

UNIVERSIDAD NACIONAL DE INGENIERÍA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA PROFESIONAL DE QUÍMICA



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

TESIS

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE

LICENCIADA EN QUÍMICA

ELENA ALICIA CÓNDOR CUYUBAMBA

LIMA – PERU

2004

RESUMEN

De las semillas del toe (*Brugmansia sanguinea*), que fueron colectadas en el centro poblado de Salalá (Provincia de Huancabamba, Dpto. Piura), se aisló la escopolamina, que fué identificada mediante sus espectros de masas, de RMN¹H, RMN¹³C, ¹H-¹H COSY e IR. Además, se realizó el análisis cualitativo de los metabolitos secundarios (marcha fitoquímica) y la cuantificación de alcaloides presentes en las semillas.

ESTUDIO QUÍMICO DE LAS SEMILLAS DEL TOE (*Brugmansia sanguinea*)

I. ASPECTOS GENERALES	
A. PRESENTACIÓN	2
B. OBJETIVOS DE LA TESIS	4
II. ESTUDIO BIBLIOGRÁFICO	
A. ESTUDIOS QUÍMICOS PRECEDENTES RELATIVOS A LAS SEMILLAS DEL TOE (<i>B. sanguinea</i>)	7
1. Composición química de las semillas del toe (<i>B. sanguinea</i>)	7
a) Análisis cualitativo	7
b) Principales alcaloides presentes en las semillas del toe	7
c) Análisis cuantitativo (porcentaje de alcaloides) de las semillas del toe	9
2. Aislamiento de alcaloides de las semillas del toe	11
3. Identificación clásica de la escopolamina y/o derivados	14
a) Comportamiento cromatográfico de la escopolamina	14
b) Punto de fusión	14
4. Identificación espectroscópica de la escopolamina	14
a) Espectro de masas de la escopolamina	15
b) Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno (RMN ¹ H)	18
c) Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de Carbono (RMN ¹³ C)	21
d) Espectro ¹ H- ¹ H COSY	23
B. ESTUDIOS QUÍMICOS GENERALES	24
1. Análisis cualitativo – Marcha fitoquímica	24
2. Test de alcaloides	24
3. Determinación cuantitativa de alcaloides	25
a) Procedimiento de Pelt et al. (1967)	25
b) Procedimiento de la 20 th ed. U.S. Pharmacopoeia – USP (1980)	26
c) Procedimiento realizado en la tesis	27
4. Aislamiento de alcaloides	29
a) Procedimiento de Reyna & Torpoco (1994)	29
b) Procedimiento de Hoet y Ríos (1980)	30
b) Comparación de Procedimientos	31

5. Identificación espectroscópica de compuestos orgánicos	32
a) Espectrometría de Masas, EM	32
b) Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear de ^1H , RMN ^1H	34
c) Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear de ^{13}C , RMN ^{13}C	35
d) Espectroscopía de Resonancia Magnética Bidimensional (COSY y HETCOR)	38
e) Espectroscopía de Infrarrojo, IR	39
f) Espectroscopía de Ultravioleta, UV	41

III. PARTE EXPERIMENTAL

PRESENTACIÓN	45
TRABAJO PRELIMINAR	49
A. COLECCIÓN DE LA PLANTA	49
B. USO DEL TOE (BRUGMANSIA SANGUINEA) EN MEDICINA TRADICIONAL	49
C. DETERMINACIÓN (IDENTIFICACIÓN) BOTÁNICA	51
D. ESTUDIO BIBLIOGRÁFICO	51
TRABAJO EXPERIMENTAL	53
E. SECADO Y MOLIENDA DE LA PLANTA	53
F. ANÁLISIS CUALITATIVO – MARCHA FITOQUÍMICA	53
1. Muestra. Cantidad de muestra por análisis	53
2. Procedimiento	53
3. Resultados	53
G. DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE ALCALOIDES	54
1. Muestra. Cantidad de muestra por análisis	54
2. Procedimiento	54
a) Extracción sólido – líquido: Obtención del Extracto Bruto Orgánico	54
b) Separación líquido – líquido: Obtención del Extracto Bruto de Alcaloides	55
c) Eliminación de las bases volátiles	55
d) Titulación. Determinación potenciométrica	56
3. Cálculo de la cantidad y del porcentaje de alcaloides	56

H. AISLAMIENTO DE LA ESCOPOLAMINA	59
1. Muestra	59
2. Procedimiento	59
a) Extracción sólido – líquido: Obtención del Extracto Bruto Orgánico	59
b) Separación líquido – líquido: Obtención del Extracto Bruto de Alcaloides	60
c) Purificación por cromatografía	61
d) Análisis preliminar por cromatografía en capa fina – CCF	61
e) Cromatografía de columna – CC	62
f) Cromatografía en placa preparativa – CPP	64
I. IDENTIFICACIÓN ESPECTROSCÓPICA	66
1. Espectro de masas	66
Espectro N°1.- Espectro de masas de la escopolamina obtenida a partir de las semillas del toe (<i>B. sanguinea</i>)	68
2. Espectro de RMN ¹ H	69
Espectro N°2.- Espectro de RMN ¹ H de la escopolamina obtenida a partir de las semillas del toe (<i>B. sanguinea</i>)	71
3. Espectro de RMN ¹³ C	72
Espectro N°3 .- Espectro de RMN ¹³ C – DEPT de la escopolamina obtenida a partir de las semillas del toe (<i>B. sanguinea</i>)	75
Espectro N°4.- Espectro de RMN ¹³ C – Desacoplamiento de ¹ H de Banda ancha de la escopolamina obtenida a partir de las semillas del toe (<i>B. sanguinea</i>)	76
4. Espectro ¹ H- ¹ H COSY	77
Espectro N°5.- Espectro de COSY de la escopolamina obtenida a partir de las semillas del toe (<i>B. sanguinea</i>)	78
5. Espectro de IR	79
Espectro N°6- Espectro de IR de la escopolamina obtenida a partir de las semillas del toe (<i>B. sanguinea</i>)	80
IV. RESULTADOS Y CONCLUSIONES	81
Resultados	82
Conclusiones	84
V. BIBLIOGRAFÍA	85

VI. ANEXOS	90
Anexo N°1. Alcaloides en trazas en las semillas del toe	91
Anexo N°2. Marcha fitoquímica (Reyna, 1999-b)	92
Anexo N°3. Análisis cualitativo para la detección de alcaloides presentes en plantas (Reyna, 1992)	98
Anexo N°4. Identificación Botánica del toe (<i>B. sanguinea</i>)	101
Anexo N°5. Resultados de la Marcha Fitoquímica de las semillas del toe (<i>B. sanguinea</i>)	104
Anexo N°6. Determinación del punto de equivalencia de la valoración potenciométrica	105
Anexo N°7. Determinación cuantitativa de alcaloides totales en las semillas del toe (<i>B. sanguinea</i>)	109
Anexo N°8. Análisis preliminar por cromatografía en capa fina (CCF) del extracto bruto de alcaloides	112
Anexo N°9. Análisis por cromatografía en capa fina (CCF) de las fracciones obtenidas de la purificación por cromatografía en columna (CC)	114
Anexo N°10. Cromatografía en placa preparativa (CPP) de la fracción N°2	115

I. ASPECTOS GENERALES

A. PRESENTACIÓN

La Química de los Productos Naturales representa un tema de estudio particularmente importante para el Perú, en razón de la gran riqueza de su flora, y de la amplia utilización que se ha dado en el pasado y que actualmente continúa dándose a las plantas medicinales, así como a otros productos naturales, en medicina tradicional, y en 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 las semillas del toe (*Brugmansia sanguinea*) y constituyó para mí el repaso de los cuatro cursos básicos semestrales de Química Orgánica, así como de los cursos de Proyecto de Tesis I CQ561 (Estudio Bibliográfico de Antraquinonas y Glicósidos Antraquinónicos presentes en la sábila) y Proyecto de Tesis II CQ562 (Aislamiento, obtención de la Barbaloina y Aloe-emodina), 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, permitiéndome conocer i) qué clase de compuestos están presentes, ii) cuál es la cantidad de alcaloides que contiene y iii) cuál es el alcaloide principal contenido en las semillas del toe.

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

el secado y molienda de las semillas del toe (*Brugmansia sanguinea*), su análisis cualitativo (marcha fitoquímica), la determinación cuantitativa del total de alcaloides presentes en ella y el aislamiento y purificación de la escopolamina, el principal alcaloide presente en las semillas de esta planta. Igualmente la identificación preliminar de la escopolamina mediante cromatografía en capa fina. Este trabajo demandó una dedicación de 5 meses (considerando el trabajo de 8 horas/día, durante 5 días/semana), y se realizó en el período de enero a diciembre del 2003.

- ii Identificación espectroscópica de la escopolamina mediante el análisis de los espectros de Masas y de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno (RMN¹H), Carbono (RMN¹³C) y ¹H-¹H COSY, espectros obtenidos durante mi estadía en los Laboratorios del Instituto de Química de la Universidad de São Paulo-Brasil (del 18 de agosto al 14 de setiembre del 2003) .
- iii Finalmente, aunque es la primera actividad, la cual se lleva a cabo durante toda la realización de la tesis, el estudio y análisis de la información bibliográfica relativa a los estudios químicos de las semillas del toe (*B. sanguinea*) y de la escopolamina.

B. OBJETIVOS DE LA TESIS

Los objetivos de la presente tesis son los siguientes:

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

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

El aislamiento comprende las etapas de extracción por solventes, separación y purificación. Así, se describirán los diversos métodos de extracción de alcaloides publicados en la bibliografía, las pruebas cualitativas de detección de alcaloides, la utilización de la cromatografía en capa fina como método preliminar de identificación y la purificación mediante la cromatografía en columna y placa preparativa. Asimismo, se describe la aplicación de la espectrometría de masas y de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno (RMN¹H), de Carbono (RMN¹³C) y ¹H-¹H COSY 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 LAS SEMILLAS DEL TOE (*Brugmansia sanguinea*)

1. Composición Química de las semillas del toe (*B. sanguinea*)

a) Análisis cualitativo (marcha fitoquímica)

La marcha fitoquímica se refiere a la determinación cualitativa de los metabolitos secundarios o productos naturales* presentes en una planta o cualquier organismo vivo.

En la bibliografía revisada, no hemos encontrado ningún trabajo de análisis fitoquímico realizado a las semillas del toe.

b) Principales alcaloides presentes en las semillas del toe

El estudio más completo sobre los alcaloides presentes en las semillas del toe (*B. sanguinea*) ha sido publicado por Leary (1970), quien encontró que éstas contienen principalmente el alcaloide escopolamina, llamada también hioscina (a), y además los alcaloides hiosciamina (b) y apohioscina (c), cuyas estructuras se muestran en la Figura N°1, en la que se incluye la estructura básica de los alcaloides tropánicos (d), a la cual pertenecen estos alcaloides.

Asimismo, Leary (1970) hace mención de la presencia, en trazas, de tropina, pseudotropina y colina (ver Anexo N°1). Según Leary (1970), las semillas fueron colectadas el año 1963 en La Laguna (Nariño, Colombia) y el trabajo químico se realizó en los años 1968 y 1969

* 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.

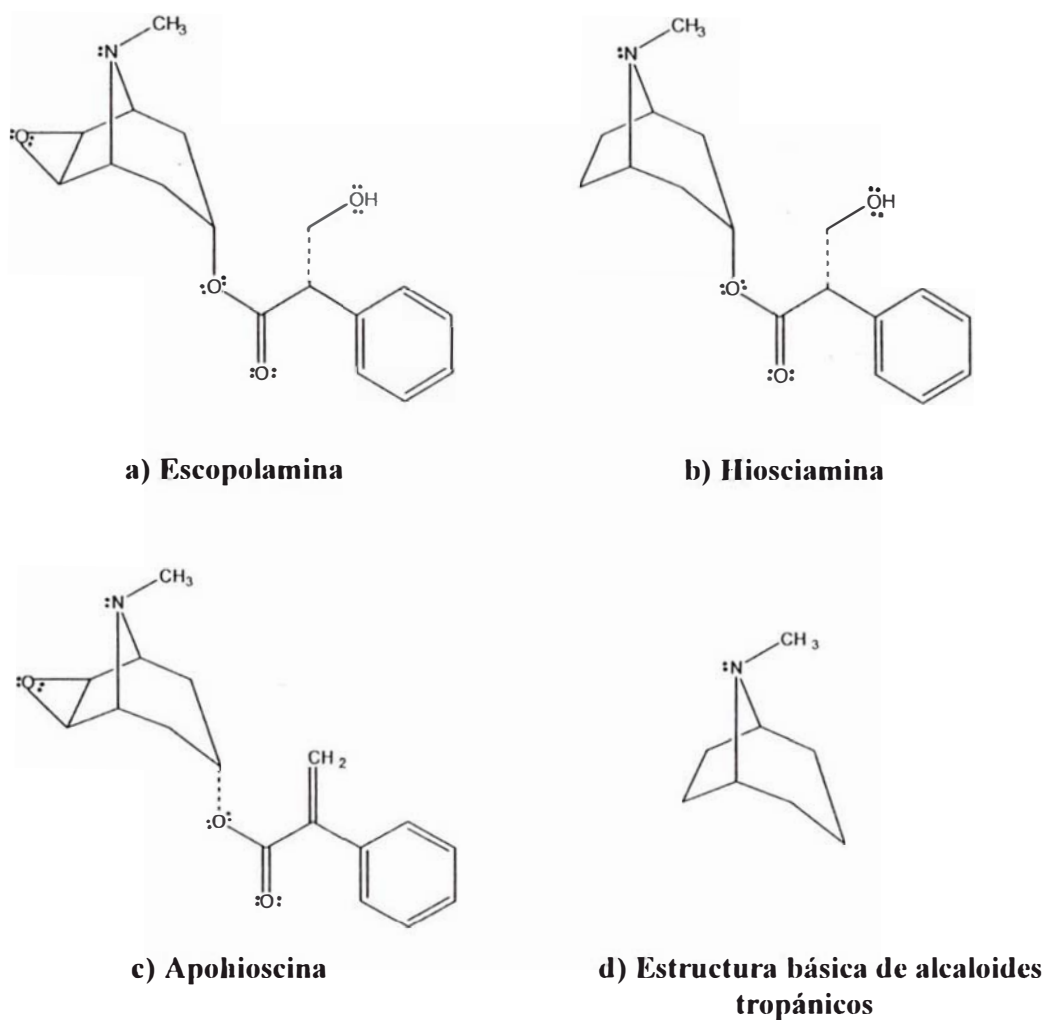


Figura N°1.- Principales alcaloides presentes en las semillas del toe

Además de este trabajo, en la bibliografía sólo encontramos el trabajo de Drey & Foster (1953) referidas al análisis por cromatografía de papel de los extractos de semillas de *B. sanguinea*.

Los otros trabajos sobre *B. sanguinea* están referidos al estudio de las hojas, tallos y raíces. Así, Evans, Major y Pe Than (1965) reportan el aislamiento y caracterización de escopolamina (hioscina), apoescopolamina (apohioscina), norescopolamina (norhioscina) y hiosciamina de las partes aéreas (hojas y tallos) de *B. sanguinea*. Además, estos autores, reportan el aislamiento de atropina o hiosciamina como el principal alcaloide en las raíces de *B. sanguinea*,

junto con escopolamina, $3\alpha,6\beta$ -ditigloyloxytropano y $3,6$ -ditigloyloxytropano-7-ol.

Posteriormente, Evans & Mayor (1966) reportaron el aislamiento de (-)- 3α -tigloyloxytropano- 6β -acetoxitropano y 3α -acetoxitropano de las hojas y tallos jóvenes de *B. sanguinea*.

Asimismo, Evans & Mayor (1968) aislaron los alcaloides meteloidina, oscina y littorina de las hojas y raíces de *B. sanguinea*, y los alcaloides 6β -isovaleryloxy- 3α -tigloyloxytropano- 7β -ol y 3α -tigloyloxytropano de las raíces de esta planta.

Finalmente, Nathan et al. (1993), reportan el aislamiento y caracterización de un nuevo alcaloide, 6β -hydroxy- 3α -tigloyloxytropano, de las hojas de *B. sanguinea*.

En todas estas investigaciones se encontró que la escopolamina es el principal alcaloide en las partes aéreas (hojas y tallos), junto con pequeñas cantidades de hiosciamina o atropina.

c) Análisis cuantitativo (porcentaje de alcaloides) de las semillas del toe

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

El porcentaje total de alcaloides en las semillas (secas) de *B. sanguinea* procedentes de Ecuador fue de 0,17% (Tabla N°1).

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

Características y/o procedencia de las muestras	Partes de la muestra (seca)	% total de alcaloides
Ecuador	Hojas	0,27
	Flores	0,62
	Cortezas	0,26
	Semillas	0,17
Dartford (Inglaterra) (Plantas de esqueje)	Hojas	0,41
	Tallos	0,30
	Raíces	0,76
Dartford (Inglaterra) (Plantas de almácigo)	Hojas	0,51
	Tallos	0,31
	Raíces	0,54

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

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

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

* HPLC: Cromatografía líquida de alta presión.

2. Aislamiento de alcaloides de las semillas del toe

La única referencia acerca del aislamiento de alcaloides de las semillas del toe es aquella publicada por Leary (1970), quien reporta el aislamiento e identificación del picrato de escopolamina.

Además, en la bibliografía se reporta el aislamiento de escopolamina y de otros alcaloides a partir de otras partes del toe (*B.sanguinea*), así como de otras especies de *Brugmansia*, entre las que citaremos las siguientes:

- i Hojas, tallos y raíces del toe: Evans, Major & Pe Than (1965).
- ii Hojas y tallos del toe: Evans & Major (1966).
- iii Hojas y raíces del toe: Evans & Major (1968).
- iv Hojas del toe: Nathan et al. (1993).
- v Hojas y raíces de *B. candida*: Evans, Bristol & Lampard (1969).
- vi Semillas de *Datura ferox*: Vitale et al. (1995).
- vii Hojas, tallos y raíces de *B.cornigera Hook*: Evans & Pe Than (1962).

Robins et al. (1993), en su estudio acerca de la biosíntesis de la escopolamina a partir de hiosciamina, proporcionan un procedimiento clásico de purificación de estos alcaloides, el cual presentaremos en esta sección.

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

- a) Procedimiento de Leary (1970).** “Alcaloides de las semillas de *Brugmansia sanguinea* R. & P.”
- Muestra utilizada
Semillas de *Brugmansia sanguinea* R. & P.
 - Extracción sólido–líquido (Obtención del Extracto Bruto Orgánico, EBO)
 - i Maceración de las semillas con solventes de polaridad creciente: éter de petróleo, éter etílico, metanol (extracto que contenía alcaloides), etanol al 70%. El extracto orgánico se concentra al vacío hasta sequedad, obteniéndose el EBO.
 - Separación cromatográfica
 - ii El extracto bruto de alcaloides se empacó en una columna cromatográfica sobre Kieselguhr, el cual se había sometido a una solución buffer de fosfato de pH 6,6.
 - iii Se eluyó solventes de polaridad creciente aislándose los siguientes alcaloides:
 - Fracción de éter etílico: apohioscina y escopolamina.
 - Fracción de cloroformo: hiosciamina y dos alcaloides no identificados.
 - Fracción de cloroformo en medio amoniacal: trazas de hiosciamina tropina, pseudotropina y colina.
 - Purificación e Identificación
 - iv Purificación: se sintetizó el picrato de escopolamina.
 - v Identificación: mediante punto de fusión y espectroscopía infrarroja.
 - Resultados: aislamiento e identificación del picrato de escopolamina de las semillas de *B. sanguinea*.

b) Procedimiento de Robins et al. (1993). “Estereoquímica de los procesos enzimáticos involucrados en la biosíntesis de escopolamina a partir de la hiosciamina”.

- Muestra utilizada
Raíces de *Brugmansia sp.*
- Extracción sólido – líquido (Obtención del Extracto Bruto Orgánico, EBO)
 - i Maceración de las raíces con metanol. El extracto orgánico se concentra al vacío hasta sequedad, obteniéndose el EBO.
- Separación líquido–líquido (Obtención del Extracto Bruto de Alcaloides,EBA)
 - ii Disolución del extracto bruto orgánico con una solución acuosa de ácido clorhídrico $\text{HCl}_{(ac)}$ 1M.
 - iii Las soluciones ácidas se juntan y se lavan con cloruro de metileno CH_2Cl_2 (6x75 mL), descartando la fase orgánica.
 - iv La fase acuosa ácida se alcaliniza con amoníaco $\text{NH}_3_{(ac)}$ 15N.
 - v La fase acuosa alcalina se extrae con cloroformo CHCl_3 (4x100mL).
 - vi Las fases orgánicas se reúnen, se secan con sulfato de sodio anhidro $\text{Na}_2\text{SO}_{4(s)}$, se filtran, y se concentran: se obtiene el EBA.
- Purificación e Identificación
 - vii Purificación mediante cromatografía en placa preparativa, obteniéndose alcaloides puros.
 - viii Identificación: mediante espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno, RMN^1H .
- Resultados: aislamiento e identificación de los alcaloides escopolamina e hiosciamina.

3. Identificación clásica de la escopolamina y/o derivados

a) Comportamiento cromatográfico de la escopolamina e hiosciamina

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

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

Eluente* : EtOAc - iPrOH-25% NH₃ (45:35:10)

Revelador: Dragendorff

i R_f(escopolamina): 0,61 ii R_f (hiosciamina) : 0,40

b) Punto de fusión

i Escopolamina: Líquido viscoso. Forma un cristal monohidratado

59°C (The Merck Index – 1996)

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

188°C (Griffin-1966)

187-188°C (Evans & Pe Than-1961)

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

Picrato de Hiosciamina: No reportado.

4. Identificación espectroscópica de la escopolamina

En la Sección II.B.5. (Identificación espectroscópica de compuestos orgánicos, pág. 32) 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 de Hidrógeno (RMN¹H) y de Carbono (RMN¹³C), COSY y HETCOR, así como la espectroscopía de Infrarrojo, IR y de Ultravioleta, UV.

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

a) Espectro de Masas de la escopolamina

i Vitale et al. (1995)

Proporciona el espectro de masas de la escopolamina, obtenido con un cromatógrafo de gases-espectrómetro de masas VG TRIO-2, tal como se reproduce en la Figura N°2.

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

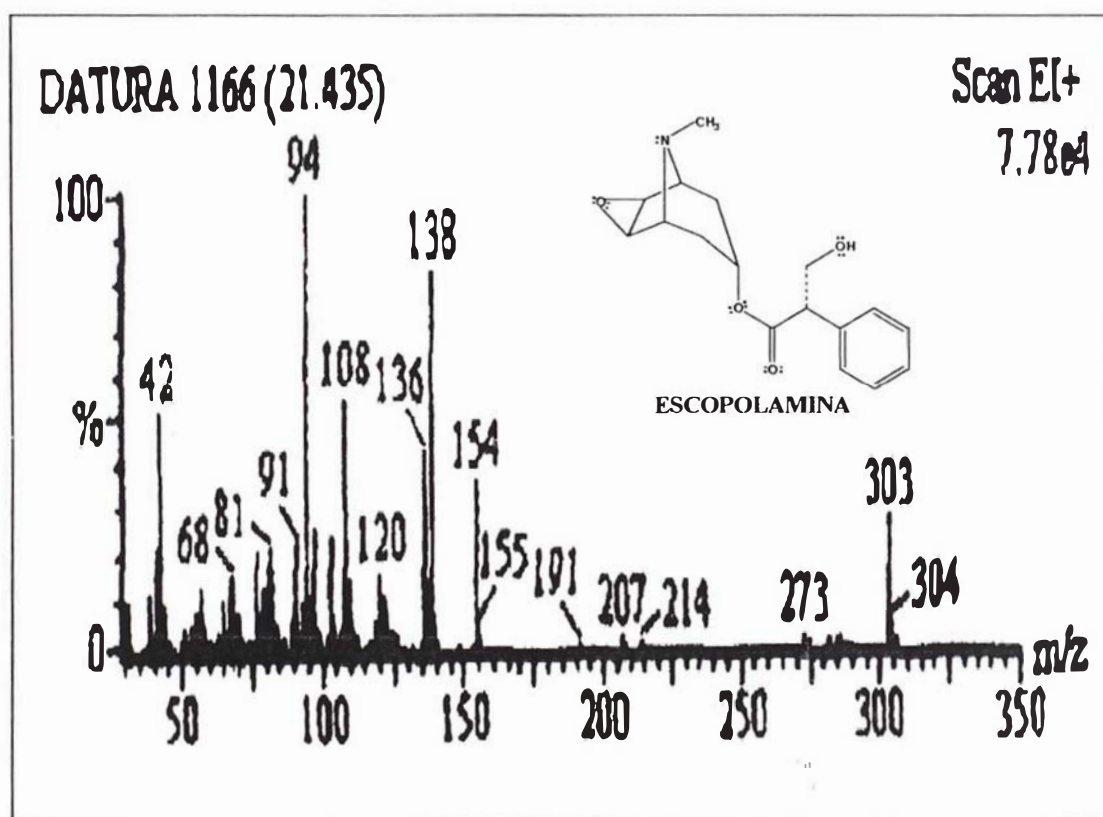
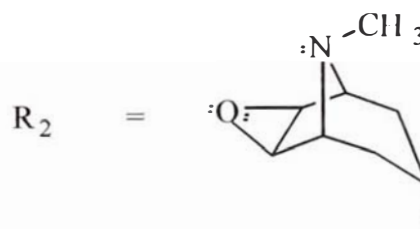
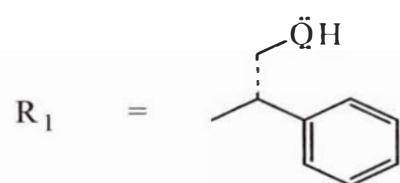


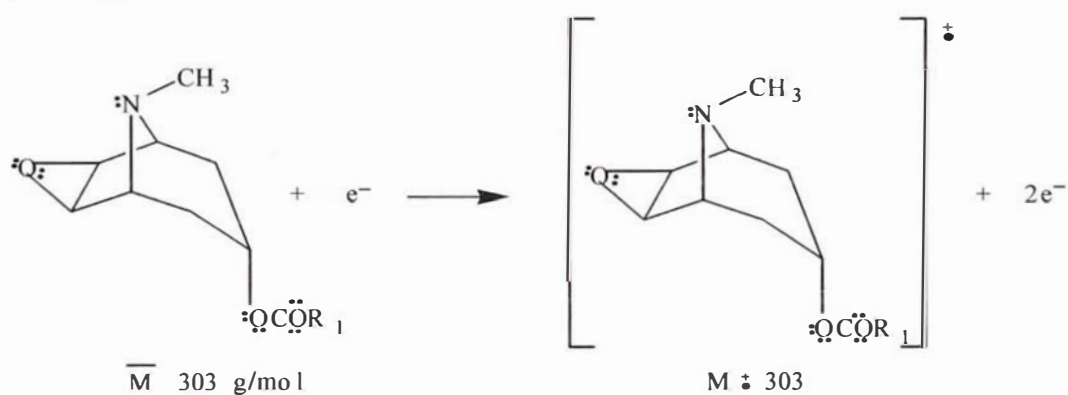
Figura N°2.- Espectro de masas de la escopolamina (Vitale et al.- 1995)

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

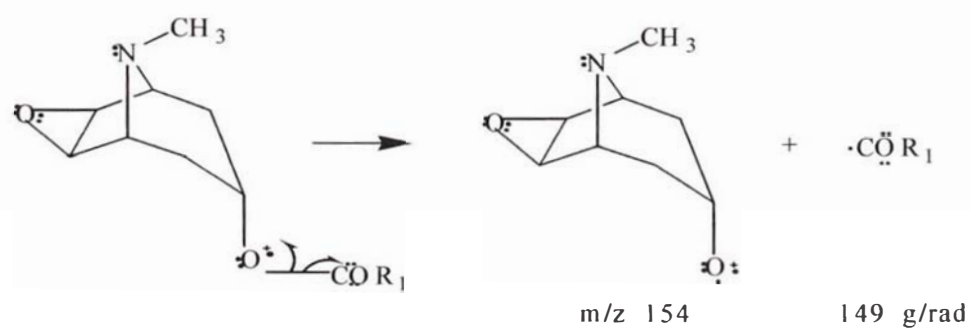
ii Ecuaciones de fragmentación del espectro de la escopolamina
 m/z : 303 (M^+) , 154, 138, 94 (pico base)



$M^+ 303$



$m/z \text{ 154 (} M^+ - \cdot\text{C}\ddot{\text{O}}\text{R}_1 \text{)}$



b) Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno, RMN¹H

Sarazin et al. (1991) ofrece los valores de los desplazamientos químicos (δ , ppm) de todos los hidrógenos de la escopolamina (ver Tabla N° 2), sin proporcionar el espectro de Resonancia Magnética de Hidrógeno (RMN¹H) correspondiente.

A continuación indicaremos los desplazamientos químicos del espectro de RMN¹H del compuesto aislado de las semillas del toe (ver Figura N°3).

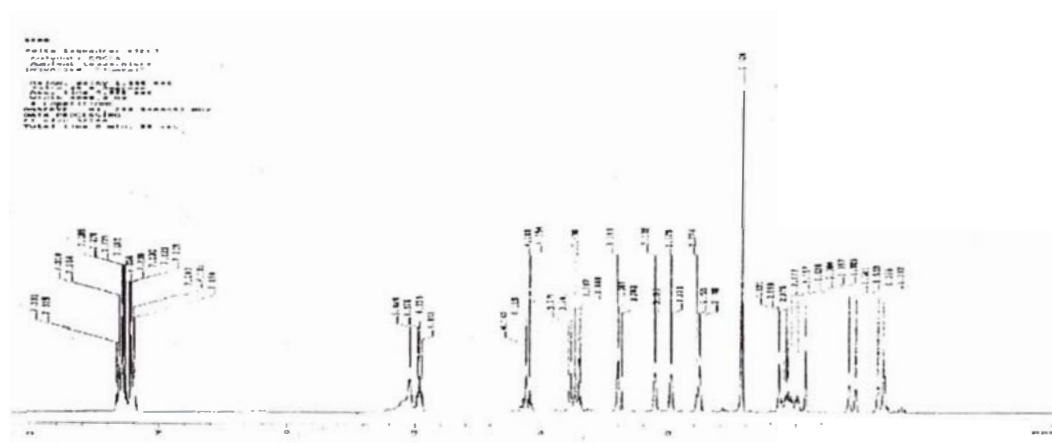


Figura N°3.- Espectro de RMN¹H de la escopolamina (300MHz, solvente CDCl₃)

Los valores de desplazamiento químico aparecen registrados en la parte superior del espectro (Figura N°3), tomaremos sólo dos de los tres decimales indicados. Luego, para el análisis del espectro determinaremos el valor exacto del desplazamiento químico promediando los valores que aparecen en la parte superior, para aquellos valores que sean necesarios.

- $\delta = 1,32\text{ppm}, 1,56\text{ppm}$; hidrógenos ecuatoriales enlazados al carbono perteneciente al ciclo tropánico.
- $\delta = 2,42\text{ppm}$; grupo metilo CH₃ enlazado a un átomo de nitrógeno; y corresponde a los tres hidrógenos equivalentes del grupo metilo.

- $\delta = 2,76\text{ppm}, 2,97\text{ppm}, 3,1\text{ppm}, 3,38\text{ppm}$; hidrógenos enlazados al carbono perteneciente al ciclo tropánico.
- $\delta = 4,12\text{ppm}$; hidrógeno enlazado al carbono metileno.
- $\delta = 4,96\text{ppm}$; hidrógeno ecuatorial enlazado al carbono perteneciente al ciclo tropánico.

En la Tabla N°2 se indican los valores de los desplazamientos químicos de los hidrógenos de la escopolamina reportados por Sarazin et al. (1991) y los valores obtenidos en este trabajo.

Tabla N° 2

COMPARACIÓN DE LOS DESPLAZAMIENTOS QUÍMICOS (δ , ppm) DE LOS HIDRÓGENOS DE LA ESCOPOLAMINA

Tipo de Hidrógeno*	Sarazin et al. –1991 δ (ppm)	Tesis ECC-2004 δ (ppm)
H-1	2,94	2,97
H-2 ax	1,99	-
H-2 eq	1,31	1,33
H-3	4,98	4,96
H-4 ax	2,08	-
H-4 eq	1,55	1,56
H-5	3,08	3,10
H-6	3,37	3,38
H-7	2,70	2,76
H-2'	3,72	-
H-3'a	4,30	4,12
H-3'b	3,77	-
2xo-H	7,21	-
2xm-H	7,29	-
1xp-H	7,18	-
CH ₃ -N	2,42	2,42

Observación: no se ha determinado los desplazamientos químicos para los hidrógenos del anillo aromático, 2 hidrógenos axiales y 1 hidrógeno enlazado al carbono que contiene el grupo funcional hidroxilo.

* Ver Figura N° 4

Escopolamina

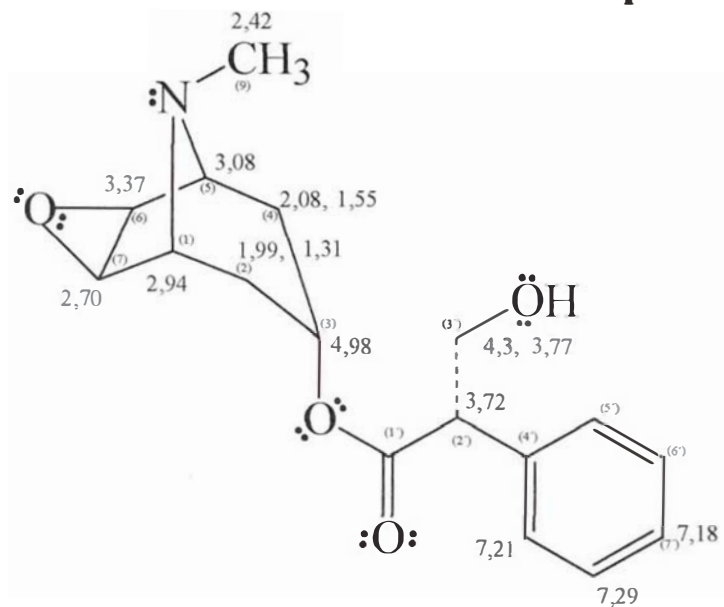


Figura N° 4.- Estructura de la escopolamina con los valores de los desplazamiento químicos (δ , ppm) para los hidrógenos (Sarazin et al. –1991).

c) Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de Carbono, RMN¹³C

Sarazin et al. (1991) reporta los valores de los desplazamientos químicos (δ , ppm) de todos los carbonos de la escopolamina (ver Tabla N°3), sin proporcionar el espectro de Resonancia Magnética de Carbono (RMN¹³C) correspondiente.

En la Tabla N°3 se indican los valores de los desplazamientos químicos obtenidos experimentalmente para la escopolamina.

Tabla N° 3

COMPARACIÓN DE LOS DESPLAZAMIENTOS QUÍMICOS (δ , ppm) DE LOS CARBONOS DE LA ESCOPOLAMINA

Número de átomo de carbono*	Sarazin et al. -1991 δ (ppm)	Tesis ECC-2004 δ (ppm)
1	57,8	57,4
2	30,8	30,1
3	66,9	66,3
4	31,0	30,3
5	57,9	57,5
6	56,4	56,0
7	56,0	55,5
9	42,2	41,5
1'	171,8	171,5
2'	54,4	54,2
3'	64,0	63,5
ipso	135,8	135,6
o-C	128,1	127,8
m-C	129,0	128,7
p-C	127,9	127,6

* Ver Figura N°5

Escopolamina

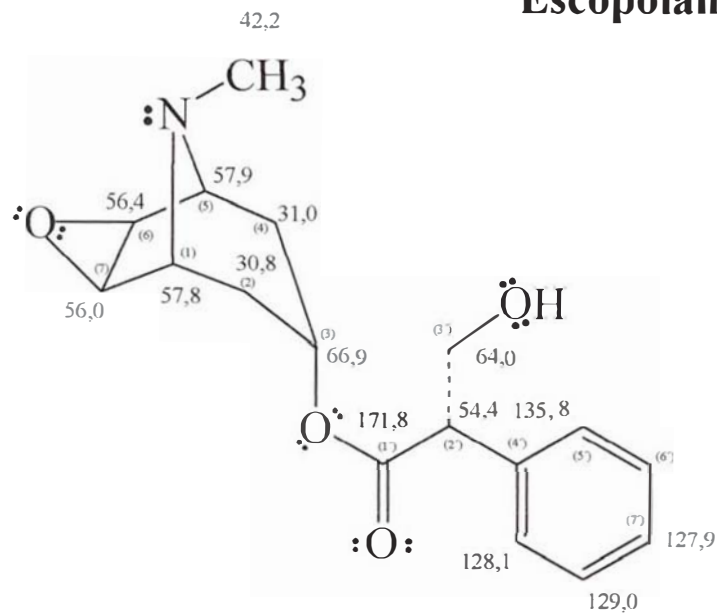


Figura N° 5.- Estructura de la escopolamina con los valores de los desplazamiento químicos (δ , ppm) para los carbonos (Sarazin et al. –1991).

d) Espectro ^1H - ^1H COSY

Sazarin et al. (1991) nos proporciona el espectro ^1H - ^1H COSY para la escopolamina, tal como se muestra en la Figura N°6.

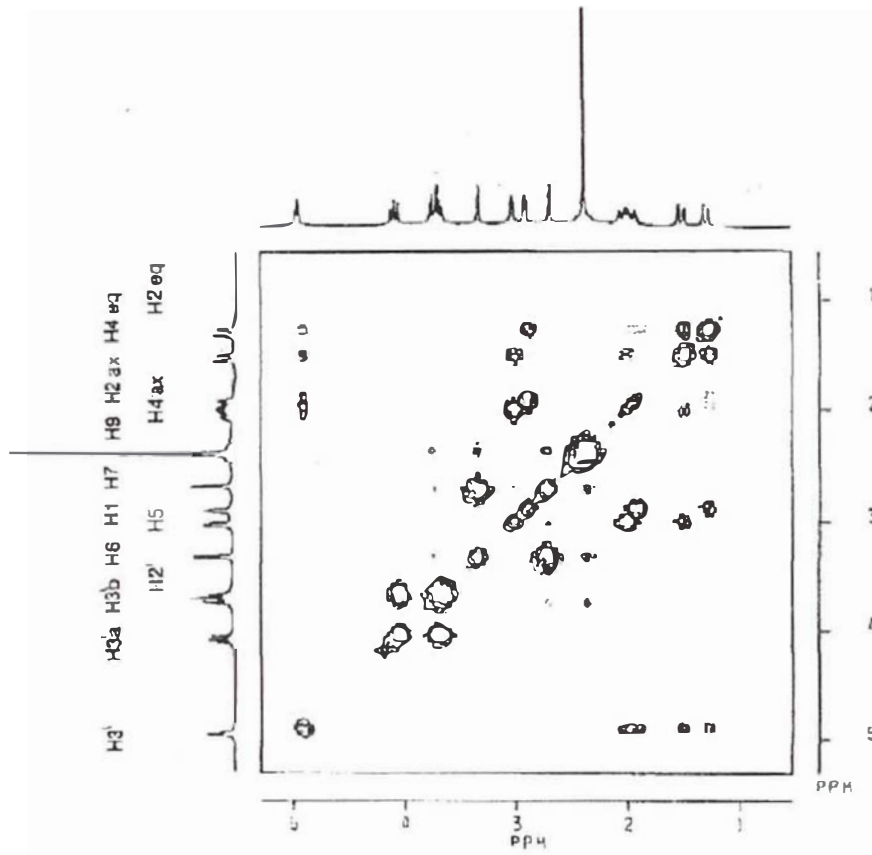


Figura N°6.- Espectro ^1H - ^1H COSY de la escopolamina (solvente CDCl_3)
(Sarazin et al.- 1991)

En este de espectro se observa las siguientes correlaciones ^1H - ^1H :

H (δ ppm)	Hidrógenos correlacionados (δ ppm)
H-2eq (1,31)	H-4eq (1,55), H1 (2,94)
H-4eq (1,55)	H-5 (3,08), H-2eq (1,31)
H-2ax (1,99)	H-1(2,94)
H-4ax (2,08)	H-5 (3,08)
H-7 (2,70)	H-6 (3,37)

B. ESTUDIOS QUÍMICOS 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°2).
- 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 tiene dos desventajas: a) el uso de éter etílico, que es un solvente excesivamente volátil y costoso, y debe usarse con mucha precaución por la posible presencia de peróxidos orgánicos, y b) la utilización de una mayor cantidad de muestra y de solventes, debido a que los extractos se obtienen por percolación*.

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

2. Test de alcaloides

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

* Percolación.- Procedimiento mediante el cual se hace pasar el solvente a través de la muestra empacada en un recipiente adecuado, por acción de la gravedad (ver Pág. 26).

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 20th edición de la Farmacopoeia 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. Pharmacopocia – 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 Maceración.- Se deja macerar la muestra con el solvente o mezcla de solventes y se alcaliniza con amoníaco, durante 12 a 24 horas.
Se decanta el sólido y se separa del extracto.
 - i' 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'' 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 seguido el método de Pelt et al. (1967), con una sola modificación: la observación del punto final de la titulación, cuantificación, mediante titulación Potenciométrica.

En la Tabla N°4 se hace un resumen comparativo entre ambos procedimientos.

Tabla N°4

COMPARACIÓN DEL MÉTODO DE DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE ALCALOIDES DESCRITO POR PELT ET AL. – 1967 Y TESIS E.C.C. -2004

NATURALEZA DE LAS OPERACIONES		PELT ET AL. (1967)	TESIS E. CÓNDOR (2004)
EXTRACCIÓN	Peso de la muestra	10 g	10 g
	DESENGRASE	No se realiza	No se realiza
	ALCALINIZACIÓN	Amoniaco concentrado (8ml.)	Amoniaco concentrado (10ml.)
	SOLVENTE	Alcohol 95°- cloroformo, 1:2 (30 ml.) ó Etanol - éter, 1:2 (30 ml.) ó Éter:- cloroformo, 3:1 (150 ml.)	Etanol – éter 1:2 (60 ml.)
	FORMA DE EXTRACCIÓN	Maceración: 12 hrs, agitación, o una combinación de ambas	Maceración 15hrs
	SEPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN EXTRACTORA	Extracción con Éter etílico en soxhlet	Extracción con Éter etílico en soxhlet
	VERIFICACION DE LA EXTRACCIÓN	Reactivo de Mayer	Reactivo de Mayer
SEPARACIÓN	PURIFICACIÓN Y ELIMINACIÓN DE PIGMENTOS Y OTRAS FRACCIONES SOLUBLES	<ul style="list-style-type: none"> • Evaporación del solvente • Reemplazo del solvente con la mezcla éter – cloroformo • Paso de los alcaloides a una solución de ácido sulfúrico 0,5N • Basificación de la solución ácida con amoníaco acuoso y retorno de los alcaloides libres a una mezcla de éter – cloroformo • Evaporación del solvente 	<ul style="list-style-type: none"> • Evaporación del solvente • Disolución del sólido con la mezcla éter-cloroformo • Paso de los alcaloides a una solución de ácido sulfúrico 0,5N • Basificación de la solución ácida con amoníaco acuoso y extracción de los alcaloides libres con una mezcla de éter-cloroformo. • Evaporación del solvente
	ELIMINACION DE LAS BASES VOLATILES	<ul style="list-style-type: none"> • 15 minutos en baño maría hirviendo • Redisolución del residuo en cloroformo • Evaporación a sequedad • 15 minutos en baño maría hirviendo 	<ul style="list-style-type: none"> • Disolución del sólido en cloroformo • Evaporación en el rotavapor (30°C 300 mbar) • Repetición de la operación 4 veces
CUANTIFICACION	TITULACIÓN ACIDO – BASE	<ul style="list-style-type: none"> • Redisolución del residuo en cloroformo • Adición de 20 ml. de H₂SO₄ 0,02N • 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 0,0 2N • Evaporación del cloroformo en el rotavapor • Titulación del exceso de ácido con NaOH 0,0 2N
	OBSERVACIÓN DEL PUNTO FINAL	Rojo de metilo	Titulación Potenciométrica

4. Aislamiento de alcaloides

En este acápite se presenta dos 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 Descengrase del material vegetal con éter de petróleo (50 – 90° C).
 - ii Alcalinización con una solución acuosa de amoníaco NH_3 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 $\text{H}_2\text{SO}_{4(\text{ac})} 2\text{N}$.
 - vi Lavado con solvente orgánico (cloruro de metileno), se descarta la fase orgánica.
 - 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 e Identificación
 - ix El EBA se purifica mediante CPP* y CC*: Obtención del alcaloide N, N-Dimetiltriptamina puro.
 - x Identificación: Espectro de Masas y de RMN^1H del alcaloide.
- Resultados: Aislamiento e identificación de la N, N- Dimetiltriptamina de las hojas de chacruna (*Psychotria viridis*).

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

b) Procedimiento de Hoet y Ríos (1980)

- Muestra utilizada
Muestra de *Datura stramonium*, seca y molida
- Extracción sólido – líquido (Obtención del Extracto Bruto Orgánico, EBO)
 - i Alcalinización de la muestra vegetal con una solución acuosa de amoníaco $\text{NH}_3(\text{ac})$
 - ii Extracción en frío con una mezcla de solventes orgánicos de etanol-éter (20:40).
 - iii Extracción en un extractor soxhlet con éter, hasta que el resto sólido quede exento de alcaloides (Test de Mayer negativo).
 - iv El extracto orgánico se concentra, con la finalidad de eliminar el solvente: se obtiene el EBO.
- Separación líquido – líquido (Obtención del Extracto Bruto de Alcaloides, EBA)
 - v Disolución del EBO con una mezcla orgánica de éter-cloroformo.
 - vi Extracción con solución ácida de ácido sulfúrico $\text{H}_2\text{SO}_4(\text{ac})$ 0,5N, 4x50mL.
 - vii La fase acuosa ácida se alcaliniza con una solución acuosa de amoníaco $\text{NH}_3(\text{ac})$ (pH= 11).
 - viii Se extraen los alcaloides libres con solvente orgánico. Se descarta la fase acuosa.
 - ix Las fases orgánicas se reúnen, se secan con sulfato de sodio anhidro $\text{Na}_2\text{SO}_4(\text{s})$ y se concentra: se obtiene el EBA.

Observación: Hoet y Ríos (1980), al igual que Pelt et al. (1967), realizaron la determinación cuantitativa del total de alcaloides, y no se ocupan del aislamiento de cada alcaloide individual. Sin embargo, el procedimiento que emplean hasta la obtención del Extracto Bruto de

Alcaloides (EBA), constituye uno de los procedimientos clásicos, por lo que presentamos en esta sección.

c) Comparación de Procedimientos

Los cuatro procedimientos de aislamiento de alcaloides presentados, dos en la Sec. I.A.2. (pág. 12-13) y dos en esta sección, siguen dos grandes etapas para la obtención del Extracto Bruto de Alcaloides, siendo éste el procedimiento experimental realizado en nuestra Tesis. Este esquema de trabajo se resume a continuación.

- Extracción sólido-líquido (Obtención del Extracto Bruto Orgánico, EBO)
 - i 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.
 - ii Alcalinización con $\text{NH}_{3(\text{ac})}$.
 - iii Extracción con solventes (por agitación, reflujo o soxhlet).
 - iv Eliminación del solvente por destilación a presión reducida y obtención del EBO.
- Separación líquido - líquido (Obtención del Extracto Bruto de Alcaloides, EBA)
 - v Disolución del EBO con ácidos, $\text{H}_2\text{SO}_{4(\text{ac})}$ o $\text{HCl}_{(\text{ac})}$
Esta etapa tiene como objetivo extraer los alcaloides como sales.
 - vi Lavado con solventes orgánicos (éter de petróleo, diclorometano, y/o cloroformo) y eliminación del solvente orgánico.
Esta etapa tiene como objetivo eliminar la mayor parte de compuestos coloreados solubles en solventes orgánicos.

vii 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.

viii 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.

ix Eliminación del solvente por destilación y obtención del EBA.

5. Identificación espectroscópica de compuestos orgánicos

Son cuatro 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 (RMN^1H) y de carbono (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:

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

a) Espectrometría de Masas, EM

En un espectrómetro de masas, las moléculas que se encuentran en un estado gaseoso y a baja presión son bombardeadas con un haz de electrones de alta energía (70 eV ó 1 600 Kcal/mol), y uno de los efectos que este bombardeo produce es desprender uno de los

electrones de la molécula y producir un ion de carga positiva (con un número impar de electrones, un catión radical) al que se denomina “ion molecular” y se lo representa por $M^{\dot{+}}$

Además el haz de electrones imparte a los iones moleculares un excedente muy grande de energía, que es muy superior a lo que se requiere para romper los enlaces covalentes de las moléculas (50 a 100 Kcal /mol), y así poco después que se forman los iones moleculares la mayoría de ellos se “fragmentan” en diversas formas, que dependen de la naturaleza del 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 de la masa 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 de Hidrógeno, RMN¹H

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

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

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

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

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

- 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;
- iii el “acoplamiento spin – spin”, esto es la interacción entre hidrógenos vecinos, que se presenta en el espectro como divisiones de cada señal: nos indica el número de hidrógenos vecinos que tiene el protón que origina la señal.

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

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

c) Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear de Carbono-13, RMN¹³C

La RMN¹³C tiene un valor particular en química orgánica. Mientras la RMN¹H nos permite “ver” los protones enlazados a la estructura carbonada de la molécula, la RMN¹³C nos permite ver los carbonos; por ello, la RMN¹³C es un complemento perfecto de la RMN¹H para dilucidar la estructura de un compuesto.

Igual que en el isótopo de hidrógeno ¹H, el núcleo del isótopo de carbono – 13, ¹³C, 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 RMN¹³C son los mismos que los de la RMN¹H. Sin embargo, se presenta una diferencia. En la RMN¹H se estudia al isótopo natural más común del hidrógeno, ¹H, cuya abundancia es del 99,98% del total de hidrógenos. Por el contrario, en la RMN¹³C se estudia al isótopo de carbono menos abundante, al ¹³C, que constituye el 1,1% del total de carbonos. Esta deficiencia deviene en una ventaja, en razón de que no se observan desdoblamientos del tipo ¹³C – ¹³C en los espectros de RMN¹³C, a pesar que dichos núcleos vecinos pueden desdoblar sus señales entre sí, pero las probabilidades que se encuentren dos núcleos de ¹³C resultan muy escasas.

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

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

Al igual que la RMN¹H, la RMN¹³C proporciona información del entorno electrónico en el que se encuentra cada átomo de carbono en la molécula. Los desplazamientos químicos en la RMN¹³C son más o menos paralelos a los de la RMN¹H. El compuesto de referencia, tetrametilsilano, (CH₃)₄Si, TMS, absorbe a campo alto, mientras que los átomos de carbono aldehídico y carboxílico lo hacen a campos más bajos.

Los desplazamientos químicos en la RMN¹³C son mucho mayores que los observados en la RMN¹H, extendiéndose la zona de absorción en el rango de 0 a 250 ppm (δ) hacia campo bajo de la señal del TMS. Esto hace que los espectros de RMN¹³C sean más sencillos que los de

hidrógeno, ya que en un espectro de ^{13}C es poco probable que se observen señales sobrepuestas.

Existen dos clases de espectros de RMN ^{13}C : en uno se observa los acoplamientos spin – spin $^{13}\text{C} - ^1\text{H}$, y en el otro no.

En el **espectro de RMN ^{13}C desacoplado a ^1H de banda ancha**, el núcleo de ^{13}C 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 RMN ^{13}C acoplado a ^1H** no se suprime el acoplamiento $^{13}\text{C} - ^1\text{H}$ 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, CH_3) 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 RMN ^{13}C – 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, CH_3 , CH_2 , CH o $\text{C}_{\text{cuaternario}}$, al que pertenece una determinada señal. En particular, es especialmente útil para superar la confusión de un espectro de RMN^{13}C acoplado a ^1H en el que se superponen las señales multipletes 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 CH_3 y CH , absorciones negativas para CH_2 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 en nuestra tesis y presentado en la parte experimental (pág. 75) pertenece a esta clase de espectros.

d) Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear Bidimensional

Existen diversos experimentos de resonancia magnética nuclear de dos dimensiones, entre los más utilizados y el que se presenta en este trabajo es el experimento de RMN bidimensional homonuclear COSY^* u HOMCOR^{**} .

Hablaremos de dos experimentos, **COSY** y **HECTOR**^{***}, en ambos se pueden observar dos ejes de coordenadas, los cuales están representados por desplazamientos químicos (δ , en ppm).

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

* COSY : Correlated Spectroscopy (Espectroscopía de Correlación)

** HOMCOR: Homonuclear Correlation Spectroscopy (Espectroscopía de Correlación Homonuclear)

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

cuales representan la intensidad de los picos. Fuera de la diagonal se observan otras manchas contorneadas, las cuales vienen hacer el resultado de la correlación de pares de núcleos por medio del acoplamiento spin-spin.

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

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

En nuestra tesis hemos obtenido este tipo de espectro para la escopolamina (pág. 78).

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

e) **Espectroscopía de Infrarrojo, IR**

El espectro de infrarrojo de un compuesto es una representación gráfica de la longitud de onda λ ó del número de onda ν^{-1} , en el rango de radiación infrarroja (4000 a 666 cm^{-1}), en relación a la transmitancia (%T) o absorbancia (A) que presenta la muestra.

En el espectro IR de la escopolamina obtenido en nuestra tesis se registra el número de onda ν^{-1} con respecto a la transmitancia (%T) (pág. 80).

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.

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

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

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

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

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 C = O, etc.) mediante simple 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.

f) Espectroscopía de Ultravioleta, UV

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

extendida sobre un amplio rango de longitudes de onda, cuyas características principales son su posición y su intensidad.

La posición de la absorción UV se especifica como 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:

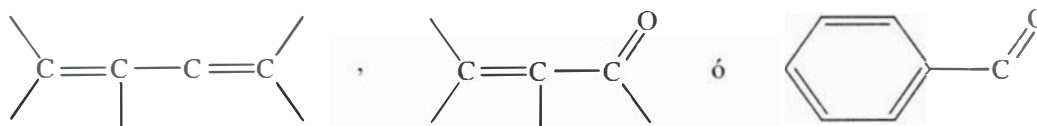
$$A = \text{Log}_{10}(I/I_0) = \epsilon cb \quad \text{y} \quad \epsilon = A/cb$$

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 $\epsilon_{\max} > 10^4$ son absorciones de alta intensidad, mientras que las absorciones de baja intensidad corresponden a valores de $\epsilon_{\max} < 10^3$. Estas últimas se consideran “transiciones prohibidas”.

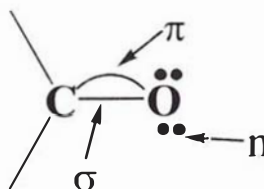
Los espectros de UV proporcionan mucho menor información acerca de la estructura de los compuestos, que aquella proporcionada

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 (200-400nm) 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

La culminación de esta Tesis de Licenciatura ha pasado por el trabajo en el laboratorio de tres plantas, convenciéndonos que hay casos en que es mejor dejar de lado un trabajo de investigación cuando los resultados experimentales no resultan favorables.

El primer tema de tesis trató del "Estudio Químico del Pishcol Negro (*Espostoa lanata*)"*. En el aislamiento de los constituyentes químicos de esta planta, primero de alcaloides y, después, de esteroides, no obtuvimos resultados satisfactorios: no se logró aislar ningún constituyente químico puro.

El cactus "Pishcol Negro" se colectó en la localidad de Shantaco, a 3000 msnm (Prov. Huancabamba-Dpto. Piura) y los ensayos iniciales indicaron la presencia de alcaloides. Sin embargo, luego de la extracción del Extracto Bruto Orgánico se obtuvieron resultados negativos, lo cual – además- contradecía la información etnobotánica de que dicho cactus se utilizó en épocas pasadas en la preparación de bebidas reemplazando al cactus San Pedro (*Echinopsis pachanoi*), el cual contiene el alcaloide mescalina.

Como se contaba con muestra vegetal, se decidió continuar con el estudio de esteroides, al haberse obtenido resultados positivos de la presencia de β -sitosterol, mediante cromatografía de capa fina.

A partir de 340g de cactus "Pishcol Negro" seco y molido se obtuvo por extracción con solventes de baja polaridad, un extracto bruto orgánico, cuya purificación mediante cromatografía en columna proporcionó una pequeña fracción (20mg) del producto deseado, que resultó ser una mezcla de esteroides.

* Número de Registro de Tesis 99 en la Facultad de Ciencias-UNI, de fecha 12. Set.96

Así, a pesar de proporcionar una sola mancha por CCF* frente al patrón β -sitosterol, el análisis de dicho producto mediante RMN¹H y RMN¹³C que realizó el Dr. V. Reyna P. durante su breve estadía en el ICSN-CNRS de Gif-Sur Yvette ** (setiembre del 2000), confirmó que se trataba de una mezcla de esteroides.

Se intentó la purificación de esta mezcla de esteroides a través de la síntesis de sus derivados acetilados (mediante reacción con ácido acético en presencia de piridina) y la subsiguiente separación de la mezcla por cromatografía en columna. Sin embargo, la pequeña cantidad de producto purificado (β -sitosterol acetilado), menos de 10 mg, hicieron muy difícil realizar su identificación, motivo por el cual se decidió interrumpir esta investigación.

El segundo tema de tesis trató del “Estudio Químico del cactus Gigantón (*Echinopsis tarmaensis*)”***, cactus que fué colectado en la provincia de Tarma (Dpto. Junín) y que por su semejanza físicas con el cactus San Pedro (*E. pachanoi*) y las pruebas preliminares de presencia de alcaloides nos condujeron a su estudio.

El trabajo de laboratorio realizado, desde Set`2000 a Dic`2001, el cual comprendió la obtención del Extracto Bruto de Alcaloides (EBA) en nueve oportunidades y la purificación del EBA por cromatografía en columna en siete ocasiones, lográndose aislar un sólido blanco de apariencia cristalina, que se presentaba como una sustancia pura por cromatografía en capa fina, pero, que finalmente, quedó demostrado mediante CG-EM* realizado en el exterior (colaboración de la M. Sc. Ingrid Collantes) que se trataba de una mezcla compleja de compuestos.

* CCF: Cromatografía en capa fina, CG-EM: Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas.

** Institut de Chimie des Substances Naturelles del Centre 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).

*** Número de Registro de Tesis 165 en la Facultad de Ciencias-UNI, de fecha 28.Feb.02.

En razón de lo inesperado de estos resultados, éstos fueron puestos en conocimiento de otras compañeras que actualmente están realizando su Doctorado en el exterior, quienes estuvieron en Lima entre los meses de diciembre del 2001 y enero del 2002. El análisis químico que realizaron con estos extractos confirmó la complejidad de la muestra estudiada, y la dificultad de aislar uno de los compuestos puros en cantidad suficiente (40mg) para realizar los análisis que permitiera su identificación (análisis centesimal de elementos, RMN¹H, RMN¹³C y espectro de masas).

Finalmente, decidimos comenzar un nuevo tema de tesis. Para ello se eligió las semillas de toe (*Brugmansia sanguinea*), material que había colectado nuestro Grupo de Investigación en los viajes a la provincia de Huancabamba (Dpto. Piura).

El trabajo experimental del “Estudio Químico de las semillas del toe (*Brugmansia sanguinea*)”*, nombre con que fué registrado esta tesis, se comenzó en el mes del enero del 2003, obteniéndose como resultado de esta investigación, el aislamiento del principal alcaloide: la escopolamina.

Consideramos importante indicar que las etapas experimentales de laboratorio químico, desde el secado de la planta hasta la obtención del extracto de alcaloides, se realizaron en el ambiente de Investigación de Química de Productos Naturales (C3-175) del Laboratorio N° 12 de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Ingeniería, en el período comprendido entre enero y diciembre del 2003, demandando un tiempo aproximado de 5 meses de trabajo efectivo (considerando el trabajo de 8 horas/día, durante 5 días/semana).

La purificación final de la escopolamina mediante cromatografía en columna y cromatografía en placa preparativa, y su identificación mediante espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno, RMN¹H de Carbono, RMN¹³C y ¹H-¹H COSY en CDCl₃ fue realizado por

* Número de Registro de Tesis 211 en la Facultad de Ciencias-UNI, de fecha 5. Feb. 03.

la autora de esta tesis, durante la breve estadía en el Laboratorio de Productos Naturales del Instituto de Química de la Universidad de São Paulo (Brasil), que se realizó del 18 agosto al 14 de setiembre del 2003, bajo la asesoría de la M.Sc. Ingrit Collantes Díaz.

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

TRABAJO PRELIMINAR

A. COLECCIÓN DE LA PLANTA

Las semillas del toe se colectaron en el centro poblado de Salalá (3000 msnm), ubicado en el distrito de El Carmen de La Frontera, en la provincia de Huancabamba (Dpto. de Piura), el 28 de agosto del 2002, durante el viaje que realizaron los integrantes del grupo de Investigación de Química de Productos Naturales, bajo la dirección del Dr. Victor Reyna Pinedo.

Brugmansia sanguinea (toe) crece en diversas zonas de la provincia de Huancabamba. El poblado de Salalá se encuentra ubicado en la región de Las Huarinas (3000-4000 msnm), que es una zona serrano-selvática de clima frío, en donde se ubican importantes lagunas utilizadas por los curanderos del norte peruano para sus tratamientos etnomedicinales.

B. USO DEL TOE (*BRUGMANSIA SANGUINEA*) EN MEDICINA TRADICIONAL

En nuestro país existen y se utilizan varias plantas con constituyentes psicoactivos. Las más conocidas son la coca (*Erithroxylum sp.*); el binomio "ayahuasca" (*Banisteriopsis caapi*) y "chacrana" (*Psychotria viridis*), utilizadas en la preparación de la bebida "ayahuasca" en toda la amazonía; y el "San Pedro" (*Echinopsis pachanoi*), utilizadas por los curanderos del norte del Perú.

El uso de plantas del género *Brugmansia* está menos difundido, en particular en sus efectos psicoactivos, estando su uso restringido a algunas partes de la amazonía y en la costa –sierra norte del Perú (Lambayeque y Piura), pero con especies diferentes para cada región: *B. arborea*, *B. aurea* y *B. sanguinea* en las alturas andinas; *B.*

suaveolens y *B. versicolor* en las quebradas y valles de la costa; *B. candida* y *B. insignis*, en la amazonía (Cabieses-1993).

En el norte peruano *Brugmansia* se conoce como “mishas”. Así, *Brugmansia sanguinea* es la “misha toro”, también conocida como toe.

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

En los puestos de plantas medicinales del mercado Modelo de la ciudad de Chiclayo se venden atados de flores y hojas de toe (*B. sanguinea*), y se indica que se utilizan para hacer <limpias> y colocar luego en forma de emplasto (prescripción de los especialistas tradicionales (curanderos)). Esta información nos ha sido proporcionado también en la provincia de Huancabamba. Es decir, el uso del toe se da en aplicación externa y sin fines psicoactivos (comunicación personal con el Dr. Victor Reyna P.).

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

C. DETERMINACIÓN (IDENTIFICACIÓN) BOTÁNICA

La muestra de toe de donde se obtuvieron las semillas (Fotos N°1 y Foto N°2), fué identificada por la bióloga Joaquina Albán Castillo* (Ago'02) (ver Anexo N°4 y certificado adjunto).

D. ESTUDIO BIBLIOGRÁFICO

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

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

Asimismo, en Dic.'03 el Dr. Christian Marazano, Director de Investigaciones del ICSN-CNRS*** de Gif Sur Yvette, nos envió la revisión del Chemical Abstracts del Género *Brugmansia* desde el año 1992 al 2003, la cual contenía 31 títulos de referencias, todas ellas sin interés para nuestro trabajo de tesis.

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

** Actualmente esta estudiando el doctorado en la Universidad de São Paulo (São Paulo-Brasil).

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



Foto N°1.- Semillas del toe (*B. sanguinea* (R. & P.) D. Don): (Loc. Salalá, Prov. Huancabamba, Dpto. Piura, Ago'02) (Foto V. Reyna)



Foto N°2.- Semillas del toe (*B. sanguinea* (R. & P.) D. Don): de diferentes edades (Loc. Salalá, Prov. de Huancabamba, Dpto. Piura Ago'02) (Foto V. Reyna)

TRABAJO EXPERIMENTAL

E. SECADO Y MOLIENDA DE LA PLANTA

Las semillas del toe se separaron del fruto y se secaron en una estufa “Labor” (Hungria) a 40 °C, disponiéndose al inicio de nuestro trabajo (Ene’ 2003) de suficiente material seco.

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

F. ANÁLISIS CUALITATIVO – MARCHA FITOQUÍMICA

1. **Muestra:** 5 g de semillas del toe (*B. sanguinea*). Se realizaron dos análisis, con resultados similares:
 - i Primer análisis: 30. Jun – 04. Jul’03.
 - ii Segundo análisis: 06 - 13. Oct’03.
2. **Procedimiento:** Reyna (1999-b), de acuerdo a Rondina & Coussio (1969) (ver Anexo N° 2).
3. **Resultados** (ver Anexo N°5)

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

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

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

b) No contiene: Flavonoides, saponinas, quinonas y leucoantocianidinas

G. DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE ALCALOIDES

1. **Muestra:** 10 g de semillas del toe (*B. sanguinea*). Se realizó dos análisis de la misma muestra:

- i Primer análisis: 24. Feb – 27. Jun'03.
- ii Segundo análisis: 24. Feb – 08. Jul'03.

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

Observación.- Las etapas (a) y (b), extracción sólido – líquido y separación líquido – líquido, respectivamente, son similares a aquellas correspondientes a la Sec.III.H. (Aislamiento de la escopolamina, ver pág. 58 - 64), por lo que en esta sección se resumirán ambas etapas.

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

- i **Alcalinización** con amoníaco concentrado $\text{NH}_{3(\text{ac})}$ 15N.
10 gramos de la muestra seca, se colocó en un cartucho de tocuyo, y se humedeció con 10 mL de amoníaco concentrado $\text{NH}_{3(\text{ac})}$ 15N y 60 mL de etanol- éter etílico (1:2) durante 15 horas.
- ii **Extracción por solventes** (Obtención del Extracto Bruto Orgánico)
 - A la muestra alcalinizada (que se encontraba dentro del cartucho y colocada en el equipo soxhlet) se adicionó 150 mL de éter etílico y se extrajo en soxhlet durante 9 horas por día, durante 7 días.
 - La mezcla orgánica se concentró en el rotavapor (30°C, 200 PSI), hasta que no destile más solvente, hasta llegar a sequedad, obteniéndose así el Extracto Bruto Orgánico (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 solvente orgánico.
 - El extracto bruto orgánico se disolvió con 50 mL de cloroformo-éter etílico (1:1).
 - El extracto orgánico se extrajo con 50 mL de disolución de ácido sulfúrico $\text{H}_2\text{SO}_4_{(\text{ac})}$ 0,5 N.
 - Esta operación se repitió tres veces más, hasta que el solvente orgánico dió prueba negativa de alcaloides mediante el Test de Mayer.
- ii Alcalinización del extracto acuoso con disolución de amoníaco.

El extracto acuoso ácido se alcalinizó con 25 mL de una disolución de amoníaco $\text{NH}_3_{(\text{ac})}$ 7,5N. La disolución final presenta un pH 11.
- iii Extracción de alcaloides con solventes orgánicos (Obtención del Extracto Bruto de Alcaloides).
 - El extracto acuoso se extrajo con 50 mL de cloroformo-éter etílico (1:1) en un embudo de separación de 250 mL.
 - Esta operación se realizó un total de 4 veces (hasta que la solución acuosa dé Test de Mayer negativo). Se eliminó la fase acuosa libre de alcaloides.
 - Los extractos orgánicos se secaron con sulfato de sodio anhidro y, previa filtración se colocó en un balón de 500 mL y se concentró en el rotavapor (30° C, 200-100 PSI) hasta sequedad.

c) Eliminación de las bases volátiles

- i El sólido obtenido se disolvió en 50 mL de cloroformo y se llevó a concentrar al rotavapor, para eliminar el solvente. Se repitió esta operación un total de 4 veces. Esto tiene por objeto la eliminación total de la base amoníaco $\text{NH}_3_{(\text{g})}$.

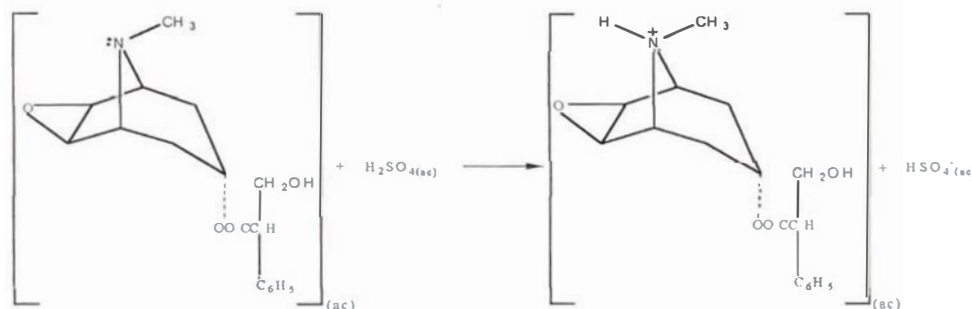
- ii Finalmente, se llevó a sequedad en el rotavapor, obteniéndose el Extracto Bruto de Alcaloides (EBA) (no se pesó).

d) Titulación. Determinación potenciométrica

- i El extracto bruto de alcaloides se disolvió con 30 mL de cloroformo y se agregó con una pipeta volumétrica 20 mL de solución estandarizada de ácido sulfúrico $H_2SO_{4(ac)}$ 0,0202N. El solvente orgánico se eliminó en el rotavapor quedando una solución acuosa ácida conteniendo alcaloides en forma de sales.
- ii Se tituló la solución ácida con una solución estandarizada de hidróxido de sodio $NaOH_{(ac)}$ 0,0173N, utilizando un potenciómetro* con electrodo de vidrio para determinar el punto de equivalencia. El análisis de la curva de titulación (ver Anexo N°6) muestra que el punto de equivalencia corresponde a la adición de 16,48 mL de base, $NaOH_{(ac)}$.

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

- i Al agregar un exceso de solución de ácido sulfúrico $H_2SO_{4(ac)}$ (20 mL, 0,0202 N) al Extracto Bruto de Alcaloides, ocurre la reacción:



* Equipo pH meter ORION 120 A (Laboratorio N° 33 de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Ingeniería).

y se tiene que:

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

$$\text{donde } N^{\circ} \text{ meq ácido total} = N \times V = 0,0202 \times 20 = 0,4040 \text{ meq} \quad (\beta)$$

- ii El ácido sulfúrico $\text{H}_2\text{SO}_{4(\text{ac})}$ sobrante, que queda sin reaccionar con el alcaloide, se titula con 16,48 mL de solución de hidróxido de sodio $\text{NaOH}_{(\text{ac})}$ 0,0173 N, según la ecuación:



y en el punto de equivalencia se cumple que:

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

- iii La cantidad (meq) de hidróxido de sodio ($N=0,0173$ y $V=16,48\text{mL}$) se determina por la relación: $N^{\circ} \text{ meq} = N \times V \text{ (mL)}$

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

$$N^{\circ} \text{ meq}_{(\text{NaOH})} = 0,0173 \text{ N} \times 16,48 \text{ mL}$$

$$N^{\circ} \text{ meq}_{(\text{NaOH})} = 0,2851 \text{ meq}$$

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

$$N^{\circ} \text{ meq ácido (sobrante)} = 0,2851 \text{ meq} \quad (\theta)$$

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

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

$$= 0,4040 \text{ meq} - 0,2851 \text{ meq}$$

$$= 0,1189 \text{ meq}$$

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

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

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

Luego:

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

$$m = (0,1189) (303,36)$$

m = 36,07 mg de escopolamina (en 10 g de muestra seca)

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

$$\begin{array}{l} 10 \text{ g} \longrightarrow 100\% \\ 36 \times 10^{-3} \text{ g} \longrightarrow \text{porcentaje de alcaloides (como escopolamina)} \end{array}$$

$$\text{Porcentaje de alcaloides (como escopolamina)} = \frac{0,036 \text{ g} \times 100\%}{10 \text{ g}} = 0,36\%$$

Observación.- En nuestro segundo análisis obtuvimos este mismo resultado (0,36 %) (ver Anexo N°7).

H. AISLAMIENTO DE LA ESCOPOLAMINA (Ene'03 – Set'03)

1. **Muestra:** Semillas de toe (*B. sanguinea*). Se realizaron dos ensayos:

- i Primer ensayo: 15. Ene – 13. Mar'03 (150 g de muestra)
- ii Segundo ensayo: 16. Ene – 14. Set'03 (150 g de muestra)

2. **Procedimiento:** (Aplicado al segundo ensayo)

a) **Extracción sólido-líquido: Obtención del Extracto Bruto Orgánico**
(16.Ene - 10.Abr'03)

i Desengrase con n-hexano

- En un frasco erlenmeyer de 1 L se colocó 150 g de la muestra y se adicionó 400 mL de n-hexano. La mezcla se puso en agitación*, a temperatura ambiente, durante cuatro horas, y luego se dejó en reposo hasta el día siguiente (20h).
- Se separó el líquido sobrenadante amarillo, con una pipeta de 50 mL. Al sólido restante se adicionó una nueva porción de 400 mL de n-hexano se agitó. Este procedimiento se realizó un total de 25 veces.
- Finalmente el sólido húmedo se transfirió a una fuente de vidrio, y se dejó que evapore el solvente a temperatura ambiente.

ii Alcalinización con solución de amoníaco concentrado

- La muestra seca y desengrasada se colocó en un cartucho de tocuyo, se cerró, y se introdujo en el cuerpo central del equipo soxhlet. Luego se añadió sobre el cartucho, con ayuda de una pipeta, 90 mL de amoníaco concentrado $\text{NH}_{3(\text{ac})}$ 15N, humedeciendo completamente toda la muestra, y se dejó en reposo por una hora.

iii Extracción con solventes

- Maceración con etanol-éter etílico (1:2)

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

Sobre la muestra alcalinizada se adicionó 300mL de etanol- éter etílico (1:2) y se dejó macerar durante dos días. La solución adquirió un color pardo claro.

- Extracción con equipo soxhlet

En el balón de destilación se adicionó 1 L de etanol- éter etílico (1:2), y sobre el cuerpo central del equipo soxhlet, se agregó 500 mL más de éter etílico. Se colocó a reflujo 10h por día durante 9 días, hasta que el solvente en el cuerpo central del Soxhlet dio Test de Mayer negativo.

iv Eliminación del solvente

- El extracto orgánico se concentró en el rotavapor (30° - 35°C, 200 PSI) hasta tener aproximadamente 5 mL (no se llevó a sequedad).

b) Separación líquido – líquido: Obtención del Extracto Bruto de Alcaloides (10. Abr-12. Abr'03)

v Disolución del extracto bruto orgánico con solución ácida

- El extracto orgánico se disolvió con 10 mL de solución de ácido sulfúrico H_2SO_4 (ac) 0,5N. Seguidamente la disolución acuosa ácida se filtró a través de papel de filtro “lento” recibiendo directamente en un embudo de decantación de 1L.
- Esta operación se repitió diecisiete veces más hasta prueba negativa de alcaloides (Test de Mayer) del solvente orgánico.

vi Alcalinización del extracto con amoníaco concentrado $NH_{3(ac)}$ 15N

La disolución acuosa ácida se alcalinizó con 100 mL de $NH_{3(ac)}$ 15 N hasta pH 11. Se observó el oscurecimiento de la disolución.

vii Extracción de alcaloides con solventes orgánicos

- La fase acuosa básica (en el embudo de separación) se extrajo con 100 mL de cloroformo-éter etílico (1:1).

- Esta extracción se repitió cinco veces más, hasta que la fase acuosa esté exenta de alcaloides (Test de Mayer negativo).
- Los extractos orgánicos se secaron con sulfato de sodio anhidro y, previa filtración, se colocaron en un balón de 1 L, el cual se dispuso en el rotavapor (30° C, 200-100 PSI) y se evaporó los solventes hasta sequedad, obteniéndose el Extracto Bruto de Alcaloides (EBA), como un sólido de aspecto resinoso, de color marrón oscuro (594,8mg).

c) Purificación por cromatografía (18. Ago – 14. Set'03)

Los procedimientos cromatográficos que se realizaron para la purificación de la escopolamina del extracto bruto de alcaloides fueron:

- i Análisis preliminar: Cromatografía de capa fina-CCF (ver Sec. d).
- ii Cromatografía en columna-CC (ver Sec. e).
- iii Cromatografía en placa preparativa-CPP (ver Sec. f).

Esta etapa del trabajo la realicé durante la estadía de investigación en el Laboratorio de Química de Productos Naturales del Instituto de Química de la Universidad de São Paulo-Brasil, bajo la asesoría de la M. Sc. Ingrit Collantes D., del 18 de agosto al 14 de setiembre del 2003.

d) Análisis preliminar por cromatografía en capa fina – CCF

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

- i Muestra: Extracto Bruto de Alcaloide (EBA), obtenida en la Sec.b precedente.
- ii Referencia : no se dispuso de patrón de escopolamina.
- iii Placa: Placa de aluminio Kieselgel 60F-254, 0,2mm

- iv Eluente: Cloroformo, 1% metanol en CHCl_3 , 5% metanol en CHCl_3 , 10% de metanol en CHCl_3 , 15% de acetona en CHCl_3 , cloroformo-acetona (10:3) saturada con NH_3 15M*.
- 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.
- v Revelador: Reactivo de Dragendorff
- vi Observaciones: el resultado de la realización de este trabajo preliminar nos indica que aparentemente presenta un alcaloide mayoritario y que tiene un comportamiento polar (ver Anexo N°8), lo cual nos ayudó para la realización de la columna cromatográfica (ver Sec. e).

e) Cromatografía en columna-CC

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

- i Muestra: EBA.2 (552 mg)*, obtenida en la Sec. H. a y b (pág. 59-61).
- ii Características de la columna: $\phi_i=35\text{mm}$, $h=19\text{cm}$; altura de la alúmina = 5,5cm.
- iii Adsorbente : Oxido de Aluminio (Alúmina)
- iv Procedimiento

En una cápsula de porcelana se depositó 1,2g de sílica gel 60 para columna cromatográfica y sobre ella se adicionó la muestra de

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

* El peso de este EBA.2 era de 594,8mg. En São Paulo (Brasil) este mismo EBA pesaba 552mg.

alcaloides redisuelta con la mínima cantidad de cloruro de metileno y metanol, de manera de preparar una mezcla uniforme (papilla).

Una vez preparada la papilla se procedió a secar a vacío en un desecador durante 6 horas.

En la columna se agregó la alúmina en polvo y luego se adicionó lentamente cloroformo hasta cubrir el empaque.

La papilla se trasvasó sobre la parte superior del empaque de alúmina (en la columna) que contenía un poco de cloroformo (0,2cm de altura). Finalmente se colocó una capa de algodón, para proteger la capa de muestra.

Se agregó cuidadosamente cloroformo sobre el empaque y se eluyó la columna hasta recibir 200 mL de eluente en un balón de 250 mL (fracción N°1).

Se modificó el eluente y se agregó 1% de metanol en CHCl_3 , recibiendo 200 mL de elución en un balón de 250mL(fracción N°2).

Se continuó la elusión, esta vez con 5% de metanol en CHCl_3 , recibiendo 250 mL de elución en un balón de 500 mL(fracciónN°3).

Se aumentó la polaridad del eluente a 10% de metanol en CHCl_3 , recibiendo 250 mL en un balón de 500 mL (fracción N°4).

Se continuó la elusión con 25% de metanol en CHCl_3 , recibéndose 250 mL en un balón de 500 mL (fracción N° 5).

Se agregó el eluente 50% de metanol en CHCl_3 , recibéndose 250 mL en un balón de 500 mL (fracción N°6).

Finalmente se terminó la elusión con 300 mL de metanol, el cual se recibió en un balón de 500 mL (fracción N° 7).

Todas las soluciones presentaban color amarillo de diferentes tonalidades, y fueron llevadas a sequedad en el rotavapor (25-30°C, 100PSI).

v Resultados:

Se obtuvieron 7 fracciones, los cuales contenían sustancias de color amarillo de aspecto resinoso. Sus pesos correspondientes fueron:

Fracción N°1 : 28,08 mg	Fracción N°5 : 11,75 mg
Fracción N°2 : 220,00 mg	Fracción N°6 : 5,9 mg
Fracción N°3 : 251,59 mg	Fracción N°7 : 4,22 mg
Fracción N°4 : 25,90 mg	

La cromatografía en capa fina (CCF) de estas fracciones nos indicó la presencia de alcaloides en las fracciones N°2, N°3 y N°4 (Anexo N°9), debido a que revelaban positivo frente al reactivo de Dragendorff.

f) Cromatografía en placa preparativa-CPP

- i Muestra: Fracción N° 2 (220 mg)
- ii Adsorbente: Placas de Sílica Gel Kieselgel 60F-254*, 1mm de espesor de capa (20x20cm²) (permiten trabajar con 20mg de muestra).
- iii Eluyente: Cloroformo: Acetona (10:3), saturada con NH₃ 15N.
- iv Revelador: Reactivo de Dragendorff.
- v Procedimiento : La aplicación de las muestras, la triple elusión** cromatográfica, la identificación de la porción de la placa que contiene el compuesto de interés y la recuperación a partir de las placas son procedimientos descritos en los textos y guías de prácticas de química orgánica.

Como la cantidad total de muestra por placa no debe exceder de 20 mg por placa, se sembró la muestra en 11 placas.

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

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

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

Luego de las tres eluciones cromatográficas, se cubrió la mayor parte de la placa con un vidrio, dejando libre unos 2 cm del extremo izquierdo, y se reveló dicha porción con reactivo de Dragendorff. La aparición de la mancha de color anaranjado nos indicó la zona donde se encontraba el alcaloide.

En seguida, con ayuda de la espátula se recogió el adsorbente comprendido en la porción delimitada, recibiendo el sólido en un frasco Erlenmeyer de 250 mL.

Al frasco Erlenmeyer que contenía el adsorbente con el alcaloide se adicionó cloroformo y se dejó reposar por 14 horas. Luego se filtró a través de un embudo de vidrio fritado (para evitar que partículas pasen a la solución), obteniéndose así una fracción a la cual denominamos fracción N°1 (fracción clorofórmica) (peso: 3mg).

Inmediatamente, se hizo pasar, a través del adsorbente, metanol, obteniéndose un líquido resinoso de color amarillo, después de la evaporación del solvente, a la cual denominamos fracción N°2 (fracción metanólica) (peso: 195mg).

- En ambos casos se eliminó el solvente por evaporación en el rotavapor.
- vi Análisis de las fracciones mediante CCF y su espectro de RMN¹³C:
Por cromatografía en capa fina se determinó que el alcaloide se encontraba en la fracción N°2 (fracción metanólica) (Anexo N°10).
Por espectroscopía de RMN¹³C se verificó la presencia de la escopolamina en la fracción N° 2.

vii Conclusión: A partir de 150g de muestra seca de semillas del toe (*Brugmansia sanguinea*), se ha podido aislar el principal alcaloide, escopolamina (peso aproximado = 195 mg).

I. IDENTIFICACION ESPECTROSCÓPICA DE LA ESCOPOLAMINA

La determinación estructural de la escopolamina obtenida de las semillas de toe (*B. sanguinea*) se realizó mediante el análisis de sus espectros* de Masas, de RMN¹H, de RMN¹³C y ¹H-¹H COSY.

La muestra analizada fué el líquido resinoso de color amarillo tenue (escopolamina) y los espectros fueron obtenidos durante la estadía que realicé, en el Instituto de Química de la Universidad de São Paulo (Brasil).

1. Espectro de masas (Espectro N°1)

a. Condiciones de trabajo

- i Equipo: Cromatógrafo de Gas acoplado a Masas (CG-MS) AGIELNT Serie 6890; Columna: HP5 30mx0,25mm Ø; Gas: Helio (1mL/min).
- ii Laboratorio: Laboratorio de Fitoquímica - Instituto Botánico de São Paulo-Brasil)**.
- iii Operador: Dr. Paulo Moreno.
- iv Fecha: 01.Set.03.
- v Cantidad de muestra: 3µL (1mg de muestra x 1mL acetona)

b. Características del espectro

m/z 303 (ión molecular M⁺ 154 (35,63%), 138 (79,98%), 94 (pico base, 100%).

* Los espectros fueron obtenidos durante la estadía que realizó la autora de esta Tesis, en el Instituto de Química de la Universidad de São Paulo (Brasil).

** El espectro de masa no se pudo obtener en el tiempo de mi estadía en Brasil. fué enviada posteriormente.

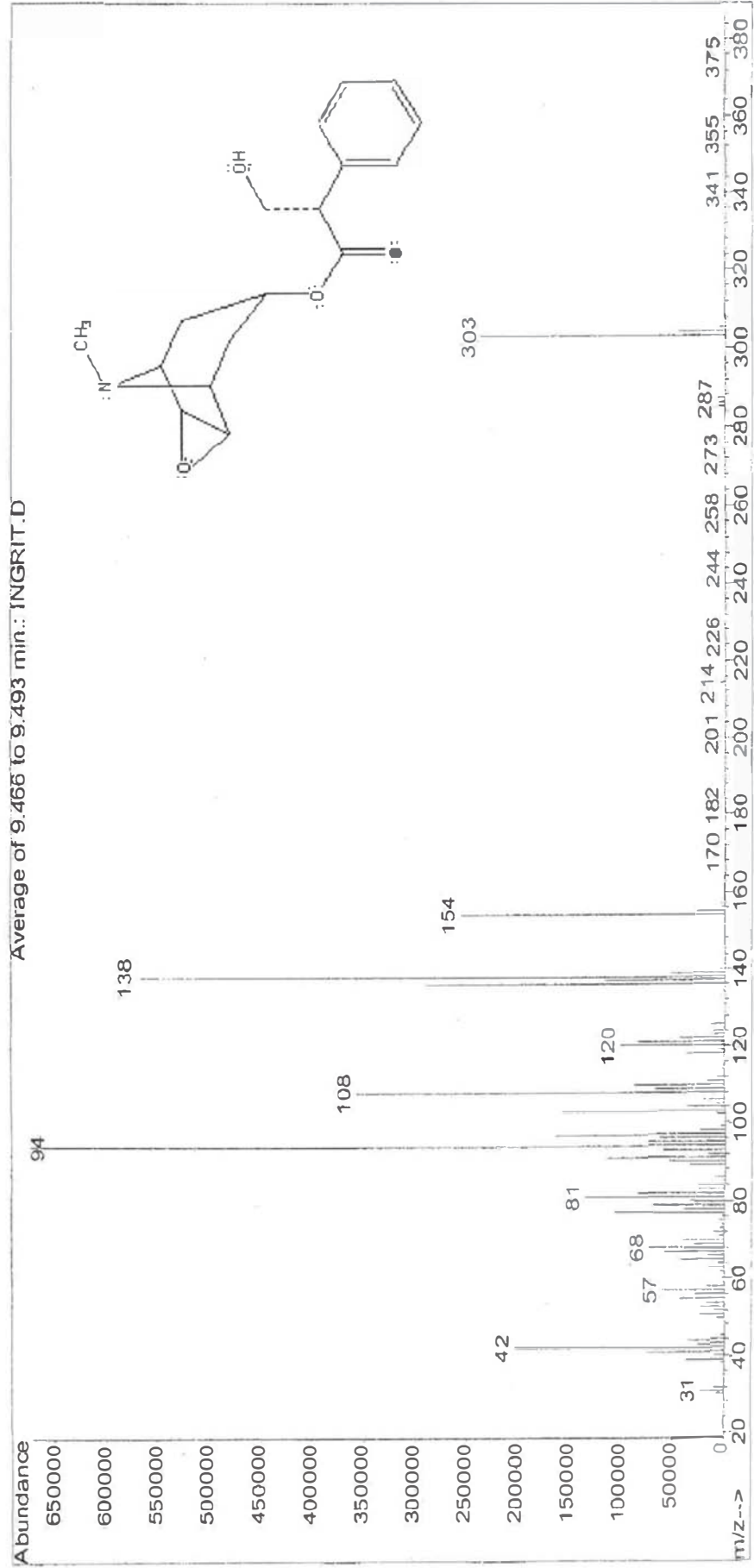
c. Análisis del espectro

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

El espectro de masas de la escopolamina obtenida a partir de las semillas de toe (*Brugmansia sanguinea*) es similar al espectro registrado por Vitale et al. (1995), ver Sec. I.A.4.a.i (pág. 15).

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

File : C:\MSDCHEM\1\DATA\INGRIT.D
 Operator : Paulo
 Acquired : 1 Oct 2003 11:20 using AcqMethod ALKELV A
 Instrument : Instrumenten
 Sample Name: escopolamina
 Misc Info :
 Vial Number: 1



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

2. Espectro de RMN¹H (Espectro N°2)

a. Condiciones de trabajo

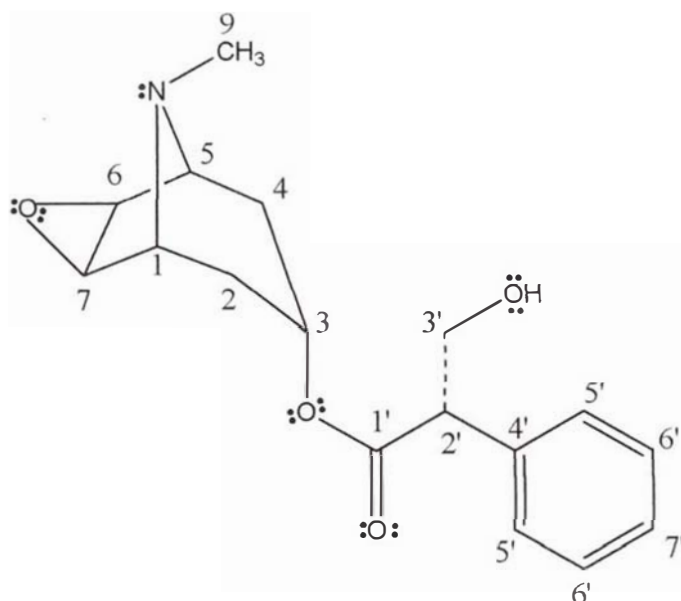
- i Equipo: Varian DPX-300 (300 MHz)
- ii Laboratorio: Productos Naturales – Instituto de Química (Universidad de São Paulo-Brasil).
- iii Operador: M. Sc. Ingrit Collantes Díaz
- iv Fecha: 13. Set.03
- v Solvente: CDCl₃
- vi Peso: 120 mg

b. Características del espectro

1,32 ppm (d, 1H ciclo tropánico), 1,56 ppm (d, 1H ciclo tropánico), 1,93 ppm al 2,13ppm (m, 2H ciclo tropánico), 2,42ppm (s, CH₃), 2,76 (m, 1H ciclo tropánico), 2,97 ppm (s, 1H ciclo tropánico), 3,10 ppm (s, 1H ciclo tropánico), 3,38ppm (m, 1H ciclo tropánico), 3,69 al 3,78 ppm (m, 2H: CH, CH₂), 4,12 ppm (m, 1H: CH₂), 4,96 (m, 1H ciclo tropánico), 7,19 al 7,33 ppm (m, 5H aromático)

c. Análisis del espectro (Desplazamientos químicos)

La identificación de los diferentes tipos de hidrógenos correspondientes se han descrito precedentemente (Sec. II.A.4.b).



δ (ppm)	Tipo de Señal	Integración	Tipo de Hidrógeno
1,32	Doblete	1H	Heq (posición 2)
1,56	Doblete	1H	Heq (posición 4)
1,92-2,13	Multiplete	2H	Hax (posición 2, 4)
2,42	Singulete	3H	-NCH ₃ H
2,76	Multiplete	1H	H (posición 7)
2,97	Singulete	1H	H (posición 1)
3,10	Singulete	1H	H (posición 5)
3,38	Multiplete	1H	H (posición 6)
3,69- 3,78	Multiplete	2H	H (posición 2', 3')
4,12	Multiplete	1H	H (posición 3')
4,96	Multiplete	1H	H (posición 3)
7,19-7,33	Multiplete	5H	H-Ar

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

6500

Pulse Sequence: s2pul

Solvent: CDCl3

Ambient temperature

INOVA-300 "Inova1"

Relax. delay 1.000 sec

Pulse 45.0 degrees

Acq. time 4.056 sec

Width 4000.0 Hz

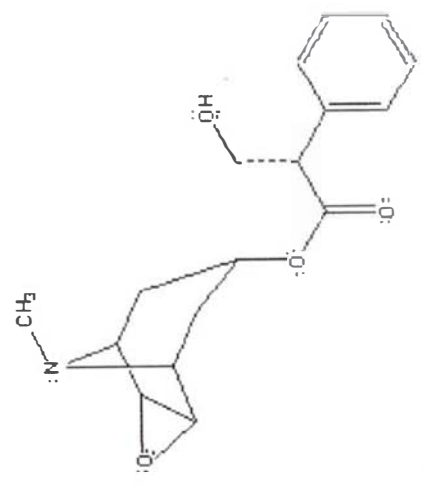
4 repetitions

OBSERVE F1, 299.9169462 MHz

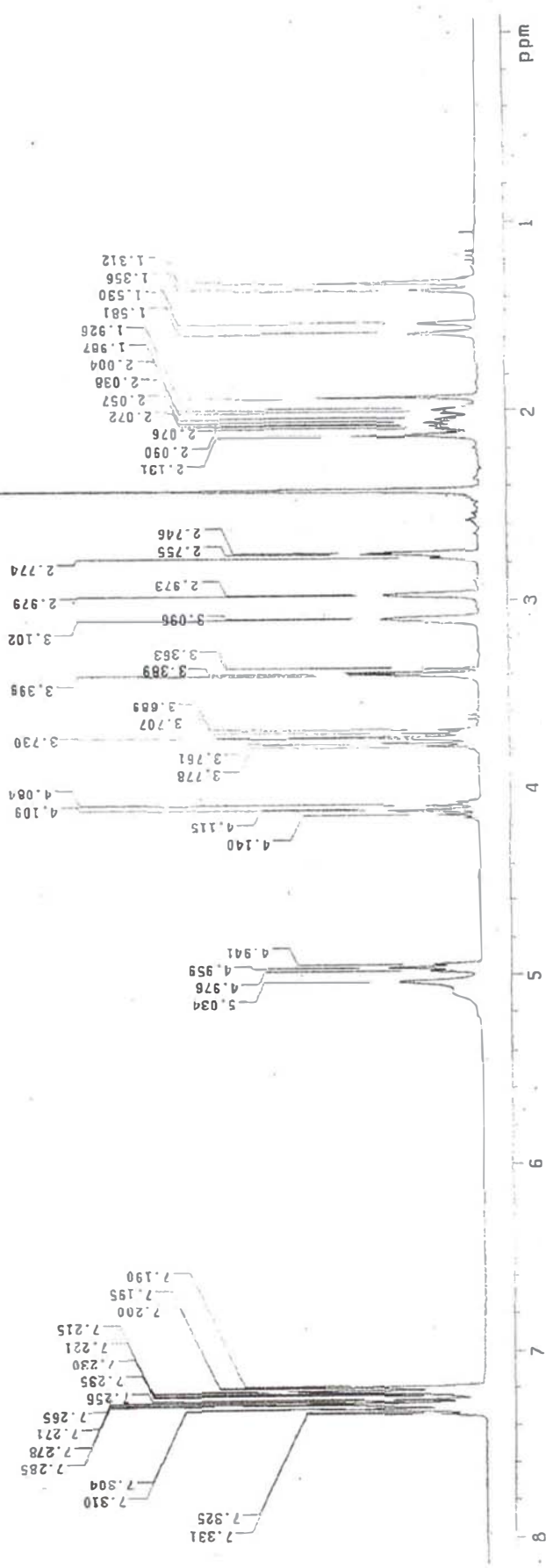
DATA PROCESSING

FT size 32768

Total time 0 min, 20 sec



2 420



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

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

a. Condiciones de trabajo

- i Equipo: Varian DPX-300 (300 MHz)
- ii Laboratorio: Productos Naturales – Instituto de Química (Universidad de São Paulo-Brasil).
- iii Operador: M. Sc. Ingrit Collantes Díaz
- iv Fecha: 13.Set.03
- v Solvente: CDCl₃
- vi Peso: 120 mg

Observación: Los espectros N°3 y N°4 fueron registrados a continuación del espectro de RMN¹H.

b. Características del espectro DEPT 90 (Espectro N° 3)

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

Carbonos terciarios (CH)

(C _{2'}): 54,2 ppm	(C ₅): 57,4 ppm	(C _{7'}): 127,6 ppm
(C ₆): 55,5 ppm	(C ₁): 57,5 ppm	(C _{5'}): 127,8 ppm
(C ₇): 56,0 ppm	(C ₃): 66,3 ppm	(C _{6'}): 128,7 ppm

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

Señales hacia arriba (10):

Carbonos primarios(CH ₃):	(C ₉): 41,5 ppm	
Carbonos terciarios(CH):	(C _{2'}): 54,2 ppm	(C ₃): 66,3 ppm
	(C ₆): 55,5 ppm	(C _{7'}): 127,6 ppm
	(C ₇): 56,0 ppm	(C _{5'}): 127,8 ppm
	(C ₅): 57,4 ppm	(C _{6'}): 128,7 ppm
	(C ₁): 57,5 ppm	

- ii Señales hacia abajo (3): carbonos secundarios (CH₂): (C₂): 30,3 ppm
 (C₄): 30,1 ppm
 (C₃): 63,5 ppm

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

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

En este tipo de espectro aparecen todos los carbonos:

30,1 ppm (CH₂); 30,3 ppm (CH₂); 41,5 ppm (CH₃); 54,2 ppm (CH);
 55,5 (CH); 56,0 (CH); 57,4 (CH); 57,5 (CH); 66,3 (CH); 63,5 (CH₂);
 127,6 (C – aromático); 127,8 ppm (C – aromático); 128,7 ppm (C –
 aromático); 135,6 ppm (C – aromático); 171,5 ppm (C – carbonilo).

e. Análisis del espectro DEPT-90 y espectro DEPT-135

En el espectro N° 3 (DEPT – 135) observamos 13 señales de átomos de carbonos, de los cuales 1 señal corresponde a un átomo de carbono primario, que pertenecería al átomo de carbono del grupo metilo; 3 señales corresponden a átomos de carbonos secundario, que pertenecen a átomos de carbono del anillo tropánico; y las 9 señales restantes corresponden a átomos de carbonos terciarios, pertenecientes a átomos de carbono del anillo tropánico y del anillo aromático (ver Figura N°7).

f. Análisis del espectro de Desacoplamiento de ¹H de banda ancha

En el espectro N° 4 (Desacoplamiento de ¹H de banda ancha) se localizan 2 señales registrados a δ 135,6 y 171,5 ppm, que corresponden a los dos átomos de carbonos cuaternarios de la molécula de escopolamina.

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

N° de carbono	Tipo de carbono	δ (ppm)	N° de carbono	Tipo de carbono	δ (ppm)
1	CH (terciario)	57,1	1'	C (CO)	171,5
2	CH ₂ (secundario)	30,3	2'	CH (terciario)	54,2
3	CH (terciario)	66,3	3'	CH ₂ (OH)	63,5
4	CH ₂ (secundario)	30,1	4'	C (aromático)	135,6
5	CH (terciario)	57,4	5'	CH (aromático)	128,7
6	CH (terciario)	55,5	6'	CH (aromático)	127,8
7	CH(terciario)	56,0	7'	CH (aromático)	127,6
9	C (primario)	41,5			

g. Conclusión.- El espectro RMN¹³C – DEPT: DEPT – 90, DEPT – 135 y Desacoplamiento de ¹H de banda ancha presentado corresponde a lo esperado para la estructura de la escopolamina.

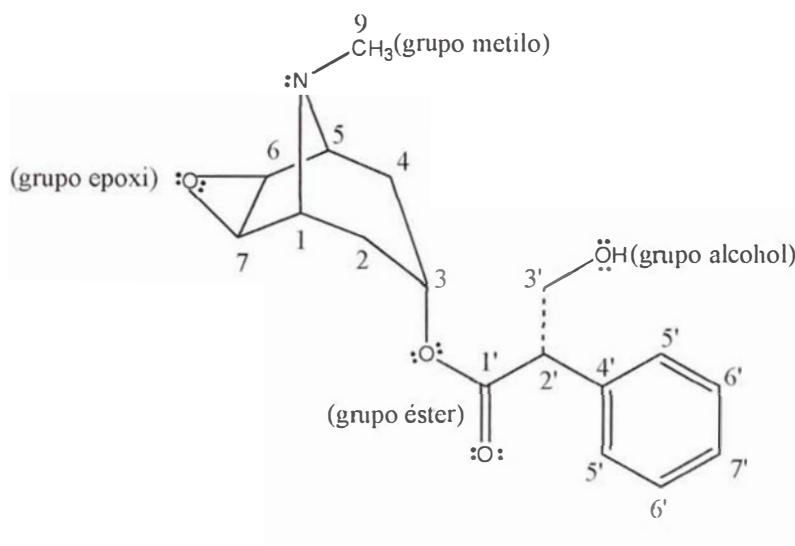
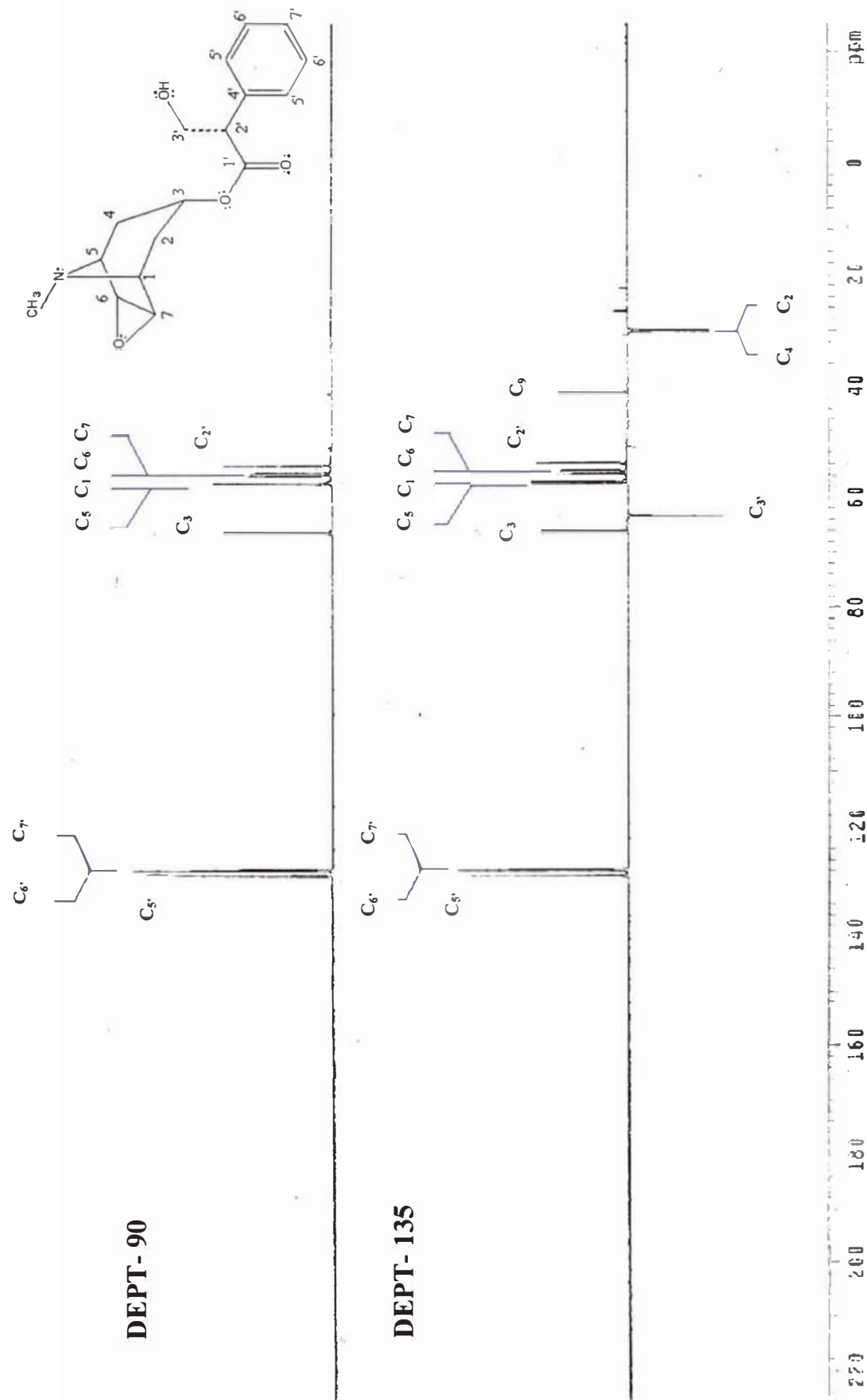


Figura N° 7.- Indicación de los átomos de carbono de la Escopolamina



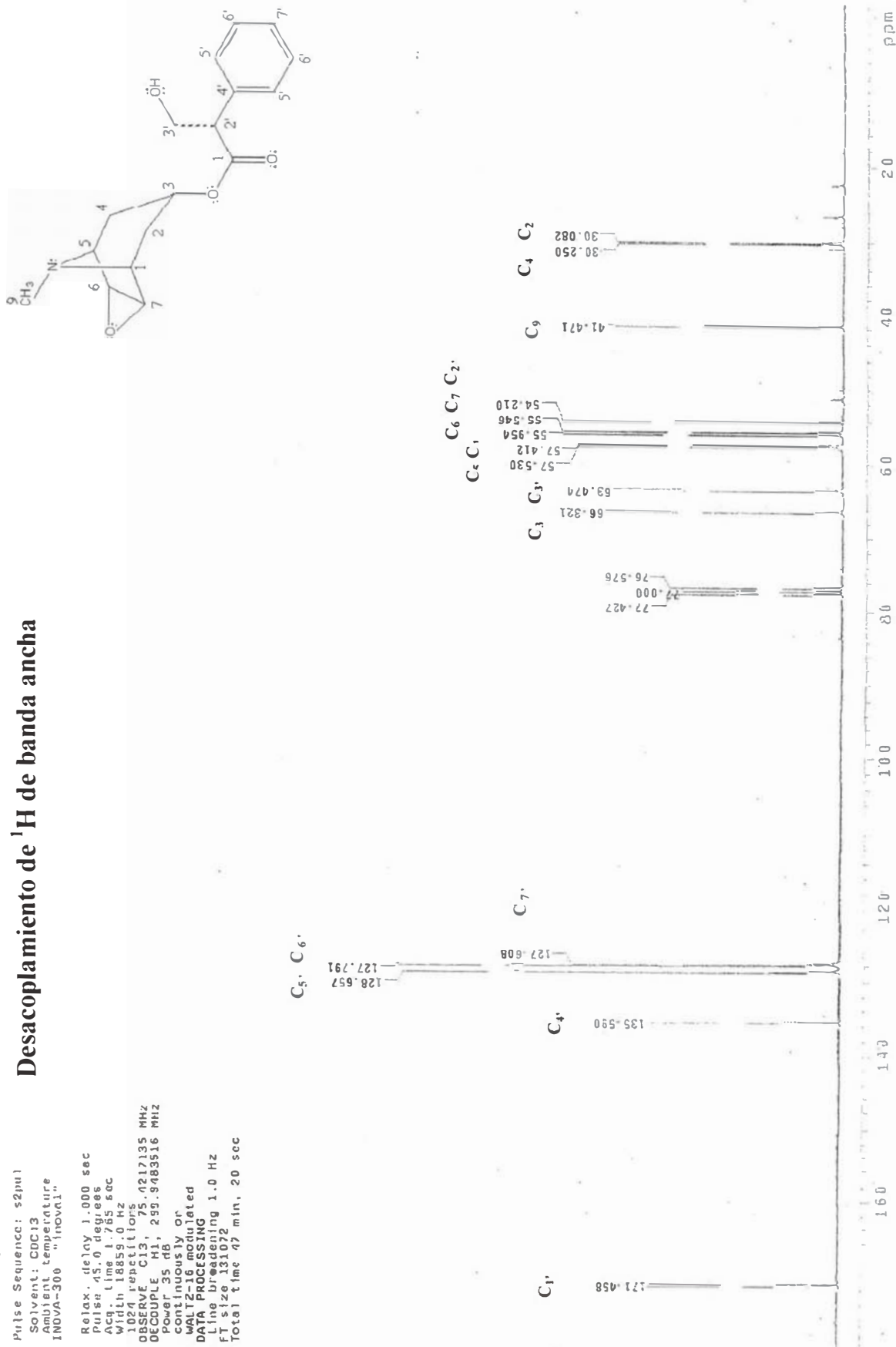
Espectro N°3.- Espectro de RMN¹³C -DEPT (300 MHz) de la Escopolamina obtenida a partir de las semillas de toe (*B. sanguinea*)

Desacoplamiento de ^1H de banda ancha

E16501CHCL3

Pulse Sequence: s2pul
 Solvent: CDCl3
 Ambient temperature
 INOVA-300 "nova1"

Relax. delay 1.000 sec
 Pulse 45.0 degrees
 Acq. time 1.785 sec
 Width 18859.0 Hz
 1024 repetitions
 OBSERVE C13, 75.0217135 MHz
 DECOUPLE H1, 299.9483516 MHz
 Power 35 dB
 continuously or
 WALTZ-16 modulated
 DATA PROCESSING
 Line broadening 1.0 Hz
 F1 24.33072
 Total time 47 min, 20 sec



Espectro N°4.- Espectro de RMN ^{13}C (300 MHz) de la Escopolamina obtenida a partir de las semillas de toe (*B. sanguinea*)

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

a. Condiciones de trabajo

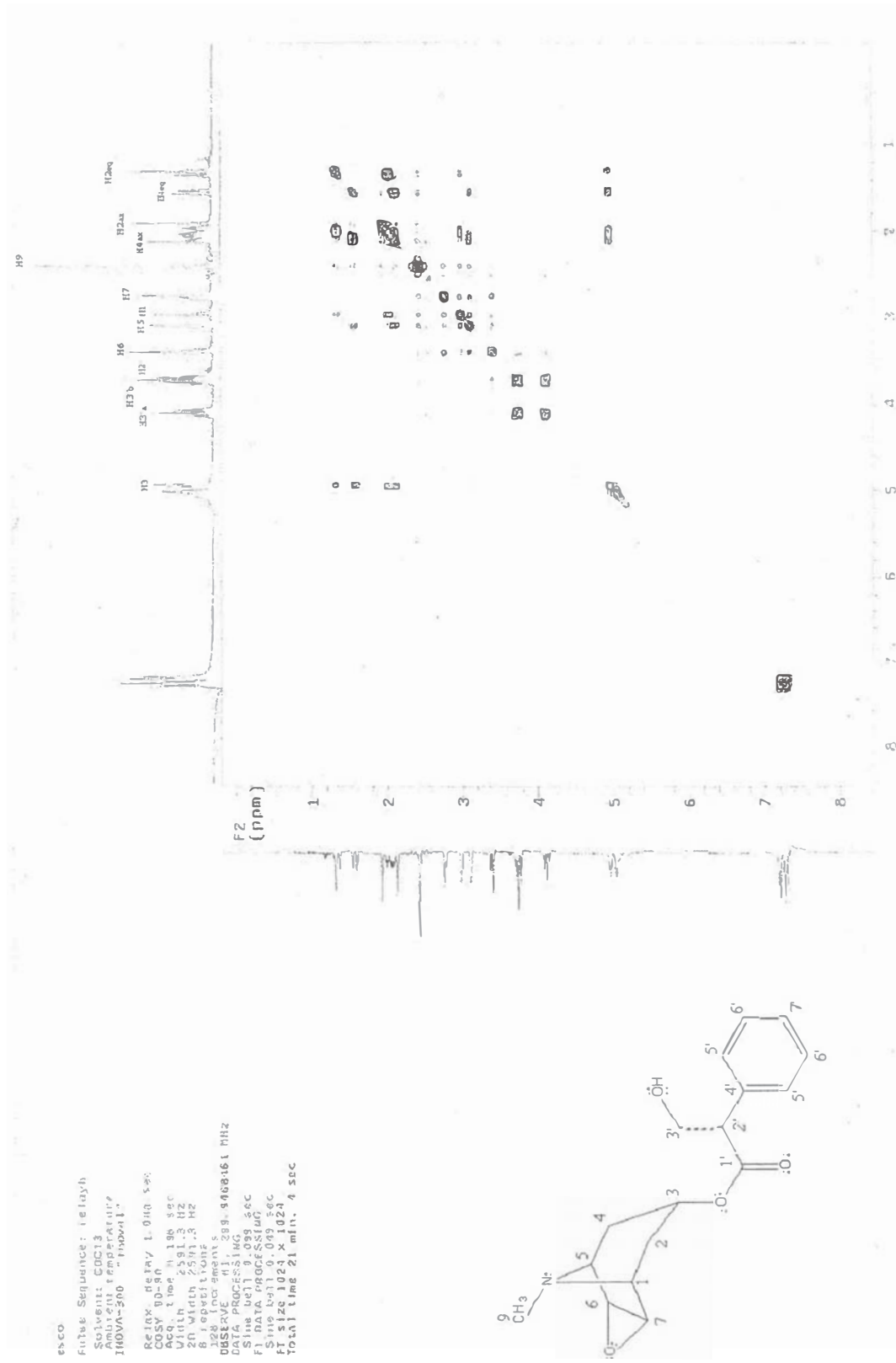
- i Equipo: Varian DPX-300 (300 MHz)
- ii Laboratorio: Productos Naturales – Instituto de Química (Universidad de São Paulo-Brasil).
- iii Operador: M. Sc. Ingrid Collantes Díaz
- iv Fecha: 13. Set.03
- v Solvente: CDCl_3
- vi Peso: 120 mg

b. Características del espectro

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

H (δ ppm)	Hidrógenos correlacionado
H-2eq (1,34)	H-4eq (1,56), H-1 (2,98)
H-4eq (1,56)	H-5 (3,1), H-2eq (1,34)
H-2ax	H-1 (2,98)
H-4ax	H-5 (3,1)
H-7 (2,76)	H-6 (3,38)

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



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

5. Espectro de IR (Espectro N°6)

a. Condiciones de trabajo

- i Equipo: Espectrofotómetro infrarrojo: ABB Bomen, modelo MB 102.
- ii Laboratorio: Química Inorgánica, Sintética y Estructural. Departamento de Química Fundamental – Instituto de Química (Universidad de São Paulo-Brasil).
- iii Operador: M. Sc. Ana Valderrama N.
- iv Fecha: 18. Mar.2004
- v Solvente: Nujol.

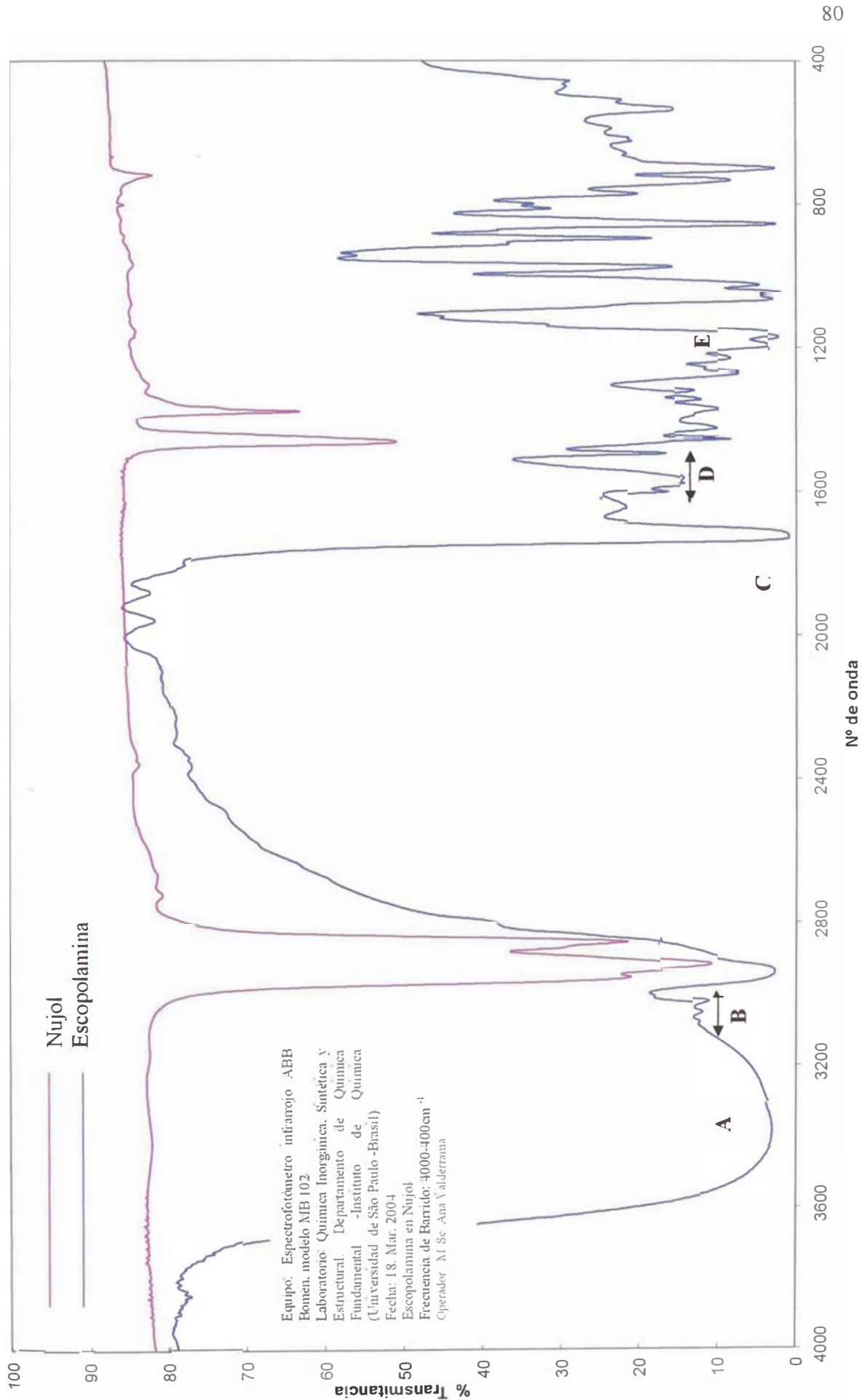
b. Características del espectro

ν^{-1} (cm⁻¹): 3400, 3095, 3060, 1733, 1585, 1434, 1456, 1496, 1207, 1197.

c. Análisis del espectro (ver Espectro N°7)

Banda	ν^{-1} (cm ⁻¹)	
A	3400	Alargamiento O-H
B	3095, 3060	Alargamiento C-H aromático
C	1733	Alargamiento C=O (éster)
D	1585, 1434	
	1456, 1496	Vib. de Tensión C=C, aromáticos
E	1207, 1197	Alargamiento C-O

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



Espectro N°6- Espectro Infrarrojo de la Escopolamina obtenida a partir de las semillas de toe (*B. sanguinea*)

IV. RESULTADOS Y CONCLUSIONES

RESULTADOS

1. Obtención de la escopolamina a partir de las semillas del toe (*B.sanguinea*).

- a. A partir de 150 g de semillas del toe (*Brugmansia sanguinea*), 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 cromatografía en columna, seguido de cromatografía en placa preparativa proporcionando aproximadamente 195 mg de escopolamina, como un líquido resinoso de color amarillo tenue.

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

- b. El análisis del espectro de masas corresponde a lo esperado para la escopolamina y es análogo al espectro de la escopolamina publicado en la literatura.
- c. Los espectros de RMN (de ¹H y de ¹³C) son consistentes con aquellos de la escopolamina.
- d. El espectro IR presenta las bandas de absorción características de los grupos funcionales presentes en la escopolamina.

2. El análisis cualitativo de los metabolitos secundarios (Marcha Fitoquímica) presentes en las semillas del toe, siguiendo el procedimiento de Reyna (1999) (de acuerdo al procedimiento de Rondina y Coussio 1969), nos indica que contiene: Aminogrupos primarios o secundarios (++) , grupos fenólicos libres (+), taninos (+), triterpenos y esteroides (+), alcaloides (+++) y catequinas (+).

3. La determinación cuantitativa del total de alcaloides contenidos en las semillas del toe, siguiendo el procedimiento de titulación potenciométrica proporciona 0,36%. Este valor es mayor con respecto a lo publicado en la bibliografía para semillas de *B. sanguinea* colectados en Ecuador (0,17%).

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

CONCLUSIONES

1. A partir de las semillas del toe (*B. sanguinea*) se ha aislado la escopolamina, la cual se ha identificado mediante sus espectros de Masas, RMN¹H, RMN¹³C, ¹H-¹H COSY e IR, y la comparación de éstos con lo publicado en la bibliografía.
2. Se realizó el análisis cualitativo de los metabolitos secundarios (Marcha Fitoquímica) presentes en las semillas del toe según el procedimiento de Rondina y Coussio (1969), habiéndose verificado la presencia de: Aminogrupos primarios y/o secundarios (++), grupos fenólicos (+), taninos (+), triterpenos y esteroides (+), alcaloides (+++), y catequinas (+).
3. Se realizó la determinación cuantitativa del total de alcaloides de las semillas del toe, según el procedimiento de Pelt et al. (1967), habiéndose obtenido 0,36%.

V. BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Cabieses, F., Apuntes de Medicina Tradicional, CONCYTEC, Lima, 1993, pág. 192-193.
2. Brossi, A. (Ed.), The Alkaloids. Chemistry and Pharmacology, Vol. 33, Academic Press, California, 1988, pág. 53-70 (M. Lounasmaa, the Tropane Alkaloids, Sec. VI. Spectroscopy).
3. Drey, R. and G. Foster, J. Pharm. Pharmacol., 5, 839-848 (1953).
"The estimation of tropane alkaloids in vegetable drugs by paper partition chromatography, with special reference to the alkaloids of *Datura sanguinea*".
4. Duddeck, H. and W. Dietrich, Structure Elucidation by Modern NMR, Springer-Verlag, New York, 1989, pág. 1-28.
5. Evans, W. and M. Partridge, J. Pharm. Pharmacol., 4, 769-780 (1952).
"The Parttition Chromatography of alkaloids. Part IV. The assay of Solanaceous drugs".
6. Evans, W. and M. Wellendorf, J. Chem. Soc., 1406-1409 (1959).
"The alkaloids of the Roots of *Datura*".
7. Evans, W., and M. Pe Than, J. Pharm. Pharmacol, 147-154 (1961).
"The alkaloids of the genus *Datura*, section *Brugmansia*. Part I. *D. cornigera hook*".
8. Evans, W., V. Major and M. Pe Than, Planta Médica, 13, 353-358 (1965).
"The alkaloids of the genus *Datura*, section *Brugmansia*. Part III. *Datura sanguinea R. and P.*".
9. Evans, W., and V. Major, J. Chem. Soc., 1621-1623 (1966).
"The alkaloids of the genus *Datura*, section *Brugmansia*. Part IV. New Alkaloids of *D. sanguinea R. and P.*".
10. Evans, W., and Major, V., J. Chem. Soc., 2775-2778 (1968).
"The alkaloids of the genus *Datura*, section *Brugmansia*. Part V. Alkaloids of *D. sanguinea R. and P.* and related esters of Tropane-3 α ,6 β ,7 β -triol".

11. Evans, W., M. Bristol and J. Lampard, *Lloydia*, 32, 123-130 (1969).
"The alkaloids of the genus *Datura*, section *Brugmansia*. Part VI. Tree *Datura* drugs (*Datura candida* cvs) of the Colombian Sibundoy.
12. 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, 103págs.), pág. 26-31; 32-42; 91-99.
13. Florey, K., *Analytical Profiles of Drugs Substances*, Vol. 14, Academic Press, INC, London, 1985, pág. 326-339.
14. Griffin, W., *Planta Médica*, 14, 468-473 (1966).
"Alkaloids in *Datura*. Section *Brugmansia*".
15. Hesse, H., H. Meier y B. Zeel, *Métodos espectroscópicos en Química Orgánica*, Editorial Sintesis S.A., New York, 1997, pág. 163-179.
16. Hoet, P. Y M. Ríos, *Bol. Soc. Quím. (Perú)*, 46, 113-121 (1980).
17. Leary, J., *Lloydia*, 33, 264-266 (1970).
"Alkaloids of the seeds of *Datura sanguinea*".
18. Lock de Ugaz, Olga, *Investigación Fitoquímica*, Fondo editorial, Pontificia Universidad Católica del Perú, Lima, 1994, pág. 4-7.
19. Miranda, M., *Métodos de Análisis de drogas y extractos*, Universidad de La Habana, La Habana, 2002.
20. Nathan, P., L. Arteaga de García, M. Reguero and B. Almanza, *Fitoterapia*, 64, 554 (1993).
"Constituents of *Brugmansia sanguinea* leaves".
21. Padula, L., L. Bandoni, R. Rondina and J. Coussio, *Planta Médica*, 29, 357-360 (1976).
"Quantitative determination of total alkaloids and scopolamine in *Datura ferox* growing in Argentina".
22. Parello, J., P. Longevialle, W. Vetter and A. McCloskey, *Boll. Soc. Chimique de la France*, 2787-2793 (1963).
"Structure de la phyllalbine. Application de la résonance magnétique nucléaire et de la spectrométrie de masse à l'étude des dérivés du tropane".

23. Pavia, D., G. Lampman and G. Kriz, Introduction to Spectroscopy, Saunders Golden Sunburst Series, USA, 2^oEd., 1996, pág. 404-443.
24. Pelt, J., Cl. Vigneron, Ch. Younos, Bull. Soc. Pharm. Nancy, 72, 12-23 (1967).
"Comparaison de diverses méthodes officielle utilisées pour le dosage des Alcaloides des Solanacées".
25. Polia, M., Despierta, remedio, cuenta.....: adivinos y médicos del Ande, Tomo I, PUCP, Lima, 1996, pág. 333-346.
26. Reyna P., Víctor, Apuntes del curso de Alcaloides Indólicos CQ 044, Escuela Profesional de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Ingeniería, Lima, Set-Dic, 1992.
27. Reyna P., Víctor, Apuntes del curso de Química Orgánica IV-CQ442, (Espectrometría de Masas, de RMN, UV, IR en separatas), Escuela Profesional de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Ingeniería, Lima, 1999-a.
28. Reyna P., Víctor, Marcha Fitoquímica, Práctica de Laboratorio (Separata), Curso de Química de Productos Naturales-CQ046, Escuela Profesional de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Ingeniería, Lima, 1999-b, 5 pág.
29. Robins, R., J. Payne, J. Hamill and M. Rhodes, Planta Médica, 53, 474-478 (1987),
"Production of Hyoscyamine by "Hairy root" cultures of *Datura stramonium*".
30. Robins, D., A. Watson, I. Freer and N. Walton, J. Natural Prod., 56, 1234-1238 (1993),
"Stereochemistry of the enzymic processes involved in the biosynthesis of Scopolamine from Hyoscyamine".
31. Sánchez, R., Estudio Químico de la liana "Ayahuasca" (*Banisteriopsis caapi Spruce ex. Grisebach Morton*). Tesis de Licenciatura en Ciencias-mención Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Ingeniería, Lima, 2001, 124págs., pág. 32-38; 40-51; 104-112.

32. Sarazin, C., G. Goethals, J. Séquin, and J. Barbotin, *Magnetic Resonance in Chemistry*, 29, 291-300 (1991).
“Spectral reassignment and structure elucidation of scopolamine free base through two –dimensional NMR techniques”.
33. Schultes, R. y Raffauf, *The Healing Forest*, Dioscorides Press, Pórtland, Oregon, 1990, pág. 419-424.
34. Schultes, R. y A. Hofmann, *Plantas de los Dioses. Orígenes del uso de los alucinógenos*, Fondo de Cultura Económica, México, 1993 (c.1979), pág. 128-131 (Brugmansia. Floripondio).
35. Silverstein, R., G. Bassler and T. Morrill, *Spectrometric Identification of Organic Compounds*, John Wiley and Sons, New York, 6° Ed., 1998, pág. 250-274.
36. *The Merck Index*, 12° Ed., 1996, pág. 1444 (escopolamina); pág. 835 (hiosciamina).
37. 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 pág., pág.44-48; 64-69.
38. *United States Pharmacopoeia-USP*, 20th Ed., (1980), pág. 913.
"Alkaloidal Drug Assays; Proximate Assays".
39. Vitale, A., A. Acher, and A. Pomilio, *Journal of Ethnopharmacology*, 49, 81-89 (1995).
“Alkaloids of *Datura ferox* from Argentina”.