

Substancia Bazo – Constrictora extraída de las semillas del género citrus

Por: Dr. Francisco T. Macías B.*

Ya que se trata de la presentación ante los distinguidos miembros de la Sociedad Médico – Quirúrgica y estudiantes de medicina, aquí reunidos, de una substancia bazo – constrictora extraída de la semilla del género citrus: método de obtención, presentación del medicamento, trabajos experimentales realizados y casos clínicos de terapéutica aplicada, voy a hacer una pequeña narración acerca de cómo se desarrolló esta investigación, su fuente de origen, sus propulsores y los resultados obtenidos y la aplicación terapéutica que puede dársele.

En el año 1934, siendo estudiante de Patología General, con el Dr. Gabriel Burbano tuve que hacer una pequeña charla sobre Nosología y Nosografía y para ello me puse en contacto con empíricos de nuestros campos para que ellos me revelaran el secreto de la curación de enfermedades según las conciben y las tratan. Fué esta ocasión la que me hizo aprender que las semillas de género citrus eran utilizadas como antifebrífugas y se les atribuía la curación del paludismo. El eminente clínico guayaquileño Dr. Alejo Lascano recetaba a la gente pobre infusión de semillas con ese fin. Uno de sus familiares colaboró en mi idea y comencé a efectuar ensayos en la calle y en la Sala San José de este hospital, servicio del Dr. Heinert. Uno de los efectos terapéuticos que me llamó la atención fué la contracción inmediata y posteriormente permanente de los bazo en los enfermos de paludismo. Muchos médicos participaron de mi interés de investigación acerca de esta acción espleno – constrictora y el Dr. Clodoveo Alcívar me facilitó su laboratorio con el fin de tratar de tener un producto inyectable, pasando pues. de la infusión

* Trabajo presentado ante La Sociedad Médico–Quirúrgica del Guayas
Agosto 18 de 1943.

de semillas a la preparación de una solución concentrada, filtrada en caliente y envasada en ampollas de 1 centímetro. Luego hice un ensayo con los doctores Izquieta Pérez, Montalván e In-sua quienes vieron los primeros resultados de esta investigación. Más tarde el Dr. Darío Moral me ayudó en el campo experimental y comencé a purificar el extracto que había obtenido por concentración de la infusión de semillas. Realizamos estudios analíticos, más o menos completos y seguimos algunos casos clínicos. Durante estos primeros años de experimentación puse en claro que el extracto de semillas dado en solución o en sellos en la dosis de 1 gramo durante 7 días, daba resultados satisfactorios en enfermos palúdicos con esplenomegalias congestivos. Las inyecciones preparadas en colaboración del Dr. Darío Moral eran un poco más purificadas, pero contenían muy poca cantidad de principio activo porque usábamos soluciones alcohólicas en su preparación, quedando en el precipitado la mayor cantidad del principio activo, el cual no usábamos. Las observaciones clínicas de los enfermos tratados en esta forma nos hizo preferir la vía oral. En nuestro empeño de obtener la purificación del extracto usábamos el carbón animal para la clarificación de las soluciones. Encontramos presencia de ácido málico y ácido cítrico, separamos gomas, resinas, aceites, determinamos Ph y observamos que las soluciones de extracto de semillas reducían el licor de Pheling. El Dr. Fassio hizo ciertas aplicaciones con resultados satisfactorios con las inyecciones preparadas en este Laboratorio: Tuve la oportunidad de tratar enfermos de los doctores A. Serrano y T. Maldonado en que se puso de manifiesto la acción benéfica del medicamento en las esplenomegalias palúdicas y en los paludismos crónicos. Uno de mis colegas el Dr. Oscar Paladines acreditó el medicamento sometiéndose al tratamiento. Muchos fueron los enfermos tratados que manifestaron haber sido beneficiados. Al presentármese la oportunidad de viajar a los Estados Unidos llevé a la Universidad de Michigan, extracto crudo e inyecciones, planteando el trabajo de investigación de la siguiente manera:

- 1º. Investigar la acción farmacodinámica del medicamento en animales — Ver su toxicidad y la dosificación terapéutica.
- 2º. Purificación del extracto a fin de obtener el principio activo.
- 3º. Aplicación clínica — terapéutica en el hombre.
- 4º. Análisis químico del principio activo.

Las observaciones clínicas realizadas en la primera etapa de mi investigación me hizo presentar ante la Universidad de Michigan U.S.A. el estudio de una sustancia, que se encontraba en la semilla del género citrus, que producía la contracción del bazo sin alterar la presión arterial, provocaba estímulo respiratorio y que aumentaba la amplitud del pulso. Los trabajos realizados en Michigan están resumidos en el siguiente artículo en el *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. — Vol 77 N^o. 4. — April 1943, que dice:

UNA SUSTANCIA BAZO CONTRACTIL EN LA SEMILLA DE NARANJA

Por Francisco Macías (*), Ralph Smith y Foster N. Martin Jr.,
del Departamento de Farmacología de la Universidad de
Michigan, Escuela de Medicina Ann Arbor, U.S.A.
Recibida para publicación Agosto 31 de 1942.

El interés de este descubrimiento comenzó por el uso de uno de nosotros Francisco T. Macías, de un extracto crudo de semillas de naranjas en el tratamiento de la Malaria en el Ecuador.

(*) Becado por el Instituto de Educación Internacional.

Un efecto que había observado fué la contracción de los bazos grandes en los pacientes con esta enfermedad. El presente artículo concierne a la descripción de la preparación del extracto crudo, su parcial purificación y su acción farmacológica con particular referencia de sus efectos sobre el bazo.

PREPARACION DEL EXTRACTO CRUDO: — Dos kilogramos de semillas enteras de naranjas se ponen en un saco de algodón y se extrae el principio activo, haciendo hervir las semillas por una hora en 10 litros de agua. Esta atracción se repite dos veces con 10 litros por una hora y 2 veces con 5 litros por 45 minutos. Continúa la extracción hasta tener un volumen de 40 litros de agua en un período de 4 1/2 horas. Se combinan todos los líquidos que se recogen y se los evapora a llama abierta hasta un volumen aproximadamente de 8 litros. Entonces la solución se vuelve de consistencia de jarabe y de color café. Esta evaporación se continúa en baño de maría hasta que queda de consistencia semi sólida. 600 gramos de este producto café negrusco de consistencia de jalea, contiene aproximadamente 40 o/o de agua. Este preparado es al que le damos al nombre de extracto crudo; este material forma una solución coloidal cuando se le añade agua. Se disuelve más fácilmente en agua caliente. Cierta cantidad de materia insoluble se separa por centrifugación. La solución de extracto crudo es amarga, tiene un pH. aproximadamente de 4.5 titulado la acidez de 3.7 cc. $\frac{1}{10}$ NaOH por gramo y reduce la solución de Benedict' s.

TOXICIDAD.— La Toxicidad del extracto crudo fué determinada en ratones blancos administrándoles inyecciones subcutáneas de una solución que contiene 0.25 gramos del extracto crudo por cc. El resultado indicado en la tabla N^o. 1, muestra la respectiva baja toxicidad. La L.D. 56 es aproximadamente 7 miligramos, una dosis mortal es de 10 miligramos y una dosis terapéutica es de 5 miligramos por gramo de peso. Con este resultado fué posible determinar las dosis necesarias en los perros pa-

ra producir los efectos más abajo descritos. Después de 2 minutos de haber sido puesta la inyección en los ratones blancos, la respiración se hizo lenta y profunda y con dosis grandes se produjo disneas. Estos cambios respiratorios en los ratones blancos, fueron acompañados con disminución de su actividad motora, aparente depresión y debilidad. Aunque los animales se hicieron fácilmente irritables ellos no respondieron con gritos o chillidos; algunos de los ratones que murieron mostraron un aumento de su actividad justamente hasta antes de morir con movimientos convulsivos de sus colas y sus piernas. Algunos ratones pertenecientes a cada uno de los otros grupos, murieron horas después en relación de los otros incluidos en la tabla N^o. 1. Once ratones se inyectaron con extracto crudo de 7 1/2 a 1 miligramos, por gramo de peso, neutralizando con hidróxido de sodio y mostraron las mismas manifestaciones, aunque solamente uno no murió.

ACCION DEL EXTRACTO CRUDO.— La contracción del bazo se pone de manifiesto al inyectar intravenosamente, una dosis de 0.05 a 0.5 gramos de solución de extracto crudo en animales de peso de 8 a 18 kilogramos a los cuales se los anestesia con pentabarbital sódico (35 miligramos por kilogramo de peso via intravenosa). La contracción del bazo se grafica por medio de una ancómiter, la contracción se inicia a pocos segundos después de la inyección y se mantiene durante diferentes períodos. La duración de la contracción varia según la dosis y según el perro. Ocasionalmente el bazo se dilata hasta su porte normal durante algunos minutos y en el mismo animal se puede producir la contracción repetidas veces. En algunos perros con dosis grandes o con repetidas dosis la contracción del bazo persiste por horas. En conclusión la contracción del bazo de un perro puede durar de 2 a 5 horas que es el tiempo que dura la experimentación; la observación directa del bazo al final de la experimentación demuestra estar de consistencia dura y reducida a la mitad o menos de la mitad de su porte original.

TABLA N^o. 1

Determinación de la toxicidad del extracto de las semillas de naranja en ratones blancos por medio de inyecciones subcutáneas.

Número de ratones	Dosis (m.g.m gm. peso)	Mueren	Murieron después de minutos.
5	20.0	5	68(4 ratones)
5	10.0	5	181(4 ratones)
5	7.5	4	137(3 ratones)
5	6.25	1	50
10	5.0	0	

La forma como se contrae el bazo no es constante, a veces se observa una fuerte contracción seguida de una dilatación y finalmente después de 2 a 5 minutos, la contracción se hace persistente, (Experimento No. 1). En otras ocasiones usando soluciones de extracto crudo parcialmente purificado.

Administrando por vía oral un gramo de extracto crudo por medio de una sonda esofágica, se produce una fuerte y prolongada contracción del bazo, (cuadro N^o.2). La contracción del bazo cuando se administra el medicamento por vía oral nos hace pensar que es debido a un reflejo que parte de la mucosa gástrica ya que es muy difícil concebir la absorción del medicamento en tan poco tiempo, pues la contracción del bazo se produce pocos segundos después de su administración.

Inmediatamente después de una inyección intravenosa de extracto crudo se observa un descenso de la presión arterial por pocos segundos. Inmediatamente se normaliza o se produce una ligera hipotensión, pero si se administra lentamente, este cambio en la presión arterial no se produce, pero el bazo se contrae, lo cual demuestra que la contracción del bazo se hace independiente. Cuando se toma la gráfica del volumen del riñón, los

pequeños cambios en su volumen están en relación a los pequeños cambios de la presión arterial lo que es constante observar cuando se pone repetidas dosis, en el aumento de la amplitud del pulso.

La atropina inhibe parcialmente la acción del extracto crudo, pero en grandes dosis (de 2 a 3 miligramos por kilogramo) en algunos animales de experimentación se ha obtenido neutralizar la acción del extracto por medio de la atropina.

En relación a la acción del extracto crudo sobre la respiración, se observa en algunos casos que el extracto crudo produce un estímulo respiratorio, y en grandes dosis un período de apnea.

PURIFICACION: — Para hacer el estudio farmacodinámico del extracto crudo era necesario tratar de purificarlo con el fin de aislar la gran cantidad de material inerte en el contenido y de encontrar el principio activo.

Cada una de las porciones aisladas fueron envasadas en perros con el fin de encontrar la parte del extracto que producía la contracción del bazo. Fueron utilizados 40 perros y en el cuadro N^o. 2 está anotado de 9 experimentos representativos. Mucha dificultad se encontró en la purificación del extracto crudo, ya que el principio activo y el material inerte eran más solubles en agua que en cualquier otro disolvente. El principio activo es relativamente insoluble en éter sulfúrico, éter de petróleo, acetona deshidratada, cloroformo, cloruro de metilo, letacloruro de carbono, pues todos ellos dejaban mucho material inerte en solución y principio activo en el residuo.

Un buen inicial paso de purificación, fué la filtración de la solución acuosa del extracto crudo por medio del carbón animal; obteniéndose una filtración clara que provocaba la contrac-

cion del bazo. Pero, el procedimiento es demasiado largo y es necesario filtrar repetidas veces, además que todos los carbones de origen animal no tienen el mismo poder de clarificación.

Un buen procedimiento fué el tratar el extracto crudo con una solución de hidrato de cal al 2 o/o hasta obtener la gelificación del material inerte. Y, luego, por filtración se separa una solución con el principio activo quedándose la masa gelatinosa en el filtro la cual no es activa.

Por medio del alcohol se logra separar una gran cantidad de material inactivo, pero siempre queda una parte del principio activo en el residuo insoluble, especialmente en soluciones alcohólicas entre 60 y 70 o/o . En alcohol de 95 o/o es posible poder extraer una pequeña cantidad de principio activo, pero usando de 20 a 30 volúmenes. La parte del principio activo soluble en alcohol se deseca en aire corriente o en baño de María y luego se disuelve en agua. En este procedimiento parte del principio activo se pierde por la evaporación y la solución acuosa deja un precipitado de recinas. Experimento N^o. 7 Tabla N^o. 2.

Un método que parece ser uno de los que dio mejores resultados fué el tratar el extracto con hidrato de cal, reducir luego el volumen de la solución a 1/10 evaporarla en baño de María y aumentar alcohol absoluto hasta obtener una concentración de 90 o/o por volumen; separar el precipitado por centrifugación y tratar la solución con 2 volúmenes de éter sulfúrico; centrifugar para separar la parte insoluble en éter en la cual está contenida la mayor parte del principio activo. Figura N^o. 1 Tabla N^o. 2 Experimento N^o. 9.

La purificación del extracto crudo por medio del acetato básico del plomo no dio buen resultado por encontrarse más principio activo en el precipitado que en la solución.

Pensando que el principio activo podía tener propiedades de un alcaloide se lo trató como tal haciendo soluciones alcalinas de extracto crudo con amoníaco o carbonato de sodio.

La extracción por medio del éter dio mejores resultados que el cloroformo. Haciendo una extracción por cinco a diez horas en su extracto de Wathin's resultó incompleta, ya que no fué posible saturar la solución con cloruro de sodio, pero el principio activo si fué posible parcialmente extraerle agitándole en agua acidificada en un embudo de separación. La mayor parte del producto obtenido así produciría contracción del bazo con aumento de la presión arterial y el residuo también contraía el bazo, pero haciéndola descender fuertemente. Tabla N^o. 2 Experimento N^o. 8.

En algunos casos una dosis obtenida de 0.1 gramo de extracto crudo producía la caída de la presión arterial de 10 a 15 m.m. Hg. volviendo a su estado normal después de 10 a 15 minutos, más despacio que en el experimento citado en la Tabla N^o. 2. Llegando a pensarse que exista más de un principio bazo — constrictor y que la moderada acción que produce el extracto crudo sobre la presión arterial sea la combinación de estos dos efectos.

Pensando que como el extracto crudo contiene ácidos orgánicos y que uno de ellos podía ser el principio activo del extracto crudo de semillas de naranja que contrae el bazo, se hizo inyecciones que se administraron intravenosas a perros de 10 kgms. de peso de 0.030 de ácido ascórbico; 0.050 mg. de ácido málico; 0.020 mg. de ácido cítrico; 0.020 mg. de ácido succínico pero todos resultaron inactivos.

DISCUSION.— Aunque ha quedado demostrado que el extracto crudo de semillas de naranja contiene un principio activo que contrae el bazo, los métodos de extracción no han llegado aún

a ser perfectos quedándose mucha parte del principio activo unido al material inerte.

Sin embargo, se ha obtenido progresos definitivos en su purificación obtenida por el procedimiento hidróxido de cal — alcohol — éter.

Los bazos en todos los animales mostraron diferente sensibilidad y en un mismo animal la administración de dosis continua producen la contracción del bazo hasta su máximo fisiológico, perdiendo su acción cuando materialmente es imposible que el bazo se contraiga más.

SUMARIO.— El extracto de semillas de naranjas contiene un principio soluble en agua de baja toxicidad y que produce una fuerte contracción del bazo. Aunque el principio activo no ha sido aislado, definitivos progresos se han hecho en su purificación”.

De regreso de los Estados Unidos y continuando mis investigaciones clínicas en Guayaquil, con productos más purificados obtuve el apoyo incondicional del Dr. Luis Moral para la preparación de mis inyecciones, empleando métodos de mi propia experimentación, no publicados todavía y, por medio de los cuales las soluciones pueden ser estrictamente dosificadas en su contenido de principio activo por métodos colorimétricos. De tal manera que un centímetro cúbico de la solución inyectable contiene un miligramo del principio activo parcialmente purificado espeso — constrictor. Con este material preparado me ha sido posible efectuar 25 observaciones clínicas con los doctores Heintert, Tanca, Valenzuela, Torres León, L. Moral, Gómez Lince, Arturo Serrano y A. Rigal y en mis propios pacientes, en las salas del Hospital y en mi Consultorio. Los resultados obtenidos son los siguientes:

Administrando las inyecciones por vía intramuscular o intravenosa se observa la contracción del bazo sin mayores cambios en la presión arterial. Algunos enfermos presentaron estímulo respiratorio, aumento de la amplitud del pulso y contracción inmediata del bazo a los 2 o 3 minutos de haber administrado la inyección por vía intravenosa. La disminución del volumen del bazo se hace preferentemente en sentido longitudinal de 2 a 3 traveses de dedos, según el enfermo haya presentado un bazo congestivo o más o menos escleroso. Los bazos parecen a la palpación aplanarse en sentido de su espesor y al palpar el borde anterior clínico del bazo la escotadura se hace más perceptible siendo posible por la reducción del volumen en sus 3 diámetros la incidencia de los dedos por debajo del borde costal. La contracción realizada después de una inyección intravenosa de 2 miligramos permanece invariable a las 24 horas de observación.

La administración de inyecciones por vía intramuscular de 2 miligramos no produce contracciones tan violentas.

La administración oral de un gramo de extracto crudo en solución produce la contracción a los pocos minutos, observándose reacción febril en algunos casos.

Durante el período de 2 semanas, inyecciones diarias de 2 miligramos a 6 miligramos han sido administradas a enfermos según el volumen de su bazo. Obteniendo las siguientes observaciones:

Los bazos esclerosos sufren una contracción permanente y progresiva; muchos de ellos se ablandan, se aplanan y se recogen, quedando ptosados por estiramiento de sus ligamentos. Observándose que bazos inmóviles durante este período de tratamiento se hacen fácilmente desplazables.

Efectos similares se han observado en la administración por vía oral.

CONCLUSIONES.— El tratamiento de las esplenomegalias por medio de la substancia extraída de la semilla del género citrus, es efectiva y está de acuerdo a la siguiente dosificación:

- a) Usar de 10 a 12 inyecciones intravenosa de 2 miligramos en 2 centímetros cúbicos de solución acuosa, inyectadas diariamente.
Descansar una semana y comenzar otra serie si es necesaria según los resultados obtenidos.
- b) Usar 10 a 12 inyecciones intramusculares de 2 miligramos en 2 centímetros cúbicos de solución acuosa.
- c) Administrar unos o dos gramos de extracto crudo en sellos durante un período de 2 semanas.

En esta forma y con esta dosificación es posible obtener resultados beneficiosos en las esplenomegalias congestivas y esclerosas crónicas sin tener en cuenta su volumen ni el tiempo de su cronicidad.

Y para finalizar la presentación de este trabajo pongo a la consideración de ustedes señores doctores miembros de esta sociedad médico — científica, los resultados obtenidos con la aplicación clínica — terapéutica del Extracto de semillas del género citrus por vía oral, y de la substancia esplenoparalítica parcialmente purificada proveniente de este extracto y, que he podido administrarlo en forma inyectable, en los enfermos aquí presentes para su verificación.