

Tesis de Posgrado

Acido dehidrocólico : preparación industrial

Fernández Menéndez, Blas R.

1947

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Fernández Menéndez, Blas R.. (1947). Acido dehidrocólico : preparación industrial. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0499_FernandezMenendez.pdf

Cita tipo Chicago:

Fernández Menéndez, Blas R.. "Acido dehidrocólico : preparación industrial". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1947.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0499_FernandezMenendez.pdf

Universidad de Buenos Aires

Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales

A C I D O D E H I D R O C O L I C O

Preparación Industrial

T E S I S

Para Optar al Título de Doctor en Química

Tesis : 199

1 9 4 7

B. R. Fernández Menéndez

Al presentar este trabajo de tesis dejo constancia de mi agradecimiento al Profesor Dr. Ventura Morera por sus valiosas indicaciones.

ACIDO DEHIDROCOLICO

Objeto del presente trabajo

RESUMEN

Al iniciar el presente trabajo hemos tenido por finalidad los siguientes tres propósitos:

1).- Independizar la fabricación del ácido dehidrocólico de la del ácido cólico, tratando de llegar a un método directo a partir de los ácidos biliares totales.

2).- Eliminar del proceso industrial los disolventes orgánicos volátiles.

3).- Desarrollar una técnica de purificación que permita realizar las dos proposiciones anteriores.

Como se verá, por la lectura del texto, se han resuelto los tres puntos propuestos y el método adoptado fué ensayado con éxito sobre 40 toneladas de bilis.

ACIDO DEHIDROCOLICO

GENERALIDADES.

DECHOLIN

Este ácido fué introducido en terapéutica, bajo el nombre comercial "DECHOLIN", por la firma J. D. RIEDEL - E. DE HAEN A.G. como sucedáneo de los ácidos biliares naturales. Es como su nombre lo indica, un producto de oxidación - in vitro - del ácido cólico que, como es sabido, se encuentra, conjugado con la taurina y la glicocola, en la bilis humana y de varias especies animales.

El ácido cólico, al igual que los restantes ácidos biliares, presenta - no obstante ser un producto fisiológico - una toxicidad elevada cuando se inyecta en el organismo por vía parenteral.

Por el contrario, el ácido dehidrocólico es terapéuticamente más activo y no es tóxico siendo el único preparado, de este género, que hizo posible la medicación endovenosa.

A continuación damos un cuadro comparativo de la toxicidad de diversos ácidos biliares, según E. Rothlin y W.R. Schalch (1)

(2)

Acido dehidrocólico	1.23
" glicocólico	.37
" cólico	.35
" taurocólico	.33
" desoxicólico	.15

La columna de la derecha es la dosis letal 50, para el ratón, expresada en miligramos por gramo de peso.

La actividad terapéutica aumenta, en cambio, en el siguiente orden:

Acido desoxicólico
" taurocólico
" glicocólico
" cólico
" dehidrocólico

Según diversos autores citados en (3) la actividad terapéutica está relacionada con la riqueza en grupo carbonilo.

Transcribiremos, a título informativo lo que dice el "New and Nonofficial Remedies" sobre los ácidos y sales biliares (4)

"La bilis del hombre y de varias especies animales contiene las sales sódicas de los ácidos conjugados del cólico, en varias proporciones. En la bilis humana y de vaca predominan el ácido glicocólico $C_{28}H_{43}O_6N$ y el taurocólico $C_{28}H_{50}O_7NS$. La bilis fresca de vaca contiene alrededor de 3% de cada una de estas sales.

ACCION Y USOS.- Las sales biliares constituyen el principio activo de la bilis y, por consiguiente, ejercen la misma acción y tienen los mismos usos que élla, con la ventaja de una composición más constante. Cuando se inyectan en la circulación, causan una seria depresión nerviosa y cardíaca, no observada cuando se administran por vía bucal.

Se les atribuye, generalmente, una débil acción antiséptica y laxante, y una acción estimulante que favorece la absorción de las grasas. Estimulan la secreción del hígado y hacen la bilis más fluída.

Se usan en disturbios nutritivos acompañados de fístula biliar. Las sales biliares son útiles para facilitar la absorción de las grasas y vitaminas liposolubles en el intestino, cuando la falta de absorción de estos materiales se debe a la falta de bilis en el intestino.

REACCION DE PETTENKOFFER.- Todos los ácidos biliares responden a esta reacción. Una pequeña porción de sal es disuelta en un poco de ácido sulfúrico, calentando cuidadosamente para que la temperatura no pase de 60-70° C. Se agrega entonces una solución al 10% de azúcar de caña, gota a gota, y se agita. Si hay ácido cólico aparecerá un bello color rojo que no desaparece a temperatura ambiente pero que, al día siguiente, vira al azul violeta. El líquido rojo presenta dos bandas de absorción, una en F y otra entre D y E, más próxima a E. Debe tenerse la precaución de no calentar mucho ni agregar demasiado azúcar. El ácido sulfúrico debe estar libre de ácido sulfuroso y de óxidos inferiores de nitrógeno. Otras substancias tales como la albúmina, el alcohol metílico, la morfina, etc. dan la reacción de Pettenkoffer por eso, en caso de duda, debe recurrirse al examen espec-

trocópico (5).

REACCION DEL FURFURAL.- La substancia se disuelve en alcohol y por cada centímetro cúbico de la solución alcohólica se agrega una gota de solución de furfurol al 1 por mil y 1 c.c. de ácido sulfúrico concentrado, enfriando la mezcla. Si la reacción es positiva se obtiene el mismo color que en la reacción de Pettenkofer.

DECHOLIN.

Acido dehidrocólico. Un producto de oxidación del ácido cólico derivado de los ácidos naturales.

ACCION Y USOS.- El Decholín fué propuesto para la insuficiencia funcional del hígado; para marcar los conductos biliares en las operaciones del hígado y para evitar la posible aparición de algunos de los síntomas post-operatorios. En colescitografía para acelerar la aparición de la sombra de la vesícula biliar y para remover los residuos de la tetrayodofenolftaleína del aparato biliar; en la descompensación cardíaca con congestión hepática, cirrosis del hígado y disturbios similares de la función hepática, con ascitis; en la hepatitis arsenical, con elevado índice ictérico, para prevenir la ictericia y los trastornos gastrointestinales que se presentan en algunos pacientes después del tratamiento arsenical.

DECHOLIN COMPRIMIDOS (tabletas de 0.25 gr.)

DOSIS.- De 0.25 a 0.5 gr. dos a tres veces al día, después de las comidas, por un período de 4 a 6 semanas.

Distribuido por Riedel de Haen, Inc. Nueva York. U.S. 1,933,003 (Oct. 21 1933; vence 1950) U.S. marca registrada 315,067.

ESPECIFICACIONES.- Se presenta como un polvo fino, cristali-

no, de color blanco y gusto amargo; es muy soluble en ácido acético glacial. Funde a 233-235° C.

Hervir un gramo de Decholin con 100 c.c. de agua destilada durante dos minutos; no debe dar olor; enfriar, filtrar, separar en porciones de 10 c.c. el líquido filtrado e investigar:

CLORUROS.- No debe dar ninguna opalescencia con 1 c.c. de ácido nítrico diluido y 1 c.c. de solución de nitrato de plata.

SULFATOS.- No debe dar ninguna turbidez con 1 c.c. de ácido nítrico diluido y 1 c.c. de solución de nitrato de bario.

BARIO SOLUBLE.- No debe dar ninguna turbidez con 1 c.c. de ácido sulfúrico diluido.

METALES PESADOS.- No debe dar ninguna coloración o precipitado con hidrógeno sulfurado a saturación.

HUMEDAD.- Sobre un gramo de muestra, a 100° C. La pérdida de peso no debe exceder del 1.5%.

CENIZAS.- Sobre 1 gramo de muestra; el residuo no debe exceder del 0.1%.

ACIDEZ.- Sobre 0.5 gr. de muestra en 40 c.c. de alcohol neutro, diluir con medio volumen de agua destilada y titular con sol. de NaOH N/10. La cantidad de solución consumida corresponderá a no menos del 98.5% ni más del 101.5%.

DECHOLIN SODICO.

Dehidrocolato de sodio. Sal sódica del ácido dehidrocólico.

DOSIS.- El dehidrocolato de sodio es administrado en forma endovenosa. Una inyección diaria durante tres días consecutivos. La primer dosis consiste en 5 a 10 c.c. (de acuerdo a la urgencia del caso) de solución al 20%. La segunda y tercera de 10 c.c.

Un centímetro y medio de Decholin sódico, en solución al 20%, puede ser usado como disolvente de 0.15 gr. de neosalvarsán o puede ser agregado a la solución de neosalvarsán.

Se expende en solución al 20% en ampollas de 3 y 10 c.c.

Distribuido por Riedel de Haen, Inc. Nueva York. U.S. 1,933,033 (Oct. 31 1933; vence en 1950) U.S. marca registrada 315,083.

ESPECIFICACIONES.- Se presenta como un polvo cristalino, fino, de color blanco, con un gusto muy amargo, soluble en agua y alcohol. La solución acuosa es alcalina al tornasol.

Disolver 1 gr. de Decholin sódico en 200 c.c. de agua destilada y agregar un exceso de ácido clorhídrico, filtrar el ácido dehidrocólico precipitado, lavar y recristalizar en ácido acético al 80% P.F. 233-235° C.

Disolver alrededor de 0.5 gr. de Decholin sódico, pesado exactamente, en 100 c.c. de agua destilada, acidular con ácido clorhídrico y filtrar. Separar porciones de 10 c.c. cada una e investigar sulfatos y metales pesados en la misma forma que antes.

Pesar, exactamente, alrededor de 1 gr. de Decholin sódico y secarlo hasta peso constante a 100° C. La pérdida de peso no debe exceder del 7%.

Pesar, exactamente, alrededor de 1 gramo de Decholin sódico, en un crisol de platino tarado y agregar dos centímetros cúbicos de ácido sulfúrico, calentar suavemente hasta que se desprendan humos de sulfuroso, repetir esta operación usando dos porciones de 1 c.c. de ácido sulfúrico cada vez, calcinar, enfriar y pesar el sulfato de sodio; el porcentaje de sodio corresponderá a no menos de 5.4% ni más de 5.6%, calculado sobre substancia seca".

No obstante ser la Argentina un país productor de bilis, de primer orden, el ácido dehidrocólico fué, hasta la iniciación de la última guerra, un producto de importación. Pero ante la imposibilidad de seguir recibéndolo regularmente, la firma Riedel y Levalle encaró el problema de su preparación industrial.

El presente trabajo fué hecho en la mencionada firma y si bien fué la base de la fabricación durante un año, bien pronto, y por las mismas circunstancias, se hizo necesario reemplazar el oxidante (ácido crómico) habiéndose encontrado, al salvar esta dificultad, un método más económico, es por éello que, en el momento actual, su publicación no perjudica los intereses de dicha firma y debe ser mirado como una contribución al estudio de esta industria.

SUMARIO

BREVE ESTUDIO CRITICO DE LOS METODOS CONOCIDOS.

ACIDO DEHIDROCOLICO.

La literatura sobre su preparación es muy escasa y, a excepción del método de Hammarsten (6), se limita a breves reseñas de algunas patentes: (7) al (11). En todos los casos se hace referencia a la oxidación del ácido cólico y, por lo tanto, nuestro problema queda, momentaneamente, transferido a la preparación de este último.

ACIDO COLICO.

La literatura sobre el ácido cólico es más numerosa; existen, igualmente, varias patentes industriales: (11) al (15), pero se encuentra también mucha información sobre la forma de prepararlo en el laboratorio: (16) al (29).

Todos estos métodos son en el fondo muy similares y, en esencia, se reducen a saponificar la bilis y a someter los ácidos biliares a sucesivos tratamientos (lavados, extracciones, cristalizaciones) con disolventes orgánicos hasta llegar, finalmente, a los dos ácidos más importantes: el ácido cólico de P.F.195-198

grados centígrados y el ácido desoxicolico de P.F. 169-172° C.

OBJECCIONES GENERALES.

Entre los disolventes propuestos figuran, entre otros, éter sulfúrico, alcohol metílico, alcohol etílico absoluto, etc.

En nuestro país estos disolventes son, en general, caros y es caro, también, el equipo necesario para trabajar con ellos en la industria. Algunos, como el alcohol metílico, son difíciles de conseguir, el éter es, además, peligroso y el alcohol etílico está sometido a un riguroso control de Impuestos Internos; las soluciones de los ácidos biliares en ellos son líquidos de consistencia siruposa, cargados de materiales resinosos, de manejo muy desagradable y difícil cuando se opera en gran escala, pero dejando a un lado estos pequeños inconvenientes, subsanables, la objeción fundamental es que - incluso en escala de laboratorio - son métodos de valor muy dudoso; el siguiente comentario de Seville Milne White, autor de uno de ellos, nos dará una idea acerca de la bondad de estas técnicas;

"El método de Pregl (22), así como el Pregl y Buchtala (23), es caro y difícil de llevar a la práctica. El método de Langheld (21) es, según Wieland y Sorge (25), impracticable. El método de

Schryver (19) es realizable pero muy lento. El método de Mair (27) es simple pero el producto, aunque algunas veces satisfactorio, está a menudo contaminado con ácidos grasos superiores y, con algunas clases de bilis es irrealizable. De los métodos de preparación de ácido cólico el más simple es el Wieland y Weill (26) pero tiene el inconveniente de que se necesita distinto procedimiento según se trate de bilis de invierno o de verano".

A nuestro juicio el método propuesto por White (17) - con algunas modificaciones - puede ser útil para preparar ácido desoxicólico, pero considerado en general resulta también largo y complicado. No entramos a discutir los rendimientos porque, sobre este punto, el autor dice: "varían considerablemente de una bilis a otra". Seguimos opinando como él que el más sencillo, para el cólico es el de Wieland.

METODO DE WIELAND.

Wieland trata los ácidos biliares totales (el precipitado global que se obtiene acidulando la bilis saponificada) por alcohol absoluto y filtra. El residuo sólido se puede tratar de dos maneras: una, con alcohol metílico y, la otra, con acetato de etilo, elegimos esta última debido a la dificultad para conseguir alcohol metílico. No hemos podido reproducir los rendimientos

y puntos de fusión consignados por el autor; atribuimos este hecho a que en el comercio no se distingue entre bilis de invierno y de verano, a la diversa variedad de bilis que hay dentro de una misma estación y, en parte también, a que nosotros operábamos en una escala semi-industrial.

Resumiendo:

Todos los intentos para llegar, con estos métodos, a un ácido cólico de alto punto de fusión, con rendimientos que permitan la comercialización del dehidrocólico, dieron resultado negativo.

Pensamos entonces en oxidar un ácido cólico de mediana pureza (P.F. 160° C.) pero no obtuvimos ninguna ventaja positiva; en efecto: la oxidación de este ácido da un dehidrocólico de P.F. 214° C. y como veremos (pág. 17) a este mismo resultado se puede llegar por un camino mucho más sencillo y económico.

OBJETO DE ESTE TRABAJO.

El presente trabajo es una consecuencia de las dificultades presentadas y tiene por objeto:

1º.- Independizar la fabricación del ácido dehidrocólico de la del ácido cólico, tratando de llegar a un método directo a partir de los ácidos biliares totales.

2º.- Eliminar del proceso industrial los disolventes voláti-

les.

3º.- Desarrollar una técnica de purificación que permita realizar las dos proposiciones anteriores.

METODO DE OXIDACION.

Como método de oxidación elegimos el de Hammarsten por ser el más accesible. La técnica seguida es la de Fieser y Newman (30), las cantidades se han modificado un poco, de acuerdo con nuestra experiencia, debido a la diferencia del material oxidado.

En síntesis este método consta de las siguientes etapas:

- 1.- Oxidación del cólico con ácido crómico, en medio acético.
- 2.- Ppción. del dehidrocólico diluyendo con agua. Filtración.
- 3.- Disolución del precipitado obtenido, en álcalis, filtrando después para separar el hidróxido de cromo.
- 4.- Precipitación, en el filtrado, del ácido dehidrocólico, con ácido acético. Filtrar y secar.

DIFICULTADES Y ANOMALIAS AL ADAPTAR ESTA TECNICA.

Al adaptar esta técnica a la oxidación de los ácidos bilia-

res totales, obtuvimos en 4) un precipitado abundante y pesado, de aspecto resinoso, fuertemente pigmentado y muy fusible. La solución en álcalis presenta el color de una infusión concentrada de café y por enfriamiento coagula dando un gel, constituido probablemente por proteínas (31), que se redisuelve en caliente. Evidentemente, hasta aquí, no habíamos hecho más que trasladar el problema. Pero en una oportunidad y con motivo de haber ejecutado la operación 2) al revés, es decir: volcando el ácido sobre una gran cantidad de agua (ver pág. 25), la filtración se hizo tan pesada que fué necesario calentar para acelerarla; esta vez, al precipitar en 4), en lugar del precipitado abundante y resinoso de que hemos hablado, se obtuvo un pequeño precipitado blanco constituido por ácido dehidrocólico bastante puro. En el filtro, en cambio, en vez del precipitado gelatinoso, característico, de hidróxido de cromo se obtuvo una masa abundante, verde-gris, que una vez seca y fría se puede pulverizar. Esta masa resiste la ebullición prolongada con amoníaco concentrado y con las soluciones diluídas de ácidos y álcalis minerales fuertes, pero se puede disgregar calentándola con soluciones concen-

tradas de los mismos; así por ebullición con hidróxido de sodio al 10% se obtiene, al filtrar, el precipitado característico de hidróxido de cromo y un filtrado con las mismas características que el primitivo.

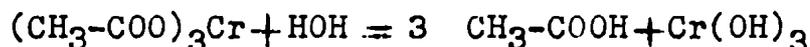
Esta anomalía no se observa si el calentamiento se hace en medio fuertemente alcalino o si antes de calentar se ha eliminado el cromo por lavado.

EXPLICACION DE ESTAS ANOMALIAS-JABONES DE CROMO.

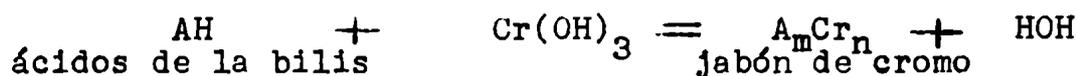
Para explicar estos hechos experimentales nos vimos obligados a admitir la posibilidad de que los componentes ácidos de la bilis se uniesen al cromo procedente de la oxidación, dando compuestos de tipo salino, que englobaremos bajo la denominación general de jabones de cromo.

Esto podría interpretarse de acuerdo con las ecuaciones siguientes:

1).- Por calentamiento se produciría una pequeña hidrólisis del acetato de cromo:



2).- La precipitación del jabón de cromo desplazaría continuamente el equilibrio hacia la derecha:



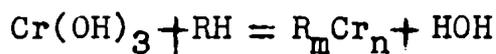
Repetidas experiencias demostraron que la cantidad de jabón formado depende de la temperatura, tiempo de calentamiento y pH de la solución.

UTILIZACION DE LOS JABONES DE CROMO.

Planteadas así las cosas sólo quedaba un paso para resolver nuestro problema y era: encontrar las condiciones bajo las cuales se formase el jabón de cromo de las impurezas, sin afectar al ácido dehidrocólico. Afortunadamente esto fué posible debido a que el ácido dehidrocólico es el más fuerte de todos los presentes en la mezcla, de tal manera que a pH 8 se tiene, por hidrólisis, la siguiente composición en la mezcla:



Calentando se tendría:



De acuerdo con esto si el medio es muy ácido (acidez orgánica) todo el dehidrocólico pasará, junto con las impurezas, a sal de cromo y el rendimiento de la operación será nulo. En cambio si el medio es muy alcalino tanto el dehidrocólico como las impurezas se encuentran salificados y pasarán al filtrado juntos,

como sales solubles, dando al acidular el precipitado resinoso de que habíamos hablado.

El intervalo de pH comprendido entre 6 y 9 es la región donde todos los pigmentos biliares y la mayor parte de las restantes impurezas pasan por calentamiento a jabón de cromo que flocula sobre un líquido límpido, color amarillo ámbar, fácilmente filtrable, constituido por la sal sódica del ácido dehidrocólico. Acidulando este filtrado se tiene un precipitado blanco compuesto de ácido dehidrocólico que como veremos (pág. 35) es ya apto para uso farmacéutico (vía bucal). Para uso inyectable necesita una nueva purificación, para lo cual se cristaliza en ácido acético al 70-80%.

A continuación damos una tabla con los rendimientos y puntos de fusión a distintos pH:

<u>pH del medio</u>	<u>R.</u>	<u>P.F.</u>	<u>Color del pp.</u>
medio acético	0	-	-
6	25%	225°C.	blanco
7	35%	220°"	"
8	43%	214°"	"
9	60%	205°"	"
10	96%	150°"	marrón

Como se verá más adelante elegimos pH 8, para trabajar, por ser el máximo rendimiento compatible con las especificaciones.

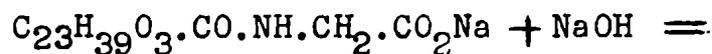
El pH se tomó en la siguiente forma: 2 c.c. de agua destilada, 2 gotas de indicador Yamada (34) y una gota del líquido en cuestión. Este indicador vira en la siguiente forma: rojo-4; anaranjado-5; amarillo-6; verde-7; azul-8; añil-9 y violeta-10.

TECNICA

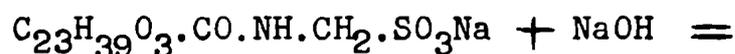
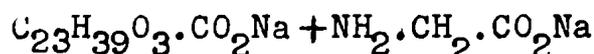
I.- SAPONIFICACION DE LA BILIS.

a).- ATAQUE ALCALINO.

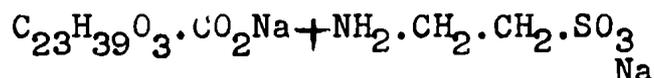
Reacción principal:



glicocolato



taurocolato



En una cuba de hierro de 0.5 cm. de espesor y capacidad para 1.000 litros, provista de camisa de vapor, se cargan 150 kilos de bilis concentrada del comercio (generalmente 8:1), o su equivalente en bilis fresca, y 60 kilos de hidróxido de sodio en solución al 30%, se completa el volumen con agua hasta 800 litros y se hace hervir durante 30 horas, reponiendo el agua perdida por evaporación y agitando a intervalos regulares. Al cabo de este tiempo se dará por terminada la saponificación cortando el vapor y procediendo como sigue:

b).- PRECIPITACION DE LOS ACIDOS BILIARES TOTALES

El líquido procedente de a) se deja enfriar hasta una tem-

peratura de 50-60° C. y se precipitan los ácidos biliares totales con ácido clorhídrico concentrado, agitando, hasta que una muestra de líquido extraída por a (ver figura) no precipita más o, bien, hasta reacción ácida al rojo congo. Los ácidos biliares forman, por reposo, una espesa capa semifluida que flota en la superficie del líquido. La razón de precipitar a 60° C. es obtener un precipitado blando, pues la formación repentina de una gran masa dura en el seno del líquido podría romper el agitador y proyectar el líquido ácido sobre el operador. Al día siguiente se drena el líquido por b y se tira.

c).- LAVADO DE LOS ACIDOS BILIARES.

Se rompe la capa de ácidos biliares para que caigan al fondo de la cuba y se llena ésta con agua. Se calienta durante dos horas, manteniendo agitación constante, y por último se corta el vapor y se deja en reposo hasta el día siguiente, esta vez el material se deposita en el fondo de la cuba, drenar la mayor parte del agua por a y después por b. Por precaución conviene colocar una arpillera en la boca b de salida para evitar posibles pérdidas del producto.

77

Ca ¹⁰⁰
100

b

1.2 E - -

~ CUBA = SAMPONIC ACID ~

d).- SECADO

Al día siguiente un hombre debe penetrar en la cuba para sacar el material que será extendido al aire libre para que se seque solo. Tarda alrededor de 15 días. No usar secadero pues el material húmedo funde con mucha facilidad.

e).- MOLIENDA

Una vez seco está en condiciones de ser molido; se usará para éllo un molino a martillo, tipo Fitte.

RENDIMIENTO

40% de la bilis concent.

5% " " " fresca

PROPIEDADES.

Es un material de aspecto térreo, de un color que varía del amarillo claro al marrón oscuro, pasando por el amarillo verdoso, con algunos tipos de bilis es de aspecto vítreo. Es friable, funde con facilidad y tiene un sabor amargo. Es totalmente soluble en álcalis.

COMPOSICION

Están constituidos por una mezcla de ácido cólico (50%), ácido desoxicólico (20%), pequeñas cantidades de ácido litocólico,

y cheno-desoxicólico, ácidos grasos superiores (palmítico, esteárico y oléico), pigmentos biliares, mucina, materias minerales y materiales no identificados.(21).

II.- OXIDACION DE LOS ACIDOS BILIARES

a).- PREPARACION DEL OXIDANTE

Se disuelven 3 kilos de ácido crómico del comercio (CrO_3) en igual cantidad de agua y se le agregan 12 litros de ácido acético glacial, desnaturalizado. La solución se coloca en b (ver fig.). Se puede usar un barril de agua destilada, el robinete es de vidrio y el tapón puede ser de goma.

b).- OXIDACION

Reacción principal:



En el recipiente R de 50-60 litros, de aluminio, se colocan 28.5 litros de ácido acético glacial, desnaturalizado, y 4 kilos de ácidos biliares totales molidos. No es necesario calentar. Manteniendo agitación constante se deja caer el oxidante a una velocidad tal que toda la operación dure de 2 horas y media a 3

horas. La temperatura se mantendrá, constantemente, entre 30 y 40 grados centígrados regulando, para éllo, el agua en el recipiente C (se recomienda un casco de vino cortado, transversalmente, por la mitad). Transcurridas las 3 h. se procede como sigue:

c).- PRECIPITACION DEL MATERIAL OXIDADO

El líquido procedente de dos oxidaciones - conviene hacer dos en paralelo - se vuelca en una cuba de madera de 400 litros y se diluye con agua, agitando, hasta unos 360 litros. Por dilución precipita el ácido dehidrocólico, junto con las impurezas, en un líquido que contiene ácido acético y acetato de cromo. Debe tenerse cuidado de no efectuar la dilución al revés, es decir: volcando el ácido acético sobre el agua pues en ese caso la grasa precipita muy finamente dando una emulsión muy difícil de filtrar (ver pág. 14). Finalmente se centrifuga.

d).- CENTRIFUGACION DEL PRECIPITADO

El líquido procedente de c) se filtra con auxilio de la centrífuga y se recoge el precipitado que no debe lavarse para evitar la pérdida del cromo.

III.- PURIFICACION DEL PRECIPITADO.

a).- DISOLUCION Y AJUSTE DE pH.

El precipitado d) se empasta, con poco agua, en un mezclador, provisto de calefacción, hasta formar una crema fina que se diluye con agua hasta unos 100 litros. Calentar a 50-60 grados y agregar solución de hidróxido de sodio al 5% o, mejor, amoníaco, hasta que el pH se mantiene constante en 8 (usamos indicador Yamada). Se calienta entonces hasta que flocule el jabón de cromo. Conviene que la temperatura se eleve con alguna rapidez para evitar que una digestión larga pueda peptizar parte del precipitado dificultando la filtración.

b).- FILTRACION

Si se ejecuta bien la operación anterior, el precipitado flota sobre un líquido límpido de color amarillo ámbar. Se puede separar la mayor parte del precipitado mecánicamente que se exprime y lava en la centrífuga, recogiendo el líquido. La otra parte de éste se filtra en caliente. Pasa tan rápido que no es necesario usar la centrífuga, pero si se dispone de una limpia se puede hacer con élla, en reposo. También se puede construir

un canasto como el de la centrífuga que se arma sobre un soporte.

c).- PRECIPITACION DEL ACIDO DEHIDROCOLICO.

El líquido anterior se calienta a 80-90 grados y se acidula con ácido acético al 50% hasta reacción ácida al tornasol; se obtiene así un precipitado abundante, blanco, coposo, de ácido dehidrocólico que se centrifuga y lava con agua destilada hasta reacción negativa de cloruros.

d).- SECADO Y MOLIDO

El precipitado anterior se extiende en bandejas que se colocan en el secadero. Una vez seco se muele en un molino a martillo.

RENDIMIENTO

43% del ácido biliar oxidado. P.F. 214° C.

Este producto, así como está, es ya apto para ser usado en la elaboración de comprimidos (ver pág.35), pero para uso inyectable debe ser sometido a una cristalización.

e).- CRISTALIZACION

El ácido dehidrocólico procedente de d) se disuelve en 4 veces su peso de ácido acético al 70%. Para éllo se calienta, pri-

mero, el ácido acético en un recipiente enlozado y, una vez caliente, se disuelve en él, el ácido dehidrocólico agregando, por último el agua necesaria para llevarlo a la concentración indicada. Se deja enfriar hasta el día siguiente, que se centrifuga.

f).- CENTRIFUGACION DEL CRISTALIZADO.

El cristalizado e) se centrifuga, durante media hora, en una centrífuga que gire a 1.200 rev./min. No tirar las aguas madres. El precipitado se lava con ácido acético al 50%, primero, y con agua destilada, después. Por último se seca y muele como anteriormente.

RENDIMIENTO.

55% del ácido disuelto P.F. 230° C.

PROPIEDADES.

Polvo blanco, cristalino, extremadamente liviano y de sabor muy amargo. No da la reacción de Pettenkoffer. Es totalmente soluble en álcalis; la solución al 20% es de color amarillo ámbar sin fluorescencia. Es apto para todo uso farmacéutico. El ácido puro funde a 237-238 grados C. pero comercialmente no hay interés en llevar la purificación hasta ese extremo pues encarece mu-

cho el producto sin ninguna finalidad práctica.

REACCIONES.

Si se calienta una solución neutra de dehidrocolato de sodio con una solución de hidroxilamina a 50-60° C. se obtiene un precipitado formado por láminas microscópicas de la trialdoxima: $C_{24}H_{34}O_2(NO_2)_3$ que funde 270° sin descomposición. Es poco soluble en alcohol hirviente y casi insoluble en agua y éter. Los ácidos lo descomponen dando ácido cólico e hidroxilamina.

IV.- RECUPERADO DE LAS AGUAS MADRES

Las aguas madres de la cristalización se diluyen con agua hasta que no precipite más. Se separa mecánicamente la impureza gomosa, que precipita primero, del ácido dehidrocólico que precipita después. Este ácido, que es muy impuro y pigmentado, entra de nuevo en proceso incorporándolo a la operación III.-a).

RENDIMIENTO

25% del ácido que se cristalizó

NOTA.- Los rendimientos consignados en esta técnica son el resultado de promediar la fabricación de 1 año, habiéndose empleado alrededor de 40 toneladas de bilis.

DISCUSION

VENTAJAS DEL METODO

1).- La eliminación total de los disolventes volátiles elimina, a su vez, los riesgos de explosiones e incendios, baja la prima del seguro y elimina la intervención de Impuestos Internos.

2).- La simplicidad del método trae aparejada la sencillez del equipo industrial (ausencia de alambiques, extractores y columnas de destilación). Todos los procesos unitarios son simples: calentamiento en recipiente abierto, centrifugación, secado, molienda.

3).- La economía en el equipo rebaja la carga de amortización.

4).- En ningún momento aparecen productos de manipuleo difícil, tan frecuentes en los otros métodos, tales como: colas, gelatinas, resinas o líquidos siruposos (nos referimos a materiales que presenten ese aspecto aun cuando, químicamente, no se puedan clasificar como tales).

5).- No se necesita el uso de carbón para eliminar los pigmentos biliares.

6).- Se puede operar con cualquier clase de bilis.

7).- Dado que es fácil producir ácidos biliares en masa, la alimentación de las células de oxidación está, ampliamente, asegurada y, con ella, la capacidad de producción.

CAPACIDAD DE PRODUCCION.

Trabajando con dos células de oxidación, en paralelo, se pueden hacer 4 oxidaciones por turno de ocho horas, lo que representa una producción de unos 7 kilos diarios, es decir: alrededor de 140 K. por mes, de ácido dehidrocólico de P.F. 214° C. quedando márgen para duplicar o triplicar la producción trabajando en dos o tres turnos respectivamente. A continuación incluimos una lista con el equipo necesario para mantener este régimen.

EQUIPO.

- 3 Cubas de saponificación de 1.000 L. c/u.
- 1 Cuba de hierro de 1.200 L.
- 1 Aparejo para 500 K.
- 1 Bomba a reloj
- 1 " centrífuga
- 1 Generador de vapor de 25-30 H.P.
- 2 Molinos a martillo
- 1 Cuba de madera de 400-500 L.
- 2 Centrífugas con canasto de acero inoxidable
- 2 Células de oxidación
- 1 Secadero para 100 K. de droga
- 1 Mezclador con calefacción de unos 100 L.

CALCULO DE COSTO. (Con los precios de Enero 1942)

ACIDOS BILIARES TOTALES.

100.00 K.	Bilis concentrada	a	1.05	\$/K.	105.00	\$
40.00 "	NaOH comercial	"	.40	"	16.00	"
160.00 "	HCl	"	.50	"	80.00	"
					<hr/>	
TOTAL					201.00	"

RENDIMIENTO: 40.00 K. a 5.03 \$/K.

ACIDO DEHIDROCOLICO (vía bucal)

4.00 K.	A. Bil. Totales	a	5.03	\$/K.	20.12	\$
3.00 "	" Crómico Com.	"	4.88	"	14.64	"
37.50 "	" Acét. 99% desn.	"	2.30	"	86.25	"
	Varios				5.00	"
					<hr/>	
TOTAL					126.01	"

RENDIMIENTO: 1.700 K. a 74.12 \$/K.

ACIDO DEHIDROCOLICO CRISTALIZADO

10.00 K.	A.Deh. (v.bucal)	a	74.12	\$/K.	741.20	\$
28.00 L.	A.Acet.99% desn.	a	2.30	"	64.40	"
					<hr/>	
SUBTOTAL					805.60	"
Recuperado de las aguas madres: 2.5 K. a 50.00					-125.00	"
					<hr/>	
TOTAL					680.60	"

RENDIMIENTO: 5.500 K. a 123.64 \$/K.

Nota.- Sobre estos precios puede estimarse un recargo del 25% para gastos generales.

OBJECCIONES AL METODO

Las objeciones a este método son las inherentes al método de Hammarsten, de oxidación en medio acético. Como se puede ver examinando el cálculo de costo, cerca del 70% de éste corresponde al ácido acético. Esta carga se podía soportar debido a dos razones, una, el bajo precio de la bilis y, la otra, la ventaja de oxidar ácido biliar. En la actualidad el elevado precio de la bilis (35 \$/K.) no permite derrochar esa cantidad de acético.

POSIBILIDADES DE ACTUALIZARLO.

Existe sin embargo la posibilidad de recuperar, por destilación, un ácido acético de 85%, pero el largo calentamiento, necesario para esta operación, da lugar a la formación de, los ya mencionados, jabones de cromo que impiden seguir el normal desarrollo de la técnica propuesta. A nuestro juicio esta dificultad no es insalvable, pero exige una modificación que debe ser estudiada.

CRITICA A LAS ESPECIFICACIONES DEL

NEW AND NONOFFICIAL REMEDIES

Al hablar del Decholin tabletas (ver pág. 5) dice: P.F. 233 a 235° C. mientras que cuando se refiere al Decholin en ampollas (pág. 6) especifica el mismo punto de fusión pero después de haber sufrido una precipitación y cristalización en ácido acético al 80%, es decir, después de haber sufrido una nueva purificación.

No es lógico que se exija mayor pureza al comprimido que al inyectable. Por otra parte el Decholin en tabletas no está constituido por ácido dehidrocólico únicamente, sino que está asociado a materias inertes (talco, etc.) y no es posible que se le tome el punto de fusión directamente.

Nosotros creemos que eso debe ser interpretado en la siguiente forma:

Disolver el Decholin en tabletas (finamente molido) en hidróxido de sodio, filtrar para separar las materias inertes, recoger el filtrado y, en él, precipitar el ácido dehidrocólico acidulando, filtrar nuevamente recogiendo el precipitado, el cual, una vez seco, y cristalizado en ácido acético al 80% debe dar

un P.F. de 233-235° C. Esto significa, implícitamente, admitir en la droga un P.F. 215° C. aproximadamente.

Tampoco creemos que el punto de fusión sea una de las cosas más importantes para controlar la pureza comercial de este producto porque pequeñas cantidades de impurezas no tóxicas (ácidos grasos, por ejemplo, o dehidrodesoxicólico) hacen bajar mucho el punto de fusión y como habrá visto por el rendimiento de las cristalizaciones resulta muy caro eliminarlas. Además existen en el comercio ácidos de alto punto de fusión y de aspecto impecable y que no obstante responder a todas las especificaciones no son aptos para uso inyectable porque la solución coagula por enfriamiento (gel) o porque presentan gran fluorescencia. Creemos que sería mucho más racional determinar la cantidad de grupo carbonilo que según Bermann y otros (3) es la parte activa del medicamento y clasificarlos según su contenido. Para el inyectable se exigiría además que la solución al 20% sea, a lo más, amarillo ámbar, libre de fluorescencia y que no forme gel por enfriamiento.

En la búsqueda de metales incluiríamos al cromo y, por últi-

mo recomendaríamos las pruebas biológicas (hay ácidos que producen shock).

Otro dato que creemos de interés es la densidad aparente del material pues, por un lado, es un índice de la pureza y, por otro, es muy importante en la técnica de la elaboración del comprimido para que salgan todos de igual volumen. La forma de realizar este ensayo sería, por ejemplo, moler el material hasta una determinada malla y medir, en una probeta, el volumen de un peso fijo después de asentarlo con pequeños golpes hasta volumen constante. Se podría expresar empíricamente por el número leído directamente en la probeta.

APENDICE

DOSIFICACION DE GRUPO CARBONILO. (32)

REACTIVOS NECESARIOS.

SOLUCION DE HIDROXILAMINA 0.5 N.- Se prepara disolviendo 35 gr. de clorhidrato de hidroxilamina en 160 c.c. de agua destilada y diluyendo todo hasta un litro con alcohol etílico de 95%.

SOLUCION DE NaOH 0.5 N.- Se prepara en alcohol de 90%. Es preferible usar alcohol metílico porque, con éste, la solución no cambia de color con el tiempo.

SOLUCION DE PIRIDINA.- Se prepara con 20 c.c de piridina y 0.25 c.c. de solución alcohólica de azul de bromofenol al 4%, diluyendo todo hasta un litro con alcohol etílico de 95%.

El clorhidrato de hidroxilamina usado no contendrá excesiva cantidad de ácido libre. 10 gr. de clorhidrato de hidroxilamina en 50 c. c. de agua destilada no deben gastar más de 8 c.c. de solución 0.5 N. de hidróxido de sodio para hacer virar al verde el azul de bromofenol.

PROCEDIMIENTO ANALITICO.

Medir con una bureta 30 c.c. de la solución de hidroxilamina y 100 c.c. de la sol. de piridina y colocarlos en una botella de "Soda Belgrano". Después de mezclar las dos soluciones el color debe ser verde azulado. La muestra es entonces pesada y colocada dentro de la mezcla, preferiblemente en tal proporción

que la mitad del reactivo (y nunca más de un tercio) permanezca después que la reacción ha terminado. Se tapa la botella y se calienta, en baño maría, a 100° C. (dos horas de calentamiento son generalmente suficientes), la muestra calentada se deja enfriar, espontáneamente, a temperatura ambiente (aproximadamente una hora). Titular el exceso de clorhidrato de hidroxilamina con la solución de NaOH 0.5 N. hasta que el indicador vire al mismo color que el de un blanco, previamente preparado. Evitar la agitación violenta durante la titulación pues podría precipitar sal enmascarando el viraje del indicador.

El número de moles de NaOH gastados es una medida directa de la cantidad de carbonilos.



Para un método gravimétrico ver Amos E. Light (33).

PREPARACION DEL INDICADOR YAMADA. (34)

Disolver:

Azul de timol	.0050 gr.
Rojo de metilo	.0125 "
Azul de bromo ^{timol} fenol	.0500 "
Fenolftaleína	.1000 "

en 100 c.c. de alcohol puro neutralizado con NaOH .05 N. y llevado hasta 200 c.c. con agua destilada.

CONCLUSIONES

1).- Se presenta un método de fabricación de ácido dehidrocólico, basado en la oxidación directa de los ácidos biliares totales.

2).- Se desarrolla una técnica de purificación, nueva, basada en la formación de compuestos de cromo no mencionados, hasta hoy, en la literatura química.

3).- Se estudian las condiciones requeridas para obtener los rendimientos máximos, compatibles con la calidad y el precio comercial.

4).- Se hace un estudio del aspecto económico.

5).- Se presentan las ventajas y los inconvenientes; planteando problemas e indicando las posibles soluciones.

6).- Se hace una crítica a las especificaciones del "New and Nonofficial Remedies".

BIBLIOGRAFIA

- (1) E. Rothlin y W. R. Schalch. Comparative study of some bile acids. *Helv. Physiol. Pharmacol. Acta.* 2 249-68 (1944).
- (2) E. Gilbert. *Z. Ges. Exptl. Med. The Physiology of the Bile.* 52 779-90 (1926)
- (3) Bermann A. L.- Snapp E.- Ivy A. C. - Atkinson A. J. y Hough V. S. *Am. J. Digestive Diseases* 7 333 (1940).
- (4) *Am. Med. Assoc. New and Nonofficial Remedies.* 146-48 (1941).
- (5) Hammarsten O. *Lehrbuch der Physiologischen Chemie.* Ed. 6. pág. 312.
- (6) Hammarsten O. Ueber Dehydrocholalsäure ein Neues Oxidations Produkt der Cholalsäure. *Ber.* 1 71 (1881).
- (7) J.D. Riedel - E. de Haen A. G. *Ger.* 489, 572 Abril 23 1927.
- (8) J. D. Riedel - E. de Haen A. G. *Fr.* 740,310 Julio 11 1932.
- (9) J. D. Riedel - E. de Haen A. G. (Gustav Revery, inventor) *Ger.* 582,727 Agosto 21 1933.
- (10) J. D. Riedel - E. de Haen A. G. *Ger.* 576,965 Mayo 22 1933.
- (11) Russel y J. Fesbinder (to the Maltbic Chemical C^o). U.S. 2,228,596. Enero 14 1941.
- (12) *Chemische Fabrik vorm Sandoz.* *Swiss* 128,727. Abril 21 1927
- (13) Robert H. Sifferd (to Armour C^o) U. S. 2,346,349. Abril 11 1944.

- (14) Chemische Fabrik vorm Sandoz. Brit. 269,925. April 24 1926.
- (15) Wieland D. R. P. 321,699. Ullman 10 97 (1938)
- (16) Martin Shenck. Bile Acids. Z. Phys. Chem. 148 218-24 (1925)
- (17) Seville Milne White. The Preparation of the Unconjugated Acids of Ox Bile. Biochem. J. 23 1165-71 (1929).
- (18) Schryver S. B. y Brompton S. W. The Preparation of the Unconjugated Acids of Bile. J. Physiol. 44 275 (1912).
- (19) Mylius F. Sur l'acid cholique. D. Ch. G. 19 2000 (1886).
Bull. Soc. Ch. Fr. 46 876 (1886).
- (20) Mylius F. Preparation et composition de l'acide cholique.
- (21) Langheld K. Sur les constituants de la bile de boeuf. Ber. 41 378-85 (1908). Bull. Soc. Ch. Fr. 6 829 (1909).
- (22) Fritz Pregl. Preparation de l'acide desoxicolique et cholique et etude de leurs products d'oxidation. Monatshefte fur Chemie 24 19.67 (1903).
- (23) Fritz Pregl y Hans Buchtala. The Acids of the Bile of Summer Oxen at Graz. A New Process for the Isolation of the Three Specific Bile Acids from Ox Bile. Z. Physiol. Chem. 74 198-211 1911.
- (24) M. Pieltre. Analysis of Bile. Separation of Biliary Acids. Compt. Rend. 148 372-4 (1909).
- (25) Wieland y Sorge. Bile Acids. Choleic Acids. Zeit. Phys. Ch. 97 1.27 (1916).

- (26) Wieland y Weill. Z. Phys. Ch. 80 287-97 (1912).
- (27) Mair W. Preparation of Desoxichlique Acid. Bioch. J. 11
11 (1917).
- (28) Gatterman y Wieland. Laboratory Methods of Organic Chemistry. 412-13 (1938).
- (29) Rojahn C. A. Preparación de productos químicos y químico-farmacéuticos. 2 744-47 (1942).
- (30) Fieser L. F. y Newman M. S. Methylcholanthrene of Cholique Acid. J. Am. Chem. Soc. 57 961 (1935)
- (31) Kopaczewsky W. Gelation of Proteins Substances. Protoplasma. 29 180-93 (1937).
- (32) Bryant W. M. D. y Smith D. M. Improved Hydroxylamine Method for the Determination of Aldehydes and Ketones. J. Am. Chem. Soc. 57 57 (1935).
- (33) Amos E. Light. Determination of Carbonyl Groups in Bile Preparations. Ind. Eng. Chem. 14 42-43 (1942)
- (34) Yamada S. Indicator for Concentration of Hidrogen Ion. Japan 99, 664. Febrero 21 1933.

INDICE

GENERALIDADES

Sales biliares, toxicidad de	Pág.	3
" " actividad terapéutica de	"	3
" " acción y usos de	"	4
" " Reacción de Pettenkoffer	"	4
" " " del furfural	"	5
Decholin, acción y usos del	"	5
" comprimidos, dosis	"	5
" " especificaciones	"	6
" sódico, dosis	"	6
" " especificaciones	"	7
Motivo de este trabajo	"	8

SUMARIO

Breve estudio crítico de los métodos conocidos	"	9
Objeto de este trabajo	"	12
Método de oxidación	"	13
Dificultades y anomalías presentadas	"	13
Explicación de las anomalías-jabones de cromo	"	15
Utilización de los jabones de cromo	"	16
Tabla de rendimientos a distintos pH	"	17

TECNICA

Saponificación de la bilis	"	19
Oxidación de los ácidos biliares	"	23

Purificación del material oxidado	Pág.	26
Recuperado de aguas madres	"	29
Experiencia sobre este método	"	29

DISCUSION

Ventajas del método	"	30
Capacidad de producción	"	31
Equipo necesario	"	31
Cálculo de costo	"	32
Objecciones al método	"	33
Posibilidades de actualizarlo	"	33
Crítica a las especificaciones	"	34

APENDICE

Dosificación de grupo carbonilo	"	37
Preparación del indicador Yamada	"	38

CONCLUSIONES

" 39

BIBLIOGRAFIA

" 40

LAMINAS

Fórmula del ácido dehidrocólico	"	1
Cuba de saponificación	"	21
Célula de oxidación	"	24
