

UNIVERSIDAD NACIONAL DE INGENIERÍA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA PROFESIONAL DE QUÍMICA



**“ESTUDIO QUIMICO DE LA LIANA
AYAHUASCA” (*Banisteriopsis caapi Spruce ex.
Grisebach Morton*)**

TESIS

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE

LICENCIATURA EN CIENCIAS

CON MENCIÓN EN QUÍMICA

TANIA YENNY SÁNCHEZ RAMÍREZ

LIMA – PERU

2001

ESTUDIO QUÍMICO DE LA LIANA “AYAHUASCA” (*Banisteriopsis caapi*)

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN

I. ASPECTOS GENERALES

A. PRESENTACIÓN	2
B. OBJETIVOS DE LA TESIS	4

II. ESTUDIO BIBLIOGRÁFICO

A. ESTUDIOS QUÍMICOS PRECEDENTES RELATIVOS A LA LIANA “AYAHUASCA” (<i>B. caapi</i>)	7
1. Composición química de la “ayahuasca” (<i>B. caapi</i>)	7
a) Análisis fitoquímico	7
b) Principales alcaloides presentes en la “ayahuasca”	7
c) Porcentaje de alcaloides en la liana “ayahuasca”	8
2. Aislamiento de alcaloides de la liana “ayahuasca”	11
a) Procedimiento de Rivier & Lindgren (1972)	13
b) Procedimiento de Hochstein & Paradies (1957)	14
3. Identificación clásica de harmina y/o derivados	15
a) Comportamiento cromatográfico de la harmina	15
b) Punto de fusión	16
c) Uv – visible	17
4. Identificación espectroscópica de la harmina	17
a) Espectros de masas de la harmina y compuestos análogos	17
b) Espectros de resonancia magnética nuclear del ^1H , RMN ^1H	20
5. Síntesis de la harmina	28
B. ESTUDIOS QUÍMICOS GENERALES	32
1. Análisis cualitativo – Marcha fitoquímica	32
2. Test de alcaloides	32
3. Determinación cuantitativa de alcaloides	33
a) Procedimiento de Pelt et al. (1967)	33

b) Procedimiento de la 20 th ed. U.S. Pharmacopoeia – USP (1980)	34
c) Procedimiento realizado en la tesis	36
4. Aislamiento de alcaloides	36
a) Procedimiento de Reyna & Torpoco (1994)	36
b) Procedimiento de Poupat (1982)	38
c) Procedimiento de Farnsworth & Euler (1962)	39
d) Comparación de resultados	40
5. Identificación espectroscópica de compuestos orgánicos	41
a) Espectrometría de masas	42
b) Espectroscopía de resonancia magnética nuclear de ¹ H, RMN ¹ H	42
c) Espectroscopía de resonancia magnética nuclear de ¹³ C, RMN ¹³ C	44
d) Espectroscopía de infrarrojo, IR	47
e) Espectroscopía de ultravioleta, UV	49

III. PARTE EXPERIMENTAL

PRESENTACIÓN	53
TRABAJO EXPERIMENTAL	57
A. COLECCIÓN DE LA PLANTA	57
B. ESTUDIO ETNOBOTÁNICO Y ETNOMEDICINAL, USO DE LA AYAHUASCA EN MEDICINA TRADICIONAL	57
C. DETERMINACIÓN (IDENTIFICACIÓN BOTÁNICA)	59
D. ESTUDIO BIBLIOGRÁFICO	61
TRABAJO EN EL LABORATORIO	61
E. SECADO Y MOLIENDA DE LA PLANTA	61
F. ANÁLISIS CUALITATIVO – MARCHA FITOQUÍMICA	63
1. Muestra	63
2. Cantidad de muestra por análisis	63
3. Procedimiento	63
4. Resultados	63
G. DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE ALCALOIDES	63
1. Muestra	63
2. Cantidad de muestra por análisis	63
3. Procedimiento	63
a) Extracción sólido – líquido: Obtención del Extracto Bruto orgánico	64

b) Separación líquido – líquido: Obtención del Extracto Bruto de Alcaloides	65
c) Eliminación de las sales volátiles	65
d) Titulación. Determinación potenciométrica	66
4. Cálculo de la cantidad y del porcentaje de alcaloides en la muestra	66
H. AISLAMIENTO DE LA HARMINA	69
1. Muestra	69
2. Procedimiento	69
a) Extracción sólido – líquido: Obtención del Extracto Bruto Orgánico	69
b) Separación líquido – líquido: Obtención del Extracto Bruto de Alcaloides	70
c) Purificación por recristalización	72
d) Purificación cromatográfica	74
e) Análisis preliminar por cromatografía en capa fina – CCF	74
f) Cromatografía de columna – CC	75
I. IDENTIFICACIÓN CLÁSICA DE HARMINA	76
1. Características del producto	77
2. Determinación del punto de fusión	77
3. Análisis porcentual de carbono, nitrógeno e hidrógeno	77
J. IDENTIFICACIÓN ESPECTROSCÓPICA	78
1. Espectro de masas	79
Espectro N°1.- Espectro de masas de la Harmina obtenida a partir de la liana “ayahuasca” (<i>B. caapi</i>)	80
2. Espectro de RMN ¹ H	81
Espectro N°2.- Espectro de RMN ¹ H de la Harmina obtenida a partir de la liana “ayahuasca” (<i>B. caapi</i>)	83
3. Espectro de RMN ¹³ C	84
Espectro N°3.- Espectro de RMN ¹³ C de la Harmina obtenida a partir de la liana “ayahuasca” (<i>B. caapi</i>)	87
4. Espectro de IR	88
Espectro N°4.- Espectro de IR de la Harmina obtenida a partir de la liana “ayahuasca” (<i>B. caapi</i>)	89
5. Espectro de UV	90
Espectro N°5.- Espectro de UV de la Harmina obtenida a partir de la liana “ayahuasca” (<i>B. caapi</i>)	91
IV. RESUMEN DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES	92
Resumen de resultados	93
Conclusiones	95
V. BIBLIOGRAFÍA	96

VI. ANEXOS	102
Anexo N°1. Alcaloides en trazas en ejemplares de <i>B. Caapi</i>	103
Anexo N°2. Análisis cualitativos para la detección de alcaloides presentes en plantas.	104
Anexo N°3. Marcha fitoquímica (Reyna, 1999)	107
Anexo N°4. Aspectos químicos y etnomedicinales de la bebida “ayahuasca”	113
Anexo N°5. Identificación botánica de la “ayahuasca” (<i>B. caapi</i>)	115
Anexo N°6. Resultados de la marcha fitoquímica de la “ayahuasca” (<i>B. caapi</i>)	116
Anexo N°7. Curva de titulación potenciométrica de la harmina	117
Anexo N°8. Determinación cuantitativa de alcaloides totales en los tallos de “ayahuasca” (1 ^{er} y 2 ^{do} análisis)	118
Anexo N°9. Análisis preliminar por cromatografía en capa fina (CCF) del extracto bruto de alcaloides	121
Anexo N°10. Espectro N°6.- Espectro de RMN ¹ H en CD ₃ OD – CHCl ₃ de la Harmina a partir de la liana “ayahuasca” (<i>B. caapi</i>)	122
Anexo N°11. Espectro N°7.- Espectro de RMN ¹ H en DMSO – d ₆ de la Harmina a partir de la liana “ayahuasca” (<i>B. caapi</i>)	123

I. ASPECTOS GENERALES

A. PRESENTACION

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

La presente tesis, en la línea de Química Orgánica de Productos Naturales, comprende el estudio químico de alcaloides presentes en la liana ayahuasca (*Banisteriopsis caapi*) 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 CQ561 (Marcha Fitoquímica) y Proyecto de Tesis II CQ562 (Determinación Cuantitativa), y del curso electivo CQ046, 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 medicinal, permitiéndonos 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 la liana “ayahuasca”.

Adicionalmente, el interés en el estudio de esta planta reside en la amplia utilización que los curanderos de nuestra amazonía hacen en sesiones nocturnas permanentemente, y desde hace siglos, de la bebida denominada igualmente “ayahuasca”, la cual se prepara a partir de dos plantas básicas: tallos de la liana ayahuasca (*Banisteriopsis caapi*) y hojas del arbusto “chacrana” (*Psychotria viridis*).

Este trabajo de Tesis comprendió las siguientes actividades:

- i 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 la molienda de los tallos de ayahuasca, su análisis cualitativo (marcha fitoquímica), la determinación cuantitativa del total de alcaloides presentes en ella y el aislamiento y purificación de la harmina, el principal alcaloide presente en dicha planta. Igualmente la identificación preliminar de la harmina mediante cromatografía en capa fina y su punto de fusión. Este trabajo demandó una dedicación de 4 meses (considerando el trabajo de 8 horas/día, durante 5 días/semana), y se realizó en el período de enero de 1999 a septiembre del 2000.
- ii Identificación espectroscópica de la harmina mediante el análisis de los espectros de masas, y de resonancia magnética nuclear (RMN¹H y RMN¹³C), espectros obtenidos en los laboratorios de Espectrometría de Masas y de Resonancia Magnética Nuclear del Instituto Universitario de Bio – Orgánica – IUBO – Laboratorio N°4, Universidad de la Laguna (Tenerife – España), durante la estadía de investigación que realizó, del 6 de enero al 25 de marzo del 2001 la M. Sc Virginia Torpoco.
- iii Análisis de la información bibliográfica relativa a los estudios químicos de la “ayahuasca” (*B. caapi*) y de la harmina.

B. OBJETIVOS DE LA TESIS

Los objetivos de la presente Tesis son los siguientes:

- i El aislamiento e identificación (clásica y espectroscópica) de la harmina, obtenida a partir de los tallos de la liana ayahuasca (*Banisteriopsis caapi*),
- ii el análisis cualitativo de los metabolitos secundarios (Marcha Fitoquímica) presentes en los tallos de ayahuasca, y
- iii la determinación cuantitativa del total de alcaloides contenido en dichos tallos.

Nuestro objetivo principal es el primero, esto es, el aislamiento e identificación del principal alcaloide contenido en los tallos de la liana ayahuasca, que nos lleva al estudio y experimentación de los diversos procedimientos de aislamiento de alcaloides y 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 recristalización y por cromatografía en columna. Asimismo, se describe la aplicación de la espectrometría de masas y de resonancia magnética nuclear (de hidrógeno y de carbono) 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 del método 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 compuestos orgánicos (metabolito secundario) contenido en un producto natural.

II. ESTUDIO BIBLIOGRÁFICO

A. ESTUDIOS QUÍMICOS PRECEDENTES RELATIVOS A LA LIANA “AYAHUASCA” (*B. caapi*)

1. Composición Química de la “ayahuasca” (*B. caapi*)

a) Análisis fitoquímico

El análisis fitoquímico, se refiere a la determinación cualitativa de los metabolitos secundarios o productos naturales* presentes en una planta o cualquier organismo vivo.

En la bibliografía revisada, no hemos encontrado ningún trabajo de análisis fitoquímico realizado a la liana “ayahuasca”.

b) Principales alcaloides presentes en la “ayahuasca”

Los estudios más completos sobre los alcaloides presentes en la liana ayahuasca (*B. caapi*) han sido publicados por Rivier & Lindgren (1972) y por McKenna et al. (1984). Estos grupos de investigadores encontraron que los tallos de ayahuasca (*B. caapi*) contienen principalmente los alcaloides harmina (a), harmalina (b) y tetrahydroharmina (c) cuyas estructuras se muestran en la Figura N°1, en la cual se incluye la estructura básica β -carbolina (d).

También se han reportado trazas de harmol y 6-metoxitriptamina (Rivier & Lindgren – 1972); así como de ácido hármico, éster metílico del ácido hármico, acetilnorharmina, amida hármica, ácido harmalínico, cetotetrahidronorharmina, N-óxido de harmina, shihunina y dihidroshihunina (Hashimoto & Kawanishi – 1975, 1976 y Kawanishi – 1982) (ver Anexo N°1). Sin embargo dado que estos alcaloides se encuentran en trazas y sólo en algunas de las muestras

* 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, mucilagos, ceras, etc.

analizadas, podría ocurrir que estos compuestos sean “artefactos”, es decir productos que se forman durante los procesos de extracción química.

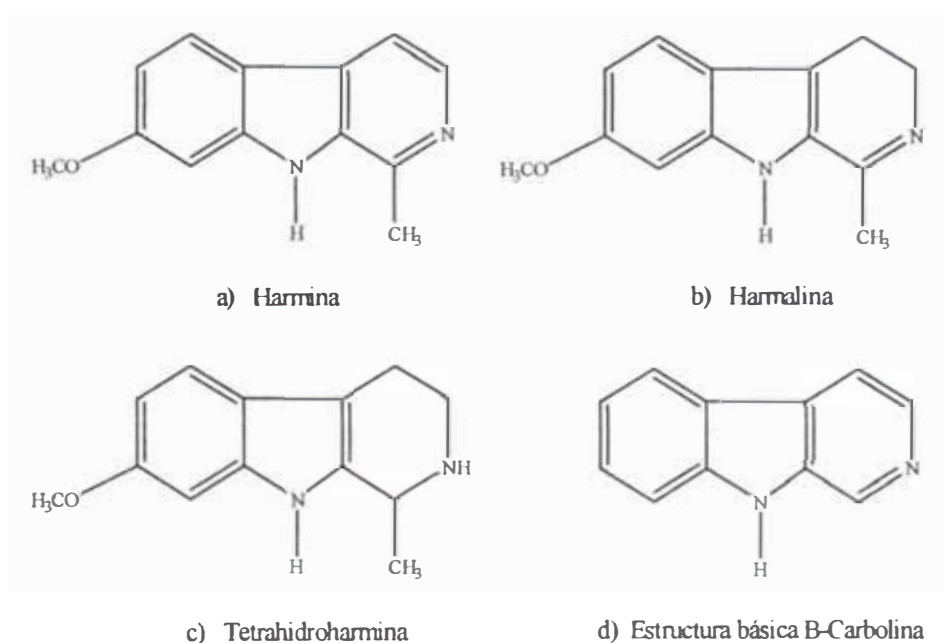


Figura N°1.- Principales alcaloides presentes en la “ayahuasca”

Asimismo, las hojas de “ayahuasca” contienen principalmente harmina y pequeñas cantidades de harmalina y tetrahydroharmina; mientras que en las raíces se encuentran, además de la harmina, cantidades apreciables de tetrahydroharmina y de harmalina. (Rivier & Lindgren – 1972) (ver Tabla N°2, pág. 10).

c) Porcentaje de alcaloides en la liana “ayahuasca”

El porcentaje total de alcaloides presentes en los tallos de ayahuasca varía apreciablemente, entre 0,11 y 1,36% (Rivier & Lindgren – 1972 y McKenna et al. – 1984), tal como se describe en la Tabla N°1. Estos resultados tan variables dependen de la localidad de colección (tipo de suelo, agua, luz), la edad de la planta, el periodo (verano, invierno, etc.), e incluso la hora de colección de la planta. Estos

Tabla N°1

ANÁLISIS QUÍMICOS DE ALCALOIDES PRESENTES EN LOS TALLOS DE AYAHUASCA (*B. caapi*).

a) Referencia: River & Lindgren (1972) (Equipo: Cromatógrafo de gases F & M Model 400; estimación cuantitativa por planimetría)				
N°	Especie (Código) Localidad de colección	Porcentaje % total de alcaloides ⁽¹⁾	Alcaloides presentes	Porcentaje % relativo entre ellos
1	N°1 Zapote (Alto Río Purús)	0,11	Harmina Tetrahydroharmina NI (232) ⁽²⁾	91 1 1
2	N°4 Marcos (Alto Río Purús)	0,20	Harmina Tetrahydroharmina Harmalina Harmol NI (232)	84 9 1 2 3
3	Plowman y Martin Tarapoto	0,83	Harmina Tetrahydroharmina Harmalina Harmol NI (232)	62 24 7 tr ⁽³⁾ 1
b) Referencia: McKenna, et al. (1984) (Equipo: HPLC Varian Model 5000 con integrador SP 4100)				
N°	Especie (Código) Localidad de colección	Porcentaje % total de alcaloides ⁽¹⁾	Alcaloides presentes	Porcentaje % relativo entre ellos
1	DMCK N°126 "Cielo" Iquitos	0,17	Harmina Tetrahydroharmina Harmalina Harmol Harmalol	34 15 45 6 tr
2	DMCK N° 110 "Cielo" Tarapoto	0,74	Harmina Tetrahydroharmina Harmalina Harmol	71 13 15 1
3	DMCK N° 125 Puerto Almendras	1,36	Harmina Tetrahydroharmina Harmalina Harmol Harmalol	46 14 28 9 2

⁽¹⁾ Porcentaje total de alcaloides respecto al peso del material vegetal seco utilizado.

⁽²⁾ NI = Alcaloide no identificado, de peso molecular 232 g/mol

⁽³⁾ tr = trazas.

Tabla N°2

**ANÁLISIS QUÍMICO DE ALCALOIDES PRESENTES EN LAS HOJAS Y
RAICES DE *B. caapi*
(Rivier & Lindgren – 1972)**

N°	Especie (Código) Localidad de colección	Parte de la planta	Porcentaje % total de alcaloides	Alcaloides presentes	Porcentaje % relativo entre ellos
1	N°1 Zapote Alto río Purus	Hojas	0,28	Harmina	94
		Raíces	0,92	Harmina Tetrahydroharmina Harmalina NI (232)	40 44 15 tr
2	N°2 Zapote Alto río Purus	Raíces	1,95	Harmina Tetrahydroharmina Harmalina 6-MeO-T	41 37 17 tr
3	N°4 Marcos Alto río Purus	Hojas	0,70	Harmina Tetrahydroharmina Harmalina NI (232)	78 2 tr tr
		Raíces	0,71	Harmina Tetrahydroharmina Harmalina NI (232)	78 15 5 1

dos grupos de investigadores realizaron el análisis sometiendo al extracto bruto de alcaloides a separación cromatográfica (cromatografía de gases y HPLC, respectivamente) y analizando cuantitativamente cada alcaloide que se separa de la mezcla.

Asimismo, el porcentaje relativo de estos alcaloides varía de una muestra a otra, siendo la harmina el alcaloide principal: harmina (34 a 91%), tetrahydroharmina (1 a 24%), harmalina (1 a 45%), harmol (trazas a 9%) y harmalol (trazas a 2%).

En este contexto es interesante resaltar como estas muestras de composición tan diferente, son utilizados en distintas regiones de la amazonía peruana en la preparación de la bebida “ayahuasca”, que se utiliza para los mismos fines en sesiones de medicina tradicional.

De la publicación de Rivier & Lindgren (1972) hemos transcrito 2 de las 4 muestras de *B. caapi* colectado por Rivier en 1968 y el análisis de una de las 3 muestras de herbario de *B. caapi* colectado por otros investigadores. En cambio, hemos reproducido 3 de las 5 muestras de *B. caapi* colectadas por McKenna et al. en 1981, quienes incluyen una muestra de herbario (McKenna et al. – 1984). Todas estas muestras han sido debidamente identificados botánicamente por especialistas.

Rivier & Lindgren (1972) también realizaron el análisis de las hojas y raíces de *B. caapi*, los cuales igualmente exhiben una gran variabilidad del contenido total de alcaloides y de los diversos constituyentes, tal como se ilustra en la Tabla N°2.

2. Aislamiento de alcaloides de la liana “ayahuasca”

Rivier & Lindgren (1972) presentan un resumen cronológico de los trabajos químicos previos realizados con la liana ayahuasca (ver Tabla N°3). Los primeros estudios (1905 a 1928) permitieron el aislamiento de un alcaloide al que denominó indistintamente telepatina, yageina o banisterina. En 1928 se comprobó que dicho alcaloide era idéntico a la ya conocida harmina, la cual había sido aislada en 1847 de la planta *Peganum harmala*.

A partir de 1957 se aislaron e identificaron los otros alcaloides presentes en la liana, siendo los trabajos más importantes los publicados por Rivier & Lindgren (1972) y McKenna et al. (1984). Los trabajos de los investigadores japoneses Hashimoto & Kawanishi (1975, 1976, 1982) se refieren al aislamiento de los otros alcaloides presentes en trazas. De los trabajos de este período, Schultes et al. (1969) no proporcionan el procedimiento de aislamiento, realizando la purificación e identificación de la harmina por cromatografía

Tabla N°3

ANÁLISIS QUÍMICOS REALIZADOS EN AYAHUASCA

Autor	Año	Nombre vernacular Identificación Existencia del espécimen de herbario	Compuestos aislados y/o Identificados (Técnicas utilizadas)
Zerda Bayón	1905	Yagé (decocción) -	Telepatina
Seil y Putt	1924	Caapi Banisteria caapi -	3 alcaloides
Clinguart	1926	Yagé (decocción) -	Yageina
Perrot y Raymond-Hamet		Yagé Banisteria caapi -	Telepatina (yageina)
Lewin	1928	Yagé, según Merck Banisteria caapi -	Banisterina
Wolfes y Rumpf	1928	Yagé, según Merck Malpighiaceas -	Harmina = yageina
Elger	1928	Yagé, Banisteria caapi -	Harmina + un alcaloide
Arispe	1938	Ayahuasca Banisteria caapi -	Yageina (y yagenina)
Chen y Chen	1939	Caapi Banisteria caapi -	Harmina
Mors y Zaltzman	1954	Ayahuasca Banisteria caapi -	Yageina
Costa	1954	Yagé Banisteria caapi -	Yageina
Hochstein & Paradies	1957	Ayahuasca Banisteria caapi -	Harmina, harmalina y tetrahydroharmina
Der Marderosian*	1968	Yagé Banisteriopsis caapi Si	Harmina y harmalina (CG/CCF)
Schultes et al.*	1969	Caapi Banisteriopsis caapi Si	Harmina (CG - EM)
Der Marderosian	1970	Ayahuasca Banisteriopsis caapi Si	Harmina y harmalina
Rivier & Lindgren	1972	Ayahuasca Banisteriopsis caapi Si	Harmol, 6 metoxitriptamina
Hashimoto & Kawanishi	1975	- Banisteriopsis caapi -	N-óxido de harmina, Ester metílico del ácido hármico,
Hashimoto & Kawanishi	1976	- Banisteriopsis caapi -	Acido hamalinico Amida hármica, acetilnorharmina, cetotetrahydroharmina
Kawanishi, Uhara y Haschimoto	1982	- Banisteriopsis caapi -	Shihunina y dihidroshihunina
McKenna et al.*	1984	Ayahuasca Banisteriopsis caapi Si	Harmina, harmalina, tetrahydroharmina, etc (HPLC)

* No proporcionan procedimiento de extracción de alcaloides

de gases – espectrometría de masas (CG – EM), mientras que Der Marderosian (1968) refieren que la extracción de alcaloides se realizó de acuerdo al procedimiento de Farnsworth & Euler (1962), el cual será presentado posteriormente (Sec. II B.4, Procedimiento a), pág. 39). Por su parte McKenna et al. (1984) realizaron el análisis cuantitativo del extracto bruto de alcaloides obtenido de sus muestras de *B. caapi* por HPLC.

En esta tesis describiremos los procedimientos publicados por Rivier & Lindgren (1972) y Hochstein & Paradies (1957), los cuales para una mejor comprensión, presentamos dividido en subtítulos (muestra utilizada, extracción sólido – líquido, separación líquido - líquido, y purificación e identificación).

a) Procedimiento de Rivier & Lindgren (1972). “Aislamiento de alcaloides de la ayahuasca”

- Muestra utilizada
Liana de ayahuasca (*Banisteriopsis caapi*), secada al aire libre, sin exposición al sol.
- Extracción sólido – líquido (Obtención del Extracto Bruto Orgánico, EBO)
 - i Extracción con metanol durante una noche, a temperatura ambiente y agitación. El extracto orgánico se concentra al vacío hasta sequedad: se obtiene el EBO.
- Separación líquido – líquido (Obtención del Extracto Bruto de Alcaloides, EBA)
 - ii Disolución del extracto bruto orgánico con una solución acuosa de ácido sulfúrico H_2SO_4 (ac) 2N (dos veces).
 - iii Las soluciones ácidas se juntan y se extraen con cloroformo $CHCl_3$, (tres veces), descartando la fase orgánica.

- iv La fase acuosa ácida se alcaliniza con carbonato de sodio sólido $\text{NaCO}_{3(s)}$, hasta pH 10.
- v La fase acuosa alcalina se extrae de tres a cinco veces con cloroformo CHCl_3 .
- vi Las fases orgánicas se reúnen, se secan con sulfato de sodio anhidro $\text{Na}_2\text{SO}_{4(s)}$, y se concentran a sequedad a presión reducida: se obtiene el EBA.

- Purificación e Identificación

- vii El extracto bruto de alcaloides se analiza mediante cromatografía de gases y espectrometría de masas (CG – EM).

- Resultados: Se encontraron alcaloides del tipo β -carbolino: harmina, harmalina, tetrahydroharmina y trazas de harmol y 6-metoxitriptamina.

b) Procedimiento de Hochstein & Paradies (1957). “Extracción de alcaloides de *Banisteria caapi*”

- Muestra utilizada

150 g de la liana *Banisteriopsis caapi* molida

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

- i Extracción a reflujo con 3 L de metanol durante 5 horas (dos veces). Se filtra el solvente y se concentra al vacío hasta sequedad: se obtiene 120 g de producto sólido (EBO).

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

- ii El extracto bruto orgánico se alcaliniza con 1 L de solución de amoníaco $\text{NH}_3_{(ac)}$ al 5%.

- iii La fase acuosa alcalina se extrae con cloroformo CHCl_3 (4 x 400 mL).

- iv Los extractos orgánicos se reúnen, se secan con sulfato de sodio anhidro $\text{Na}_2\text{SO}_{4(s)}$, y se concentran al vacío: se obtiene 15g de extracto bruto de alcaloides (A)
- v De la fase acuosa alcalina se filtra un sólido (20 g), cuya extracción en soxhlet con cloroformo CHCl_3 durante 12 horas proporciona 9g de extracto bruto de alcaloides (B).
- Purificación y obtención de harmina
 - vi Recristalización directa del extracto bruto de alcaloides, (A) y (B), con cloroformo CHCl_3 caliente: se obtienen 3g y 5g de harmina respectivamente.
 - vii La harmina (8 g) se recristaliza con metanol CH_3OH , dos veces, obteniéndose 5 g de harmina pura (Pf = 261,8 – 262,4°C).
- Resultados: Aislamiento de harmina pura a partir de la liana “ayahuasca”.

3. Identificación clásica de harmina y/o derivados

a) Comportamiento cromatográfico de la harmina (Cromatografía de capa fina – CCF y en papel)

i Hashimoto (1988)

Adsorbente : Sílica gel G

Revelador: Luz UV

Eluente: CHCl_3 – MeOH (15:1)

R_f : 0,17

ii McKenna et al. (1984) (CCF en dos dimensiones)

Adsorbente : Polygran sílica gel GF₂₅₄

Revelador: Luz UV

Eluente: N°1. Eter – 2 – butanona – amoníaco concentrado (5:4:1)

N°2. n–propanol – amoníaco acuoso 1,5% (9:2)

R_f : No indicado.

iii Kichner (1978).

Adsorbente: Sílica gel

Revelador: No indica

Eluente: N°1. CHCl_3 – MeOH – amoníaco acuoso 10% (80:20:1,5)

N°2. CHCl_3 – MeOH (3:1)

R_f : 0,66 (eluente N°1) y 0,44 (eluente N°2)

iv Der Marderosian (1968)

Adsorbente: Sílica gel

Revelador: Luz UV, Dragendorff

Eluente: N°1. Butanol – ácido acético – agua (4:2:1)

N°2. Acetato de etilo – cloroformo – metanol (2:2:1)

R_f : 0,34 (eluente N°1) y 0,40 (eluente N°2)

v Der Marderosian (1968)

Adsorbente: Papel Whatman N°1

Revelador: Luz UV, Dragendorff

Eluente: N°1. Butanol – ácido acético – agua (4:2:1)

N°2. Isopropanol – amoníaco – agua (10:1:1)

R_f : 0,66 (eluente N°1) y 0,81 (eluente N°2)

b) Punto de fusión

i Harmina : 261°C (con descomposición) (Merck – 1996)

261,8 – 262,4°C (Hochstein & Paradies – 1957)

ii Harmalina : 229 – 231°C (Merck – 1996)

227 – 229°C (Hochstein & Paradies – 1957)

iii Tetrahidroharmina : 198,4 – 199,8°C (Hochstein & Paradies – 1957)

c) UV. Visible

i Harmina: $\lambda_{\text{máx}}$. (metanol) 241, 301, 336 nm (Merck – 1996)

ii Harmalina: $\lambda_{\text{máx}}$ (metanol) 218, 260, 376 nm (Merck – 1996)

4. Identificación espectroscópica de la harmina

En la sección II.B.5. (Identificación espectroscópicos de compuestos orgánicos, pág. 41) se presentarán los aspectos generales y la importancia en la determinación de la estructura molecular de las principales técnicas espectroscópicas, a saber, la espectrometría de masas, la resonancia magnética nuclear del hidrógeno y del carbono, RMN¹H y RMN¹³C, respectivamente, así como la espectroscopía de infrarrojo IR y de ultravioleta UV.

En esta sección sólo presentaremos los espectros de la harmina y de compuestos análogos publicados en la bibliografía.

a) Espectros de masas de la harmina y compuestos análogos

i Holmstedt & Lindgren (1979)

Proporciona los espectros de masas de la harmina y de la tetrahidroharmina, tal como se reproducen en la Figura N°2.

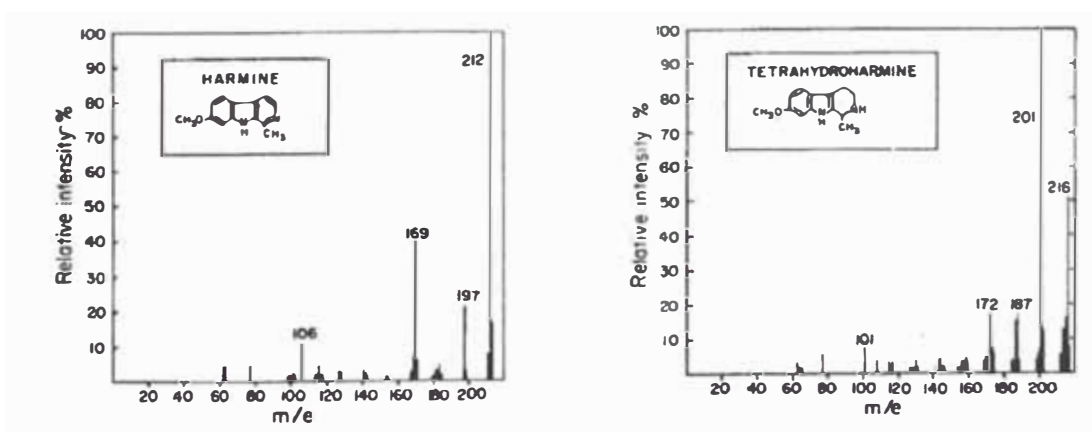


Figura N°2.- Espectros de masas de la harmina y tetrahidroharmina (Holmstedt & Lindgren – 1979)

Los valores de los iones característicos de estos alcaloides son reproducidos por Rivier & Lindgren (1972) (Tabla VI, pág. 119):

- Harmina: 212 (Pico base y M^+), 197, 169, 106
- Tetrahydroharmina: 216 (M^+), 201 (Pico base), 187, 172, 101

Hesse (1974) explica la formación de los iones característicos del espectro de la tetrahydroharmina, presentando la fragmentación del ciclo tetrahydrocarbolino como una reacción de retro Diels – Alder (Aguell, S. et. al. – 1969)

ii Rivier & Lindgren (1972)

Proporciona los espectros de masas y los valores de sus iones característicos de la harmina y del harmol, obtenidos con un cromatógrafo de gases – espectrómetro de masas LKB 900.

- Harmalina: 214 (Pico base y M^+), 199, 198, 186, 170, 169.
- Harmol: 198 (Pico base y M^+), 197, 170, 169, 115, 99.

iii NIST. Mass Spectrometry Data Center

A través de Internet se obtuvo el espectro de masas de la harmina proporcionada por el NIST Chemistry WebBook (ver Fig. N°3), en el cual se observan los mismos iones característicos del espectro obtenido por Holmstedt & Lindgren (1979).

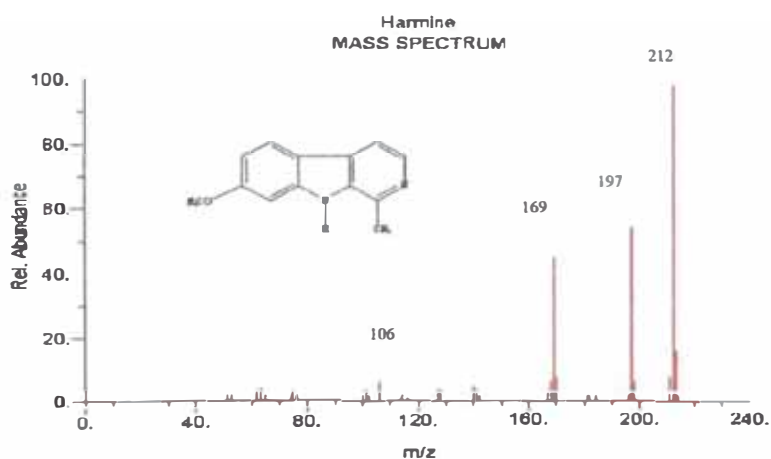


Figura N°3.- Espectro de masas de la harmina (NIST Chemistry WebBook)

Los espectros de masas que obtuvimos a partir de los alcaloides puros, harmina y harmalina (Sigma – USA) son similares a aquellos publicados en la bibliografía.

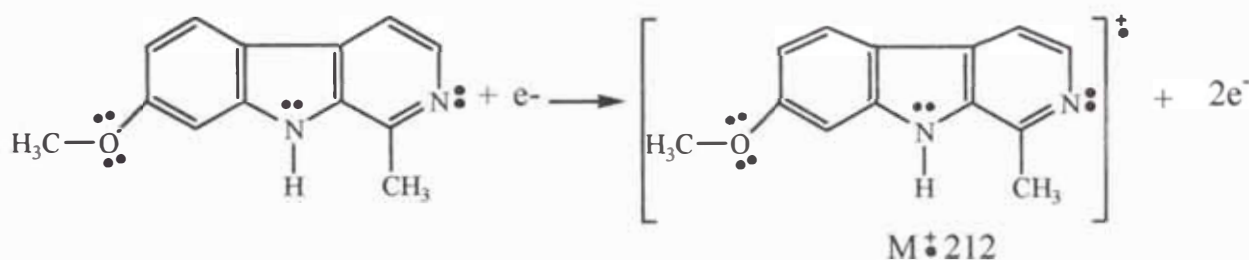
Asimismo, el espectro de masas obtenido del alcaloide puro harmina aislado de los tallos de la “ayahuasca” (*B. caapi*) es similar a aquel publicado por Holmstedt & Lindgren (1979)

A continuación presentamos las ecuaciones de fragmentación de los principales picos del espectro de masas para de la harmina.

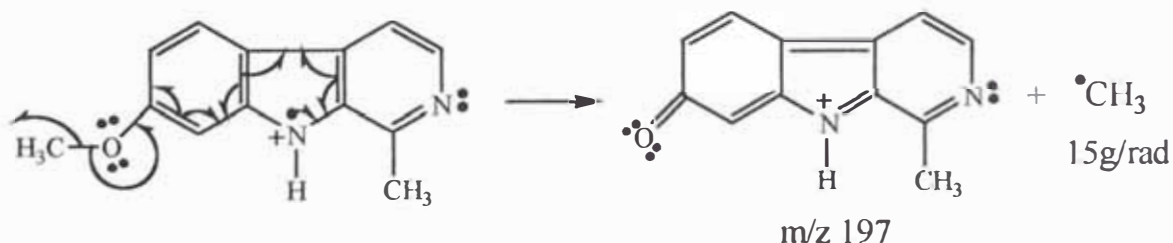
iv Ecuaciones de fragmentación del espectro de la harmina (Reyna, 1992)

m/z : 212 (pico base y M^{\dagger}), 197, 169, 106

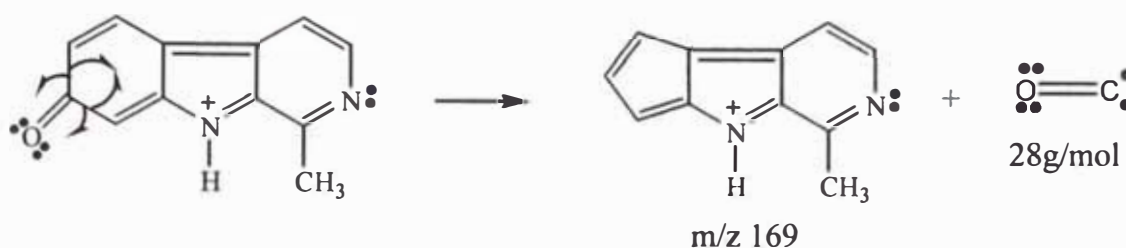
$M^{\dagger} 212$



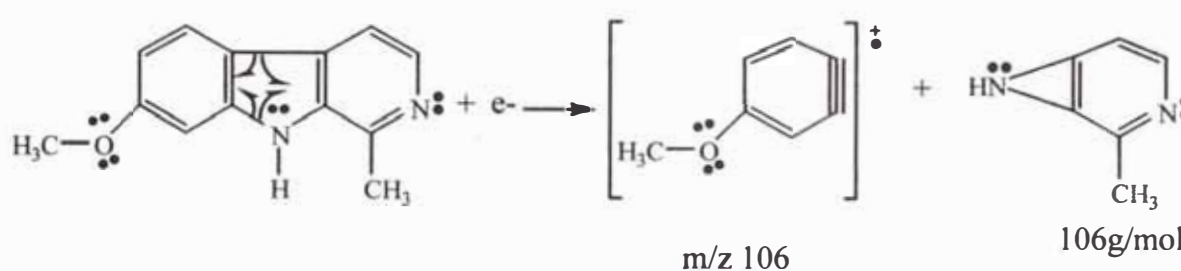
m/z 197 ($M^{\dagger} - CH_3$)



m/z 169 (m/z 197 - CO)



m/z 106



b) Espectros de resonancia magnética nuclear del ^1H , RMN ^1H .

En las referencias revisadas no hemos encontrado el espectro de RMN ^1H de la harmina,

Experimentalmente, hemos obtenido el espectro de RMN ^1H de la harmina pura (Sigma – USA) (Figura N°4), así como de la harmina de los tallos de “ayahuasca” (*B. caapi*), que es idéntico al precedente.

A continuación se presenta el análisis de dicho espectro:

Espectro RMN ^1H de la harmina (Figura N°4)

El espectro RMN ^1H que analizaremos es aquel que obtuvimos del alcaloide puro (Sigma – USA) (Equipo RMN Bruker 200 MHz, solvente cloroformo deuterado CDCl_3 , Laboratorio de RMN, Institute de Chimie des Substances Naturales, Gif–Sur–Yvette, Francia, Figura N°4.

Además, para realizar el análisis de la porción aromática del espectro (δ : 6,5 a 8,5 ppm), utilizaremos el espectro amplificado de

dicha porción que se registró para una muestra de harmina pura aislada de la ayahuasca (*Banisteriopsis caapi*), Figura N°5.

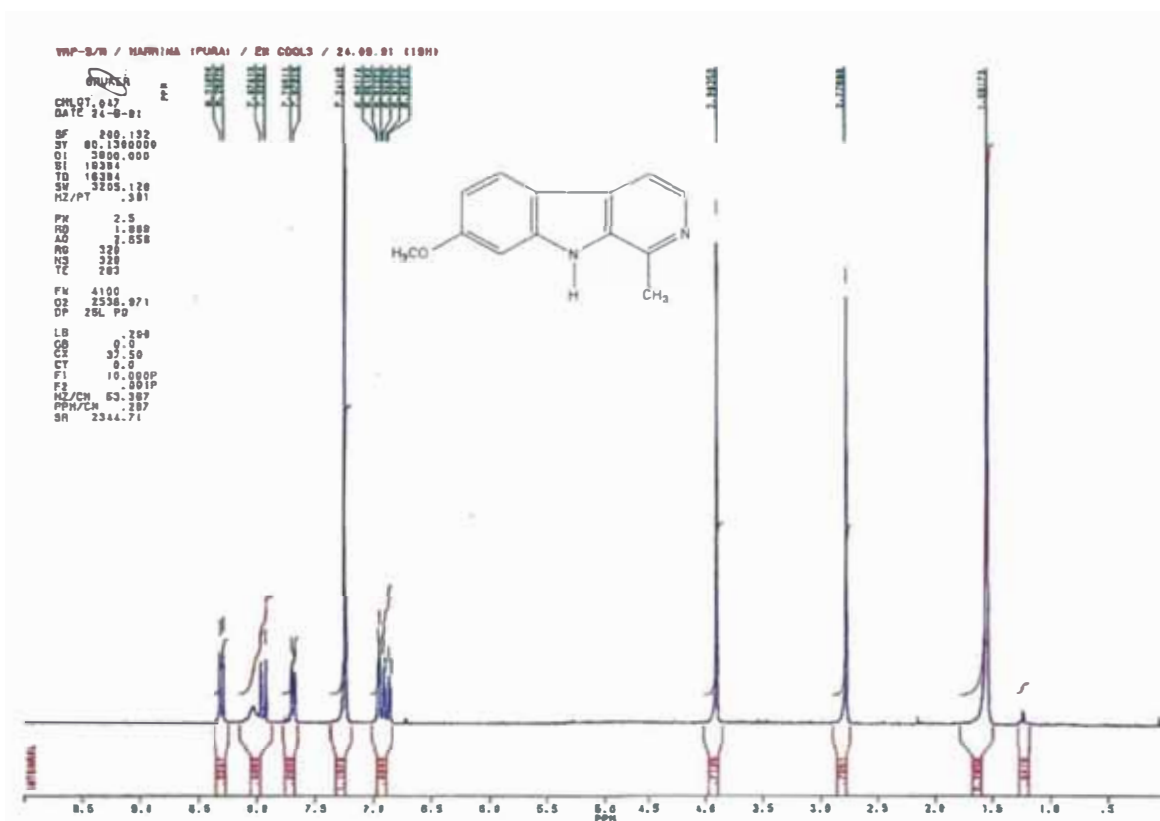
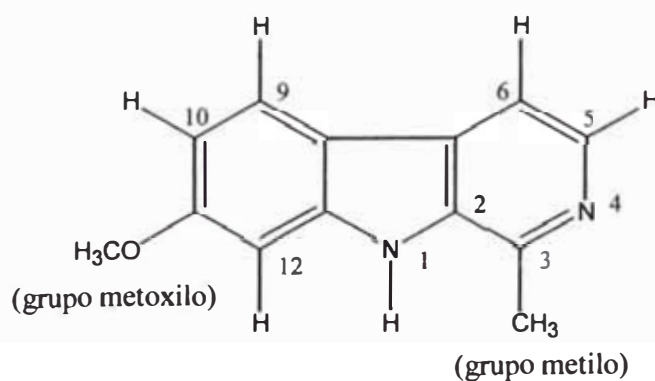


Figura N°4.- Espectro de RMN¹H de la harmina pura (Sigma-USA) (a 200MHz, solvente CDCl₃)

La interpretación de un espectro de RMN involucra el análisis de las siguientes características: i los desplazamientos químicos, ii la intensidad (integración) de cada señal, y iii los acoplamientos spin – spin (ver Sec. II.B.5.b, pág. 42).



a) Desplazamiento químico

Proporciona información sobre los diferentes tipos de hidrógenos en la molécula y el entorno químico de cada tipo de protón.

Los valores de desplazamiento químico aparecen registrados en la parte superior del espectro (Figura N°4), tomaremos sólo dos de los cinco decimales indicados. Luego, los diferentes tipos de hidrógenos que tiene la molécula, ubicados de campo alto hacia campo bajo del espectro, son los siguientes:

i $\delta = 2,78$ ppm; singlete: grupo metilo CH_3 enlazado a ciclo aromático. Esta señal corresponde a los tres hidrógenos equivalentes del grupo metilo enlazado al C_3 ciclo aromático

ii $\delta = 3,90$ ppm; singlete: grupo metóxilo OCH_3

Esta señal corresponde a los tres hidrógenos equivalentes del grupo metóxilo OCH_3 enlazado al C_{11} .

iii $\delta = 6,86$ a $6,96$ ppm; tres dobletes (integración = 2 hidrógenos)

Para el análisis de la porción aromática se hace necesario utilizar el espectro amplificado reproducido de la Figura N°5, así como tener en cuenta la integración del espectro.

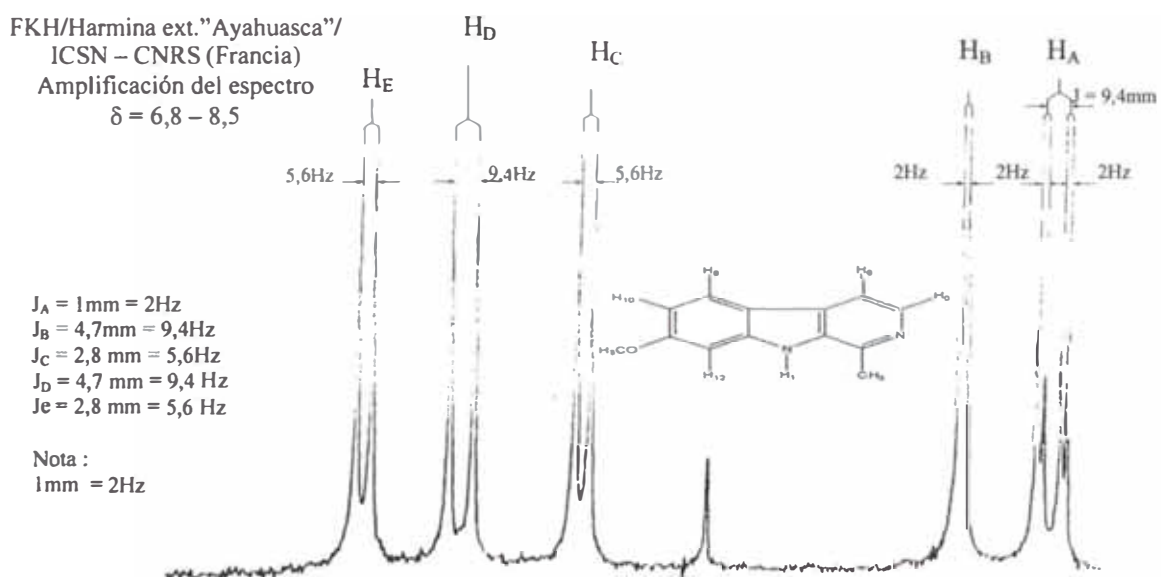
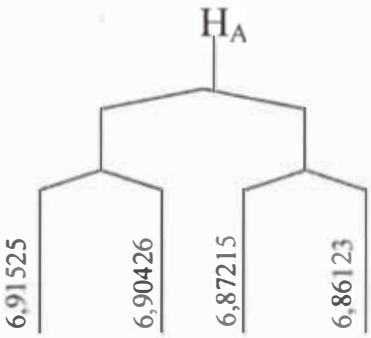


Figura N°5.- Espectro RMN^1H amplificado de la harmina pura (Sigma – USA)

En la Figura N°5 se observa fácilmente como estas señales (tres dobletes) corresponden a dos protones diferentes: Los dos primeros dobletes, de tamaños semejantes, corresponden al protón más protegido (hacia campo más alto), al cual denominaremos H_A ; y el otro doblete corresponderá a un segundo protón, H_B .

El valor exacto de desplazamiento químico para el hidrógeno H_A se obtiene promediando los cuatro valores de δ que corresponden a los dos dobletes de esta señal (y que están registradas en la parte superior de la Figura N°4), así:



$$H_A = \frac{\frac{6,86 + 6,87}{2} + \frac{6,90 + 6,92}{2}}{2} = \frac{6,87 + 6,91}{2} = 6,89\text{ppm}$$

Como se refirió precedentemente el siguiente doblete en el espectro de RMN (desplazándose hacia campo bajo) corresponde a un segundo protón H_B , cuyo valor de desplazamiento químico se obtiene promediando los dos valores registrados en la parte superior de la Figura N°4, así:

$$H_B : \delta = \frac{6,95 + 6,96}{2} = 6,96\text{ppm}$$

- iv Los tres hidrógenos aromáticos restantes presentan señales dobletes (interacción con un solo hidrógeno vecino), y sus valores de desplazamiento químico se determinan análogamente; esto es:

$$H_C : \delta = \frac{7,68 + 7,71}{2} = 7,70\text{ppm}; \text{ doblete (integración = un protón)}$$

v $H_D : \delta = \frac{7,93 + 7,97}{2} = 7,95\text{ppm}; \text{ doblete (integración dos protones)}$

La señal del protón H_D se integró junto con la señal del protón del indol N-H.

vi $H_E : \delta = \frac{8,29 + 8,32}{2} = 8,31\text{ppm}; \text{ doblete (integración = un protón)}$

Y con los datos con que se cuenta hasta este momento no es posible de identificar a estos portones H_A , H_B , H_C , H_D y H_E con los protones aromáticos de la harmina.

- vii La señal del protón del indol N-H es una señal móvil, y en el espectro aparece a $\delta = 8 \text{ ppm}$ (pequeña banda) (Figura N°4).

b) Integración de las señales en el espectro (Figura N°4)

Esta información nos proporcionará el número de protones que corresponden a cada señal; así.

- i singulete a $\delta = 2,78 \text{ ppm}$: $4,1 \text{ cm} \rightarrow \text{CH}_3$; por tanto: $1,36 \text{ cm} / \text{H}$
 ii singulete a $\delta = 3,90 \text{ ppm}$: $4,1\text{cm} \rightarrow \text{OCH}_3$; por tanto: $1,36 \text{ cm} / \text{H}$

iii tres dobletes a δ : 6,86 – 6,96 ppm: 2,7 cm \rightarrow H_A y H_B: 1.35 cm / H

iv doblete a $\delta = 7,70$ ppm: 1,3 cm \rightarrow H_C: 1,30 cm / H

v doblete a $\delta = 7,95$ ppm

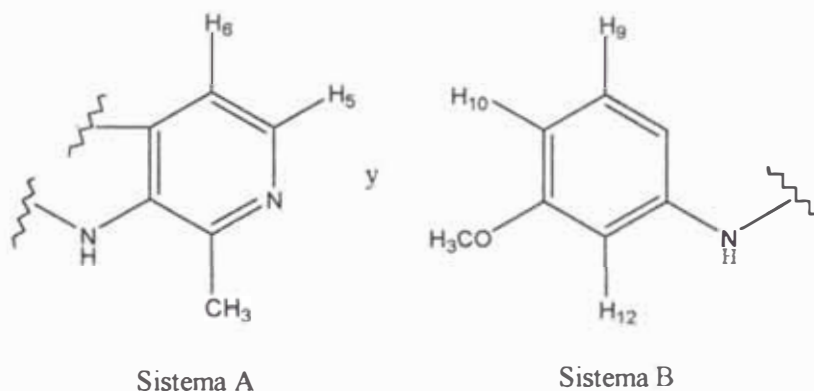
pequeña señal a $\delta = 8,00$ ppm | 2,4 cm \rightarrow H_D y N-H : 1,20 cm / H

vi doblete a $\delta = 8,31$ ppm: 1,35 cm \rightarrow H_E: 1,35 cm / H

Luego la integración del espectro está de acuerdo con lo esperado.

c) Acoplamiento spin - spin

Se tiene dos sistemas aromáticos diferenciados

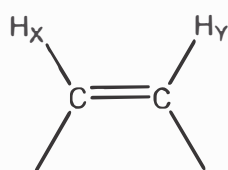


Donde el sistema A puede analizarse como un sistema olefínico simple donde H₅ acopla con H₆, ubicados en posición cis uno respecto al otro y el sistema B implica 3 protones aromáticos acoplados (en posición orto, meta y para) unos respecto a otros.

- Sistema A (H₅ vs H₆)

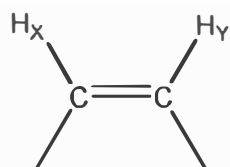
De las Tablas (Silverstein et al. – 1974, Apéndice F, pág. 226 –227)

i



$J_{xy} = 6 - 12$ Hz (valor típico: 10 Hz)

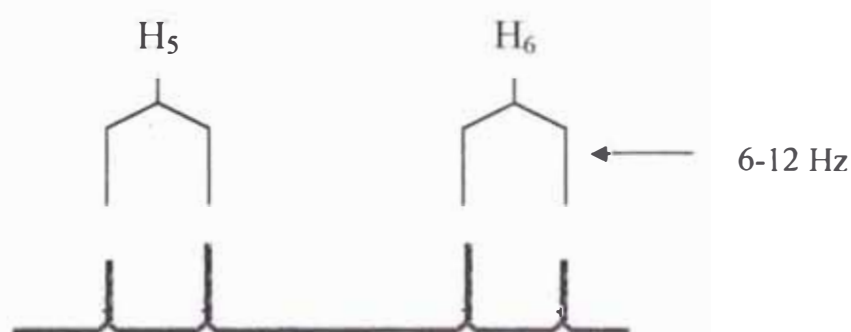
ii



$$J_{xy} = 8,8 - 11,0 \text{ Hz}$$

anillo, 6 miembros

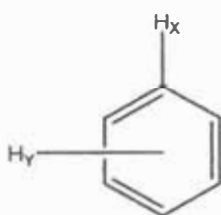
Por tanto, H_5 acopla con H_6 y también una constante de acoplamiento J de 6 – 12 Hz.



es decir, se tendrán 2 dobletes acoplados, donde H_5 por encontrarse cercano al átomo de N aparecerá a campo bajo.

- Sistema B (H_9 vs H_{10} vs H_{12})

De las Tablas (Silverstein et al. –1974, Apéndice F, pág. 226 – 227)

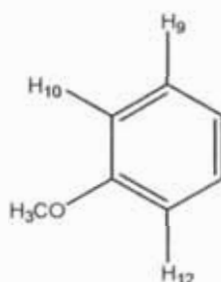


$$J_{\text{orto}} = 6 - 10 \text{ Hz (valor típico} = 9)$$

$$J_{\text{meta}} = 1 - 3 \text{ Hz (valor típico} = 3)$$

$$J_{\text{para}} = 0 - 1 \text{ Hz (valor típico} = 0)$$

Por tanto, los acoplamientos esperados para H_9 , H_{10} y H_{12} serían:



i Protón H_9

$$J_{H_9H_{10}} = J_{\text{orto}} = 9 \text{ Hz}$$

$$J_{H_9H_{12}} = J_{\text{para}} = 0 \text{ Hz}$$

Luego, H_9 solo acopla con H_{10} : $J_{H_9H_{10}} = 9 \text{ Hz}$

ii Protón H_{10}

$$J_{H_9H_{10}} = J_{\text{orto}} = 9 \text{ Hz}$$

$$J_{H_{10}H_{12}} = J_{\text{meta}} = 3 \text{ Hz}$$

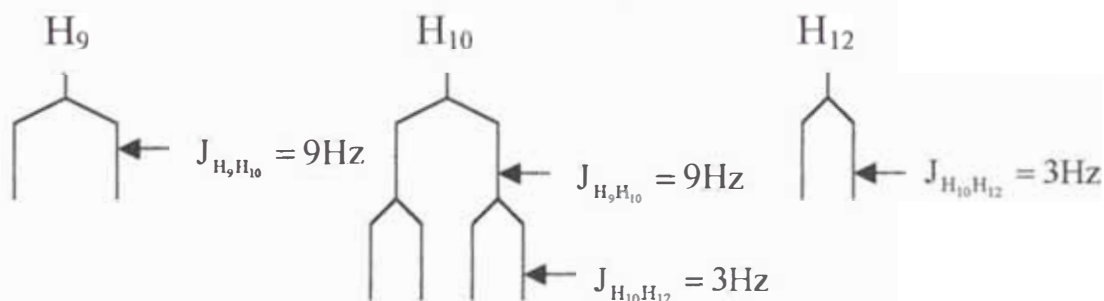
Luego, H_{10} acopla con ambos protones H_9 y H_{12}

iii Protón H_{12}

Por lo mencionado antes, H_{12} sólo acopla con H_{10}

$$J_{H_{10}H_{12}} = J_{\text{meta}} = 3 \text{ Hz}$$

Por tanto, los acoplamientos entre H_9 y H_{10} , y H_{10} y H_{12} serían:



Luego, comparando estos acoplamientos con aquellos obtenidos con el espectro (fino), resulta evidente que:

- H_C acopla con H_E : $J_{H_C H_E} = 5,6 \text{ Hz}$

y se encuentran a campo bajo

Por tanto, $H_5 = H_E$ y $H_6 = H_C$

- H_A acopla con H_D : $J_{H_A H_D} = 9,4 \text{ Hz}$

H_A acopla con H_B : $J_{H_A H_B} = 2 \text{ Hz}$

es decir, H_A acopla tanto con H_D ($J = 9,4$ Hz) como con H_B ($J = 2$ Hz).

Por tanto, $H_9 = H_D$, $H_{10} = H_A$ y $H_{12} = H_B$

Con lo cual se tiene asignado todos los hidrógenos del espectro con aquellos del compuesto.

5. Síntesis de harmina (Reyna, 1992)

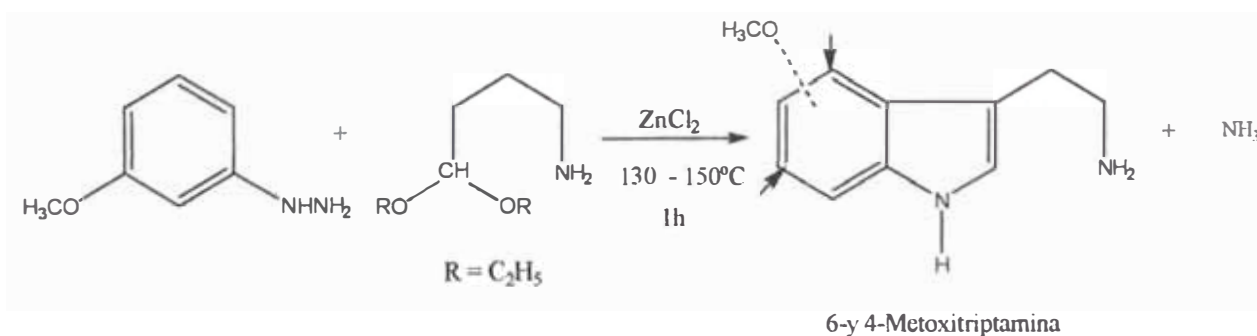
Los alcaloides mantienen el interés de los químicos orgánicos desde fines del siglo XIX, habiéndose extraído e identificado cientos de esas sustancias. Paralelamente, se emprendió la síntesis de estas moléculas, buscando imitar en el laboratorio los difíciles procesos de biosíntesis que realiza la naturaleza para producir los alcaloides, con el objeto de disponer de mayores cantidades de estos importantes compuestos que aquello que se puede obtener directamente de las plantas o animales.

De los nueve procedimientos de síntesis citados en las notas de revisión de Trout (1998), presentaremos dos de ellos, la de Späth & Lederer (1930) y de Akabori & Saito (1930).

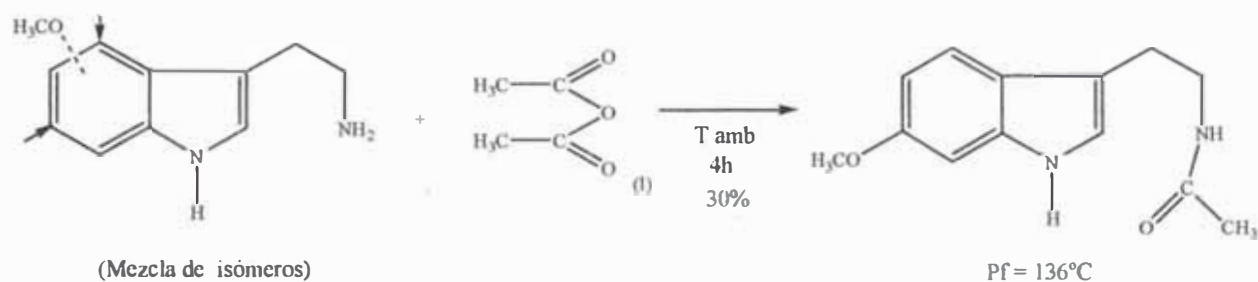
Síntesis N°1.- Método de Späth & Lederer (1930)

El proceso de síntesis utilizado por estos autores involucra cuatro etapas, cuyas reacciones se muestran a continuación.

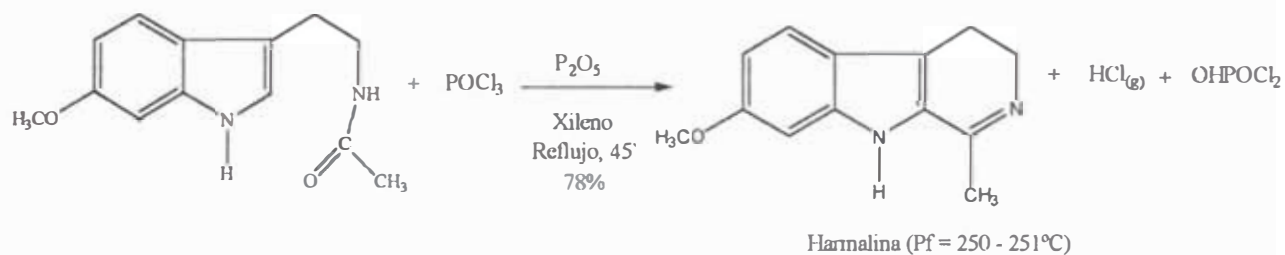
Etapa N° 1 Síntesis de la 6 – y – 4 metoxitriptamina.



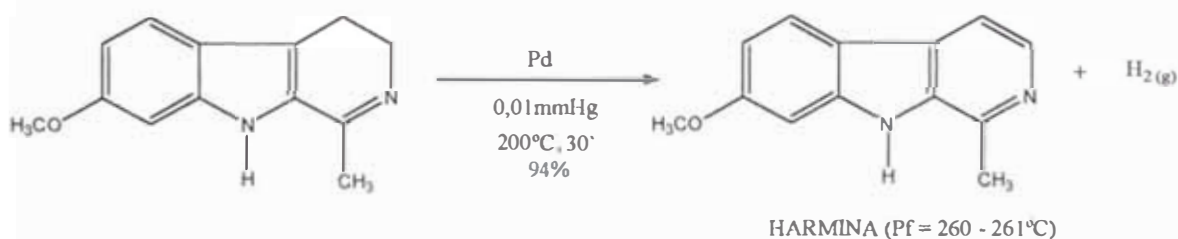
Etapa N°2.- Síntesis de la N-acetil-6-metoxitriptamina



Etapa N°3.- Síntesis de la harmalina



Etapa N°4.- Síntesis de la harmina

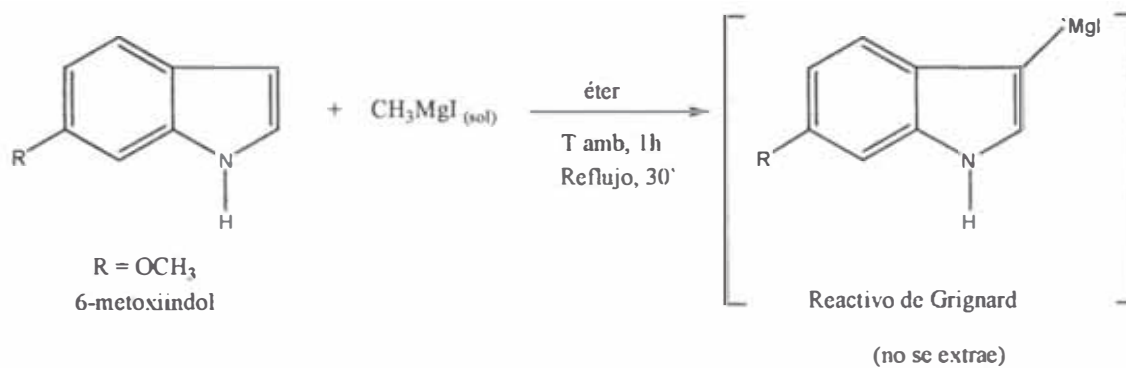


Síntesis N°2 Akabori, S. & K Saito (1930)

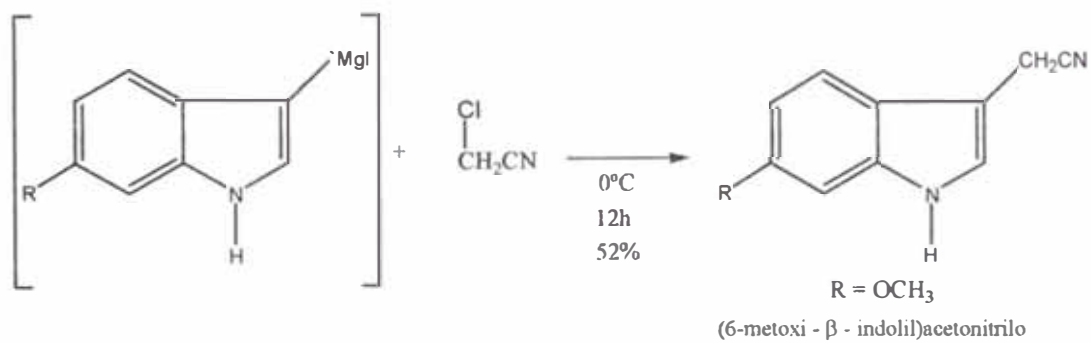
El proceso utilizado por estos autores involucra 3 etapas importantes, las cuales se muestran a continuación.

Etapa N°1 Síntesis de 6-metoxitriptamina

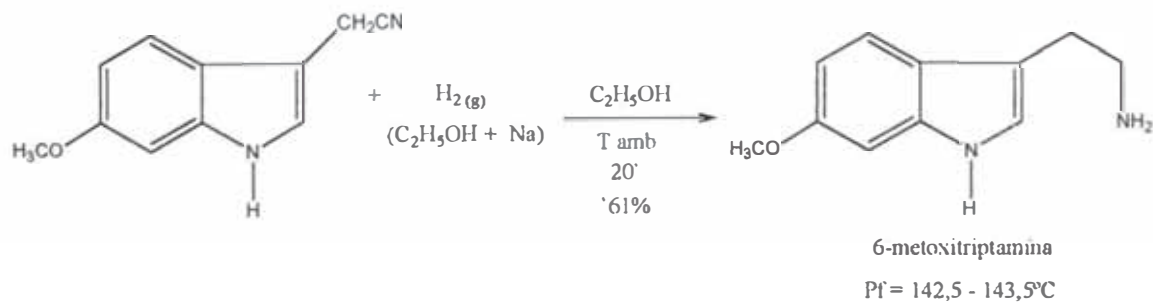
a)



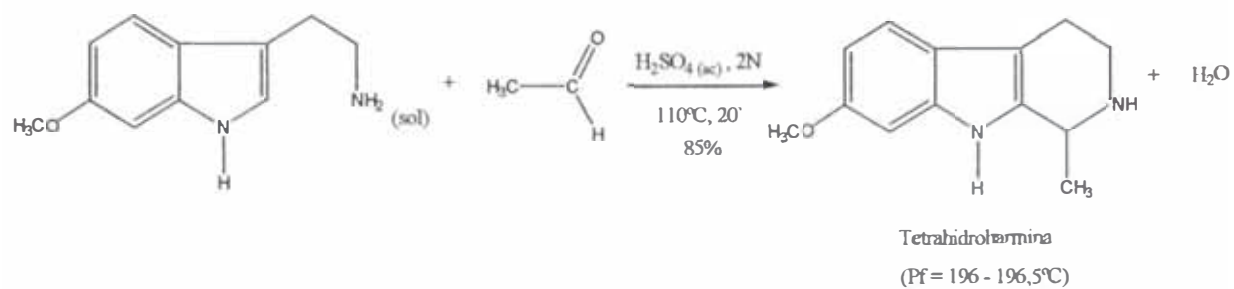
b)



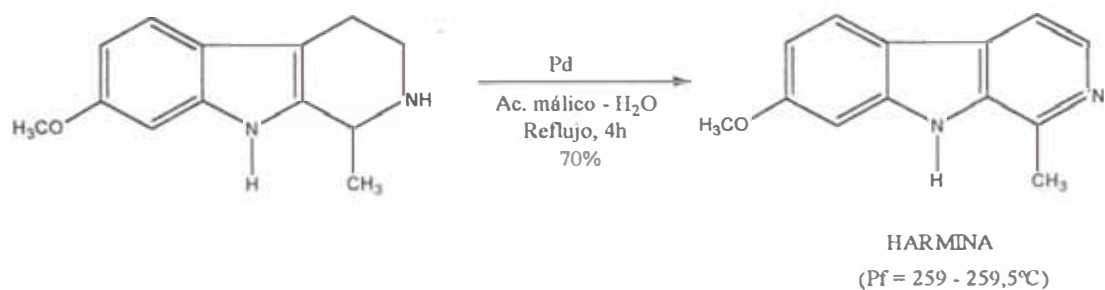
c)



Etapa N°2 Síntesis de la tetrahidroharmina



Etapa N°3 Síntesis de la harmina



B. ESTUDIOS QUIMICOS GENERALES

1. Análisis cualitativo – Marcha fitoquímica

Se han revisado tres procedimientos citados en la bibliografía:

- i Reyna (1999-b), de acuerdo a Rondina & Coussio - 1969 (Anexo N°3).
- ii Lock (1994)
- iii Miranda (1996)

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

Miranda (1996) sigue un procedimiento totalmente diferente, para llegar a los mismos resultados. Este procedimiento lo hemos experimentado durante nuestra práctica Pre Profesional en “La Molina Calidad Total Laboratorios” (julio - octubre, 1998) y fue presentado como informe del curso CP500 Taller de Prácticas Pre Profesionales (Per. Acad. 98 – 2). Este procedimiento tiene dos desventajas: a) el uso de éter etílico, que es un solvente excesivamente volátil y costoso, 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 de Reyna (1999-b), (ver Anexo N°3)

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

* 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.

dos test generales para alcaloides, los cuales se describen en el Anexo N°2.

3. Determinación cuantitativa de alcaloides

Se revisó dos procedimientos referentes a la determinación cuantitativa de alcaloides en muestras vegetales: el método propuesto por Pelt et al. (1967), y el descrito en la 20ª edición de la Farmacopea de los Estados Unidos (1980). 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 de los alcaloides).

a) 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)

i Alcalinización de la muestra con una solución de amoníaco concentrado $\text{NH}_3(\text{ac})$ 15N.

ii Maceración con una mezcla de solventes: Etanol – cloroformo (1 : 2), Etanol – éter etílico (1: 2) ó Eter etílico – cloroformo (3 : 1).

iii 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: se obtiene 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 $\text{H}_2\text{SO}_{4(\text{ac})}$ 0,5N.
- vi Alcalinización de la solución ácida con una solución de amoníaco concentrado $\text{NH}_{3(\text{ac})}$ 15N, y extracción de los alcaloides como bases libres en una mezcla de éter – cloroformo.
- vii Evaporación del solvente orgánico: se obtiene 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 $\text{H}_2\text{SO}_{4(\text{ac})}$ 0,2N.
 - 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 $\text{NaOH}_{(\text{ac})}$ 0,2N

b) Procedimiento de la 20th ed. U.S. Pharmacopoeia – USP (1980).

“Determinación cuantitativa de alcaloides”

- Muestra utilizada
Secado de la muestra a baja temperatura y molienda
- Extracción sólido – líquido (Obtención del Extracto Bruto Orgánico, EBO)

Se contemplan tres métodos

- i.a 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.
- i.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).
- i.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)
 - ii 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.
 - iii Se evapora la solución de alcaloides purificados con un baño de vapor o con corriente de aire: se obtiene 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.

c) Procedimiento realizado en la Tesis

En la presente Tesis se ha tomado como base el método de Pelt et al. (1967), con la introducción de algunas modificaciones, tanto en el procedimiento, como en los solventes utilizados; y en la Tabla N°4 se resumen comparativamente ambos procedimientos.

4. Aislamiento de alcaloides

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

a) Procedimiento de Reyna & Torpoco (1994)

- 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 NH₃ al 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 H₂SO_{4(ac)} 2N.
 - vi Lavado con solvente orgánico (cloruro de metileno), se descarta la fase orgánica.

Tabla N°4

**COMPARACIÓN DEL MÉTODO DE DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE
ALCALOIDES DESCRITO POR PELT et al. – 1967 Y AQUEL UTILIZADO
EN NUESTRA TESIS.**

NATURALEZA DE LAS OPERACIONES		PELT ET AL. (1967)	TESIS. SÁNCHEZ (2001)
EXTRACCIÓN	Peso de la muestra	10 g	50 g
	DESENGRASE	No se realiza	(3x300 mL n – hexano en frio)
	ALCALINIZACION	Amoniaco concentrado (8mL)	Amoniaco concentrado (100 mL)
	SOLVENTE	Alcohol 95°- cloroformo, 1:2 (30 mL) ó Etanol - éter, 1:2 (30 mL) ó Eter:- cloroformo, 3:1 (150 mL)	Metanol - cloroformo 1:1 (200 mL)
	FORMA DE EXTRACCION	Maceración: 12 h, agitación, o una combinación de ambas	Maceración 7 días
	SEPARACION DE LA SOLUCIÓN EXTRACTORA	Extracción con Eter etílico utilizando un soxhlet	Extracción con acetato de etilo en soxhlet
	VERIFICACION DE LA EXTRACCION	Reactivo de Mayer	Reactivo de Mayer
SEPARACIÓN	PURIFICACION Y ELIMINACION DE PIGMENTOS Y OTRAS FRACCIONES SOLUBLES	<ul style="list-style-type: none"> • Evaporación del solvente • Reemplazo del solvente con la mezcla éter – cloroformo • Paso de los alcaloides a una solución de ácido sulfúrico 0,5N • 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 en ácido sulfúrico 0,5N • Lavado de la solución ácida con acetato de etilo • Basificación de la solución ácida con amoniaco acuoso y extracción de los alcaloides libres con acetato de etilo. • Evaporación del solvente
	ELIMINACION 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 (40°C 300 mbar) • Repetición de la operación 4 veces
CUANTIFICACION	TITULACION ACIDO – BASE	<ul style="list-style-type: none"> • Redisolución del residuo en cloroformo • Adición de 20 mL de H₂SO₄ 0,2N • Evaporación del cloroformo en baño maría • Filtración y lavado del filtrado • Titulación del exceso de ácido con NaOH 0,02N 	<ul style="list-style-type: none"> • Redisolución del residuo en cloroformo • Adición de 20 mL de H₂SO₄ 0,2N • Evaporación del cloroformo en baño maría • Titulación del exceso de ácido con NaOH 0,2N
	OBSERVACION DEL PUNTO FINAL	Rojo de metilo	Titulación Potenciométrica

vii Alcalinización del extracto acuoso con carbonato de sodio y extracción de los alcaloides libres con cloruro de metileno.

viii Concentración por destilación simple: se obtiene el EBA.

- Purificación

El EBA se purifica mediante cromatografía en placa preparativa y en columna.

- Resultados

Se obtuvo el alcaloide puro (por CCF) y se caracterizó por espectrometría de masas y resonancia magnética nuclear RMN^1H .

b) **Procedimiento de Poupat (1982)**

- Muestra utilizada

Muestra seca y molida

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

Alcalinización de la muestra vegetal con una solución acuosa de amoníaco NH_3 al 25% hasta consistencia pastosa.

ii Extracción de la muestra en un extractor soxhlet con solventes orgánicos, hasta que el resto sólido quede exento de alcaloides (Test de Mayer negativo).

iii El extracto orgánico se concentra a la tercera parte de su volumen: se obtiene el EBO.

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

iv Disolución del EBO con una solución acuosa ácida (ácido clorhídrico $\text{HCl}_{(\text{ac})}$ 2 – 5% ó ácido sulfúrico $\text{H}_2\text{SO}_{4(\text{ac})}$ 2 – 5%). Se descarta la fase orgánica.

v La fase acuosa ácida se extrae con éter de petróleo para eliminar los compuestos orgánicos solubles.

- vi La fase acuosa ácida se alcaliniza con una solución acuosa de amoníaco $\text{NH}_3(\text{ac})$ al 25%, en presencia de solvente orgánico (cloroformo).
- vii Se extraen los alcaloides libres con solvente orgánico. Se descarta la fase acuosa.
- viii Las fases orgánicas se reúnen, se secan con sulfato de sodio anhidro $\text{Na}_2\text{SO}_4(\text{s})$ y se concentra a sequedad: se obtiene el EBA.

c) Procedimiento de Farnsworth & Euler (1962)

- Muestra utilizada
Muestra seca y molida
- Extracción sólido – líquido (Obtención del Extracto Bruto Orgánico, EBO)
 - i Desengrase del material vegetal, con éter de petróleo (30 – 60° C).
 - ii Alcalinización con una solución acuosa de amoníaco NH_3 al 20% y se seca sobre un baño de vapor.
 - iii Se extrae la muestra a reflujo con cloroformo CHCl_3 durante 30 minutos. Se filtra el solvente, y se vuelve a repetir la extracción una segunda vez.
 - iv Los extractos orgánicos se concentran hasta un volumen muy reducido: se obtiene el EBO.
- Separación líquido – líquido (Obtención del Extracto Bruto de Alcaloides, EBA)
 - v El extracto orgánico concentrado se extrae, en una pera de decantación, con una solución de ácido clorhídrico $\text{HCl}(\text{ac})$ al 1%. Se descarta la fase orgánica.
 - vi El extracto acuoso ácido se alcaliniza con solución de amoníaco acuoso $\text{NH}_3(\text{ac})$ al 28%.

vii El extracto acuoso alcalino se extrae dos veces con cloroformo CHCl_3 .

viii Los extractos se evaporan a sequedad: se obtiene el EBA.

d) Comparación de Procedimientos

Los cinco procedimientos de aislamiento de alcaloides presentados, dos en la Sec. II.A.2. (pág. 13 - 15) y tres en esta sección, siguen dos grandes etapas para la obtención del Extracto Bruto de Alcaloides, siendo este el procedimiento experimental realizado en nuestra Tesis. Este esquema de trabajo se resume a continuación.

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

- 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.

- Alcalinización con $\text{NH}_3(\text{ac})$

- Extracción con solventes (por agitación, reflujo o soxhlet)

- Eliminación del solvente por destilación a presión reducida y obtención del EBO.

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

- Disolución del EBO con $\text{H}_2\text{SO}_4(\text{ac})$ o $\text{HCl}(\text{ac})$

Esta etapa tiene como objetivo extraer los alcaloides como sales.

- Lavado con solventes orgánicos (éter de petróleo, CH_2Cl_2 , y/o CHCl_3) y eliminación del solvente orgánico.

Esta etapa tiene como objetivo eliminar la mayor parte de compuestos coloreados solubles en solventes orgánicos.

- Alcalinización (con Na_2CO_3 , NaOH ó $\text{NH}_3(\text{ac})$) de la fase acuosa. Mediante la alcalinización de los extractos acuosos ácidos las sales de alcaloides retoman a su forma de bases libres.
- Extracción con solventes orgánicos
En esta etapa se procede a la extracción de los alcaloides libres de la fase acuosa alcalina, mediante extracción líquido – líquido.
- Eliminación del solvente por destilación y obtención del EBA.

5. Identificación espectroscópica de compuestos orgánicos (Reyna, 1999-a)

Son cinco las técnicas espectroscópicas que constituyen las herramientas principales para la determinación de la estructura de un compuesto orgánico, a saber, la espectrometría de masas EM, la espectroscopía de resonancia magnética nuclear de hidrógeno y de carbono, RMN^1H y RMN^{13}C , la espectroscopía de infrarrojo IR y la espectroscopía ultravioleta UV, debido a que estas técnicas permiten determinar un amplio rango de elementos estructurales.

La importancia relativa de cada método depende de la cantidad de información útil que pueda obtenerse a partir de él, la cual es función no solamente de la cantidad total de información, sino también de su interpretabilidad, y esto varía de molécula a molécula. En general, se acepta que la utilidad entre ellas sigue el orden:



a) Espectrometría de masas, EM

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 (50 a 100 Kcal /mol) de las moléculas, 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 ion 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 ion molecular, son reportados como porcentaje del pico base.

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

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

b) Espectroscopía de resonancia magnética nuclear del ^1H , RMN ^1H

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 ó 600 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:

- i 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;
- ii 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;

- i. 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 del carbono ^{13}C , RMN ^{13}C**

La RMN ^{13}C tiene un valor particular en química orgánica. Mientras la RMN ^1H nos permite “ver” los protones enlazados a la estructura carbonada de la molécula, la RMN ^{13}C nos permite ver los carbonos; por ello, la RMN ^{13}C es un complemento perfecto de la RMN ^1H para dilucidar la estructura de un compuesto.

Igual que en el isótopo de hidrógeno ^1H , el núcleo del isótopo de carbono – 13, ^{13}C , tiene valores de spin de $+1/2$ y $-1/2$, que permite utilizarlo en espectroscopía de RMN, y por ello, los principios físicos de la RMN ^{13}C son los mismos que los de la RMN ^1H . Sin embargo, se presenta una diferencia. En la RMN ^1H 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 RMN ^{13}C se estudia al isótopo de carbono menos abundante, al ^{13}C , que constituye el 1,1% del total de carbonos. Esta deficiencia deviene en una ventaja, en razón de que no se observan desdoblamientos del tipo $^{13}\text{C} - ^{13}\text{C}$ en los espectros de RMN ^{13}C , a pesar que dichos núcleos vecinos pueden desdoblar sus señales entre sí, pero las probabilidades que se encuentren dos núcleos de ^{13}C resultan muy escasas.

Una desventaja de la baja abundancia isotópica del ^{13}C 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 RMN ^{13}C .

Otra desventaja es que debe utilizarse una cantidad de muestra mayor (aproximadamente 20 mg) que la requerida para obtener un espectro de RMN ^1H (4 mg o aún menos).

Al igual que la RMN ^1H , la RMN ^{13}C proporciona información del entorno electrónico en el que se encuentra cada átomo de carbono en la molécula. Los desplazamientos químicos en la RMN ^{13}C son más o menos paralelos a los de la RMN ^1H . El compuesto de referencia, tetrametilsilano, $(\text{CH}_3)_4\text{Si}$, 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 RMN ^{13}C son mucho mayores que los observados en la RMN ^1H , 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 RMN ^{13}C sean más sencillos que los de hidrógeno, ya que en un espectro de ^{13}C es poco probable que se observen señales sobrepuestas.

Existen dos clases de espectros de RMN¹³C: en uno se observa los acoplamientos spin – spin ¹³C – ¹H, y en el otro no.

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 picos, la señal de cada grupo de átomos de carbono magnéticamente 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 picos 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.

Transferencia de polarización. Uno de los métodos con secuencias de pulsos de uso rutinario en la investigación de laboratorio es, por ejemplo, la RMN¹³C – DEPT (en inglés, “distorsionless enhanced by polarization transfer”, osea, transferencia de polarización aumentada y no distorsionada).

Este tipo de espectro permite saber 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 multiplas próximas. El experimento DEPT consta de tres espectros: espectro registrado con un pulso (DEPT – 90) que sólo muestra las señales de los carbonos unidos a un solo hidrógeno (CH), un segundo espectro (DEPT – 135) en el que aparecen señales positivas para CH₃ y CH, absorciones negativas para CH₂ y en los que los carbonos cuaternarios carecen de señal, y por último, el espectro normal con desacoplamiento de ¹H de banda ancha.

El espectro obtenido y presentado en la parte experimental (pág. 87) pertenece a esta clase de espectros.

d) 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 666 cm^{-1}), en relación a la transmitancia (%T) o absorbancia (A) que presenta la muestra.

En nuestro espectro IR de la harmina (pág. 89) se registra el número de onda ν^{-1} con respecto a la transmitancia (%T).

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).

Cuando una muestra no absorbe radiación a una longitud de onda particular, se registra como un 100% T (caso ideal). La porción del espectro donde %T es 100 o cerca de 100 se llama “línea base” y aparece registrada en la parte superior de un espectro de IR.

La absorción de radiación por la muestra a una longitud de onda determinada origina un descenso en el %T, lo que se pone de

manifiesto en el espectro en forma de un “pico” o más propiamente de una “banda de absorción”.

La posición de las bandas de un espectro de IR se presentan como longitudes de onda λ (en micrones, μm) o como número de onda ν^{-1} (en cm^{-1}).

Las intensidades de la absorción de las bandas se expresan ya sea como transmitancia (%T) o como absorbancia*.

A diferencia de los espectros de masas y de RMN los espectros de 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 pico a pico 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 de IR es característico de toda la molécula, es una característica experimental que 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. Es la persistencia de estas bandas características lo que permite al químico obtener útil información estructural acerca de los grupos funcionales presentes en la molécula (por ejemplo: el grupo oxhidrilo OH, el grupo carbonilo $\text{C} = \text{O}$, etc.) mediante simple

* La transmitancia es la relación de la intensidad radiante transmitida por una muestra con respecto a la intensidad radiante incidente sobre la muestra

$$\% T = \frac{\text{intensidad transmitida}}{\text{intensidad incidente}} \times 100$$

La absorbancia es el logaritmo, en la base 10, del recíproco de la transmitancia

$$A = \text{Log}_{10} T^{-1}$$

inspección del espectro y la referencia a las tablas de frecuencias de tales grupos.

Dado al hecho que no dependemos sólo del espectro de IR para la identificación de un compuesto orgánico, no se requerirá un análisis detallado del espectro de IR. Estos espectros se utilizan en conjunción con los otros datos espectrales (masas, RMN, UV) para la determinación de la estructura molecular.

La radiación IR ($4000 - 666 \text{ cm}^{-1}$) es absorbida y convertida por una molécula orgánica en energía de vibración molecular. Esta absorción está cuantizada; sin embargo, los espectros vibracionales (de IR) aparecen como bandas y no como líneas, debido a que un simple cambio de energía vibracional se encuentra acompañado por muchos cambios de energía rotacional.

e) 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 ($200 - 400 \text{ nm}$), en relación a la intensidad de absorción (expresada como absorbancia $A \times 100$; ó absorptividad 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 λ_{max} , 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.

La intensidad de la absorción UV (expresada como Absorbancia) cumple con la Ley de Lambert – Beer, la cual relaciona la absorbancia

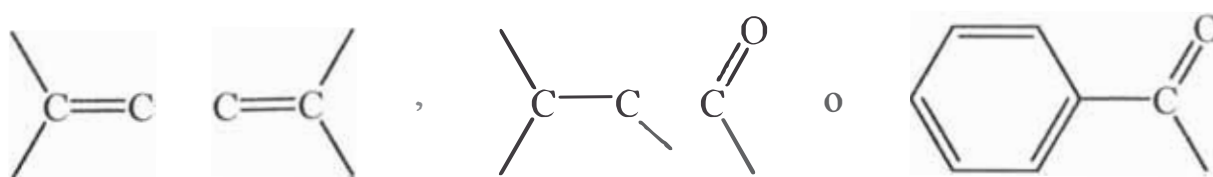
A, la transmitancia T y la absorptividad molar ϵ (coeficiente de extinción molar) según la ecuación:

$$A = \text{Log}_{10}(1/T) = \epsilon cb \text{ y } \epsilon = A/cb$$

La absorbancia de un compuesto, a una longitud de onda en particular, aumenta al aumentar el número de moléculas que experimentan la absorción. En consecuencia la absorbancia, además de depender de la estructura electrónica del compuesto, depende de la concentración de la muestra c (en mol/L) y del espesor de la celda empleada b (en cm). Por ello es frecuente expresar la intensidad de absorción en los espectros UV como absorptividad molar ϵ en lugar de absorbancia A, debido a que ϵ es un valor reproducible que tiene en cuenta tanto la concentración de la muestra c como la longitud de la celda b; y si bien sus unidades son $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ es frecuente escribirla como una cantidad adimensional.

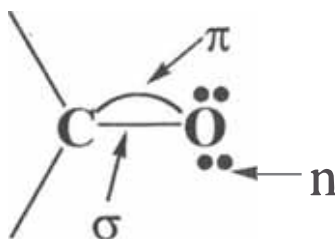
Cuando los valores de ϵ son muy grandes es común utilizar $\log \epsilon$ en los gráficos de UV. Las absorciones con $\epsilon_{\text{max}} > 10^4$ son absorciones de alta intensidad, mientras que las absorciones de baja intensidad corresponden a valores de $\epsilon_{\text{max}} < 10^3$. Estas últimas se consideran “transiciones prohibidas”.

Los espectros de UV proporcionan mucho 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:



La Espectrometría UV toma ventaja de esta selectividad en caracterizar sólo sistemas conjugados: La mayor parte de una molécula compleja resulta transparente (no absorbe) en el UV, y por tanto estos grupos conjugados característicos pueden ser puestos en evidencia dentro de la molécula.

Origen de las absorciones UV. El estado fundamental de una molécula orgánica contiene los electrones de valencia en tres tipos de orbitales moleculares: orbitales sigma σ , orbitales pi π y orbitales ocupados pero no enlazados n. Así para el grupo carbonilo se tiene:



La energía absorbida por la molécula en la región UV (200 – 400 nm) produce transiciones electrónicas de los electrones de valencia de la molécula presentes en los orbitales σ , π ó n, a un orbital excitado de mayor energía.

III. PARTE EXPERIMENTAL

Presentación

El Dr. Víctor Reyna Pinedo, asesor de esta tesis, inició sus investigaciones en química orgánica de productos naturales en nuestra universidad, durante el año de 1982, estudiando justamente la liana ayahuasca (*B. caapi*).

En el mes de setiembre de dicho año 1982, el Dr. Víctor Reyna presentó al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología – Concytec el proyecto “Contribución al estudio químico de plantas peruanas”, el cual recibió la aprobación correspondiente (Resolución de Presidencia N° 066–Concytec–P–82 del 30.09.82). A raíz de ello, recibió la sugerencia del Dr. Ramiro Castro de la Mata, entonces alto funcionario del Concytec, para realizar sus investigaciones con el estudio de la liana “ayahuasca” (*B. caapi*), en razón a su extendido uso en medicina tradicional en la región amazónica. Además, el Dr. Castro le proporcionó muestra de dicha planta que la tenía cultivada en su domicilio en Lima.

En diciembre de 1982 el Dr. Reyna presentó ante el Concytec el proyecto para continuar tales investigaciones, recibiendo la aprobación respectiva (Resolución de Presidencia 029–Concytec–P–83 del 25.02.83). Del 10 al 28 de septiembre del año 1983 el Dr. Reyna participó en el “viaje de colección para el estudio de la flora medicinal en la región del Alto Ucayali” (Comunidades Shipibo – Conibo de Puerto Belén y Puerto Nuevo de Charara, Distrito de Iparia, Provincia Ucayali, Dpto. Ucayali), bajo la dirección del Dr. Jacques Tournon y con la participación de los docentes de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Blga. Joaquina Albán C. y Q. F. Gudelia Serrano. En dicho viaje se colectó la liana “ayahuasca” (*B. caapi*) (Reyna, 1984). En esta primera etapa se logró también adquirir las principales referencias bibliográficas relativas a la “ayahuasca”.

El siguiente proyecto presentado al Concytec, en el mes de julio de 1984, “Contribución al estudio químico de la <ayahuasca> (*Banisteriopsis*

caapi) y de la <chacrana> (*Psychotria viridis*)”, también recibió la subvención solicitada (Resolución de Presidencia N°158–Concytec–P–84 del 30.08.84). Con dicha subvención se sufragó los gastos de transporte que posibilitó la participación del Dr. Reyna en el cursillo de medicina tradicional realizada en la comunidad de Infierno (Prov. Tambopata – Dpto de Madre de Dios, del 01 al 06 de octubre de 1984) y realizar la colecta de otra muestra de la liana “ayahuasca” (*B. caapi*) (Reyna, 1986).

Durante el período de ejecución de dicho proyecto (Set’84 – Jul’86) se incorporó a su grupo de investigación el Bach. Clovis Aguinaga Risco, al haber iniciado su trabajo como Jefe de Prácticas de nuestra Facultad en el Período Académico 85-1.

El trabajo experimental realizado en este período (1982 – 1985) permitió la obtención de una muestra de alcaloides semipurificado, la cual fue remitido a los colegas del ICSN – CNRS* de Francia recibiendo los análisis respectivos en julio del 1986 (espectros de RMN¹H y de masas), que concluían que se trataba de harmina, el principal alcaloide contenido en la liana “ayahuasca”. Lamentablemente, desde ese momento (Ago’86) y hasta agosto de 1995 (9 años) el Bach. Aguinaga no escribió la tesis respectiva, y tampoco logró culminarla en el Per. Acad. 95–2 (Ago. – Dic. 95) cuando se le redujo la carga académica con tal fin, quedando sin publicarse los resultados de dicho trabajo.

Por el contrario, bajo la asesoría del Dr. Reyna, se culminaron dos trabajos estrechamente relacionados con esta planta:

- i Monografía de Bachiller de la Srta. E. Donoyan, de la Facultad de Ciencias y Filosofía de la Universidad Particular Cayetano Heredia

* Institute de Chimie des Substances Naturelles del Centro Nationale de la Recherche Scientifique (de Gif – Sur – Yvette, Francia), lugar donde el Dr. Victor Reyna realizó sus estudios de Doctorado de Tercer Ciclo en Química Orgánica.(Oct’78 – Dic’81)

(Julio, 1986): “*Banisteriopsis caapi* (Spruce ex – Griseb) Morton y el brebaje Ayahuasca”, 49 págs.

- ii Tesis de Licenciatura en química de la Srta. V. Torpoco C., de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Ingeniería (Diciembre, 1993): “Constituyentes Químicos (alcaloides) de la <chacruna>, *Phychotria viridis* (Ruiz & Pavón)”, 115 págs.

En el Per. Acad. 98–1 (Abr – Jul’98) la autora de esta tesis, Tania Sánchez R., reinició el trabajo químico con la liana “ayahuasca”, inscribiéndose en el curso CQ561 Proyecto de Tesis I, realizando el trabajo “Estudio fitoquímico de la ayahuasca (*B. caapi*)”. Trabajo que fue continuado en el siguiente semestre 98–2 (Ago – Dic’98) en el curso CQ562 Proyecto de Tesis II, con el trabajo “Determinación cuantitativa de alcaloides presentes en los tallos de la ayahuasca (*B. caapi*)”; posteriormente se registró con fecha 16.07.99 en nuestra Facultad el plan de Tesis de Licenciatura “Estudio Químico de la Ayahuasca (*B. caapi*)” (Nº de registro 143).

Consideramos importante indicar que las etapas experimentales de laboratorio químico, desde el secado de la planta hasta la obtención del extracto semipurificado de alcaloides por recristalización, se realizaron en el ambiente de Investigación de Química de Productos Naturales (C3 – 175) del Laboratorio Nº12 de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Ingeniería, en el período comprendido entre abril de 1998 y octubre de 1999, demandando un tiempo aproximado de 4 meses de trabajo efectivo (considerando 5 días de trabajo por semana, de 8 horas por día).

Igualmente, la identificación de la harmina mediante procedimientos clásicos (punto de fusión y cromatografía en capa fina) se realizaron en nuestro laboratorio en el mes de octubre del 2000.

En cambio, la purificación final de la harmina mediante cromatografía en columna y su identificación mediante el espectro de resonancia

magnética nuclear de hidrógeno RMN¹H en CD₃OD – CDCl₃ y DMSO – d₆, fueron realizados por el Dr. Víctor Reyna, asesor de esta tesis, durante la breve estadía que realizó en el Institute de Chimie des Substances Naturelles del Centre Nationale de la Recherche Scientifique ICSN CNRS de Gif – Sur – Yvette (Francia) del 22 al 26 de septiembre del 2000, con la colaboración del Dr. M. Benechie. Además, una fracción de harmina purificada fue analizada en el Instituto Universitario de Bio – Orgánica – IUBO – Laboratorio N^o4, Universidad de la Laguna (Tenerife – España), durante la estadía de investigación que realizó, del 6 de enero al 25 de marzo del 2001, la M. Sc. Virginia Torpoco Carmen integrante de nuestro grupo de investigación, obteniéndose los espectros de masas, de RMN¹H (en DMSO – d₆), RMN¹³C y análisis porcentual de elementos.

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 masa CG – EM y la cromatografía líquida de alta presión – espectrometría de masas HPLC – EM.

Sin embargo, en nuestro laboratorio no contamos con estos equipos, en razón a su alto precio de venta, así como a su elevado costo de mantenimiento y puesta en operación. Por ello, en nuestro trabajo de purificación hemos hecho uso de los procedimientos convencionales, como lo son la recristalización y la cromatografía en columna. Posteriormente, la muestra purificada es identificada por métodos espectroscópicos (solicitados al exterior: masas y RMN).

TRABAJO PRELIMINAR

A. COLECCIÓN DE LA PLANTA

La muestra de tallos de ayahuasca (*Banisteriopsis caapi*) fue colectada, a pedido del Dr. Victor Reyna Pinedo, por el Sr. Ignacio Duri, curandero de la Comunidad de Infierno (Provincia Tambopata – Dpto. Madre de Dios), y entregado el día 6 de octubre de 1984. El Dr. Reyna se encontraba en dicha Comunidad asistiendo al curso “Aplicación de la Medicina Tradicional”, organizado por el Proyecto Aplicación de la Medicina Tradicional Ametra 2001 (Coordinador, Sr. Didier Lacaze), del Lun.01 al Sáb. 06. Oct. 1984 (Reyna, 1986).

B. ESTUDIO ETNOBOTANICO Y ETNOMEDICINAL. USO DE LA AYAHUASCA EN MEDICINA TRADICIONAL (Reyna, 1994 y Anexo N°4)

Durante el primer viaje de colección de plantas medicinales en la región del Alto Ucayali (amazonía peruana, Set`83) el Dr. Victor Reyna tomó conocimiento, por información de curanderos locales, que la bebida ayahuasca, utilizada ampliamente en la medicina tradicional de dicha región, se prepara a partir de dos plantas básicas: tallos de la liana del mismo nombre “ayahuasca” (*Banisteriopsis caapi*) y hojas del arbusto “chacrana” (*Psychotria viridis*) (Foto N°1).

Este conocimiento tradicional está considerado en la literatura científica consultada (Rivier & Lindgren – 1972 y McKenna et al. – 1984). Sin embargo, uno de los principales estudiosos de estos temas el etnobotánico norteamericano Richard E. Schultes considera que, por lo general, sólo una especie se utiliza en la preparación de la bebida, la liana ayahuasca (*Banisteriopsis caapi*), y que frecuentemente, pero no



Foto N°1. Preparación de la bebida “ayahuasca”, donde se observan los trozos de la liana “ayahuasca”. Comunidad de Vista Alegre, Alto Ucayali, Set’ 83. (Foto V. Reyna)

necesariamente, otras especies se agregan como aditivos, principalmente para alterar los efectos de la bebida, siendo los más comúnmente empleados las hojas de “chacrana” (*Psychotria viridis*) y de “yajè” (*Diplopteris cabrerana*) (Schultes & Raffauf – 1990, Schultes & Hoffmann – 1982 y 1980).

Esta opinión también ha sido sostenida por otros autores (McKenna et al. – 1984, Ayala & Lewis – 1978).

Actualmente esta plenamente verificado que las hojas de “chacrana” (*P. viridis*) junto con los tallos de “ayahuasca” (*B. caapi*) son los dos constituyentes básicos con los cuales se prepara la bebida ayahuasca (Callaway et al. – 1999 y Reyna – 1986), lo cual ratifica aquello sostenido por los curanderos de nuestra amazonía (Arévalo – 1986 y Luna & Amaringo – 1991).

Justamente, en la Foto N°2 se reproduce una pintura (visión) del reconocido pintor Pablo Amaringo, curandero “ayahuasquero” natural de Pucallpa, en la cual “... representa las dos plantas necesarias en la preparación del brebaje “ayahuasca”. De la liana “ayahuasca” sale una serpiente negra... Hay otra serpiente, la serpiente “chacrana”, de colores brillantes y luminosos. De su boca sale una radiación violeta rodeada por rayos azules. La serpiente “chacrana” penetra dentro de la serpiente “ayahuasca”, produciendo los efectos visionarios de estas dos plantas mágicas ...” Luna & Amaringo (1991).

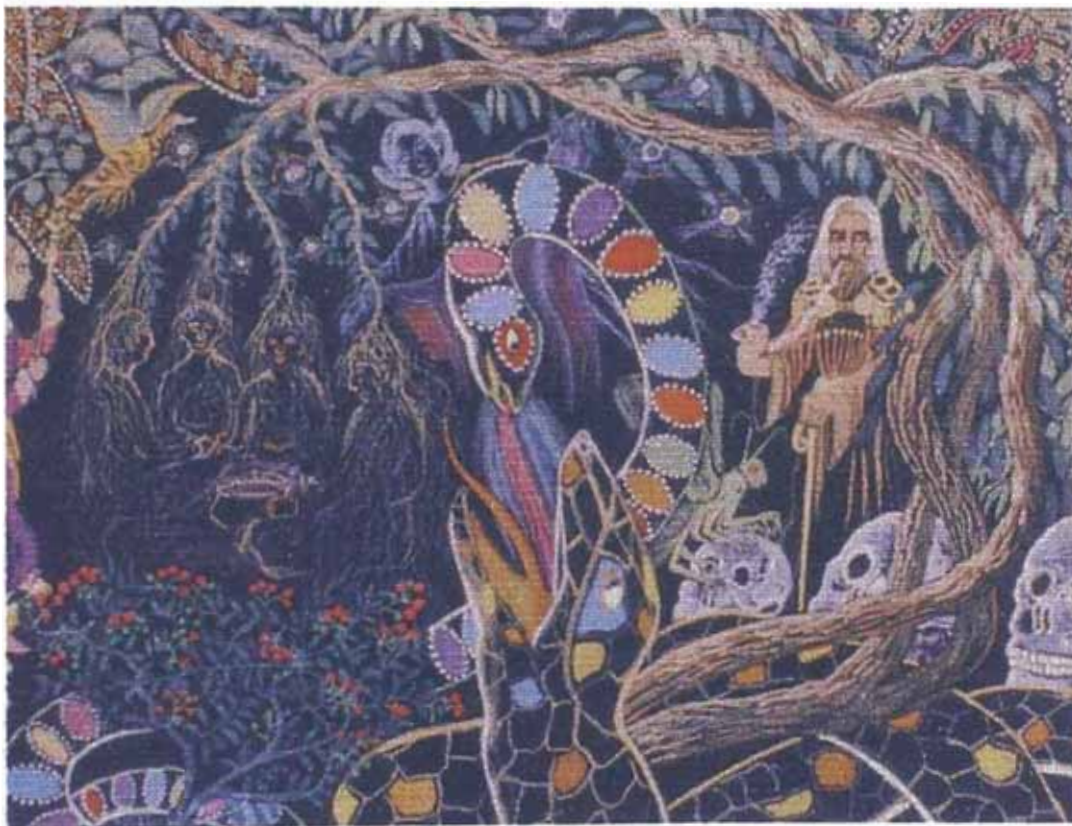


Foto N°2. Pintura del curandero ayahuasquero don Pablo Amaringo representando las dos plantas necesarias en la preparación de la bebida “ayahuasca”

C. DETERMINACION SISTEMATICA (IDENTIFICACIÓN BOTÁNICA)

La muestra de ayahuasca (Foto N°3) fue identificada por el etnobotánico José Schuncke Vigo, del Instituto Nacional de Medicina Tradicional – Inmetra del Ministerio de Salud (Anexo N°5).



Foto N°3. Tallo de la liana “ayahuasca” (*B. caapi*) y su corte transversal (Procedencia: Comunidad de Infierno, Provincia de Tambopata, Dpto. Madre de Dios, Oct' 84) (Foto. V. Reyna)

En la foto N°4 se muestra un ejemplar de ayahuasca en su estado natural.



Foto N°4. Liana “ayahuasca” (*B. caapi*) en su habitat natural (Alto Ucayali, Set' 83) (Foto V. Reyna)

D. ESTUDIO BIBLIOGRAFICO

Los estudios precedentes realizados por el Dr. Víctor Reyna acerca de la ayahuasca (Donoyan – 1986 y Reyna & Torpoco – 1994) nos permitieron contar desde el inicio de nuestro trabajo con el estudio bibliográfico respectivo, la revisión por computadoras del Chemical Abstracts, y copia de las principales referencias sobre este tema.

Los colegas e instituciones que nos apoyaron con la revisión del Chemical Abstracts fueron los siguientes:

- i Dr. Andre Collet, Ecole Normale Superieure de Lyon, Febrero 1996 (Chemical Abstracts 1985 – 1996).
- ii Prof. A. Kornhauser, I
UNESCO, Yugoslavia, Febrero de 1986
Chemical Abstracts: 1967 y siguientes.
- iii Dra. Christiane Poupat, ICSN – C NRS, Gif – Sur –Yvette, Francia, Febrero de 1983.
Chemical Abstracts: 1967 a 1982.

Consideramos oportuno indicar que los dos estudios más completos acerca de constituyentes químicos de la ayahuasca (*B. caapi*) corresponden a Rivier & Lindgren (1972) y McKenna et al. (1984), artículos que tratan acerca de la bebida ayahuasca.

TRABAJO EXPERIMENTAL

E. SECADO Y MOLIENDA DE LA PLANTA

Los tallos de "ayahuasca" se secaron precedentemente, inmediatamente después de su colección y transporte a nuestro laboratorio (Oct`84) en una estufa "Labor" (Hungría) a 40 – 60°C,

disponiéndose al inicio de nuestro trabajo (Abr'98) de 1355g de material seco (Foto N°5).



Foto N°5. Tallos de ayahuasca (*Banisteriopsis caapi*)

Esta muestra fue pulverizada en dos etapas: i A grano grueso, utilizando un molino de cuchillas “Finommechanika” (Hungría) y posteriormente, ii a grano fino, con ayuda de un molino de pulverización *(Foto N°6).

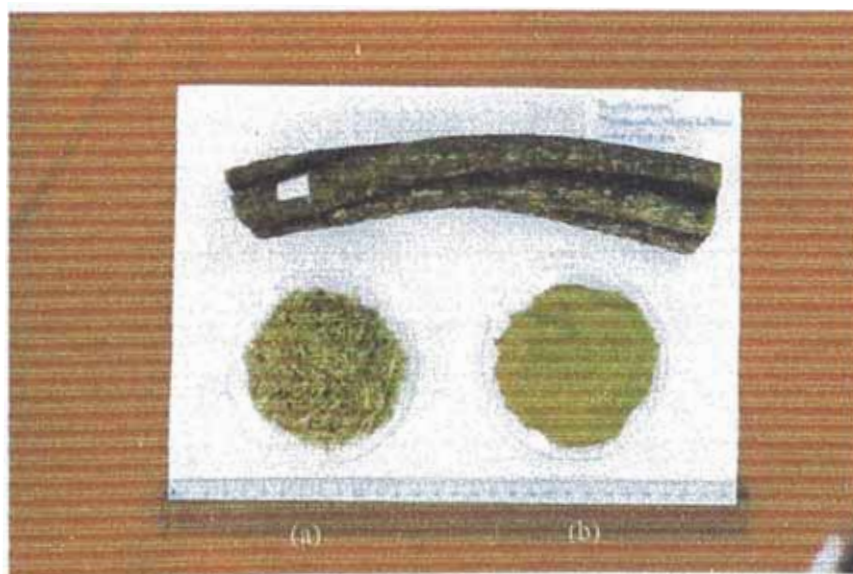


Foto N°6. Molienda de los tallos de ayahuasca a) Grano grueso y b) Grano fino

* Molino de cuchillas “Laboratory and Pulverizing Mill (malla N°024) (Laboratorio N°14 – Facultad de Ingeniería Química y Manufacturera - Universidad Nacional de Ingeniería.

F. ANALISIS CUALITATIVO – MARCHA FITOQUIMICA

1. **Muestra:** Tallos de ayahuasca (*B. caapi*) colectado en Tambopata (ver Sec. III. A). Se realizaron dos análisis, con resultados similares
 - i Primer análisis: Abr – Jul 98. Curso CQ 561 Proyecto de Tesis I.
 - ii Segundo análisis: 06 – 09 Ago 99. Quím. María A. Prieto (Becaria Intercampus) (con la colaboración de la Bach. Tania Sánchez).
2. **Cantidad de muestra por análisis:** 5g
3. **Procedimiento:** Reyna (1999), de acuerdo a Rondina & Coussio (1969) (ver Anexo N° 3).
4. **Resultados** (Ver Anexo N° 6)

Las dos muestras analizadas nos dieron idénticos resultados, los cuales se detallan en el Anexo N° 6 y se resumen a continuación:

- a) **Contiene:** Aminogrupos primarios o secundarios (+), grupos fenólicos libres (+), taninos (+), alcaloides(+++), triterpenos y esteroides (+), y leucoantocianidinas (+).

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

- b) **No contiene:** Flavonoides, saponinas, quinonas y catequinas.

G. DETERMINACION CUANTITATIVA DE ALCALOIDES

1. **Muestra:** Tallos de ayahuasca (*B. caapi*) colectado en Tambopata (ver Sec.III.A). Se realizaron tres análisis de la misma muestra:
 - i Primer análisis: Ago – Dic 98. Curso CQ 562 Proyecto de Tesis II.
 - ii Segundo análisis: Oct 98 – Feb 99.
 - iii Tercer análisis: 06 – 09 Ago 99. Quím. María A. Prieto (Becaria Intercampus) (con la colaboración de la Bach. Tania Sánchez)
2. **Cantidad de muestra por análisis:** 50g
3. **Procedimiento** (Descripción del 3^{er} 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 harmina, ver pág. 69 - 71), 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 colocan en un frasco erlenmeyer de 500 mL y se adicionan 200 mL de n-hexano. Se pone en agitación durante 3 horas y luego se decanta la solución orgánica. Al sólido recuperado se le adiciona una nueva porción de n-hexano y se repite la extracción. Este proceso se realiza dos veces más. La muestra sólida se deja secar al ambiente en un vaso de 800 mL.

ii Alcalinización con amoníaco concentrado $\text{NH}_{3(\text{ac})}$ 15N.

La muestra seca se coloca en un cartucho de tocuyo y se humedece con 100 mL de amoníaco concentrado $\text{NH}_{3(\text{ac})}$ 15N, durante 4 horas.

iii Extracción por solventes (Obtención del Extracto Bruto Orgánico)

- La muestra alcalinizada (dentro del cartucho y colocada en el equipo soxhlet) se coloca en maceración con 200 mL de una mezcla de metanol – cloroformo (1:1) a temperatura ambiente, durante 7 días.
- Luego se adiciona a la mezcla anterior 500 mL de acetato de etilo y se extrae en soxhlet durante 6 horas / día por 10 días.
- La mezcla orgánica se concentra en el rotavapor (40°C, 300 PSI), hasta que no destile más solvente y luego en baño maría 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 disolución ácida.
El Extracto Bruto Orgánico se disuelve con 190 mL de solución de ácido sulfúrico $H_2SO_{4(ac)}$ 0,5N.
- ii Lavado de la disolución ácida con solventes orgánicos
El extracto acuoso ácido se extrae con 400 mL de acetato de etilo, eliminándose los extractos orgánicos. Este lavado se realiza un total de 5 veces.
- iii Alcalinización del extracto acuoso con disolución de amoníaco.
El extracto acuoso ácido se alcaliniza con 12 mL de una disolución de amoníaco $NH_{3(ac)}$ 7,5N. La disolución final tiene pH 9.
- iv Extracción de alcaloides con solventes orgánicos (Obtención del Extracto Bruto de Alcaloides)
 - El extracto acuoso se extrae con 100 mL de acetato de etilo en un embudo de separación de 250 mL. Se realiza la extracción un total de 15 veces (hasta que la solución acuosa dé Test de Mayer negativo). Se elimina la fase acuosa libre de alcaloides.
 - Los extractos orgánicos se concentran en el rotavapor (40°C, 300 PSI) a sequedad.

c) Eliminación de las bases volátiles

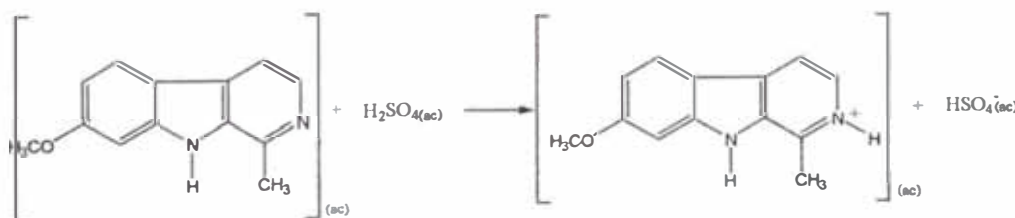
- i El sólido obtenido se disuelve en 50 mL de cloroformo y se lleva a concentrar al rotavapor, para eliminar el solvente. Se repite esta operación un total de 4 veces. Esto tiene por objeto la eliminación total de la base amoníaco $NH_3(g)$.
- ii Finalmente, se lleva a sequedad en el rotavapor, obteniéndose 840,2 mg de Extracto Bruto de Alcaloides (EBA).

d) Titulación. Determinación potenciométrica

- i El extracto bruto de alcaloides (840,2 mg) se disuelve con 30 mL de cloroformo y se agregan con una pipeta volumétrica 30 mL de solución estandarizada de ácido sulfúrico $\text{H}_2\text{SO}_{4(\text{ac})}$ 0,2009 N. El solvente orgánico se elimina en el rotavapor quedando una solución acuosa ácida que contiene alcaloides en forma de sales.
- ii Utilizando un potenciómetro* con electrodo de vidrio para determinar el punto de equivalencia, se titula la solución ácida con una solución estandarizada de hidróxido de sodio $\text{NaOH}_{(\text{ac})}$ 0,2363 N. El análisis de la curva de titulación (ver Anexo N°7) muestra que el punto de equivalencia corresponde a la adición de 16,0 mL de base, $\text{NaOH}_{(\text{ac})}$.

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

- i Al agregar un exceso de solución de ácido sulfúrico $\text{H}_2\text{SO}_{4(\text{ac})}$ (30 mL, 0,2009N) al Extracto Bruto de Alcaloides, ocurre la reacción:



y se tiene que:

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

$$\text{donde } N^\circ \text{ meq ácido total} = N \times V = 0,2009 \times 30 = 6,027 \text{ meq} (\gamma)$$

- ii El ácido sulfúrico $\text{H}_2\text{SO}_{4(\text{ac})}$ sobrante, que queda sin reaccionar con el alcaloide, se titula con 16,0 mL de solución de hidróxido de sodio

* Potenciómetro Mach EC20 Potable (Laboratorio N° 33 de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Ingeniería).

NaOH_(ac) 0,2363 N, según la ecuación:



Y en el punto de equivalencia se cumple que:

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

iii La cantidad de meq de hidróxido de sodio ($N = 0,2363$ y $V = 16,0$ mL) se determina por la relación: $\text{N}^\circ \text{ meq} = N \times V$ (mL)

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

$$\text{N}^\circ \text{ meq}_{(\text{NaOH})} = 0,2363 \text{ N} \times 16,0 \text{ mL}$$

$$\text{N}^\circ \text{ meq}_{(\text{NaOH})} = 3,780 \text{ meq}$$

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

$$\text{N}^\circ \text{ de meq (H}_2\text{SO}_4) \text{ sobrante} = 3,780 \text{ meq}$$

v La cantidad (en meq) de alcaloides presentes se determina a partir de la relación (β) y (γ):

$$\begin{aligned} \text{N}^\circ \text{ meq de alcaloide} &= \text{N}^\circ \text{ meq de ácido total} - \text{N}^\circ \text{ meq de ácido (sobrante)} \\ &= 6,023 \text{ meq} - 3,780 \text{ meq} \\ &= 2,243 \text{ meq} \end{aligned}$$

vi La cantidad (en mg) de alcaloides (harmina) 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 harmina $\theta = 1$) y M es el peso molecular de la sustancia (para la harmina $M = 212$ g/mol).

Luego:

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

$$W = 2,243 \times 212$$

$$W = 475,52 \text{ mg de (en 50 g de muestra seca)}$$

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

50 g	→	100%
0,476 g	→	% de alcaloides (como harmina)

$$\% \text{ de alcaloides (como harmina)} = \frac{0,476 \times 100}{50} = 0,95\%$$

Observación.- Para el caso de los análisis N° 1 y N° 2 (pág. 63) se obtuvieron resultados diferentes, de 0,22% y 0,30%, respectivamente (ver Anexo N° 8). Consideramos que estos resultados son defectuosos por lo siguiente:

- i En el 1er análisis el acetato de etilo probablemente se transformó en ácido acético.
- ii en el 2do análisis no se llega a observar bien el punto final de la titulación porque la coloración marrón oscuro del extracto bruto de alcaloides impide ver el viraje del indicador fenolftaleína.

H. AISLAMIENTO DE LA HARMINA (Enero 99 – Setiembre 2000)

1. **Muestra:** Tallos de ayahuasca (*B. caapi*) colectado en Tambopata (ver Sec. III.A). Se realizaron tres ensayos:

- i Primer ensayo: 28 enero – 29 octubre 1999 (150 g de muestra)
- ii Segundo ensayo: 26 abril 99 – agosto 2000 (200 g de muestra)
- iii Tercer ensayo: 31 enero 2000 – 21 marzo 2000 (50 g de muestra)

2. **Procedimiento:** (Aplicado al ensayo N°1)

a) Extracción sólido-líquido: Obtención del Extracto Bruto Orgánico

- i Desengrase con n-hexano.
 - En un frasco erlenmeyer de 1 L se colocan 150 g de la muestra y se adicionan 600 mL de n-hexano. La mezcla se pone en agitación*, a temperatura ambiente, durante cuatro horas, y luego se deja en reposo hasta el día siguiente (20h).
 - Se separa el líquido sobrenadante incoloro, con una pipeta de 10 mL. Al sólido restante se adiciona una nueva porción de 600 mL de n-hexano y se agita. Este procedimiento se realiza un total de 3 veces.
 - Finalmente el sólido húmedo se transfiere a un vaso de 800 mL, y se deja secar al aire a la temperatura ambiente.

ii Alcalinización con solución de amoníaco concentrado.

La muestra seca y desengrasada se introduce en un cartucho de tocuyo, se cierra, y se coloca dentro del cuerpo central del equipo soxhlet. Luego se añade sobre el cartucho, con la ayuda de una pipeta, 300 mL de solución de amoníaco concentrado $\text{NH}_3(\text{ac})$ 15N, humedeciendo completamente toda la muestra, y se deja en reposo durante una hora.

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

iii Extracción con solventes

- Maceración con metanol – cloroformo (1:1)

Sobre la muestra alcalinizada, dentro del cuerpo central del equipo soxhlet, se adicionan 500 mL de una mezcla de metanol – cloroformo (1:1) y se deja macerar durante 10 días. La solución final adquiere un color pardo, que se separa por decantación.

- Extracción con acetato de etilo en equipo soxhlet

En el balón de destilación de 2 L se adicionan 1 L de acetato de etilo, y luego se adiciona sobre el cuerpo central del equipo soxhlet 500 mL más de acetato de etilo. Se coloca a reflujo 8h/día durante 30 días, hasta que el test de Mayer de negativo.

- Eliminación del solvente

El extracto orgánico se concentra en dos etapas. Primero en el rotavapor (40° C, 300 PSI) y luego se transfiere el concentrado a una cápsula de porcelana de 9 cm de diámetro, se evapora sobre un baño maría (T = 90° C), hasta sequedad, obteniéndose el Extracto Bruto Orgánico, sólido de color marrón oscuro, que no se pesó.

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

iv Disolución del extracto bruto orgánico con solución ácida

- El extracto bruto orgánico se disuelve en 200 mL de solución de ácido sulfúrico $H_2SO_{4(ac)}$ 0,5N.
- La disolución acuosa ácida se filtra a través de papel de filtro.
- Al Extracto Bruto Orgánico sólido se le vuelve a agregar 100 mL de solución de ácido sulfúrico $H_2SO_{4(ac)}$ 0,5N; se filtra la solución ácida.
- Finalmente, al Extracto Bruto Orgánico sólido se le agregan 100 mL de solución de ácido sulfúrico $H_2SO_{4(ac)}$ 0,5N y se filtra. El

sólido remanente da prueba negativa de alcaloides (test de Mayer) y se descarta.

- Los extractos acuosos ácidos, de color anaranjado oscuro, se reúnen (volumen total = 400 mL) y se colocan en un embudo de separación de 1 L.
- v Lavado de la disolución ácida con solventes orgánicos
- La disolución ácida, que contiene los alcaloides como sales, se lava 3 veces con porciones de 400 mL de acetato de etilo.
 - Se separa la fase orgánica (que no contiene alcaloides, test de Mayer negativo), que es de color anaranjado, y se descarta.
- vi Alcalinización del extracto con solución de amoníaco $\text{NH}_3(\text{ac})$ 7,5N
- La disolución acuosa ácida, en el embudo de separación, se alcaliniza con 34 mL de $\text{NH}_3(\text{ac})$ 7,5 N hasta pH 9. Se observa el oscurecimiento de la disolución.
- vii Extracción de alcaloides con solventes orgánicos
- A la fase acuosa básica (en el embudo de separación) se agregan 400 mL de acetato de etilo.
 - Esta extracción se repite cinco veces, cada vez con 400 mL de acetato de etilo, hasta que la fase acuosa esté exenta de alcaloides (test de Mayer negativo).
 - Los extractos orgánicos se colocan en un balón de 2 L y se concentran en el rotavapor (40° C, 300 PSI) hasta sequedad, obteniéndose el Extracto Bruto de Alcaloides (EBA), como un sólido pulverulento, de color marrón claro, que no se pesó. El análisis por CCF nos indica que el extracto contiene harmina (ver Anexo N°9).

c) **Purificación por recristalización** (14 – 29 Oct. 99)

i 1ra Recristalización

- Se realizó en dos fracciones. La primera fracción se obtuvo agregando metanol caliente sobre el EBA sólido, por partes y separando inmediatamente la disolución obtenida, con ayuda de una pipeta. Se agregó un total de 50 mL de metanol, lográndose disolver la mayor parte del EBA sólido.

Esta disolución se deja reposar durante 4 días, a temperatura ambiente (1 día) y en refrigeración a 0 – 3°C (3 días), observándose la formación de cristales en forma de agujas, que se recuperan retirando con ayuda de una pipeta el líquido sobrenadante: se obtiene los cristales N°1.

- La 2da fracción se obtuvo agregando lentamente y con agitación un total de 30 mL de metanol caliente al resto del EBA sólido que no se disolvió previamente, consiguiendo la disolución total de todo el sólido. La disolución se deja en reposo a temperatura ambiente durante 1 día y se refrigera (0 – 3°C) durante 3 días, observándose igualmente la formación de cristales en forma de agujas, con ligeras impurezas de color marrón: cristales N°2
- Se juntan los cristales obtenidos precedentemente (N°1 y N°2) transvasándolos a un erlenmeyer de 50 mL y se procede a una segunda recristalización.

ii 2da Recristalización

Se agregan 25 mL de metanol caliente sobre los cristales de harmina impura, disolviéndose completamente. Se concentra la disolución calentando a 40°C sobre una plancha de calentamiento, hasta reducir el volumen a la mitad, y la disolución se transfiere a un tubo de rotavapor. Se coloca a refrigeración (4°C) durante 5 días, observándose la precipitación de un sólido. Se decanta el líquido

sobrenadante, y se coloca el tubo en el rotavapor y se lleva a sequedad (100 mmbar, 34°C, 1h), y posteriormente se coloca en un desecador al vacío y se deja durante 5 días (en presencia de $P_2O_{5(s)}$, 150 mmbar). Se obtiene 200 mg de cristales brillantes incoloros (EBA.1 – S2).

- El líquido sobrenadante se recibe en un frasco pequeño (5 mL) y se deja en reposo durante 5 días. Al no obtenerse precipitación se coloca el frasco dentro de un tubo de rotavapor* y se lleva a sequedad en el rotavapor (100 mmbar, 34°C, 1h) y posteriormente se coloca en un desecador al vacío (en presencia de $P_2O_{5(s)}$, 150 mmbar) durante 5 días; obteniéndose 60 mg de cristales (EBA.1 – L1).
- En resumen, se obtuvieron 260 mg de harmina parcialmente purificada, la cual se trabajó ulteriormente de la siguiente manera:

➤ EBA.1 – S2 (Total = 200 mg)

56 mg : Se remitieron a la M. Sc. María Caramantin (ex – alumna EPQ – FC), estudiante de Doctorado en la Universidad de Campinas. No pudo realizar los espectros de RMN y de masas solicitados

144 mg: Fueron llevados por el Dr. Víctor Reyna y purificada en el ICSN – CNRS (Francia) en el mes de Set`2000. Ver Sec. d) a continuación.

EBA.1 – L1 (Total = 60 mg): Igualmente fueron purificados por el Dr. Víctor Reyna en el ICSN – CNRS (Francia). Ver Sec. d) a continuación.

* Tubo especial con cuello esmerilado de H 24/40 ($\phi = 2,5\text{cm}$, $L = 12,5\text{ cm}$)

d) Purificación cromatográfica (25 – 26 Set. 2000)

Los procedimientos cromatográficos que se utilizaron para la purificación final de la harmina parcialmente purificada (obtenida en la Sección c) precedentemente).

i Análisis preliminar: Cromatografía de capa fina – CCF (ver Sec. e).

ii Cromatografía de columna – CC (ver Sec. f))

Esta etapa del trabajo fue realizada por el profesor Víctor Reyna, asesor de esta tesis, en el Institute de Chimie des Substances Naturelles del Centre Nationale de la Recherche Scientifique (ICSN-CNRS) de Gif-Sur – Yvette (Francia), el 25 y 26 de setiembre del 2000, durante la breve estadía que realizó en dicho centro de investigación (22 – 26. Set. 2000).

e) Análisis preliminar por cromatografía en capa fina – CCF

i Muestras: Harmina parcialmente purificada por recristalización, obtenida de la Sec. c) precedente.

EBA.1 – S2 (144 mg)

EBA.1 – L1 (60 mg)

ii Referencia : Harmina (alcaloide puro, Sigma – USA)

iii Placa: Placa de aluminio Kieselgel 60F–254

iv Eluente: Cloroformo – metanol (2,5:1)

v 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.

vi Revelador: UV / H₂SO₄ con calentamiento

vii R_f = 0,48

viii Observaciones: Se observa una sola mancha.

ix Conclusión: EBA.1 – S2 y EBA.1 – L1 sólo contienen harmina, y por tanto se juntan para realizar la purificación final mediante cromatografía en columna.

f) Cromatografía de columna – CC.

i Muestras: EBA.1 – S2 (144 mg) y EBA.1 - L1 (60 mg) = 200 mg de harmina semipurificada se juntan y se disuelven con metanol en un balón de 50 mL y se concentra a presión reducida.

ii Características de la columna: $\phi_i = 20 \text{ mm}$, $h = 12 \text{ cm}$; altura de la sílica = 3,2 cm.

iii Adsorbente: Sílica Gel 60H TLC (Merck)

iv Procedimiento

- En la columna se agrega la sílica gel en polvo, y se adiciona n-hexano, con el objeto que se infle la sílica y no se formen huecos.

La muestra se redisuelve con 20 mL de cloroformo y se calienta sobre baño maría (~60°C).

- Se trasvasa sobre la columna, con presencia de n-hexano. Se agrega más cloroformo al balón para disolver los cristales de muestra (coloreados) que aun quedan sin disolver.

Cuando toda la muestra está en la columna se agrega cloroformo hasta haber recibido 50mL de eluente en un balón de 100 mL (balón N°1).

- Se modifica el eluente y se agrega 2% de metanol en CH_2Cl_2 , recibiendo 25 mL de elución en un balón de 50mL (balón N°2).

- Se continúa la elución con el mismo eluente (2% de metanol en CH_2Cl_2), recibiendo 50 mL en los balones N°3 hasta el N°10.

- Se aumenta la polaridad del eluente a 3,5% de metanol en CH_2Cl_2 , y se reciben en el balón N°11 25 mL de eluente y en el balón N°12 50 mL.

- Se realiza el seguimiento de la elución del sustrato, llevando inmediatamente al rotavapor el balón que contiene el producto eluido, y

registrando su placa de CCF en comparación con la harmina pura (Sigma).

v Resultados:

- **Balón N°1:** Sustancia aceitosa y coloreada. Se descarta.
- **Balones N°2 a N°7:** Sólido blanco.
- **Balones N°2, 3 y 5** = Contiene 110 mg de harmina (indicado por CCF) (Harmina N°1).
- **Balones N°6 y 7** = Contiene 49 mg de harmina (indicado por CCF) (Harmina N°2)
- **Balón N°4** (no se pesó, aproximadamente podemos considerar 41 mg). La CCF indica que se trata de harmina (Harmina N°3).

Se registró su espectro de RMN¹H en CD₃OD – CDCl₃: Espectro N°6, ver Anexo N°10.

Posteriormente, se registra su espectro en DMSO – d₆. Espectro N°7, ver Anexo N°11 y se desecha dicha muestra.

Observación: Se trata de harmina.

- Balones N°8 a N°12 = 19 mg, sólido blanco ligeramente amarillo.

vi Conclusión: Se ha logrado aislar el alcaloide puro. la harmina, el principal alcaloide presente en los tallos de ayahuasca (*B. caapi*), (balones N°2 a 7; peso aproximado = 200 mg)

I. IDENTIFICACION CLASICA DE HARMINA

La identificación de la harmina se realizó mediante métodos clásicos (punto de fusión, comportamiento cromatográfico – CCF, análisis porcentual) y métodos espectroscópicos (espectros de masas, RMN¹H, RMN¹³C, UV, IR).

Muestra: Harmina purificada (Harmina N°1), aislada de la liana ayahuasca (ver Sec. III.H.2.f.v, precedente).

1. Características del producto.- Sólido blanco

2. Determinación del punto de fusión

a) Condiciones de trabajo

- i Equipo: Electrothermal JA9200 – Digital Melting Point APP.
- ii Laboratorio : Lab. N°14 (Química Orgánica), FIQM* – UNI.
- iii Operador: Bach. Tania Sánchez
- iv Fecha: 20.04.01

b) Resultados

Punto de Fusión: 261,2°C (con descomposición)

- Referencias:
- i 261°C (con descomposición) (Merck – 1996)
 - ii 261,8 – 262,4°C (Hochstein & Paradies – 1957)

3. Análisis porcentual de carbono, nitrógeno e hidrógeno

a) Condiciones de trabajo

- i Equipo: Analizador elemental EA 1108 CHNS-O
- ii Laboratorio: Instituto Universitario de Bio – Orgánica IUBO – Lab. N°4 Universidad de La Laguna (Tenerife – España)
- iii Operador: Quim. Pastora – M.Sc. Virginia Torpoco
- iv Fecha: 22.03.01

b) Resultados:

Carbono	Nitrógeno	Hidrógeno	Oxígeno
73,309%	13,403%	5,71%	7,578%

c) Deducción de la fórmula empírica a partir del porcentaje en peso de los elementos

- i Se asumen 100 g de sustancia.

* Facultad de Ingeniería Química y Manufacturera de la Universidad Nacional de Ingeniería.

ii Las cantidades relativas de C, H, N y O sería.

Elemento	%	Peso (g)	Peso Atómico	n (moles)	Cantidad relativa
C	73,309	73,309	12,000	6,109	12,91 = 13
H	5,71	5,71	1,008	5,665	11,97 = 12
N	13,403	13,403	14,007	0,957	2,02 = 2
O	7,578	7,578	15,999	0,473	1,00 = 1

iii Por tanto la fórmula empírica del compuesto analizado es $C_{13}H_{12}N_2O$.

iv La fórmula empírica de la harmina es $C_{13}H_{12}N_2O$.

v Conclusión: El análisis porcentual de la muestra analizada corresponde a la molécula de harmina.

J. IDENTIFICACION ESPECTROSCÓPICA

La determinación estructural de la harmina obtenida de la liana “ayahuasca” (*B. caapi*) se realizó mediante el análisis de sus espectros de masas, de RMN¹H y de RMN¹³C.

La muestra analizada fue el sólido de color blanco obtenido (Harmina N°1) en la Sec. III.H.f.v, la cual se remitió en el mes de marzo del 2001 a la M.Sc Virginia Torpoco (Universidad de La Laguna, Tenerife – España), para la obtención de tales espectros.

Además en nuestra Facultad registramos los espectros de IR y UV, respectivamente.

1. Espectro de masas. Ver Espectro N°1

a. Condiciones de trabajo

- i Equipo: Espectrómetro MS 5870B (70 eV)
- ii Laboratorio: Instituto Universitario de Bio – Orgánica IUBO – Lab. N°4 Universidad de La Laguna (Tenerife – España).
- iii Operador: Dra. Ana Estévez Braun – M. Sc. Virginia Torpoco
- iv Fecha: 21.03.01
- v Peso de la muestra: 3 – 4 mg

b. Características del espectro

m/z 212 (ión molecular M^+ y pico base, 100%), 197 (24,51%), 183 (5,13%), 169 (50,25%), 106 (6,52%).

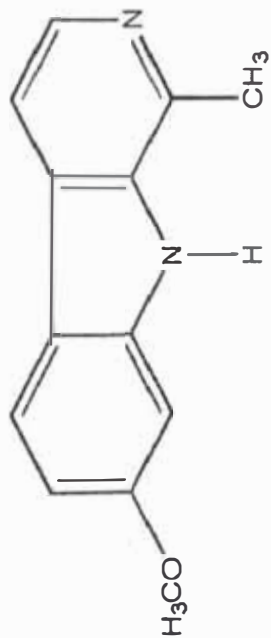
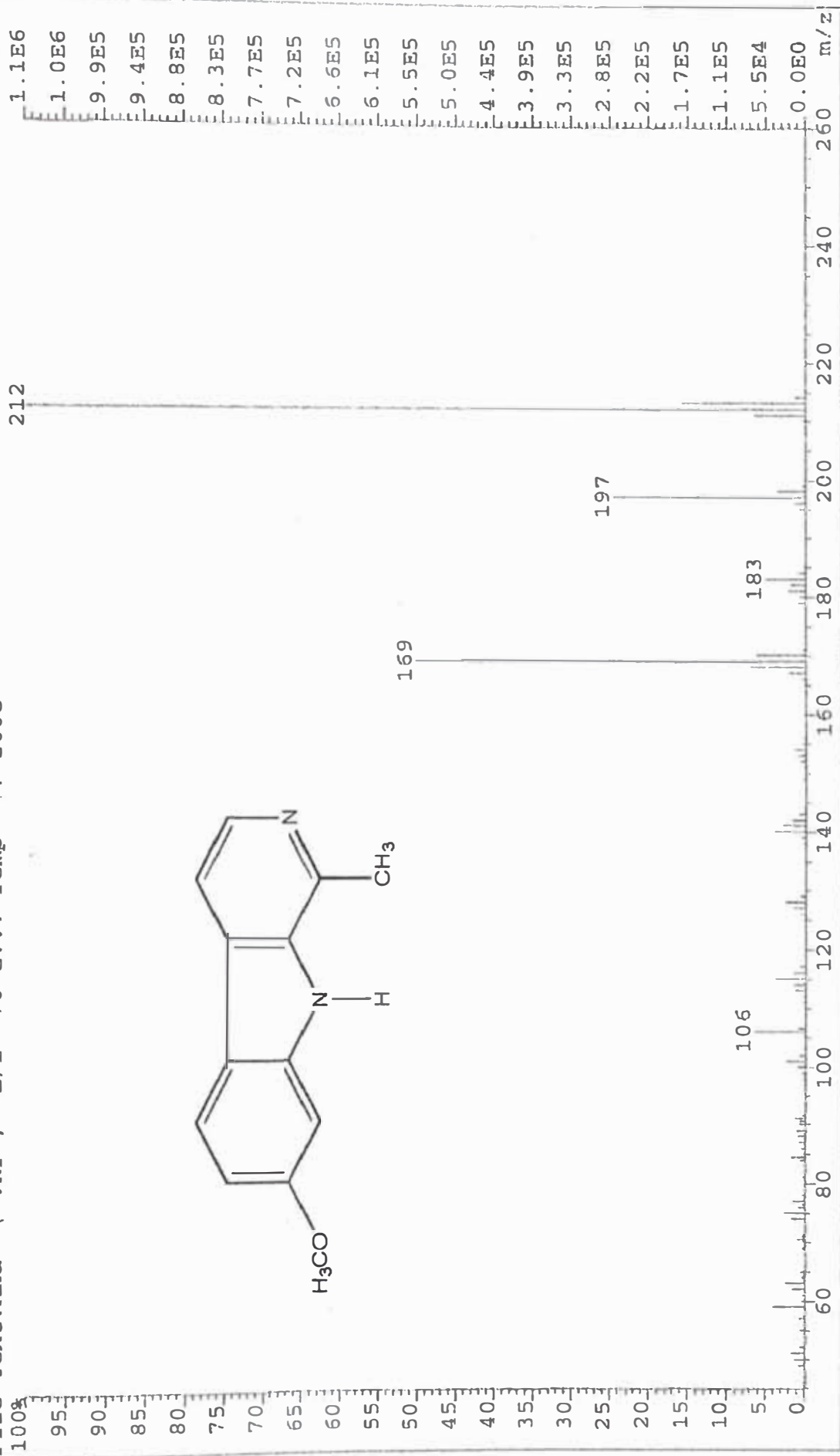
c. Análisis del espectro

La identificación de los cinco fragmentos iónicos correspondientes a los picos m/z 212, 197, 183, 169 y 106, y las ecuaciones de fragmentación respectivas, se han descrito precedentemente (Sec. I.4.a.iv).

El espectro de masas de la harmina obtenido a partir de los tallos de la liana “ayahuasca” (*B. caapi*) es similar al espectro registrado por Holmstedt & Lindgren (1979).

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

File: H3384 Ident: 25 Acq: 20-MAR-2001 08:30:27 +I:51 Cal: H3384
Autospec EI+ Magnet BpM: 212 BpI: 1104896 TIC: 3667334 Flags: ACC
File Text: Ana (VRP) E/I 70 e.v. Temp ? 200C



Espectro N°1.- Espectro de masas de la Harmina obtenida a partir de la liana "ayahuasca" (*B. caapi*)

2. Espectro de RMN¹H. Ver Espectro N°2

a. Condiciones de trabajo

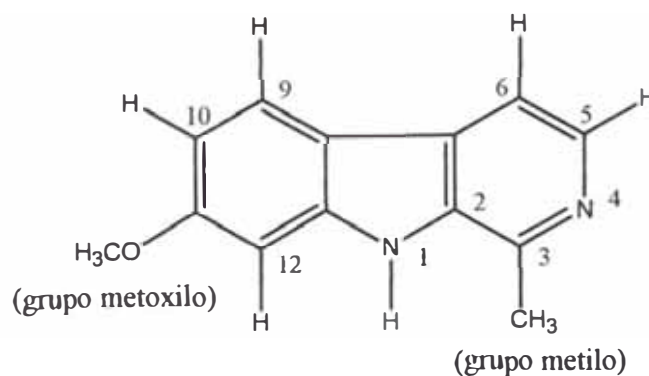
- i Equipo: Bruker AM (100 MHz)
- ii Laboratorio: Instituto Universitario de Bio – Orgánica IUBO – Lab. N°4. Universidad de la Laguna (Tenerife – España)
- iii Operador: Dra. Ana Estévez Braun – M. Sc. Virginia Torpoco
- iv Fecha: 20.03.01
- v Peso de muestra: 30 mg
- vi Solvente: DMSO - d₆

b. Características del espectro

2,73 ppm (s, CH₃), 3,86 ppm (s, OCH₃), 6,82 – 6,86 ppm (2d, 2H aromáticos), 7,82 ppm (d, 1H aromático), 8,05 ppm (d, 1H aromático y N-H) 8,15 ppm (d, 1H aromático)

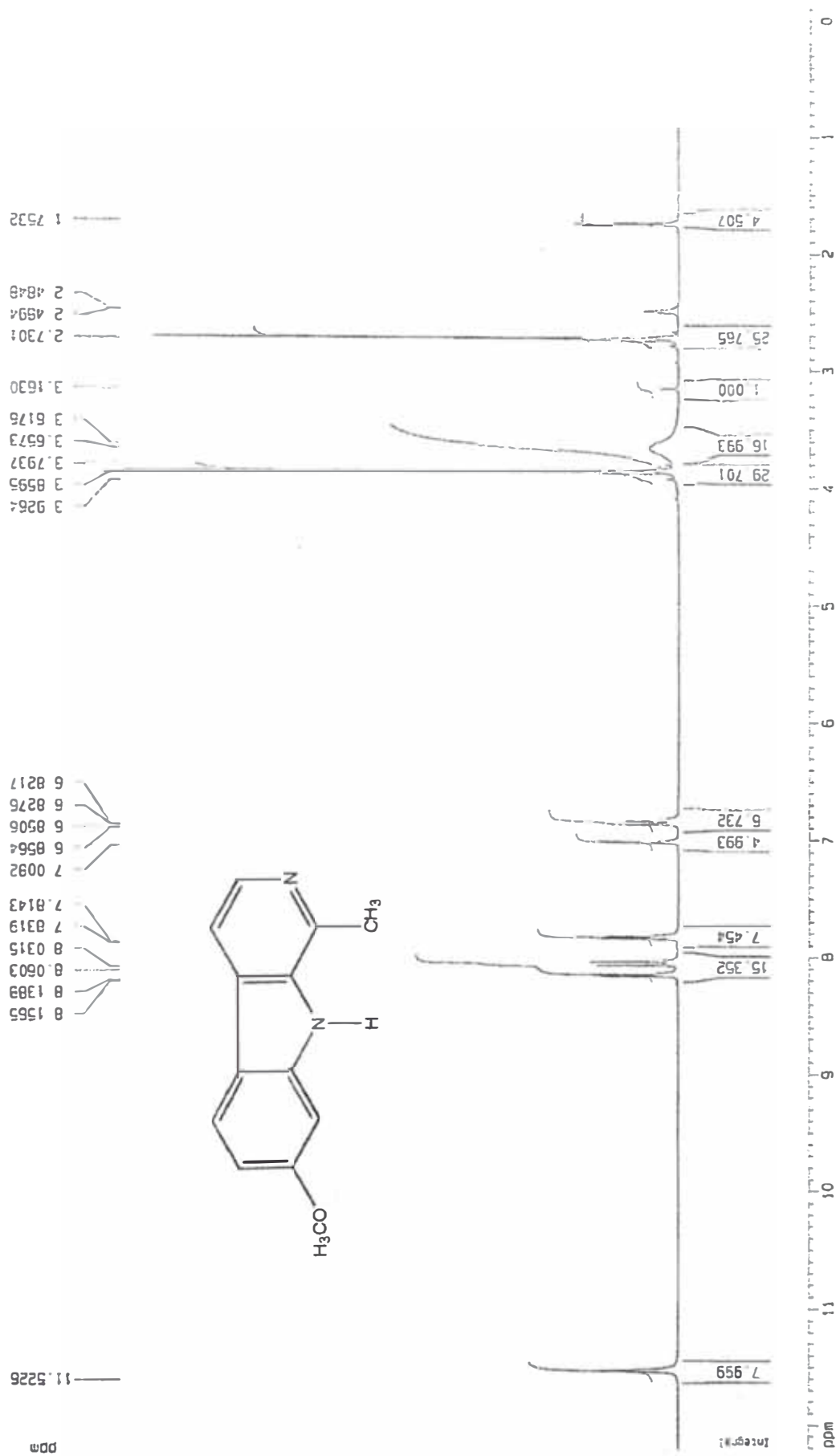
c. Análisis del espectro (Desplazamientos químicos e integración)

La identificación de los 8 tipos de hidrógenos correspondientes a los desplazamientos $\delta = 2,73$; 3,86; 6,82 – 6,86; 7,82; 8,05 y 8,15 ppm, se han descrito precedentemente (Sec. II.4.b)



δ (ppm)	Tipo de Señal	Integración	Tipo de Hidrógeno
2,73	Singulete	3H	Ar – CH ₃
3,85	Singulete	3H	Ar – O – CH ₃
6,82 – 6,86	Dos dobletes	2H	H – Ar (posición 10 y 12)
7,82	Doblete	1H	H – Ar (posición 6)
8,05	Doblete	2H	H – Ar y N-H (posición 9)
8,15	Doblete	1H	H – Ar (posición 5)

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



3. Espectro de RMN¹³C. Ver Espectro N°3

a. Condiciones de trabajo

- i Equipo: Bruker AH – 400 (400 MHz)
- ii Laboratorio: Instituto Universitario de Bio – Orgánica IUBO – Lab. N°4 Universidad de La Laguna (Tenerife – España).
- iii Operador: Dra. Ana Estévez Braun – M. Sc. Virginia Torpoco
- iv Fecha: 20.03.01
- v Peso de muestra: 30 mg
- vi Solvente: DMSO – d₆

b. Características del espectro

(A) Espectro DEPT 90

Aparecen cinco señales que corresponden a carbonos unidos a un solo hidrógeno.

Carbonos terciarios (CH) (C₁₂): 95,0 ppm
 (C₁₀): 109,7 ppm
 (C₆): 112,5 ppm
 (C₉): 123,1 ppm
 (C₅): 137,5 ppm

(B) Espectro DEPT 135

- i Señales hacia arriba (7): Carbonos primarios (CH₃) (C₁₅): 20,4 ppm
 (C₁₄): 55,8 ppm
 Carbonos terciarios (CH) (C₁₂): 95,0 ppm
 (C₁₀): 109,7 ppm
 (C₆): 112,5 ppm
 (C₉): 123,1 ppm
 (C₅): 137,5 ppm
- ii Señales hacia abajo (0): No hay carbonos secundarios (CH₂): --

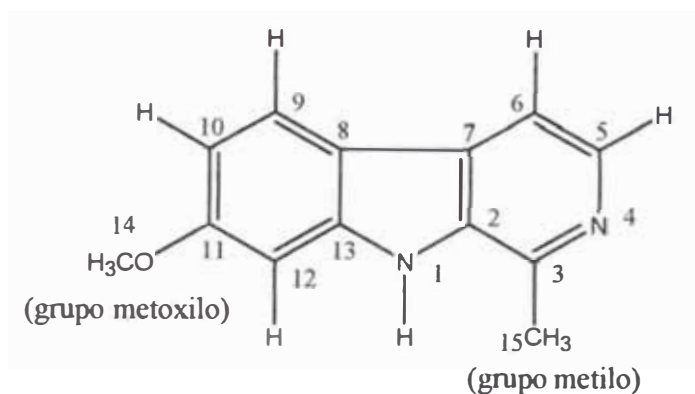
Observación.- En esta tipo de espectros no se registran carbonos cuaternarios.

(C) Desacoplamiento de ^1H de banda ancha

20,4 ppm (CH_3); 55,8 ppm (OCH_3); 95,0 ppm (C – aromático); 109,7 ppm (C – aromático); 112,5 ppm (C – aromático); 115,2 ppm (C – aromático); 123,1 ppm (C – aromático); 128,0 ppm (C – aromático), 134,9 ppm (C – aromático); 137,5 ppm (C – aromático); 141,4 ppm (C – aromático); 142,6 ppm (C – aromático); 160,7 ppm (C – aromático).

c. Análisis del espectro

(A) Espectro DEPT – 90 y (B) DEPT - 135



(C) Desacoplamiento de ^1H de banda ancha

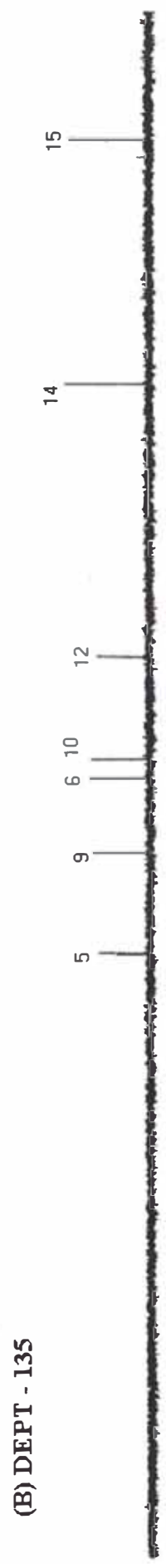
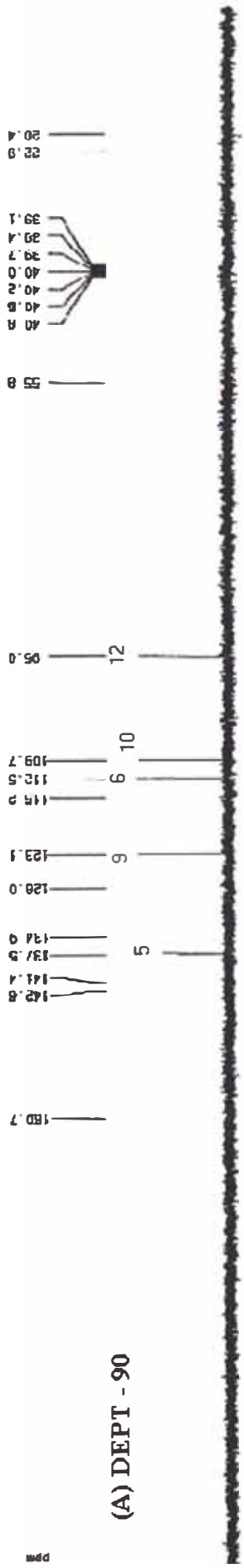
En el espectro N° 3 ((B) DEPT – 135) observamos 7 señales de átomos de carbono, de los cuales 5 señales corresponden a átomos de carbono primarios y las 2 señales restantes corresponden a átomos de carbono terciarios.

Luego, las 6 señales restantes registrados a δ 115,2; 128,0; 134,9; 141,4; 142,6 y 160,7 ppm, corresponden a los seis átomos de carbono cuaternarios de la molécula de harmina.

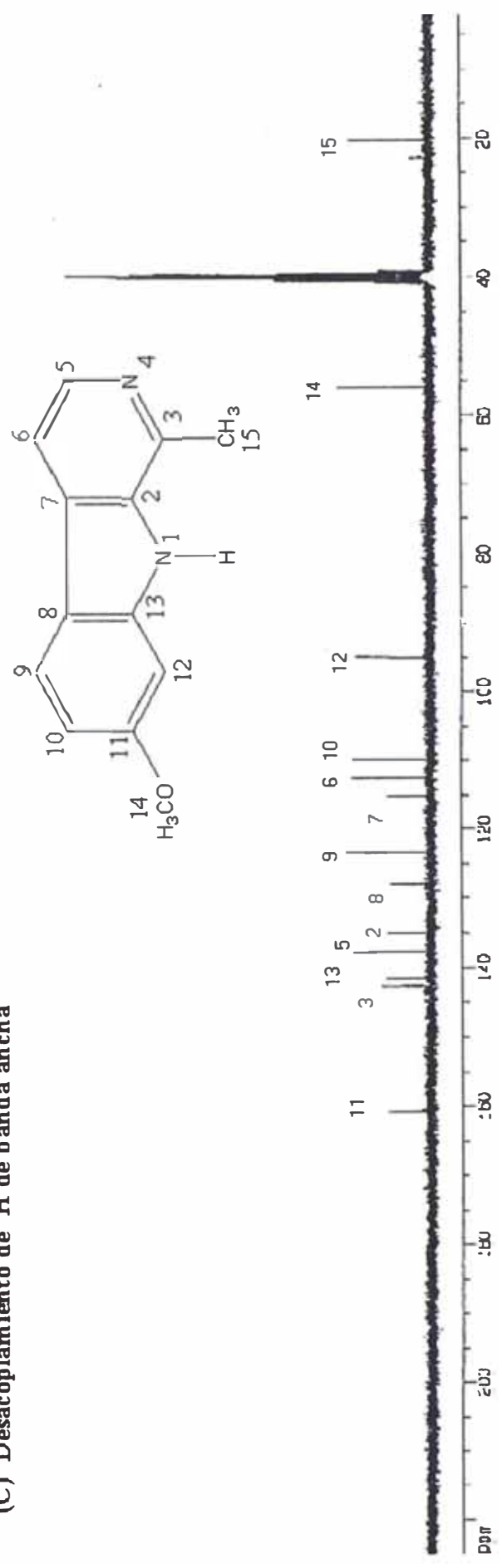
Los átomos de carbono de la molécula de harmina tendrían los siguientes valores de δ (ppm) (ver Espectro N°3 (C)):

N° de átomos de carbono	Tipo de carbono	$\delta(\text{ppm})$	N° de átomos de carbono	Tipo de carbono	$\delta(\text{ppm})$
2	C (cuaternario)	134,9	10	CH (aromático)	109,7
3	C (cuaternario)	142,6	11	C (cuaternario)	160,7
5	CH (aromático)	137,5	12	CH (aromático)	95,0
6	CH (aromático)	112,5	13	C (cuaternario)	141,4
7	C (cuaternario)	115,2	14	CH ₃ (OCH ₃)	55,8
8	C (cuaternario)	128,0	15	CH ₃ (primario)	20,4
9	CH (aromático)	123,1			

d. Conclusión.- El espectro RMN¹³C – DEPT: **(A)** DEPT – 90, **(B)** DEPT – 135 y **(C)** Desacoplamiento de ¹H de banda ancha presentado corresponde a lo esperado para la estructura de la harmina.



(C) Desacoplamiento de ¹H de banda ancha



Espectro N°3.- Espectro RMN ¹³C-DEPT (400MHz) de la Harmina aislada de la "ayahuasca" (*B. caapi*)

4. Espectro de IR. Ver Espectro N°4

a. Condiciones de trabajo

- i Equipo: Espectrofotómetro infrarrojo Shimadzu FTIR 800 – DRS800 (reflectancia difusa).
- ii Laboratorio: Laboratorio de Películas Delgadas (Ambiente R2-111). Facultad de Ciencias – UNI.
- iii Operador: Dr. Abel Gutarra – Bach. Tania Sánchez
- iv Fecha: 20.04.01
- v Peso de muestra: 30 mg de harmina. Se preparó una pastilla de ($\phi = 4$ mm) que contiene 29 mg de bromuro de potasio KBr(s).

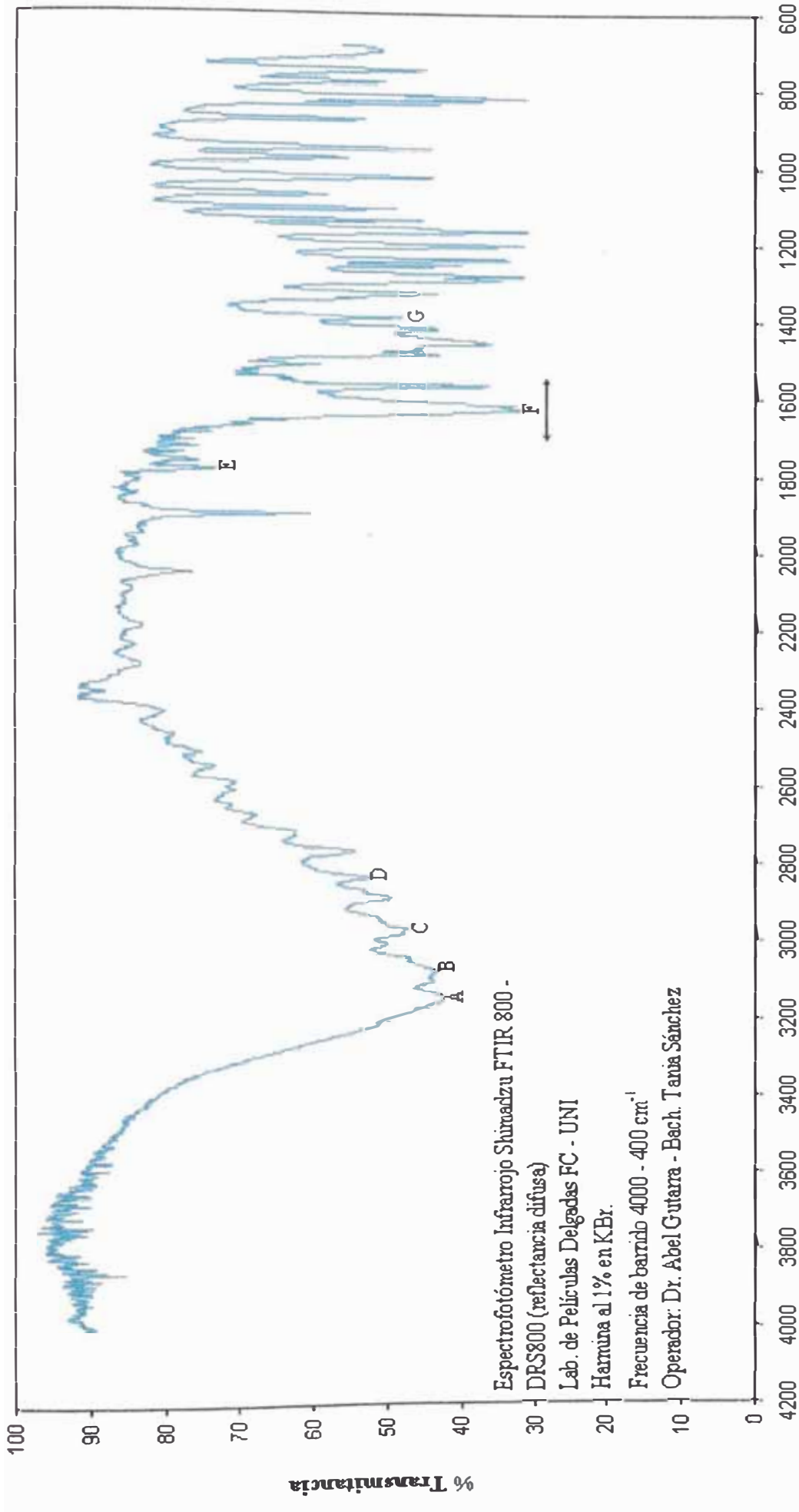
b. Características del espectro

ν^{-1} (cm^{-1}) 3155 cm^{-1} ; 3089 cm^{-1} ; 2986 cm^{-1} ; 2836 cm^{-1} ; 1778 cm^{-1} ; 1628 cm^{-1} ; 1388 cm^{-1} .

c. Análisis del espectro (ver Espectro N°4)

Banda	ν^{-1} (cm^{-1})	
A	3155	Vib. de tensión N – H
B	3089	Alargamiento C - H aromático
C	2986	Alargamiento C – H metilénico
D	2836	- OCH ₃
E	1778	Vib de Tensión C = N
F	1628	Vib de Tensión C = C, aromáticos

d. **Conclusión.**- El espectro IR obtenido corresponde a lo esperado para la estructura de la harmina.



N° de onda

Espectro N°4.- Espectro Infrarrojo de la Harmina obtenida a partir de la liana “ayahuasca” (*B. caapi*)

5. Espectro de UV. Ver Espectro N°5

a. Condiciones de trabajo

- i Equipo: Espectrofotómetro UV Perkin Elmer – Lambda 10
- ii Laboratorio: Laboratorio N° 33 (Instrumentación Química).
Facultad de Ciencias.
- iii Operador: Quim. Christian Jacinto – Bach. Tania Sánchez
- iv Fecha: 24.08.01
- v Peso de muestra: 1 mg
- vi Concentración: 0,004 mg / mL
- vii Solvente: Etanol absoluto

Observación: La muestra de harmina insoluble en metanol.

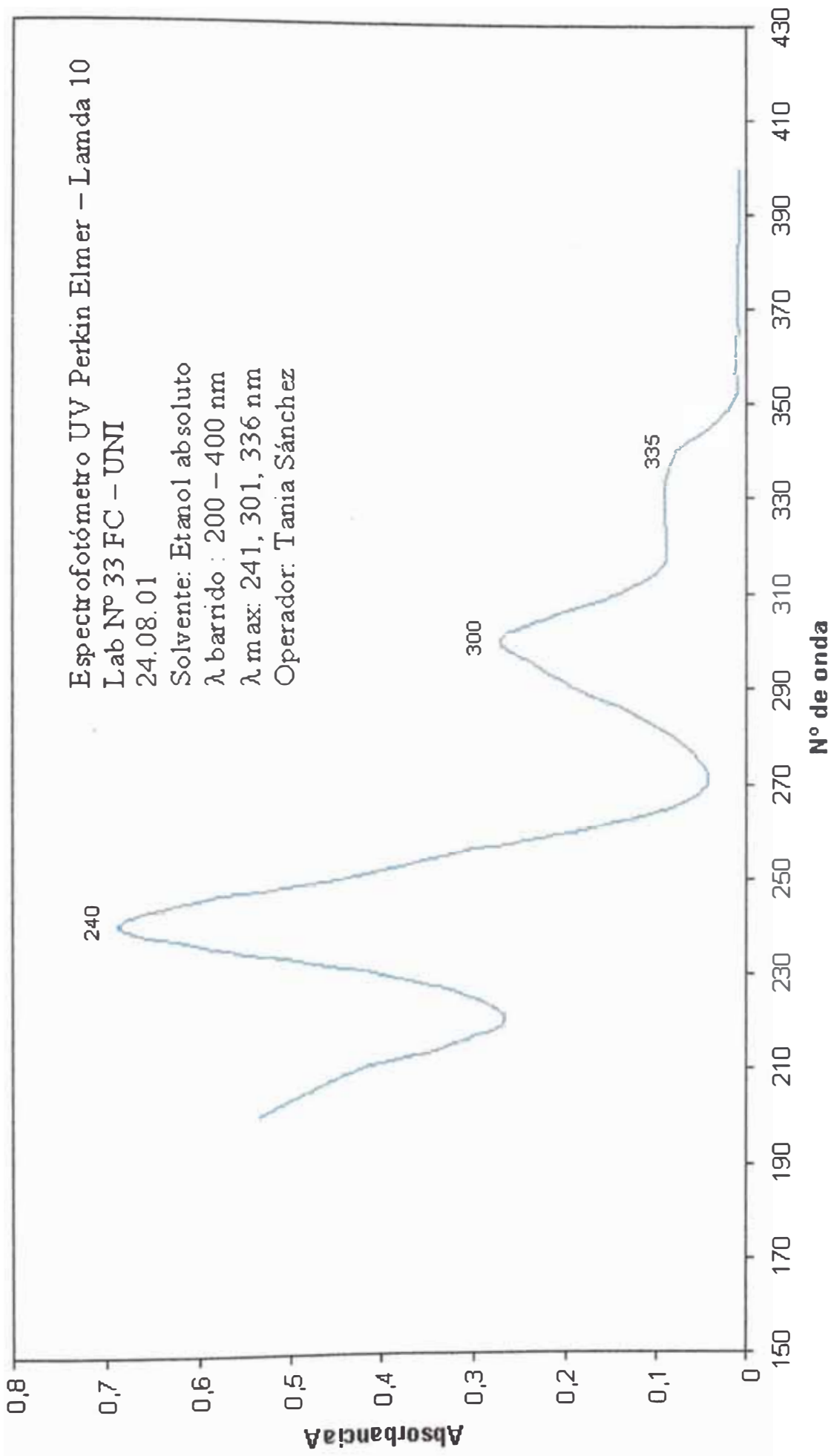
b. Características del espectro

Máximo de absorción, $\lambda_{\text{máx}}$: 240, 300, 335 nm.

c. Análisis del espectro

Estos valores son análogos a aquellos publicados en el Merck Index (1991) para la harmina $\lambda_{\text{máx}}$ (metanol) 241, 301, 336 nm.

d. Conclusión.- El espectro UV obtenido corresponde a lo esperado para la estructura de la harmina.



Espectro N°5.- Espectro UV de la Harmina obtenida a partir de la liana “ayahuasca” (*B. caapi*)

IV. RESUMEN DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES

RESUMEN DE RESULTADOS

1. Obtención de la harmina a partir de los tallos del “ayahuasca” (*B. caapi*).

a. A partir de 150 g de tallos de la liana “ayahuasca” (*Banisteriopsis caapi*), seca y molida (malla = 315 μ m) se obtuvo mediante extracción por solventes y partición líquido – líquido el Extracto Bruto de Alcaloides, el cual se purificó mediante recristalización, seguido de cromatografía de columna proporcionando aproximadamente 200 mg de harmina pura, como un sólido blanco.

La caracterización de dicha sustancia se realizó mediante su punto de fusión 261,2°C (con descomposición), el análisis porcentual de elementos (C 73,3%; H 5,7%; N 13,4 %; O 7,5%) y sus espectros de masas, RMN¹H, RMN¹³C, IR y UV, correspondiendo todos ellos a los valores y características referidas en la bibliografía para la harmina. Asimismo, dicho compuesto presenta por cromatografía de capa fina una sola mancha ($R_f = 0,48$) de color violeta con el revelador H₂SO₄, además presencia fluorescencia con la luz UV.

b. El análisis del espectro de masas corresponde a lo esperado para la harmina y es análogo al espectro de la harmina publicado en la literatura.

c. Los espectros de RMN (de ¹H y de ¹³C) son consistentes con aquellos de la harmina.

d. El espectro de UV de la harmina es análogo a los valores publicados en la bibliografía.

- e. El espectro IR presenta las bandas de absorción características de los grupos funcionales presentes en la harmina.
2. El análisis cualitativo de los metabolitos secundarios (Marcha Fitoquímica) presentes en los tallos del ayahuasca, siguiendo el procedimiento de Reyna (1999) (de acuerdo al procedimiento de Rondina y Coussio – 1969) y verificado con ensayos específicos para cada clase de compuestos (Villacrés, 1995), nos indica que contiene: Aminogrupos primarios o secundarios (+), grupos fenólicos libres (+), taninos (+), triterpenos y esteroides (+), alcaloides (+++) y leucoantocianidinas (+).
 3. La determinación cuantitativa del total de alcaloides contenidos en los tallos del “ayahuasca”, siguiendo el procedimiento clásico de titulación ácido – base, (Pelt et al. – 1967) proporciona 0,95%. Este valor está comprendido en el rango de porcentajes de alcaloides para la “ayahuasca” publicado en la bibliografía.
 4. Se realizó el análisis de la información bibliográfica relativa a los estudios químicos del “ayahuasca” (*B. caapi*) y de la harmina.

CONCLUSIONES

1. A partir de los tallos de la “ayahuasca” (*B. caapi*) se ha aislado la harmina, la cual se ha identificado mediante su punto de fusión, el análisis porcentual de elementos, su comportamiento cromatográfico por CCF, y sus espectros de masas, RMN¹H, RMN¹³C, IR, y UV, 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 los tallos de la “ayahuasca” según el procedimiento de Rondina y Coussio (1969) y Villacrés (1995), habiéndose verificado la presencia de: Aminogrupos primarios y/o secundarios (+), grupos fenólicos (+), taninos (+), triterpenos y esteroides (+), alcaloides (+++), y leucoantocianidinas (+).
3. Se realizó la determinación cuantitativa del total de alcaloides de los tallos de la “ayahuasca”, según el procedimiento de Pelt et al. (1967), habiéndose obtenido 0,95%.

V. BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Arévalo V., G., *América Indígena*, 46, 147 – 161 (1986). “El ayahuasca y el curandero Shipibo – conibo del Ucayali (Perú)” [pág. 150].
2. Ayala F., F, and W. Lewis, *Econ. Bot.*, 32, 154 – 156 (1978). “Drinking the South American Hallucinogenic Ayahuasca”.
3. Callaway, J. et al. of *Ethnopharmac*, 65, 243 – 256 (1999). “Pharmacokinetics of Hoasca alkaloids in healthy humano”.
4. Dalton, D., *The Alkaloids. The Fundamental Chemistry. A biogenetic Approach*, Marcel Dekker, Inc., 1979, pág. 480 – 483.
5. Der Marderosian, A. et al., *Am. J Pharm.*, 140, 137 – 147 (1968). “Native use and occurrence of N,N – Dimethyltryptamina in the leaves of *Banisteriopsis rusbyana*, [pág 142 – 145].
6. De Simone, F. et al., *Fitoterapia*, 62, 453 (1991). Constituents of *Banisteriopsis caapi*.
7. Deulofeu, V., in: Efron, D., B. Holmstedt and N. Kline (Eds.), *Ethnopharmacologic Search for Psychoactive Drugs*, Raven Press, N.Y., 1979, pág. 393 – 402.
8. Donoyan A., E., *Banisteriopsis caapi* (Spruce ex Griseb) Morton y el brebaje “ayahuasca”, Monografía de Bachiller (Biología), Facultad de Ciencias y Filosofía, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, 1986, 33 págs.
9. Farnsworth N.R. and K.L Euler, *Lloydia*, 25, 186 – 195 (1962). “An Alkaloid Screening Procedure Utilizing Thin – Layer Chromatography”.
10. 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..
11. Hashimoto, Y. et al., in: *The Alkaloids*, Vol 32, A Brossi (Eds.), 1988, pág. 40 – 45 (F. Harmala Alkaloids).

12. Hashimoto Y., and K., Kawanishi, *Phytochemistry*, 14, 1633 – 1635 (1975), “New Organic Bases From Amazonian *Banisteriopsis caapi*”.
13. Hashimoto Y., and K., Kawanishi, *Phytochemistry*, 15, 1559 – 1560 (1976), “New Alkaloids from *Banisteriopsis caapi*”.
14. Heese, M., *Indoalkaloide, Teil 1: Text*, Verlag Chemie (Progress in Mass Spectrometry), 1974, pág. 7 – 8 (derivados indólicos sencillos).
15. Hochstein, F, A, and A. M. Paradies, *J. Am. Chem. Soc.*, 79, 5735 – 5736 (1957). “Alkaloids of *Banisteria caapi* and *Prestoria amazonicum*”.
16. Holmstedt, B. and J. Lindgren, “Chemical Constituents and Pharmacology of South American Snuffs”, in: Efron, D., B. Holmstedt and N. Kline (Eds.), *Etnopharmacologic Search for Psychoactive Drugs*, Raven Press, New York, 1979, pág. 339 – 373.
17. Kawanishi, K, et al. *J. Nat. Prod.*, 45, 637 (1982) “Shihunine and Dihydroshihunine from *Banisteriopsis caapi*”.
18. Kichner, J., in: *Techniques of Chemistry, Vol. XIV, Thin Layer Chromatography*, A. Weissberger (Editor), John Wiley & Sons, 2º Ed, 1978 (Cap. XV. Alkaloids: 386 – 417), pág. 407.
19. Kutney, J., in: *The Total Synthesis of Natural Products, Vol.3*, John ApSimon (Eds.), John Wiley & Sons, 1977, pág 273 – 438. (The Synthesis of Indole Alkaloids).
20. Lock de Ugaz, Olga, “Investigación Fotoquímica”, Fondo editorial, Pontificia Universidad Católica del Perú, Lima, 1994, pág. 4 – 7.
21. Luna, L, E. y P. Amaringo, *Ayahuasca Visions the religious iconography of a Peruvian Shaman*, North Atlantic Books, Berkeley, California, 1991, pág. 52 – 53.
22. Marion, L., in: Manske, R. and H. Holmer, *The Alkaloids, Vol II*, Ac. Press, N.Y., 1952, págs. 393 – 402.
23. McKenna, D., G. Towers and F. Abbott, *J. of Ethnopharm.*, 10, 195 – 223 (1984). “Monoamine oxidase inhibitors in South American

Hallucinogenic Plants: Triptamine and β - carboline constituents of Ayahuasca”.

24. Miranda, M., “Métodos de Análisis de Drogas y Extractos”, Ed. Universidad de La Habana, La Habana, 1996.
25. NIST Chemistry WebBook, <http://webbook.nist.gov/chemistry>, 1 pág.
26. Pelt, J., – M., et al., Bull. Soc. Pharm. Nancy, 72, 12 – 23 (1967). “Comparaison de diverses méthodes officielles utilisées pour le dosage des Alcaloides des Solanacées”.
27. Poupat, C., Apuntes de laboratorio ICSN – CNRS, Gif – Sur – Yvette, Francia, enero de 1982, 1 pág.
28. Reyna V., “Viaje de colección para el estudio de la flora medicinal en la región del alto Ucayali”, en : Estudio Químico de los alcaloides de la ayahuasca (*Banisteriopsis caapi*), Informe presentado al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Lima, abril de 1984, Anexo N°5', pág. A5.5
29. Reyna V., “Contribución al estudio químico de la “ayahuasca” (*Banisteriopsis caapi*) y de la “chacrana” (*Psychotria viridis*)”. Informe presentado al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Lima, julio de 1986, 4 págs.
30. Reyna, V., Apuntes del curso Alcaloides Indólicos CQ 044, Escuela Profesional de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Ingeniería, Lima, Set – Dic, 1992.
31. 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.
32. Reyna, V., Marcha Fitoquímica, Práctica de Laboratorio (Separata). Curso Química de Productos Naturales – CQ 046, Escuela Profesional de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Ingeniería, Lima, 1999-b, 5 págs.

33. Reyna, V., Aspectos Químicos y Etnomedicinales de la Bebida “Ayahuasca”, separata, II Congreso Nacional e Internacional de Medicina Tradicional Amazónica, Pucallpa – Perú, octubre del 2000. 2 págs.
34. Reyna, V. y V. Torpoco, Bol. Soc. Quím. (Perú), 60, 21 – 24 (1994). “Aislamiento del Alcaloide: N,N – Dimetiltriptamina de la Chacrana (*Psychotria viridis* R. & P.)”.
35. Rivier, L. and J. Lindgren, Econ. Bot., 26, 101 – 129 (1972). “Ayahuasca”, the South American Hallucinogenic Drink: an Ethnobotanical and Chemical Investigation”.
36. Schultes, R. E. y A. Hoffmann, Plantas de los Dioses. Origen de los alucinógenos, Fondo de Cultura Económica, Gran Bretaña, 1982 (c. 1979), pág. 120 – 123.
37. Schultes R, and Raffauf, The Healing Foresst, Dioscondes press, Oregon, USA, 1990, pág. 274 – 276.
38. Schultes, R. and A. Hoffmann, The Botany and Chemistry of Hallucinogens, C. C. Thomas, Springfield 2º Ed, 1980, Illinois, USA, pág 163 – 181.
39. Schultes, R. E. et al., Bot. Mus. Leaflets, Harvard Univ., 22, 121 – 132 (1969). “De plantis toxicartis e mundo novo tropicale commentationes III”
40. Silverstein, R., G. Bassler and T. Morrill, Spectrometric Identification of Organic Compounds, John Willey and Sons, New York, 3º Ed., 1974.
41. The Merck Index, 11ºEd., 1996, pág. 727 – 728 (Harmina, Harmalina)
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. Trout, K., Trout’s Notes on Ayahuasca and Ayahuasca Alkaloids, Better Days Pub., Austin, USA, 207 págs.

44. United States Pharmacopoeia – USP, 20th Ed., 1980, pág 913 “Alkaloidal Drug Assays, Proximate Assays”
45. Villacrez, O., Víctor, “Bioactividad de Plantas Amazónicas”, Ed. Abya – yala, Ecuador, 1995, pág. 154 – 171.