

UNIVERSIDAD NACIONAL DE INGENIERÍA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA PROFESIONAL DE QUÍMICA



**“ESTUDIO QUÍMICO DE LAS HOJAS DEL TOE
(*Datura sanguinea* (R. & P.) D. Don)”**

TESIS

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE

LICENCIADO EN QUÍMICA

GOLFER MUEDAS TAIPE

LIMA – PERÚ

2006

A Dios que nunca me deja solo.

*A mis padres ejemplos de
perseverancia y trabajo.*

*A mis hermanos y sobrinos que
siempre los tengo presente.*

AGRADECIMIENTOS

Deseo agradecer sinceramente a mi asesor, Dr. Víctor Reyna Pinedo, por su invaluable apoyo y los consejos brindados durante la realización del presente trabajo y durante mis años de estudios.

A los miembros del Grupo de Investigación de Química de Productos Naturales, en especial a la M.Sc. Virginia Torpoco C. y a la Lic. Elena Córdor C., por los constantes apoyos que me brindaron durante las diferentes etapas de la realización de esta tesis;

a la M.Sc. Blga. Joaquina Albán (Universidad Nacional Mayor de San Marcos) por la determinación botánica del material vegetal;

a la M.Sc. Ingrit Collantes D., al Dr. Yoshida Massayoshi y al Dr. Paulo Roberto H. Moreno por el apoyo y facilidades brindadas, durante mi permanencia en el Laboratorio de Productos Naturales del Instituto de Química de la Universidad de São Paulo (São Paulo-Brasil), entre el 15 de julio y el 15 de agosto del 2005, para la realización de la purificación cromatográfica de los extractos de alcaloides, así como para la obtención de los espectros de Masas, y de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno (RMN¹H), Carbono (RMN¹³C), ¹H-¹H COSY y ¹H-¹³C HETCOR;

al Instituto General de Investigación de la UNI y al Instituto de Investigación de la Facultad de Ciencias-UNI, por el apoyo económico que me brindaron, para la realización de todo este trabajo de investigación, desde la colecta de la muestra hasta la etapa final de la parte experimental de esta tesis;

finalmente, a todas aquellas personas que de una u otra forma contribuyeron en la realización de este trabajo.

RESUMEN

El toe (*Datura sanguinea*) se emplea en la medicina tradicional peruana, y sus constituyentes puros (el alcaloide escopolamina) se utilizan como espasmolítico, anticolinérgico, narcótico y anestésico.

Las hojas del toe (*D. sanguinea*) contienen alcaloides del tipo tropánico, principalmente escopolamina, conocida también como hioscina (Evans et al.-1965, 1966 y 1968).

En el presente trabajo de tesis hemos aislado la escopolamina de las hojas del toe, habiéndola caracterizado mediante sus espectros de Masas, RMN¹H, RMN¹³C, ¹H-¹H COSY y ¹H-¹³C HETCOR.

Drey & Foster (1953) realizaron el análisis cuantitativo de alcaloides presentes en la *Datura sanguinea*, reportando que el porcentaje total de alcaloides en las hojas (secas) fluctúa entre 0,27 a 0,51%. En nuestro laboratorio se realizó la determinación cuantitativa del total de alcaloides de las hojas del toe, habiendo obtenido 0,34% (procedimiento de Pelt et al.-1967).

El análisis cualitativo que realizamos, nos indica la presencia de, aminogrupos primarios y/o secundarios, grupos fenólicos libres, alcaloides, triterpenos y esteroides, catequinas y saponinas.

ESTUDIO QUÍMICO DE LAS HOJAS DEL TOE
(*Datura sanguinea* (R. & P.) D. Don)

CONTENIDO

I. ASPECTOS GENERALES

A. PRESENTACIÓN	2
B. OBJETIVOS DE LA TESIS	5

II. ESTUDIO BIBLIOGRÁFICO

A. ESTUDIOS QUÍMICOS PRECEDENTES RELATIVOS A LAS HOJAS DEL TOE (<i>Datura sanguinea</i>)	7
1. Composición Química de las hojas del toe (<i>D. sanguinea</i>)	7
a) Análisis cualitativo (marcha fitoquímica)	7
b) Principales alcaloides presentes en las hojas del toe	7
c) Análisis cuantitativo (porcentaje de alcaloides) en las hojas del toe	10
2. Aislamiento de alcaloides de las hojas del toe	12
a) Procedimiento de Evans et al. (1965)	13
b) Procedimiento de Leary (1970)	14
c) Procedimiento de Robins et al. (1993)	15
3. Identificación clásica de la escopolamina y/o derivados	16
a) Comportamiento cromatográfico de la escopolamina e hiosciamina	16
b) Punto de fusión	17
4. Identificación espectroscópica de la escopolamina	17
a) Espectro de Masas de la escopolamina	17
b) Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno, RMN ¹ H	21
c) Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de Carbono, RMN ¹³ C	24
d) Espectro de Correlación Homonuclear, ¹ H- ¹ H COSY	28
e) Espectro de Correlación Heteronuclear, ¹ H- ¹³ C HETCOR	29
f) Espectro Ultravioleta, UV	31
g) Espectro Infrarrojo, IR	32
5. Biosíntesis de la escopolamina	34

B. ESTUDIOS QUÍMICOS GENERALES	36
1. Análisis cualitativo (marcha fitoquímica)	36
2. Test de alcaloides	36
3. Análisis cuantitativo de alcaloides	37
a) Procedimiento de la 20 th ed. U.S. Pharmacopoeia–USP (1980)	37
b) Procedimiento de Pelt et al. (1967)	38
c) Procedimiento realizado en la tesis	39
4. Aislamiento de alcaloides	41
a) Procedimiento de Reyna & Torpoco (1993)	41
b) Procedimiento de Hoet & Ríos (1980)	42
c) Procedimiento de Vitale et al. (1995)	42
d) Comparación de Procedimientos	43
5. Identificación espectroscópica de compuestos orgánicos	45
a) Espectrometría de Masas, EM	45
b) Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno, RMN ¹ H	47
c) Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear de Carbono, RMN ¹³ C	48
d) Espectroscopía de Resonancia Magnética Bidimensional	52
e) Espectroscopía de Infrarrojo, IR	54
f) Espectroscopía de Ultravioleta, UV	55

III. PARTE EXPERIMENTAL

PRESENTACIÓN	57
METODOLOGÍA DE INVESTIGACIÓN PARA EL ESTUDIO QUÍMICO (ALCALOIDES) DE PLANTAS MEDICINALES	59
TRABAJO PRELIMINAR	60
A. SELECCIÓN Y COLECCIÓN DE LA PLANTA	60
B. ESTUDIO ETNOBOTÁNICO Y ETNOMEDICINAL	60
C. DETERMINACIÓN (IDENTIFICACIÓN) BOTÁNICA	62
D. ESTUDIO BIBLIOGRÁFICO	62
TRABAJO EXPERIMENTAL EN EL LABORATORIO	64
E. SECADO Y MOLIENDA DE LA PLANTA	64

F. ANÁLISIS CUALITATIVO (MARCHA FITOQUÍMICA)	64
1. Muestra. Cantidad de muestra por análisis	64
2. Procedimiento	64
3. Resultados	64
G. ANÁLISIS CUANTITATIVO DE ALCALOIDES	65
1. Muestra. Cantidad de muestra por análisis	65
2. Procedimiento	65
a) Extracción sólido–líquido: Obtención del Extracto Bruto Orgánico	65
b) Separación líquido–líquido: Obtención del Extracto Bruto de Alcaloides	66
c) Eliminación de las bases volátiles	67
d) Titulación. Determinación potenciométrica	67
3. Cálculo de la cantidad y del porcentaje de alcaloides en la muestra	68
H. AISLAMIENTO DE LA ESCOPOLAMINA	70
1. Extracción sólido–líquido: Obtención del Extracto Bruto Orgánico	71
2. Separación líquido–líquido: Obtención del Extracto Bruto de Alcaloides	73
3. Purificación por cromatografía	74
4. Análisis preliminar por cromatografía en capa fina–CCF	75
5. Cromatografía de columna–CC	76
6. Cromatografía en placa preparativa–CPP	78
I. IDENTIFICACIÓN ESPECTROSCÓPICA DE LA ESCOPOLAMINA	80
1. Espectro de Masas	80
Espectro N°1.- Espectro de Masas de la escopolamina obtenida a partir de las hojas del toe (<i>D. sanguinea</i>)	82
2. Espectro de RMN ¹ H	83
Espectro N°2.- Espectro de RMN ¹ H de la escopolamina obtenida a partir de las hojas del toe (<i>D. sanguinea</i>)	85
3. Espectro de RMN ¹³ C	86
Espectro N°3.- Espectro DEPT-135 de la escopolamina obtenida a partir de las hojas del toe (<i>D. sanguinea</i>)	89

Espectro N°4.- Espectro de RMN ¹³ C–Desacoplamiento de ¹ H de banda ancha de la escopolamina obtenida a partir de las hojas del toe (<i>D. sanguinea</i>)	90
4. Espectro ¹ H- ¹ H COSY	91
Espectro N°5.- Espectro de COSY de la escopolamina obtenida a partir de las hojas del toe (<i>D. sanguinea</i>)	92
5. Espectro ¹ H- ¹³ C HETCOR	93
Espectro N°6.- Espectro de HETCOR de la escopolamina obtenida a partir de las hojas del toe (<i>D. sanguinea</i>)	94

IV. RESULTADOS Y CONCLUSIONES

RESULTADOS	96
CONCLUSIONES	98

V. BIBLIOGRAFÍA

VI. ANEXOS

Anexo N°1. Alcaloides en trazas en las hojas del toe	106
Anexo N°2. Marcha fitoquímica preliminar (Reyna, 1999-b)	107
Anexo N°3. Análisis cualitativo para la detección de alcaloides presentes en plantas (Reyna, 1992)	113
Anexo N°4. Identificación Botánica del toe (<i>D. sanguinea</i>)	116
Anexo N°5. Resultados de la marcha fitoquímica de las hojas del toe (<i>D. sanguinea</i>)	119
Anexo N°6. Curva de titulación potenciométrica de la escopolamina	120
Anexo N°7. Análisis cuantitativo de alcaloides en las hojas del toe (<i>D. sanguinea</i>)	121
Anexo N°8. Ensayos de aislamiento y purificación de alcaloides	124
Anexo N°9. Obtención del Extracto Bruto de Alcaloides N°3	126
Anexo N°10. Análisis preliminar por cromatografía en capa fina (CCF) del extracto bruto de alcaloides	129
Anexo N°11. Cromatografía en placa preparativa (CPP) de la fracción N°3	131

I. ASPECTOS GENERALES

A. PRESENTACIÓN

La Química de los Productos Naturales es un campo de estudio muy amplio de la Química Orgánica, y de mucha importancia para el Perú debido a la gran riqueza de su flora, y de la amplia utilización que se ha dado en el pasado y que actualmente continúa dándose a las plantas en medicina tradicional, y en otros dominios como colorantes, insecticidas, aromatizantes, etc.

La investigación científica de las plantas medicinales involucran dos grandes partes; primera, la adquisición de la planta y de los conocimientos y/o estudios previos sobre ella, y la segunda parte que trata del trabajo experimental en el laboratorio.

En primer lugar, debemos seleccionar o decidir la planta que vamos a estudiar, realizar la adquisición de la muestra, hacer la identificación botánica de la planta y conseguir toda la información referente a ella, tanto en el campo como en la biblioteca. La segunda parte de estas investigaciones, referida al estudio químico de las plantas medicinales, tiene como objetivo responder todas las interrogantes en relación a los constituyentes químicos (los llamados productos naturales) presentes en las plantas:

1. ¿Qué clase de compuestos contiene?, lo que se consigue mediante el análisis cualitativo (marcha fitoquímica) de la planta.
2. ¿Cuánto contiene de determinada clase de constituyente (por ejemplo, de alcaloides)?, lo cual se consigue mediante el análisis cuantitativo de dicha clase de constituyentes.
3. ¿Cuál es la identidad, la estructura química exacta de los constituyentes principales?, lo cual se logra mediante el aislamiento de cada constituyente puro (lo que involucra los procedimientos de

extracción por solventes, separación y purificación) y la identificación espectroscópica de su estructura, mediante el análisis de sus espectros de Resonancia Magnética Nuclear RMN¹H y RMN¹³C, entre otras.

La presente tesis, en la línea de Química Orgánica de Productos Naturales, comprende el estudio químico de alcaloides presentes en las hojas del toe (*Datura sanguinea*) y constituyó para mí el repaso de los cuatro cursos básicos semestrales de Química Orgánica, así como de los cursos de Proyecto de Tesis I CQ 561 (Estudio Fitoquímico de la hojas del toe (*B. sanguinea*) y Proyecto de Tesis II CQ 562 (Análisis Cuantitativo de Alcaloides de las hojas del toe), y del curso electivo CQ 046-Química de los Productos Naturales, habiéndome proporcionado una visión global de la aplicación de los conocimientos de la Química Orgánica a la solución experimental de un problema específico, el estudio químico de una planta, permitiéndome conocer i qué clase de compuestos están presentes, ii cuál es la cantidad de alcaloides que contiene y iii cuál es el alcaloide principal contenido en las hojas del toe.

Este trabajo de tesis comprendió las siguientes actividades:

- 1 Trabajo experimental en laboratorio químico, realizado en el ambiente de Investigación de Química de Productos Naturales (C3-175), ubicado en el Laboratorio N°12 (pabellón C) de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Ingeniería, que comprendió el secado y molienda de las hojas del toe (*Datura sanguinea*), el análisis cualitativo (marcha fitoquímica), el análisis cuantitativo del total de alcaloides y la obtención de los extractos de alcaloides.

- ii La parte más importante de esta tesis, la purificación de la escopolamina, el principal alcaloide presente en las hojas de esta planta, se logró en dos estadias realizadas en el Instituto de Química de la Universidad de São Paulo (Brasil). La primera estadia entre los meses de agosto y setiembre del 2003 a cargo de la Lic. Elena Córdor C., integrante de nuestro grupo de investigación que realizó una purificación parcial mediante cromatografía en columna (CC). En la segunda estadia, a cargo del autor de esta tesis, se logró la purificación final de la escopolamina mediante cromatografía en placa preparativa (CPP).
- iii Identificación espectroscópica de la escopolamina mediante el análisis de los espectros de Masas y de Resonancia Magnética Nuclear (RMN¹H, RMN¹³C, ¹H-¹H COSY y ¹H-¹³C HETCOR).
- iv Análisis de la información bibliográfica relativa a los estudios químicos de las hojas del toe (*D. sanguinea*) y de la escopolamina.

Todo este trabajo demandó, en promedio, una dedicación de 12 meses (considerando el trabajo de 8 horas/día, durante 5 días/semana), y se realizó en el período de marzo del 2001 a agosto del 2005.

B. OBJETIVOS DE LA TESIS

Los objetivos de la presente tesis son los siguientes:

- i El aislamiento e identificación (espectroscópica) de la escopolamina, principal alcaloide presente en las hojas del toe (*Datura sanguinea*),
- ii el análisis cualitativo (marcha fitoquímica) de los metabolitos secundarios presentes en las hojas del toe, y
- iii el análisis cuantitativo del total de alcaloides contenido en las hojas de la planta.

Nuestro objetivo principal es el primero, esto es, el aislamiento e identificación del principal alcaloide contenido en las hojas del toe, que nos llevó al estudio y experimentación de los diversos procedimientos de aislamiento de alcaloides y de las técnicas de identificación espectroscópicas.

El aislamiento comprende las etapas de extracción por solventes, separación y purificación. Así, se describirán los diversos métodos de extracción de alcaloides publicados en la bibliografía, las pruebas cualitativas de detección de alcaloides, la utilización de la cromatografía en capa fina como método preliminar de identificación y la purificación mediante la cromatografía en columna y placa preparativa. Asimismo, se describe la aplicación de la espectrometría de Masas y de Resonancia Magnética Nuclear, de Hidrógeno-RMN¹H, de Carbono-RMN¹³C, ¹H-¹H COSY y ¹H-¹³C HETCOR, en la identificación de la estructura molecular.

De esta manera se nos capacita en la rutina de trabajo químico en productos naturales, estudiando las diversas etapas de la metodología de trabajo que se sigue para el estudio químico de alcaloides contenidos en una planta, el cual es análogo al que se sigue para el estudio de cualquier clase de compuesto orgánico (metabolito secundario) contenido en un producto natural.

II. ESTUDIO BIBLIOGRÁFICO

A. ESTUDIOS QUÍMICOS PRECEDENTES RELATIVOS A LAS HOJAS DEL TOE (*Datura sanguinea*)

1. Composición Química de las hojas del toe (*D. sanguinea*)

a) Análisis cualitativo (marcha fitoquímica)

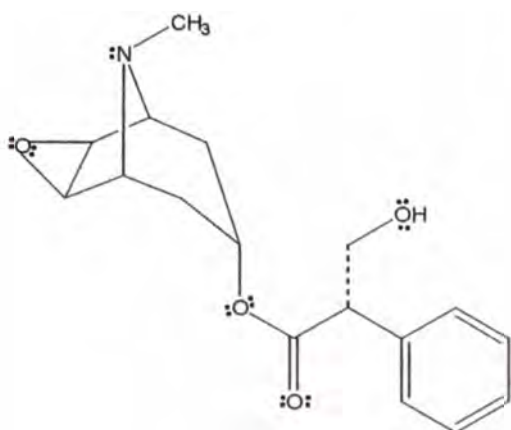
La marcha fitoquímica, se refiere a la determinación cualitativa de los metabolitos secundarios o productos naturales* presentes en una planta o cualquier organismo vivo, basándonos en la extracción con solventes apropiados y en la aplicación de pruebas de coloración y/o precipitación.

En la bibliografía revisada, no se ha encontrado ningún trabajo de análisis cualitativo de las hojas del toe.

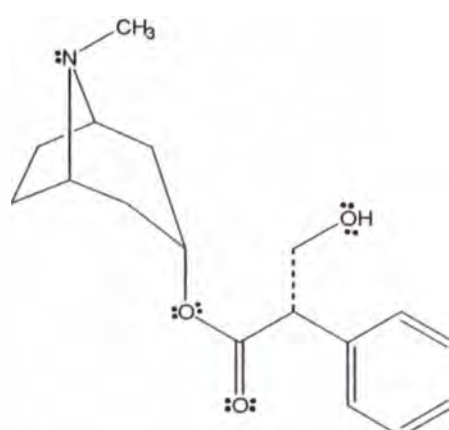
b) Principales alcaloides presentes en las hojas del toe

Los estudios mas completos sobre los alcaloides presentes en las hojas del toe (*D. sanguinea*) han sido publicados por Evans et al. (1965, 1966 y 1968), quienes encontraron que éstas contienen principalmente el alcaloide escopolamina, llamado también hioscina (Figura N°1 a, 0,08%), y pequeñas cantidades de hiosciamina (0,01%), norescopolamina (0,006%) y apoescopolamina (0,005%), cuyas estructuras se muestran en la Figura N°1, en la que se incluye la estructura básica de los alcaloides tropánicos a la cual pertenecen estos alcaloides.

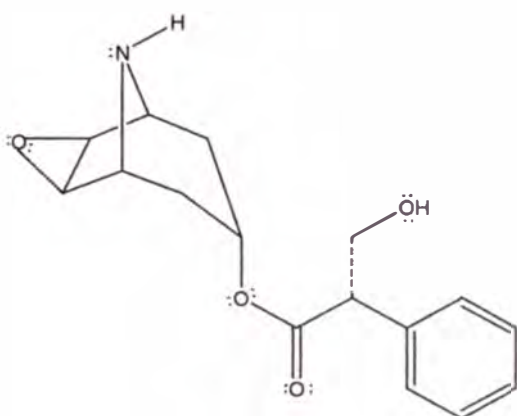
* Metabolitos secundarios o productos naturales.- Se refiere a los compuestos orgánicos de estructura variada, presentes en los organismos vivos, que tienen una distribución restringida y característica a determinada especie. Ejemplos: alcaloides, taninos, quinonas, triterpenos y esteroides, leucoantocianidinas, catequinas, flavonoides, saponinas, etc.
Metabolitos primarios.- Productos del metabolismo general y de amplia distribución en plantas y animales. Ejemplos: carbohidratos, aminoácidos y proteínas, mucílago, ceras, etc.



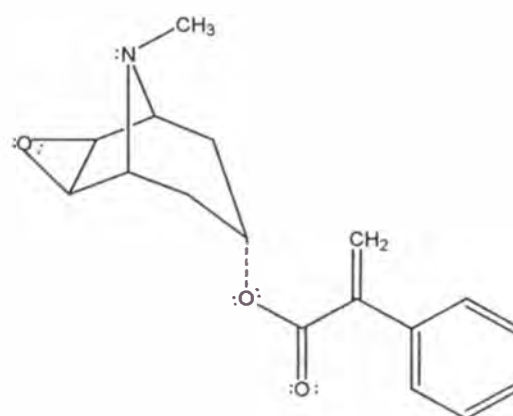
a) Escopolamina (o hioscina)



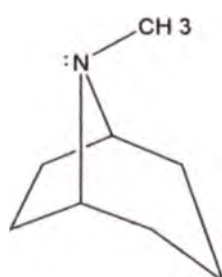
b) Hiosciamina*



c) Norescopolamina



d) Apoescopolamina



e) Estructura básica de alcaloides tropánicos

Figura N°1.- Principales alcaloides presentes en las hojas del toe (*D. sanguinea*)

* Atropina.- Es un producto racémico de la hiosciamina

Asimismo, Evans et al. (1966 y 1968) lograron aislar, en trazas, los alcaloides (-)-3 α -tigloiloxi-6 β -acetoxitropano, 3 α -acetoxitropano, meteloidina, oscina y litorina, cuyas estructuras se presentan en el Anexo N°1.

Las plantas estudiadas fueron cultivadas y colectadas en el año 1962 en Nottingham (Inglaterra).

Drey & Foster (1953) en su análisis cuantitativo sobre los alcaloides del toe (*D. sanguinea*) encuentran que éste contiene casi exclusivamente escopolamina (0,27-0,51%) (ver Tabla N°1).

Nathan et al. (1993) reportan el aislamiento del alcaloide 6 β -hidroxi-3 α -tigloiloxitropano, pero este compuesto podría ser un producto de degradación del (-)-3 α -tigloiloxi-6 β -acetoxitropano.

En sus investigaciones, Evans et al. (1965 y 1968), también analizaron las raíces de la *D. sanguinea*, encontrando que ésta contiene principalmente escopolamina e hiosciamina (o atropina), así como 3,6-ditigloiloxitropan-7-ol y (-)-3 α ,6 β -ditigloiloxitropano.

El estudio más completo sobre los alcaloides presentes en las semillas del toe (*D. sanguinea*) fue publicado por Leary (1970), quien encontró que éstas contienen principalmente el alcaloide escopolamina (88,4% del total de alcaloides) y, además, los alcaloides hiosciamina (10,5%) y apohioscina (1,1%). Este trabajo fue revisado en la tesis realizada en nuestro laboratorio por E. Córdor (2004).

De todas las partes de esta planta la menos estudiadas han sido las flores, reportándose la presencia del alcaloide principal, la escopolamina, (0,34; 0,55 y 0,89%), de hiosciamina (0,04%) y otros alcaloides (0,25% y 0,03%) (Evans et al.-1965 y Drey & Foster-1953), sin indicación del proceso de aislamiento.

En resumen, en todas estas publicaciones se encontró que la escopolamina es el principal alcaloide presente en toda la planta (hojas, raíces y semillas), junto con pequeñas cantidades de hiosciamina o atropina.

c) Análisis cuantitativo (porcentaje de alcaloides) en las hojas del toe

Drey & Foster (1953) reportan la determinación del total de alcaloides presentes en *D. sanguinea* siguiendo el procedimiento de extracción de la muestra basificada por percolación con cloroformo; extracción del percolado con ácido acético y regeneración de los alcaloides libres con amoníaco acuoso, los que fueron extraídos con cloroformo. Después de la eliminación del solvente orgánico, el residuo se disuelve con ácido sulfúrico 0,1 N y se titula con hidróxido de sodio 0,02 N usando indicador rojo de metilo.

El porcentaje total de alcaloides en las hojas (secas) de *D. sanguinea* fluctúa entre 0,27 a 0,51%, siendo la escopolamina el alcaloide principal (Tabla N°1).

En la bibliografía se reporta la determinación del total de alcaloides presentes en otras especies de *Brugmansias* y *Daturas*, así como la determinación cuantitativa diferenciada de escopolamina en relación a la hiosciamina presente en la planta. Así, Padula et al. (1976) reporta la determinación cuantitativa del total de alcaloides (por el método de la USP XVIII) y de la escopolamina (utilizando cromatografía de gases) presente en *Datura ferox* de Argentina.

Los métodos clásicos de determinación de escopolamina y hiosciamina involucran la purificación mediante cromatografía en columna del extracto total de alcaloides, y la cuantificación por separado de cada alcaloide (Evans & Partridge-1952).

Tabla N°1
ANÁLISIS CUANTITATIVO DE MUESTRAS DE *DATURA SANGUINEA*
(Drey & Foster-1953)

Características y/o procedencia de las muestras	Partes de la muestra (seca)	Contenido de alcaloides			
		Total de alcaloides %	Escopolamina %	Hiosciamina %	Otros %
Ecuador	Hojas	0,27	0,27	-	-
	Flores	0,62	0,55	0,04	0,03
	Cortezas	0,26	0,19	0,02	0,04
	Semillas	0,17	0,17	-	-
Dartford (Inglaterra) (Plantas de almacigo) Cosecha 1952	Hojas	0,51	0,49	0,02	-
	Tallos	0,31	0,28	0,03	-
	Raíces	0,54	0,21	0,29	0,04
Dartford (Inglaterra) (Plantas de esqueje) Cosecha 1952	Hojas	0,41	0,41	Trazas	-
	Tallos	0,30	0,27	0,02	-
	Raíces	0,76	0,18	0,42	0,16
Dartford (Inglaterra) (Plantas de invernadero) Cosecha 1952	Hojas	0,34	0,34	-	-
	Tallos	0,30	0,29	0,01	-

Los métodos modernos de análisis involucran el uso de HPLC* para el análisis de estos alcaloides (Vitale et al.-1995 y Robins et al.-1987).

Pelt et al. (1967) realizaron una revisión exhaustiva de los diversos métodos oficiales (presentados en las Farmacopeas) utilizados para la determinación cuantitativa del total de alcaloides contenidos en estas plantas (pertenecientes a la familia de las Solanáceas). Este estudio fue replicado en el Perú por Hoet & Ríos (1980), para el análisis de la *Datura stramonium*.

* HPLC: Cromatografía líquida de alta performance.

2. Aislamiento de alcaloides de las hojas del toe

La escopolamina se encuentra junto con la hiosciamina y/o atropina en varias plantas de la familia Solanaceae, en los géneros *Atropa*, *Datura* (o *Brugmansia*), *Hyoscyamus*, *Duboisia*, *Mandragora* y *Scopolia*. La escopolamina es el principal alcaloide presente en las especies del género *Datura*, mientras que la hiosciamina es el alcaloide principal en los géneros *Atropa* y *Scopolia* (Muhtadi & Hassan-1990).

Evans et al. (1965, 1966 y 1968) y Drey & Foster (1953) reportan el aislamiento de los alcaloides contenidos en las hojas del toe (*D. sanguinea*); y Leary (1970) reporta el aislamiento de los alcaloides contenidas en sus semillas.

En la bibliografía se encuentra numerosos artículos referidos al aislamiento de escopolamina e hiosciamina de otras especies de *Datura*, siendo el procedimiento de Robins et al. (1993) aquel que guarda mayor semejanza al procedimiento experimental que hemos aplicado en nuestra tesis.

A continuación se describen los procedimientos publicados por Evans et al. (1965), Leary (1970) y Robins et al. (1993), los cuales para una mejor comprensión, se presentan divididos en subtítulos (muestra utilizada, extracción sólido-líquido, separación líquido-líquido, purificación e identificación).

No presentaremos el procedimiento de Drey & Foster (1953) porque este involucra la purificación final de los alcaloides mediante cromatografía de papel, técnica que actualmente no se utiliza con estos propósitos.

a) Procedimiento de Evans et al. (1965)

“Caracterización de la apoescopolamina, norescopolamina e hiosciamina de las partes aéreas (*Datura sanguinea R. & P.*)”.

- Muestra utilizada

Hojas pulverizadas de *Datura sanguinea R. & P.* (600g)

- Extracción sólido–líquido (Obtención del Extracto Bruto Orgánico, EBO)

- i Alcalinización de la muestra: La muestra se mezcla con hidróxido de calcio y agua. Se deja en reposo por una hora.

- ii Se extrae con éter etílico y luego de la evaporación del solvente se obtiene el EBO.

- Separación cromatográfica (Obtención del Extracto Bruto de alcaloides, EBA)

- iii El extracto bruto se disuelve en éter y se hace pasar por una columna cromatográfica empacada con Kieselguhr, recubierto con ácido sulfúrico 1,0 N.

- iv Se hace pasar éter a través de la columna y se eluyen pigmentos y algo de material básico.

- v Se retira el adsorbente Kieselguhr de la columna, se deja secar al ambiente y las bases se recuperan con cloroformo amoniacal, obteniéndose una mezcla cruda luego de la evaporación del solvente.

- vi La mezcla cruda se disuelve en etanol y se neutraliza con ácido sulfúrico 1,0 N. Se diluye con agua, se filtra y se agitan con cloroformo.

- vii Se separa la fase acuosa (superior) y se basifican gradualmente con NaOH_(ac) 1,0 N y los alcaloides se extraen con cloroformo. La eliminación del solvente proporciona el EBA.

- Purificación e Identificación

viii La fracción 4 se empaca en una columna cromatográfica de Kieselguhr, recubierto con una solución buffer de fosfato 0,5 M de pH 6,6.

ix A partir de la elución de la columna con éter etílico, se obtiene escopolamina (0,51 g).

x Purificación: se sintetizó el picrato de escopolamina.

xi Identificación: mediante su punto de fusión y espectroscopía infrarroja.

- Resultados: aislamiento e identificación del picrato de escopolamina de las hojas de *D. sanguinea*.

b) Procedimiento de Leary (1970)

“Alcaloides de las semillas de *Datura sanguinea* R. & P.”

- Muestra utilizada

Semillas de *Datura sanguinea* R. & P.

- Extracción sólido-líquido (Obtención del Extracto Bruto Orgánico, EBO)

1 Maceración de las semillas con solventes de polaridad creciente: éter de petróleo, éter etílico, metanol (extracto que contenía alcaloides), etanol al 70%. El extracto orgánico se concentra al vacío hasta sequedad, obteniéndose el EBO.

- Separación cromatográfica

11 El extracto bruto de alcaloides se empacó en una columna cromatográfica sobre Kieselguhr, el cual se había sometido a una solución buffer de fosfato de pH 6,6.

111 Se eluyó con solventes de polaridad creciente aislándose los siguientes alcaloides:

-Fracción de éter etílico: apohioscina y escopolamina.

-Fracción de cloroformo: hiosciamina y dos alcaloides no identificados.

-Fracción de cloroformo en medio amoniacal: trazas de hiosciamina, tropina, pseudotropina y colina.

- Purificación e Identificación

- iv Purificación: se sintetizó el picrato de escopolamina.

- v Identificación: mediante su punto de fusión y espectroscopía infrarroja.

- Resultados: aislamiento e identificación del picrato de escopolamina de las semillas de *D. sanguinea*.

c) Procedimiento de Robins et al. (1993)*

- Muestra utilizada

Raíces de *Datura sp.*

- Extracción sólido-líquido (Obtención del Extracto Bruto Orgánico, EBO)

- i Maceración de las raíces con metanol. El extracto orgánico se concentra al vacío hasta sequedad, obteniéndose el EBO.

- Separación líquido-líquido (Obtención del Extracto Bruto de Alcaloides, EBA)

- ii Disolución del extracto bruto orgánico con una solución acuosa de ácido clorhídrico $\text{HCl}_{(ac)}$ 1,0 M.

- iii Las soluciones ácidas se juntan y se lavan con cloruro de metileno CH_2Cl_2 (6x75 mL), descartando la fase orgánica.

- iv La fase acuosa ácida se alcaliniza con amoníaco $\text{NH}_3_{(ac)}$ 15 N.

- v La fase acuosa alcalina se extrae con cloroformo CHCl_3 (4x100 mL).

- vi Las fases orgánicas se reúnen, se secan con sulfato de sodio anhidro $\text{Na}_2\text{SO}_{4(s)}$, se filtran, y se concentran: se obtiene el EBA.

* Título del artículo: "Estereoquímica de los procesos enzimáticos involucrados en la biosíntesis de la escopolamina a partir de la hiosciamina".

- Purificación e Identificación
 - vii Purificación mediante cromatografía en placa preparativa, obteniéndose alcaloides puros.
 - viii Identificación: mediante espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno, RMN¹H.
- Resultados: aislamiento e identificación de los alcaloides escopolamina e hiosciamina.

3. Identificación clásica de la escopolamina y/o derivados

a) Comportamiento cromatográfico de la escopolamina e hiosciamina

i Cromatografía en capa fina-CCF: Robins et al. (1993)

Adsorbente : Kieselgel G, placas de 0,25 mm de espesor.

Eluente*: AcOEt-iPrOH-NH_{3(ac)} 25% (45:35:10)

Revelador: Dragendorff

- R_f(escopolamina): 0,61
- R_f (hiosciamina) : 0,40

ii Cromatografía en capa fina-CCF: Ayala & Sotelo (1993)

Adsorbente : Sílica gel G-60.

Eluente: Acetona-NH_{3(ac)} 7,5% (90:10)

Revelador: Dragendorff

- R_f(escopolamina): 0,94
- R_f (hiosciamina) : 0,85

* AcOEt: acetato de etilo (CH₃COOCH₂CH₃); iPrOH: isopropanol (CH₃CHOHCH₃).

b) Punto de fusión

i Escopolamina: Líquido viscoso. Forma un cristal monohidratado

59 °C (The Merck Index-1996)

Picrato de escopolamina : 187,8 °C (Leary-1970)

188 °C (Griffin-1966)

187-188 °C (Evans & Pe Than-1961)

ii Hiosciamina : 108,5 °C (The Merck Index-1996)

Picrato de hiosciamina: 165 °C (Dictionary of Alkaloids, Southon-1989)

4. Identificación espectroscópica de la escopolamina

En la Sección II.B.5. (Identificación espectroscópica de compuestos orgánicos, pág. 45) se presentarán los aspectos generales y la importancia de las principales técnicas espectroscópicas en la determinación de la estructura molecular: La Espectrometría de Masas (EM), la Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno (RMN¹H) y de Carbono (RMN¹³C), la espectroscopía de Correlación Homonuclear (COSY), Correlación Heteronuclear (HETCOR) y Correlación Heteronuclear de Enlace Múltiple (HMBC), así como la espectroscopía de Infrarrojo (IR) y de Ultravioleta (UV).

a) Espectro de Masas de la escopolamina

Vitale et al. (1995:86) proporcionan el espectro de masas de la escopolamina (aislada de *D. ferox*), ver Figura N°2, explicando la formación de alguno de sus picos principales. Ellos utilizaron un equipo acoplado de cromatografía de gases-espectrómetro de masas VG TRIO-2.

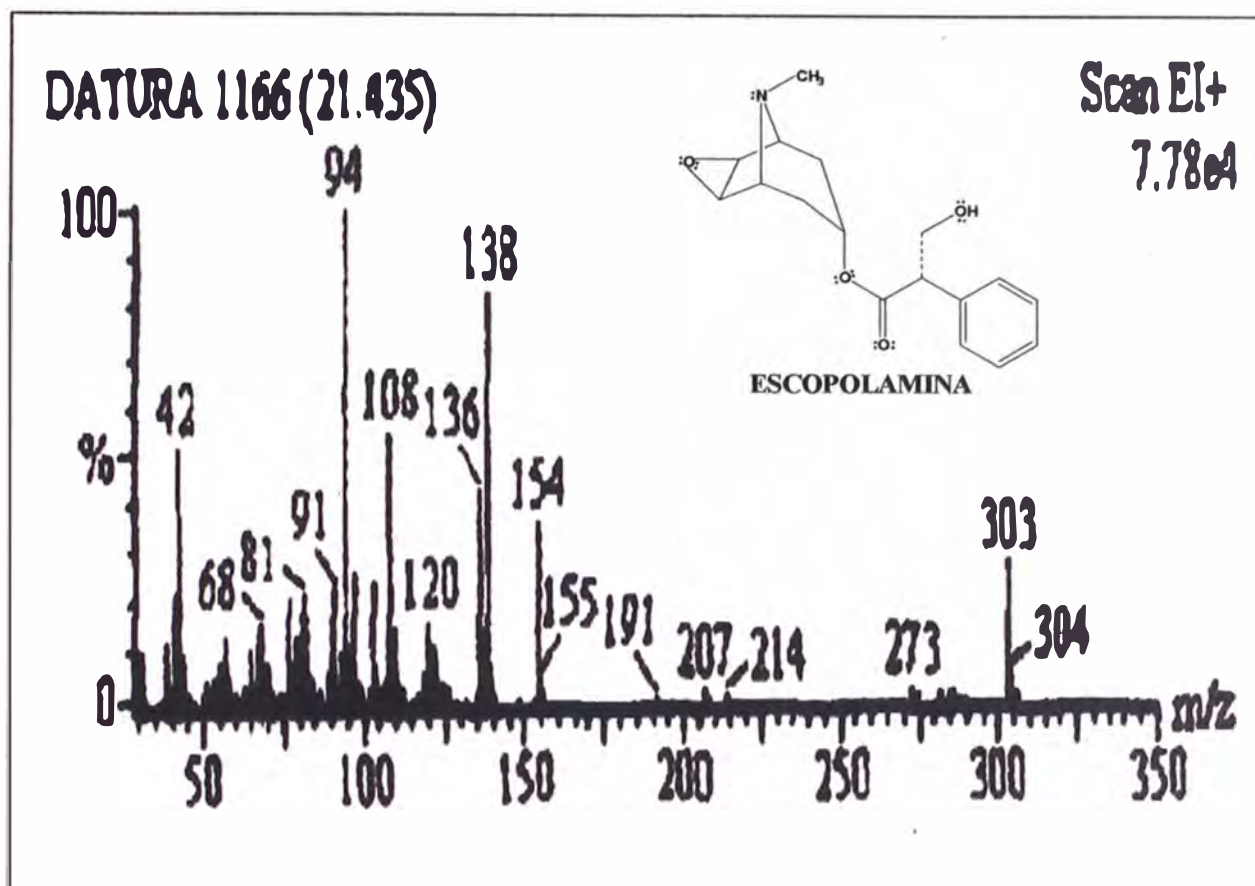


Figura N°2.- Espectro de masas de la escopolamina (Vitale et al.-1995)

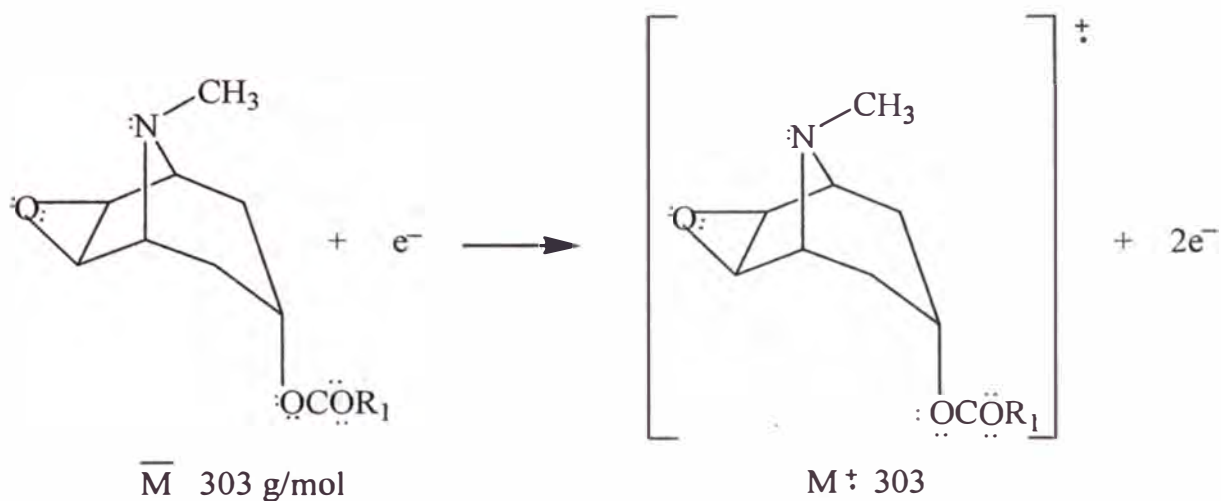
Asimismo, Whitte et al. (1987:194) proporcionan los valores de los principales iones (y su abundancia relativa) del espectro de masas de la escopolamina: 303 (28%), 154 (40%), 138 (64%), 137 (24%), 136 (33%), 108 (41%), 94 (100%).

Por su parte Muhtadi & Hassan (1990:494-497) proporcionan el espectro de masas y, además, los principales fragmentos y los iones que les corresponden, del bromuro de escopolamina. Esta información nos ayudó a describir las ecuaciones de fragmentación de los principales iones del espectro.

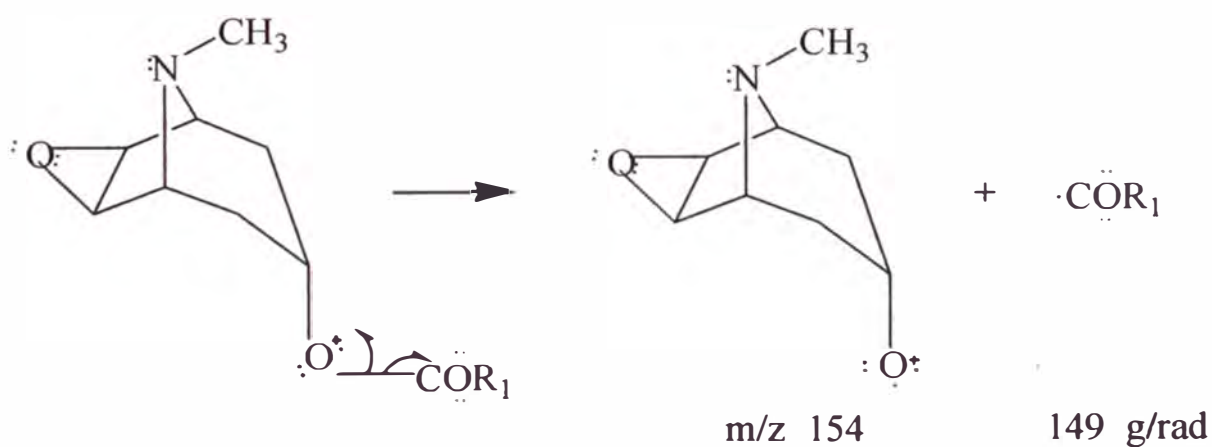
El espectro de masas obtenido del alcaloide puro, escopolamina, que hemos aislado de las hojas del toe (*D. sanguinea*) es similar a aquel publicado por Vitale et al. (1995) (ver Figura N°2).

A continuación, presentamos las ecuaciones de fragmentación de los principales picos del espectro de masas de la escopolamina presentados en la Figura N°2 .

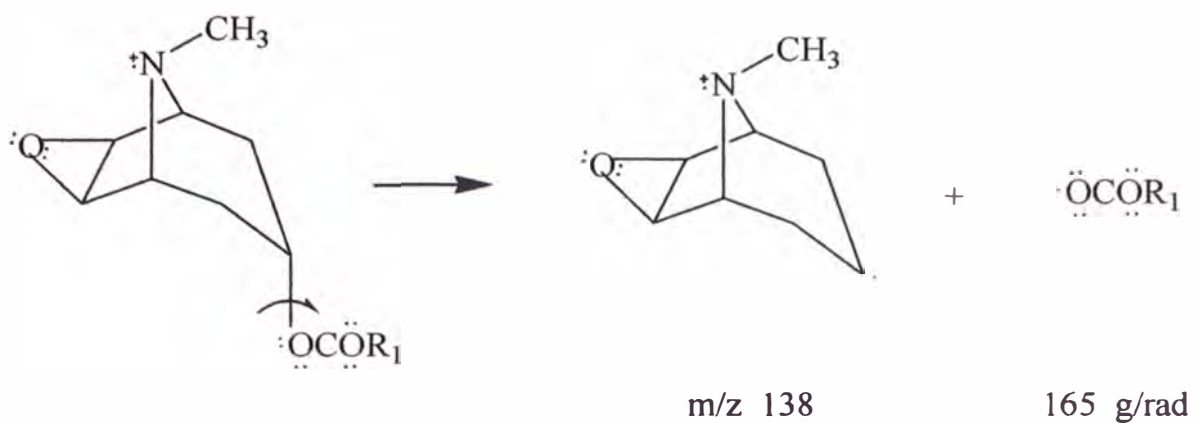
i M^+ 303



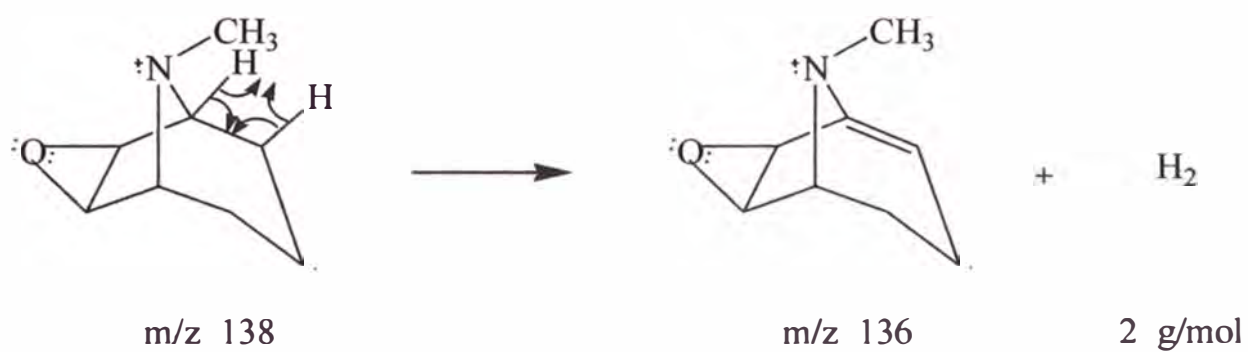
ii m/z 154 ($M^+ - \cdot\text{COR}_1$)



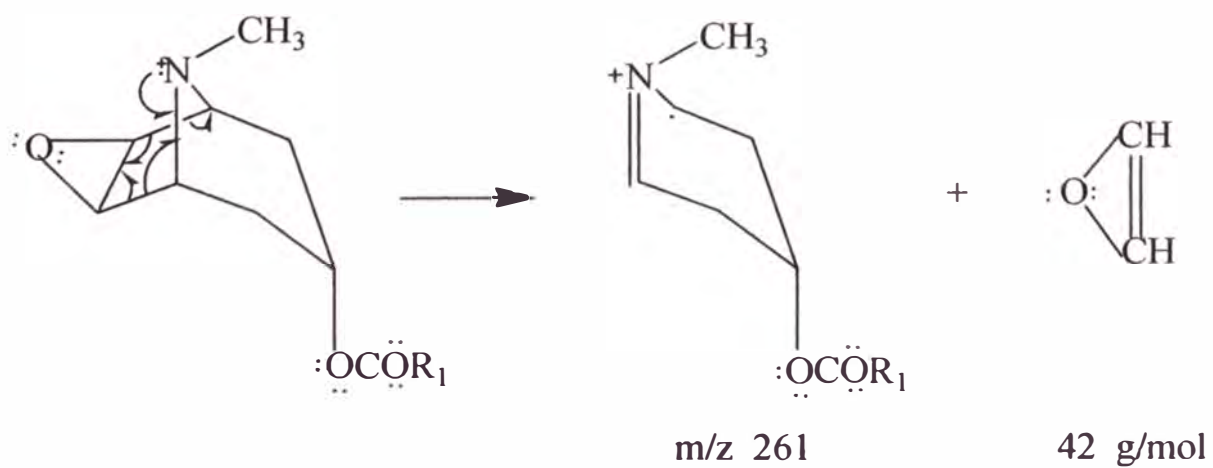
iii m/z 138 ($M^+ - \ddot{O}C\ddot{O}R_1$)

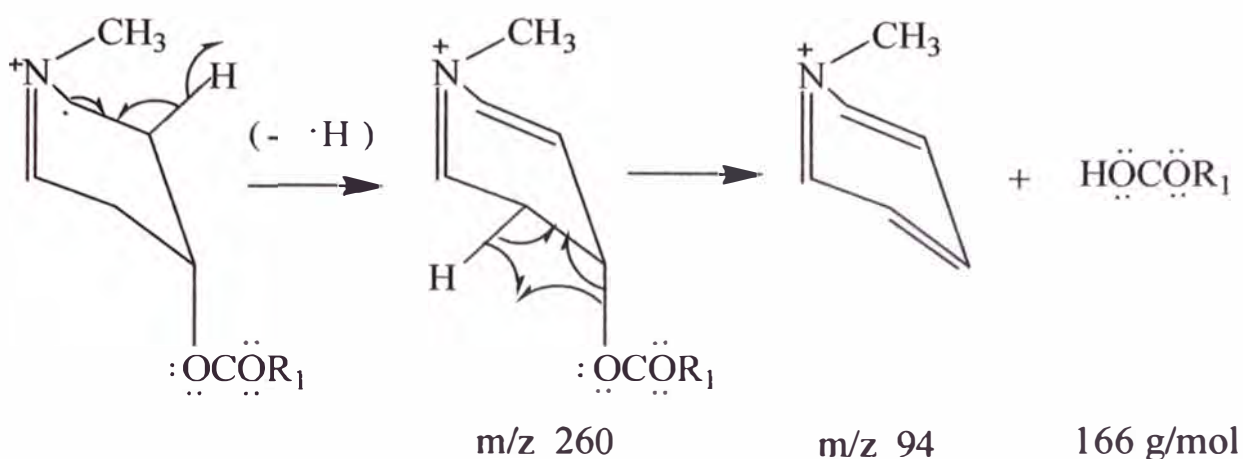


iv m/z 136 ($138 - H_2$)



v m/z 94





b) Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno, RMN¹H

Tal como es reconocido en la revisión realizada por Lounasmaa & Tamminen (1993) sobre alcaloides tropánicos, Sarazin et al. (1991) reportaron la asignación espectral por RMN¹H y RMN¹³C, completa e inequívoca, de la escopolamina (base libre) en CDCl₃.

Cada átomo del anillo de piperidina pudo ser diferenciada y se corrigieron algunas asignaciones precedentes.

Asimismo, en contraste con los resultados precedentes y la presunción general, Sazarin et al. (1991) demostraron que el grupo N-metilo está dispuesto ecuatorialmente en relación al anillo de piperidina.

La asignación de señales se realizó usando una combinación de técnicas de RMN de 1D y 2D y las medidas de las constantes de acoplamiento homo y heteronuclear.

En la Figura N°3 se ilustra la estructura de la escopolamina propuesta por Lounasmaa & Tamminen (1993), en donde se indica la numeración generalmente aceptada* de cada átomo de la molécula, y en la Tabla N°2 se presentan los desplazamientos químicos del espectro de RMN¹H de la escopolamina (base libre) en solución de CDCl₃, medidos a partir de la referencia interna de TMS.

* La numeración de la molécula generalmente aceptada es la indicada por Chazin & Colebrook (1986).

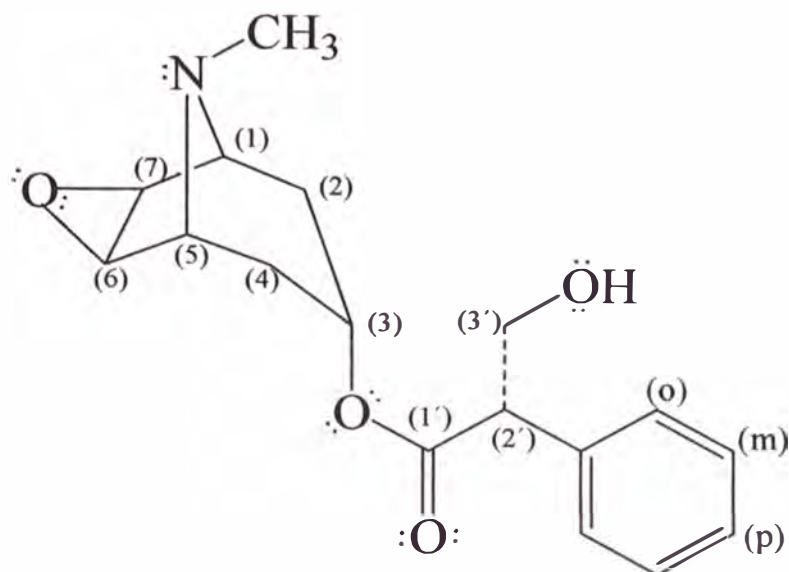


Figura N°3.- Estructura de la escopolamina propuesta por Lounasmaa & Tamminen (1993).

Además, en la Tabla N°2 se incluyen los desplazamientos químicos de todos los protones de la escopolamina (base libre) en CDCl_3 reportados por Chazin & Colebrook (1986), y por Robins et al. (1993).

Finalmente, en la Tabla N°2 incluimos los valores de los desplazamientos químicos obtenidos del espectro RMN^1H de la escopolamina que aislamos de las hojas del toe (*D. sanguinea*), en CDCl_3 , espectro que se ilustra en la Figura N°4.

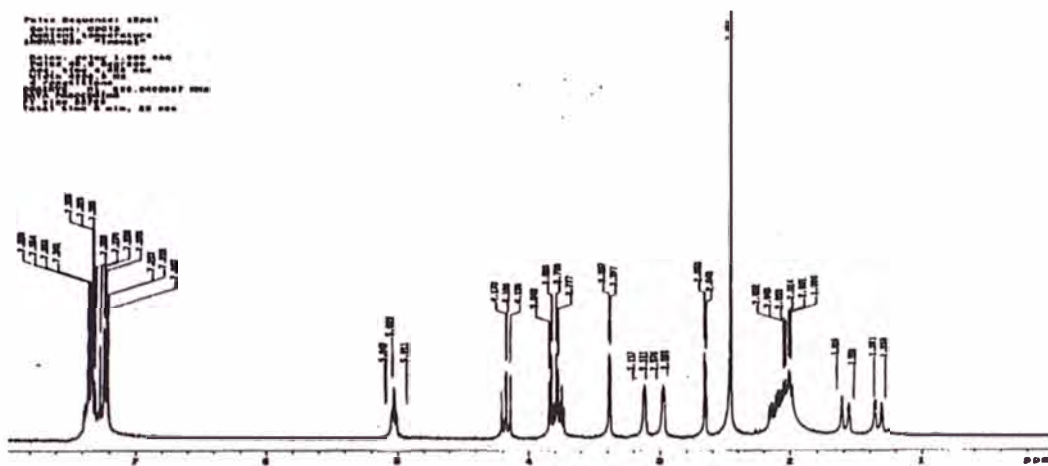


Figura N°4.- Espectro de RMN¹H de la escopolamina (300 MHz, CDCl₃)

A continuación presentamos el análisis de dicho espectro (Figura N°4), teniendo presente que la interpretación de un espectro de RMN¹H involucra principalmente la asignación de los desplazamientos químicos de cada átomo de hidrógeno de la molécula.

Tabla N°2

**DESPLAZAMIENTOS QUÍMICOS (δ , ppm) DE LOS ÁTOMOS DE
HIDRÓGENO DE LA ESCOPOLAMINA**

Tipo de Hidrógeno	Desplazamientos Químicos del Protón (δ , ppm)			
	Chazin & Colebrook (1986)	Sarazin et al. (1991)	Robins et al. (1993)	Tesis G. Muedas (2006)
H-1	2,97	2,94	2,88	2,97
H-2ax	2,02	1,99	2,01	2,00
H-2eq	1,33	1,31	1,49	1,34
H-3	5,02	4,98	4,92	5,03
H-4ax	2,11	2,08	1,93	2,05
H-4eq	1,58	1,55	1,25	1,58
H-5	3,11	3,08	3,00	3,11
H-6	3,38	3,37	3,31	3,38
H-7	2,66	2,70	2,66	2,65
H-2'	3,75	3,72	3,65	3,75
H-3'a	3,81	4,30	4,06	4,17
H-3'b	4,17	3,77	3,71	3,78
H-o	6,72	7,21	-	-
H-m	7,35	7,29	-	-
H-p	7,30	7,18	-	-
CH ₃ -N	2,45	2,42	2,36	2,46

Finalmente, en la Figura N°5, se ilustra la estructura de la escopolamina con los valores de los desplazamientos químicos de cada átomo de hidrógeno, según Sarazin et al.-1991.

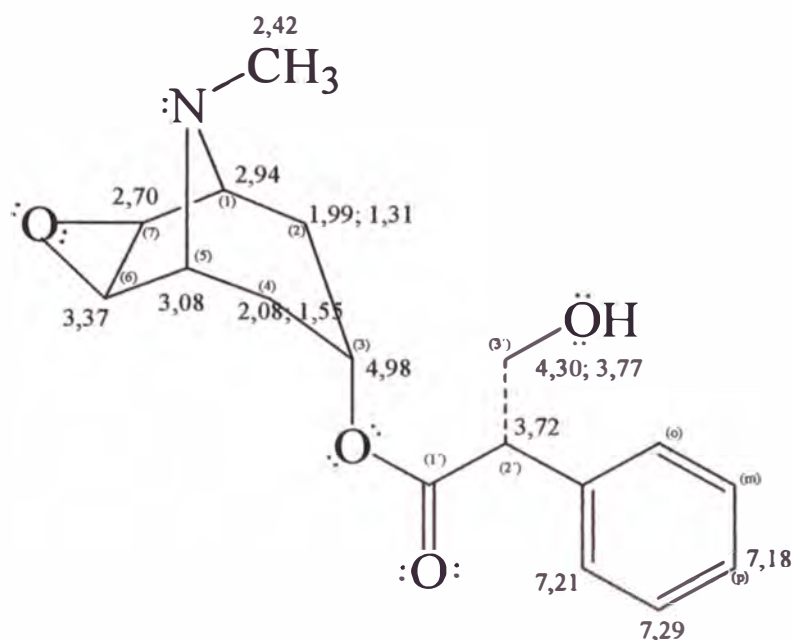


Figura N°5.- Estructura de la escopolamina con los valores de los desplazamientos químicos (δ , ppm) para los hidrógenos (Sarazin et al.-1991).

c) Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de Carbono, RMN¹³C

Como hemos referido en la sección b) precedente, Sarazin et al. (1991) realizaron la asignación espectral por RMN¹H y RMN¹³C, completa e inequívoca, de la escopolamina (base libre) en solución de cloroformo deuterado CDCl₃, proporcionando los valores de desplazamiento químico de cada uno de los átomos de carbono de la molécula, a partir del espectro de RMN¹³C completamente desacoplado, tal como se presenta en la Tabla N°3.

Tabla N°3
DESPLAZAMIENTOS QUÍMICOS (δ , ppm) DE LOS ÁTOMOS DE
CARBONO DE LA ESCOPOLAMINA

Número de átomo de carbono*	Sarazin et al. (1991) δ (ppm)	Tesis G. Muedas (2006) δ (ppm)
1	57,8	57,4
2	30,8	30,2
3	66,9	66,5
4	31,0	30,3
5	57,9	57,5
6	56,4	56,1
7	56,0	55,6
9	42,2	41,6
1'	171,8	171,6
2'	54,4	54,2
3'	64,0	63,6
ipso	135,8	135,6
o-C	128,1	127,8
m-C	129,0	128,7
p-C	127,9	127,7

A continuación reproducimos la interpretación propuesta por Sarazin et al. (1991):

- i La señal a 171,8 ppm claramente puede atribuirse al átomo de carbono de la función éster R-COO-R'.
- ii Las señales de los átomos de carbono del anillo aromático, C₆H₅-, están en el rango 125-140 ppm.
- iii El desplazamiento químico del átomo de carbono “para” ($\delta = 127,9$ ppm) se obtuvo por comparación de la intensidad de su señal en el espectro de RMN¹³C completamente desacoplado.
- iv La señal a 135,8 ppm fue atribuida inequívocamente al carbono “ipso” (enlazado al resto de la molécula) por medio del espectro de DEPT-RMN¹³C.

* Ver Figura N°7.

- v Las asignaciones del carbono “orto” y “meta” precedente, han sido reportados de manera posiblemente equivocada, y por lo tanto, usamos el espectro de RMN¹³C acoplado con ¹H para obtener los acoplamientos C-H de rango largo para estos carbonos aromáticos.
- vi Las señales a 129,0 ppm y 128,1 ppm, pueden por lo tanto ser inequívocamente atribuido a los carbonos “meta” y “orto”, respectivamente.
- vii En el espectro de RMN¹³C completamente desacoplado, diez señales fueron observados en la región debajo de 70 ppm, el cual indica que todos los carbonos del anillo tropano son magnéticamente no equivalentes. Esto es posible identificar a la señal del metilo a 42,2 ppm y las señales de los metilenos a 30,8; 31,0 y 64,0 ppm, mediante los experimentos DEPT.
- viii Para completar las asignaciones de RMN¹³C se necesita el uso de desplazamientos químicos homo y heteronuclear de los experimentos de correlación.
- ix El espectro de correlación heteronuclear con desplazamientos químicos de rango largo fue usado para asignar otros carbonos ,y más particularmente, para determinar a que lado del anillo tropano pertenecen estos carbonos, considerando un plano de simetría.
- x El carbono de la función éster R-COOR' y los carbonos “ipso” y “orto”del anillo fenilo, tienen un acoplamiento de rango largo con el mismo protón, el cual puede corresponder solamente a H-2' (3,72 ppm).
- xi La señal a campo alto (30,8 ppm), de las dos últimas señales de metilenos no indicados, es asignada a C-2 y la señal a 31,0 ppm para C-4.
- xii A partir del espectro de correlación heteronuclear, la resonancia del carbono a 57,8 ppm es asignado a C-1 y similarmente, el protón y

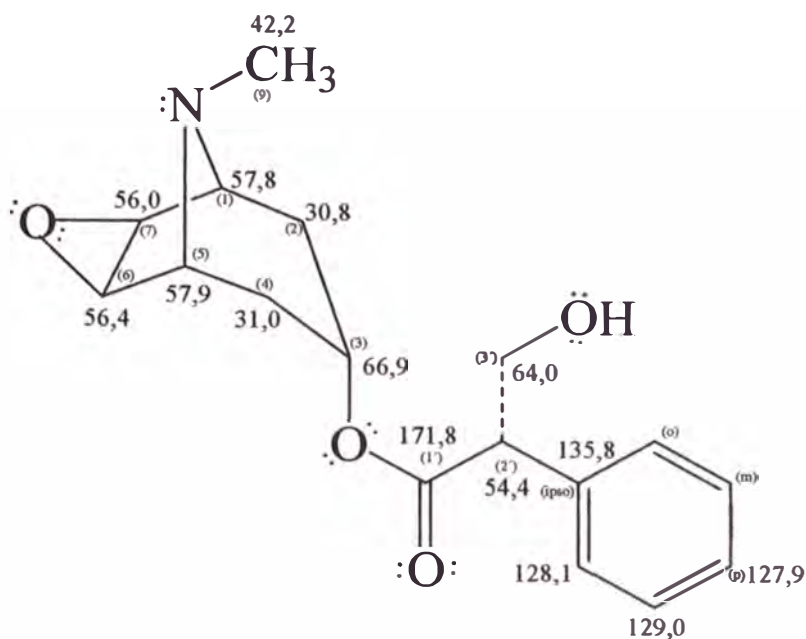


Figura N°7.- Estructura de la escopolamina con los valores de los desplazamientos químicos (δ , ppm) para los carbonos (Sarazin et al.-1991).

d) Espectro de Correlación Homonuclear, ^1H - ^1H COSY

Sazarin et al. (1991) proporcionan el espectro ^1H - ^1H COSY para la escopolamina, tal como se muestra en la Figura N°8.

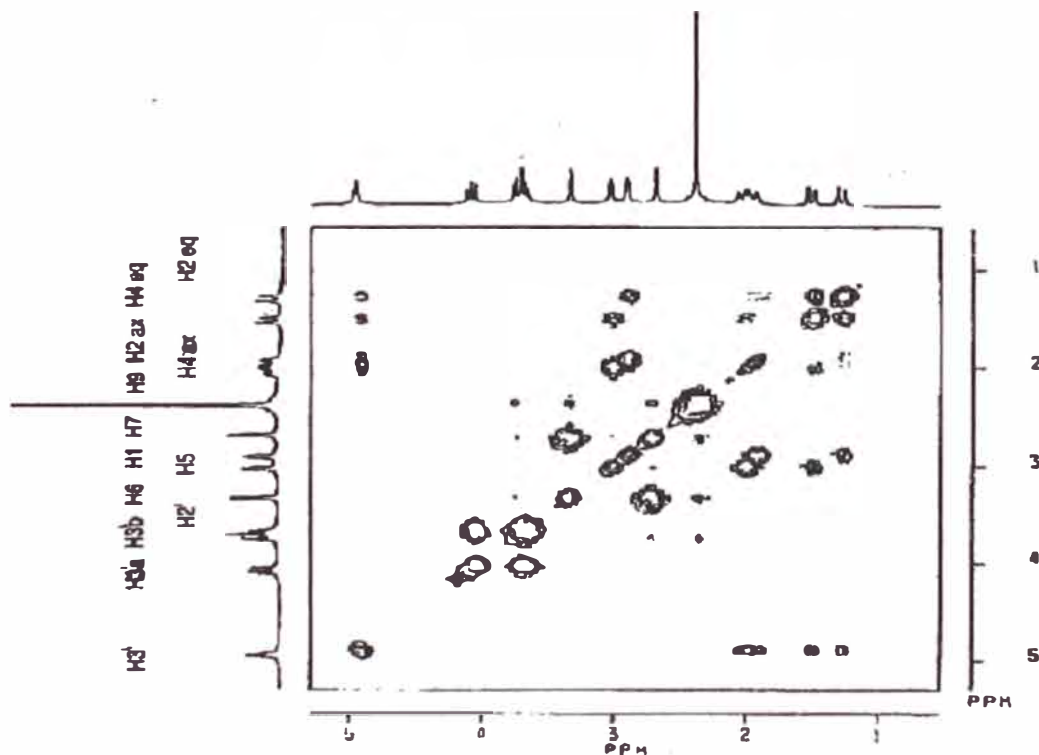


Figura N°8.- Espectro ^1H - ^1H COSY de la escopolamina en CDCl_3 (Sarazin et al.-1991)

En este espectro (Figura N°8) se observa las siguientes correlaciones ^1H - ^1H :

H (δ ppm)	Hidrógenos correlacionados (δ ppm; $J_{\text{H-H}}$ Hz)
H-2eq (1,31)	H-5 (3,08; 1,5), H-3 (4,98; 0,6), H-4eq (1,55; 1,4), H-2ax (1,99; -15)
H-4eq (1,55)	H-5 (3,08; 1,5), H-3 (4,98; 0,6), H-2eq (1,31; 1,4), H-4ax (2,08; -15)
H-2ax (1,99)	H-3 (4,98; 5,0), H-5 (3,08; 3,9)
H-4ax (2,08)	H-3 (4,98; 5,0), H-5 (3,08; 3,9)
H-7 (2,70)	H-6 (3,37; 3,0)
H-1 (2,94)	H-2ax (1,99; 3,9), H-2eq (1,31; 1,5)
H-5 (3,08)	H-4ax (2,08; 3,9), H-4eq (1,55; 1,5)
H-6 (3,37)	H-7 (2,70; 3,0)
H-2' (3,72)	H-3'a (4,3; 9,2), H-3'b (3,77; 5,7)
H-3'b (3,77)	H-2' (3,72; 5,7), H-3'a (4,30; -10)
H-3'a (4,30)	H-2' (3,72; 9,2)
H-3 (4,98)	H-4ax (2,08; 5,0), H-2eq (1,31; 0,6), H-4eq (1,55; 0,6)
H-p (7,18)	H-2ax (1,99; 5,0)

e) Espectro de Correlación Heteronuclear, ^1H - ^{13}C HETCOR

Sazarin et al. (1991) proporcionan el espectro ^1H - ^{13}C HETCOR para la escopolamina, tal como se muestra en la Figura N°9 y N°10.

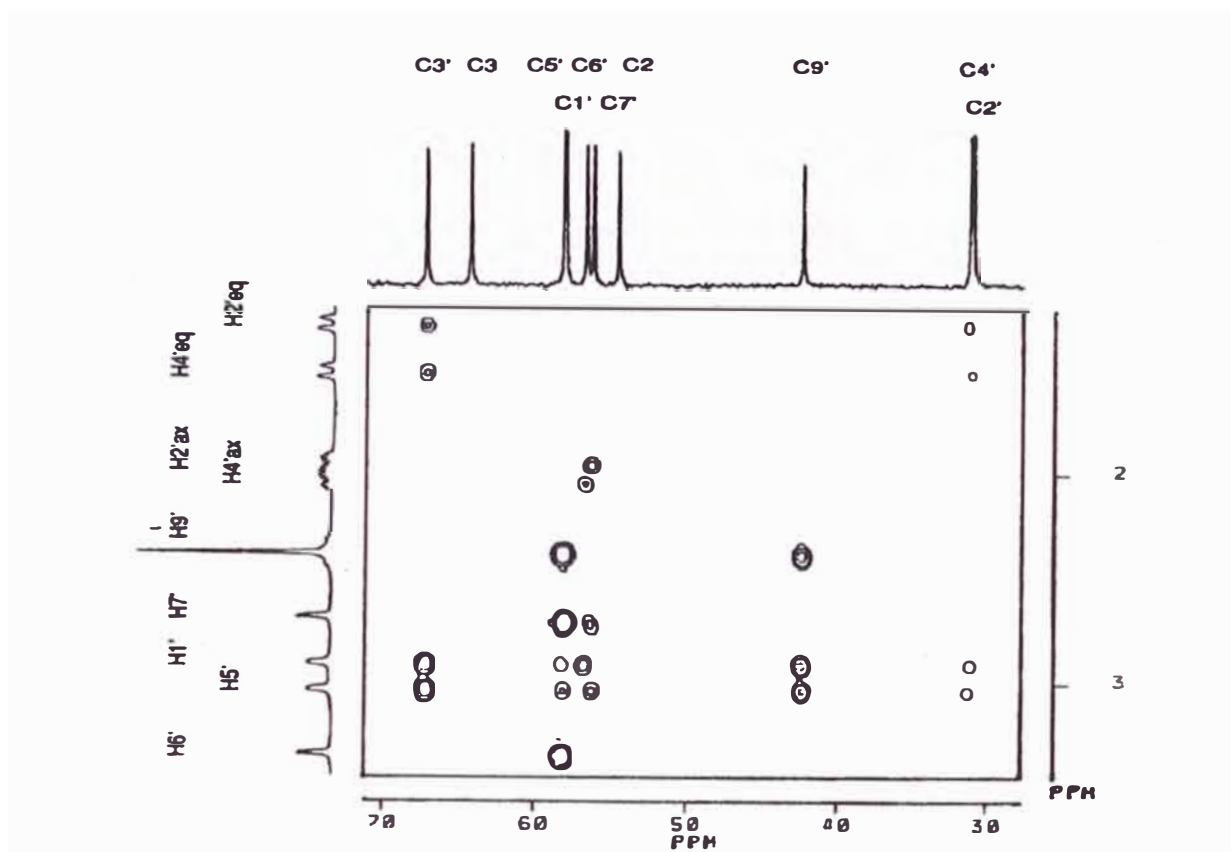


Figura N°9.- Espectro HETCOR de la escopolamina en CDCl_3 (Sarazin et al.-1991)

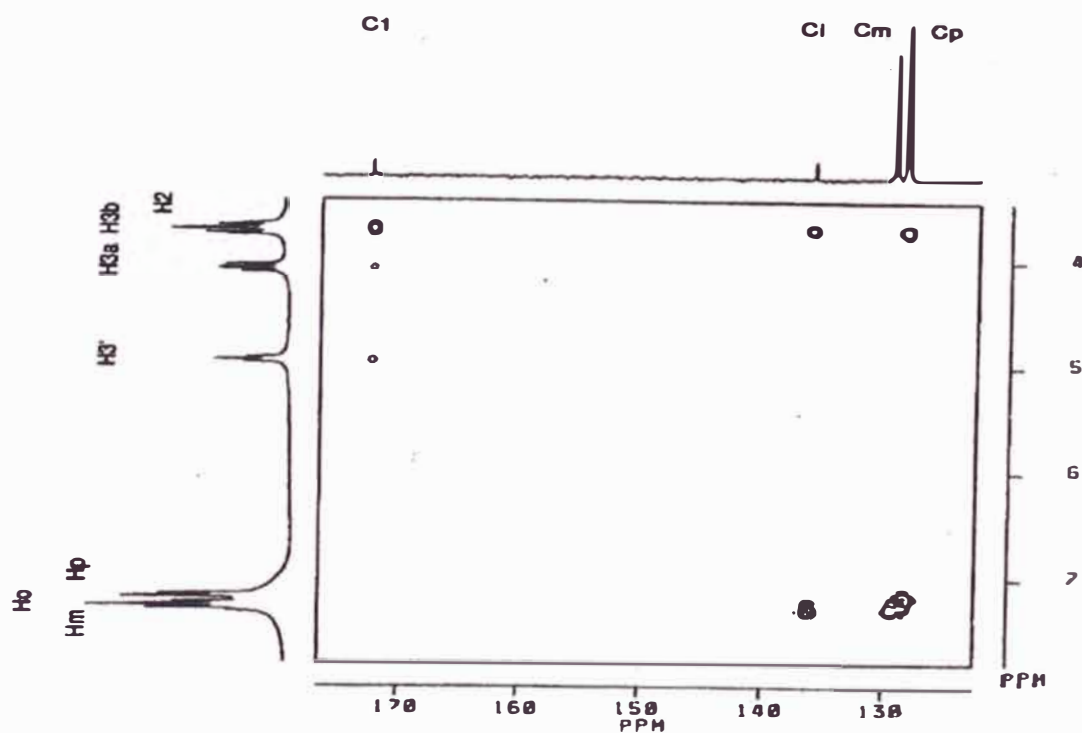


Figura N°10.- Espectro HETCOR de la escopolamina en CDCl_3 (Sarazin et al.-1991)

En este espectro (Figura N°9 y N°10) se observa las siguientes correlaciones ^{13}C - ^1H :

C (δ ppm)	Hidrógenos correlacionados (δ ppm; $^n\text{J}_{\text{C-H}}$ Hz)
C-2 (30,8)	H-1 (2,94; 1,2), H-4eq (1,55; 3,8)
C-4 (31,0)	H-5 (3,08; 1,2), H-2eq (1,31; 3,8)
C-9 (42,2)	H-1 (2,94; 3,0), H-5 (3,08; 3,0)
C-7 (56,0)	H-2ax (1,99; 7,0), H-5 (3,08; 7,0)
C-6 (56,4)	H-1 (2,94; 7,0), H-4ax (2,08; 7,0)
C-1 (57,8)	H-3 (4,98; 5,0), H-5 (3,08; 5,0), H-6 (3,37; 5,0)
C-5 (57,9)	H-3 (4,98; 5,0), H-1 (2,94; 5,0), H-7 (2,70; 5,0), H-9 (2,42; 5,0)
C-3' (64,0)	H-2' (3,72; -5,5), H-9 (2,42; 5,0)
C-3 (66,9)	H-4eq (1,55; -7,0), H-1 (2,94; 7,0), H-5 (3,08; 7,0)
p-C (127,9)	H-o (7,21; 7,0), H-2eq (1,31; -7,0)
o-C (128,1)	H-p (7,18; 6,5), H-o (7,21; 6,5)
m-C (129,0)	H-m (7,29; 7,5), H-2' (3,72; 6,5)
ipso (135,8)	H-3'b (3,77; 7,0), H-o (7,21; 2,0)
C-1' (171,8)	H-3 (4,98; 3,5), H-3'a (4,30; 3,5), H-3'b (3,77; 7,0), H-2' (3,72; 7,0), H-m (7,29; 7,0)

f) Espectro Ultravioleta, UV

En las referencias revisadas no hemos encontrado el espectro UV de la escopolamina como base libre.

Muhtadi & Hassan (1990) muestra el espectro ultravioleta (UV) para el bromuro de escopolamina en metanol (en el rango de 200-400 nm), en donde se indican los valores de máxima absorción y sus respectivas absortividades molares, tal como se muestra en la Figura N°11.

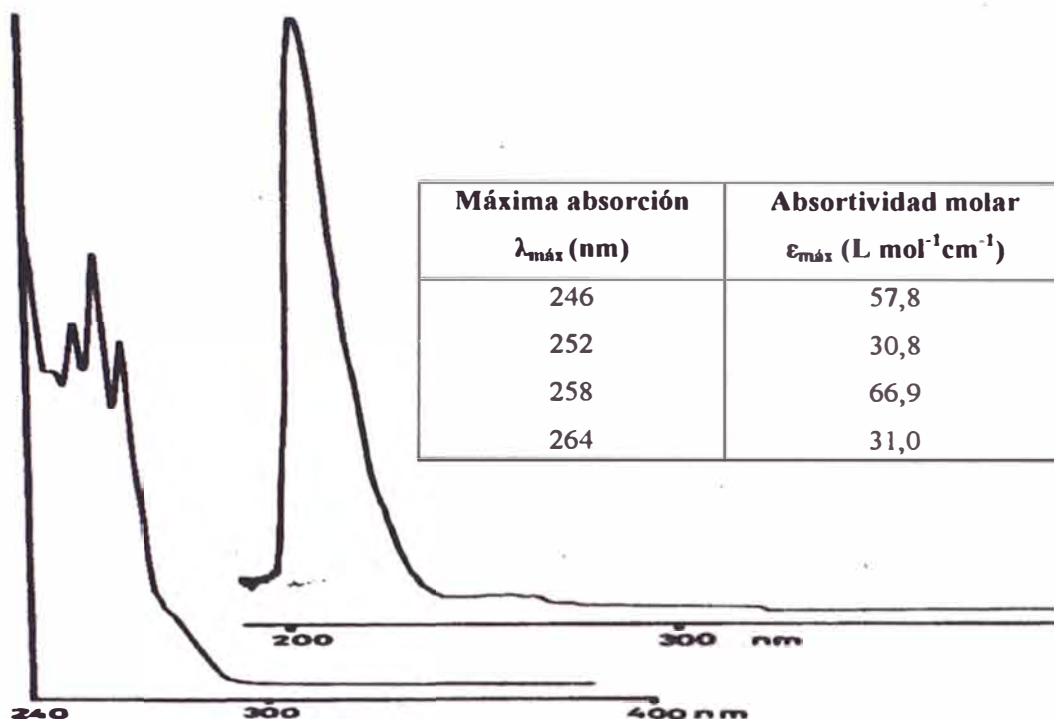


Figura N°11.- Espectro UV del bromuro escopolamina en metanol (Muhtadi & Hassan-1990)

g) Espectro Infrarrojo, IR

Tal como se mencionó en la sección precedente e), en las revisiones realizadas no se ha encontrado el espectro IR de la escopolamina como base libre.

Muhtadi & Hassan (1990) muestra el espectro infrarrojo (IR) para el bromuro de escopolamina con disco de KBr (1:200). En este espectro aparecen las bandas de absorción más características del compuesto, tal como se muestra en la Figura N°12.

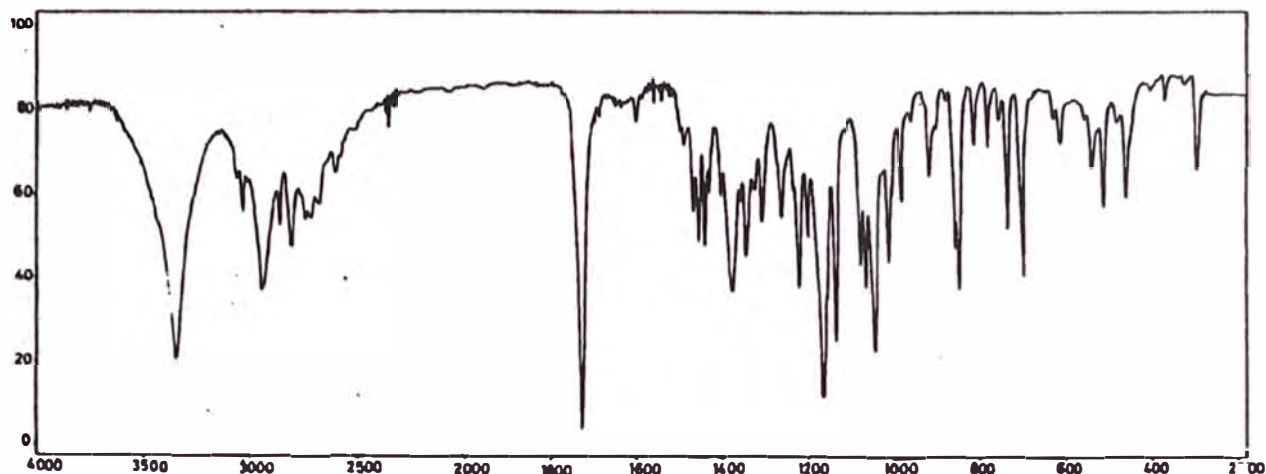


Figura N°12.- Espectro IR del bromuro escopolamina (KBr) (Muhtadi & Hassan-1990)

En la Tabla N°4 se indican las correlaciones de las frecuencias de absorción y los grupos funcionales presentes en el bromuro de escopolamina reportados por Muhtadi & Hassan (1990).

Tabla N°4

FRECUENCIAS DE ABSORCIÓN IR DEL BROMURO DE ESCOPOLAMINA

Frecuencia de absorción, ν^{-1} (cm⁻¹)	Muhtadi & Hassan -1990 Grupo funcional
3350 (s)	OH
2950	CH (estiramiento)
2810	N-CH ₃
1728 (s)	-COO- (éster)
1600	C=C (aromático)
1166 (s), 1045 (s)	C-O-C (éter)
780, 735, 700 (s)	5H (aromático monosustituido)

5. Biosíntesis de la escopolamina

Paralelamente al desarrollo de la química orgánica de síntesis, desde los primeros años del siglo XX, los científicos intentaron explicar la biosíntesis de los constituyentes químicos presentes en las plantas, presentando hipótesis relativas a la secuencia de transformaciones que experimentaba un determinado compuesto de partida (el precursor) hasta transformarse en el compuesto aislado de la planta (la denominada ruta biosintética), basándose únicamente en las posibles reacciones químicas que podría realizarse a partir del precursor.

Afortunadamente a inicios de los años 60, la síntesis de compuestos marcados (radiactivos), generalmente con el isótopo de carbono-14, ^{14}C , y con ello el empleo de precursores marcados, permitió hacer el seguimiento de las distintas transformaciones que experimentaba tal precursor hasta convertirse en el compuesto aislado de la planta. Así, la incorporación de precursores marcados se convirtió en la técnica de rutina en el estudio de la biosíntesis de alcaloides.

La biosíntesis de los alcaloides tropánicos y en particular de la escopolamina, considera a la ornitina (i) como el principal precursor (Humphrey & O'Hagan-2001 y Shimomura et al.-1995) (ver Figura N°13).

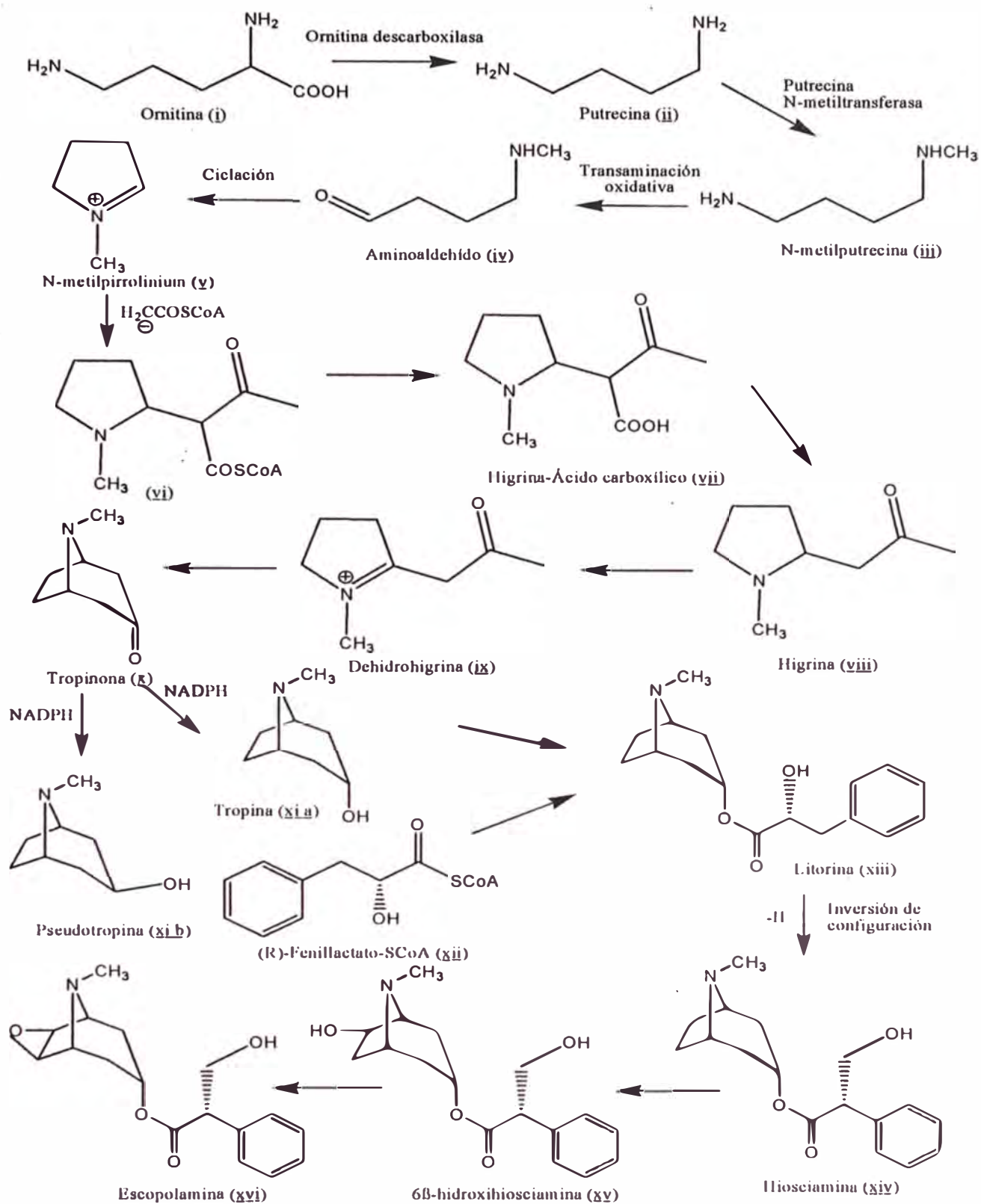


Figura N°13.- Biosíntesis de la escopolamina a partir de la ornitina (Humphrey & O'Hagan-2001 y Shimomura et al.-1995)

B. ESTUDIOS QUÍMICOS GENERALES

1. Análisis cualitativo (marcha fitoquímica)

Se han revisado tres procedimientos citados en la bibliografía:

- i. Reyna (1999-b), basado en Rondina & Coussio (1969) (Anexo N°2).
- ii. Lock (1994).
- iii. Miranda (2002).

Lock (1994) proporciona esquemáticamente tres procesos sin ofrecer los detalles experimentales respectivos, siendo el más amplio de ellos similar al procedimiento de Rondina & Coussio (1969).

Miranda (2002) sigue un procedimiento totalmente diferente, para llegar a los mismos resultados. Este procedimiento tiene dos desventajas: a) el uso de éter etílico, que es un solvente muy volátil y costoso, y debe usarse con mucha precaución por la posible presencia de peróxidos orgánicos, y b) la utilización de una mayor cantidad de muestra y de solventes, debido a que los extractos se obtienen por percolación*.

En esta tesis se ha seguido el procedimiento descrito por Reyna (1999-b), (ver Anexo N°2).

2. Test de alcaloides

Para la detección de alcaloides presentes en plantas o en sus extractos se utilizan diversos test (reacciones de precipitación y coloración), algunos de ellos se les consideran como generales y otros específicos. Se ha escogido dos de ellos: Mayer y Dragendorff, por ser pruebas generales para alcaloides, los cuales se describen en el Anexo N°3.

* Percolación.- Procedimiento mediante el cual se hace pasar el solvente a través de la muestra empacada en un recipiente adecuado, por acción de la gravedad (ver Pág. 37).

3. Análisis cuantitativo de alcaloides

Se revisó dos procedimientos referentes a la determinación cuantitativa de alcaloides en muestras vegetales: el método descrito en la 20th edición de la Farmacopea de los Estados Unidos (1980) y el propuesto por Pelt et al. (1967). A continuación describiremos ambos métodos, los cuales, para su mejor comprensión, presentamos subdividido en subtítulos (muestra utilizada, extracción sólido-líquido, separación líquido-líquido, eliminación de las bases volátiles residuales y determinación cuantitativa de los alcaloides).

a) Procedimiento de la 20th ed. U.S. Pharmacopoeia-USP (1980) “Análisis cuantitativo de alcaloides”

- Muestra utilizada

Muestra vegetal seca (a baja temperatura) y molida.

- Extracción sólido-líquido (Obtención del Extracto Bruto Orgánico, EBO)

Se contemplan tres métodos:

1.a Maceración.- Se deja macerar la muestra con el solvente o mezcla de solventes y se alcaliniza con amoníaco, durante 12 a 24 horas.

Se decanta el sólido y se separa del extracto.

1.b Percolación.- Se satura una cantidad exactamente pesada de muestra con el solvente o mezcla especificada en un recipiente.

Se deja reposar por 5 minutos y se alcaliniza con una solución de amoníaco $\text{NH}_3(\text{ac})$, mezclando luego completamente.

Se trasvasa a un percolador cilíndrico empacado con algodón y se deja macerar de 1 a 12 horas.

Se deja percolar lentamente con el solvente hasta que la muestra quede exenta de alcaloides (test de Valser).

1.c Extracción continua.- Se coloca la muestra pesada en un dedal de extracción y se lleva a un extractor soxhlet.

Se humedece la muestra con el solvente especificado y se alcaliniza con solución de amoníaco. Se dejar macerar de 6 a 12 horas.

Se extrae por un tiempo determinado o hasta extracción completa.

- Separación líquido–líquido (Obtención del Extracto Bruto de Alcaloides, EBA)
 - 11 Se extraen los alcaloides del solvente orgánico agitando con un ácido, luego se alcaliniza la solución, con un hidróxido alcalino, y se extrae con un solvente inmiscible.
 - 111 Se evapora la solución de alcaloides purificados con un baño de vapor o con corriente de aire, obteniéndose así el EBA.
- Determinación de los alcaloides
 - iv Se adiciona 1 mL de alcohol neutro o éter y una cantidad exactamente medida de ácido estandarizado (una y media o dos veces el volumen que se estima será consumido por los alcaloides) y se calienta ligeramente para asegurar la disolución total de los alcaloides.
 - v Se titula el exceso de ácido con una solución alcalina estandarizada usando como indicador rojo de metilo.

b) Procedimiento de Pelt et al. (1967). “Comparación de diversos métodos oficiales para la cuantificación de alcaloides de Solanáceas”.

- Muestra utilizada
Muestra vegetal seca y pulverizada
- Extracción sólido–líquido (Obtención del Extracto Bruto Orgánico, EBO)
 - 1 Alcalinización de la muestra con una solución de amoníaco concentrado $\text{NH}_3(\text{ac})$ 15 N.
 - 11 Maceración con una mezcla de solventes: etanol-cloroformo (1:2), etanol-éter etílico (1:2) ó éter etílico-cloroformo (3:1).
 - 111 Extracción de la muestra con éter etílico usando un soxhlet, verificando si la extracción es completa mediante el test de Mayer.

- iv Evaporación de los solventes orgánicos, obteniéndose así el EBO.
- Separación líquido–líquido (Obtención del Extracto Bruto de Alcaloides, EBA)
 - v Disolución del EBO con una mezcla de éter etílico-cloroformo y extracción de los alcaloides, como sales, mediante la adición de una solución acuosa de ácido sulfúrico $\text{H}_2\text{SO}_{4(\text{ac})}$ 0,5 N.
 - vi Alcalinización de la solución ácida con una solución de amoníaco concentrado $\text{NH}_{3(\text{ac})}$ 15 N, y extracción de los alcaloides como bases libres en una mezcla de éter-cloroformo.
 - vii Evaporación del solvente orgánico, obteniéndose así el EBA.
 - viii Eliminación de las bases volátiles residuales.
 - ix Disolución del EBA en cloroformo CHCl_3 .
 - x Evaporación del solvente en baño maría.
 - xi Repetición de la operación, de las etapas viii y ix, respectivamente.
- Determinación de los alcaloides
 - xii Disolución del EBA en cloroformo CHCl_3 .
 - xiii Adición de 50 mL de solución estandarizada de ácido sulfúrico $\text{H}_2\text{SO}_{4(\text{ac})}$ 0,02 N.
 - xiv Evaporación del solvente orgánico en baño maría.
 - xv Filtración y lavado del filtrado.
 - xvi Adición del indicador rojo de metilo.
 - xvii Titulación del exceso de ácido con una solución estandarizada de hidróxido de sodio $\text{NaOH}_{(\text{ac})}$ 0,02 N.

c) Procedimiento realizado en la tesis

En la presente tesis se ha seguido el método de Pelt et al. (1967), con ciertas modificaciones, siendo la principal la observación del punto final de la cuantificación de alcaloides mediante titulación potenciométrica.

En la Tabla N°5 se hace un resumen comparativo entre ambos procedimientos.

Tabla N°5

**COMPARACIÓN DEL MÉTODO DE ANÁLISIS CUANTITATIVO DE ALCALOIDES
DESCRITO POR PELT ET AL.-1967 Y TESIS G. MUEDAS-2006**

NATURALEZA DE LAS OPERACIONES		PELT ET AL. (1967)	TESIS G. MUEDAS (2006)
EXTRACCIÓN	PESO DE LA MUESTRA	10 g	50 g
	DESENGRASE	No se realiza.	n-hexano, con agitación.
	ALCALINIZACIÓN	Amoniaco concentrado (8 mL).	Amoniaco concentrado (90 mL).
	SOLVENTE	Alcohol 95°-cloroformo, 1:2 (30 mL) ó Etanol-éter, 1:2 (30 mL) ó Éter-cloroformo, 3:1 (150 mL).	Metanol-cloroformo, 1:1 (150 mL).
	FORMA DE EXTRACCIÓN	Maceración: 12 hrs, agitación, o una combinación de ambas.	Maceración 72 hrs.
	SEPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN EXTRACTORA	Extracción con Éter etílico en soxhlet.	Mezcla de metanol-cloroformo-acetato de etilo, 1:1:4 utilizando soxhlet.
	VERIFICACIÓN DE LA EXTRACCIÓN	Reactivo de Mayer.	Reactivo de Mayer.
SEPARACIÓN	PURIFICACIÓN Y ELIMINACIÓN DE PIGMENTOS Y OTRAS FRACCIONES SOLUBLES	<ul style="list-style-type: none"> • Evaporación del solvente. • Reemplazo del solvente con la mezcla de éter-cloroformo. • Paso de los alcaloides a una solución de ácido sulfúrico 0,5 N. • Basificación de la solución ácida con amoniaco acuoso y retorno de los alcaloides libres a una mezcla de éter-cloroformo. • Evaporación del solvente. 	<ul style="list-style-type: none"> • Evaporación del solvente. • Disolución del sólido con la mezcla metanol-cloroformo, 1:10. • Paso de los alcaloides a una solución de ácido sulfúrico 0,5 N. • Lavado de la solución ácida con cloroformo. • Basificación de la solución ácida con amoniaco acuoso y extracción de los alcaloides libres con cloroformo. • Evaporación del solvente.
	ELIMINACIÓN DE LAS BASES VOLATILES	<ul style="list-style-type: none"> • 15 minutos en baño maría hirviente. • Redisolución del residuo en cloroformo. • Evaporación a sequedad. • 15 minutos en baño maría hirviente. 	<ul style="list-style-type: none"> • Disolución del sólido en cloroformo. • Evaporación en el rotavapor (35°C, 450-50 mbar). • Repetición de la operación 4 veces.
	TITULACIÓN ÁCIDO-BASE	<ul style="list-style-type: none"> • Redisolución del residuo en cloroformo. • Adición de 20 mL de H₂SO₄ 0,02 N. • Evaporación del cloroformo en baño maría. • Filtración y lavado del filtrado. • Titulación del exceso de ácido con NaOH 0,02 N. 	<ul style="list-style-type: none"> • Redisolución del residuo en cloroformo. • Adición de 45 mL de H₂SO₄ 0,02 N. • Evaporación del cloroformo en el rotavapor. • Titulación del exceso de ácido con NaOH 0,02 N.
CUANTIFICACIÓN	OBSERVACIÓN DEL PUNTO FINAL	Rojo de metilo	Titulación potenciométrica

4. Aislamiento de alcaloides

En este acápite se presentan tres procedimientos para el aislamiento de alcaloides.

a) Procedimiento de Reyna & Torpoco (1993)

- Muestra utilizada

Hojas de Chacrana (*Psychotria viridis*), seca y molida.

- Extracción sólido-líquido (Obtención del Extracto Bruto Orgánico, EBO)

i Desengrase del material vegetal con éter de petróleo (50-90 °C).

ii Alcalinización con una solución acuosa de amoníaco $\text{NH}_3(\text{ac})$ 5%.

iii Extracción a reflujo con etanol.

iv Eliminación del solvente por destilación simple: se obtiene el EBO.

- Separación líquido-líquido (Obtención del Extracto Bruto de Alcaloides, EBA)

v Disolución del EBO con una solución de ácido sulfúrico $\text{H}_2\text{SO}_4(\text{ac})$ 2,0 N.

vi Lavado con solvente orgánico (cloruro de metileno, CH_2Cl_2), se descarta la fase orgánica.

vii Alcalinización del extracto acuoso con carbonato de sodio $\text{Na}_2\text{CO}_3(\text{ac})$ y extracción de los alcaloides libres con cloruro de metileno.

viii Concentración por destilación simple: se obtiene el EBA.

- Purificación e Identificación

ix El EBA se purifica mediante CPP* y CC*: Obtención del alcaloide N,N-Dimetiltriptamina puro.

x Identificación: Espectro de Masas y de RMN^1H del alcaloide.

- Resultados: Aislamiento e identificación de la N,N-Dimetiltriptamina de las hojas de chacruna (*Psychotria viridis*).

* CPP: Cromatografía en Placa Preparativa y CC: Cromatografía en Columna.

b) Procedimiento de Hoet & Ríos (1980)

- Muestra utilizada
Muestra de *Datura stramonium*, seca y molida
- Extracción sólido–líquido (Obtención del Extracto Bruto Orgánico, EBO)
 - i Alcalinización de la muestra vegetal con una solución acuosa de amoníaco $\text{NH}_3(\text{ac})$
 - ii Extracción en frío con una mezcla de solventes orgánicos de etanol-éter (20:40).
 - iii Extracción en un extractor soxhlet con éter, hasta que el resto sólido quede exento de alcaloides (test de Mayer negativo).
 - iv El extracto orgánico se concentra, con la finalidad de eliminar el solvente, obteniéndose así el EBO.
- Separación líquido–líquido (Obtención del Extracto Bruto de Alcaloides, EBA)
 - v Disolución del EBO con una mezcla orgánica de éter-cloroformo.
 - vi Extracción con ácido sulfúrico $\text{H}_2\text{SO}_4(\text{ac})$ 0,5 N (4x50 mL).
 - vii La fase acuosa ácida se alcaliniza (hasta pH 11) con una solución acuosa de amoníaco $\text{NH}_3(\text{ac})$.
 - viii Se extraen los alcaloides libres con solvente orgánico. Se descarta la fase acuosa.
 - ix Las fases orgánicas se reúnen, se secan con sulfato de sodio anhidro $\text{Na}_2\text{SO}_4(\text{s})$ y se concentra, obteniéndose así el EBA.

c) Procedimiento de Vitale et al. (1995)*

- Muestra utilizada
Semillas de *Datura ferox*, fresca y molida (5 g).
- Extracción sólido–líquido (Obtención del Extracto Bruto Orgánico, EBO)
 - 1 Extracción a temperatura ambiente con una mezcla de etanol- $\text{NH}_3(\text{ac})$ 28% (95:5; 20 mL), durante 12 h.

* Título del artículo: “Alkaloids of *Datura ferox* from Argentina” (Pág. 84: Extracción).

- ii El extracto orgánico se filtra y concentra a presión reducida, obteniéndose un residuo gomoso, el EBO.
- Separación líquido–líquido (Obtención del Extracto Bruto de Alcaloides, EBA)
 - iii Extracción con ácido clorhídrico $\text{HCl}_{(\text{ac})}$ 1,0 N (2x10 mL), y filtración.
 - iv La fase acuosa ácida se alcaliniza (hasta pH 9,8) con una solución acuosa de carbonato de sodio $\text{Na}_2\text{CO}_{3(\text{ac})}$ 0,7 M.
 - v Se extraen los alcaloides libres con cloruro de metileno CH_2Cl_2 (3x5 mL). Se descarta la fase acuosa.
 - vi Las fases orgánicas se reúnen, se secan con sulfato de sodio anhidro $\text{Na}_2\text{SO}_{4(\text{s})}$ y se concentra, obteniéndose así el EBA (28 mg; 0,56%).

Observación.- Hoet y Ríos (1980), al igual que Vitale et al. (1995), realizaron la determinación cuantitativa del total de alcaloides, y no se ocupan del aislamiento de cada alcaloide individual. Sin embargo, el procedimiento que emplean hasta la obtención del Extracto Bruto de Alcaloides (EBA), constituye uno de los procedimientos clásicos, por lo que presentamos en esta sección.

d) Comparación de Procedimientos

Los procedimientos de aislamiento de alcaloides presentados, siguen dos grandes etapas para la obtención del Extracto Bruto de Alcaloides, siendo éste el procedimiento experimental realizado en nuestra tesis. Este esquema de trabajo se resume a continuación.

- Extracción sólido–líquido (Obtención del Extracto Bruto Orgánico, EBO)
 - 1 Desengrase con solventes orgánicos

Esta etapa tiene como objetivo remover los lípidos y pigmentos coloreados que contiene la planta, para obtener extractos exentos de sustancias que dificulten la purificación ulterior del alcaloide.

5. Identificación espectroscópica de compuestos orgánicos (Reyna, 2005)

Actualmente está plenamente establecido que las cinco técnicas espectroscópicas, a saber, la Espectrometría de Masas (EM), la espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno (RMN¹H) y de Carbono (RMN¹³C), la espectroscopía de Infrarrojo (IR) y la espectroscopía Ultravioleta (UV), son las herramientas principales para la determinación de la estructura de los compuestos orgánicos.

La amplitud de cada método puede definirse como la cantidad de información útil obtenible de ella, lo cual es función no solamente de la cantidad total de información sino también de su interpretabilidad. Y esto varía de problema a problema, y cada método tiene sus aficionados; sin embargo, podemos afirmar que la utilidad disminuye en el orden:

$$\text{RMN } (^1\text{H y } ^{13}\text{C}) > \text{EM} \gg \text{IR} > \text{UV}$$

Los fundamentos técnicos necesarios para comprender cada método varía de acuerdo a la naturaleza del experimento, sin embargo, la cantidad básica (mínima) de teoría disminuye en el orden.

$$\text{RMN} \gg \text{EM} > \text{IR} \sim \text{UV}$$

a) Espectrometría de Masas, EM

En un espectrómetro de masas, las moléculas que se encuentran en un estado gaseoso y a baja presión son bombardeadas con un haz de electrones de alta energía (70 eV ó 1600 Kcal/mol), y uno de los efectos que este bombardeo produce es desprender uno de los electrones de la molécula y producir un ión de carga positiva (con un número impar de electrones, un catión radical) al que se denomina “ión molecular” y se lo representa por M^{\pm}

Además el haz de electrones imparte a los iones moleculares un excedente muy grande de energía, que es muy superior a lo que se requiere para romper los enlaces covalentes de las moléculas (50 a 100 Kcal/mol), y así poco después que se forman los iones moleculares la mayoría de ellos se “fragmentan” en diversas formas, que dependen de la naturaleza del ión molecular específico.

En seguida, el espectrómetro de masas separa la mezcla de iones resultante de acuerdo a su relación de masa/carga, m/z , y se registra la abundancia relativa de cada fragmento iónico. El espectrómetro presenta estos resultados en una gráfica donde aparece las intensidades de los fragmentos iónicos positivos respecto a m/z (esto es, respecto a su masa, puesto que la carga de los iones es unitaria); obteniéndose así el espectro de masas.

A la señal (o pico) más intensa en el espectro, denominada “pico base” se le asigna un valor de 100%, y las intensidades de los otros picos, incluyendo el del ión molecular, son reportados como porcentaje del pico base.

La espectrometría de masas tiene dos aplicaciones importantes en el estudio de compuestos orgánicos:

- 1 La determinación de la masa molecular del compuesto analizado, en la cual su precisión es superior a cualquier otro método; y
- 11 La deducción de la estructura del compuesto a partir del análisis cuidadoso de los diversos fragmentos que constituyen el espectro de masas.

Actualmente, la espectrometría de masas-EM se utiliza en el análisis de mezclas de compuestos orgánicos, a condición de separar previamente los compuestos de la mezcla. Los acoplamientos en línea, de equipos acoplados de cromatografía de gases-CG/EM y de

cromatografía líquida-HPLC/EM constituyen una de las principales técnicas para analizar mezclas.

b) Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno, RMN¹H

Se conoce como resonancia magnética nuclear RMN al proceso de absorción de energía que experimenta el núcleo de un elemento, en este caso el hidrógeno, cuando se le coloca en un campo magnético fuerte y simultáneamente se lo irradia con energía electromagnética.

Esta absorción de energía, al igual que todos los procesos que se llevan a cabo a escala atómica y molecular, está cuantizada: La absorción de energía sólo se verifica cuando la fuerza de campo magnético y la frecuencia de radiación electromagnética (sobre un núcleo de hidrógeno particular) tienen valores específicos.

Los instrumentos conocidos como espectrómetros de RMN permiten medir la absorción de energía en los núcleos de hidrógeno (de un compuesto orgánico). Estos instrumentos están diseñados de manera que irradian al compuesto con energía electromagnética de frecuencia constante (60, 80, 200, 500 u 800 MHz) mientras se varía la fuerza del campo magnético. Cuando este campo magnético alcanza la fuerza correcta, los núcleos de hidrógeno absorben energía (y se produce la “resonancia”): esta absorción es registrada por el instrumento como una señal (un pico o una serie de picos) sobre una hoja de papel calibrado.

El espectro de RMN constituye la gráfica de la frecuencia de los picos de absorción (expresado en unidades de δ , en partes por millón–ppm) en función de las intensidades de tales señales.

La interpretación de un espectro de RMN involucra el análisis de las tres principales características que presentan estos espectros:

- 1 Los “desplazamientos químicos”, esto es la posición y número de señales diferentes que aparecen en el espectro: proporciona información sobre los diferentes tipos de hidrógeno en la molécula y el entorno químico de cada tipo de protón;
- 11 la intensidad de cada señal, registrada experimentalmente por el equipo de RMN como una “integración”: nos indica el número de hidrógenos que corresponde a cada señal;
- 111 el “acoplamiento spin-spin”, esto es la interacción entre hidrógenos vecinos, que se presenta en el espectro como divisiones de cada señal: nos indica el número de hidrógenos vecinos que tiene el protón que origina la señal.

Un espectro de RMN se considera plenamente identificado cuando a cada una de las señales que aparecen en el espectro se le puede asignar uno o un grupo de hidrógenos de la molécula en estudio. Esto es, a cada hidrógeno, o grupo de hidrógenos equivalentes, de la molécula debe corresponder una señal en el espectro que satisfaga los requerimientos de desplazamiento químico, integración e interacción spin-spin correspondientes.

Sin embargo, el “modus operandi” del químico orgánico al interpretar un espectro de RMN es identificar sólo aquellas señales donde puedan deducirse fácilmente los acoplamientos spin-spin y, por lo general, no está interesado en encontrar soluciones precisas a sistemas complejos.

c) Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear de Carbono, RMN¹³C

La RMN¹³C se ha convertido en la técnica principal para dilucidar la estructura de compuestos orgánicos. Mientras la RMN¹H nos permite

identificar los protones enlazados a la estructura de la molécula, la RMN¹³C nos permite identificar los átomos de carbono; por ello, la RMN¹³C es un complemento perfecto de la RMN¹H para dilucidar la estructura completa de un compuesto.

Igual que en el isótopo de hidrógeno ¹H, el núcleo del isótopo de carbono-13, ¹³C, tiene un número de espín I=1/2, que permite utilizarlo ya que dará una señal en espectroscopía de RMN, y por ello, los principios físicos de la RMN¹³C son los mismos que los de la RMN¹H. Sin embargo, se presenta una diferencia. En la RMN¹H se estudia al isótopo natural más común del hidrógeno, ¹H, cuya abundancia es del 99,98% del total de hidrógenos. Por el contrario, en la RMN¹³C se estudia al isótopo de carbono menos abundante, al ¹³C, que constituye el 1,1% del elemento carbono, lo que genera menor sensibilidad. Esta deficiencia deviene en una ventaja, en razón de que no se observan desdoblamientos del tipo ¹³C-¹³C en los espectros de RMN¹³C, a pesar que dichos núcleos vecinos pueden desdoblar sus señales entre sí, pero las probabilidades que se encuentren dos núcleos de ¹³C resultan muy escasas.

Una desventaja de la baja abundancia isotópica del ¹³C es que se hace necesario utilizar técnicas especiales que hacen que en el espectro las áreas de los picos no sean proporcionales al número real de carbonos en la molécula. Por ello, la integración de la señal no se practica en la RMN¹³C.

Otra desventaja es que debe utilizarse una cantidad de muestra mayor (aproximadamente 20 mg) que la requerida para obtener un espectro de RMN¹H (aproximadamente 4 mg).

Al igual que la RMN¹H, la RMN¹³C proporciona información del entorno electrónico en el que se encuentra cada átomo de carbono en la molécula. Los desplazamientos químicos en la RMN¹³C son más o

menos paralelos a los de la RMN¹H. El compuesto de referencia, tetrametilsilano, (CH₃)₄Si, TMS, absorbe a campo alto, mientras que los átomos de carbono aldehídico y carboxílico lo hacen a campos más bajos.

Los desplazamientos químicos en la RMN¹³C son mucho mayores que los observados en la RMN¹H, extendiéndose la zona de absorción en el rango de 0 a 250 ppm (δ) hacia campo bajo de la señal del TMS. Esto hace que los espectros de RMN¹³C sean más sencillos que los de hidrógeno, ya que en un espectro de ¹³C es poco probable que se observen señales sobrepuestas.

Existen dos clases de espectros de RMN¹³C: en uno se observa los acoplamiento spin-spin ¹³C–¹H (espectro acoplado a ¹H), y en el otro no (espectro desacoplado a ¹H).

En el **espectro de RMN¹³C desacoplado a ¹H de banda ancha**, el núcleo de ¹³C no está acoplado con los del ¹H y, por lo tanto, no muestra acoplamiento spin-spin. El desacoplamiento se hace electrónicamente irradiando la muestra con una segunda radiofrecuencia. Dado que no hay desdoblamiento de señales, la señal de cada grupo de átomos de carbono magnéticamente equivalentes aparece como un <singulete>. Este tipo de espectro permite determinar, de una manera sencilla, el número de átomos de carbono diferentes en la molécula, que corresponde al número de señales que aparecen en el espectro.

En los **espectros de RMN¹³C acoplado a ¹H** no se suprime el acoplamiento ¹³C–¹H y, en este caso, la señal de cada carbono se desdobra por acción de los protones directamente enlazados a él, aplicándose también la regla “n + 1” donde n es el número de átomos de hidrógeno enlazados al átomo de carbono que se analiza. Así, un carbono cuaternario (enlazado a cuatro grupos alquílicos y sin H

enlazado a él) presenta una señal singulete; un carbono terciario (que sólo tiene 1 H enlazado) presenta un doblete; un carbono secundario (que tiene 2 H) presenta un triplete y un carbono primario (un grupo metilo, CH₃) presentará un cuadruplete.

Espectros de RMN con transferencia por polarización. Espectros de RMN¹³C-DEPT. Uno de los métodos con secuencias de pulsos (45°, 90° y 135°) de uso rutinario en la investigación de laboratorio es, por ejemplo, la RMN¹³C-DEPT (en inglés, “Distortionless Enhancement by Polarization Transfer”, es decir, transferencia por polarización aumentada y no distorsionada).

Este tipo de espectro permite distinguir el tipo de carbono CH₃, CH₂, CH o C_{cuaternario}, al que pertenece una determinada señal. En particular, es especialmente útil para superar la confusión de un espectro de RMN¹³C acoplado a ¹H en el que se superponen las señales multipletes próximas. El experimento DEPT consta de tres espectros: un primer espectro registrado con pulsos de 45° (DEPT-45) en el que aparecen señales de CH, CH₂ y CH₃; un segundo espectro registrado con pulsos de 90° (DEPT-90) que solo muestra las señales de los carbonos unidos a un solo hidrógeno (CH); y por último un tercer espectro registrado con pulsos de 135° (DEPT-135) en el que aparecen señales positivas para CH y CH₃, absorciones negativas para CH₂, y en el que los carbonos cuaternarios carecen de señal.

El espectro de RMN¹³C-DEPT obtenido para el compuesto escopolamina se presenta en la parte experimental de esta tesis (pág. 89).

d) Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear Bidimensional

Existen diversos experimentos de resonancia magnética nuclear de dos dimensiones, y entre los más utilizados se encuentran los experimentos de RMN bidimensional homonuclear COSY*, y de RMN bidimensional heteronuclear HETCOR** y HMBC***.

Los experimentos bidimensionales, **COSY**, **HETCOR** y **HMBC**, muestran dos ejes de coordenadas, los cuales están representados por desplazamientos químicos (δ , en ppm).

Espectros ^1H - ^1H COSY

En los espectros ^1H - ^1H COSY se pueden observar la correlación de pares de núcleos de hidrógeno por medio del acoplamiento spin-spin, a través de un diagrama de entorno. En este diagrama, el espectro de hidrógeno aparece a lo largo de la diagonal, como manchas contorneadas, las cuales representan la intensidad de los picos. Fuera de la diagonal se observan otras manchas contorneadas, las cuales son el resultado de la correlación de pares de núcleos por medio del acoplamiento spin-spin.

En principio este tipo de espectros abarcan a los acoplamientos intensos (geminales y vecinales).

Hay que notar que en los espectros ^1H - ^1H COSY, se muestran manchas contorneadas de menor intensidad con respecto a las examinadas. Estas manchas se deben a que también se pueden detectar a veces interacciones entre núcleos enlazados a larga distancia (tres y hasta cuatro enlaces).

* COSY : Correlated Spectroscopy (Espectroscopía de Correlación).

** HETCOR : Heteronuclear Correlation Spectroscopy (Espectroscopía de Correlación Heteronuclear).

*** HMBC : Heteronuclear Multiple Bond Correlation (Correlación Heteronuclear de Enlace Múltiple).

En nuestra tesis hemos obtenido este tipo de espectro para la escopolamina (pág. 92).

Espectros ^1H - ^{13}C HETCOR

En los espectros ^1H - ^{13}C HETCOR, se correlacionan los picos del espectro de ^1H con los picos del espectro de ^{13}C . El espectro de ^1H es presentado en el eje axial vertical y el espectro de ^{13}C de banda ancha desacoplado está presente en el eje horizontal. La correlación de ^1H - ^{13}C se representa por un diagrama de entorno, al igual que los espectros de ^1H - ^1H COSY.

El arreglo bidimensional obtenido en este experimento permite asociar las señales del protón con las del carbono, de tal manera que fácilmente se identifica los protones enlazados a los carbonos de la molécula.

En nuestra tesis hemos obtenido este tipo de espectro para la escopolamina (pág. 94).

Espectros HMBC

El espectro HMBC es muy sensitivo para la determinación de la conectividad* ^1H - ^{13}C a larga distancia (dos y tres enlaces), y de esta manera se puede solucionar completamente los problemas que se presenta con los otros experimentos bidimensionales, ya que brinda una información completa.

Este espectro, presenta algunas diferencias respecto al espectro HETCOR: en el eje axial vertical, se presenta el espectro de ^{13}C y en el eje horizontal, el espectro ^1H .

Su mayor aplicación incluye las asignaciones de resonancias de núcleos de carbonos y nitrógenos no protonados y la correlación de

* Conectividad.- Acoplamiento entre núcleos separados a dos o más enlaces.

rango amplio de carbonos protonados que están separados por carbonos no protonados y otros heteronucleos.

e) Espectroscopía de Infrarrojo, IR

El espectro de infrarrojo de un compuesto es una representación gráfica de la longitud de onda λ ó del número de onda ν^{-1} , en el rango de radiación infrarroja (4000 a 200 cm^{-1}), en relación a la transmitancia (%T) o absorbancia (A) que presenta la muestra.

En la bibliografía se encuentran espectros IR lineales en número de onda ν^{-1} (cm^{-1}), y en longitud de onda λ (μm); y es importante tener presente –para propósitos de comparación entre espectros– que un espectro lineal en número de onda ν^{-1} (cm^{-1}) tiene una apariencia muy diferente de aquel que es lineal en longitud de onda λ (μm).

A diferencia de los espectros de masas y de RMN, los espectros IR aún de moléculas muy simples pueden ser extremadamente complejos. Sin embargo, el químico orgánico toma ventaja de esta complejidad cuando compara el espectro de un compuesto desconocido con aquel de una muestra de referencia: la correlación de las bandas de absorción de ambos espectros es una excelente evidencia de identidad. **No es posible que dos compuestos cualesquiera, excepto los enantiómeros ópticos, tengan el mismo espectro de IR.**

A pesar de esta complejidad y del hecho que el espectro IR es característico de toda la molécula, ciertos grupos de átomos (los grupos funcionales) originan bandas a, o cerca de, la misma frecuencia sin importar la estructura del resto de la molécula, lo que permite al químico obtener útil información estructural acerca de los grupos funcionales presentes (por ejemplo: el grupo oxhidrilo OH, el grupo carbonilo C=O, etc.) mediante simple inspección del espectro y la referencia a las tablas de frecuencias de tales grupos.

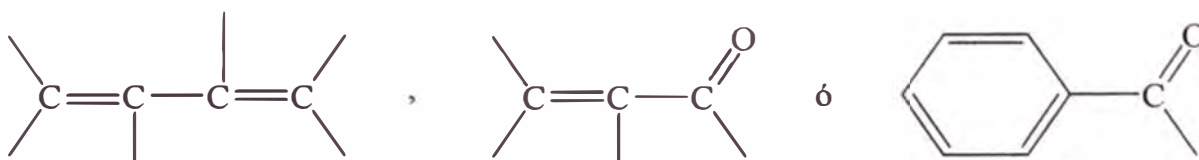
Dado al hecho que contamos con los espectros de Masa y de RMN para la identificación de un compuesto orgánico, en la práctica no se realiza un análisis detallado del espectro de IR, limitándose a la identificación de grupos funcionales.

f) Espectroscopía de Ultravioleta, UV

El espectro de UV de un compuesto es una representación gráfica de la longitud de onda λ de absorción, en el rango de la radiación ultravioleta cercano (200 a 400 nm), en relación a la intensidad de absorción (expresada como absorbancia $A \times 100$; ó absortividad molar $\text{Log } \epsilon$). El espectro UV consiste en una banda ancha de absorción extendida sobre un amplio rango de longitudes de onda, cuyas características principales son su posición y su intensidad.

La posición de la absorción UV se especifica como $\lambda_{\text{máx}}$ (nm), es decir la longitud de onda del punto máximo de la curva de absorción, la cual corresponde a la longitud de onda de la radiación cuya energía es la requerida para que se produzca una transición electrónica.

Los espectros de UV proporcionan menor información acerca de la estructura de los compuestos, que aquella proporcionada por los espectros de masas y de RMN, y se aplica principalmente y prácticamente de manera exclusiva al estudio de sistemas conjugados, tales como:



III. PARTE EXPERIMENTAL

PRESENTACIÓN

La composición química de una planta varía cualitativa y cuantitativamente, en función del órgano de la planta; por lo que deben estudiarse separadamente las hojas, los tallos (o la corteza), las semillas, las flores, etc.

Así, en nuestro laboratorio se emprendió el estudio químico del toe (*Datura sanguinea*), planta colectada en la provincia de Huancabamba (Dpto. Piura, a 2000-3000 msnm), habiéndose concluido una tesis sobre el “Estudio Químico de las semillas del toe, *Brugmansia sanguinea*” (Cóndor-2004).

Simultáneamente, inicié durante el Per. Acad. 2000-I, el estudio químico de las hojas de esta planta realizando el Estudio Fitoquímico de las hojas del toe (*B. sanguinea*) como tema del curso CQ 561-Proyecto de Tesis I, continuando con el Análisis Cuantitativo de alcaloides de sus hojas como tema del curso CQ 562-Proyecto de Tesis II, durante el Per. Acad. 2000-II.

Posteriormente, este tema de investigación fue inscrito como tema de Tesis de Licenciatura en Ciencias-Mención Química, con N° de Registro 208 de fecha 22 de enero del 2003 (que actualizó el Registro N° 173, de fecha 05.06.2001).

Consideramos importante indicar que las etapas experimentales de laboratorio químico, desde el secado de la planta hasta la obtención del extracto de alcaloides, se realizaron en el ambiente de Investigación de Química de Productos Naturales (C3-175) del Laboratorio N°12 de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Ingeniería, en el periodo comprendido entre junio del 2001 y abril del 2005.

Asimismo, durante este periodo realizamos varios ensayos de purificación de estos extractos, mediante cromatografía en columna, sin lograr la obtención del alcaloide puro.

La obtención de la escopolamina pura, el principal alcaloide contenido en las hojas del *toe*, se logró en dos etapas: primero se realizó una purificación parcial mediante cromatografía en columna, y luego se logró la purificación final mediante cromatografía en placa preparativa.

La identificación del alcaloide se realizó mediante el análisis de sus espectros de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno (RMN¹H) y de Carbono (RMN¹³C) y, además, mediante sus espectros ¹H-¹H COSY y ¹H-¹³C HETCOR.

Consideramos pertinente reconocer que los procedimientos modernos de purificación e identificación de alcaloides involucran el uso de equipos acoplados de separación cromatográfica e identificación espectroscópica, como la cromatografía de gases-espectrometría de masas CG-EM, procedimientos que pudimos experimentar durante la etapa final de esta tesis, que realizamos en los Laboratorios del Instituto de Química de la Universidad de São Paulo (São Paulo-Brasil).

Sin embargo, en nuestro laboratorio no contamos con estos equipos, en razón de su alto precio de venta, así como a su elevado costo de mantenimiento y puesta en operación. Por ello, en nuestro trabajo luego de obtener el Extracto Bruto de Alcaloides, hemos hecho aplicación de los procedimientos convencionales, como la cromatografía en columna, pero sin lograr la purificación deseada.

METODOLOGÍA DE INVESTIGACIÓN PARA EL ESTUDIO QUÍMICO (ALCALOIDES) DE PLANTAS MEDICINALES*

Para realizar sus investigaciones los químicos orgánicos de plantas medicinales han establecido una metodología general que involucra las siguientes etapas, agrupadas en dos partes principales:

Trabajo Preliminar

1. Selección y colección de la planta
2. Estudio Etnobotánico y Etnomedicinal de la planta
3. Determinación sistemática (identificación botánica)
4. Estudio bibliográfico

Trabajo experimental en el laboratorio (alcaloides)

Secado y molienda de la planta

5. Análisis cualitativo (marcha fitoquímica)
6. Análisis cuantitativo de alcaloides
7. Aislamiento de compuestos puros
 - a) Extracción sólido-líquido de la planta: Extracto Bruto Orgánico
 - b) Separación líquido-líquido: Extracto Bruto de Alcaloides
 - c) Purificación: Aislamiento de cada alcaloide puro
(Cromatografía/recristalización/preparación de derivados)
8. Identificación del compuesto puro
 - a) Proced. Clásicos: punto de fusión, composición centesimal, CCF
 - b) Proced. Espectroscópicos: Masas, RMN¹H, RMN¹³C

Por consiguiente, la presente Tesis de Licenciatura involucró la realización de cada una de estas etapas, tal como pasamos a describir a continuación.

* Víctor Reyna P., Libro de resúmenes del Primer Curso Nacional de Plantas Medicinales y Fitoterapia-Fito 2001, Instituto de Fitoterapia Americano, Lima, 06-12. Ago.2001, Pág. 26.

TRABAJO PRELIMINAR

A. SELECCIÓN Y COLECCIÓN DE LA PLANTA

Las hojas del toe (*Datura sanguinea*) se colectaron en dos zonas de la provincia de Huancabamba (Dpto. de Piura):

- i. en el centro poblado de Salalá (3000 msnm), ubicado en el distrito de El Carmen de la Frontera y en tres oportunidades diferentes: el 21 de julio de 1988, el 26 de julio de 1999 y el 01 de agosto del 2000 (17 h), y
- ii. en el camino* del centro poblado de Tulum hacia la laguna Pico de Loro, ubicado en el distrito de Sapalache, el miércoles 01 de agosto del 2001 (15h45-16h30),

durante los viajes que realizaron los integrantes del Grupo de Investigación de Química de Productos Naturales, bajo la dirección del Dr. Víctor Reyna Pinedo, habiendo participado, el autor de esta tesis, en el viaje del año 2001.

La *Datura sanguinea* (toe, o misha toro) crece en diversas zonas de la provincia de Huancabamba, en donde se ubican importantes lagunas utilizadas por los curanderos del norte peruano para sus tratamientos etnomedicinales.

B. ESTUDIO ETNOBOTÁNICO Y ETNOMEDICINAL. El uso del toe (*D. sanguinea*) en medicina tradicional.

En nuestro país existen y se utilizan varias plantas con constituyentes psicoactivos. Las más conocidas son la coca (*Erithroxylum sp.*); el binomio "ayahuasca" (*Banisteriopsis caapi*) y "chacrana" (*Psychotria viridis*), utilizadas en la preparación de la

* Coordenadas S 05° 04' 49,9" / W 079° 24' 44,1" (2685 msnm).

bebida "ayahuasca" en toda la amazonía; y el "San Pedro" (*Echinopsis pachanoi*), utilizadas por los curanderos del norte del Perú.

El uso de plantas del género *Datura* está menos difundido, en particular en sus efectos psicoactivos, estando su uso restringido en algunas partes de la amazonía y en la costa-sierra norte del Perú (Lambayeque y Piura), pero con especies diferentes para cada región: *D. arborea*, *D. aurea* y *D. sanguinea* en las alturas andinas; *D. suaveolens* y *D. versicolor* en las quebradas y valles de la costa; *D. candida* y *D. insignis*, en la amazonía (Cabieses-1993).

En el norte peruano al género *Datura* se le conoce como "mishas". Así, *Datura sanguinea* es la "misha toro", también conocida como toe.

Polia (1996) reporta el uso adivinatorio de flores y hojas del toe maceradas en vino blanco, lo que se absorbe por la nariz (singar). También indica que se obtienen estos efectos colocándose dos hojas en la frente y en la nuca, en la noche antes de acostarse.

En los puestos de plantas medicinales del Mercado Modelo de la ciudad de Chiclayo se venden atados de flores y hojas del toe (*D. sanguinea*) (Foto N°1), y se indica* que se utilizan para hacer <limpias> y colocar en forma de emplasto en la parte afectada del paciente. Esta información nos ha sido proporcionado también en la provincia de Huancabamba. Es decir, el uso del toe se da en aplicación externa y sin fines psicoactivos.

Schultes & Raffauf (1990) señalan que se aplica un emplasto de las flores del toe para el tratamiento del reumatismo, las hojas se colocan sobre infecciones agudas y una infusión de las hojas puede aplicarse como un baño para el tratamiento de infecciones.

* Comunicación personal del Sr. Elmer C. N., Presidente de la Asociación de Vendedores de Plantas Medicinales del Mercado Modelo de Chiclayo, al Dr. Víctor Reyna P., asesor de esta tesis.

C. DETERMINACIÓN (IDENTIFICACIÓN) BOTÁNICA

Las hojas del toe (Foto N°2), fueron identificadas como *Datura sanguinea* (R. & P.) D. Don, por la M.Sc. Blga. Joaquina Albán Castillo* (ver certificado adjunto en Anexo N°4).

D. ESTUDIO BIBLIOGRÁFICO

Las investigaciones precedentes que realizó nuestro Grupo de Investigación sobre plantas psicoactivas nos proporcionaron los textos generales en donde se describe al género *Datura* (y *Brugmansia*), y a partir de ello disponer de las referencias bibliográficas relativas a esta planta.

Estas referencias se obtuvieron de la Biblioteca del Departamento de Ciencias de la Pontificia Universidad Católica del Perú (Leary-1970 y Evans, Major & Pe Than-1965), así como de Bibliotecas de universidades extranjeras, gracias a la colaboración de ex-alumnas que se encuentran en el exterior, en particular de la M.Sc. Ingrit Collantes Díaz**. Adicionalmente, con ocasión de la estadia de investigación que la Lic. Elena Córdor C., Jefe de Prácticas de nuestra Facultad, realizó en el Instituto de Química de la Universidad de São Paulo (São Paulo-Brasil) en el mes de agosto del 2003, se completó la recopilación de referencias, en particular aquellas referidas al análisis espectroscópico de la estructura de la escopolamina.

Asimismo, en Dic'03 el Dr. Christian Marazano, Director de Investigaciones del ICSN-CNRS*** de Gif Sur Yvette, nos envió la revisión del Chemical Abstracts del género *Datura* desde el año 1992 al

* Jefa del Departamento de Etnobotánica y Botánica Económica del Museo de Historia Natural y Profesora Asociada de la Facultad de Ciencias Biológica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (Lima-Perú).

** Actualmente está realizando estudios de doctorado en la Universidad de São Paulo (São Paulo-Brasil).

*** Institute de Chimie des Substances Naturelles del Centro Nationale de la Recherche Scientifique (de Gif Sur-Yvette, Francia).

2003, la cual contenía 31 títulos de referencias, todas ellas sin interés para nuestro trabajo de tesis.



Foto N°1.- Atado de hoja y flores del toe (*D. anguinea* (R. & P.) D. Don.);
Mdo. Modelo, Chiclayo, Dpto. Lambayeque, Nov'04 (Foto V. Reyna)



Foto N°2.- Arbusto del toe (*D. anguinea* (R. & P.) D. Don.); Sapalache,
Huancabamba, Dpto. Piura, Ago'01 (Foto V. Reyna)

TRABAJO EXPERIMENTAL EN EL LABORATORIO

E. SECADO Y MOLIENDA DE LA PLANTA

Las hojas del toe se secaron en una estufa “Labor” (Hungria) a 40 °C, durante cinco días, disponiéndose al inicio de nuestro trabajo de suficiente material seco.

Esta muestra seca se pulverizó a grano fino en un molino doméstico “Moulinex” (750 W).

F. ANÁLISIS CUALITATIVO (MARCHA FITOQUÍMICA)

1. Muestra: 6 g de hojas del toe (*D. sanguinea*). Se realizaron dos análisis, con resultados similares:

i Primer análisis: 18 May–26 Jun’00. Alumno Golfer Muedas T., Curso CQ 561-Proyecto de Tesis I, Per. Acad. 2000-I (muestra colectada en Salalá-Piura, 21 Jul’88).

ii Segundo análisis: 23–25 Jul’01. Bach. Golfer Muedas T. y Lic. Tania Sánchez R. (muestra colectada en Salalá-Piura, 01 Ago’00).

2. Procedimiento: Reyna (1999-b), de acuerdo a Rondina & Coussio (1969) (ver Anexo N°2).

3. Resultados (ver Anexo N°5)

Las dos muestras analizadas nos dieron resultados similares, los cuales se detallan en el Anexo N°5 y se resumen a continuación:

a) Contiene: Aminogrupos primarios y/o secundarios (++), grupos fenólicos libres (+), alcaloides (+++), triterpenos y esteroides (+), catequinas (+) y saponinas (+).

Convención: Abundante (+++), regular (++) , poco (+).

b) No contiene: Flavonoides, taninos, quinonas y leucoantocianidinas.

G. ANÁLISIS CUANTITATIVO DE ALCALOIDES

1. **Muestra:** 50 g de hojas del toe (*D. sanguinea*). Se realizaron dos análisis de la misma muestra (colectada en Sapalache-Piura, 01 Ago'01)

i Primer análisis: 21 Ene–01 Ago'03.

ii Segundo análisis: 21 Ene–04 Ago'03.

2. **Procedimiento** (descripción del primer análisis)

Observación.- Las etapas (a) y (b), extracción sólido–líquido y separación líquido–líquido, respectivamente, son similares a aquellas correspondientes a la Sec. III.H. (Aislamiento de la escopolamina, ver págs. 70-80), por lo que en esta sección se resumirán ambas etapas.

a) **Extracción sólido–líquido: Obtención del Extracto Bruto Orgánico**

i Desengrase del material vegetal, seco y molido, con n-hexano.

Cincuenta gramos (50 g) de muestra, se colocó en un frasco erlenmeyer de 1 L y se adicionó 300 mL de n-hexano. Se agitó* durante 4 horas y luego se decantó la solución orgánica. Al sólido recuperado se le adicionó una nueva porción de 300 mL de n-hexano y se repitió la extracción. Este proceso se realizó once veces más. Finalmente, la muestra sólida se dejó secar a temperatura ambiente.

ii Alcalinización con amoníaco concentrado $\text{NH}_3(\text{ac})$ 15 N.

La muestra desengrasada y seca, se colocó en un cartucho de tocuyo y se humedeció con 90 mL de amoníaco concentrado $\text{NH}_3(\text{ac})$ 15 N, durante un día.

iii Extracción por solventes (Obtención del Extracto Bruto Orgánico)

- A la muestra alcalinizada (que se encontraba dentro del cartucho y colocada en el equipo soxhlet) se adicionó 150 mL de una mezcla

* Para la agitación se utilizó un agitador magnético eléctrico con eje flexible y paleta de vidrio, modelo MLW (Ex-República Democrática Alemana).

de metanol-cloroformo (1:1) y se dejó macerar, a temperatura ambiente, durante 3 días.

- Luego se adicionó a la mezcla anterior 350 mL de acetato de etilo y se extrajo en soxhlet durante 8 horas/día, por 9 días.
- La mezcla orgánica se concentró en el rotavapor (40 °C, 400-50 mbar), sin llegar a sequedad, obteniéndose así el Extracto Bruto Orgánico (que no se pesó debido a la continuación del proceso).

b) Separación líquido-líquido: Obtención del Extracto Bruto de Alcaloides

i Disolución del Extracto Bruto Orgánico con solución ácida.

- El extracto bruto orgánico se disolvió con 55 mL de cloroformo-etanol (10:1) y se colocó en un embudo de separación de 250 mL.
- El extracto orgánico se extrajo con 50 mL de disolución de ácido sulfúrico $\text{H}_2\text{SO}_4_{(\text{ac})}$ 0,5 N.
- Esta operación se repitió ocho veces más, hasta que el solvente orgánico dio prueba negativa de alcaloides mediante el test de Mayer.

ii Alcalinización del extracto acuoso con disolución de amoníaco.

El extracto acuoso ácido se alcalinizó con 60 mL de amoníaco concentrado $\text{NH}_3_{(\text{ac})}$ 15 N. La disolución final presenta un $\text{pH} = 9$.

iii Extracción de alcaloides con solventes orgánicos (Obtención del Extracto Bruto de Alcaloides).

- El extracto acuoso se extrajo con 100 mL de cloroformo en un embudo de separación de 1 L.
- Esta operación se realizó un total de 8 veces (hasta que la solución acuosa presentó test de Mayer negativo). Se eliminó la fase acuosa libre de alcaloides.

- Los extractos orgánicos se secaron con sulfato de sodio anhidro y, previa filtración, se colocó en un balón de 500 mL y se concentró en el rotavapor (40 °C, 400-50 mbar) hasta sequedad.

c) Eliminación de las bases volátiles

- 1 El sólido obtenido se disolvió con 50 mL de cloroformo y se llevó a concentrar al rotavapor, para eliminar el solvente. Se repitió esta operación un total de 4 veces. Este proceso tuvo por objeto la eliminación total de la base amoníaco NH_3 (g).
- 11 Finalmente, se llevó a sequedad en el rotavapor, obteniéndose así el Extracto Bruto de Alcaloides (EBA.1 = 344 mg).

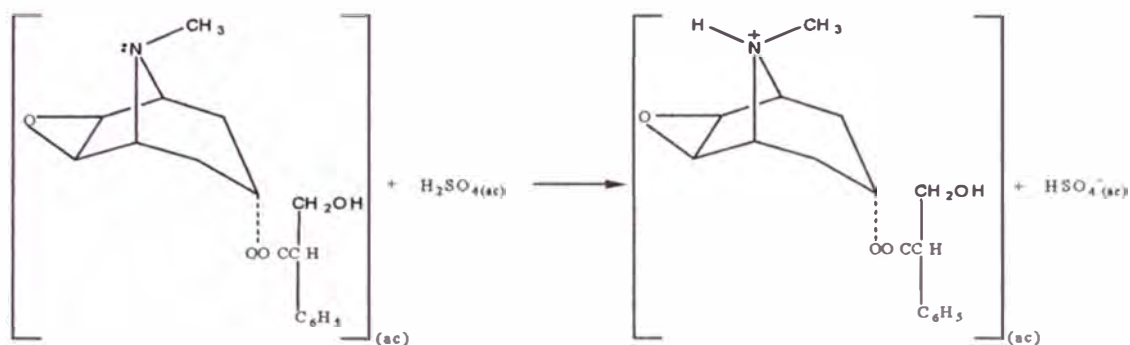
d) Titulación. Determinación potenciométrica

- 1 El extracto bruto de alcaloides (EBA.1 = 344 mg), contenido en un balón de 250 mL, se disolvió con 20 mL de cloroformo. Luego, se agregó 45 mL de solución estandarizada de ácido sulfúrico $\text{H}_2\text{SO}_{4(\text{ac})}$ 0,0223 N, con una pipeta graduada. El solvente orgánico se eliminó en el rotavapor quedando una solución acuosa ácida que contiene alcaloides en forma de sales. Finalmente, esta solución se trasvasó a un vaso de 200 mL.
- 11 Se tituló la solución ácida con una solución estandarizada de hidróxido de sodio $\text{NaOH}_{(\text{ac})}$ 0,0190 N, utilizando un potenciómetro* con electrodo de vidrio para determinar el punto de equivalencia. El análisis de la curva de titulación (ver Anexo N°6) muestra que el punto de equivalencia corresponde a la adición de 20,50 mL de base, $\text{NaOH}_{(\text{ac})}$.

* Potenciómetro Hanna pH 211 (Laboratorio N°12 de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Ingeniería).

3. Cálculo de la cantidad y del porcentaje de alcaloides en la muestra

- i Al agregar un exceso de solución de ácido sulfúrico $H_2SO_{4(ac)}$ (45 mL, 0,0223 N) al Extracto Bruto de Alcaloides, ocurre la reacción:



y se tiene que:

$$N^{\circ} \text{ meq ácido (sobrante)} = N^{\circ} \text{ meq ácido total} - N^{\circ} \text{ meq alcaloide... } (\alpha)$$

$$\text{donde } N^{\circ} \text{ meq ácido total} = N \times V = 0,0223 \times 45 = \mathbf{1,0035 \text{ meq}} \dots (\beta)$$

- ii El ácido sulfúrico $H_2SO_{4(ac)}$ sobrante, que queda sin reaccionar con el alcaloide, se titula con 20,50 mL de solución de hidróxido de sodio $NaOH_{(ac)}$ 0,0190 N, según la ecuación:



y en el punto de equivalencia se cumple que:

$$N^{\circ} \text{ meq. ácido (sobrante)} = N^{\circ} \text{ meq. base} \dots \dots \dots (\gamma)$$

- iii La cantidad (meq) de hidróxido de sodio ($N=0,0190$ y $V=20,50$ mL) se determina por la relación: $N^{\circ} \text{ meq} = N \times V$ (mL)

$$N^{\circ} \text{ meq base} = N_{NaOH} \times V_{NaOH}$$

$$N^{\circ} \text{ meq}_{(NaOH)} = 0,0190 \text{ N} \times 20,50 \text{ mL}$$

$$N^{\circ} \text{ meq}_{(NaOH)} = 0,3895 \text{ meq}$$

- iv La cantidad de meq de ácido sobrante se determina por la relación (γ):

$$\text{N}^\circ \text{ de meq (H}_2\text{SO}_4\text{) sobrante} = \mathbf{0,3895 \text{ meq}} \dots\dots\dots (\epsilon)$$

- v La cantidad (en meq) de alcaloides presentes se determina reemplazando las cantidades (β) y (ϵ) en la relación (α):

$$\begin{aligned} \text{N}^\circ \text{ meq de alcaloide} &= \text{N}^\circ \text{ meq de ácido total} - \text{N}^\circ \text{ meq de ácido (sobrante)} \\ &= 1,0035 \text{ meq} - 0,3895 \text{ meq} \\ &= \mathbf{0,6140 \text{ meq}} \end{aligned}$$

- vi La cantidad (en mg) de alcaloides (escopolamina) se determina teniendo en cuenta que:

$$\text{N}^\circ \text{ eq} = \frac{W}{1 \text{ Eq} - g} \quad \text{y} \quad 1 \text{ Eq} - g = \frac{\bar{M}}{\theta}$$

donde θ es el número de hidrógenos intercambiados en la reacción ácido-base (para la escopolamina $\theta = 1$) y \bar{M} es el peso molecular de la sustancia (para la escopolamina $\bar{M} = 303,36 \text{ g/mol}$).

Luego:

$$W = \text{N}^\circ \text{ meq} \times \bar{M}$$

$$W = 0,6140 \times 303,36$$

W = 186 mg de escopolamina (en 50 g de muestra seca)

- vii El porcentaje de alcaloides en la muestra se determina por la relación:

$$\begin{array}{l} 50 \text{ g} \quad \longrightarrow \quad 100\% \\ 0,186 \text{ g} \quad \longrightarrow \quad \% \text{ de alcaloides (como escopolamina)} \end{array}$$

$$\% \text{ de alcaloides (como escopolamina)} = \frac{0,186 \times 100}{50} = 0,37\%$$

viii Para el caso del segundo análisis se obtuvieron los siguientes resultados (ver Anexo N°7):

- EBA.2 = 442 mg
- W = 150 mg de escopolamina (en 50 g de muestra seca)
- % alcaloides = 0,30% (como escopolamina)

ix Por lo tanto, el porcentaje de alcaloides en las hojas del toe será el promedio entre los dos análisis:

$$\% \text{ de alcaloides (como escopolamina)} = \frac{0,37\% + 0,30\%}{2} = 0,34\%$$

Este resultado se encuentra comprendido en el rango de porcentaje de alcaloides reportado en la literatura (Sec. II.A.1.c, págs. 10-11).

H. AISLAMIENTO DE LA ESCOPLAMINA

Como se describió en la metodología de investigación (pág. 59) el aislamiento de compuestos puros comprende tres etapas:

- i Extracción sólido-líquido de la planta: para la obtención del Extracto Bruto Orgánico, EBO.
- ii Separación líquido-líquido: para la obtención del Extracto Bruto de Alcaloides, EBA.
- iii Purificación: para el aislamiento del compuesto puro.

Las dos primeras etapas, hasta la obtención del EBA, se realizaron en 6 oportunidades (ver Tabla N°6).

Las muestras del toe (*D. sanguinea*) utilizadas, secas y pulverizadas, fueron colectadas en el distrito de Sapalache (Ago'01), a excepción del primer ensayo en el que se utilizó la muestra colectada en Salalá en Ago'00 (ver Sec. A).

La tercera etapa, la purificación del EBA mediante técnicas cromatográficas para la obtención del alcaloide puro, fue realizada varias veces (ver Anexo N°8), tanto en nuestro Laboratorio en la UNI,

como en el Instituto de Química de la Universidad de São Paulo-Brasil (Ago-Set'03 y Jul-Ago'05), habiendo logrado la obtención del alcaloide escopolamina puro recién durante la estadia de Jul-Ago'05 en Brasil. Todos los intentos realizados en nuestro laboratorio (UNI, Lima) de lograr el aislamiento del alcaloide puro resultaron infructuosos.

A continuación pasaremos a describir el procedimiento realizado en cada etapa hasta lograr la obtención de la escopolamina pura.

1. Extracción sólido-líquido: Obtención del Extracto Bruto Orgánico (Descripción del primer ensayo: 07 Jun-06 Nov'01)

a) Desengrase con n-hexano.

- i En un frasco erlenmeyer de 1 L se colocó 150 g de la muestra y se adicionó 300 mL de n-hexano. La mezcla se puso en agitación*, a temperatura ambiente, durante cuatro horas, y luego se dejó en reposo hasta el día siguiente (20h).
- ii Se separó el líquido sobrenadante de color verde oscuro, con una pipeta volumétrica de 50 mL. Al sólido restante se adicionó una nueva porción de 300 mL de n-hexano y se agitó. Este procedimiento se realizó un total de 30 veces.
- iii Finalmente el sólido húmedo se transfirió a una bandeja de 17 cm x 26 cm, y se dejó secar al aire a la temperatura ambiente.

c) Alcalinización con solución de amoníaco concentrado.

La muestra seca y desengrasada se introdujo en un cartucho de tocuyo, y se colocó dentro de un frasco de 800 mL. Luego se añadió sobre el cartucho, con la ayuda de una pipeta, 180 mL de solución de amoníaco concentrado $\text{NH}_3(\text{ac})$ 15 N, humedeciéndose así completamente toda la muestra, y se dejó en reposo durante 2 horas.

* Para la agitación se utilizó un agitador eléctrico de eje flexible con paleta de vidrio MLW ER10.

d) Extracción con solventes

1 Maceración con metanol-cloroformo (1:1)

Sobre la muestra alcalinizada, que se encontraba dentro del cuerpo central del equipo soxhlet, se adicionó 300 mL de una mezcla de metanol-cloroformo (1:1) y se dejó macerar durante 14 días. La solución final adquirió un color marrón oscuro.

Se filtró el extracto a través de un embudo de vidrio de 8 cm de diámetro y papel de filtro “rápido”, lavando este último con aproximadamente 20 mL de la mezcla de solventes usada.

11 Maceración con mezcla de solventes

Sobre la muestra, que se encontraba dentro del cuerpo central del equipo soxhlet, y se le adicionó 325 mL de una mezcla de metanol-cloroformo-acetato de etilo (1:1:4) y se dejó en reposo, a temperatura ambiente, durante 14 días. Se filtró el extracto, y la muestra sólida en el cartucho se volvió a tratar de la misma manera cinco veces más, dando así un test de Mayer negativo.

d) Eliminación del solvente

Todos los extractos orgánicos se juntaron y luego se concentró en el rotavapor (40 °C, 300-150 mbar), casi hasta sequedad, obteniéndose el Extracto Bruto Orgánico, de color marrón oscuro, que no se pesó.

2. Separación líquido-líquido: Obtención del Extracto Bruto de Alcaloides
(Descripción del primer ensayo: 08 Nov'01-10 Ene'02)

e) Disolución del extracto bruto orgánico con solución ácida

- 1 El extracto bruto orgánico se disolvió en 200 mL de solución de ácido sulfúrico $H_2SO_{4(ac)}$ 0,5 N. Seguidamente la disolución acuosa ácida se filtró a través de papel de filtro “lento”.

- ii Este procedimiento se realizó cuatro veces más con diferentes cantidades de ácido (2x100 mL, 2x80 mL). El sólido remanente dio prueba negativa de alcaloides (test de Mayer) y se descartó.
- iii Los extractos acuosos ácidos, de color marrón claro, se reunieron (volumen total = 560 mL) y se colocaron en un embudo de separación de 1 L.
- f) Lavado de la disolución ácida con solventes orgánicos
 - i La disolución ácida, que contiene los alcaloides como sales, se lavó 4 veces con porciones de 150 mL cloroformo.
 - ii Se separó la fase orgánica (que no contiene alcaloides, test de Mayer negativo), de color amarillo, y se descartó.
- g) Alcalinización del extracto con solución de amoníaco $\text{NH}_3(\text{ac})$ 7,5 N
La disolución acuosa ácida se alcalinizó con 55 mL de $\text{NH}_3(\text{ac})$ 7,5 N hasta $\text{pH} = 9$. Se observó el oscurecimiento de la disolución.
- h) Extracción de alcaloides con solventes orgánicos
 - i La fase acuosa básica (en el embudo de separación) se extrajo con 150 mL de cloroformo.
 - ii Esta extracción se repitió doce veces más, hasta que la fase acuosa esté exenta de alcaloides (test de Mayer negativo).
 - iii Los extractos orgánicos se colocaron en un balón de 2 L y se concentró en el rotavapor (40 °C, 400-150 mbar) hasta sequedad.
 - iv Sobre el residuo de alcaloides se agregó 100 mL de cloroformo y se volvió a concentrar a sequedad en el rotavapor, (40 °C, 400-150 mbar), repitiéndose esta operación un total de cuatro veces. Esto tiene por objeto eliminar las bases volátiles (amoníaco, $\text{NH}_3(\text{g})$) que estuvieran disueltas en el extracto.
- v Finalmente se obtuvo 914 mg del Extracto Bruto de Alcaloides (EBA.1), como un gel, de color marrón claro. El análisis por CCF nos indica que el extracto contiene escopolamina.

Observación.- Para el ensayo N°2 se siguió el mismo procedimiento descrito, a excepción de que en la etapa de desengrase y extracción con solventes se realizó con el equipo soxhlet. Se obtuvo 793 mg del Extracto Bruto de Alcaloides (EBA.2) a partir de 150 g de muestra. Para los ensayos N°3, N°4, N°5 y N°6 se obtuvieron 539 mg (EBA.3), 786 mg (EBA.4), 753 mg (EBA.5) y 659 mg (EBA.6) del Extracto Bruto de Alcaloides a partir de 150 g, 100 g, 200 g y 200 g de muestra, respectivamente (ver Tabla N°6 y Anexo N°9).

Tabla N°6

OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS BRUTOS DE ALCALOIDES-EBA

Ensayo N°	Peso de muestra (g)	Procedencia (fecha de colección)	Fecha de ejecución	Peso de EBA obtenido (mg)
1	150	Salalá (01 Ago'00)	07 Jun'01-10 Ene'02	914
2	150	Sapalache (01 Ago'01)	17 Ene'02-26 Mar'03	793
3	150		16 Ene'03-23 May'03	539
4	100		20 Jul'04-21 Oct'04	786
5	200		20 Jul'04-21 Oct'04	753
6	200		21 Feb'05-05 Abr'05	659

3. Purificación por cromatografía

Los procedimientos cromatográficos que se realizaron para la purificación del Extracto Bruto de Alcaloides fueron los siguientes:

- i Análisis preliminar por cromatografía de capa fina-CCF (ver Sec. 4).
- ii Cromatografía en columna-CC (ver Sec. 5).
- iii Cromatografía en placa preparativa-CPP (ver Sec.6).

Los procedimientos de CCF y CC se realizaron tanto en nuestro laboratorio en la UNI (Lima, Perú), como en el Instituto de Química de

la Universidad de São Paulo-Brasil; mientras que todas las CPP se realizaron en São Paulo-Brasil.

Los ensayos en São Paulo-Brasil se realizaron en dos ocasiones, durante las estadias de Investigación que realizó la Lic. Elena Córdor C., Jefe de Prácticas de la FC-UNI e integrante de nuestro Grupo de Investigación del 18 Ago-14 Set'03, y la que realizó el autor de esta tesis del 15 Jul-15 Ago'05.

4. Análisis preliminar por cromatografía en capa fina-CCF

El objetivo de este procedimiento preliminar es seleccionar el eluente más eficiente para realizar posteriormente la purificación del extracto bruto de alcaloides por cromatografía en columna (CC) y/o cromatografía en placa preparativa (CPP).

- a) Muestras: Extracto Bruto de Alcaloide (EBA), obtenida en la Sec. 2.h.v precedente (pág. 74).
- b) Referencia : No se dispuso de patrón de escopolamina.
- c) Placa: Placa de Sílica gel 60 PF₂₅₄, 0,2 mm.
- d) Eluente: Cloroformo-acetona (10:3) saturado* con NH_{3(ac)} 15 N.
- e) Procedimiento: La aplicación de las muestras, el desarrollo del cromatograma y el revelado de las placas son procedimientos descritos en los textos y guías de prácticas de química orgánica.
- f) Revelador: Reactivo de Dragendorff.
- g) Observaciones: El resultado de la realización de este trabajo preliminar nos indica que aparentemente presenta un alcaloide mayoritario ($R_f = 0,40$), que tiene un comportamiento polar

* Para saturar con amoníaco, se coloca dentro de la cubeta un frasco pequeño conteniendo 2 mL de amoníaco concentrado, después de la adición del eluente. Una vez que la cubeta se satura con el vapor del solvente recién se introduce la placa cromatográfica.

(ver Anexo N°10), lo cual nos ayudó para la realización de la columna cromatográfica (ver Sec. 5).

5. Cromatografía en columna–CC

El objetivo de este procedimiento cromatográfico, es obtener fracciones enriquecidas, y si fuera posible puras, del alcaloide que se quiere purificar.

- a) Muestra: EBA.1, EBA.2 y EBA.3 (1317 mg)*, obtenida en la Sec. H.1 y 2 (págs. 71-74).
- b) Características de la columna: $\phi_i = 35$ mm, $h = 19$ cm; altura de la alúmina = 5,5 cm.
- c) Adsorbente : Óxido de aluminio activo neutro (Alúmina).
- d) Procedimiento (realizado en São Paulo-Brasil)**
 - i En una cápsula de porcelana se depositó 2,6 g de sílica gel 60 para columna cromatográfica y sobre ella se adicionó la muestra de alcaloides redisuelta con la mínima cantidad de cloruro de metileno y metanol, de manera de preparar una mezcla uniforme (papilla).
 - ii Una vez preparada la papilla se procedió a secar a vacío en un desecador durante 6 horas.
 - iii En la columna se agregó la alúmina (50 g) en polvo mezclada con cloroformo hasta cubrir el empaque.
 - iv La papilla se trasvasó sobre la parte superior del empaque de alúmina (en la columna) que contenía un poco de cloroformo (0,2 cm de altura). Finalmente se colocó una capa de algodón, para proteger la muestra.

* Los extractos EBA.1, EBA.2 y EBA.3, cuyo peso total fue de 2030 mg en Lima, se juntaron en Brasil dando un peso de 1317 mg.

** Esta parte fue realizada por la Lic. Elena Cóndor C. durante la estadía que realizó en São Paulo-Brasil del 18 Ago-14 Set'03.

- v Se agregó cuidadosamente cloroformo sobre el empaque y se eluyó la columna hasta recibir dos fracciones de 200 mL de eluente en balones de 500 mL (fracción N°1 y N°2).
- vi Se modificó el eluente y se agregó 1% de metanol en CHCl_3 , recibiendo 300 mL de eluente en un balón de 500 mL (fracción N°3).
- vii Se continuó la elución, esta vez con 5% de metanol en CHCl_3 , recibiendo tres fracciones de 100 mL de eluente en balones de 250 mL (fracción N°4, N°5 y N°6).
- viii Se aumentó la polaridad del eluente a 10% de metanol en CHCl_3 , recibiendo 300 mL en un balón de 500 mL (fracción N°7).
- ix Se continuó la elución con 25% de metanol en CHCl_3 , recibiendo dos fracciones de 200 mL de eluente en balones de 500 mL (fracción N°8 y N°9).
- x Se agregó el eluente 50% de metanol en CHCl_3 , recibiendo dos fracciones de 200 mL de eluente en balones de 500 mL (fracción N°10 y N°11).
- xi Finalmente, se terminó la elución con 250 mL de metanol, el cual se recibió en un balón de 500 mL (fracción N°12).
- xii Todas las soluciones presentaban color amarillo de diferentes tonalidades, y fueron llevadas a sequedad en el rotavapor (20-30 °C, 100 PSI).

e) Resultados

- i Se obtuvieron 12 fracciones, los cuales contenían sustancias de color pardo-marrón de aspecto resinoso y cuyos pesos fueron:

Fracción N°1 : 81 mg

Fracción N°7 : 85 mg

Fracción N°2 : 57 mg

Fracción N°8 : 4 mg

Fracción N°3: 285 mg

Fracción N°9 : 36 mg

Fracción N°4 : 425 mg

Fracción N°10 : 13 mg

Fracción N°5 : 56 mg

Fracción N°11 : 2 mg

Fracción N°6 : 135 mg

Fracción N°12 : 11 mg

- ii La cromatografía en capa fina (CCF) de estas fracciones nos indicó la presencia de alcaloides en todas las fracciones, debido a que revelaban positivo frente al reactivo de Dragendorff.
- iii Las fracciones obtenidas se guardaron en refrigeración a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su purificación mediante cromatografía en placa preparativa (CPP) (ver Sec. 6).

6. Cromatografía en placa preparativa-CPP

- a) Muestra: Fracción N°3 (285 mg, ver Sec. 5.e.i precedente).
- b) Adsorbente: Placas de Sílica Gel 60 PF₂₅₄^{*}, 1 mm de espesor de capa (20x20 cm²).
- c) Eluente: Cloroformo-acetona (10:3), saturada con NH₃ 15 N.
- d) Revelador: UV (254 y 360 nm) y reactivo de Dragendorff.
- e) Procedimiento (realizado en São Paulo-Brasil^{**})

La aplicación de las muestras, la elución^{***} cromatográfica, la identificación de la porción de la placa que contiene el compuesto de interés y la recuperación a partir de las placas son procedimientos descritos en los textos y guías de prácticas de química orgánica.

La muestra se sembró en 8 placas cromatográficas diferentes, debido a la capacidad de resolución de las placas de sílice utilizadas, y se realizaron cinco eluciones consecutivas de la misma placa.

* Las placas fueron preparadas dispersando una suspensión de sílica en agua destilada sobre placa de vidrio de 20x20 cm².

** Estadia de Investigación del Bach. Golfer Muedas T. del 15 Jul-15 Ago'05 en el Laboratorio del Instituto de Química de la Universidad de São Paulo-Brasil.

*** Elución consiste en el ascenso del solvente por la propiedad de capilaridad.

La escopolamina no presenta fluorescencia; sin embargo, al ser irradiada por luz UV se observa como una mancha oscura, lo cual nos ayudó a delimitar la porción de la placa que contiene el alcaloide. Para asegurar la zona correcta a separar, se procedió de la siguiente manera:

- i Luego de las cinco eluciones, se delimitó 1 cm del extremo izquierdo de la placa cromatográfica y se reveló con el reactivo de Dragendorff. La aparición de manchas de color anaranjado nos indicó la presencia de alcaloides.
- ii En seguida, con ayuda de la luz UV se delimitó la placa en 8 porciones de material adsorbente, los cuales se recogieron con una espátula, recibiendo el sólido en frascos erlenmeyer de 250 mL.
- iii A los frascos erlenmeyer que contenían el adsorbente con el alcaloide, se adicionó diclorometano y se dejó reposar por 12 horas. Luego se filtró a vacío a través de un embudo de vidrio fritado (para evitar que partículas pasen a la solución), recibiendo todo el adsorbente en el embudo.
- iv Inmediatamente, se hizo pasar metanol, a través del adsorbente, obteniéndose así la mezcla de solventes de color amarillo.
- v El solvente se eliminó por evaporación en el rotavapor.

f) Resultados

- i Se obtuvieron 8 fracciones (Anexo N°11)

Fracción N°1 : 41 mg	Fracción N°5 : 26 mg
Fracción N°2 : 20 mg	Fracción N°6: 119 mg
Fracción N°3 : 17 mg	Fracción N°7 : 21 mg
Fracción N°4 : 13 mg	Fracción N°8 : 13 mg

- ii Análisis de las fracciones mediante CCF y su espectro de RMN¹³C:
Por cromatografía en capa fina se determinó que el alcaloide principal se encontraba en la fracción N°6, $R_f = 0,4$ (**peso 119 mg**),

que es un líquido resinoso y de color pardo tenue.

- Por espectroscopía de RMN¹³C se verificó la presencia de la escopolamina en la fracción N°6.
- g) Conclusión: A partir del Extracto Bruto de Alcaloides obtenidas de las hojas del toe (*Datura sanguinea*), se logró aislar su principal alcaloide, la escopolamina (peso = 119 mg).

I. IDENTIFICACION ESPECTROSCÓPICA DE LA ESCOPOLAMINA

La determinación estructural de la escopolamina obtenida de las hojas del toe (*D. sanguinea*) se realizó mediante el análisis de sus espectros* de Masas, de RMN¹H, de RMN¹³C, ¹H-¹H COSY y ¹H-¹³C HETCOR.

La muestra analizada fue la fracción N°6 (119 mg) obtenido en la Sec. 6.f.i precedente.

1. Espectro de masas (Espectro N°1)

a. Condiciones de trabajo

- i Equipo: Cromatógrafo de Gas acoplado a Masas (CG-MS) AGIELNT Serie 6890; Columna: HP5 30m x 0,25mm Ø; Gas: Helio (1 mL/min).
- ii Laboratorio: Laboratorio de Fitoquímica-Instituto Botánico de São Paulo-Brasil)**.
- iii Operador: Dr. Paulo Roberto H. Moreno.
- iv Fecha: 24.Oct.05.
- v Cantidad de muestra: 3 µL (1 mg de muestra x 1 mL acetona).

* Los espectros de RMN¹H y RMN¹³C fueron obtenidos durante la estadia que realizó el autor de esta tesis, en el Instituto de Química de la Universidad de São Paulo (Brasil).

** Los espectros de masas, DEPT-135, COSY y HETCOR no se pudo obtener en el tiempo de la estadia en São Paulo-Brasil del autor de esta tesis, y fueron enviados posteriormente por la M.Sc. I. Collantes.

b. Características del espectro

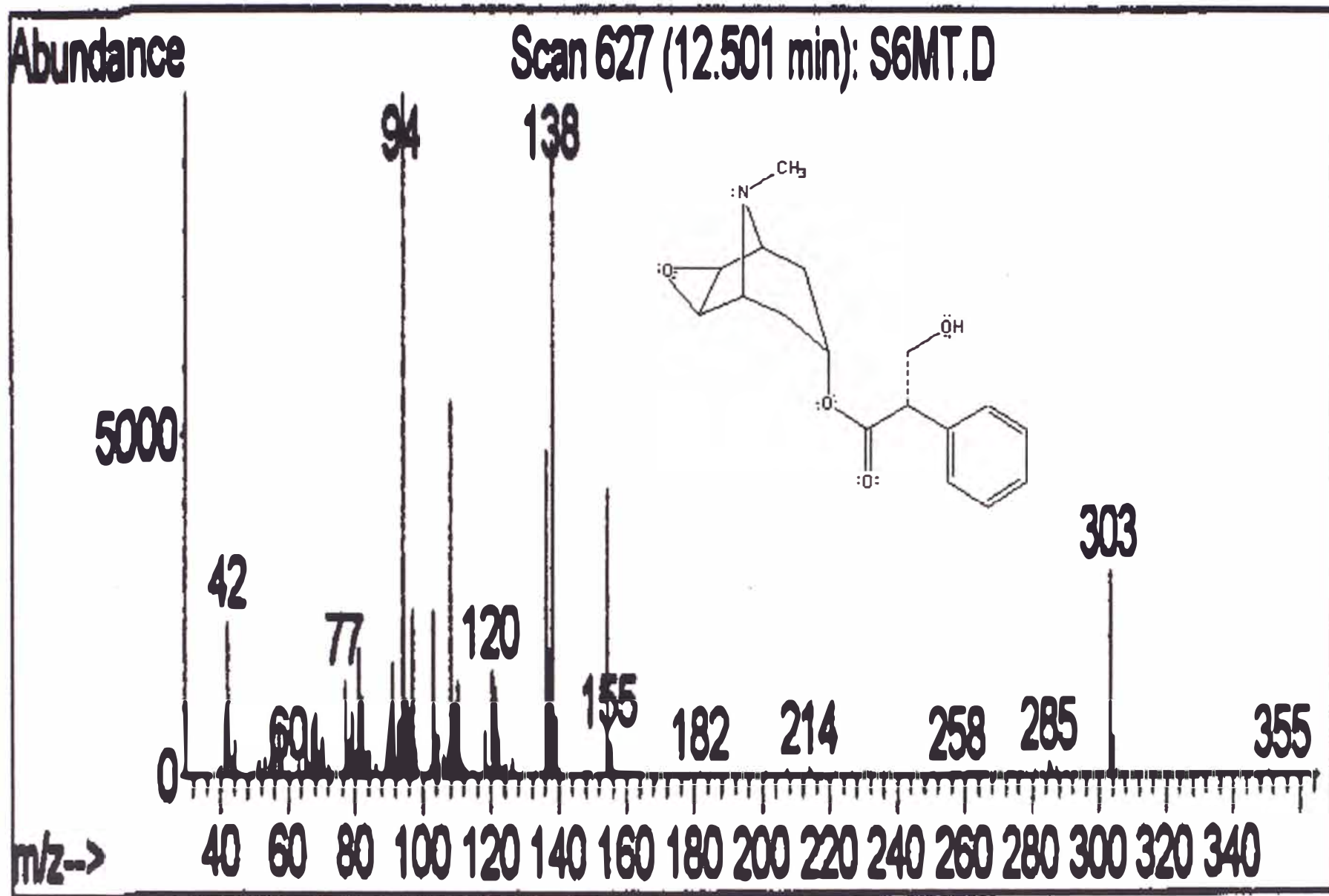
m/z 303 (ión molecular, 47,30%), 154 (42,03%), 138 (93,01%), 136 (47,82%), 108 (55,08%), 94 (pico base, 100%).

c. Análisis del espectro

La identificación de los cinco fragmentos iónicos correspondientes a los picos m/z 303, 154, 138, 136 y 94, y las ecuaciones de fragmentación respectivas, se han descrito precedentemente (Sec. II.A.4.a).

El espectro de masas de la escopolamina obtenida a partir de las hojas del toe (*Datura sanguinea*) es similar al espectro registrado por Vitale et al. (1995), ver Sec. II.A.4.a (pág. 18).

d. Conclusión.- Existe correspondencia entre el espectro de masas obtenido para nuestro compuesto y aquel publicado en la bibliografía para la escopolamina.



Espectro N°1.- Espectro de Masas de la Escopolamina obtenida a partir de las hojas del toe (*D. sanguinea*)

2. Espectro de RMN¹H (Espectro N°2)

a. Condiciones de trabajo

- i Equipo: Varian DPX-300 (300 MHz).
- ii Laboratorio: Productos Naturales–Instituto de Química (Universidad de São Paulo-Brasil).
- iii Operador: M.Sc. Ingrit Collantes Díaz.
- iv Fecha: 14.Ago.05.
- v Solvente: CDCl₃.
- vi Muestra: Fracción N°6 (119 mg), ver Sec. H.6.f.i.

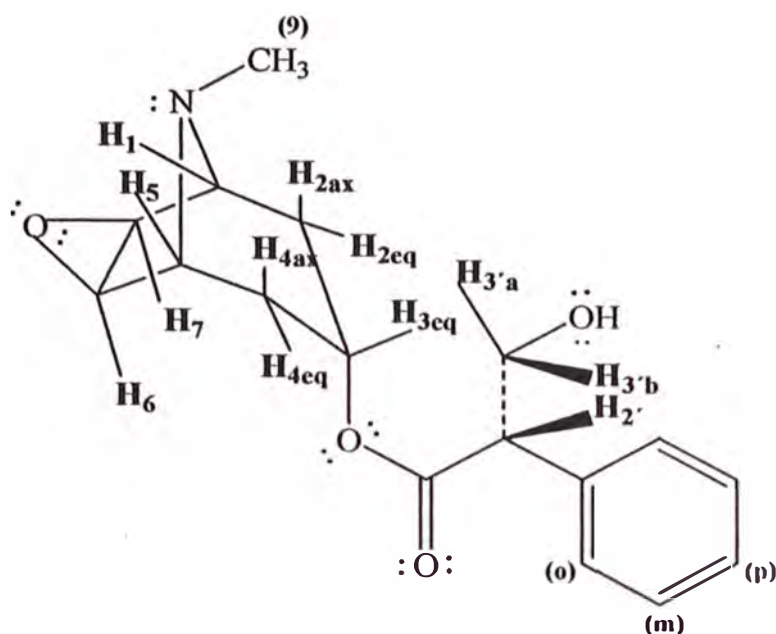
b. Características del espectro

1,34 ppm (d, H-2eq*, ciclo tropánico); 1,58 ppm (d, H-4eq, ciclo tropánico); 2,00 ppm (ddd, H-2ax*, ciclo tropánico); 2,05 ppm (ddd, H-4ax, ciclo tropánico); 2,46 ppm (s, N-CH₃); 2,65 ppm (d, H-7, ciclo tropánico); 2,97 ppm (dd, H-1, ciclo tropánico); 3,11 ppm (dd, H-5, ciclo tropánico); 3,38 ppm (d, H-6, ciclo tropánico); 3,75 ppm (dd, H-2'); 3,78 ppm (dd, H-3'b); 4,17 ppm (dd, H-3'a); 5,03 ppm (t, H-3, ciclo tropánico); 7,21-7,39 ppm (m, 5H aromático).

c. Análisis del espectro (Desplazamientos químicos)

La identificación de los diferentes tipos de hidrógenos correspondientes se ha descrito precedentemente (Sec. II.A.4.b) y se resume a continuación.

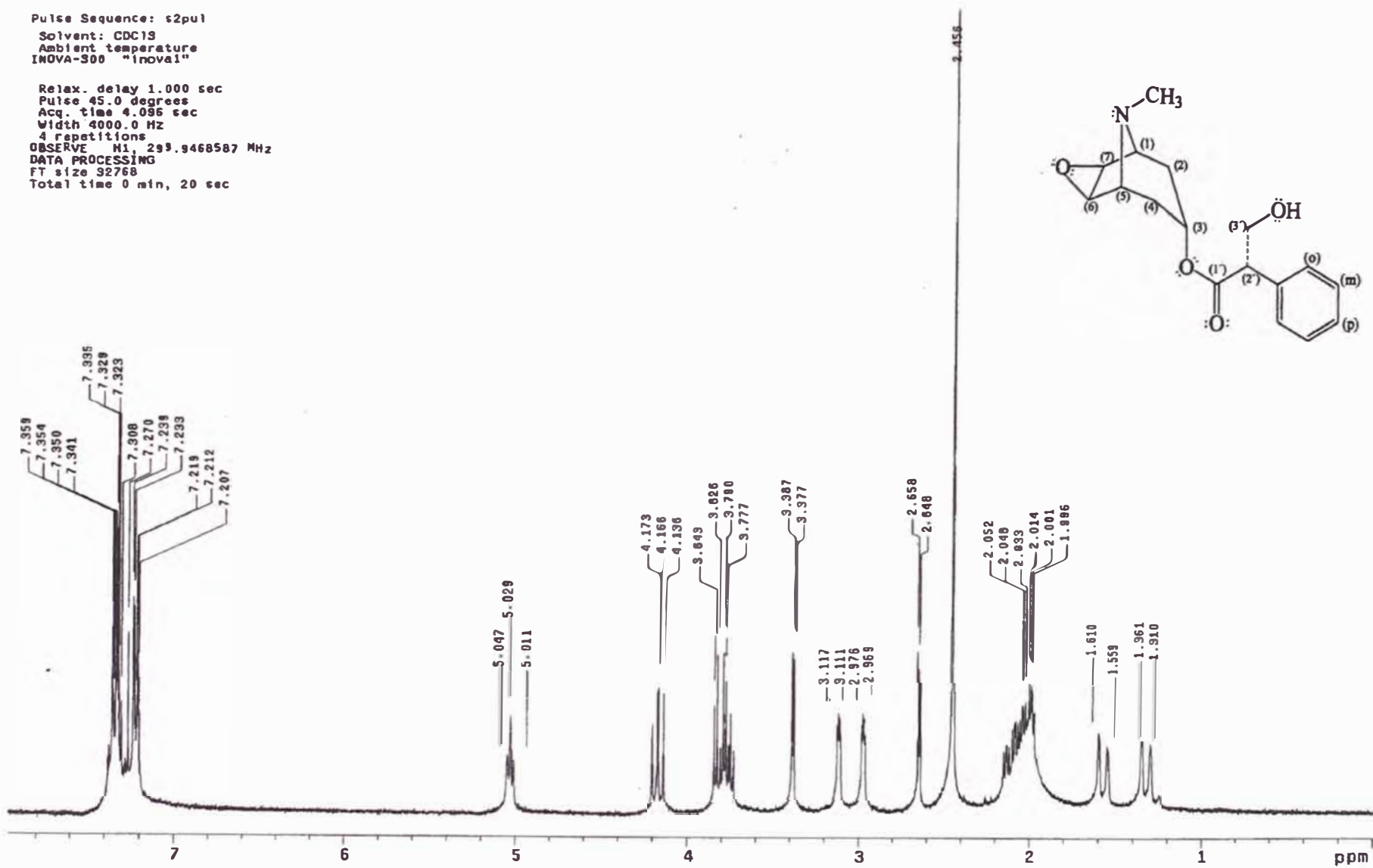
* eq: ecuatorial, ax: axial.



δ (ppm)	Tipo de Señal	Integración	Tipo de Hidrógeno
1,34	d	1H	Heq (posición 2)
1,58	d	1H	Heq (posición 4)
2,00	ddd	1H	Hax (posición 2)
2,05	ddd	1H	Hax (posición 4)
2,46	s	3H	N-CH ₃ (posición 9)
2,65	d	1H	H (posición 7)
2,97	dd	1H	H (posición 1)
3,11	dd	1H	H (posición 5)
3,38	d	1H	H (posición 6)
3,75	dd	1H	H (posición 2')
3,78	dd	1H	H (posición 3'b)
4,17	dd	1H	H (posición 3'a)
5,03	t	1H	H (posición 3)
7,21-7,39	m	5H	H-Ar (o, m y p)

d. Conclusión.- El espectro RMN¹H obtenido corresponde a lo esperado para la estructura de la escopolamina.

Pulse Sequence: s2pu1
 Solvent: CDCl3
 Ambient temperature
 INOVA-300 "inova1"
 Relax. delay 1.000 sec
 Pulse 45.0 degrees
 Acq. time 4.096 sec
 Width 4000.0 Hz
 4 repetitions
 OBSERVE N1, 299.9468507 MHz
 DATA PROCESSING
 FT size 32768
 Total time 0 min, 20 sec



Espectro N°2.- Espectro de RMN¹H (300MHz) de la Escopolamina obtenida a partir de las hojas del toe (*D. sanguinea*)

3. Espectro de RMN¹³C (Espectro N°3 y N°4)

a. Condiciones de trabajo

- i Equipo: Varian DPX-300 (300 MHz).
- ii Laboratorio: Productos Naturales–Instituto de Química (Universidad de São Paulo-Brasil).
- iii Operador: M.Sc. Ingrit Collantes Díaz.
- iv Fecha: 14.Ago. y 24.Oct. 05.
- v Solvente: CDCl₃.
- vi Muestra: Fracción N°6 (119 mg), ver Sec. H.6.f.i.

b. Características del espectro DEPT-135 (Espectro N° 3)

i Señales hacia arriba (10):

Carbonos primarios (CH ₃):	(C ₉):	41,6 ppm	
Carbonos terciarios (CH):	(C ₂):	54,2 ppm	(C ₃): 66,5 ppm
	(C ₇):	55,6 ppm	(p-C): 127,7 ppm
	(C ₆):	56,1 ppm	(o-C): 127,8 ppm
	(C ₁):	57,4 ppm	(m-C): 128,7 ppm
	(C ₅):	57,5 ppm	

- ii Señales hacia abajo (3): carbonos secundarios (CH₂): (C₂): 30,2 ppm
(C₄): 30,3 ppm
(C₃): 63,6 ppm

Observación.- En este tipo de espectros no se registran carbonos cuaternarios.

c. Características del espectro de Desacoplamiento de ^1H de banda ancha (Espectro N°4)

En este tipo de espectro aparecen todos los carbonos:

30,2 ppm (CH_2); 30,3 ppm (CH_2); 41,6 ppm (CH_3); 54,2 ppm (CH); 55,6 ppm (CH); 56,1 ppm (CH); 57,4 ppm (CH); 57,5 ppm (CH); 63,6 ppm (CH_2); 66,5 ppm (CH); 127,7 ppm (p- CH); 127,8 ppm (o- CH); 128,7 ppm (m- CH); 135,6 ppm (ipso-C); 171,6 ppm (C-carbonilo).

d. Análisis del espectro DEPT-135

En el espectro N° 3 (DEPT-135) observamos 13 señales de átomos de carbonos, de los cuales 1 señal corresponde a un átomo de carbono primario (CH_3), que pertenecería al átomo de carbono del grupo metilo; 3 señales corresponden a átomos de carbonos secundario (CH_2), que pertenecen a átomos de carbono del anillo tropánico; y las 9 señales restantes corresponden a átomos de carbonos terciarios (CH), pertenecientes a átomos de carbono del anillo tropánico y del anillo aromático (ver Figura N°14).

e. Análisis del espectro de Desacoplamiento de ^1H de banda ancha

En el espectro N°4 (Desacoplamiento de ^1H de banda ancha) se localizan 2 señales registrados a δ 135,6 y 171,6 ppm, que corresponden a los dos átomos de carbonos cuaternarios de la molécula de escopolamina.

En resumen los átomos de la molécula de escopolamina tendrían los siguientes valores de δ (ppm) (ver Espectro N°4):

Nº de átomo de carbono	Tipo de carbono	$\delta(\text{ppm})$
1	CH (terciario)	57,4
2	CH ₂ (secundario)	30,2
3	CH (terciario)	66,5
4	CH ₂ (secundario)	30,3
5	CH (terciario)	57,5
6	CH (terciario)	56,1
7	CH (terciario)	55,6
9	CH ₃ (primario)	41,6
1'	C (C=O)	171,6
2'	CH (terciario)	54,2
3'	CH ₂ (OH)	63,6
ipso	C (aromático)	135,6
m-C	CH (aromático)	128,7
o-C	CH (aromático)	127,8
p-C	CH (aromático)	127,7

f. **Conclusión.-** El espectro DEPT-135 y Desacoplamiento de ¹H de banda ancha presentado corresponde a lo esperado para la estructura de la escopolamina.

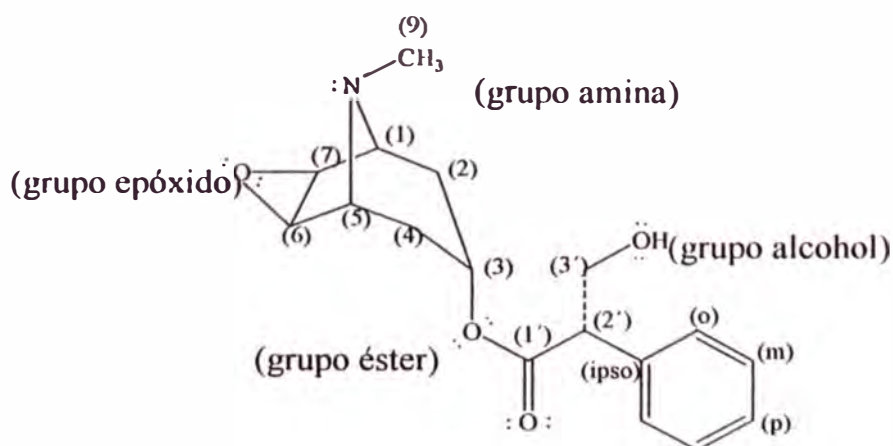
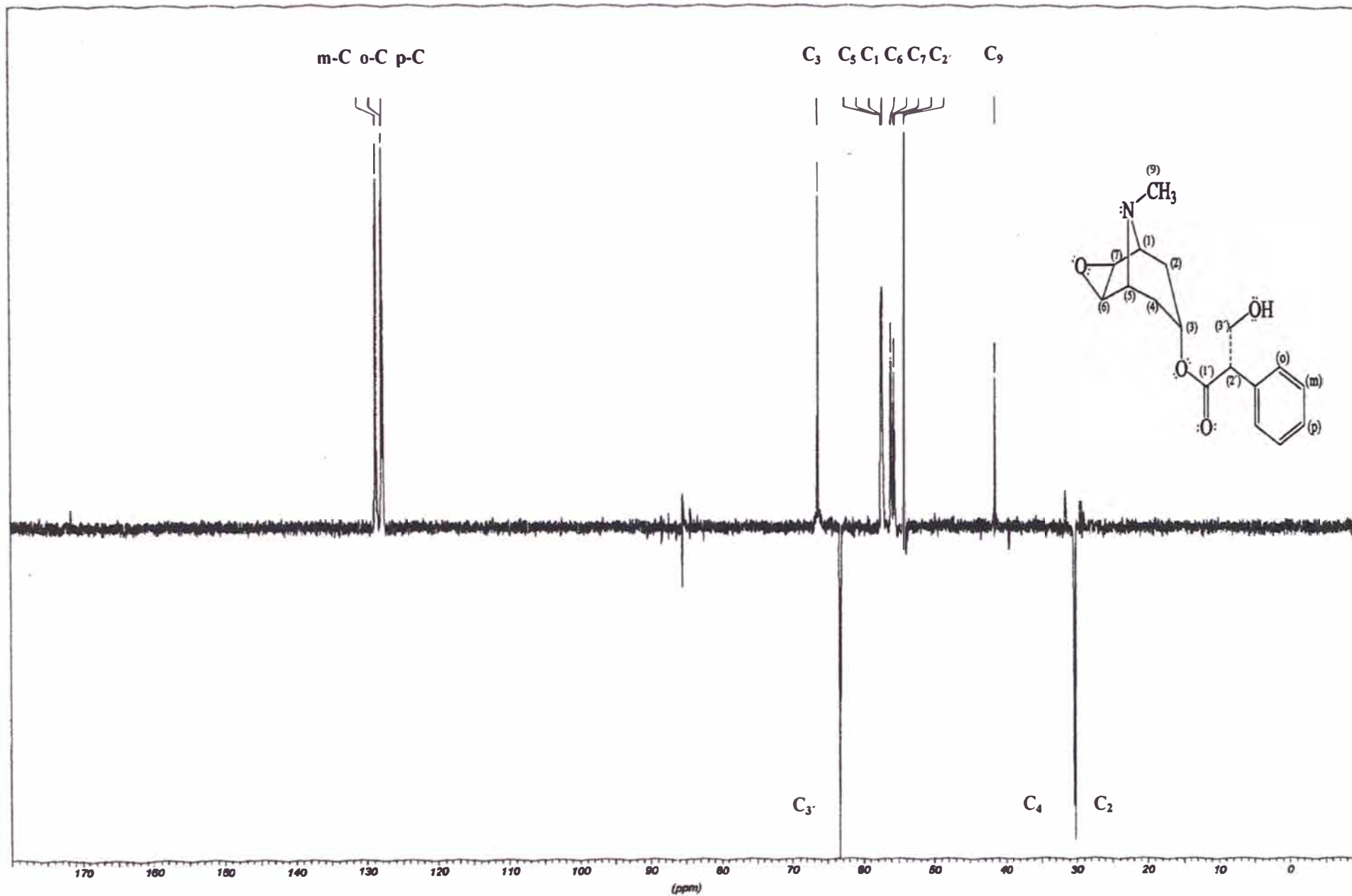


Figura N°14.- Átomos de carbono de la escopolamina y grupos funcionales presentes



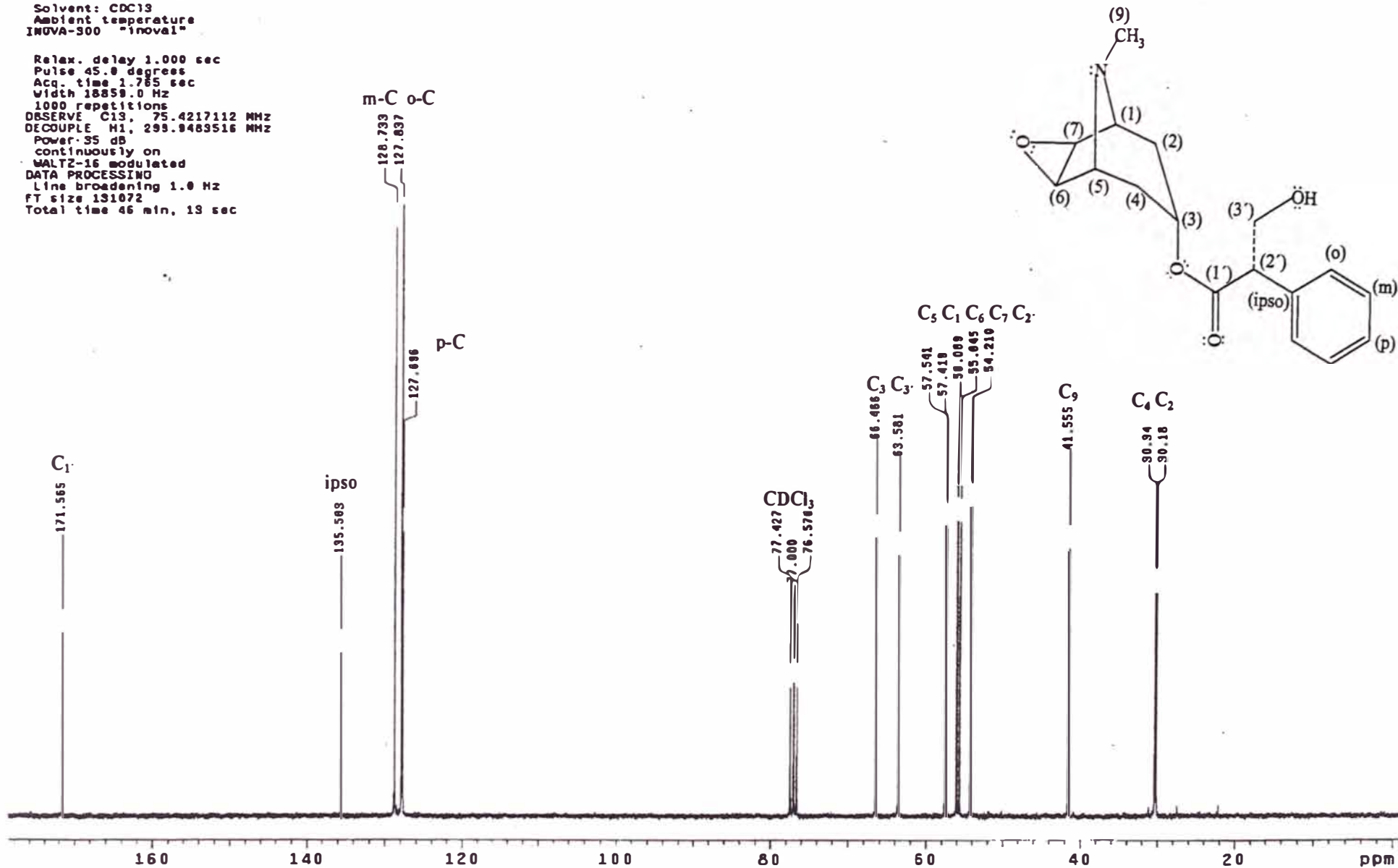
Espectro N°3.- Espectro DEPT-135 (300 MHz) de la Escopolamina obtenida a partir de las hojas del toe (*D. sanguinea*)

6de1x

Pulse Sequence: s2pu1

Solvent: CDC13
Ambient temperature
INOVA-300 "inova1"

Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 1.765 sec
Width 18859.0 Hz
1000 repetitions
OBSERVE C13, 75.4217112 MHz
DECOUPLE H1, 299.9463516 MHz
Power 35 dB
continuously on
WALTZ-16 modulated
DATA PROCESSING
Line broadening 1.0 Hz
FT size 131072
Total time 46 min, 13 sec



Espectro N°4.- Espectro de RMN¹³C (300 MHz) de la Escopolamina obtenida a partir de las hojas de toe (*D. sanguinea*)

4. Espectro ^1H - ^1H COSY (Espectro N°5)

a. Condiciones de trabajo

- i Equipo: Varian DPX-300 (300 MHz).
- ii Laboratorio: Productos Naturales–Instituto de Química (Universidad de São Paulo-Brasil).
- iii Operador: M.Sc. Ingrit Collantes Díaz.
- iv Fecha: 24.Oct.05.
- v Solvente: CDCl_3 .
- vi Muestra: Fracción N°6 (119 mg), ver Sec. H.6.f.i.

b. Características del espectro

Correlaciones observadas en el espectro ^1H - ^1H COSY

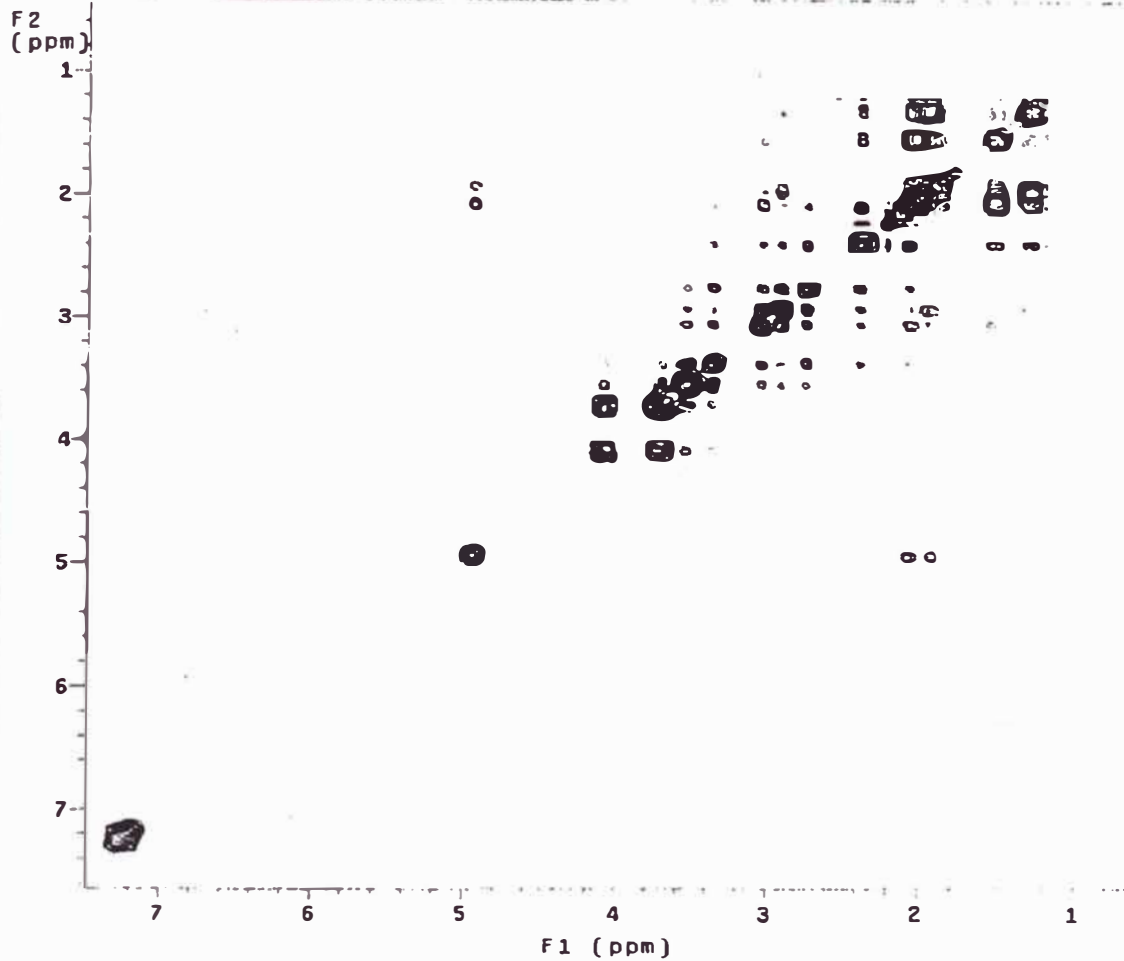
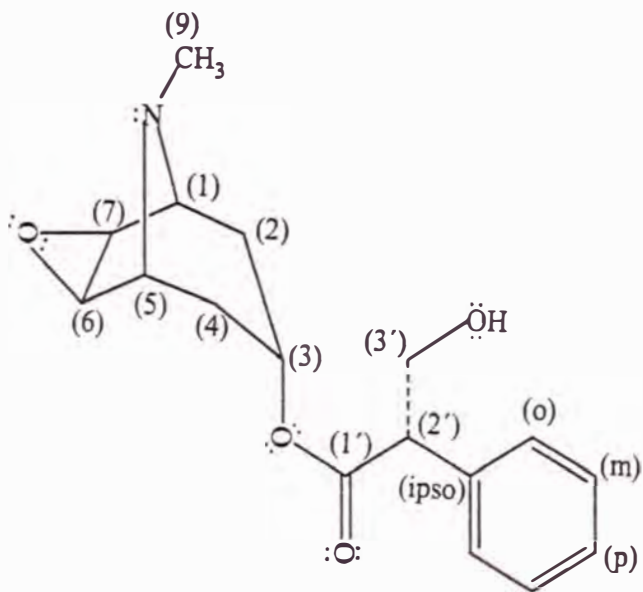
H (δ ppm)	Hidrógenos correlacionados
H-2eq (1,34)	H-4eq (1,58), H-2ax (2,00)
H-4eq (1,58)	H-2eq (1,34), H-4ax (2,05)
H-2ax (2,00)	H-2eq (1,34), H-1 (2,97), H-3 (5,03)
H-4ax (2,05)	H-4eq (1,58), H-5 (3,11), H-3 (5,03)
H-9 (2,46)	H-4ax (2,05), H-7 (2,65), H-6 (3,38)
H-7 (2,65)	H-9 (2,65) H-1 (2,97), H-6 (3,38)
H-1 (2,97)	H-2ax (2,00), H-7 (2,65), H-5 (3,11)
H-5 (3,11)	H-4ax (2,05), H-1 (2,97), H-6 (3,38)
H-6 (3,38)	H-7 (2,65), H-1 (2,97), H-5 (3,11)
H-2' (3,75)	H-3'a (4,17)
H-3'b (3,78)	H-3'a (4,17)
H-3'a (4,17)	H-2' (3,75)
H-3 (5,03)	H-2ax (2,00), H-4ax (2,05)

- c. **Conclusión.**- Existe correspondencia entre el espectro ^1H - ^1H COSY obtenido para nuestro compuesto y aquel publicado en la bibliografía.

STANDARD 1H OBSERVE

Pulse Sequence: relayh
Solvent: CDC13
Ambient temperature
INDVA-300 "inova1"

Relax. delay 1.000 sec
COSY 90-90
Acq. time 0.128 sec
Width 4000.0 Hz
2D Width 4000.0 Hz
8 repetitions
128 increments
OBSERVE N1, 299.9468517 MHz
DATA PROCESSING
Sine bell 0.064 sec
F1 DATA PROCESSING
Sine bell 0.032 sec
FT size 1024 x 1024
Total time 19 min, 44 sec



Espectro N°5.- Espectro ¹H-¹H COSY (300 MHz) de la Escopolamina obtenida a partir de las hojas del toe (*D. sanguinea*)

5. Espectro ^1H - ^{13}C HETCOR (Espectro N°6)

a. Condiciones de trabajo

- i Equipo: Varian DPX-300 (300 MHz).
- ii Laboratorio: Productos Naturales–Instituto de Química (Universidad de São Paulo-Brasil).
- iii Operador: M.Sc. Ingrit Collantes Díaz.
- iv Fecha: 24.Oct.05.
- v Solvente: CDCl_3 .
- vi Muestra: Fracción N°6 (119 mg), ver Sec. H.6.f.i.

b. Características del espectro

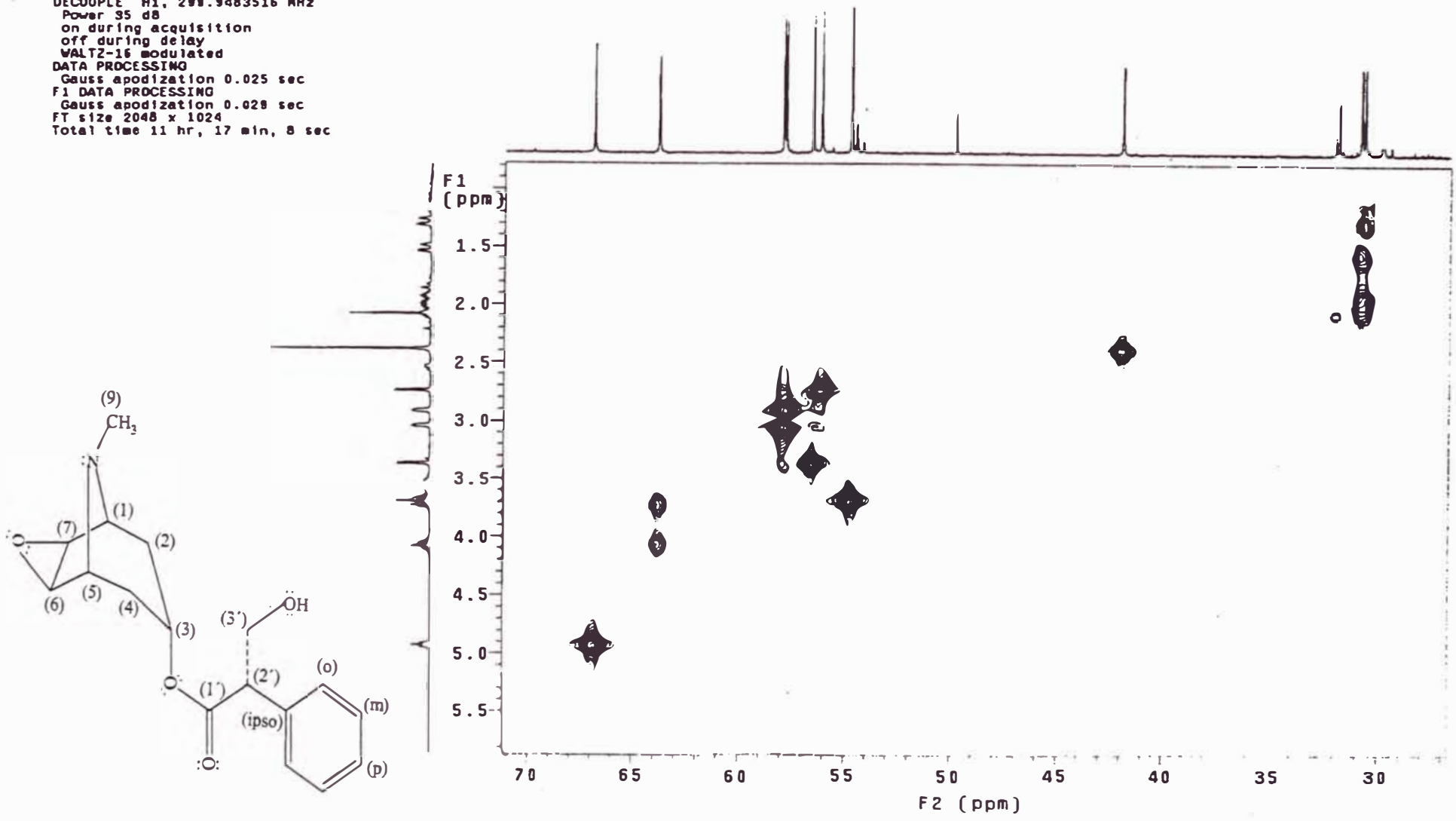
Correlaciones observadas en el espectro ^1H - ^{13}C HETCOR

C (δ ppm)	Hidrógenos correlacionados
C-2 (30,2)	H-2eq (1,34), H-2ax (2,00)
C-4 (30,3)	H-4eq (1,58), H-4ax (2,05)
C-9 (41,6)	H-9 (2,46)
C-2' (54,2)	H-2' (3,75)
C-7 (55,6)	H-7 (2,65)
C-6 (56,1)	H-6 (3,38)
C-1 (57,4)	H-1 (2,97)
C-5 (57,5)	H-5 (3,11)
C-3' (63,6)	H.3'b (3,78), H-3'a (4,17)
C-3 (66,5)	H-3 (5,03)

- d. Conclusión.-** Existe correspondencia entre el espectro ^1H - ^{13}C HETCOR obtenido para nuestro compuesto y aquel publicado en la bibliografía.

Pulse Sequence: hetcor
Solvent: CDC13
Ambient temperature
INOVA-300 "inoval"

Relax. delay 1.000 sec
Acq. time 8.054 sec
Width 18859.0 MHz
2D Width 4000.0 Hz
90 repetitions
400 increments
OBSERVE C13, 75.4216778 MHz
DECOUPLE H1, 299.9483516 MHz
Power 35 dB
on during acquisition
off during delay
WALTZ-16 modulated
DATA PROCESSING
Gauss apodization 0.025 sec
F1 DATA PROCESSING
Gauss apodization 0.028 sec
FT size 2048 x 1024
Total time 11 hr, 17 min, 8 sec



Espectro N°6.- Espectro ¹H-¹³C HETCOR (300 MHz) de la Escopolamina obtenida a partir de las hojas del toe (*D. sanguinea*)

IV. RESULTADOS Y CONCLUSIONES

RESULTADOS

1. Aislamiento de la escopolamina a partir de las hojas del toe (*D. sanguinea*).

A partir de 150 g de hojas del toe (*Datura sanguinea*), seca y molida (malla 315 μm) se obtuvo mediante extracción por solventes y partición líquido-líquido el Extracto Bruto de Alcaloides, el cual se purificó mediante cromatografía en columna, seguido de cromatografía en placa preparativa, obteniéndose así 119 mg de escopolamina, como un líquido resinoso de color pardo tenue.

La caracterización de la escopolamina se realizó mediante sus espectros de Masas, RMN¹H, RMN¹³C, ¹H-¹H COSY, y ¹H-¹³C HETCOR correspondiendo todos ellos a los valores y características referidas en la bibliografía para la escopolamina.

2. El análisis cualitativo de los metabolitos secundarios (marcha fitoquímica) presentes en las hojas del toe (*D. sanguinea*), según el procedimiento de Rondina y Coussio (1969), nos indica que contiene: Aminogrupos primarios y/o secundarios (++) , grupos fenólicos libres (+), alcaloides (+++), triterpenos y esteroides (+), catequinas (+) y saponinas (+).
3. El análisis cuantitativo del total de alcaloides contenidos en las hojas del toe (*D. sanguinea*), mediante el procedimiento de Pelt et al. (1967) proporciona 0,34%. Este valor está comprendido en el rango de porcentaje de alcaloides publicado en la bibliografía para las hojas de *D. sanguinea* (Drey & Foster-1953).

4. Se realizó el análisis de la información bibliográfica relativa a los estudios químicos de las hojas del toe (*D. sanguinea*) y de la escopolamina.

CONCLUSIONES

1. A partir de las hojas del toe (*D. sanguinea*) se aisló la escopolamina, la cual ha sido identificada mediante sus espectros de Masas, RMN¹H, RMN¹³C, ¹H-¹H COSY y ¹H-¹³C HETCOR, y la comparación de éstos con lo publicado en la bibliografía.
2. Se realizó el análisis cualitativo de los metabolitos secundarios (marcha fitoquímica) presentes en las hojas del toe (*D. sanguinea*), según el procedimiento de Rondina y Coussio (1969), logrando verificar la presencia de: Aminogrupos primarios y/o secundarios (++) , grupos fenólicos libres (+), alcaloides (+++), triterpenos y esteroides (+), catequinas (+) y saponinas (+).
3. Se realizó el análisis cuantitativo del total de alcaloides de las hojas del toe (*D. sanguinea*), según el procedimiento de Pelt et al. (1967), habiendo obtenido 0,34%.

V. BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Ayala, H., J. Sotelo, Cuantificación de los Alcaloides de *Brugmansia Arborea* “Floripondio” y Estudio de su Efecto Farmacológico sobre la Función Memoria del Sistema Nervioso Central. Trabajo de Aptitud Profesional para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, 1993, 104 págs.
2. Cabieses, F., Apuntes de Medicina Tradicional, CONCYTEC, Lima, 1993, págs. 192-193.
3. Chazin, W. and L. Colebrook, *J. Org. Chem.*, 51, 1243-1253 (1986).
“Use of Proton Spin-Lattice Relaxation and Nuclear Overhauser Effect Data in Structure Analysis of Alkaloids”.
4. Cóndor, E., Estudio Químico de la semillas del “Toc” (*Brugmansia sanguinea* (R. & P.) D. Don). Tesis de Licenciatura en Ciencias-Mención Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Ingeniería, Lima, 2000, 115 págs.
5. Cordell, G. (Ed.), *The Alkaloids. Chemistry and Pharmacology*, Vol. 44, Academic Press, Inc., London, 1993, págs. 1-3 (M. Lounasmaa and T. Tamminen, *The Tropane Alkaloids*, Sec. I. Introduction).
6. Drey, R. and G. Foster, *J. Pharm. Pharmacol.*, 5, 839-848 (1953).
“The Estimation of Tropane Alkaloids in Vegetable Drugs by Paper Partition Chromatography, with Special Reference to the Alkaloids of *Datura sanguinea*”.
7. Evans, W. and M. Partridge, *J. Pharm. Pharmacol.*, 4, 769-780 (1952).
“The Partition Chromatography of Alkaloids. Part IV. The Assay of Solanaceous Drugs”.
8. Evans, W. and M. Pe Than, *J. Pharm. Pharmacol.*, 147-154 (1961).
“The Alkaloids of the Genus *Datura*, Section *Brugmansia*. Part I. *D. cornigera* Hook”.

9. Evans, W., V. Major and M. Pe Than, *Planta Médica*, 13, 353-358 (1965).
“The Alkaloids of the Genus *Datura*, Section *Brugmansia*. Part III. *Datura sanguinea R. and P.*”.
10. Evans, W. and V. Major, *J. Chem. Soc.*, 1621-1623 (1966).
“The Alkaloids of the Genus *Datura*, Section *Brugmansia*. Part IV. New Alkaloids of *D. sanguinea R. and P.*”.
11. Evans, W. and V. Major, *J. Chem. Soc.*, 2775-2778 (1968).
“The Alkaloids of the Genus *Datura*, Section *Brugmansia*. Part V. Alkaloids of *D. sanguinea R. and P.* and Related Esters of Tropane-3 α ,6 β ,7 β -triol”.
12. Evans, W., M. Bristol and J. Lampard, *Lloydia*, 32, 123-130 (1969).
“The Alkaloids of the Genus *Datura*, Section *Brugmansia*. Part VI. Tree *Datura* Drugs (*Datura candida* cvs.) of the Colombian Sibundoy”.
13. Flores, J., Estudio Químico del “San Pedro” (*Echinopsis pachanoi Br. & R.*). Tesis de Licenciatura en Ciencias-Mención Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Ingeniería, Lima, 2000, 103 págs.
14. Griffin, W., *Planta Médica*, 14, 468-473 (1966).
“Alkaloids in *Datura*. Section *Brugmansia*”.
15. Hesse, H., H. Meier y B. Zeeh, *Métodos espectroscópicos en Química Orgánica*, Editorial Síntesis S.A., New York, 1997, págs. 163-179.
16. Hoet, P. y M. Ríos, *Bol. Soc. Quím. (Perú)*, 46, 113-121 (1980).
“Estudio Cuantitativo de los Alcaloides Totales en *Datura stramonium* del Perú. Metodología”.
17. Humprey, A. and D. O’Hagan, *Nat. Prod. Rep.*, 18, 494-502, (2001).
“Tropane Alkaloid Biosynthesis. A Century Old Problem Unresolved”.
18. Leary, J., *Lloydia*, 33, 264-266 (1970).
“Alkaloids of the Seeds of *Datura sanguinea*”.
19. Lock de Ugaz, O., *Investigación Fitoquímica*, Fondo Editorial, Pontificia Universidad Católica del Perú, Lima, 1994, págs. 4-7.

20. Miranda, M., *Farmacognosia y Productos Naturales*, Universidad de La Habana, Cuba, 2002, págs. 41-49.
21. Nathan, P., L. Arteaga de García, M. Reguero and B. Almanza, *Fitoterapia*, 64, 554 (1993).
“Constituents of *Brugmansia sanguinea* Leaves”.
22. Padula, L., L. Bandoni, R. Rondina and J. Coussio, *Planta Médica*, 29, 357-360 (1976).
“Quantitative Determination of Total Alkaloids and Scopolamine in *Datura ferox* Growing in Argentina”.
23. Parello, J., P. Longevialle, W. Vetter and A. McCloskey, *Boll. Soc. Chimique de la France*, 2787-2793 (1963).
“Structure de la Phyllalbine. Application de la Résonance Magnétique Nucléaire et de la Spectrométrie de Masse à L'étude des Dérivés du Tropane”.
24. Pavia, D., G. Lampman and G. Kriz, *Introduction to Spectroscopy*, Saunders Golden Sunburst Series, USA, 2^oEd., 1996, págs. 404-443.
25. Pelt, J., Cl. Vigneron and Ch. Younos, *Bull. Soc. Pharm. Nancy*, 72, 12-23 (1967).
“Comparaison de Diverses Méthodes Officielle Utilisées Pour le Dosage des Alcaloides des Solanacées”.
26. Polia, M., *Despierta, remedio, cuenta.....: adivinos y médicos del Ande*, Tomo I, PUCP, Lima, 1996, págs. 333-346.
27. Reyna, V., *Apuntes del curso de Alcaloides Indólicos-CQ 044*, Escuela Profesional de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Ingeniería, Lima, Set-Dic, 1992.
28. Reyna, V., *Apuntes del curso de Química Orgánica IV-CQ 442*, (Espectrometría de Masas, de RMN, UV, IR en separatas), Escuela Profesional de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Ingeniería, Lima, 1999-a.
29. Reyna, V., *Marcha Fitoquímica, Práctica de Laboratorio (Separata)*, Curso de Química de Productos Naturales-CQ 046, Escuela Profesional de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Ingeniería, Lima, 1999-b, 5 págs.

30. Reyna, V., Apuntes del curso de Química Orgánica IV-CQ 442, (Espectrometría de Masas, de RMN, UV, IR), Escuela Profesional de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Ingeniería, Lima, 2005.
31. Robins, R., J. Payne, J. Hamill and M. Rhodes, *Planta Médica*, 53, 474-478 (1987).
“Production of Hyoscyamine by “Hairy Root” Cultures of *Datura stramonium*”.
32. Robins, D., A. Watson, I. Freer and N. Walton, *J. Natural Prod.*, 56, 1234-1238 (1993).
“Stereochemistry of the Enzymic Processes Involved in the Biosynthesis of Scopolamine from Hyoscyamine”.
33. Rondina, R. and J. Coussio, *Revista de Investigaciones Agropecuarias-INTA (Argentina), Serie 2, Vol VI*, 33, 351-366 (1969).
“Estudio Fitoquímico de Plantas Medicinales”.
34. Sánchez, T., Estudio Químico de la liana “Ayahuasca” (*Banisteriopsis caapi Spruce ex. Grisebach Morton*). Tesis de Licenciatura en Ciencias-Mención Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Ingeniería, Lima, 2001, 124 págs.
35. Sarazin, C., G. Goethals, J. Séquin and J. Barbotin, *Magnetic Resonance in Chemistry*, 29, 291-300 (1991).
“Spectral Reassignment and Structure Elucidation of Scopolamine Free Base Through Two-Dimensional NMR Techniques”.
36. Schultes, R. and Raffauf, *The Healing Forest*, Dioscorides Press, Portland, Oregon, 1990, págs. 419-424.
37. Schultes, R. and A. Hofmann, *Plantas de los Dioses. Orígenes del uso de los alucinógenos*, Fondo de Cultura Económica, México, 1993 (c.1979), págs. 128-131 (*Brugmansia. Floripondio*).
38. Shimomura, K., K. Yoshimatsu, K. Ishimaru and M. Sauerwein, “Tropane Alkaloids in Root Cultures of Solanaceous Plant”, in Attar-Rahman (Ed.), *Studies in Natural Products Chemistry, Vol. 17, Structure and Chemistry (Part D)*, Elsevier, 1995, págs. 416-419.

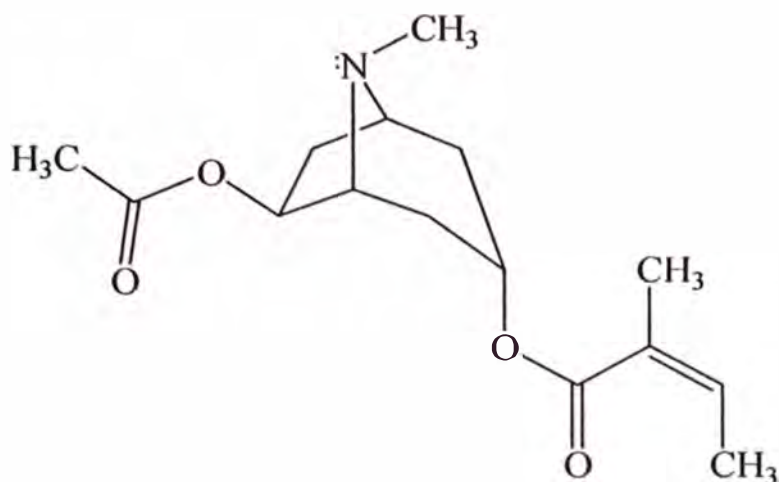
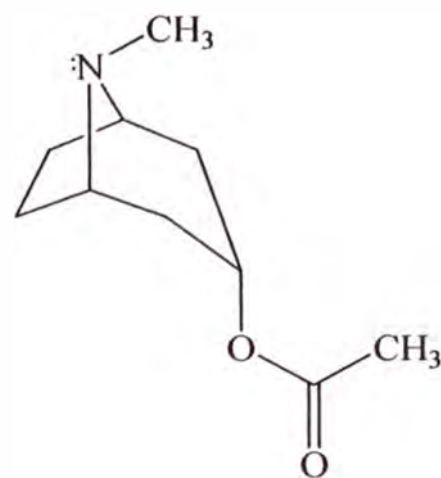
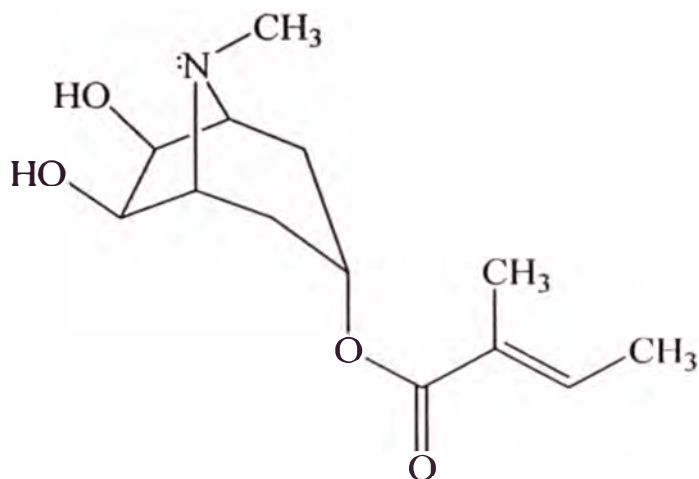
39. Silverstein, R., G. Bassler and T. Morrill, *Spectrometric Identification of Organic Compounds*, John Wiley and Sons, New York, 6^o Ed., 1998, págs. 250-274.
40. Southon, I. and J. Buckingham, *Dictionary of Alkaloids*, Chapman and Hall, London, 1989, págs. 952, 1091.
41. *The Merck Index*, 12^o Ed., 1996, pág. 1444 (escopolamina); pág. 835 (hiosciamina).
42. Torpoco, V., *Constituyentes Químicos (Alcaloides) de la "chacrana" (Psychotria viridis (Ruiz & Pavón))*. Tesis de Licenciatura en Ciencias-Mención Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Ingeniería, Lima, 1993, 115 págs.
43. *United States Pharmacopoeia-USP*, 20th Ed., (1980), pág. 913. "Alkaloidal Drug Assays; Proximate Assays".
44. Vitale, A., A. Acher and A. Pomilio, *J. of Ethnopharmacology*, 49, 81-89 (1995). "Alkaloids of *Datura ferox* from Argentina".
45. Whitte, L., K. Müller and H. Arfmann, *Planta médica*, 53, 192-197 (1987). "Investigation of the Alkaloid Pattern of *Datura innoxia* Plants by Capillary Gas-Liquid-Chromatography-Mass Spectrometry".

VI. ANEXOS

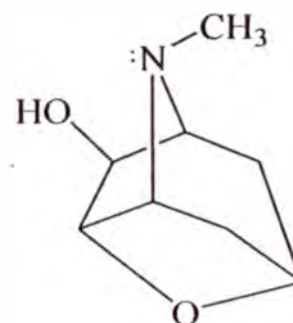
ANEXO N°1

ALCALOIDES EN TRAZAS EN LAS HOJAS DEL TOE (*D. sanguinea R. & P.*)

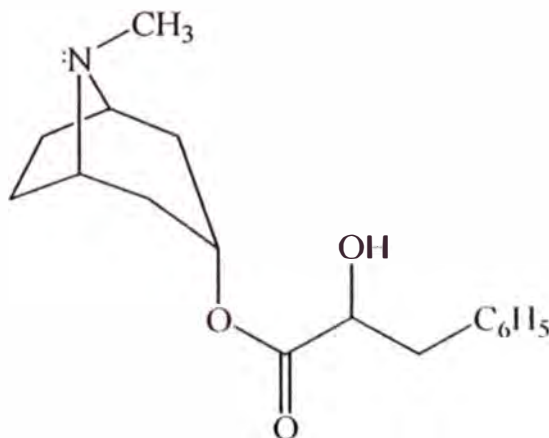
Evans et al. (1966 y 1968)

a) (-)-3 α -tigloiloxi-6 β -acetoxitropanob) 3 α -acetoxitropano

c) Meteloidina



d) Oscina



e) Litorina

ANEXO N°2

MARCHA FITOQUÍMICA PRELIMINAR (Reyna, 1999-b)

(De acuerdo al procedimiento de Rondina & Coussio–1969)

La Marcha Fitoquímica Preliminar propuesta por Rondina & Coussio (1969) se basa en el fraccionamiento de un extracto metanólico de la muestra vegetal estudiada en diferentes solventes y la identificación de los tipos de principios activos presentes en cada uno de ellos mediante reacciones de coloración y/o precipitación.

1. Obtención de las fracciones

a. *Fracción (a)*

- 1 Se toman 6,0 g de muestra seca y pulverizada y se mezclan en un balón de 100 mL con 50 mL de metanol. Se deja macerar durante 70 horas a temperatura ambiente.
- 11 La mezcla se calienta a reflujo durante 4 horas. Se filtra en caliente lavando el residuo con metanol hasta completar 50 mL. Esto constituye la *fracción (a)*.

b. *Fracción (b)*

- 1 Se separa 5 mL de la *fracción (a)* y el resto se lleva a sequedad en un rotavapor.
- 11 El residuo se extrae con 10 mL de ácido clorhídrico al 1% y se filtra utilizando papel de filtro lento. La operación se repite con 5 mL de ácido clorhídrico al 1%. Las soluciones ácidas se reúnen en un erlenmeyer de 50 mL y se guardan.
- iii Los residuos insolubles en la solución ácida se disuelven en 5 mL de cloroformo con ayuda de calor y fuerte agitación. Esta solución se filtra a través de celita completando a través del filtro a 5 mL. Esto constituye la *fracción (b)*.

c. Fracción (c)

- 1 La solución ácida que se guardó en la etapa anterior se lleva a pH 9 y utilizando $\text{NH}_{3(\text{ac})}$ 15 N, y luego se extrae dos veces con 25 mL de cloroformo CHCl_3 en un embudo de separación de 125 mL.
- ii La fase clorofórmica se lava con 10 mL de agua. El agua de lavado se reúne con la fase acuosa obtenida.
- iii La fase clorofórmica se seca con sulfato de sodio y se filtra completando a 50 mL. Esto constituye la *fracción (c)*.

d. Fracción (d)

- i La fase acuosa obtenida anteriormente se semisatura con sulfato de sodio agregando 0,1 g de sal por mL de solución. Luego se extrae dos veces con 25 mL de una mezcla de cloroformo-etanol (3:2) en un embudo de separación de 125 mL.
- ii Se lava la fase orgánica con 10 mL de solución semisaturada de sulfato de sodio reuniendo toda la fase acuosa.
- iii La fase orgánica se seca con sulfato de sodio y se filtra obteniéndose la *fracción (d)*.

e. Fracción (e)

- 1 La fase acuosa obtenida en la etapa anterior constituye la *fracción (e)*.

f. Fracción (f)

- 1 En un tubo de ensayo de 18x160 mm se calienta a 100 °C y con agitación 1 g de muestra pulverizada en 10 mL de agua durante 15 minutos.
- ii Se filtra en caliente utilizando papel de filtro rápido, se completa el filtrado a 10 mL, y se deja enfriar. Esta solución constituye la *fracción (f)*.

2. Pruebas de identificación de principios activos.

a. Prueba de la ninhidrina sobre las *fracciones (a) y (f)* (Aminogrupos primarios y/o secundarios).

- i Sobre papel de filtro lento de 5 cm de diámetro se agregan dos gotas de la fracción (a) y sobre otro papel, dos gotas de la fracción (f) con una pipeta Pasteur. Los papeles se dejan secar por 5 minutos.
- ii Sobre cada uno de los papeles se agregan dos gotas de solución de ninhidrina al 0,2% en etanol.
- iii Se preparan blancos de metanol-ninhidrina y agua-ninhidrina del mismo modo.
- iv Los papeles se colocan en una estufa a 110 °C durante 30 minutos.

Observación.- La aparición de una mancha de color violeta indica la presencia de aminogrupos primarios y/o secundarios.

b. Reacción con cloruro férrico sobre la solución acuosa de la *fracción (a)* (Grupos fenólicos libres).

- i El resto de la fracción (a) se lleva a sequedad en el rotavapor.
- ii El residuo se disuelve en 0,5 mL de agua y se filtra dicha solución (“solución a”), a través de un embudo de 3,5 cm de diámetro utilizando papel de filtro lento, a un tubo de ensayo de 13x100 mm.
- iii Se colocan dos gotas de “solución a” sobre una placa de toque blanca y se agrega una gota de solución acuosa de cloruro férrico al 1%.

Observación.- La observación da un color azul, verde, negro o marrón indica la presencia de grupos fenólicos libres.

c. Reacción con solución de gelatina sobre la solución acuosa de la *fracción (a)* (Taninos).

- i Se colocan cuatro gotas de “solución a” (ver 2.b.ii) sobre una luna de reloj de 7,5 cm de diámetro apoyada en fondo negro, y se adicionan dos gotas de solución de gelatina al 0,5%.

Observación.- La formación de un precipitado blanco indica la presencia de taninos.

d. Reacción de Liebermann–Burchard sobre las *fracciones (b), (c)* y la “solución b” de la *fracción (d)* (Triterpenoides y esteroides).

Nota: El color y la intensidad varían de acuerdo a la estructura del compuesto, y hay algunos compuestos que no desarrollan color.

- i Se separan 10 mL de la *fracción (c)* en un tubo de 18x160 mm. Se concentra hasta un volumen de 0,5 mL en el rotavapor y se traslada la solución a un tubo de 0,9 cm de diámetro.
- ii En dos tubos de ensayo de 0,9 cm de diámetro se adicionan 8 gotas de la *fracción (b)*.
- iii Se agrega a cada tubo 8 gotas de anhídrido acético y se agita fuertemente durante 20 segundos.
- iv Se deja resbalar por la pared de cada tubo 2 gotas de ácido sulfúrico concentrado sin agitar y se observa.
- v La *fracción (d)* se lleva a sequedad con un rotavapor y se redisuelve en 2,5 mL de etanol. Se filtra la solución a través de un embudo de 3,5 cm de diámetro y papel filtro lento, recibiendo el filtrado en un tubo de ensayo de 13x100 mm. Esto constituye la “solución b”.
- vi Se coloca 0,8 mL de la “solución b” en un tubo de ensayo de 13x100 mm y se lleva a sequedad con la ayuda de un baño maría. El residuo se disuelve en 0,5 mL de cloroformo y se siguen los pasos iii y iv.

Observación.- La formación de una fase superior verde, azul o negra a partir de una interfase de color rojo o naranja indica reacción positiva para triterpenos y esteroides.

e. Reacción de Bornträger sobre la *fracción (b)* (Naftoquinonas y antraquinonas, antranas y antranoles).

- i El resto de la *fracción (b)* se dispone en un tubo de ensayo de 18x150 mm, se añade 5 mL de hidróxido de sodio al 5% en agua y se agita.

Observación.- Una coloración roja en la fase acuosa indica la presencia de quinonas, antronas o antranoles.

f. Reacciones para alcaloides sobre la *fracción (c)* y la “solución b” (Ver sección 2.d.v)

- i Se lleva a sequedad la *fracción (c)* y el residuo se disuelve en 2 mL de solución de ácido clorhídrico HCl al 1%. Se colocan 3 gotas de la solución ácida en cada una de tres lunas de reloj de 7,5 mm de diámetro apoyadas sobre fondo negro. A la primera se le agregan 2 gotas del reactivo de Dragendorff, a la segunda, 2 gotas del reactivo de Mayer, y a la tercera, 2 gotas del reactivo de Wagner.
- ii En un tubo de ensayo de 13x100 mm se lleva a sequedad 0,8 mL de la “solución b” con la ayuda de rotavapor. El residuo se disuelve en 0,3 mL de solución de ácido clorhídrico HCl al 1%. Se filtra a través de papel de filtro lento y se reparte el filtrado en tres lunas de reloj de 7,5 cm de diámetro. Luego se adicionan los reactivos de Dragendorff, Mayer y Wagner respectivamente.

Observación.- La observación de turbidez o precipitados anaranjado, crema y marrón en las reacciones de Dragendorff, Mayer y Wagner respectivamente indican la presencia de alcaloides. La ausencia de precipitado o turbidez para alguno de los reactivos indica que la muestra no tiene alcaloides.

g. Reacción de Rosenheim sobre la “solución b” (Ver sección 2.d.v) y sobre la *fracción (e)* (Leucoantocianidinas y catequinas).

- i En un tubo de ensayo de 13x100 mm se colocan tres gotas de la “solución b” y se agrega 2 mL de agua. En otro tubo igual se colocan 2 mL de la *fracción (e)*.
- ii A cada tubo se le agrega 1 mL de ácido clorhídrico concentrado, se agita y se calienta durante 10 minutos en baño maría.

iii Se deja enfriar las mezclas, se agrega en cada tubo 8 gotas de alcohol amílico y se agita.

iv Las mezclas se dejan en reposo y luego se observan las fases amílicas.

Observación.- Una coloración roja en la fase amílica indica la presencia de leucoantocianidinas, un color marrón indica la presencia de catequinas.

h. Reacción de Shinoda sobre la “solución b” (Ver 2.d.v) y sobre la *fracción (e)*. (Flavonoides, excepto chalconas, dihidrochalconas, catequinas e isoflavonas).

i En un tubo de ensayo de 13x100 mm se colocan tres gotas de la “solución b” y se agrega 2 mL de agua. En otro tubo igual se colocan 2 mL de la *fracción (e)*.

ii A cada tubo se le agrega 1 mL de ácido clorhídrico concentrado y se agita bien.

iii A cada tubo se agregan limaduras de magnesio y se agita. Luego se deja reposar los tubos por 5 minutos.

iv Se adicionan 8 gotas de alcohol amílico a cada tubo, se agita y se deja reposar nuevamente. Se observa el color de la fase amílica.

Observación.- Una coloración roja o rosada en la fase amílica indica la presencia de flavonoides (excepto chalconas, auronas, catequinas e isoflavonas).

i. Prueba de la espuma sobre la *fracción (f)* (saponinas)

i Se coloca 1 mL de la *fracción (f)* en un tubo de ensayo de 13x100 mm y se agita durante 15 segundos. Luego se deja en reposo durante 15 minutos. Se mide la altura de la espuma.

Observación.- La formación de espuma de una altura mayor a 5 mm y que permanezca por lo menos 15 minutos indica la presencia de saponinas.

ANEXO N°3

ANÁLISIS CUALITATIVO PARA LA DETECCIÓN DE ALCALOIDES PRESENTES EN PLANTAS (Reyna-1992)

Para la detección de alcaloides presentes en plantas se utilizan muchos reactivos de precipitación y de coloración, algunos de los cuales se consideran de aplicación general mientras que otros son de uso más selectivo. Entre los reactivos generales de precipitación podemos citar el “reactivo de Mayer” (mercurio-yoduro de potasio) y el “reactivo de Dragendorff” (yoduro de bismuto y potasio).

Todos estos reactivos actúan sobre los alcaloides en soluciones de ácido clorhídrico o sulfúrico diluidos. Debe usarse unas gotas del reactivo, pues un exceso puede disolver el precipitado.

A continuación se describen los procedimientos y la preparación de los reactivos para los test de Mayer y Dragendorff.

A. TEST DE MAYER

Este reactivo da con casi todas las soluciones de alcaloides, precipitados de color blanco, blanco amarillento, o amarillo limón claro. Los precipitados son cristalizables. Es un reactivo muy sensible.

I. Procedimiento

- i** Se colocan 0,5 g de hojas desmenuzadas o pulverizadas en un tubo de ensayo de 18x150 mm. (para pruebas comparativas deberá hacerse con muestras debidamente pesadas y las mismas cantidades).
- ii** Se adiciona 10 mL de etanol y se coloca en un “baño maría” (baño de aceite a 90 °C), y se hace hervir por 5 minutos.
- iii** Se filtra la solución etanólica, a través de papel filtro “rápido” y un embudo de vidrio pequeño, recibiendo los filtrados en un tubo de ensayo seco de 18x150mm.

iv Se concentra la solución etanólica a sequedad. Para esto hay tres alternativas:

- Utilizando el “baño maría”
- Utilizando el rotavapor
- Utilizando un “mechero de bolsillo”

v Una vez seco, se deja enfriar y sobre el residuo se agrega de 2 a 5 gotas de una solución de ácido clorhídrico al 2%. Se agita el tubo de manera de disolver todas las partículas sólidas.

vi Se filtra el líquido (debe tenerse un filtrado completamente limpio) a dos tubos de ensayo de 13x100 mm secos de modo que en cada uno haya volúmenes aproximadamente iguales.

Se coloca ambos tubos delante de un papel blanco.

Separadamente, a cada uno de los tubos se le agrega, gota a gota, 2 gotas de “reactivo de Mayer” y se observan los cambios que se producen.

La precipitación de un sólido blancuzco o amarillento lechoso indica la presencia de alcaloides.

Si no hay cambio en la apariencia de la solución esto indicará la ausencia de alcaloides.

2. Reactivo de Mayer

Se disuelven 1,36 g de cloruro de mercurio (II) HgCl_2 en 60 mL de agua y 5 g de yoduro de potasio KI en 10 mL de agua. Se juntan las dos soluciones y se afora a 100 mL.

B. TEST DE DRAGENDORFF

Este reactivo da con los alcaloides, en soluciones débilmente aciduladas con ácido sulfúrico, precipitados de color rojo o anaranjado, amorfos, poco estables y cristalizables.

1. Procedimiento

El procedimiento es el mismo que aquel del test de Mayer, excepto que el reactivo utilizado es el de Dragendorff.

2. Reactivo de Dragendorff

Se disuelven 8 g de nitrato de bismuto pentahidratado $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ en 20 mL de ácido nítrico HNO_3 concentrado ($d = 1,18 \text{ g/mL}$), y 27,2 g de yoduro de potasio KI en 50 mL de agua. Se mezclan las dos soluciones, y se deja en reposo durante 24 horas. Se decanta y se afora a 100 mL.

ANEXO N°4**IDENTIFICACIÓN BOTÁNICA DEL TOE (*Datura sanguinea*)**

por la M.Sc. Blga. Joaquina Albán Castillo
Jefa del Departamento de Etnobotánica y Botánica Económica
Jefe Herbario San Marcos (USM)
Museo de Historia Natural-Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Nombre común : Toe, misha toro, floripondio (Prov. Huancabamba, Piura).

Nombre científico: *Datura sanguinea* (R. & P.)

Familia: Solanaceae.

La planta de toe es un arbusto que presenta largas flores tubulares, de color rojo sangre en la mitad superior y amarillas en la base (Fotos N°3 y N°4).

Dentro de la tribu *Datureae* se encuentran dos géneros: *Datura* y *Brugmansia*. Entre las especies de *Datura* tenemos a la *D. stramonium*, especie herbácea ampliamente distribuida en regiones cálidas del mundo. Otras especies de *Datura* incluye a *D. ferox* (China), *D. quercifolia* (México), *D. pruinosa* (México), *D. leichhardtii* (Australia central), *D. innoxia* (México), *D. discolor* (India), *D. metal* (Asia), *D. wrightii* (USA), *D. Ceratocaula* (México y América Central) y *D. sanguinea* (Colombia, Ecuador y Perú).

La mayoría de estas especies son de importancia social y religiosa en las antiguas culturas Andinas

Lima, 17 de febrero del 2006

Mag. Joaquina Adelaida Albán Castillo



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
MUSEO DE HISTORIA NATURAL



CONSTANCIA

EI JEFE DEL DEPARTAMENTO DE ETNOBOTANICA Y BOTÁNICA ECONOMICA DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL, DEJA CONSTANCIA QUE:

La muestra vegetal recibida del Bachiller **Golfer Muedas Taipe**, procedente de la Localidad de Sapalache, Piura, ha sido determinada según el sistema de Clasificación de Cronquist, Arthur, 1981 como sigue:

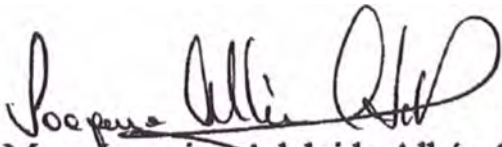
DIVISIÓN	Magnoliophyta
CLASE	Magnoliopsida
SUBCLASE	Asteridae
ORDEN	Solanales
FAMILIA	Solanaceae
GÉNERO	Datura
ESPECIE	<i>D. sanguinea</i> (R. & P.) D. Don
PROCEDENCIA:	Distrito el Carmen de la Frontera, Provincia de Huancabamba, Piura

Número de Colección: Joaquina Albán C, 14618 (USM,MO)

NOMBRE VERNACULAR: Toe

Se expide la siguiente constancia a solicitud del interesado.

Lima, 17 de Febrero de 2006


Mag. Joaquina Adelaida Albán Castillo
Jefe

Departamento de Etnobotánica y Botánica Económica
Museo de Historia Natural. U.N.M.S.M.



Foto N°3.- Arbusto de toe (*D. sanguinea* (R. & P.)); Cascapampa, Huancabamba, Dpto. Piura, Ene'06 (Foto V. Reyna).



Foto N°4.- Flores del toe (*Datura sanguinea* (R. & P.)) ; Sapalache, Huancabamba, Dpto. Piura, Jul'88 (Foto V. Reyna).

ANEXO N°5

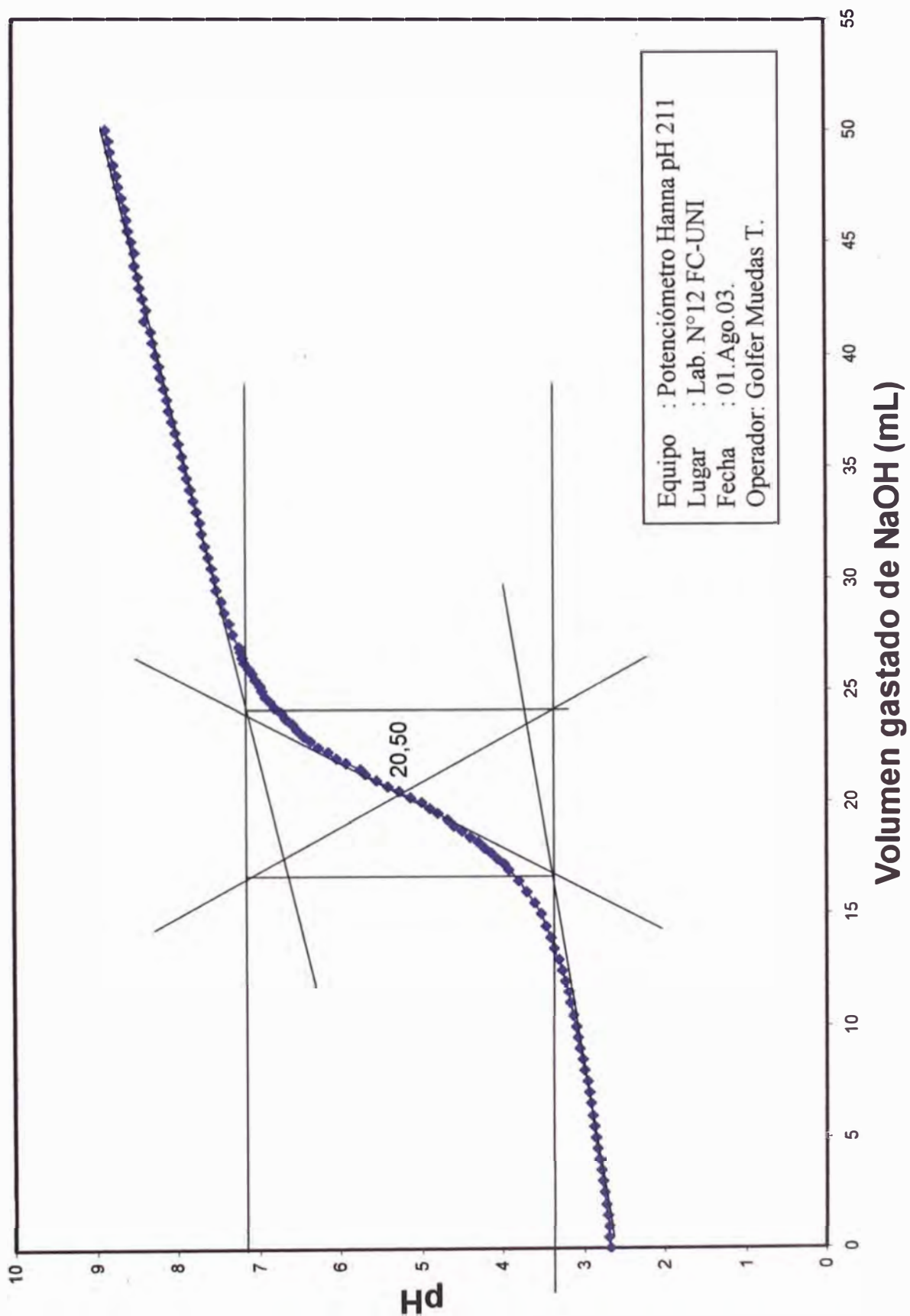
**RESULTADOS DE LA MARCHA FITOQUÍMICA PRELIMINAR
DE LAS HOJAS DEL TOE (*Datura sanguinea*)**

Principio Activo	Pruebas de coloración	Fracción	Resultados	Observaciones (color de soluciones y/o precipitados)
Aminogrupos primarios y/o secundarios	Ninhidrina	a	++	Mancha de color violeta
		f	++	Mancha de color violeta
Grupos fenólicos libres	Cloruro férrico	a	+	Color verde claro
Taninos	Gelatina	a	-	No hay formación de precipitado
Triptenos y esteroides	Reacción de Liebermann Burchard	b	+	Anillos-anaranjado-azul - verde
		c	+	Anillos anaranjado
		d	+	Anillos anaranjado-rojo-verde
Quinonas, antranas o antranoles	Reacción de Bornträger	b	-	Fase acuosa de color verde claro
Alcaloides	Reacción de Dragendorff	c	+++	Precipitado anaranjado
		d	-	No hay formación de precipitado
	Reactivo de Mayer	c	+++	Precipitado blanco
		d	-	No hay formación de precipitado
	Reactivo de Wagner	c	+++	Precipitado marrón
		d	-	No hay formación de precipitado
Leucoantocianidinas (rojo), catequinas (marrón)	Reacción de Rosenheim	d	-	Fase amilica de color amarillo
		e	+	Fase amilica de color marrón
Flavonoides excepto chalconas, auronas, catequinas e isoflavonas	Reacción de Shinoda	d	-	Fase amilica de color amarillo
		e	-	Fase amilica de color anaranjado
Saponinas	Prueba de la espuma	f	+	Formación de espuma (h=5mm)

Convención: Abundante (+++), regular (++) , poco (+), negativo(-)

ANEXO N°6
CURVA DE TITULACIÓN POTENCIOMÉTRICA DE LA
ESCOPOLAMINA

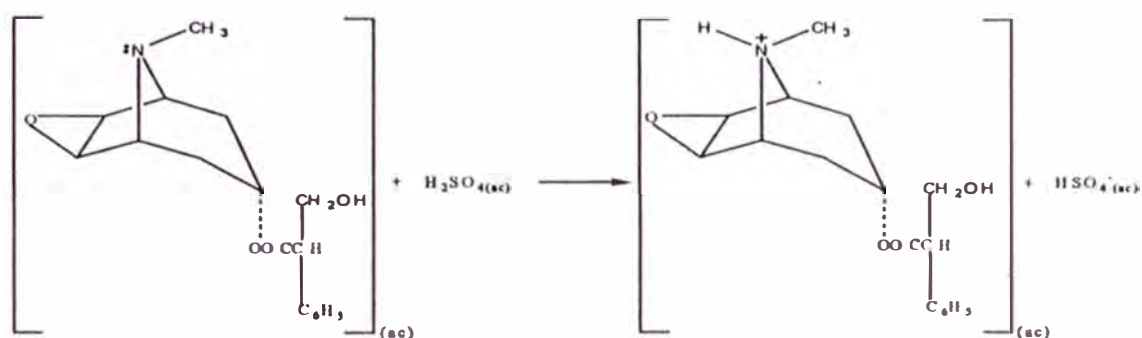
(ver Sec. III.G. Análisis cuantitativo de alcaloides pág.67)



ANEXO N°7
ANÁLISIS CUANTITATIVO DE ALCALOIDES EN LAS HOJAS
DEL TOE (*D. sanguinea*)

(Segunda determinación)

- i Al agregar un exceso de solución de ácido sulfúrico $\text{H}_2\text{SO}_{4(\text{ac})}$ (95 mL, 0,0223 N) al Extracto Bruto de Alcaloides, ocurre la reacción:



y se tiene que:

$\text{N}^\circ \text{ meq ácido (sobrante)} = \text{N}^\circ \text{ meq ácido total} - \text{N}^\circ \text{ meq alcaloide...} (\alpha)$

donde $\text{N}^\circ \text{ meq ácido total} = N \times V = 0,0223 \times 95 = 2,1185 \text{ meq...} (\beta)$

- ii El ácido sulfúrico $\text{H}_2\text{SO}_{4(\text{ac})}$ sobrante, que queda sin reaccionar con el alcaloide, se titula con 85,5 mL de solución de hidróxido de sodio $\text{NaOH}_{(\text{ac})}$ 0,0190 N, según la ecuación:



y en el punto de equivalencia se cumple que:

$\text{N}^\circ \text{ meq ácido (sobrante)} = \text{N}^\circ \text{ meq base...} (\gamma)$

- iii La cantidad (meq) de hidróxido de sodio ($N = 0,0190$ y $V = 85,5 \text{ mL}$) se determina por la relación: $\text{N}^\circ \text{ meq} = N \times V (\text{mL})$

$$N^{\circ} \text{ meq base} = N_{\text{NaOH}} \times V_{\text{NaOH}}$$

$$N^{\circ} \text{ meq}_{(\text{NaOH})} = 0,0190 \text{ N} \times 85,5 \text{ mL}$$

$$N^{\circ} \text{ meq}_{(\text{NaOH})} = 1,6245 \text{ meq}$$

iv La cantidad (meq) de ácido sobrante se determina por la relación (γ):

$$N^{\circ} \text{ de meq (H}_2\text{SO}_4\text{) sobrante} = \mathbf{1,6245 \text{ meq}} \dots \dots \dots (\epsilon)$$

v La cantidad (en meq) de alcaloides presentes se determina reemplazando las cantidades (β) y (ϵ) en la relación (α):

$$\begin{aligned} N^{\circ} \text{ meq de alcaloide} &= N^{\circ} \text{ meq de ácido total} - N^{\circ} \text{ meq de ácido (sobrante)} \\ &= 2,1185 \text{ meq} - 1,6245 \text{ meq} \\ &= \mathbf{0,4940 \text{ meq}} \end{aligned}$$

vi La masa (en mg) de alcaloide (escopolamina) se determina teniendo en cuenta que:

$$N^{\circ} \text{ eq} = \frac{m}{1 \text{ Eq} - \text{g}} \quad \text{y} \quad 1 \text{ Eq} - \text{g} = \frac{\bar{M}}{\theta}$$

donde, θ es el número de hidrógenos intercambiados en la reacción ácido base (para la escopolamina $\theta = 1$) y \bar{M} es la masa molecular de la sustancia (para la escopolamina $\bar{M} = 303,36 \text{ g/mol}$).

Luego:

$$\begin{aligned} W &= N^{\circ} \text{ meq} \times \bar{M} \\ W &= (0,4940) (303,36) \end{aligned}$$

$$\mathbf{W = 150 \text{ mg de escopolamina (en 10 g de muestra seca)}}$$

vii El porcentaje de alcaloides en la muestra se determina por la relación:

$$\begin{array}{l} 50 \text{ g} \longrightarrow 100\% \\ 0,150 \text{ g} \longrightarrow \% \text{ de alcaloides (como escopolamina)} \end{array}$$

$$\text{Porcentaje de alcaloides (como escopolamina)} = \frac{0,150 \text{ g} \times 100 \%}{50\text{g}} = 0,30\%$$

ANEXO N°8

ENSAYOS DE AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE ALCALOIDES

N°	Fecha	Actividad realizada*	Resultados
1	07 Jun'01 a 10 Ene'02	Obtención del EBA.1 (a partir de 150 g de hojas del toe)	i EBA.1 = 914 mg. ii CCF del EBA.1: Presencia del alcaloide mayoritario.
2	17 Ene'02 a 26 Mar'03	Obtención del EBA.2 (a partir de 150 g de hojas del toe)	i EBA.2 = 793 mg. ii CCF del EBA.2: Presencia del alcaloide mayoritario.
3	07 May'03 a 12 May'03	CC1 del EBA.2	i Se obtuvieron 31 fracciones. ii Análisis por CCF de fracciones, presencia de alcaloides en fracciones N°1 (383 mg), N°2 (156 mg), N°3 (51 mg), N°4 (25 mg) y N°5 (14 mg).
4	16 Ene'03 a 23 May'03	Obtención del EBA.3 (a partir de 150 g de hojas del toe)	i EBA.3 = 539 mg. ii CCF del EBA.3: Presencia del alcaloide mayoritario.
5	21 Ene'03 a 22 Jul'03	Obtención del EBA.4 (a partir de 100 g de hojas del toe)	i EBA.4 = 399 mg. ii CCF del EBA.4: Presencia del alcaloide mayoritario.
6	10 Jul'03 a 11 Nov'03	Ensayo de formación del picrato de alcaloide, con muestra purificada f3 (CC1-EBA.2) (51 mg)	i Obtención de pequeña cantidad de cristales de color amarillo (< 10 mg). ii Punto de fusión = 168-182 °C. Referencia: Picrato de escopolamina = 187-188 °C
7	06 Ene'04 a 13 Ene'04	CC1 del EBA.4	i Se obtuvieron 7 fracciones. ii Análisis por CCF de fracciones, presencia de alcaloides en fracciones N°1 (156 mg), N°2 (29 mg), N°3 (29 mg) y N°4 (19 mg).

* Abreviaturas: EBA = Extracto Bruto de Alcaloides; CCF = Cromatografía en Capa Fina; CC = Cromatografía en Columna.

Nº	Fecha	Actividad realizada*	Resultados
8	20 Jul'04 a 21 Oct'04	Obtención del EBA.5 (a partir de 200 g de hojas del toe)	<u>i</u> EBA.5 = 753 mg. <u>ii</u> CCF del EBA.5: Presencia del alcaloide mayoritario.
9	21 Jul'04 a 26 Jul'04	CC2 de f1-f4 (CC1-EBA.4) (155 mg)	<u>i</u> Se obtuvieron 6 fracciones. <u>ii</u> Análisis por CCF de fracciones, presencia de alcaloides en fracciones N°5 (28 mg) y N°6 (25 mg).
10	01 Mar'05 a 11 Mar'05	CC3 de f5-f6 (CC2/f1-f4, CC1-EBA.4) (53 mg)	<u>i</u> Se obtuvieron 11 fracciones. <u>ii</u> Análisis por CCF de fracciones, presencia de alcaloides en fracciones N°4 (21 mg) y N°5 (8 mg).
11	31 Mar'05 a 14 Abr'05	CPP de f4-f5 (CC3/ f5-f6, CC2) (29 mg)	<u>i</u> Se obtuvieron 5 fracciones. <u>ii</u> Análisis por CCF de fracciones, presencia de alcaloides en fracciones N°4 (6 mg) y N°5 (4 mg).
12	11 Feb'05 a 14 Feb'05	CC1 del EBA.5	<u>i</u> Se obtuvieron 13 fracciones. <u>ii</u> Análisis por CCF de fracciones, presencia de alcaloides en fracciones N°2 (2 mg), N°3 (6 mg), N°4 (291 mg), N°5 (310 mg), N°8 (30 mg) y N°9 (8 mg).
13	21 Feb'05 a 05 Abr'05	Obtención del EBA.6 (a partir de 200 g de hojas del toe)	<u>i</u> EBA.6 = 659 mg. <u>ii</u> CCF del EBA.6: Presencia del alcaloide mayoritario.

* Abreviaturas: EBA = Extracto Bruto de Alcaloides; CCF = Cromatografía en Capa Fina; CC = Cromatografía en Columna.

ANEXO N°9
OBTENCIÓN DEL EXTRACTO BRUTO DE ALCALOIDES N°3
(16 Ene'03-23 May'03)

1. Extracción sólido-líquido: Obtención del Extracto Bruto Orgánico

a) Desengrase con n-hexano

- i** En un frasco erlenmeyer de 1 L se colocó 150 g de la muestra y se adicionó 300 mL de n-hexano. La mezcla se puso en agitación*, a temperatura ambiente, durante cuatro horas, y luego se dejó en reposo hasta el día siguiente (20h).
- ii** Se separó el líquido sobrenadante de color verde oscuro, con una pipeta volumétrica de 50 mL. Al sólido restante se adicionó una nueva porción de 300 mL de n-hexano y se agitó. Este procedimiento se realizó un total de 15 veces.
- iii** Finalmente el sólido húmedo se transfirió a una bandeja de 17 cm x 26 cm, y se dejó que evapore el solvente a temperatura ambiente.

b) Extracción con solventes

- i** La muestra seca y desengrasada se introdujo en un frasco erlenmeyer de 1L y se maceró con 400 mL de metanol durante 17 horas.
- ii** Se separó el líquido sobrenadante, con una pipeta volumétrica de 50 mL. Al sólido restante se adicionó una nueva porción de 400 mL de metanol, dejándolo en reposo durante 24 horas.
- iii** Finalmente, se realizó una tercera maceración durante 5 días. Esto fue la última maceración debido a que el residuo sólido dio test de Mayer negativo.

* Para la agitación se utilizó un agitador magnético eléctrico de eje flexible con paleta de vidrio MLW ER 10.

c) Eliminación del solvente

Todos los extractos orgánicos se juntaron y luego se concentró en el rotavapor (35 °C, 300-50 mbar), casi hasta sequedad, obteniéndose el Extracto Bruto Orgánico, de color marrón oscuro, que no se pesó.

2. Separación líquido-líquido: Obtención del Extracto Bruto de Alcaloides

d) Disolución del extracto bruto orgánico con solución ácida

i El extracto bruto orgánico se disolvió en 50 mL de solución de ácido clorhídrico $\text{HCl}_{(\text{ac})}$ 1,0 M. Seguidamente la disolución acuosa ácida se filtró a través de papel de filtro “lento”.

ii Este procedimiento se realizó cinco veces más con porciones de 50 mL de ácido. El sólido remanente dio prueba negativa de alcaloides (test de Mayer) y se descartó.

iii Los extractos acuosos ácidos, de color marrón claro, se reunieron (volumen total = 300 mL) y se colocaron en un embudo de separación de 1 L.

e) Lavado de la disolución ácida con solventes orgánicos

i La disolución ácida, que contiene los alcaloides como sales, se lavó 3 veces con porciones de 50 mL diclorometano.

ii Se separó la fase orgánica (que no contiene alcaloides, test de Mayer negativo), de color amarillo, y se descartó.

f) Alcalinización del extracto con solución de amoníaco $\text{NH}_{3(\text{ac})}$ 15 N

La disolución acuosa ácida se alcalinizó con 100 mL de $\text{NH}_{3(\text{ac})}$ 15 N hasta pH 9. Se observó el oscurecimiento de la disolución.

g) Extracción de alcaloides con solventes orgánicos

i La fase acuosa básica (en el embudo de separación), se extrajo con 100 mL de cloroformo.

ii Esta extracción se repitió cinco veces más, hasta que la fase acuosa esté exenta de alcaloides (test de Mayer negativo).

- iii Los extractos orgánicos se secaron con sulfato de sodio anhidro y, previa filtración, se colocó en un balón de 1 L y se concentró en el rotavapor (35 °C, 400-150 mbar) hasta sequedad.
- iv Sobre el residuo de alcaloides se agregó 100 mL de cloroformo y se volvió a concentrar a sequedad en el rotavapor, (40 °C, 400-150 mbar), repitiéndose esta operación un total de cuatro veces. Esto tiene por objeto eliminar las bases volátiles (amoníaco, $\text{NH}_3(\text{g})$) que estuvieran disueltas en el extracto.
- v Finalmente se obtuvo 539 mg del Extracto Bruto de Alcaloides (EBA.3), como un gel, de color marrón claro. El análisis por CCF nos indica que el extracto contiene escopolamina.

ANEXO N° 10

ANÁLISIS PRELIMINAR POR CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA (CCF) DEL EXTRACTO BRUTO DE ALCALOIDES

(ver Sec. III. H.4.g)

Muestra: Extracto Bruto de Alcaloides

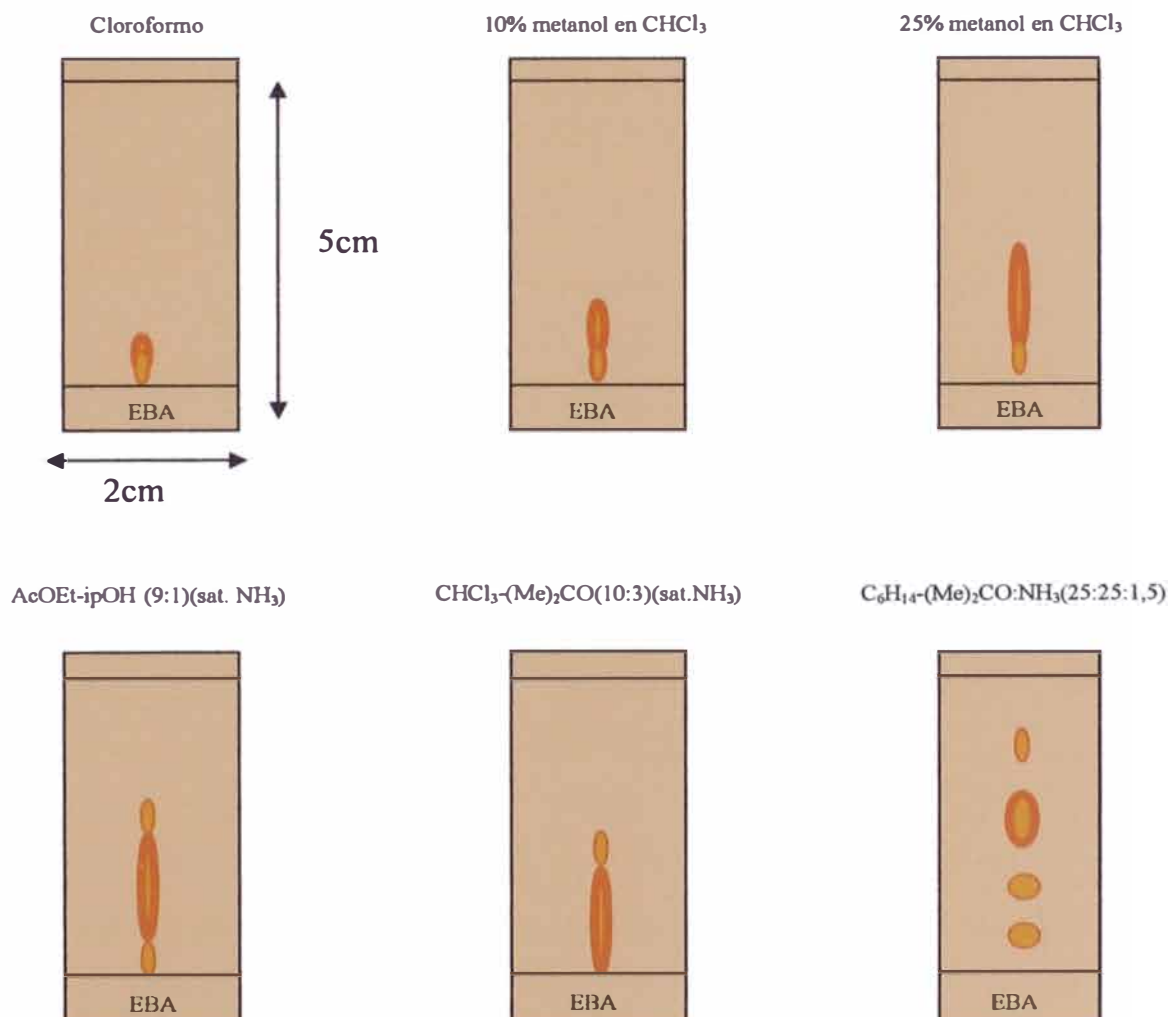
Eluente: Cloroformo, 10% de metanol en CHCl_3 , 25% de metanol en CHCl_3 , acetato de etilo-isopropanol (9:1) saturado con $\text{NH}_3(\text{ac})$ 15 N, cloroformo-acetona (10:3) saturado con $\text{NH}_3(\text{ac})$ 15 N, y hexano-acetona-amoniaco (25:25:1,5).

Placa: Placa de Sílica gel 60 PF₂₅₄, 0,2 mm.

Dimensiones de la placa: 2 cm x 5 cm

Revelador: Dragendorff*

Conclusión: Presencia de un alcaloide mayoritario.



* **Preparación del revelador Dragendorff** (Modificación de Munier y Macheboeuf)

1° Solución Madre. Se mezclan 5 mL de cada una de las soluciones A y B

Solución A: Se disuelven 0,85 g de sub-nitrato de bismuto $5\text{N}_2\text{O}_3 \cdot 6\text{Bi}_2\text{O}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en una mezcla de 10 mL en ácido acético glacial CH_3COOH y 40 mL de agua.

Solución B: Se disuelven 8 g de yoduro de potasio KI en 20 mL de agua.

2° Solución pulverizadora: A 10 mL de solución madre se agrega 20 mL de ácido acético glacial CH_3COOH y se agrega agua hasta completar 100 mL.

ANEXO N° 11
CROMATOGRAFÍA EN PLACA PREPARATIVA (CPP) DE LA
FRACCIÓN N°3 (ver Sec. III.H.6.f.i)

Muestra: Fracción N°3

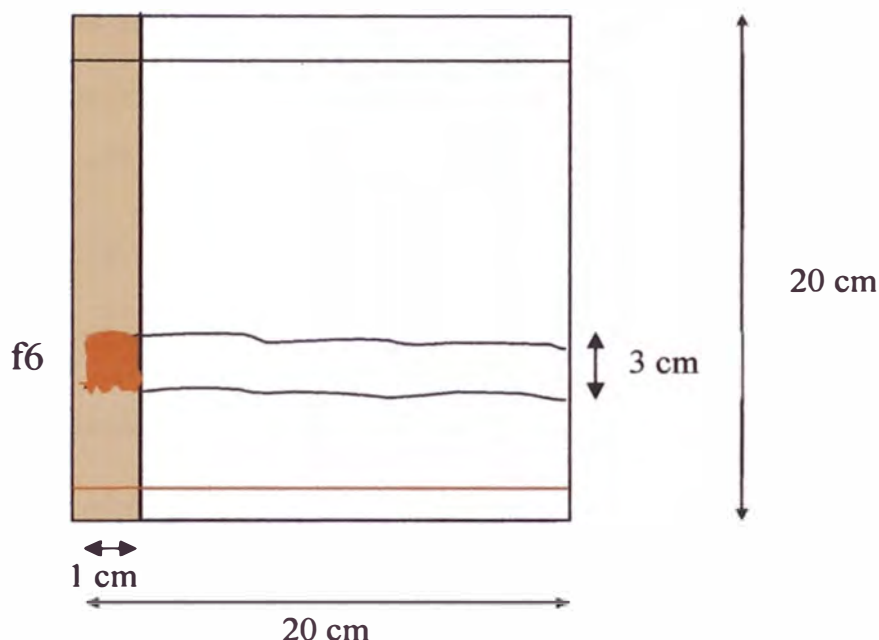
Eluente: Cloroformo-acetona (10:3) saturada con $\text{NH}_3(\text{ac})$ 15 N

Placa: Placas de Sílica Gel 60 PF_{254} *, 1 mm de espesor de capa (20x20 cm^2).

Dimensiones de la placa: 20 cm x 20 cm

Revelador: UV (254 y 360 nm) y reactivo de Dragendorff*

Conclusión: Presencia de la escopolamina en la fracción N°6



* **Preparación del revelador Dragendorff** (Modificación de Munier y Macheboeuf)

1° Solución Madre. Se mezclan 5 mL de cada una de las soluciones A y B

Solución A: Se disuelven 0,85 g de sub-nitrato de bismuto $5\text{N}_2\text{O}_3 \cdot 6\text{Bi}_2\text{O}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en una mezcla de 10 mL en ácido acético glacial CH_3COOH y 40 mL de agua.

Solución B: Se disuelven 8 g de yoduro de potasio KI en 20 mL de agua.

2° Solución pulverizadora: A 10 mL de solución madre se agrega 20 mL de ácido acético glacial CH_3COOH y se agrega agua hasta completar 100 mL.

* Las placas fueron preparadas dispersando una suspensión de sílica en agua destilada sobre placa de vidrio de 20x20 cm^2 .