ml de ácido sulfúrico concentrado, dejar reposar 10 minutos, agregar 1 ml de una solución etanólica al 1 % de RB1 (rodamina base S1), mezclar suavemente y vertir muy lentamente 1 ml de una solución acuosa al 5 % de pentacloruro de fósforo; inmediatamente se observa la formación de un color rojo-cereza que verifica la presencia del glucósido cardiaco. La reacción que se efectúa es la siguiente ( ver anexo 23 ; pag. 204 ).

**NOTAS:**

- \* En el caso de disoluciones de Actodigina, las acuosas y de piridina interfieren en el análisis, en tal caso, eliminar el disolvente y secar a 110 °C durante 2 horas antes de efectuar la prueba.
- \* La coloración rojo-cereza es específica para Actodigina, ya que Digitoxigenina presentó una tonalidad rojo-naranja y Bufalina rojo-violeta.
- \* Los reactivos empleados deberán ser de buena calidad, ya que las impurezas, pueden interferir en la reacción.
- \* Se recomienda emplear una lámpara para análisis halocrómico de luz de sodio de 100 W, para apreciar mejor la coloración rojo-cereza de la Actodigina.

5.- DESARROLLO DE METODO ESPECTROFOTOMETRICO PARA DETERMINACION CUANTITATIVA DE ACTODIGINA

5.1.- REACCION DE COLOR

Se seleccionó para desarrollo del método de cuantificación espectrofotométrica de la Actodigina, una reacción por formación de complejo de hierro III, debido a que éstos, son de fácil formación, son bastante estables en disolución y generan coloraciones muy particulares dependiendo del tipo y número de ligandos unidos al átomo metálico del complejo, además de ser propicios para detección de pequeñas cantidades de producto. El método seleccionado es el siguiente:

En un tubo de ensayo, colocar 2 ml de reactivo de color, adicionar aproximadamente 1 mg de Actodigina, mezclar perfectamente y adicionar 1 ml de ácido sulfúrico concentrado; homogenizar suavemente, la formación de una coloración rojiza que vira gradualmente a un tono azul ciena, indica la presencia del glucósido cardíaco. La reacción que se efectúa es la siguiente ( ver anexo 24 ; pag. 205 ).

NOTAS:

\* REACTIVO DE COLOR

Disolver perfectamente 25 mg de cloruro férrico en 100 ml de ácido acético glacial. Proteger de la luz.

\* En el caso de disoluciones de Actodigina, ya sean orgánicas o acuosas, tomar una alícuota, eliminar el exceso de disolvente, secar a 110 °C durante 1 hora y realizar la prueba. La reacción no se lleva a cabo satisfactoriamente estando el digital en solución.



- \* La coloración azul ciena es específica para Actodigina, ya que al efectuar la prueba con otros glucósidos cardiacos, se observó que generan una tonalidad azul muy diferente a la desarrollada por la Actodigina, tal es el caso de Digitoxina que generó una tonalidad azul claro y Bufalina, una coloración azul-verdoso.
  
- \* Para observar mejor la coloración, emplear una fuente de luz blanca, para lo cual, se recomienda utilizar una lampara de luz de sodio de 100 W, para análisis halocrómico.
  
- \* Entre más puros sean los reactivos, se podrá diferenciar mejor la coloración caracteritica de la Actodigina.

## 5.2.- ESTABILIDAD FISICA DE LA REACCION

### 5.2.1.- PERMANENCIA DE COLOR

Al efectuar el análisis de permanencia de color, se encontró que el tiempo de reacción ( tiempo que tarda en virar de un tono rojizo a un color azul ciena ), fue de 21 minutos.

En tanto que el tiempo de estabilidad colorida ( tiempo en el cual permanece constante el color azul ciena ), fue de 38 minutos, después de los cuales el color azul ciena desaparece gradualmente.

### 5.2.2.- EFEECTO DE DISOLUCION

Tanto en la disolución etanólica como en la metanólica de Actodigina, después de someterlas a reacción, se observó una coloración amarilla característica del cloruro férrico en disolución, la cual viró muy ligeramente a un tono amarillo verdoso, para declinar posteriormente en la coloración amarilla inicial, la cual, degeneró gradualmente hasta quedar incolora la reacción.

Por otra parte, al emplear una disolución de Actodigina en acetato de etilo y someterla a reacción, se observó únicamente la coloración amarilla del cloruro férrico, la cual después de algún tiempo, declinó hasta desaparecer totalmente.

En tanto que al someter la Actodigina a reacción encontrándose ésta en una disolución de agua-etanol-metanol ( 1:1:1 ), se observó inicialmente una coloración amarilla, la cual, rápidamente, viró a un tono naranja para posteriormente desaparecer tan rápido como se había formado, quedando nuevamente una tonalidad amarilla; ésta, degeneró gradualmente hasta desaparecer por completo.

Por tales resultados, se verificó que el efecto de disolución, más concretamente, los disolventes, afectan considerablemente a la reacción, por lo que hay que eliminar éstos antes de proceder a efectuar la reacción de color que identifica a la Actodigina.

## 5.2.3.- EFECTO DE LUZ

TUBO	FUENTES DE LUZ	TIEMPO DE REACCION	TIEMPO DE ESTAB. COLORIDA	VIRE DE COLOR
1	Mercurio	21 min	18 min	naranja a verde
2	Neón	20 min	21 min	amarillo rojizo a azúl verdoso
3	Sodio	28 min	29 min	rojo a azúl cienna
4	Tungsteno	25 min	40 min	rojo a azúl cienna
5	Solar	28 min	41 min	rojo a azúl cienna
6	Oscuridad	19 min	52 min	rojo a azúl cienna

EFECTO DE LUZ SOBRE LA REACCION DE COLOR

Con la prueba efectuada, se observó que las fuentes luminosas de mercurio y neón, afectan tanto el tiempo de estabilidad de la reacción así como la coloración de la misma, en tanto que las exposiciones directas ante luz de tungsteno, luz solar y luz de sodio, revelaron que la reacción no sufre alteración en la coloración del complejo de fierro III, además de propiciar un rango de tiempo aceptable en relación a la permanencia o estabilidad del color, lo cual es importante para poder efectuar una serie de análisis colorimétricos sin que éste se vea afectado.

Por otra parte, se observó que la reacción al ser aislada de cualquier fuente luminosa, ésta se lleva a cabo más rápidamente, además, de que la permanencia del color se vió prolongada por un lapso de tiempo mayor que en los otros casos, lo cual implica que el complejo es gradualmente susceptible a la luz, ya que su inestabilidad se vió acelerada por esta, al registrarse tiempos cortos de permanencia de color.

## 5.2.4.- EFECTO DE AIRE

TUBO	EFFECTO DE AIRE	TIEMPO DE REACCION	TIEMPO DE ESTAB. COLORIDA	VIRE DE COLOR
1	Total...A	28 min	41 min	rojo a azul cieno
2	Parcial.B	28 min	45 min	rojo a azul cieno
3	Nulo....C	28 min	46 min	rojo a azul cieno

A : Sin tapón.

B : Con tapón de goma.

C : Con tapón de goma y a vacío.

## EFECTO DEL AIRE SOBRE LA REACCION DE COLOR

Con el análisis efectuado se observó que la presencia del aire no afecta al tiempo de reacción, pero sí causa cierto efecto en el tiempo de estabilidad o permanencia del color, ya que éste se vio incrementado por la ausencia de aire, además, aunque en los tres casos se verificó el vire de una tonalidad rojiza a azul cieno, bajo efecto de aire parcial y nulo, el vire a azul cieno fue más intenso que el generado bajo efecto total de aire; por lo cual, se procedió a repetir nuevamente el análisis, para verificar si esa intensificación se revierte al entrar en contacto la reacción con el aire; para lo cual, se retiraron los tapones a los 30 minutos de efectuada la reacción, que es el tiempo aproximado en el cual se efectúa ésta, y se verificó que el color azul cieno intenso no declina si no hasta 40 minutos después de haberse generado, lo cual implica que el aire no afecta el tiempo de reacción, pero sí la intensidad de color del complejo de hierro III que se forma durante la reacción.

**5.3.- DETERMINACION DE LONGITUD DE ONDA DE MAXIMA ABSORCION**

En base al análisis espectrofotométrico efectuado ( ver gráfica del anexo 25 ; pag. 206 ), se observó que la longitud de onda de máxima absorción para la reacción de formación del complejo de fierro III para la Actodigina, es de 556 nm.

**5.4.- ESTABILIDAD ESPECTROFOTOMETRICA DE LA REACCION**

Tras de efectuar el análisis ( ver gráfica del anexo 26 ; pag. 207 ), se obtuvo que la reacción requiere de aproximadamente 30 minutos ( 10 minutos de preincubación más 18.35 minutos de tiempo registrado ) para alcanzar su estabilidad máxima, manteniendose en ella durante aproximadamente 39.54 minutos, en donde después de este tiempo, la reacción comienza a degenerar.

5.5.- VALIDACION DEL METODO

5.5.1.- LINEALIDAD DEL SISTEMA

En base al análisis efectuado, para evaluar la linealidad del sistema, se obtuvieron los siguientes resultados:

TUBO	Co. DE ACTODIGINA	1ª CURVA (Abs 556 nm)	2ª CURVA (Abs 556 nm)
B	0.000 mg	0.000000	0.000000
1	1.000 mg	0.656789	0.662077
2	0.875 mg	0.578646	0.582847
3	0.750 mg	0.499141	0.512724
4	0.625 mg	0.396998	0.399887
5	0.500 mg	0.319942	0.322171
6	0.375 mg	0.245885	0.247576
7	0.250 mg	0.168970	0.171201
8	0.125 mg	0.082105	0.081703
9	0.100 mg	0.068198	0.068794
10	0.075 mg	0.049201	0.048854
11	0.050 mg	0.034111	0.034359
12	0.025 mg	0.016810	0.017002
<b>TABLA DE RESULTADOS LINEALIDAD DEL SISTEMA</b>		r = 0.999731	r = 0.999548
		r <sup>2</sup> = 0.999462	r <sup>2</sup> = 0.999096
* VALORES PROMEDIO DE AMBAS CURVAS		r = 0.999640 *	
		r <sup>2</sup> = 0.999279 *	
		CV = 0.0130 %	

En ambas curvas, "r" y "r<sup>2</sup>", se encontraron dentro de los criterios de aceptación para la linealidad del sistema ( r ≥ 0.99 y r<sup>2</sup> ≥ 0.98 ), obteniéndose además un coeficiente de variación, de 0.013 %, el cual está dentro del límite de aceptación ( CV ≤ 1.5 % ). Por lo cual se infiere que EL SISTEMA ES LINEAL.

VALORES OBTENIDOS	CRITERIOS DE ACEPTACION
$r = 0.999640$	$r \geq 0.99$
$r^2 = 0.999279$	$r^2 \geq 0.98$
CV = 0.0130 %	CV $\leq$ 1.5 %

■ DATOS OBTENIDOS PARA LA LINEALIDAD DEL SISTEMA ■

#### 5.5.2.- LINEALIDAD DEL METODO

En base al análisis efectuado, para evaluar la linealidad del método, se obtuvieron los siguientes resultados:

TUBO	CANT. ADIC. DE ACTODIGINA	Abs 556 nm	CANT. RECUP. DE ACTODIGINA	PORC. DE RECOBRO
B	0.00 mg	0.000000	0.000000 mg	0.000 %
1-A	0.15 mg	0.098562	0.149985 mg	99.990 %
1-B	0.15 mg	0.098168	0.149399 mg	99.599 %
1-C	0.15 mg	0.098599	0.150056 mg	100.037 %
2-A	0.40 mg	0.262435	0.399985 mg	99.991 %
2-B	0.40 mg	0.261316	0.398278 mg	99.562 %
2-C	0.40 mg	0.260350	0.396804 mg	99.201 %
3-A	0.65 mg	0.426228	0.650015 mg	100.002 %
3-B	0.65 mg	0.425400	0.648584 mg	99.782 %
3-C	0.65 mg	0.425526	0.648776 mg	99.812 %
4-A	0.90 mg	0.590209	0.899997 mg	99.999 %
4-B	0.90 mg	0.587309	0.895573 mg	99.508 %
4-C	0.90 mg	0.584761	0.891686 mg	99.076 %

TABLAS DE RESULTADOS DE ANALISIS ESTADISTICO

TUBO	CANT. ADIC. DE ACTODIGINA	CANT. RECUP. DE ACTODIGINA
BNC	0.00 mg	0.000000 mg
1-A	0.15 mg	0.149985 mg
2-A	0.40 mg	0.399985 mg
3-A	0.65 mg	0.650015 mg
4-A	0.90 mg	0.899997 mg

**CANT. ADIC. Vs CANT. RECUP.**

CURVA \*A\*

$r_A = 0.99999999 \cong 1$   
 $r^2_A = 0.99999999 \cong 1$   
 $m_A = 1.00001193 \cong 1$   
 $b_A = 0.00000861 \cong 0$

TUBO	CANT. ADIC. DE ACTODIGINA	CANT. RECUP. DE ACTODIGINA
BNC	0.00 mg	0.000000 mg
1-B	0.15 mg	0.149399 mg
2-B	0.40 mg	0.398278 mg
3-B	0.65 mg	0.648584 mg
4-B	0.90 mg	0.895573 mg

**CANT. ADIC. Vs CANT. RECUP.**

CURVA \*B\*

$r_B = 0.99999805 \cong 1$   
 $r^2_B = 0.99999610 \cong 1$   
 $m_B = 0.99577123 \cong 1$   
 $b_B = 0.00014288 \cong 0$



TUBO	CANT. ADIC. DE ACTODIGINA	CANT. RECUP. DE ACTODIGINA
BNC	0.00 mg	0.000000 mg
1-C	0.15 mg	0.150056 mg
2-C	0.40 mg	0.396804 mg
3-C	0.65 mg	0.648776 mg
4-C	0.90 mg	0.891686 mg

CANT. ADIC. Vs CANT. RECUP.	
$r_c$	= 0.99998548 $\cong$ 1
$r_c^2$	= 0.99997078 $\cong$ 1
$m_c$	= 0.99207610 $\cong$ 1
$b_c$	= 0.00079244 $\cong$ 0

CURVA \*C\*

COEFICIENTE DE VARIACION
$r_A$ = 0.99999999
$r_B$ = 0.9999805
$r_C$ = 0.99998548
$\bar{X}_r$ = 0.99999451
$S_r$ = 0.00000775

CV = 0.00077 %
----------------

PROMEDIO DEL PORCENTAJE DE RECOBRO		
TUBO	PORCENTAJE ADICIONADO	PORCENTAJE DE RECOBRO
1-A	100 %	99.990 %
1-B	100 %	99.599 %
1-C	100 %	100.037 %
2-A	100 %	99.991 %
2-B	100 %	99.562 %
2-C	100 %	99.201 %
3-A	100 %	100.002 %
3-B	100 %	99.782 %
3-C	100 %	99.812 %
4-A	100 %	99.999 %
4-B	100 %	99.508 %
4-C	100 %	99.076 %
		$\bar{x} = 99.713 \%$

ANALISIS DE CANT. ADIC. Vs CANT. RECUP.	
PARAMETROS EXPERIMENTALES	PARAMETROS DE REFERENCIA
$m = 0.995953$	$m = 1$
$\bar{b} = 0.000312$	$b = 0$
$\bar{r} = 0.999995$	$r \geq 0.99$
$\bar{r}^2 = 0.999989$	$r^2 \geq 0.98$
$CV = 0.00077 \%$	$CV \leq 2 \%$
$\bar{PR} = 99.713 \%$	$PR = 90 - 102 \%$

TABLA DE COTEJO DE PARAMETROS ESTADISTICOS EXPERIMENTALES Y DE REFERENCIA

EN BASE A LOS RESULTADOS ANTERIORES, SE INFIERE QUE EL METODO ES LINEAL.

5.5.3.- EXACTITUD DEL METODO

En base al análisis realizado para evaluar la exactitud del método, se obtuvieron los siguientes resultados:

TUBO	CANT. ADIC. DE ACTODIGINA	Abs 556 nm	CANT. RECUP. DE ACTODIGINA	PORC. DE RECOBRO
B	0.000 mg	0.000000	0.000000 mg	0.000 %
1	0.002 mg	0.001542	0.001998 mg	99.908 %
2	0.009 mg	0.006130	0.008997 mg	99.967 %
3	0.019 mg	0.012673	0.018978 mg	99.886 %
4	0.985 mg	0.645608	0.984807 mg	99.949 %
5	0.450 mg	0.294572	0.449009 mg	99.779 %
6	0.727 mg	0.476327	0.726272 mg	99.899 %
7	0.905 mg	0.600611	0.915865 mg	101.201 %
8	0.210 mg	0.137728	0.209747 mg	99.879 %
9	0.059 mg	0.038874	0.058947 mg	99.911 %
10	0.027 mg	0.017673	0.026606 mg	98.539 %

CV = 0.6302

PR = 99.892 %

TABLA GENERAL DE RESULTADOS EXPERIMENTALES

ANALISIS DE CANT. ADIC. Vs CANT. RECUP.	
PARAMETROS EXPERIMENTALES	PARAMETROS DE REFERENCIA
CV = 0.6302 %	CV ≤ 2 %
PR = 99.892 %	PR = 98 - 102 %

TABLA DE COTEJO DE PARAMETROS ESTADISTICOS EXPERIMENTALES Y DE REFERENCIA

EN BASE A LOS RESULTADOS ANTERIORES, SE INFIERE QUE EL METODO ES EXACTO.

5.5.4.- PRECISION DEL METODO

En base al análisis efectuado, para evaluar la precisión del método, se obtuvieron los siguientes resultados:

TUBO	CANT. ADIC. DE ACTODIGINA	Abs 556 nm	CANT. RECUP. DE ACTODIGINA	PORC. DE RECOBRO
B	0.000 mg	0.000000	0.000000 mg	0.000 %
1-A	0.027 mg	0.017892	0.029940 mg	99.777 %
2-A	0.027 mg	0.017913	0.026972 mg	99.895 %
3-A	0.027 mg	0.017921	0.026984 mg	99.941 %
4-A	0.027 mg	0.017776	0.026763 mg	99.121 %
5-A	0.027 mg	0.017740	0.026708 mg	98.918 %
6-A	0.027 mg	0.017941	0.027014 mg	100.054 %
1-B	0.480 mg	0.313786	0.478320 mg	99.650 %
2-B	0.480 mg	0.311660	0.475076 mg	98.974 %
3-B	0.480 mg	0.313439	0.477790 mg	99.540 %
4-B	0.480 mg	0.311770	0.475244 mg	99.009 %
5-B	0.480 mg	0.312605	0.476518 mg	99.275 %
6-B	0.480 mg	0.314884	0.479994 mg	99.998 %
1-C	0.975 mg	0.638807	0.974132 mg	99.911 %
2-C	0.975 mg	0.632982	0.965246 mg	98.999 %
3-C	0.975 mg	0.632990	0.965258 mg	99.001 %
4-C	0.975 mg	0.635800	0.969636 mg	99.450 %
5-C	0.975 mg	0.639412	0.975055 mg	100.006 %
6-C	0.975 mg	0.638705	0.973976 mg	99.895 %

CANT. ADIC. Vs CANT. RECUP.	
CURVA A	$P_{PR} = 99.614 \%$ $S_{PR} = 0.473853$ $CV = 0.476 \%$
CURVA B	$P_{PR} = 99.408 \%$ $S_{PR} = 0.397324$ $CV = 0.399 \%$
CURVA C	$P_{PR} = 99.544 \%$ $S_{PR} = 0.463043$ $CV = 0.465 \%$
	$\bar{P}_{PR} = 99.522 \%$ $\bar{CV} = 0.447 \%$

■ TABLA GENERAL DE RESULTADOS EXPERIMENTALES ■

ANALISIS DE CANT. ADIC. Vs CANT. RECUP.	
PARAMETROS EXPERIMENTALES	PARAMETROS DE REFERENCIA
CV = 0.447 %	CV $\leq$ 1.5 %
PR = 99.522 %	PR = 98 - 102 %

TABLA DE COTEJO DE PARAMETROS ESTADISTICOS  
EXPERIMENTALES Y DE REFERENCIA

EN BASE A LOS RESULTADOS ANTERIORES, SE INFIERE QUE  
EL METODO ES PRECISO.

## ANÁLISIS DE RESULTADOS

Antes que nada, es necesario mencionar, que para efecto del estudio de caracterización de la Actodigina, el Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez", de la Ciudad de México, solamente proporcionó noventa y ocho miligramos del digital y dos viales con 5 ml cada uno, de una solución inyectable, con una concentración de 1 mg/ml de Actodigina; por lo cual, sólo se procedió a realizar las pruebas de caracterización de mayor interés para el departamento de Farmacología de ésta institución. Cabe hacer notar, que antes de aplicar las pruebas correspondientes de caracterización a la Actodigina, todas ellas, se evaluaron concienzudamente con su análogo funcional, la Digitoxina, así como con otros digitálicos o glucósidos cardiacos, tales como, Digoxina, Lanatósido-C y Bufalina entre otros. Así, una vez estudiadas perfectamente cada una de las pruebas a realizar, se procedió a la aplicación directa de éstas, sobre la Actodigina.

Ahora bien, dado que noventa y ocho miligramos del fármaco como tal y 10 mg en disolución, son una cantidad pequeña, de la cual, no se puede desperdiciar ni una mínima fracción del

producto, en primera instancia se avocó el estudio de caracterización a efectuar todas aquellas pruebas, en las cuales el glucósido cardiaco se pudiera recuperar, para ser reutilizado en análisis subsecuentes, empleando para todo ello, técnicas de microanálisis bien establecidas, reactivos de calidad y equipos de alta sensibilidad. De las pruebas efectuadas a la Actodigina, algunas de ellas se realizaron en las instalaciones del Departamento de Farmacología del Instituto Nacional de Cardiología " Ignacio Chávez " de la Secretaría de Salubridad y Asistencia, otras, en el Laboratorio de Materias Primas y Síntesis de Medicamentos de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza y en el Departamento de Bioestructuras del Instituto de Química, estas dos últimas instituciones, pertenecientes a la Universidad Nacional Autónoma de México, en donde se tuvo un gran apoyo por parte de los investigadores para el diseño y seguimiento de las pruebas de caracterización a la Actodigina, además de proporcionar los más modernos equipos para el óptimo desarrollo del estudio.

Así pues, en primera instancia se desarrollaron las pruebas físicas de evaluación organoléptica, en donde se encontró que la Actodigina es un producto cristalino amorfo, de color blanco brillante, con características inodoras e insaboras.

Posteriormente, se procedió a la evaluación de propiedades estructurales, recurriendo al análisis espectroscópico, para lo cual, sólo se determinaron aquellas pruebas en las que se pudiera obtener con certeza la composición y conformación de la molécula de Actodigina y, que además, se pudiera recuperar el producto; así, sólo se efectuó el espectro de ultravioleta, en donde se obtuvo la banda característica para los glucósidos de su tipo y el espectro de infrarrojo, del cual se verificó que realmente se tienen los grupos funcionales propuestos, lo cual se aunó a los estudios de cristalografía realizados en 1979 por Dwight S. Fullerton <sup>(22)</sup>, ratificando así, que el producto corresponde al planteamiento de diseño molecular, mediante la conformación y distribución espacial de la estructura de la molécula de Actodigina, corroborando así, que la sustancia caracterizada realmente es el producto esperado.

Una vez verificada la conformación y la presencia de ciertos grupos funcionales, se desarrolló un método de separación cromatográfica en capa fina, el cual permitiera separar perfectamente a la Actodigina de mezclas de sustancias análogas, tanto estructurales como biológicas, que resultan de evaluaciones farmacológicas; así mismo, se diseñó un sistema de revelado cromatográfico de grupos funcionales para dar seguimiento tanto a estudios de reactividad funcional como a



toda prueba relacionada en torno a este activo, en el cual se requería un análisis de esta índole.

A continuación, se desarrollaron al activo, una serie de pruebas fisicoquímicas básicas, como índice de refracción, punto de fusión y solubilidad entre otras; pruebas que particularizan e identifican indirectamente a la Actodigina. Así mismo, dado que la Actodigina se genera bajo una síntesis de nueve intermediarios, se efectuó un análisis residual para evaluar principalmente, posibles residuos de bromo orgánico o bien elemental, provenientes de la introducción del grupo D-glucosa en el carbón-3 del anillo esteroideal, prueba que resultó negativa, lo cual implica que el último proceso de recristalización efectuado en la síntesis del activo, es el apropiado para eliminar posibles residuos contaminantes de este componente. Las pruebas de determinación de humedad, residuos y pérdida por ignición, así como pérdida por secado, generaron la información propicia para continuar estudios de reactividad, además de que dan la pauta para ser considerados como ensayos indirectos de identidad que son importantes de considerar en estudios posteriores de estabilidad o de otra índole.

Dentro del análisis de reactividad funcional, esta resultó propicia como método de identificación directa y como

comprobación de la presencia de los grupos funcionales de la Actodigina, así pues, se verificó la existencia de un azúcar, un hidróxilo esteroidal, un grupo lactónico, un eter, y de la misma molécula de digital. Para los grupos metilo, ya que estos son sumamente estables, la evaluación de reactividad no se llevó a cabo, debido a que ello implicaría el manejo de reacciones altamente selectivas, lo cual no es la finalidad del estudio.

Como medida rápida de identificación específica para la Actodigina, se tuvo la formación de un complejo de fierro-III, el cual, al igual que con análogos estructurales, la Actodigina genera un color azul, pero de tonalidad muy diferente a estos, así mismo, la formación de un complejo de fósforo-V y rodamina base-SI, generó un color muy particular para este glucósido cardiaco de origen sintético.

A parte de la caracterización física, química y fisicoquímica, se desarrolló un método espectrofotométrico para determinación cuantitativa de Actodigina para evaluación de estudios invitro; el método se desarrolló en base a la formación de complejos de fierro-III, ya que resultó ser la reacción cuya coloración fue la más estable y la más fácil de realizar entre las diversas evaluaciones de reactividad, tal método se seleccionó y modificó bajo estudios de estabilidad física de la

reacción, considerando las pruebas de permanencia de color, efecto de disolución, efecto de luz y de aire, con lo cual, se estableció las condiciones de reacción pertinentes para poder desarrollar la estabilidad espectrofotométrica de la reacción, y para delimitar con ello, el preciso establecimiento de las condiciones de reacción. Una vez establecido el método, se procedió a la validación del mismo, para lo cual, dado que no se contaba con gran cantidad de la Actodigina, sólo se evaluaron los parámetros mínimos para efecto de la validación, por lo cual, se consideró la linealidad del sistema y del método, la exactitud y precisión del mismo, de lo cual, tanto el sistema como el método fueron lineales, además de que el método resultó ser exacto y preciso. La selección del rango de concentración para la linealidad, se eligió en base a los requerimientos de evaluación invitro en el área farmacológica, la cual se puede rediseñar a concentraciones más elevadas.

En sí, con la caracterización básica efectuada a la Actodigina, se tiene en general, la verificación de que el producto es el propuesto bajo diseño molecular, y que posee características muy particulares que lo tipifican y enmarcan como glucósido cardíaco.

## CONCLUSIONES

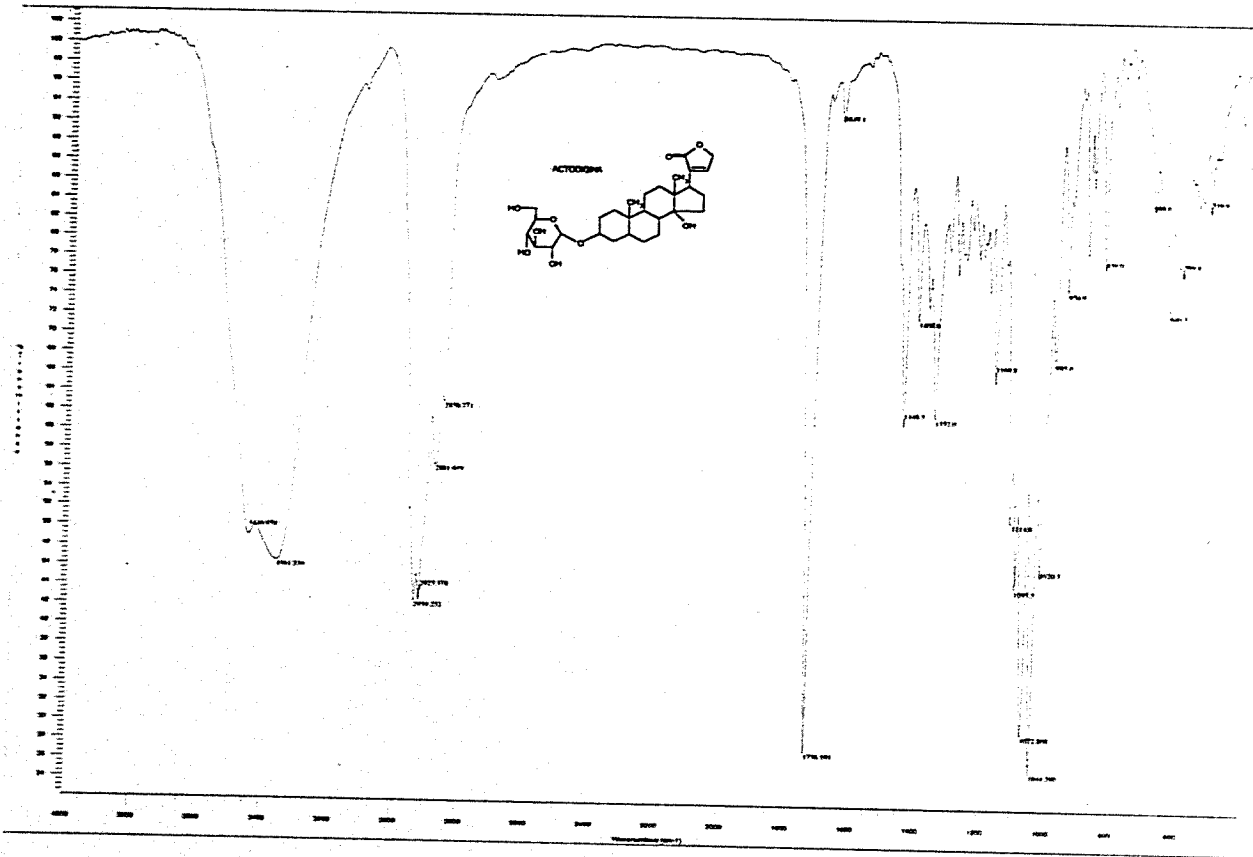
En base a la recopilación bibliográfica efectuada, para desarrollo del estudio de caracterización de la Actodigina, se desarrollaron las pruebas básicas mínimas debido a la escasa muestra proporcionada (108 mg), ya que para un estudio completo de esta índole se requería una muestra mayor. Así pues, el presente trabajo contiene tanto la definición de la conformación estructural de la molécula, así como los estudios espectroscópicos efectuados, de tal manera que el espectro de ultravioleta, manifestó que el producto en cuestión, corresponde a un glucósido cardíaco; el análisis infrarrojo, puso en evidencia a los grupos funcionales de éste, en tanto que la cristalografía, permitió conocer las distancias interatómicas, ángulos de torsión y la conformación espacial, lo que facilita comprender el por qué de su disposición y efecto ante los receptores de la célula cardíaca. En base a ello, los estudios generados de diseño cromatográfico en capa fina y la formación de sustancias y complejos coloridos, en relación a la composición funcional de la Actodigina, resultan ser una herramienta fundamental en estudios posteriores, en los que se desee rastrear o verificar

tanto la presencia como la degradación química o biológica de este glucósido.

Por otra parte, las pruebas de organolépsia, como lo son apariencia, color, olor y sabor, resultan ser parámetros básicos muy peculiares que tipifican físicamente al activo.

La evaluación de pruebas fisicoquímicas como punto de fusión, solubilidad, pH e índice de refracción entre otras, son factores que aportan un enriquecimiento al contexto científico, agilizando toda investigación en relación a éste compuesto; así mismo, contribuye a tal fin, tanto los estudios generados de reactividad funcional como los de diseño e implementación de un método de cuantificación espectrofotométrica, además del análisis residual efectuado, con lo cual, todo ello, genera una característica en extremo particular para el producto, dando por hecho el establecimiento de las bases fundamentales para nuevos campos de aplicación directa de la Actodigina.

# **ANEXOS**

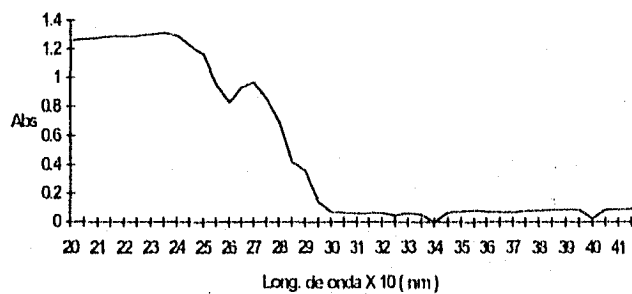


ANEXO (01)

ANEXO (02)

ESPECTRO DE ULTRAVIOLETA

ESPECTRO DE LA ACTOOGINA EN LA REGION ULTRAVIOLETA



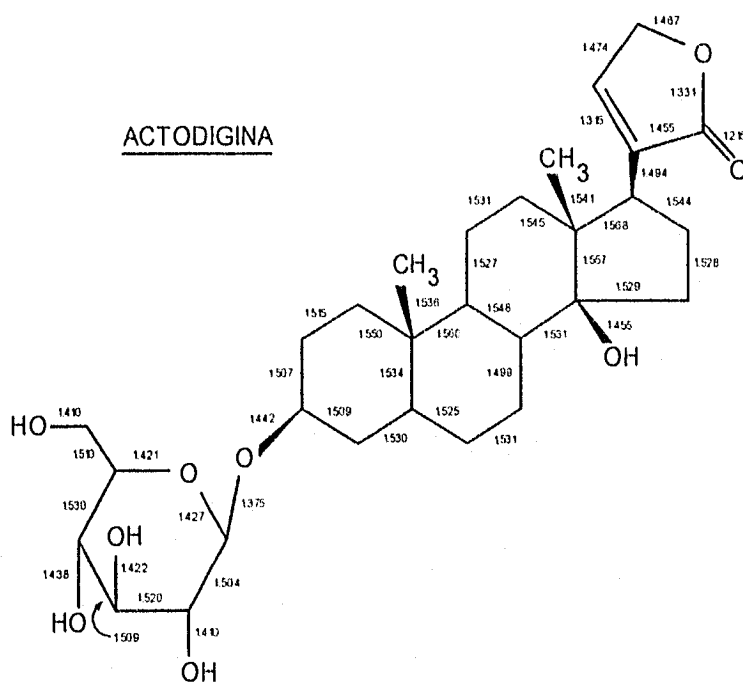
RESULTADOS SECC. 2.2. / ESPECTRO DE ULTRAVIOLETA



ANEXO (03)

CRISTALOGRAFIA POR DIFRACCION DE RAYOS X

DISTANCIAS INTERATOMICAS ( Å )



\* Fuente tomada de " A Crystallographic, Conformational Energy, and Biological Study of Actodigins (AY-21,241) and its Gslnin "; Fullerton, D.S.; Yezhicka, K. et al.; *Molecular Pharmacology*; 17:43-51:1980.

RESULTADOS SECC. 2.4. / CRISTALOGRAFIA POR DIFRACCION DE RAYOS X

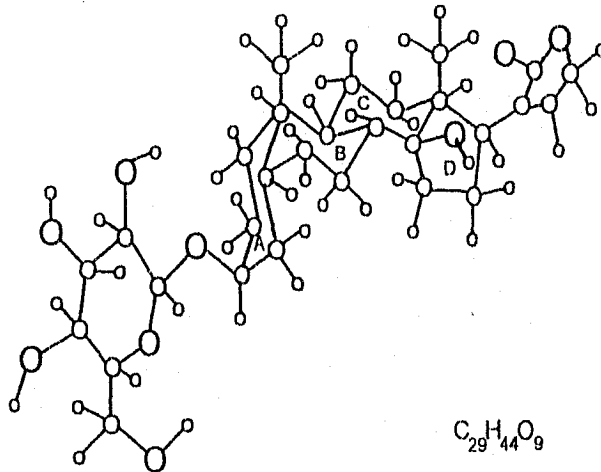


ANEXO (05)

CRISTALOGRAFIA POR DIFRACCION DE RAYOS X

CONFORMACION ESPACIAL

ACTODIGINA



○ : OXIGENO    ○ : CARBONO    ○ : HIDROGENO

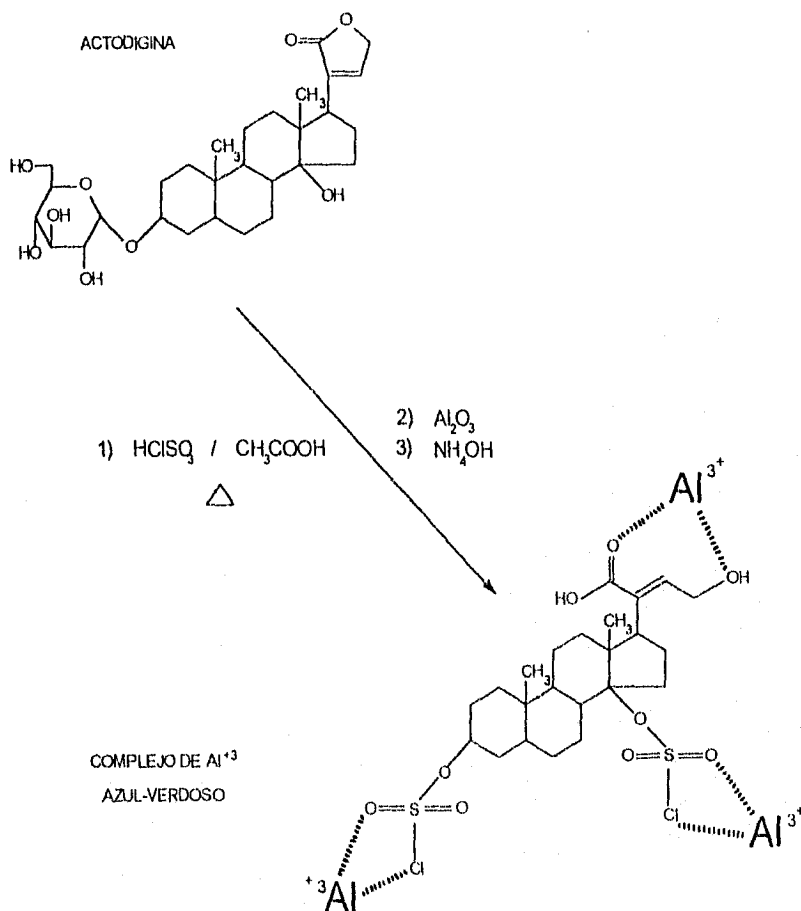
\* Fuente tomada de "A Crystallographic, Conformational Energy, and Biological Study of Actodigin (AY-12,341) and Its Genin"; Fullerton, D.S.; Verlénska, K. et al; *Molecular Pharmacology*; 1:43-51:1980.

RESULTADOS SECC. 2.4. / CRISTALOGRAFIA POR DIFRACCION DE RAYOS X

ANEXO (06)

SISTEMA REVELADOR DE ANILLO ESTEROIDAL

METODO 1

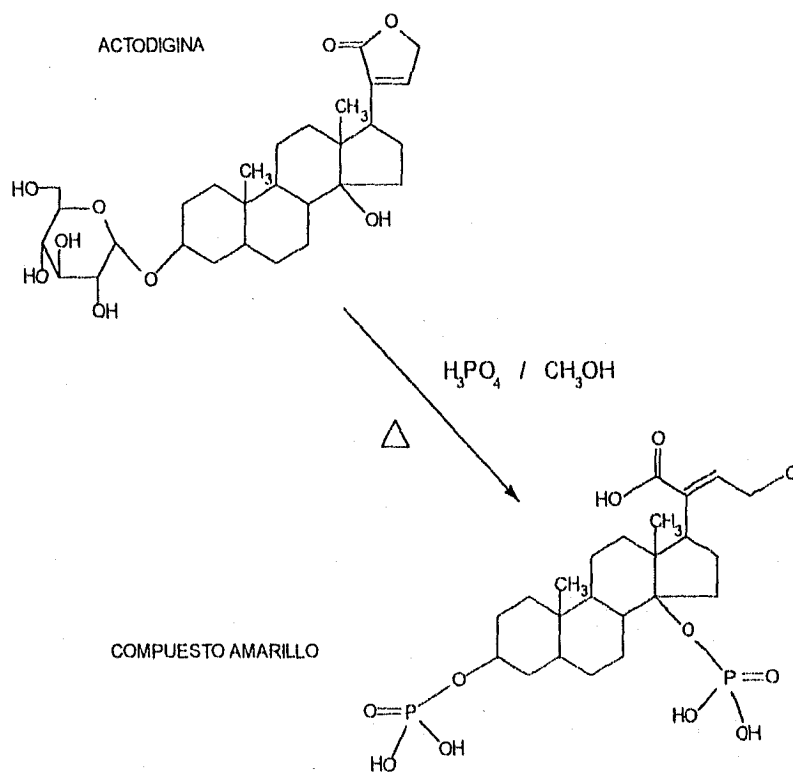


RESULTADOS SECC. 3.1.2. / SISTEMA REVELADOR DE ANILLO ESTEROIDAL

ANEXO ( 07 )

SISTEMA REVELADOR DE ANILLO ESTEROIDAL

METODO II

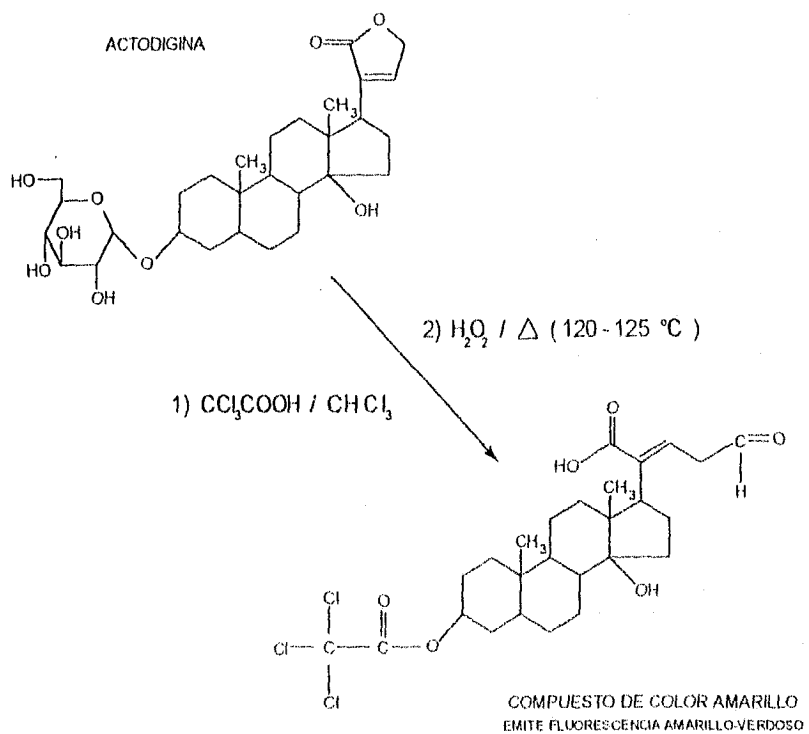


RESULTADOS SECC. 3.1.2. / SISTEMA REVELADOR DE ANILLO ESTEROIDAL

ANEXO ( 08 )

SISTEMA REVELADOR DE ANILLO ESTEROIDAL

METODÒ III

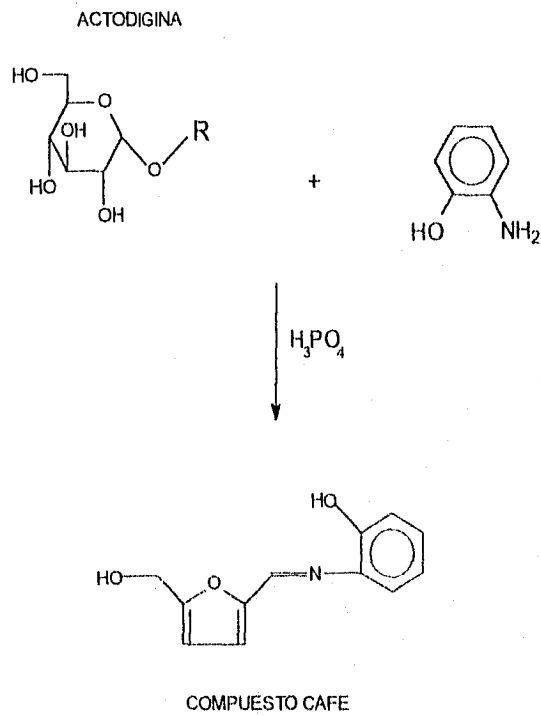


RESULTADOS SECC. 3.1.2. / SISTEMA REVELADOR DE ANILLO ESTEROIDAL

ANEXO (09)

SISTEMA REVELADOR DE D-GLUCOSA

METODO 1



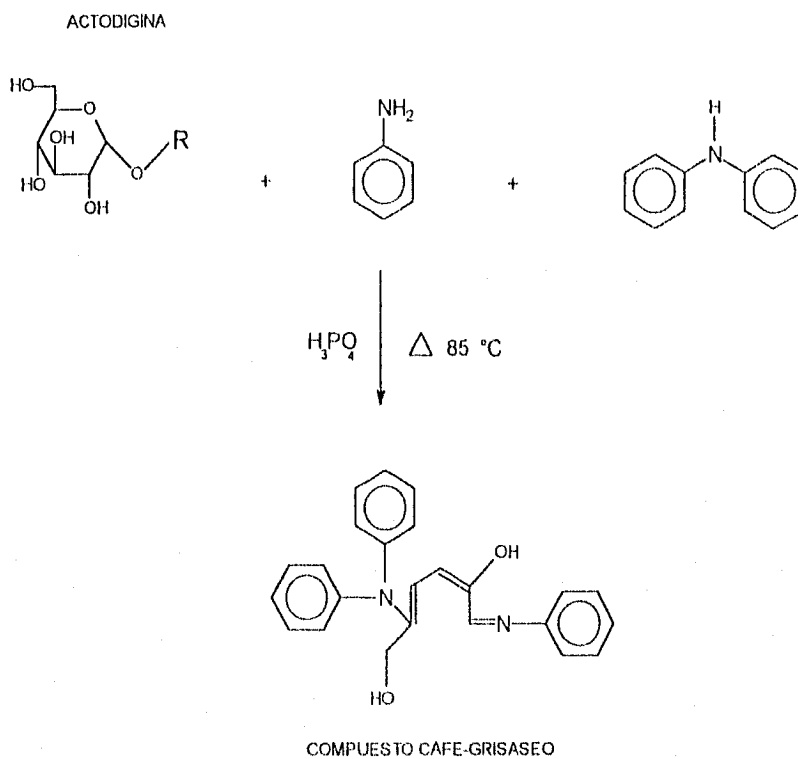
R : ANILLO ESTEROIDAL CON LACTONA EN CARBON 17

RESULTADOS SECC. 3.1.3. / SISTEMA REVELADOR DE D-GLUCOSA

ANEXO ( 10 )

SISTEMA REVELADOR DE D-GLUCOSA

METODO II



R : ANILLO ESTEROIDAL CON LACTONA EN CARBON 17

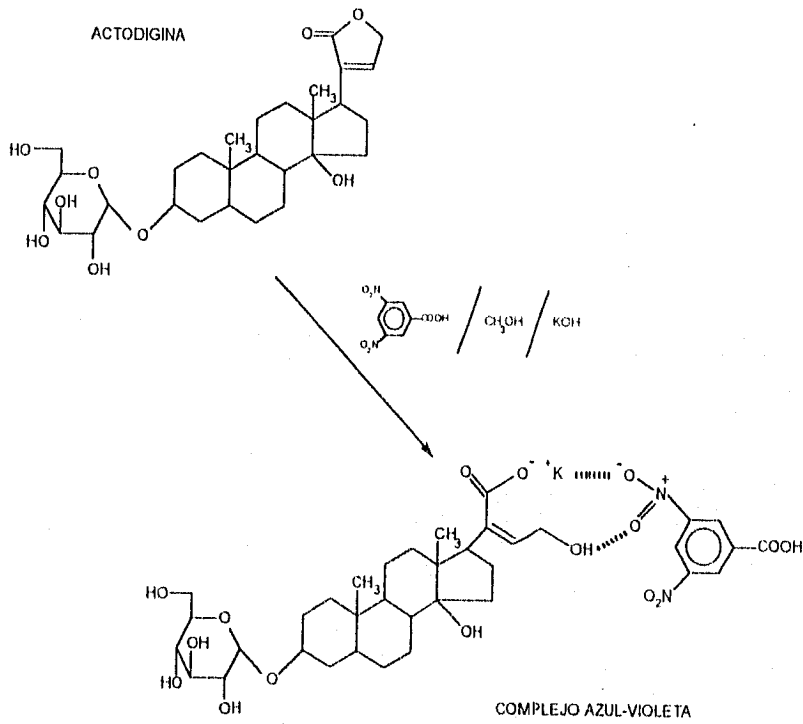
RESULTADOS SECC. 3.1.3. / SISTEMA REVELADOR DE D-GLUCOSA



ANEXO (11)

SISTEMA REVELADOR DE GLUCOSIDO CARDIACO

METODO 1

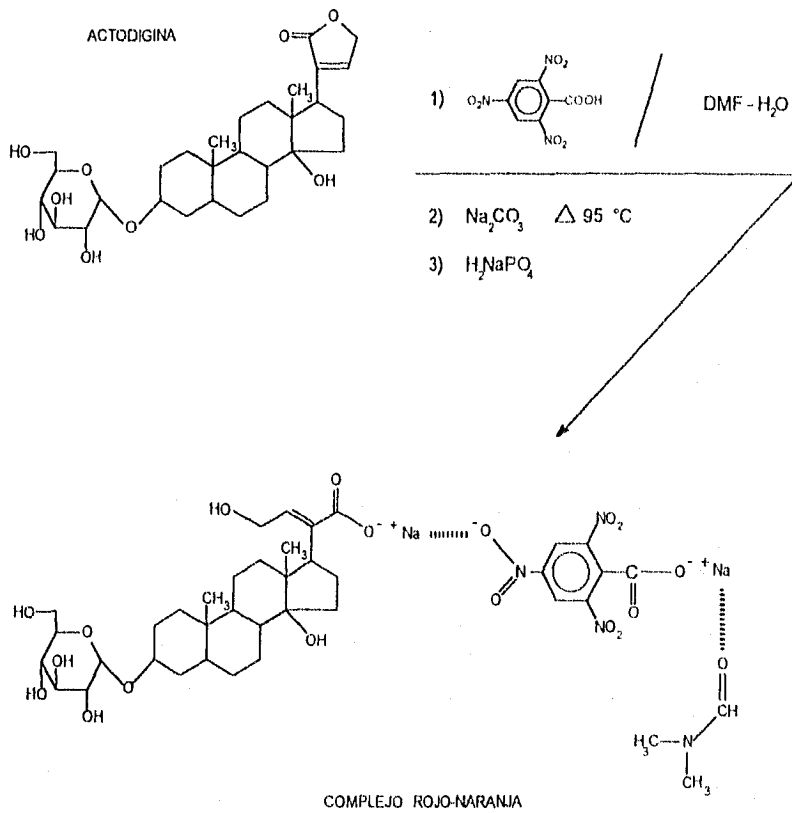


RESULTADOS SECC. 3.1.4 / SIST. REVELADOR DE GLUCOSIDO CARDIACO

ANEXO ( 12 )

SISTEMA REVELADOR DE GLUCOSIDO CARDIACO

METODO II

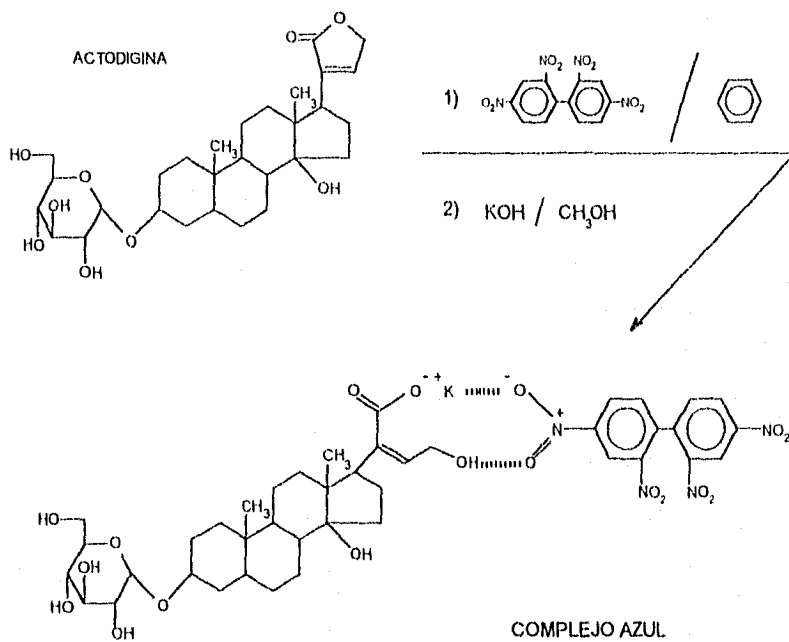


RESULTADOS SECC. 3.1.4. / SIST. REVELADOR DE GLUCOSIDO CARDIACO

ANEXO (13)

SISTEMA REVELADOR DE GLUCOSIDO CARDIACO

METODO III

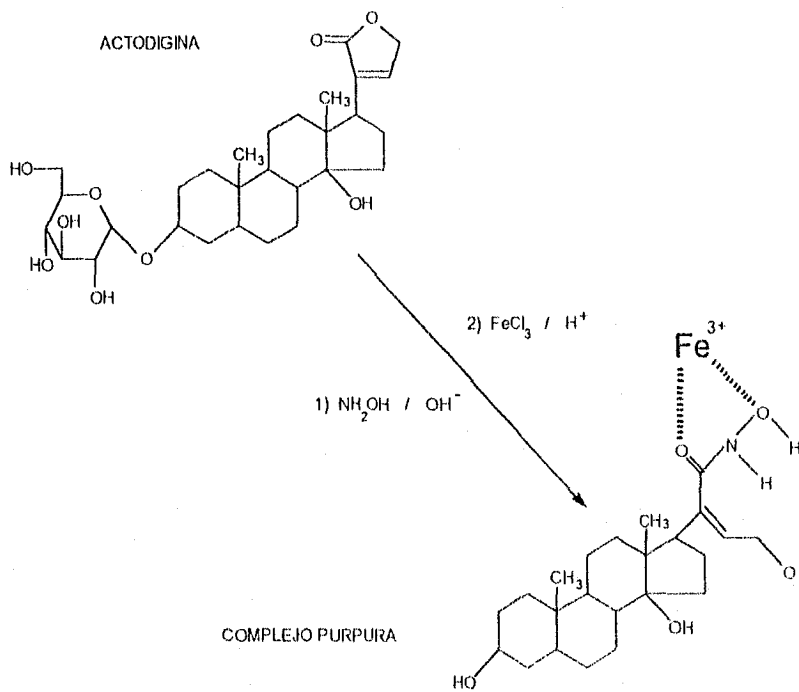


RESULTADOS SECC. 3.1.4. / SIST. REVELADOR DE GLUCOSIDO CARDIACO

ANEXO ( 14 )

SISTEMA REVELADOR DE LACTONA

METODO 1

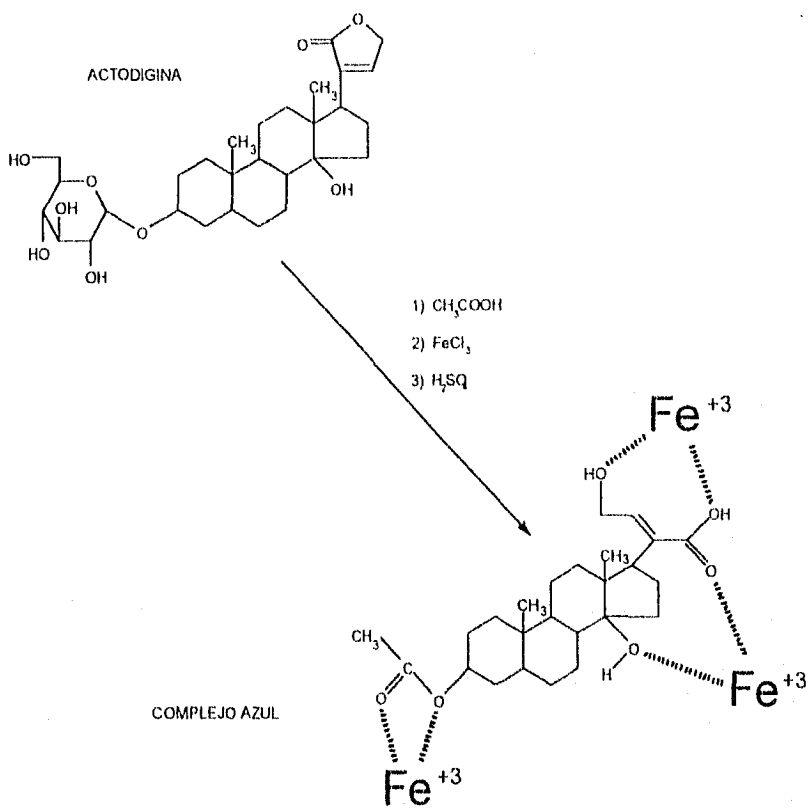


RESULTADOS SECC. 3.1.5. / SISTEMA REVELADOR DE LACTONA

ANEXO ( 15 )

REACTIVIDAD FUNCIONAL / GLUCOSIDO CARDIACO

METODO 1

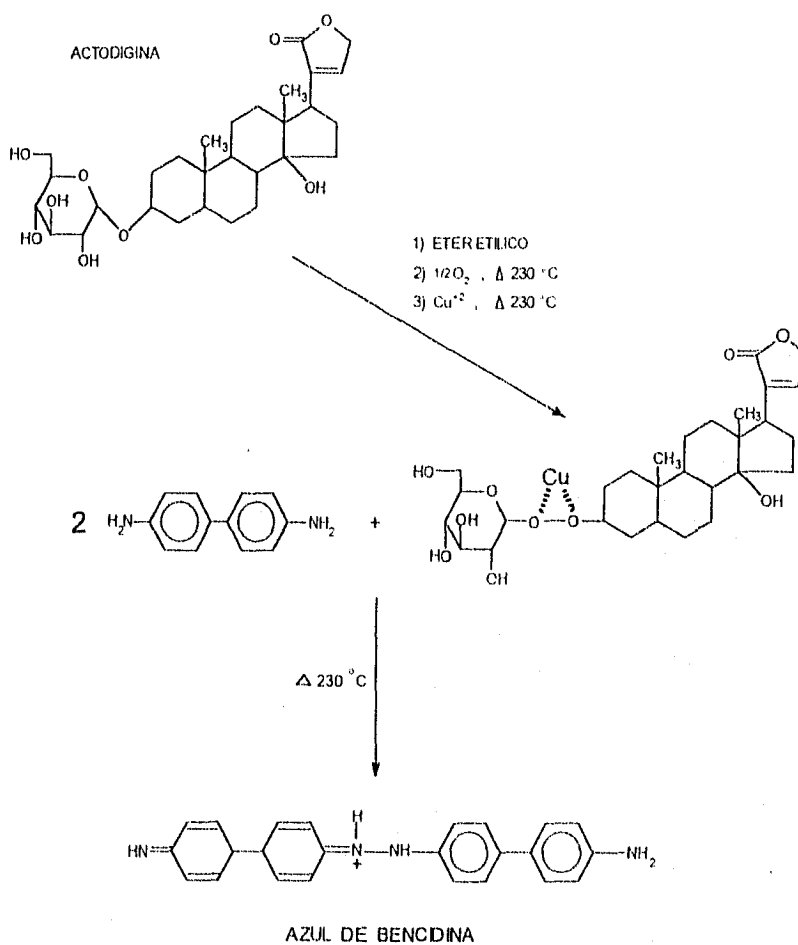


RESULTADOS SECC. 4.2.1. / REAC. FUN. / GLUCOSIDO CARDIACO

ANEXO (16)

REACTIVIDAD FUNCIONAL / ETER

METODO I

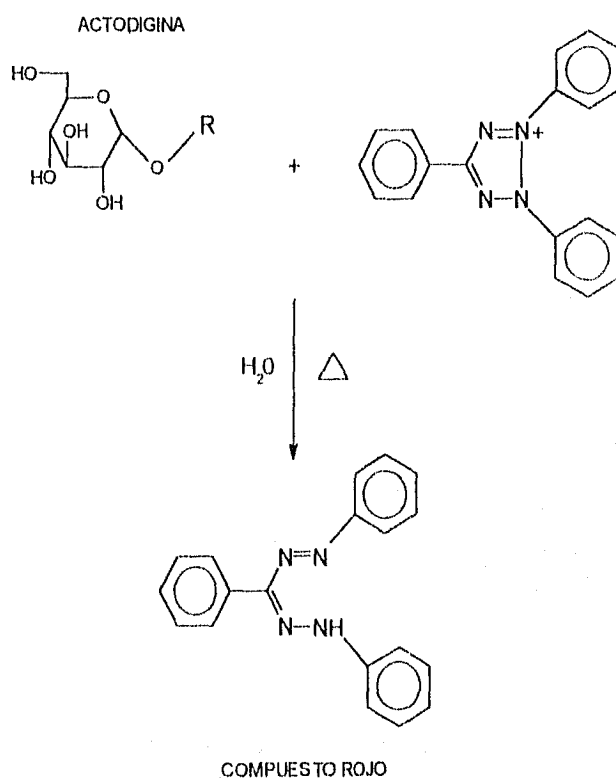


RESULTADOS SECC. 4.2.2. / REACTIVIDAD FUNCIONAL / ETER

ANEXO (17)

REACTIVIDAD FUNCIONAL / D-GLUCOSA

METODO I



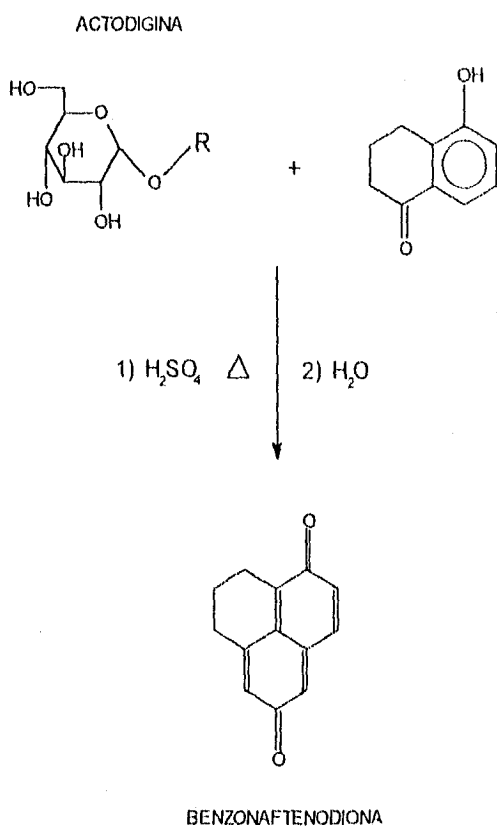
R : ANILLO ESTEROIDAL CON LACTONA EN CARBON 17

RESULTADOS SECC. 4.2.3. / REACTIVIDAD FUNCIONAL / D-GLUCOSA

ANEXO ( 18 )

REACTIVIDAD FUNCIONAL / D-GLUCOSA

METODO II



R : ANILLO ESTEROIDAL CON LACTONA EN CARBON 17

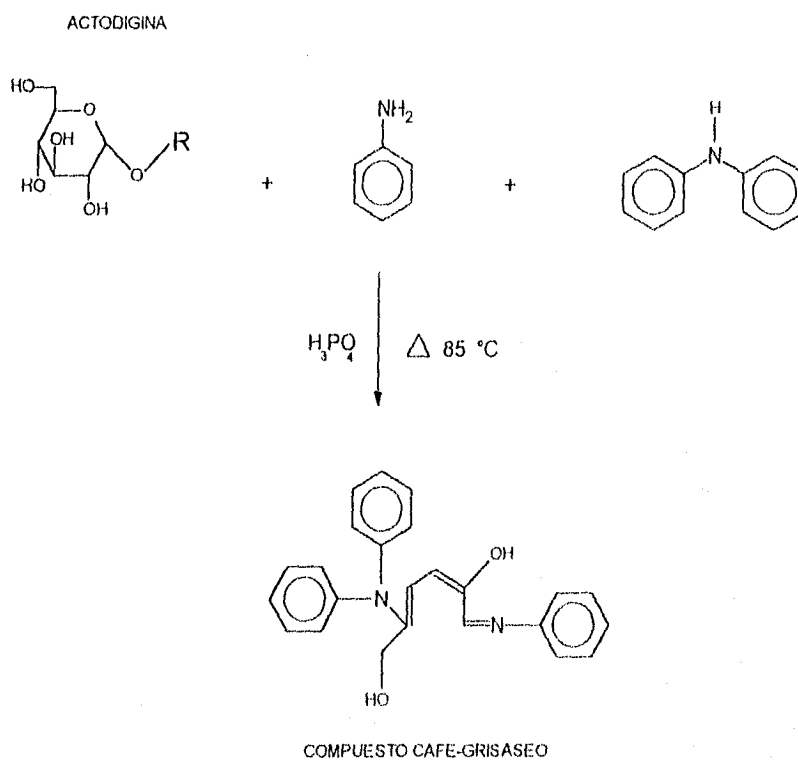
RESULTADOS SECC. 4.2.3. / REACTIVIDAD FUNCIONAL / D-GLUCOSA



ANEXO (19)

REACTIVIDAD FUNCIONAL / D-GLUCOSA

METODO III



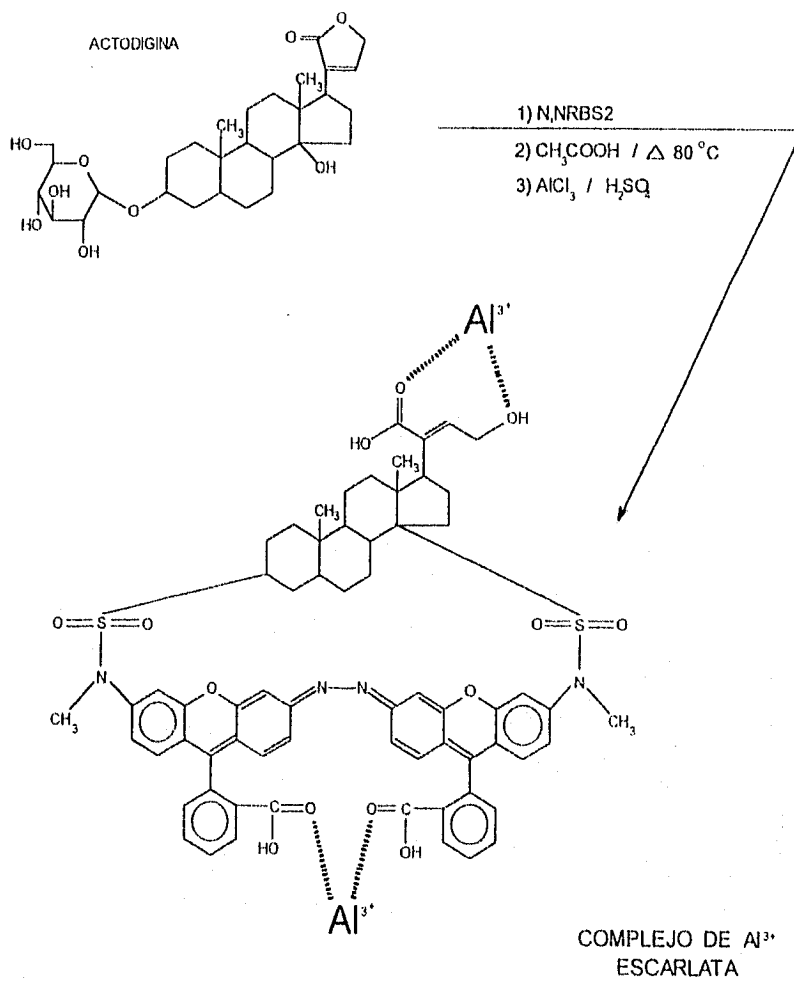
R : ANILLO ESTEROIDAL CON LACTONA EN CARBON 17

RESULTADOS SECC. 4.2.3. / REACTIVIDAD FUNCIONAL / D-GLUCOSA

ANEXO ( 20 )

REACTIVIDAD FUNCIONAL / HIDROXILO ESTEROIDAL

METODO 1

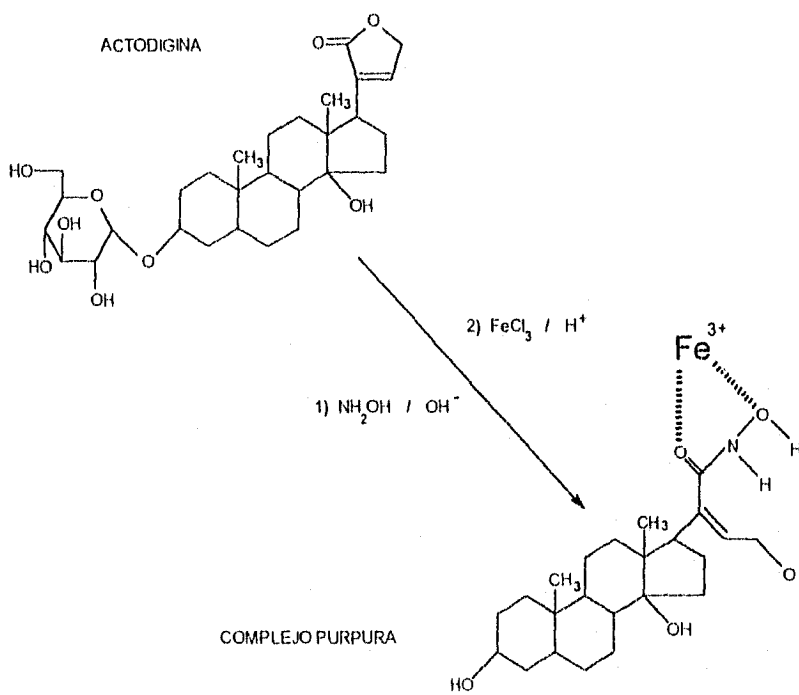


RESULTADOS SECC. 4.2.4. / REAC. FUN. / HIDROXILO ESTEROIDAL

ANEXO ( 21 )

REACTIVIDAD FUNCIONAL / LACTONA

METODO I

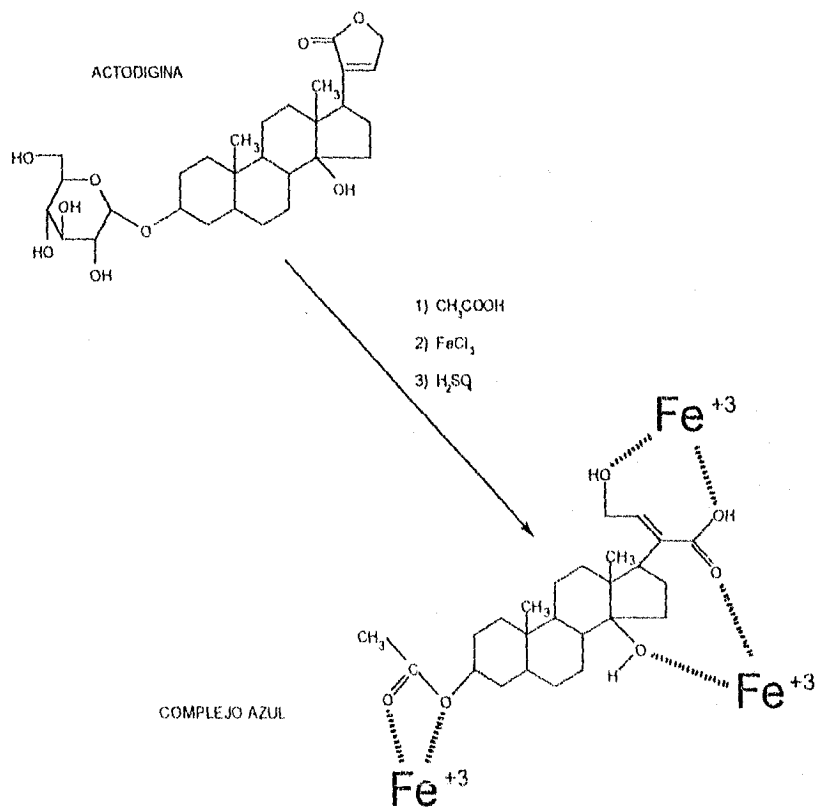


RESULTADOS SECC. 4.2.5. / REACTIVIDAD FUNCIONAL / LACTONA

ANEXO ( 22 )

FORMACION DE COMPLEJOS / COMPLEJO DE FIERRO III

METODO 1

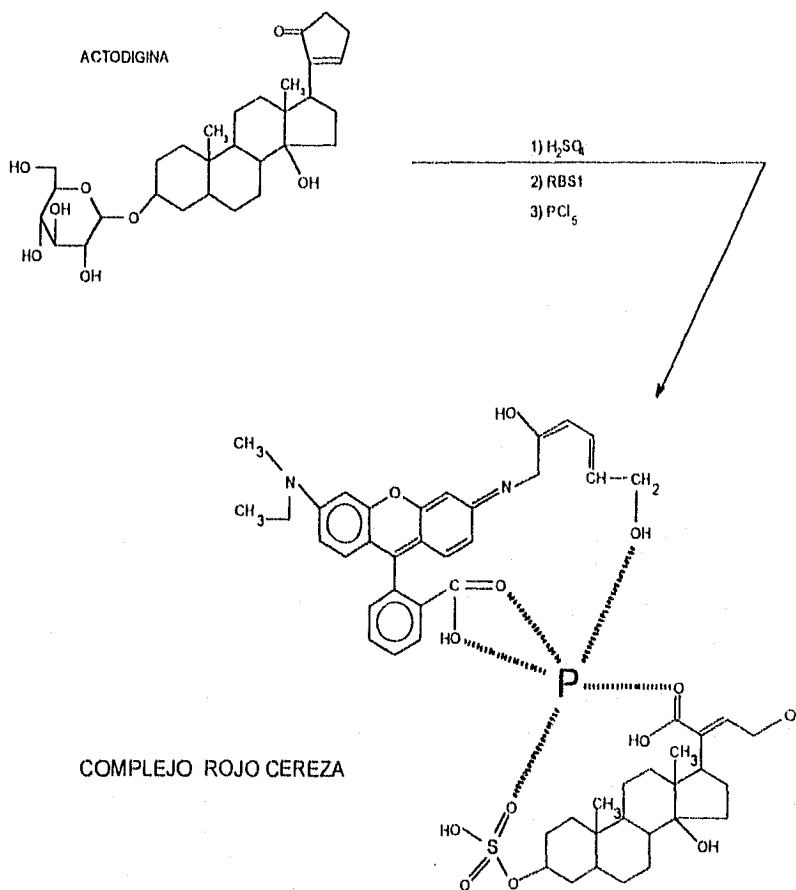


RESULTADOS SECCION 4.3.1 / COMPLEJO DE FIERRO III

ANEXO ( 23 )

FORMACION DE COMPLEJOS / COMPLEJO DE FOSFORO V - RBS1

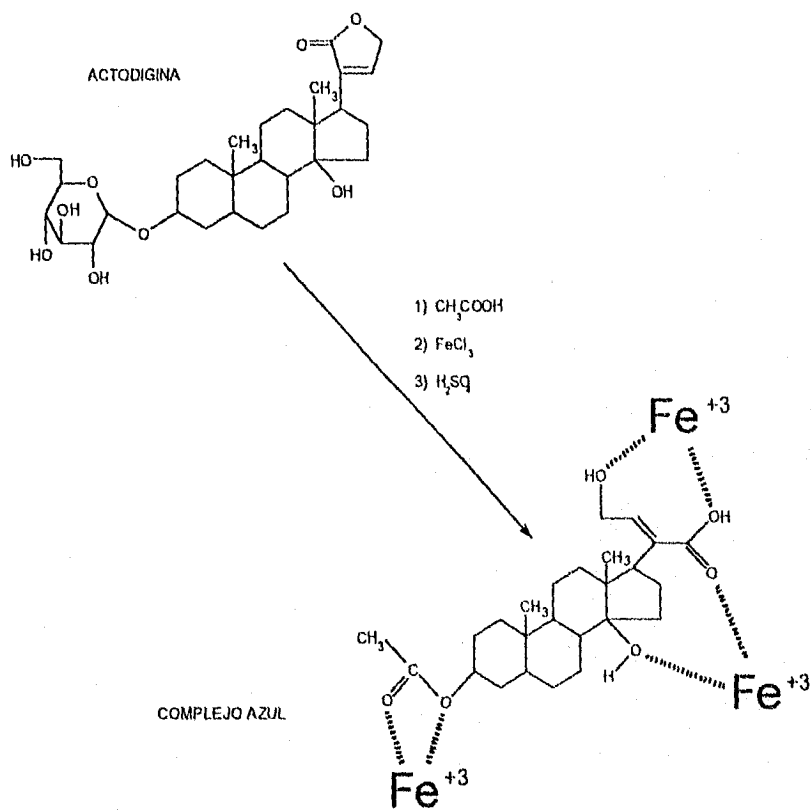
METODO 1



RESULTADOS SECCION 4.3.2. / COMPLEJO DE FOSFORO V - RBS1

ANEXO (24)

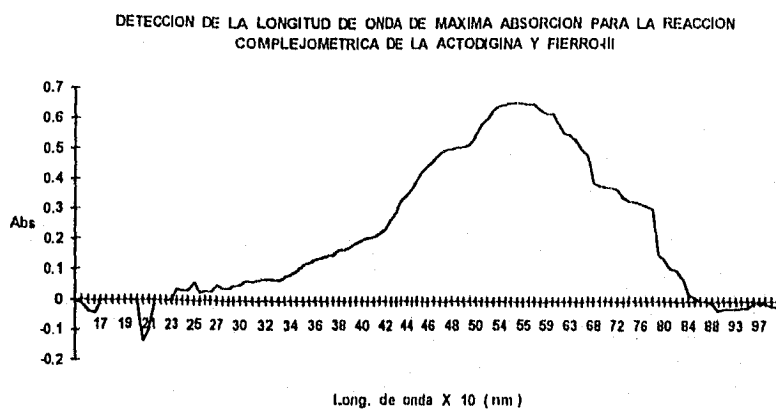
REACCION DE COLOR



RESULTADOS SECCION 5.1. / REACCION DE COLOR

ANEXO ( 25 )

DETECCION DE LA LONGITUD DE ONDA DE MAXIMA ABSORCION  
PARA LA REACCION COMPLEJOMETRICA DE LA ACTODIGINA Y  
FIERRO-III

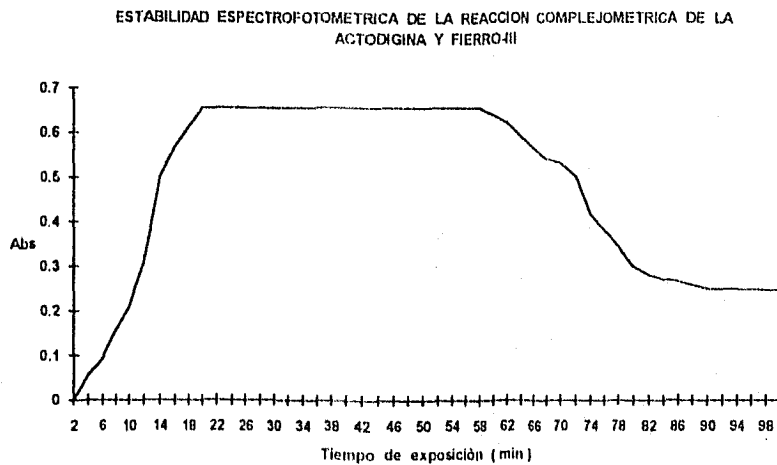


ABSORCION MAXIMA = 556 nm

RESULTADOS SECC. 5.3. / DETEC. DE LONG. DE ONDA DE MAX. ABSORCION

ANEXO ( 26 )

ESTABILIDAD ESPECTROFOTOMETRICA DE LA REACCION  
COMPLEJOMETRICA DE LA ACTODIGINA Y FIERRO-III



TIEMPO DE ESTABILIDAD MAXIMA A 556 nm = 39.74 min

RESULTADOS SECC. 5.4. / ESTAB. ESPECTROFOTOMETRICA DE LA REACCION



## PROPUESTAS

Dado que el Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez" de la Secretaría de Salubridad y Asistencia, no posee una cantidad relativamente sustanciosa de Actodigina (AY-22,241) para completar la caracterización, debido a que Karel Wiesner del Centro de Investigación de Productos Naturales de la Universidad de New Brunswick, en Brunswick Canadá, no proporcionó a Cardiología la cantidad suficiente del fármaco, para efectuar toda una serie de estudios y evaluaciones en torno al AY-22,241; por tal motivo, se propone llevar a cabo la síntesis del activo a nivel de investigación en la Ciudad de México, para concluir la caracterización del mismo, tanto en el área farmacológica como en la toxicológica, considerando en esta última, el análisis de fijación a proteínas (albúmina y globulinas), para evaluar el por qué de la rapidez en la reversibilidad de efectos tóxicos, lo cual difiere en extremo de su análogo Digitoxina y de otros glucósidos de su género, tanto naturales como semisintéticos y sintéticos, para así conocer más a fondo a éste glucósido que es de sumo interés en Cardiología.

Por otra parte, el método de cuantificación espectrofotométrica fue diseñado para estudios invitro, como lo es el trabajar en corazón aislado sin afluente de sangre y

con irrigación electrolítica isotónica, por lo que se propone realizar un ajuste del mismo a estudios in vivo, considerando que algunos componentes de la sangre pueden interferir en la reacción, como lo son las proteínas, que pueden acomplejarse fácilmente con hierro-III en medio ácido, generando coloraciones que van del púrpura al morado ( en diferente grado ), de tal suerte que es aconsejable tratar de eliminar tal efecto mediante la precipitación de las mismas, seleccionando el agente precipitador más adecuado, para evitar un arrastre o secuestro del fármaco de interés en la sedimentación protéica. Por lo tanto, si ésta propuesta se lleva a cabo, será necesario validarla bajo otros parámetros, ya que la selección estadística efectuada al método invitro, no es aplicable a un método invivo, por lo que deben agregarse la especificidad, eficiencia, eficacia y tolerancia entre otros, para así validar perfectamente el planteamiento experimental que se proponga.

Así mismo, para completar el análisis espectroscópico, se sugiere realizar los espectros de masas y resonancia magnética nuclear; claro está, que esto será posible cuando se cuente con una cantidad suficiente de Actodigina, lo cual facilitará la ampliación de los estudios de caracterización efectuados hasta este momento, así como toda investigación realizada en torno al AY-22,241.

## BIBLIOGRAFIA

---

- 1.- Wiesner, K. and Tsai, T.; 1986. Some Recent Progress in the Synthetic and Medical Chemistry Cardioactive Steroid Glycosides; Pure and Appl. Chem.; 58:799-810.
- 2.- Méndez, R.; Pastein, G. and Kabela, E.; 1974. The Influence of the Position of Attachment of the Lactone Ring to the Steroid Nucleus of Digitalis Compounds; J. Pharmacol. Exp. Ther.; 188:189-198.
- 3.- Rojas Soriano, R.; 1984. El Proceso de la Investigación Científica; 3ª ed.; Ed. Trillas; D.F., México.
- 4.- Kiwalth, R. and Kimari, O.; 1980. Infrared of Spectroscopy; 2ª ed.; Ed. D'Evan Nostrand - Simmans Public.; New York, U.S.A..
- 5.- Kiwalth, R. and Kimari, O.; 1986. Starts of the Magnetic Nuclear Resonance; 3ª ed.; Ed. D'Evan Nostrand - Simmans Public.; New York, U.S.A..
- 6.- Simmans Co.; 1980. Spectrophotometrics Assay; 2ª ed.; Ed. Simmans Public.; New Jersey, U.S.A..
- 7.- Downhns Co.; 1972. The Merck Index, Encyclopedia of Chemicals Drugs and Biologicals; 12ª ed.; Ed. Rahway; New Jersey, U.S.A..
- 8.- Malcon, K. and Jouliere, L.; 1972. Heterocyclic Chemistry; 2ª ed.; Ed. New Sons Co.; New Jersey, U.S.A..
- 9.- Sebachy, H.; 1980. Heterocyclic and Esterotypic Chemistry; 2ª ed.; Ed. Jowhelleth Co.; Ontario, Canadá.
- 10.- Acevedo, S.; 1982. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos; 4ª ed.; Ed. S. S. A. Public.; D.F., México.
- 11.- Acevedo, S.; 1983. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos; 5ª ed.; Ed. S. S. A. Public.; D.F., México.
- 12.- Dipalma, J.; 1971. Farmacología Médica; 3ª ed.; Ed. Ediciones la Prensa Médica Mexicana; D.F., México.

- 13.- Ramshar, M. and Volkar, J.; 1989. Biomedical Pharmacology; Ed. Jowhelleth Co.; Ontario, Canadá.
- 14.- D'Viller, H. and Kubbejhas, R.; 1980. Experimental Methods of Analysis; 2ª ed.; Ed. W. B. Sounder Co.; Philadelphia, U.S.A..
- 15.- Tatsime-Ohi, K. and Hiyanoto, Y.; 1989. Analysis Functional; Ed. Shendo; New York, U.S.A..
- 16.- Lemmedt, T. and Klauss, W.; 1980. Beginning of the Absortion Atomic Experimental Test; Ed. Sonth - Hill Co.; Philadelphia, U.S.A..
- 17.- Mack Publising Company; 1947. Pharmacopoeia of the United States; Ed. Mack Publising Co.; Whashington D. C., U.S.A..
- 18.- Morhing, L. and Necker, D.; 1979. Laboratory Experimental in Organic Chemistry; 2ª ed.; Ed. D'Evan Nostrand; New Jersey, U.S.A..
- 19.- Morrison, R.; 1985. Química Orgánica; 2ª ed.; Ed. Fondo Educativo Interamericano; D.F., México.
- 20.- Hawley, G.; 1960. Diccionario de Química y Productos Químicos; Ed. Omega; Barcelona, España.
- 21.- Mylen, G.; 1980. Diccionario de Medicamentos; 3ª ed.; Ed. Mc Graw-Hill; New Jersey, U.S.A..
- 22.- Mani, X. and Sander, C.; 1981. Crystallography; 2ª ed.; Ed. Simmans Public.; New York, U.S.A..
- 23.- Cardine, L. and Lila, W.; 1990. Absortion Atomic, Basic; 4ª ed.; Ed. Caplana; Marsella, Francia.
- 24.- Rajyamedde, W. and Pelhby, L.; 1992. Organic Chemistry Advanced; 2ª ed.; Ed. Shendo; New York, U.S.A..
- 25.- Cardenas, A.; Rither, F. and Miller, H.; 1989. The Microtest, Foundation Basic; Ed. Omega; Barcelona, España.
- 26.- Pastelin, G. and Méndez, R.; 1985. Typical Digitalis Like Effects of Semisybthetic Glycosides With on Lactone Ring; Archivo de Farmacologia y Toxicologia; 11:143-148.
- 27.- Deghenghi, R.; 1970. Synthetic Cardenolides and Related Products; Pure Appl. Chem.; 21:153-165.

- 
- 28.- Shiner, R.; Fuson, R.; Curtin, D. and Morrill, T.; 1979. The Systematic Identification of Organic Compounds; 6<sup>a</sup> ed.; Ed. John Wiley and Sons; Toronto, Canada.
- 29.- Feigl, F. and Anger, V.; 1978. Pruebas a la Gota en Análisis Orgánico; 7<sup>a</sup> ed.; Ed. El Manual Moderno; D.F., México.
- 30.- Feigl, F. and Anger, V.; 1980. Pruebas a la Gota en Análisis Inorgánico; 6<sup>a</sup> ed.; Ed. El Manual Moderno; D.F., México.
- 31.- Hirase, S.; Araki, H. and Nakanishi, S.; 1953. New Spraying Reagents for the Detection of Reducing Sugars on the Paper Chromatograms; Bull. Chem. Soc., Japan; **26**:183-184.
- 32.- Whittaker, V. and Wijesundera, S.; 1952. The Separation of Esters of Choline by Filter-Paper Chromatography; Biochem. Jour.; **51**:348-351.
- 33.- Tschesche, R.; Lampert, F. und Snatzke, G.; 1961. Über Triterpene; VII. Dunnschicht- und Ionenaustauscherpapier Chromatographie von Triterpenoiden; Jour. Chromatog.; **5**:217-224.
- 34.- Popov, A. und Gadeva, V.; 1961. Ein Allgemeinverfahren zur Fleckenfärbung bei der Papierchromatographie von Vulkanisations-Beschleunigern; Jour. Chromatog.; **16**:256-258.
- 35.- Bailey, R. and Bourne, E.; 1964. Colour Reactions Given by Sugars and Diphenylamine-Aniline Spray Reagents on Paper Chromatograms; Jour. Chromatog.; **4**:206-213.
- 36.- Tschesche, R.; Grimmer, G. und Seehofer, W.; 1953. Über Pflanzliche Herzgifte; XXIV. Mittel.: Die Quantitative Trennung und Identifizierung von Herzgiftglykosiden aus Digitalis Purpurea und Lanata Durch "Echte Verteilungschromatographie an Papier"; Chem. Ber.; **86**:1235-1388.
- 37.- Tschesche, R. und Wulf, G.; 1961. Über Digalogenin, ein Sapogenin aus den Samen von Digitalis Purpurea L.; Chem. Ber.; **94**:2019-2026.
- 38.- Lewbart, M.; Wehrli, W. und Reichstein, T.; 1953. Die Cardenolide von Gongronema Gazense (S. Moore) Bullock; Helv. Chim. Acta; **46**:505-517.

- 39.- Darmstadt, E. M.; 1980. Reactivos de Coloración para Cromatografía en Capa Fina y en Papel; Ed. Merck Public.; Republica Federal, Alemania.
- 40.- Soriano Garcia, M.; 1974. Bioestructura: Perspectivas de Investigación en México; Ciencia y Desarrollo; 119:34-42.
- 41.- Dowiesser, T.; 1980. Farmacología: Bases Bioquímicas y Patológicas, Aplicaciones Clínicas; 2ª ed.; Ed. Interamericana; D.F., México.
- 42.- AMA Department of Drugs; 1980. AMA Drugs Evaluations; 4ª ed.; Ed. American Medical Association; Illinois, U.S.A..
- 43.- Loehl, S.; Spratto, G. y Heckeimer, E.; 1984. Manual de Farmacología; 2ª ed.; Ed. Limusa; D.F., México.
- 44.- Ranbbi, R.; 1973. Remington's Pharmaceutical Science; 4ª ed.; Ed. Board Members; Pennsylvania, U.S.A..
- 45.- D.H.S.H.D.W.O.; 1973. British Pharmacopoeia; Ed. H.M.S.O. Public.; London, England.
- 46.- H. T. Co.; 1986. Clarke's, Isolation and Identification of Drugs; 2ª ed.; Ed. The Pharmaceutical Press; London, England.
- 47.- Neher, R. und Wettstein, A.; 1951. Farbreaktionen mit Steroiden, Insbesondere Corticosteroiden, im Papierchromatogram; Helv. Chim. Acta; 34:2279-2285.
- 48.- Binkert, J.; Angliker, E. und Wartburg, U.; 1962. Über die Autoxydation des Strophanthidins; Helv. Chim. Acta; 45:2122-2138.
- 49.- Dence, J. B.; 1980. Steroids and Peptides; Ed. John Wiley and Sons; Toronto, Canada.
- 50.- Castellanos, J. M.; 1973. Avances en Análisis de Esteroides; 2ª ed.; Ed. Científico - Médica; Lisboa, Portugal.
- 51.- Ladd, M. F. C. and Palmer, R. A.; 1988. Structure Determination by X-Ray: Crystallography; 2ª ed.; Ed. Plenum Press; London, England.
- 52.- Dean, J. A.; 1989. Lange, Manual de Química; 13ª ed.; Ed. Mc Graw-Hill; D.F., México.

- 53.- Burton, R.; Zaffaroni, A. and Keutman, E.; 1951. Chromatography of Steroids; Jour. Biol. Chem.; 188:763-771.
- 54.- Aldrich, B.; Frith, M. and Wright, S.; 1956. Paper Chromatographic Detection of New Constituents of Digitalis Lanata; Jour. Pharm. Pharmacol.; 8: 1042-1049.
- 55.- Warren, A. T.; Howland, F. O. and Green, L. W.; 1948. Colorimetric Assay of Digitoxin; Jour. Am. Pharm. Assoc.; 37:186-188.
- 56.- Billeter, J. R. und Miescher, K.; 1951. Über Steroide; Helv. Chim. Acta; 34:2053-2073.
- 57.- von Euw, J. und Reichstein, T.; 1948. Die Glikoside der Samen von Strophanthus Nicholsonii Holm. Glykoside und Aglykone; Helv. Chim. Acta; 31:883-892.
- 58.- Fullerton, D. S.; Kihara, M.; et al; 1984. Cardiac Glycosides. I. A Systematic Study of Digitoxigenin D-Glycoside; Jour. Med. Chem.; 27:256-261.
- 59.- Hilton, J. G.; 1946. A Polarographic Method for the Determination of Digitoxin and Gitoxin and its Applications to Pharmacological Studies; Jour. Pharmacol. Expl. Therap.; 35:353-355.
- 60.- Anderson, R. and Chen, K.; 1946. The Colorimetric Assay of Digitoxin by the Modified Raymond Method; Jour. Am. Pharm. Assoc.; 35:353-355.
- 61.- James, A.; Laquer, F. and Mc Intyre, J.; 1947. A Photoelectric Assay for Digitoxin by Comparison with a Standard Powder; Jour. Am. Pharm. Assoc.; 36:1-4.
- 62.- Rohatgi, S.; 1955. The Identification of Digitoxin from their Acetyl Compounds by Means of Paper Chromatography; Jour. Am. Pharm. Assoc.; 44:428-431.
- 63.- Kaiser, F.; 1955. Die Papierchromatographische Trennung von Herzgiftglykosiden; Helv. Chim. Acta; 38:556-563.
- 64.- Hassall, C. and Martin, S.; 1951. Paper Chromatography of the Cardiac Glycosides; Helv. Chim. Acta; 34:2766-2768.

- 65.- von Stoll, A.; Angliker, E.; Barfuss, F.; Kussmaul, W. und Renz, J.; 1951. Trennung und Bestimmung Herwirksamer Glykoside und Deren Aglykone durch Chromatographie an Silicagel; *Helv. Chim. Acta*; **34**:1460-1477.
- 66.- Bell, F. K. and Krantz, J. C. Jr.; 1950. Digitalis. IX. A Spectroscopic Study of the Baljet Reaction for Digitoxin and Digitoxigenin; *Jour. Am. Pharm. Assoc.*; **39**:319-322.
- 67.- von Djerassi, C.; Grossnickle, T. T. and High, R. B.; 1956. The Constitution and Stereochemistry of Digitogenin; *Chemistry and Industry*; **78**:3166-3173.
- 68.- von Djerassi, C.; Halpern, D.; Halpern, V.; Schindlers, D. und Tamm, Ch.; 1958. Untersuchungen del Optischem Rotationsdispersion. XV. An Wendung auf Steroid-ketole und Herzwirksame Aglykone; *Helv. Chim. Acta*; **41**:250-274.
- 69.- Drakenberg, T.; Brodelius, P.; Mc Intyre, D. D. and Vogel, H. J.; 1990. Structural Studies of Digitoxin and Cardenolids by Two-dimensional NMR; *Can. Jour. Chem.*; **68**:272-277.
- 70.- Rabitzsch, G. and Tambor, V.; 1967. Quantitative Determination of Cardenolides and Cardenolide Glycosides with 2,2',4,4'-tetranitrobiphenyl; *Pharmazie*; **22**:668-675.
- 71.- Brow, P.; Bruschweiler, F. and Pettit, G. R.; 1971. Field Ionization Mass Spectrometry-II; *Organic Mass Spectrometry*; **5**:573-597.
- 72.- Elber, R.; Weiss, Ek. and Reichstein, T.; 1969. Cardenolide und Pregnanderivate aus den Wurzeln von Trachycalymma Fimbriatum; *Helv. Chim. Acta*; **52**:2583-2613.
- 73.- Rashker, Ya. V.; Gorovits, M. B.; Makarichev, G.K. and Abubakirov, N.K.; 1971. Some Questions of the Mass Spectrometry of the Cardenolides; *Khim. Prir. Soedim*; **7**:724-7321.
- 74.- Helm, H.; Backenfeld, T.; Muller, B. W. and Waaler, T.; 1991. The Preparation and Characterization of Digoxin  $\beta$ -cyclodextrin and 2-hydroxypropil- $\beta$ -cyclodextrin Complex; *Acta Pharm. Nord.*; **3**:199-204.



- 75.- Csizér, E.; Gorog, E. S. and Suto, J.; 1973. Analysis of Steroids. XXIII. Microdetermination of  $O^3$ -steroids after Thin-layer Chromatographic Separation; Jour. Chromatog.; 76:502-504.
- 76.- Boasio, M. L.; 1972. Evaluation of Several Solvent Systems in the Thin-layer Chromatographic Separation of cardiotonica Aglycones and Glycosides from Cholesterol, Phytosterol and their Esters; Jour. Chrom.; 73:279-286.
- 77.- Kuhn, R. und Jerchel, D.; 1941. VII. Mitteil.: Reduktion von Tetrazoliumsalzen Durch Bakterien, Gärende Hefe und Keimen de Samen; Ber.; 74:1949-952.
- 78.- Storstein, L.; 1976. IV. A method for Thin-layer Chromatographic Separation and Determination of Digitoxin and Cardioactive Metabolites in Human Blood and Urine; Jour. Chrom.; 117:87-96.
- 79.- Rojahn, A. R.; 1988. Productos Químicos y Farmacéuticos; 8ª ed.; Ed. Talleres Nuevo Mundo, S. A.; New Cambrish, U.S.A..
- 80.- Wilson, H. and Gisvoid's, G.; 1986. Textbook of Organic Medicinal and Pharmaceutical Chemistry; 9ª ed.; Ed. J. B. Lippincott Co.; New York, U.S.A..
- 81.- Makarevich, I. F.; 1968. Kinetics of the Acetylation  $\epsilon$ -and  $\alpha$ -Hydrolysis in Cardenolides; Khim. Prir. Soedin.; 4:221-225.
- 82.- Box, G. E.; Hunter, W. G. and Hunter, J. S.; 1988. Estadística para investigadores; 2ª ed.; Ed. Reverté; Barcelona, España.
- 83.- Izyumou, Yu. A. and Syromyatnikov, V. N.; 1990. Phase Transitions and Crystal Symmetry; 2ª ed.; Ed. Kluwer Academic Publishers; London, England.
- 84.- Mc Murry, J.; 1994. Fundamentals of Organic Chemistry; 3ª ed.; Ed. Brooks / Cole Pub. Co.; California, U.S.A..
- 85.- Wade, L. G.; 1993. Química Orgánica; 2ª ed.; Ed. Prentice-Hall Hispanoamericana; D.F., México.
- 86.- Freund, J. F. y Simón, G. A.; 1992. Estadística Elemental; 8ª ed.; Ed. Prentice-Hall Hispanoamericana; D.F., México.

- 
- 87.- Cheronis, N. D. and Entrikin, J. B.; 1947. Semimicro Qualitative Organic Analysis; 2<sup>a</sup> ed.; Ed. Interscience; New York, U.S.A..
- 88.- Fullerton, D. S.; Yoshioka, Y.; Rohrer, D. et al; 1980; A Crystallographic, Conformational Energy, and Biological Study of Actodigin ( AY-22,241 ) and its Genin; Molecular Pharmacology; 17:43-51.
- 89.- Thomas, R.; Allen, J. Pitts, B. J. and Schwartz, A.; 1979; Cardenolide Analogs. An Explanation for the Unusual Properties of AY 22241; Eur. Jour. Pharm.; 53:227-237.