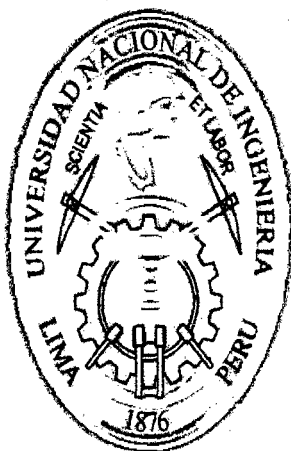


UNIVERSIDAD NACIONAL DE INGENIERÍA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA PROFESIONAL DE QUÍMICA



TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

LICENCIADO EN QUÍMICA

ESTUDIO QUÍMICO DEL CACTUS

“SAN PEDRO MACHO” (*Echinopsis peruviana*)

Presentada por:

PEDRO ALEXIS BALDERA AGUAYO

Asesor:

DR. VICTOR MANUEL REYNA PINEDO

LIMA – PERÚ

2014

Digitalizado por:

**Consortio Digital del
Conocimiento MebLatam,
Hemisferio y Dalse**

A mis padres, por su ejemplo de perseverancia y fuente de apoyo y motivación.

A mi hermana y mis abuelos, a quienes tengo presente en cada acción que realizo.

AGRADECIMIENTOS

Deseo agradecer muy sinceramente a mi asesor, Dr. Víctor Reyna Pinedo, por su invaluable apoyo y consejos brindados durante la realización del presente trabajo durante mis años de estudios, así también por su valiosa amistad durante el tiempo que nos conocemos.

También deseo agradecer a los miembros del Grupo de Investigación de Química de Productos Naturales, en especial a la M.Sc. Virginia Torpoco C. y a la M.Sc. Elena Córdor C., por los constantes apoyos que me brindaron durante las diferentes etapas de la realización de esta tesis; al Dr. Carlos Ostolaza N. por la determinación botánica del material vegetal.

Asimismo, un agradecimiento especial a la Dra. Elsa C. Y. Yan, profesora asociada del Department of Chemistry de Yale University (USA), así como al PhD. Eric Paulson, Director del Chemical and Biophysical Instrumentation Center (CBIC) de Yale University y al asistente de investigación PhD. Xiaoling Wu, por las facilidades brindadas durante mi permanencia en su equipo de investigación, para la obtención de los espectros de Masas, de RMN¹H, RMN¹³C y UV presentados en esta tesis.

De igual manera deseo agradecer la colaboración del Dr. Bernard Delpech, investigador del Institut de Chimie des Substances Naturelles del Centre National de la Recherche Scientifique (ICSN – CNRS), por gestionar la obtención del análisis porcentual de elementos realizado en el Service de Microanalyse del ICSN (Gif Sur Yvette – Francia). Asimismo, al Químico Jorge Muñante F. de la Empresa Electromédica Peruana S.A. (EMPESA) – Lima, Perú, por el registro del espectro IR presentado en esta tesis.

Finalmente, a los Bachilleres de Química de la Facultad de Ciencias – UNI, Antony Bazán Aguilar – Grupo de Películas Delgadas por su ayuda al usar la ultracentrífuga del Lab. R – 33 durante la extracción sólido – líquido de la muestra vegetal; y a Josseline S. Ramos Figueroa – LIBIPMET, por facilitar el acceso al potenciómetro para el análisis cuantitativo (titulación potenciométrica) de la muestra vegetal; así como a todos aquellos que de uno u otro modo contribuyeron con la realización de este trabajo.

RESUMEN

El cactus “San Pedro Macho” (*Echinopsis peruviana*) está relacionado con el muy conocido cactus “San Pedro Hembra” (*Echinopsis pachanoi*) el cual es el constituyente principal de la bebida San Pedro, utilizada en las denominadas Mesas con San Pedro que es uno de los procedimientos más importantes de la medicina tradicional del norte del Perú. Sin embargo, como ocurre con muchas otras plantas de nuestro país, el cactus “San Pedro Macho” (*E. peruviana*) ha sido escasamente estudiado, encontrándose en la literatura muy pocas publicaciones sobre él: Pardanani, J., *et al.* (1977) y Cjuno, M., *et al.* (2009) reportan el aislamiento del principal alcaloide presente en este cactus, la mescalina (como clorhidrato), mientras que Ogunbodede, O., *et al.* (2010) reporta el análisis cuantitativo de la mescalina (no del total de alcaloides) mediante HPLC. Finalmente, Agurell (1969) reporta que la muestra de *Echinopsis peruviana* no contenía mescalina (análisis de alcaloides por cromatografía de gases y espectrometría de masas). De estos cuatro autores, sólo Cjuno, M., *et al.* (2009) y Ogunbodede, O., *et al.* (2010) trabajaron con cactus recolectados en Perú. Los tallos del cactus “San Pedro Macho” (*E. peruviana*) contienen alcaloides del tipo feniletilamina, siendo la mescalina el alcaloide más importante (Trout – 2005). En nuestro laboratorio hemos aislado la mescalina como su sal, el sulfato dihidratado, de la corteza de los tallos del cactus “San Pedro Macho”, habiéndose caracterizado por su punto de fusión, el análisis porcentual de sus elementos y sus espectros de Masas, RMN¹H, RMN¹³C, IR y UV. El análisis fitoquímico que realizamos, nos indica la presencia de alcaloides, aminogrupos primarios y/o secundarios, grupos fenólicos libres, triterpenos y/o esteroides y catequinas. Además, realizamos la determinación cuantitativa del total de alcaloides de la corteza de los tallos de este cactus habiéndose obtenido 0,19 % (procedimiento de European Pharmacopoeia 5.0 – 2005). Cjuno, M., *et al.* – 2009 y Ogunbodede, O., *et al.* – 2010 realizaron el análisis cuantitativo de mescalina presente en el *Echinopsis peruviana*, reportando que el porcentaje de mescalina en la corteza de los tallos fluctúa entre 0,24 a 0,25 %. Adicionalmente, Pardanani, J., *et al.* – 1977, reportaron que el porcentaje de mescalina presente en el cactus completo, corteza y pulpa, es 0,817 %.

Palabras clave: *Echinopsis peruviana*, San Pedro Macho, mescalina, marcha fitoquímica, total de alcaloides.

ESTUDIO QUÍMICO DEL CACTUS “SAN PEDRO MACHO”
(*Echinopsis peruviana*)

ÍNDICE

Introducción	1
Objetivos de la tesis	3
I. ESTUDIO BIBLIOGRÁFICO	4
A. Estudios químicos precedentes relativos al cactus “San Pedro Macho” (<i>E. peruviana</i>)	5
1. Composición química del cactus “San Pedro Macho” (<i>E. peruviana</i>)	5
a) Análisis cualitativo - marcha fitoquímica	5
b) Principales alcaloides presentes en el cactus “San Pedro Macho”	5
c) Análisis cuantitativo de alcaloides en el cactus “San Pedro Macho”	6
2. Aislamiento de alcaloides del cactus “San Pedro Macho” (<i>E. peruviana</i>)	8
a) Procedimiento de Cjuno, M., <i>et al.</i> – 2009	8
b) Procedimiento de Pardanani, J., <i>et al.</i> – 1977	8
3. Identificación clásica de la mescalina y/o derivados	10
a) Comportamiento cromatográfico	10
b) Punto de fusión	10
4. Identificación espectroscópica de la mescalina y/o derivados	11
a) Espectro de Masas de la mescalina y compuestos análogos	11
b) Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno, RMN ¹ H	20
c) Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear de Carbono, RMN ¹³ C	23
d) Espectroscopía de Infrarrojo, IR	26
e) Espectroscopía de Ultravioleta, UV	33
5. Biosíntesis de la mescalina	35
6. Síntesis de la mescalina	38
B. Estudios químicos generales	41
1. Análisis cualitativo – Marcha Fitoquímica	41
2. Test de alcaloides	42
3. Análisis cuantitativo de alcaloides	42
a) Procedimiento de Hoet & Ríos Chu – 1980	42
b) Procedimiento de la 5 th Ed. European Pharmacopoeia – 2005	43
4. Aislamiento de alcaloides	46
a) Procedimiento de Flores – 2000	46
b) Procedimiento de Crosby & McLaughlin – 1973	47
5. Identificación espectroscópica de compuestos orgánicos	49
a) Espectrometría de Masas, EM	50
b) Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno, RMN ¹ H	51
c) Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear de Carbono, RMN ¹³ C	52
d) Espectroscopía de Infrarrojo, IR	54
e) Espectroscopía de Ultravioleta, UV	55

II. PARTE EXPERIMENTAL	57
Presentación	58
Metodología de investigación para el estudio químico (alcaloides) de plantas medicinales	59
TRABAJO PRELIMINAR	60
A. Selección y recolección de la planta	60
B. Estudio etnobotánico y etnomedicinal	62
C. Determinación (identificación) botánica	62
D. Estudio bibliográfico	62
TRABAJO EXPERIMENTAL EN EL LABORATORIO	64
Secado y molienda de la planta	64
E. Análisis cualitativo (marcha fitoquímica)	65
1. Muestra. Cantidad de muestra por análisis	65
2. Procedimiento	65
3. Resultados	65
F. Análisis cuantitativo de alcaloides	66
Muestra. Cantidad de muestra por análisis	66
1. Procedimiento 1: European Pharmacopoeia 5.0 – 2005	66
a) Extracción sólido – líquido: Obtención del Extracto Bruto Orgánico (EBO)	66
b) Separación líquido – líquido: Obtención del Extracto Bruto de Alcaloides (EBA)	66
c) Eliminación de las bases volátiles	67
d) Titulación. Determinación potenciométrica	67
e) Cálculo de la cantidad y del porcentaje de alcaloides en la muestra	67
2. Procedimiento 2: Hoet & Ríos Chu – 1980	69
a) Extracción sólido – líquido: Obtención del Extracto Bruto Orgánico (EBO)	69
b) Separación líquido – líquido: Obtención del Extracto Bruto de Alcaloides (EBA)	69
c) Eliminación de las bases volátiles	70
d) Titulación. Determinación potenciométrica	70
e) Cálculo de la cantidad y del porcentaje de alcaloides en la muestra	70
G. Aislamiento de la mescalina (sulfato dihidratado)	71
1. Extracción sólido – líquido: Obtención del Extracto Bruto Orgánico (EBO)	72
2. Separación líquido – líquido: Obtención del Extracto Bruto de Alcaloides (EBA)	73
3. Purificación. Preparación del sulfato de mescalina dihidratado	73
H. Identificación clásica del sulfato de mescalina dihidratado	74
1. Características del producto	75
2. Determinación del punto de fusión	75
3. Comportamiento cromatográfico (Cromatografía en Capa Fina – CCF)	75
4. Análisis porcentual de carbono, hidrógeno, nitrógeno, oxígeno y azufre	75
I. Identificación espectroscópica del sulfato de mescalina dihidratado	77
1. Espectro de Masas – EI	78
2. Espectro de RMN ¹ H – DMSO – <i>d</i> ₆	79
3. Espectro de RMN ¹ H – D ₂ O	79
4. Espectros de RMN ¹³ C	83
5. Espectro de IR	87
6. Espectro de UV	88

III. RESULTADOS Y CONCLUSIONES	89
Resultados	90
Conclusiones	91
IV. RECOMENDACIONES	92
V. BIBLIOGRAFÍA	94
VI. ANEXOS	101
Anexo 1. Espectros de IR de mescalina (base libre) y clorhidrato de mescalina	102
Anexo 2. Espectros de UV del sulfato de mescalina dihidratado	105
Anexo 3. Síntesis de mescalina	106
Anexo 4. Marcha Fitoquímica (Reyna – 2012)	110
Anexo 5. Análisis cualitativo para la detección de alcaloides presentes en plantas (Reyna – 2012)	116
Anexo 6. “San Pedro Macho” (<i>Echinopsis peruviana</i>) y “San Pedro Hembra” (<i>Echinopsis pachanoi</i>)	118
Anexo 7. Resultados de la marcha fitoquímica del cactus “San Pedro Macho” (2008)	120
Anexo 8. Resultados de la marcha fitoquímica del cactus “San Pedro Macho” (2013)	121
Anexo 9. Análisis porcentual de carbono, hidrógeno, nitrógeno, oxígeno y azufre del sulfato de mescalina dihidratado a partir del cactus “San Pedro Macho” (<i>E. peruviana</i>) (ICSN – CNRS, Francia)	122
Anexo 10. Espectro RMN ¹ H (300 MHz) del sulfato de mescalina dihidratado obtenido a partir del cactus “San Pedro Macho” (<i>E. peruviana</i>)	123
Anexo 11. Espectro RMN ¹³ C (300 MHz) del sulfato de mescalina dihidratado obtenido a partir del cactus “San Pedro Macho” (<i>E. peruviana</i>)	124
Anexo 12. Determinación del punto de equivalencia de la valoración Potenciométrica	125
Anexo 13. Espectro IR del sulfato de mescalina dihidratado en KBr obtenido a partir del cactus “San Pedro Macho” (<i>E. peruviana</i>)	138
Anexo 14. Espectro UV del sulfato de mescalina dihidratado en etanol al 80 % en agua obtenido a partir del cactus “San Pedro Macho” (<i>E. peruviana</i>)	139

ÍNDICE DE FIGURAS

1. Principales alcaloides presentes el cactus “San Pedro Macho” (<i>E. peruviana</i>)	6
2. Espectro de masas (EI) de la mescalina (NIST Chemistry WebBook - 2014)	12
3. Espectro de Masas de la mescalina (Instrumental Data for Drug Analysis, 3rd Ed. 2006)	12
4. Espectro de masas de la mescalina (SWGDRUG - 2005)	13
5. Espectro de masas (EI) de la mescalina (Henry, J., <i>et al.</i> - 2003)	13
6. Espectro de masas (EI) de la mescalina (Flores - 2000)	14
7. Espectro de Masas (EI) de la mescalina (Fucci & Chiarotii - 1996)	14
8. Espectro de masas de la mescalina (Becker - 1985)	16
9. Espectro de masas (EI) de la 3,4-dimetoxi- β -feniletilamina (A), 3,4-dimetoxi-4-hidroxi- β -feniletilamina (B) y 3,5-dimetoxi-4-hidroxifeniletilamina (C) (Agurell - 1969)	16
10. Numeración de la estructura de la mescalina para los átomos de hidrógeno	20
11. Espectro de RMN ¹ H (400MHz) en CDCl ₃ de la mescalina, como base libre (SWGDRUG - 2005)	20
12. Espectro de RMN ¹ H en CDCl ₃ /CD ₃ OD del clorhidrato de mescalina (Mills III, T., <i>et al.</i> - 2006)	21
13. Espectro de RMN ¹ H (500 MHz) en D ₂ O del sulfato de mescalina dihidratado (Flores - 2000)	21
14. Numeración de la estructura de la mescalina para los átomos de carbono	23
15. Espectros de RMN ¹³ C (125 MHz): (a) DEPT 90 en CDCl ₃ y (b) Protones desacoplados en D ₂ O del sulfato de mescalina dihidratado (Flores - 2000)	24
16. Espectros FTIR-ATR en fase sólida de (a) mescalina como base libre, (b) sulfato de mescalina, (c) clorhidrato de mescalina y (d) espectro FTIR en fase gaseosa para la mescalina (SWGDRUG - 2005)	26
17. Espectro FTIR del sulfato dihidratado de mescalina en KBr (Flores - 2000)	28
18. Espectro Infrarrojo (IR) del sulfato dihidratado de mescalina en KBr (NIST Chemistry WebBook - 2014)	29
19. Espectro Infrarrojo (IR) del sulfato dihidratado de mescalina en KBr (NIST Chemistry WebBook - 2014)	32
20. Espectro UV de la mescalina en H ₂ SO _{4(ac)} 0,2 N (Mills III, T., <i>et al.</i> - 2006)	33
21. Espectro UV del sulfato dihidratado de mescalina en etanol al 80 % en agua (Flores - 2000)	34
22. Espectro UV del sulfato de mescalina en etanol al 80 % (Salomon & Bina - 1946)	34
23. Biosíntesis de la mescalina a partir de tirosina	37
24. Ejemplos de sistemas conjugados	56
25. Orbitales moleculares presentes en el grupo carbonilo, C=O	56
26. Asignaciones de los átomos de hidrógeno en la mescalina	80
27. Asignación de los átomos de carbono en la mescalina	84

28. Espectro FTIR del clorhidrato de mescalina (Khan, J., <i>et al.</i> , 2012)	102
29. Espectro IR del clorhidrato de mescalina proveniente de la muestra de Chaviña en Ayacucho. La señal a 2000 cm^{-1} se debe a la presencia de CO_2 (Cjuno, M., <i>et al.</i> , 2009)	102
30. Espectro FTIR del clorhidrato de mescalina (Mills III, T., <i>et al.</i> , 2006)	103
31. Espectro IR del sulfato de mescalina en KBr (Becker, H., 1985)	103
32. Espectro IR de la mescalina en CHCl_3 (Lumph, P. and Lebish, P., 1974)	104
33. Espectro UV del sulfato de mescalina en H_2SO_4 0,5 N (Becker, H., 1985)	105

ÍNDICE DE FOTOS

1. Cactus “San Pedro Macho” (<i>Echinopsis peruviana</i>), Yauyos – Lima (2500 m.s.n.m.) (Foto M. Sauvain)	61
2. Lugar de recolección del cactus “San Pedro Macho” (<i>Echinopsis peruviana</i>), ladera del río Cañete en Yauyos – Lima (2500 m.s.n.m.) (Foto M. Sauvain)	61
3. Cerámicas Moche. Museo de Antropología, Arqueología e Historia, Lima, Junín 1988 (V. Reyna)	63
4. Muestra F08 – 2 seca y pulverizada (Foto P. Baldera Aguayo)	65
5. Extracción sólido – líquido (Foto P. Baldera Aguayo)	72
6. Preparación del sulfato de mescalina dihidratado (Foto Pedro Baldera Aguayo)	74

ÍNDICE DE GRÁFICAS

1. Curva de Titulación Potenciométrica de la muestra M1 según European Pharmacopoeia 5.0 – 2005	127
2. Curva de Titulación Potenciométrica de la muestra M2 según European Pharmacopoeia 5.0 – 2005	129
3. Curva de Titulación Potenciométrica de la muestra M3 según European Pharmacopoeia 5.0 – 2005	131
4. Curva de Titulación Potenciométrica de la muestra M4 según European Pharmacopoeia 5.0 – 2005	133
5. Curva de Titulación Potenciométrica de la muestra M5 según Hoet & Ríos Chu – 1980	135
6. Curva de Titulación Potenciométrica de la muestra M6 según Hoet & Ríos Chu – 1980	137

ÍNDICE DE TABLAS

1. Porcentaje (%) de alcaloides presentes en cactus "San Pedro Macho" reportados en la literatura	7
2. Porcentajes de los iones característicos para la mescalina	18
3. Desplazamientos químicos (δ , ppm) de los átomos de hidrógeno en el espectro RMN ¹ H de distintos derivados de la mescalina	22
4. Desplazamientos químicos (δ , ppm) de los átomos de carbono en el espectro RMN ¹³ C del sulfato dihidratado de mescalina	25
5. Bandas características del espectro Infrarrojo (IR) para el sulfato dihidratado de mescalina	30
6. Máximos de absorción para mescalina	35
7. Comparación de los métodos de análisis cuantitativo de alcaloides descritos por Hoet & Ríos Chu - 1980 y European Pharmacopoeia 5 th Ed. - 2005	45
8. Secado y molienda del cactus "San Pedro Macho" (<i>E. peruviana</i>)	65
9. Porcentaje (%) de alcaloides presentes en la corteza del cactus "San Pedro Macho"	70
10. Análisis porcentual encontrado para el sulfato de mescalina dihidratado	76
11. Cálculo del N° moles de cada elemento para el sulfato de mescalina dihidratado	76
12. Datos del espectro RMN ¹ H del sulfato de mescalina dihidratado (500 MHz) en DMSO y D ₂ O	80
13. Desplazamientos químicos, δ (ppm), de los átomos de carbono de la mescalina en D ₂ O	84
14. Bandas características del espectro IR del sulfato de mescalina dihidratado	87
15. Datos de la curva de titulación potenciométrica de la muestra M1 según European Pharmacopoeia 5.0 - 2005	126
16. Datos de la curva de titulación potenciométrica de la muestra M2 según European Pharmacopoeia 5.0 - 2005	128
17. Datos de la curva de titulación potenciométrica de la muestra M3 según European Pharmacopoeia 5.0 - 2005	130
18. Datos de la curva de titulación potenciométrica de la muestra M4 según European Pharmacopoeia 5.0 - 2005	132
19. Datos de la curva de titulación potenciométrica de la muestra M5 según Hoet & Ríos Chu - 1980	134
20. Datos de la curva de titulación potenciométrica de la muestra M6 según Hoet & Ríos Chu - 1980	136

LISTA DE ABREVIATURAS

A	Absorbancia
a. u.	Unidades arbitrarias
°C	Grado centígrado
CCF	Cromatografía en capa fina
CG	Cromatografía de gases
cm	Centímetro
φ	Diámetro
D₂O	Agua deuterada
δ	Desplazamiento químico
DEPT	Transferencia por polarización aumentada y no distorsionada
DMSO	Dimetilsulfóxido
ε	Absortividad molar
EBA	Extracto Bruto de Alcaloides
EBO	Extracto Bruto Orgánico
EI	Ionización electrónica
EM	Espectrometría de masas
Eq	Equivalente
Eq-g	Equivalente gramo
Et₂O	Éter etílico
EtOH	Etanol
eV	Electronvoltio
FTIR	Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier
FTIR-ATR	Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier por atenuación de reflectancia total
G	Gramo
h	Hora
HPLC	Cromatografía líquida de alta presión/Cromatografía Líquida de Alta Performancia
IR	Infrarroja
kcal	Kilocaloría
kg	Kilogramo
km	Kilómetro
L	Litro
λ_{máx}	Longitud de onda máxima
M	Molaridad
m.s.n.m.	Metros sobre el nivel del mar
m/z	Relación masa/carga
M⁺	Ión molecular
M 1 - 6	Muestra 1 - 6
Mbar	Milibar
Me₂CO	Acetona
MeOH	Metanol
meq	Miliequivalente

mg	Miligramo
MHz	Megahertz
min	Minutos
mL	Militro
N	Normalidad
N°	Número
NIST	National Institute of Standards and Technology
nm	Nanómetro
P. f.	Punto de fusión
pH	Potencial de hidrógeno
ppm	Partes por millón
R_f	Factor de retención
RMN¹³C	Resonancia magnética nuclear de 13C
RMN¹H	Resonancia magnética nuclear de 1H
SWGDRUG	Scientific Working Group for the Analysis of Seized Drugs
% T	Porcentaje de transmitancia
TMS	Tetrametilsilano
μL	Microlitro
μm	Micrómetro
uma	Unidad de masa atómica
UV	Ultravioleta
ν⁻¹	Número de onda

INTRODUCCIÓN

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

Pese a que nuestro país es uno de los más privilegiados en cuanto a su megabiodiversidad de plantas, el conocimiento científico es escaso y su empleo en la industria también, debido a ello no hay un gran aprovechamiento de esta riqueza.

La investigación científica de las plantas medicinales comprende dos grandes etapas:

En primer lugar, debemos seleccionar o decidir la planta que vamos a estudiar, realizar la adquisición de la muestra, hacer la identificación botánica de la planta y conseguir toda la información referente a ella, tanto en el campo como en la biblioteca.

La segunda parte, referida al estudio químico de las plantas medicinales, tiene como objetivo responder todas las interrogantes en relación a los constituyentes químicos (los llamados productos naturales) presentes en las plantas:

1. ¿Qué clase de compuestos contiene?, lo que se consigue mediante el análisis cualitativo o marcha fitoquímica de la planta.
2. ¿Cuánto contiene de determinada clase de constituyente (por ejemplo, de alcaloides)?, lo cual se consigue mediante la determinación cuantitativa de dicha clase de constituyentes.
3. ¿Cuál es la identidad, la estructura química exacta de los constituyentes principales?, lo cual se logra mediante el aislamiento de cada constituyente puro (lo que involucra los procedimientos de extracción por solventes, separación y purificación) y la identificación espectroscópica de su estructura, mediante el análisis de sus espectros de Resonancia Magnética Nuclear RMN¹H y RMN¹³C, entre otras.

La presente tesis, en la línea de Química Orgánica de Productos Naturales, comprende el estudio químico de los alcaloides presentes en el cactus “San Pedro Macho” (*Echinopsis peruviana*), y constituyó para mí poner en práctica los conocimientos adquiridos en los cuatro cursos básicos semestrales de Química Orgánica, los cursos de Proyecto de Tesis I CQ561, Proyecto de Tesis II CQ562 (Determinación cuantitativa), y el curso electivo CQ046, Química de Productos Naturales, habiéndome proporcionado una visión global de la aplicación de los conocimientos de Química Orgánica a la solución de problema específicos: (i) ¿Qué clase de compuestos están presentes?, (ii) ¿Cuál es el alcaloide principal que contiene? y (iii) ¿Cuál es la cantidad de alcaloides contenidos en el cactus “San Pedro Macho”?

Este trabajo de tesis comprendió las siguientes actividades:

- i. Trabajo experimental en el laboratorio químico, realizado en el ambiente de Investigación de Química de Productos Naturales (C3 – 175), ubicado en el Laboratorio N° 12 (Pabellón C) de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Ingeniería, que comprendió, la extracción por solventes (sólido – líquido y líquido – líquido), la purificación de la mescalina mediante precipitación como sulfato de mescalina dihidratado y posterior recristalización, la caracterización preliminar mediante cromatografía en capa fina y punto de fusión; y la cuantificación del contenido de alcaloides (determinación potenciométrica).
- ii. Identificación espectrométrica del sulfato de mescalina dihidratado, mediante el análisis de los espectros ultravioleta, de masas, RMN¹H, RMN¹³C, espectros obtenidos en el Chemical and Biophysical Instrumentation Center (CBIC) en la Universidad de Yale (USA).
- iii. Análisis de la información bibliográfica relativa a los estudios químicos del cactus “San Pedro Macho” (*E. peruviana*) y de la mescalina.

Todo este trabajo demandó una dedicación de 4 meses (considerando el trabajo de 8 horas/día, durante 5 días / semana) y se realizó durante los meses de octubre del 2012 – enero del 2013 y junio – julio del 2013.

OBJETIVOS DE LA TESIS

A. Objetivo general

Estudio químico del cactus "San Pedro Macho" (*Echinopsis peruviana*)

B. Objetivos específicos

- i. Aislar e identificar (clásica y espectroscópicamente) el alcaloide mescalina como sulfato dihidratado, obtenido a partir del cactus "San Pedro Macho" (*Echinopsis peruviana*),
- ii. el análisis cualitativo (marcha fitoquímica) de los metabolitos secundarios presentes en dicho cactus; y
- iii. el análisis cuantitativo del total de alcaloides contenido en dicho cactus.

El objetivo específico principal es el primero, esto es, el aislamiento e identificación de los principales alcaloides contenidos en el cactus San Pedro Macho, que llevó al estudio y experimentación de los diversos procedimientos de aislamiento de alcaloides, y las técnicas de identificación espectroscópicas.

El aislamiento comprende las etapas de extracción por solventes, separación y purificación. Así, describiremos 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 formación de derivados cristalinos (sulfato de mescalina dihidratado). Asimismo, se describe la aplicación de la espectrometría de masas y de resonancia magnética nuclear (de hidrógeno y de carbono) en la identificación de la estructura molecular.

De esta manera se nos capacita en la rutina del 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 compuesto orgánico (metabolito secundario) contenido en un producto natural.

I. ESTUDIO

BIBLIOGRÁFICO

A. ESTUDIOS QUÍMICOS PRECEDENTES RELATIVOS AL CACTUS “SAN PEDRO MACHO” (*E. peruviana*)

Al iniciar esta Tesis considero importante indicar que la especie “San Pedro Hembra” (*E. pachanoi*), especie muy relacionada con la planta que estamos presentando, ha sido motivo de más estudios químicos, y de una Tesis presentada en nuestros laboratorios (Flores - 2000¹, Reyna & Flores - 2001²).

1. Composición Química del cactus “San Pedro Macho” (*E. peruviana*)

a) Análisis cualitativo – Marcha fitoquímica

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

En la bibliografía revisada, no se ha encontrado ningún trabajo de análisis cualitativo del cactus *E. peruviana*. Sin embargo, precedentemente se realizó el estudio del cactus “San Pedro Hembra” (*E. pachanoi*) (Flores - 2000¹, Reyna & Flores - 2001²). El análisis cualitativo realizado en esta planta indica la presencia de alcaloides (+++), triterpenos (+++), esteroides (+++), catequinas (+), saponinas (++), aminogrupos primarios y/o secundarios (+++) y grupos fenólicos (+). Además, se demostró que el cactus no contiene quinonas, taninos, leucoantocianidinas ni flavonoides. Tales resultados fueron obtenidos empleando el procedimiento de Rondina & Coussio - 1969³, y se confirmaron mediante ensayos específicos descritos por Villacrés - 1995⁴.

b) Principales alcaloides presentes en el cactus “San Pedro Macho”

El cactus *E. peruviana* contiene alcaloides que tienen la estructura básica de la feniletilamina, siendo la mescalina (a) el alcaloide más importante (0,817 % en el cactus seco, obtenido como clorhidrato de mescalina, Pardanani, J. *et al.* - 1977⁵). También se encuentran pequeñas cantidades de tiramina (b); 3-metoxitiramina (c); 3,4-dimetoxifeniletilamina (d); 3,5-dimetoxi-4-hidroxifeniletilamina (e) y otros dos compuestos no identificados (Agurell, S - 1969⁶, Pardanani, J. *et al.* - 1977⁵ y Trout - 2011⁷), cuyas estructuras se muestran en la Figura 1, en la cual se incluye la estructura básica de la feniletilamina (f).

* 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, mucílagos, ceras, etc.

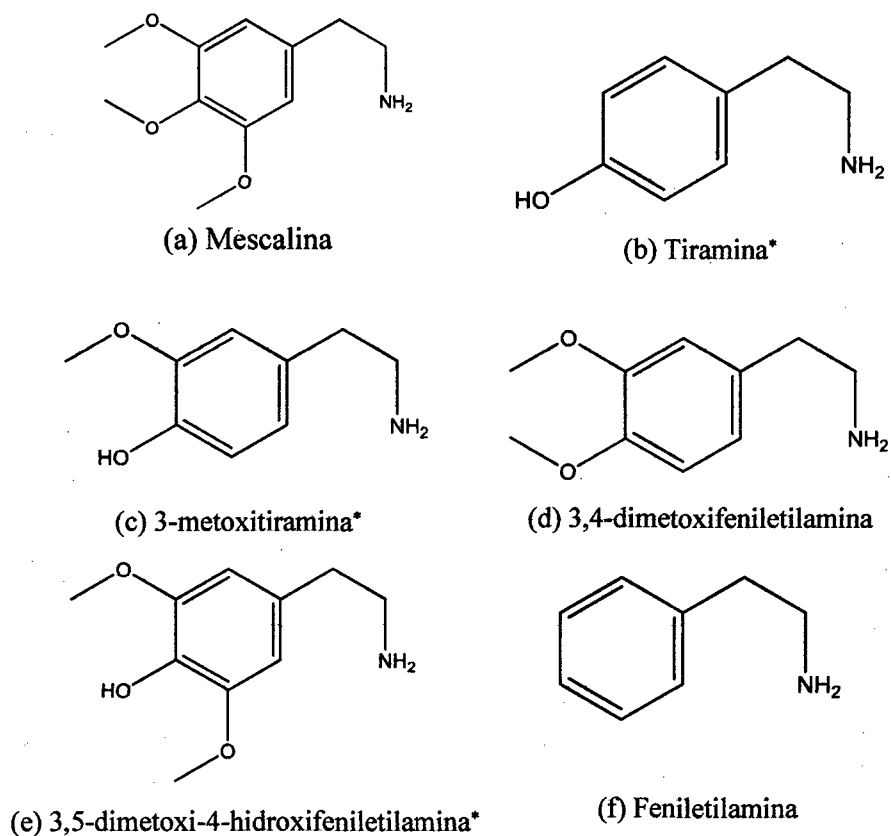


Figura 1. Principales alcaloides presentes el cactus “San Pedro Macho” (*E. peruviana*).

c) Análisis cuantitativo de alcaloides en el cactus “San Pedro Macho”

En la bibliografía hemos encontrado dos reportes de la determinación cuantitativa del total de alcaloides presentes en el cactus *Echinopsis peruviana*:

- i. Cjuno, M. *et al.* - 2009⁸ reportan el contenido mescalínico en el *Echinopsis (Trichocereus) peruviana* (recolectado en junio del 2008 en Chavín de Huántar, Huari, Ancash, 3090 m.s.n.m.) siguiendo el procedimiento de extracción ácida de la muestra (corteza verde, incluyendo epidermis) seca y desmenuzada; regeneración de los alcaloides libres a través de la basificación del extracto ácido hasta $pH = 12$ (de esta manera en la siguiente etapa no se extraen las bases fenólicas), los cuales fueron extraídos con cloroformo. El extracto básico se precipita como clorhidrato (en cloruro de hidrógeno, $HCl_{(g)}$, disuelto en éter etílico) y se pesa la sal así obtenida habiendo obtenido 0,25 % de mescalina en la corteza seca del cactus, ver Tabla 1.

* Intermediarios en la biosíntesis o biogénesis de la mescalina (ver Sec. A. 5)

- ii. Ogunbodede, O. *et al.* - 2010⁹ reportan el contenido mescalínico del *E. peruviana*, mediante HPLC*, habiendo obtenido 0,24 % de mescalina en la corteza seca de los tallos del cactus (la muestra fue recolectada en el Distrito de Matucana, Región de Lima por la empresa Karel Knize).

Es pertinente remarcar la gran similitud de estos dos resultados con muestras recolectadas en dos regiones diferentes (Huari – Ancash y Matucana – Lima).

Adicionalmente, Pardanani, J. *et al.* - 1977⁵ reporta el aislamiento del clorhidrato de mescalina (0,817 %) a partir del cactus “San Pedro Macho” cultivado en Abbey Graden – California, Estados Unidos.

En contraposición con estos resultados Djerassi, C., *et al.* – 1955¹⁰ y Agurell – 1969⁶ reportan no haber encontrado mescalina en el cactus *E. peruviana*.

Tabla 1. Porcentaje (%) de alcaloides presentes en cactus “San Pedro Macho” reportados en la literatura

Nro.	Autor	Parte del cactus	Procedencia de la muestra	Compuesto obtenido	% (respecto al cactus seco)
1	Cjuno, M., <i>et al.</i> – 2009	Corteza	Chavín de Huántar, Ancash, Perú	Mescalina HCl	0,25
2	Ogunbodede, O., <i>et al.</i> – 2010	Corteza	Matucana, Lima, Perú	Mescalina	0,24
3	Pardanani, J., <i>et al.</i> – 1977	Corteza y pulpa	Abbey Garden, California, USA	Mescalina HCl	0,817
4	Djerassi, C., <i>et al.</i> – 1955		Chosica, Lima, Perú	-	-
5	Agurell, S. - 1969		Países Bajos o Suecia	-	-

* HPLC: Cromatografía líquida de alta presión/Cromatografía Líquida de Alta Performancia.

2. Aislamiento de alcaloides del cactus “San Pedro Macho” (*E. peruviana*)

En la bibliografía se reportan dos trabajos que tratan del aislamiento del clorhidrato de mescalina a partir del cactus “San Pedro Macho”: Cjuno, M. *et al.* - 2009⁸ y Pardanani, J. *et al.* - 1977⁵.

A continuación se describen ambos procedimientos, los cuales para una mejor comprensión, se presentan divididos en subtítulos (muestra utilizada, extracción sólido – líquido, separación líquido – líquido, purificación e identificación).

a) Procedimiento de Cjuno, M., *et al.* - 2009⁸

“El género *Trichocereus*, Ecología y Contenido Mescalínico”

- **Muestra utilizada**
 - i. Muestra: Corteza verde incluyendo epidermis del cactus “San Pedro Macho” (Chavín de Huántar, Huari, Ancash, 3090 m.s.n.m., junio del 2008).
 - ii. Secado de la muestra: El material se seca en estufa a 40 °C.
- **Extracción sólido –líquido (Obtención del Extracto Bruto Orgánico, EBO)**
 - iii. El material vegetal seco y desmenuzado se somete a extracción ácida.
- **Separación líquido - líquido (Obtención del Extracto Bruto de alcaloides, EBA)**
 - iv. El extracto ácido se basicifica a $pH = 12$ (de esta manera no se extraen las bases fenólicas) y extracción con cloroformo.
- **Purificación y obtención del clorhidrato de mescalina**
 - v. El extracto básico se precipita con HCl etéreo y se pesa la sal obtenida, clorhidrato de mescalina.
 - vi. La pureza del producto se ensaya por CCF (SiGel G60; $CHCl_3$: MeOH : NH_3 ; 9:1:0,1; K_2PtI_6) y espectroscopía IR.

b) Procedimiento de Pardanani, J., *et al.* - 1977⁵

“Cactus alkaloids. XXXVI. Mescaline and related compounds from *Trichocereus peruviana*”.

- **Muestra utilizada**
 - i. Muestra: Cactus “San Pedro Macho” (Abbey Garden – California, USA) seco y pulverizado (400 g).
- **Extracción sólido –líquido (Obtención del Extracto Bruto Orgánico, EBO)**
 - ii. Desengrase con éter de petróleo, se eliminan 7 g de lípidos (1,7 %)
 - iii. Basicificación con cloroformo: metanol: amoníaco acuoso $NH_{3(ac)}$ (2:2:1).
 - iv. Extracción por percolación con 1,5 litros de cloroformo: metanol: amoníaco acuoso $NH_{3(ac)}$ (9:0,9:0,1) y posterior extracción con 18 L de cloroformo.

- v. Concentración en rotavapor a un jarabe viscoso.
 - **Separación líquido - líquido (Obtención del Extracto Bruto de alcaloides, EBA)**
- vi. Disolución del jarabe viscoso con una solución de ácido clorhídrico $\text{HCl}_{(\text{ac})}$ 1 N 6 x 200 mL.
- vii. Combinación y filtrado de los extractos acuosos. Extracción (6 veces) con 1 L de una mezcla de volúmenes iguales de cloroformo CHCl_3 y éter etílico $\text{C}_2\text{H}_5\text{OC}_2\text{H}_5$, respectivamente.
- viii. Ajuste del pH de la solución acuosa ácida a 8,5; 9,5 y 10,5 con una solución de hidróxido de sodio $\text{NaOH}_{(\text{ac})}$ 7,5 N. A cada valor de pH , la fracción acuosa se extrae con 3 L de una mezcla de volúmenes iguales de cloroformo CHCl_3 y éter etílico $\text{C}_2\text{H}_5\text{OC}_2\text{H}_5$, respectivamente.
- ix. Secado de los extractos orgánicos con sulfato de sodio anhidro $\text{Na}_2\text{SO}_{4(\text{s})}$, y concentración al vacío.
- x. Disolución de la fracción de alcaloides resultante en etanol (1 mL por cada 15 g de droga seca); si es necesario se filtra.
- xi. La disolución etanólica se adiciona a una columna de resina de intercambio iónico Amberlita IRA - 401 S en forma de hidróxido (OH) (20 g en 100 g de planta seca). La columna se lava con etanol, continuándose hasta que las fracciones efluentes sean incoloras. Estos extractos etanólicos se evaporan a sequedad sobre un baño de vapor, obteniéndose el extracto de alcaloides no fenólicos (mescalina).
- xii. La fracción no fenólica se disuelve en una solución de ácido clorhídrico $\text{HCl}_{(\text{ac})}$ 0,5 N y se vuelve a tratar como se indica en las etapas vi a viii.
 - **Purificación y obtención del clorhidrato de mescalina**
- xiii. Disolución del residuo de base libre en una pequeña cantidad de etanol absoluto.
- xiv. Adición de una solución de $\text{HCl}_{(\text{g})}$ en etanol absoluto, al 5 % y disminución del pH a 2.
- xv. Adición de éter etílico $\text{C}_2\text{H}_5\text{OC}_2\text{H}_5$ para inducir la cristalización y luego de enfriar se obtiene 2,868 g de clorhidrato de mescalina.
- xvi. Se empleó CCF para recuperar 400 mg de mescalina (como clorhidrato de mescalina) a partir de los líquidos madres.

Adicionalmente, es preciso indicar que en la bibliografía se presenta el aislamiento del clorhidrato y del sulfato de mescalina a partir del cactus "San Pedro Hembra" (*E. pachanoi*): Turner & Heyman - 1960¹¹, Poisson - 1960¹² y Crosby & McLaughlin - 1973¹³.

3. Identificación clásica de la mescalina y/o derivados

a) Comportamiento cromatográfico

i. Cromatografía en capa fina - CCF: Flores - 2000¹

Adsorbente : Sílica Gel 60F – 254 (Merck)

Eluente : Cloroformo – Acetona – Amoníaco 15 N (10:17:1)

Revelador: Ninhidrina al 2 % en Etanol

R_f : 0,82

ii. Cromatografía en capa fina - CCF: Pardanani, J., *et al.* - 1977⁵

Adsorbente : Sílica Gel 60F – 254 (Merck)

Eluentes:

- F: Éter etílico – MeOH – amoníaco acuoso 58 % (17:2:1)

- G: Cloroformo – Me₂CO – amoníaco acuoso 58 % (17:10:1)

Revelador: Fluorescamina y bencidina tetrazotizada – luz UV

R_f : 0,58 (Eluente F). No indican R_f para el eluente G.

iii. Cromatografía en capa fina - CCF: Ma, W. W., *et al.* - 1986¹⁴

Adsorbente : Sílica Gel 60F – 254 (Merck)

Eluentes*:

- Me₂CO – Et₂O – MeOH – NH_{3(ac)} (6:6:5:1)

- Et₂O – MeOH – NH_{3(ac)} (8:4:1)

- CHCl₃ – EtOH – NH_{3(ac)} (7:7:1)

Revelador: Fluorescamina y luz UV (Color: Verde amarillento característico)

R_f : No proporcionan valores de R_f

iv. Cromatografía papel: Turner & Heyman – 1960¹¹

Adsorbente : Papel Whatman N°1

Eluente : Butanol – ácido acético – agua (4:1:1)

R_f : 0,48

b) Punto de fusión

i. Mescalina: 35 – 36 °C (The Merck Index – 1996)

ii. Sulfato de mescalina y sulfato ácido de mescalina

Sulfato ácido 158 °C (The Merck Index – 1996) (Hahn & RumpH – 1938, citado por Patel – 1968)

Sulfato ácido 183 °C (Tsao – 1951) (Obtenida por síntesis)

Sulfato ácido·H₂O 183 – 186 °C (Patel – 1968)

Sulfato 184 °C (Turner & Heyman – 1960)

* Abreviaturas: Me₂CO = Acetona, MeOH = metanol; Et₂O = éter etílico; EtOH = etanol

Sulfato	185 – 186 °C (Patel - 1968)
Sulfato ácido·2H ₂ O	183 – 186 °C (The Merck Index – 1996) (Späth – 1919)
Sulfato ácido·2H ₂ O	183 °C (Flores – 2000)

iii. Clorhidrato de mescalina

181 °C	(The Merck Index – 1996)
180 – 181 °C	(Benington & Morin – 1951) (Obtenida por síntesis)
181 – 182 °C	(Reti & Castrillón – 1951)
182 °C	(Poisson – 1960) (Recristalizado con CH ₃ OH – éter)
184 – 185 °C	(Crosby & McLaughlin – 1973) (Recristalizado en etanol absoluto – éter absoluto)
183 – 184 °C	(Pardanani, R., <i>et al.</i> – 1977) (Recristalizado en etanol absoluto – éter absoluto)

iv. Picrato de mescalina

218 °C	(Poisson – 1960) (Recristalizado en metanol)
224 °C	(Turner & Heyman – 1960)
217 °C	(Tsao – 1951) (Con descomposición) (Recristalizado en metanol)

4. Identificación espectroscópica de la mescalina y/o derivados

En la Sección I.B.5 (Identificación espectroscópica de compuestos orgánicos, pág. 43) se presentarán los aspectos generales y la importancia de las principales técnicas espectroscópicas en la determinación de la estructura molecular: La Espectroscopía de Masas (EM), la Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno (RMN¹H) y de Carbono (RMN¹³C), así como la espectroscopía de Infrarrojo (IR) y de Ultravioleta (UV).

a) Espectros de masas de la mescalina y compuestos análogos

i. National Institute of Standards and Technology (NIST) Mass Spectrometry Data Center - 2014²²

A través del siguiente sitio web:

<http://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C54046&Units=SI&Mask=200#Mass-Spec>
se obtuvo el espectro de masas de la mescalina proporcionada por el NIST Chemistry WebBook, ver Figura 2, en el cual se pueden los valores de los iones y su intensidad relativa.

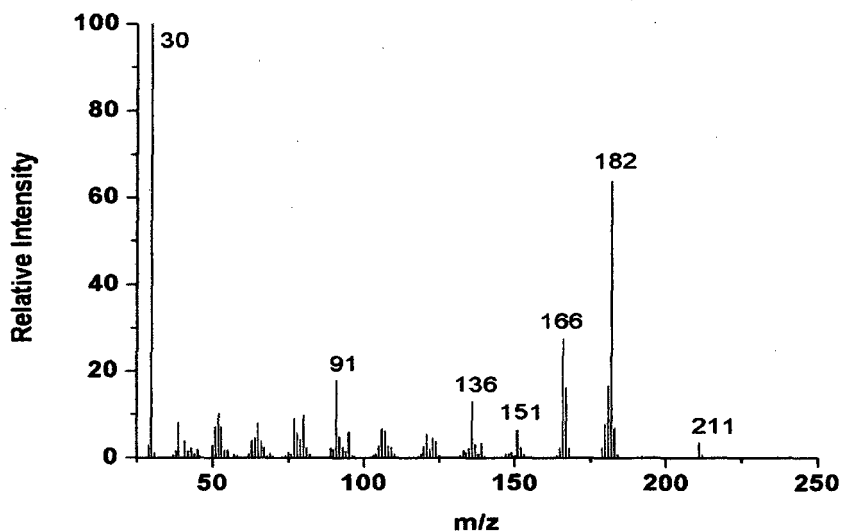


Figura 2. Espectro de masas (EI) de la mescalina (NIST Chemistry WebBook - 2014).

ii. Mills III, T., *et al.* - 2006²³

La serie de libros de referencia 'Instrumental Data for Drug Analysis' recopila información espectroscópica de 1638 compuestos, como sus espectros de masas (EM), RMN, IR, UV, así como sus cromatogramas CG y HPLC.

En este libro se presenta el espectro de masas de la mescalina (Figura 3) donde se observan los principales picos y sus intensidades relativas, pero sin indicar el tipo de espectrómetro de masas utilizado: 211 (28 %), 182 (100 %), 167 (60 %), 151 (20 %).

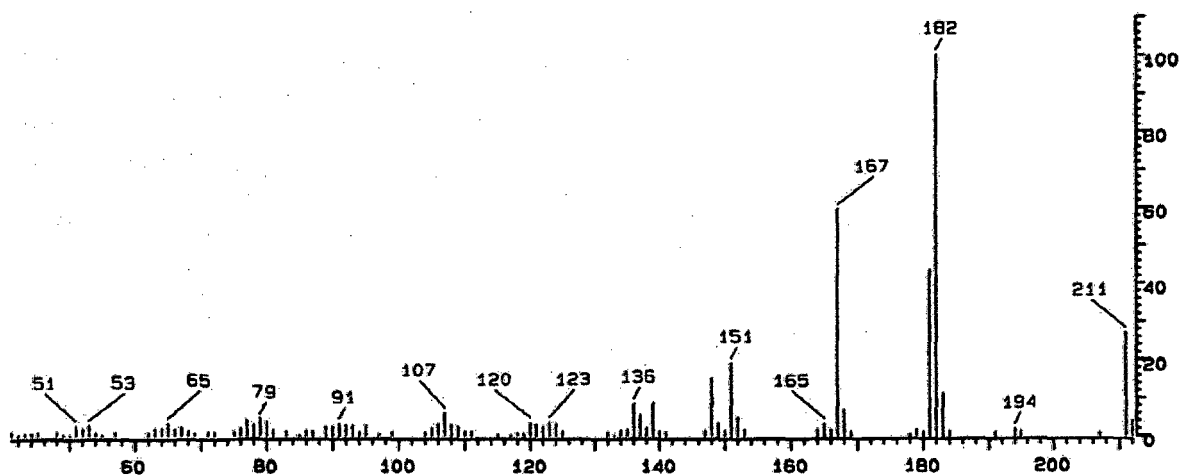


Figura 3. Espectro de Masas de la mescalina (Instrumental Data for Drug Analysis, 3rd Ed. 2006).

iii. Scientific Working Group for the Analysis of Seized Drugs (SWGDRUG) - 2005²⁴

El Grupo Científico de Trabajo para el Análisis de Drogas Incautadas (SWGDRUG) publicó en el 2005 un trabajo monográfico respecto a la mescalina, en el que presentan su espectro de masas (Figura 4) indicándose sus principales fragmentos.

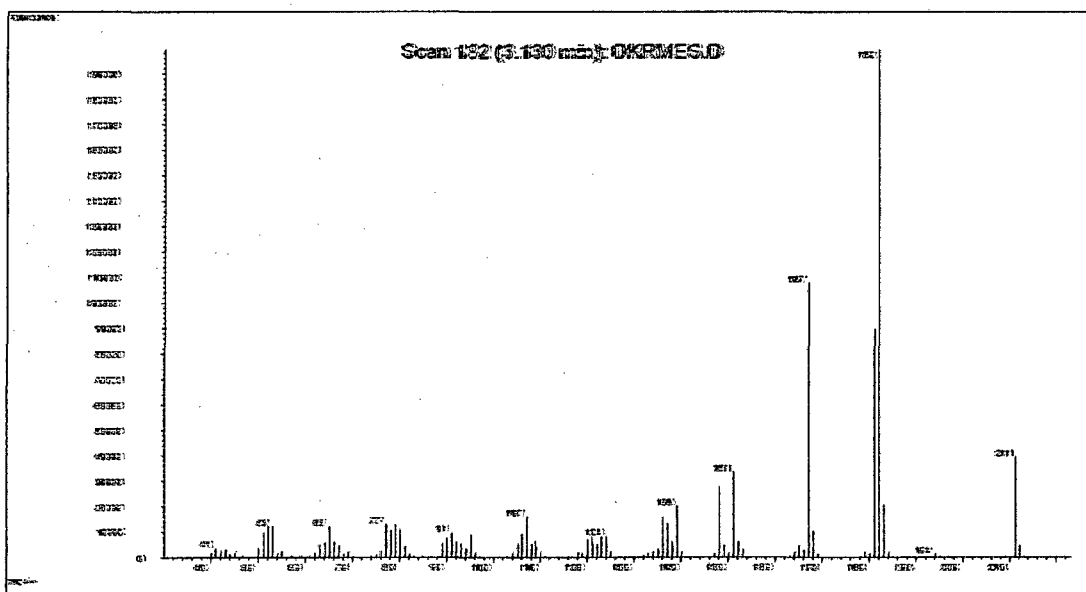


Figura 4. Espectro de masas de la mescalina (SWGDRUG - 2005).

iv. Henry, J., et al. - 2003²⁵

Proporciona el espectro de masas de la mescalina con sus fragmentos característicos, obtenidos en un equipo de Cromatografía de Gases – Espectrometría de Masas (CG/MS SIM) (Figura 5).

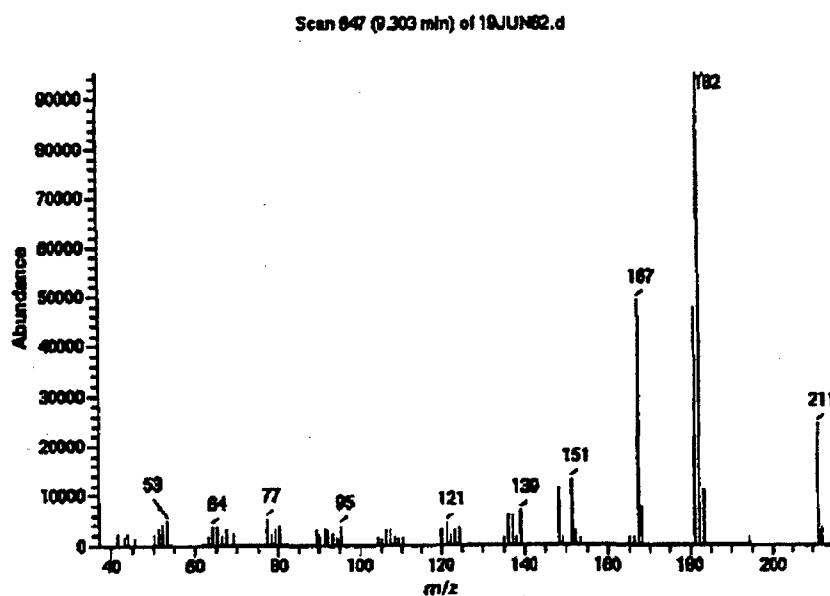


Figura 5. Espectro de masas (EI) de la mescalina (Henry, J., et al. - 2003).

v. Flores - 2000¹

Proporcionan el espectro de masas de la mescalina (aislada de *E. pachanoi*), ver Figura 6, y los principales fragmentos iónicos correspondientes a los picos: 211 (ión molecular M^+ , 37,1 %), 182 (pico base, 100 %), 167 (48,9 %) y 151 (12,2 %), obtenidos en un Espectrómetro MS 5870B (70 eV - Proceso de ionización por impacto de electrones).

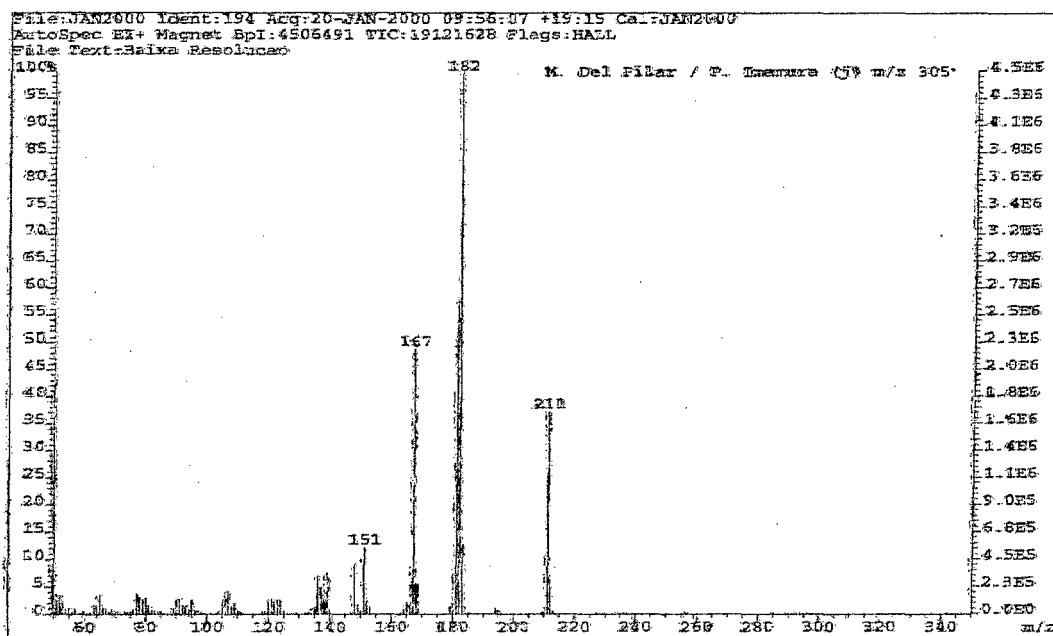


Figura 6. Espectro de masas (EI) de la mescalina (Flores - 2000).

vi. Fucci & Chiarotii - 1996²⁶

Reportan los iones característicos de la mescalina obtenidos en un Espectrómetro de Masas HP 5971A operado por Impacto Electrónico (EI, 70 eV) en modos de análisis SIM (Selected Ion Monitoring) y TIC (Total Ion Monitoring).

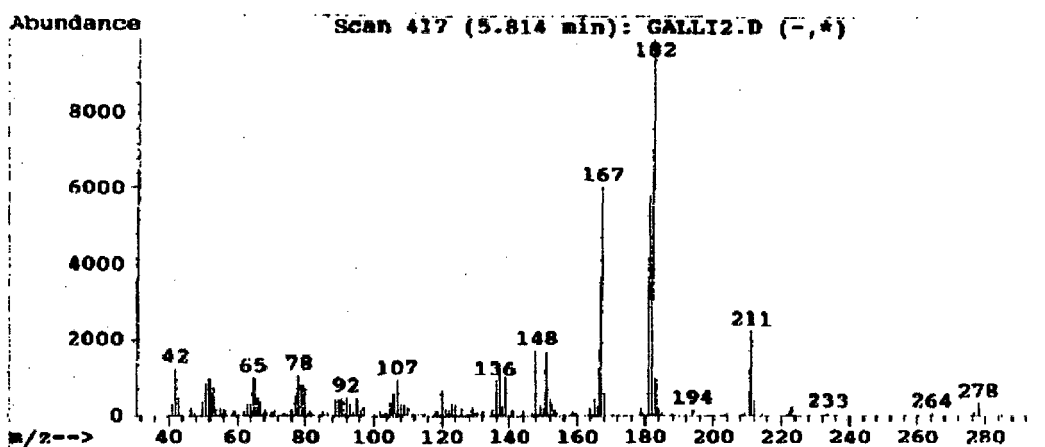


Figura 7. Espectro de Masas (EI) de la mescalina (Fucci & Chiarotii - 1996).

vii. Ikan - 1991²⁷

Reporta los valores de los iones característicos (y su abundancia relativa) del espectro de masas de la mescalina; sin embargo, no hace referencia al tipo de espectrómetro de masas empleado: 211 (17 %), 183 (7 %), 182 (34 %), 167 (25 %), 151 (6 %), 44 (100 %), 30 (70 %).

viii. Recommended Methods for Testing Peyote Cactus (Mescal Buttons)/Mescaline and Psilocybe Mushrooms/Psilocybin – 1989²⁸

El presente manual corresponde a una serie de publicaciones cuyo objetivo es el de facilitar el análisis y la identificación de varios grupos de drogas controladas internacionalmente.

En este manual se presentan los iones característicos de la mescalina, sin indicación del tipo de espectrómetro de masas empleado: 211 (Ion molecular), 182 (Pico base), 167, 151.

ix. Ma, W. W., et al. - 1986¹⁴

Proporciona los iones característicos de la mescalina y de dos compuestos análogos, obtenidos en un Espectrómetro de masas Finnigan TSQ (Modelo 4500) de triple cuadrupolo.

- Mescalina, m/z: 212 (M+H)⁺, 195 (M+H – CH₃)⁺, 180 (M+H – NH₃-CH₃)⁺, 168 (M+H – Cadena lateral)⁺, 165 (M+H – NH₃-CH₂O)⁺.
- 3,4-dimetoxi-β-feniletilamina, m/z: 182 (M+H)⁺, 165 (M+H – CH₃)⁺, 150 (M+H – NH₃-CH₃)⁺, 138 (M+H – Cadena lateral)⁺.
- 3,4-dimetoxi-4-hidroxi-β-feniletilamina, m/z: 198 (M+H)⁺, 181 (M+H – CH₃)⁺, 166 (M+H – NH₃-CH₃)⁺, 153 (M+H – Cadena lateral)⁺, 121 (M+H – NH₃-CH₂O)⁺.

x. Becker - 1985²⁹

Proporciona el espectro de masas y, además, los principales fragmentos y los iones que le corresponden, así como las intensidades relativas respectivas, de la mescalina obtenida del Peyote (*Lophora williamsii*); sin indicación del tipo de espectrómetro de masas empleado: 211 (38,55 %), 182 (63,86 %), 181 (51,81 %), 167 (45,78 %).

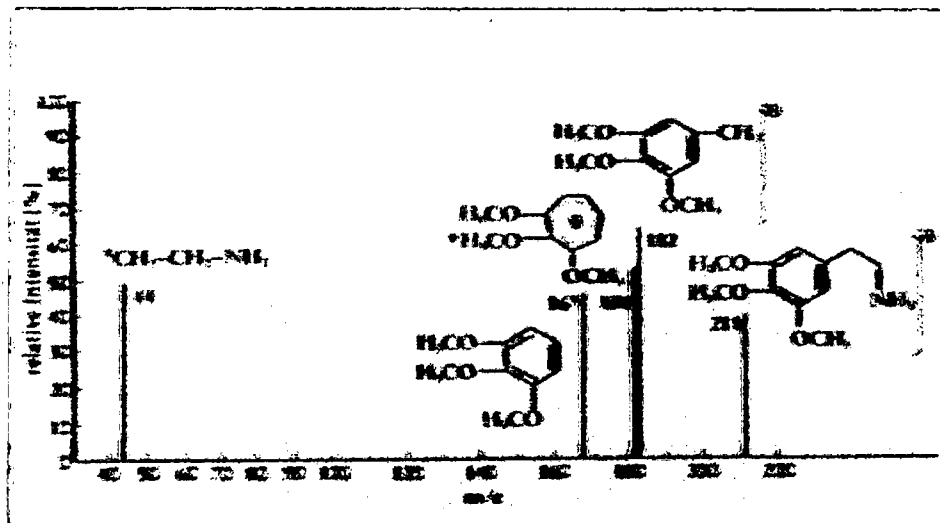


Figura 8. Espectro de masas de la mescalina (Becker - 1985).

xi. Agurell - 1969⁶

Proporciona los espectros de masas los dos últimos compuestos de Ma, W. W., *et al.* - 1986¹⁴ y, además, de la 5 - metoxitiramina, pero no de la mescalina, tal como se reproduce en la Figura 9. En este caso el análisis se realizó con un equipo acoplado de Cromatografía de Gases - Espectrómetro de Masas LKB 9000.

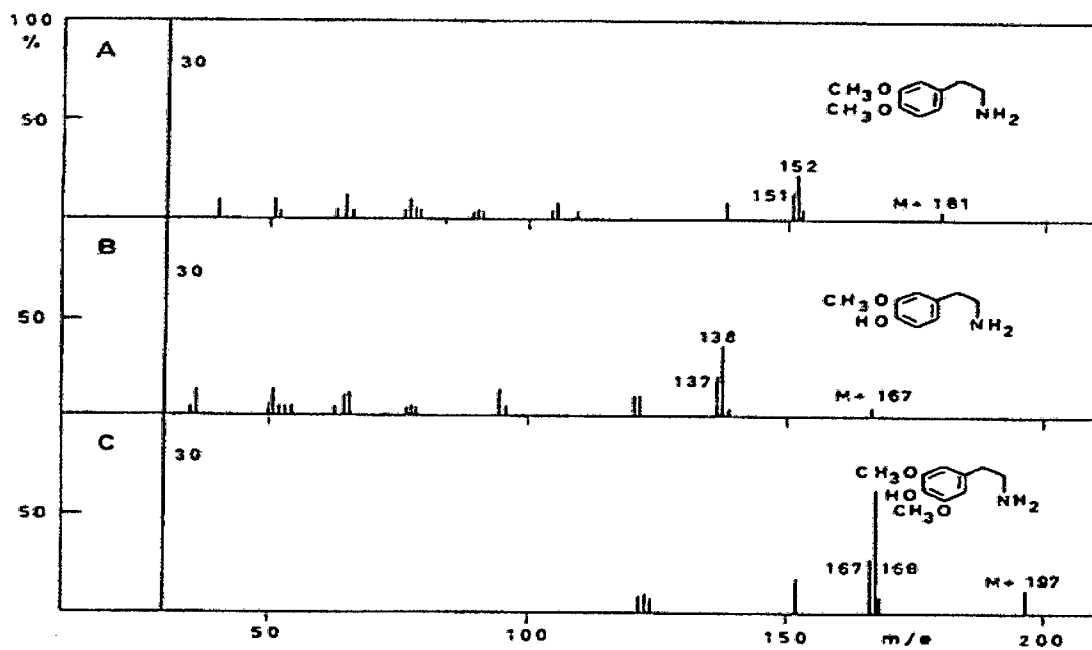


Figura 9. Espectro de masas (EI) de la 3,4-dimetoxi-β-feniletilamina (A), 3,4-dimetoxi-4-hidroxi-β-feniletilamina (B) y 3,5-dimetoxi-4-hidroxifeniletilamina (C) (Agurell - 1969).

xii. Comparación de Espectros de Masas

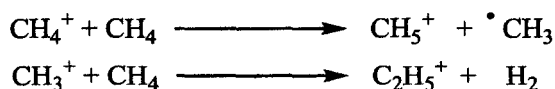
Es pertinente resaltar la ligera diferencia, en una unidad, que se presenta en el valor de dos de los iones característicos de los compuestos comunes proporcionados por estos autores, tal como lo indicamos a continuación:

- 3,4-dimetoxi-β-feniletilamina,
m/z: 182, 150 (Ma, W. W., *et al.* - 1986)
181, 152, 151 (Aguirell - 1969)
- 3,4-dimetoxi-4-hidroxi-β-feniletilamina
m/z: 198, 166 (Ma, W. W., *et al.* - 1986)
197, 168, 167 (Aguirell - 1969)

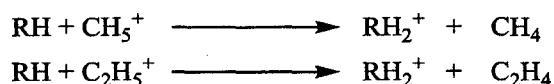
Esta diferencia en una unidad se debe a que los dos equipos empleados se basan en principios distintos para ionizar la muestra.

El grupo de Agurell - 1969⁶ utiliza un equipo de ionización por impacto electrónico (EI), el cual proporciona picos correspondientes a las masas de los fragmentos que se producen a partir del ion molecular, es decir, los valores verdaderos de tales masas.

Por otro lado, el grupo de Ma, W. W., *et al.* - 1986¹⁴, utiliza la técnica de ionización química, mediante la cual se obtienen los iones $M + 1$, de acuerdo al fenómeno descrito a continuación: la muestra se introduce casi a presión atmosférica, con un gran exceso de metano. El metano se ioniza (en la forma usual) para dar lugar a los iones primarios CH_4^+ , CH_3^+ , etc. Estos iones reaccionan con el exceso de metano para dar lugar a los iones secundarios CH_5^+ y C_2H_5^+ , de acuerdo a las siguientes ecuaciones:



Finalmente, los iones secundarios reaccionan con la muestra (RH):



produciendo los iones $M + 1$ (iones cuasimoleculares), los cuales por lo general son intensos.

La Tabla 2 resume, para la mescalina, los iones característicos, así como sus porcentajes de intensidad reportados por NIST - 2014²²; Mills, T., *et al.* - 2006²³; SWGDRUG - 2005²⁴; Henry, J., *et al.* - 2003²⁵; Flores - 2000¹; Fucci & Chiarotti - 1996²⁶; Ikan - 1991²⁷ y Becker - 1985²⁹. En esta Tabla 2, hemos incluido los valores de

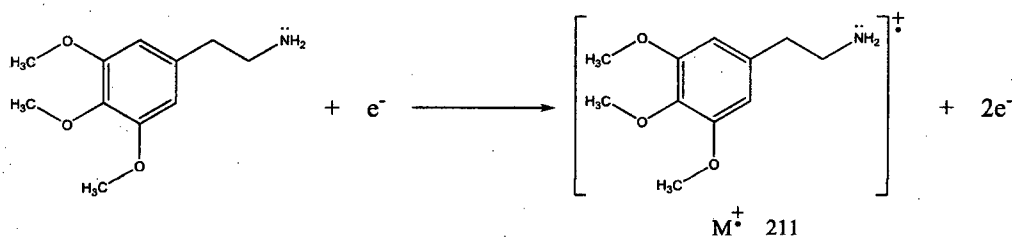
los iones característicos que obtuvimos en el espectro de masas de la mescalina que aislamos del cactus *E. peruviana*.

Tabla 2. Porcentajes de los iones característicos para la mescalina

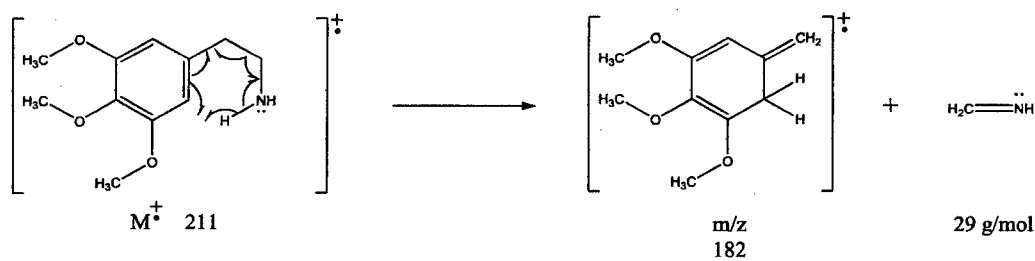
m/z	%					
	Tesis Baldera (2014)	NIST (2014)	Mills III, T., et al. (2006)	Flores (2000)	Ikan (1991)	Becker (1985)
211	11,37	3,40	28	37,15	28,81	38,55
183	44,84	6,71	12	12,16	11,86	-
182	100	63,82	100	100	100	63,86
181	69,40	16,53	44	57,59	57,62	51,81
167	50,41	16,03	60	48,86	42,37	45,78
151	17,63	6,21	20	12,16	10,17	-

xiii. Ecuaciones de fragmentación de los principales picos

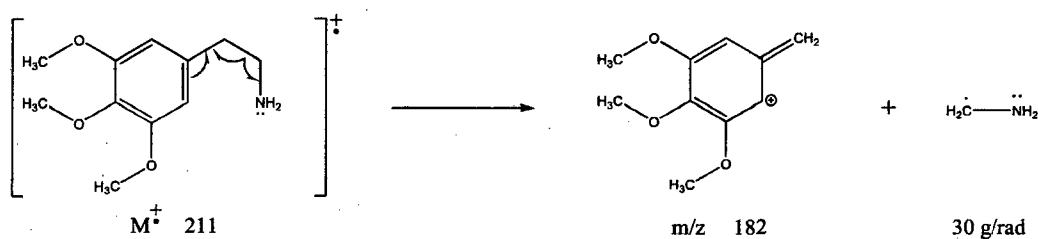
$M^+ 211$



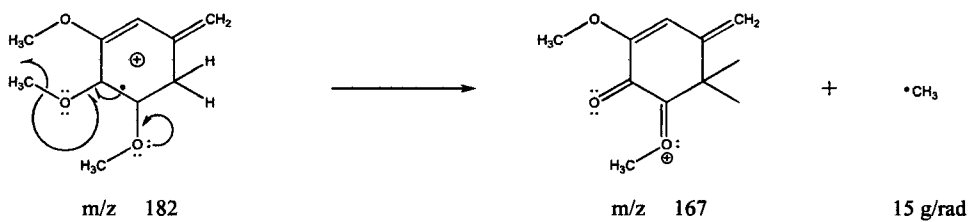
$m/z 182: (M^+ - CH_2NH)$



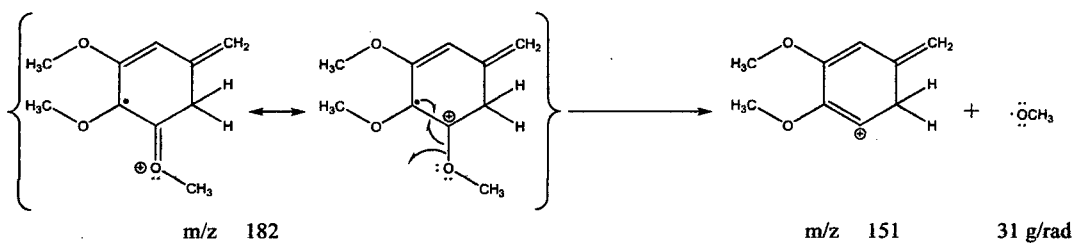
$m/z 181: (M^+ - CH_2NH_2)$



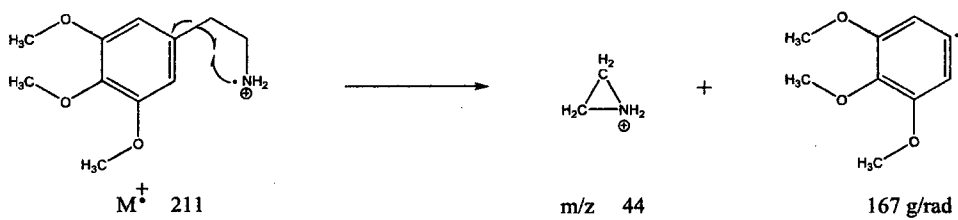
m/z 167: (m/z 182 - CH₃)



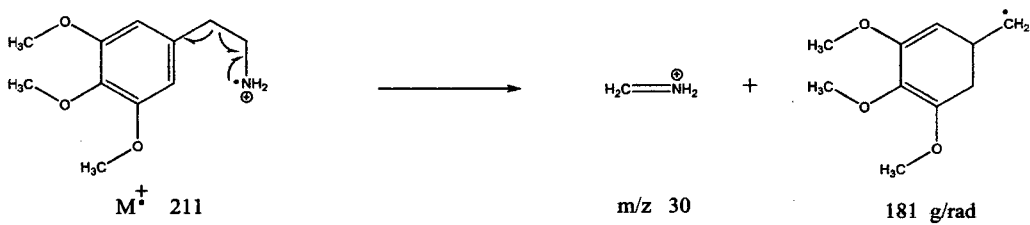
m/z 151: (m/z 182 - OCH₃)



m/z 44:



m/z 30:



b) Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno, RMN¹H

En la bibliografía se presentan los espectros de RMN¹H de la mescalina (base libre – i, ii), del clorhidrato de mescalina (iii) y del sulfato de mescalina dihidratado (iv).

Para la interpretación de los espectros de RMN¹H que se hará en la presente tesis se adoptará la siguiente notación:

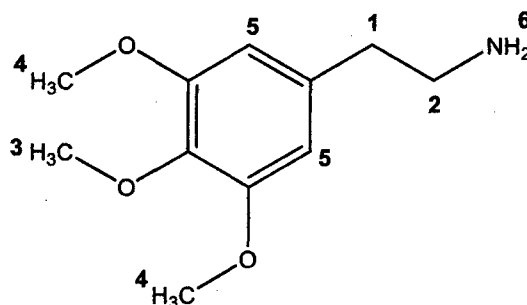


Figura 10. Numeración de la estructura de la mescalina para los átomos de hidrógeno.

i. Soderquist, J., *et al.* - 2006³⁰ : Mescalina (base libre)

Reporta los desplazamientos químicos del espectro RMN¹H (300 MHz) de la mescalina (base libre, P. fusión = 32 – 34 °C) en CDCl₃, obtenida por síntesis:

δ (ppm) = 2,81 (t, 2 H); 2,98 (m, 2 H); 3,77 (s, 3 H); 3,80 (s, 6 H); 6,42 (s, 2 H).

ii. SWGDRUG - 2005²⁴ : Mescalina (base libre)

Proporciona el espectro RMN¹H (400 MHz) para la mescalina, como base libre, en CDCl₃, sin indicación del tipo de espectrómetro de resonancia magnética nuclear empleado (Figura 11).

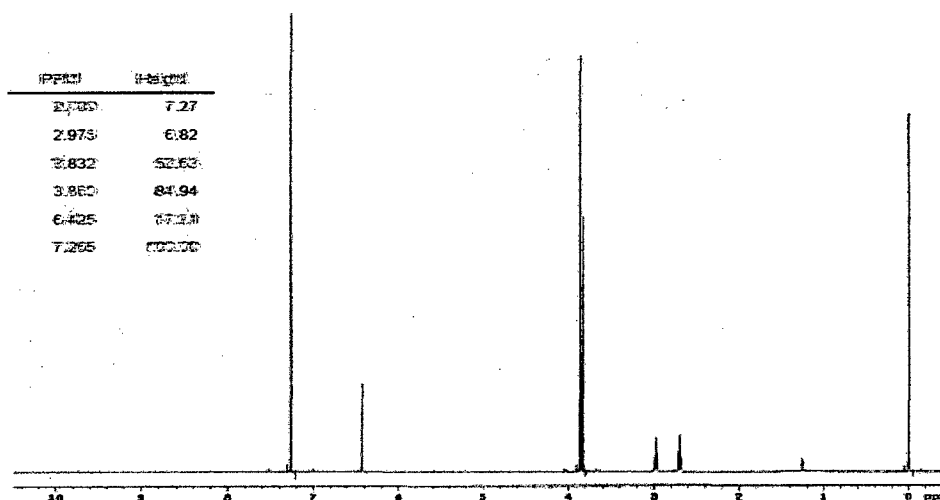


Figura 11. Espectro de RMN¹H (400MHz) en CDCl₃ de la mescalina, como base libre (SWGDRUG - 2005).

Observación.- La señal, δ = 7,265 ppm (singlete), corresponde al solvente CDCl₃.

iii. Mills III, T., *et al.* - 2006²³ : Clorhidrato de mescalina

Proporciona el espectro RMN¹H para el clorhidrato de mescalina, Mescalina HCl, en CDCl₃/CD₃OD y obtenido en un Espectrómetro FTNMR (Figura 12).

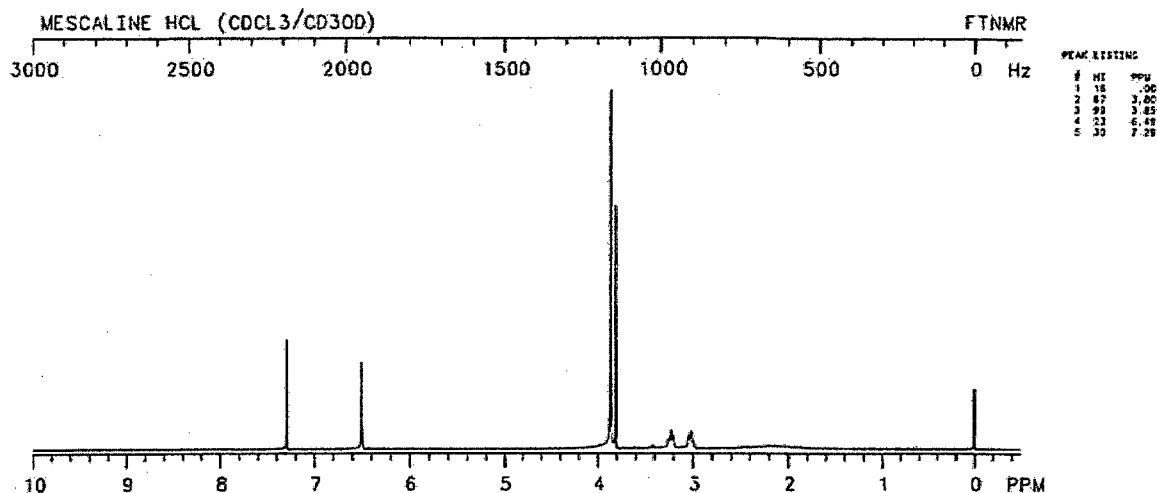


Figura 12. Espectro de RMN¹H en CDCl₃/CD₃OD del clorhidrato de mescalina (Mills III, T., *et al.* - 2006).

Observación.- Las señales, $\delta = 3,05 - 3,25$ ppm (multipletes) y 7,29 ppm (singlete), corresponde a los solvente CD₃OD y CDCl₃, respectivamente.

iv. Flores - 2000¹ : Sulfato de mescalina dihidratado

Proporcionan el espectro RMN¹H (500 MHz) del sulfato de mescalina dihidratado, aislado del cactus *E. pachanoi*, en D₂O y obtenido en un Espectrómetro RMN Varian – Inova 500, como se muestra en la Figura 13.

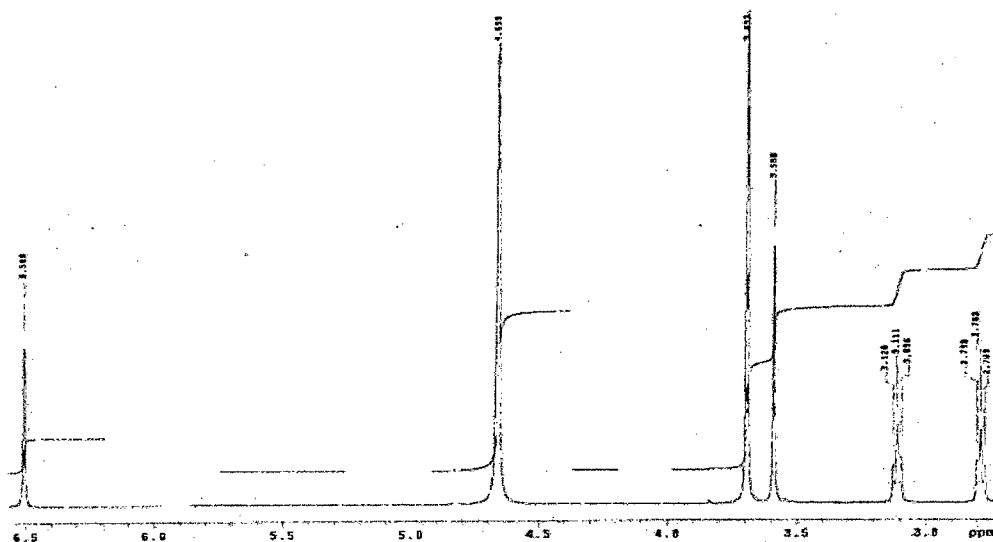


Figura 13. Espectro de RMN¹H (500 MHz) en D₂O del sulfato de mescalina dihidratado (Flores - 2000).

v. Comparación de espectros RMN¹H

En la Tabla 3 se resumen estos resultados y, además, se incluyen los valores que obtuvimos en el espectro de RMN¹H de la mescalina (sulfato dihidratado) que aislamos del cactus *E. peruviana*, en DMSO-*d*₆ y D₂O (los cuales se presentan en la Sec. II. I. 2, 3, Pág. 79), observando la correspondencia que hay entre los valores encontrados y aquellos de Flores - 2000¹.

Tabla 3. Desplazamientos químicos (δ , ppm) de los átomos de hidrógeno en el espectro RMN¹H de distintos derivados de la mescalina

Numeración del átomo de Hidrógeno	Mescalina·H ₂ SO ₄ ·2H ₂ O		Mescalina·HCl		Mescalina	
	Tesis Baldera (2014)		Flores (2000)	Mills III, T., <i>et al.</i> (2006)	Soderquist, J., <i>et al.</i> (2006)	SWGDRUG (2005)
	DMSO- <i>d</i> ₆	D ₂ O	D ₂ O	CDCl ₃ /CD ₃ OD	CDCl ₃	CDCl ₃
H-1	2,67	2,94	2,78	-	2,81	2,700
H-2	2,89	3,26	3,11	-	2,98	2,976
H-3	3,62	3,75	3,58	3,80	3,77	3,832
H-4	3,76	3,85	3,69	3,85	3,80	3,860
H-5	6,52	6,67	6,50	6,49	6,42	6,425
H-6	3,32 ^b	4,79 ^a	4,65 ^a	-	-	-

Observación.-

^a Estas señales corresponden al solvente D₂O.

^b Señal correspondiente a NH₂ parcialmente solapado con la señal residual de HDO.

c) **Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear de Carbono, RMN¹³C**

En la bibliografía se presentan los espectros de RMN¹³C de la mescalina (base libre – i, ii), del clorhidrato de mescalina (ii) y del sulfato de mescalina dihidratado (iii).

Para la interpretación de los espectros de RMN¹³C que se hará en la presente tesis se adoptará la siguiente notación:

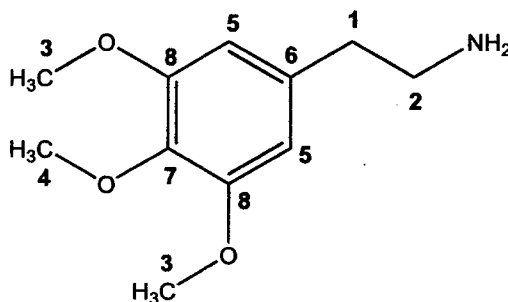


Figura 14. Numeración de la estructura de la mescalina para los átomos de carbono.

i. **Soderquist, J., et al. - 2006³⁰ : Mescalina (base libre)**

Reporta los desplazamientos químicos del espectro RMN¹³C (75 MHz) de la mescalina (base libre, P. fusión = 32 – 34 °C) en CDCl₃, obtenida por síntesis:

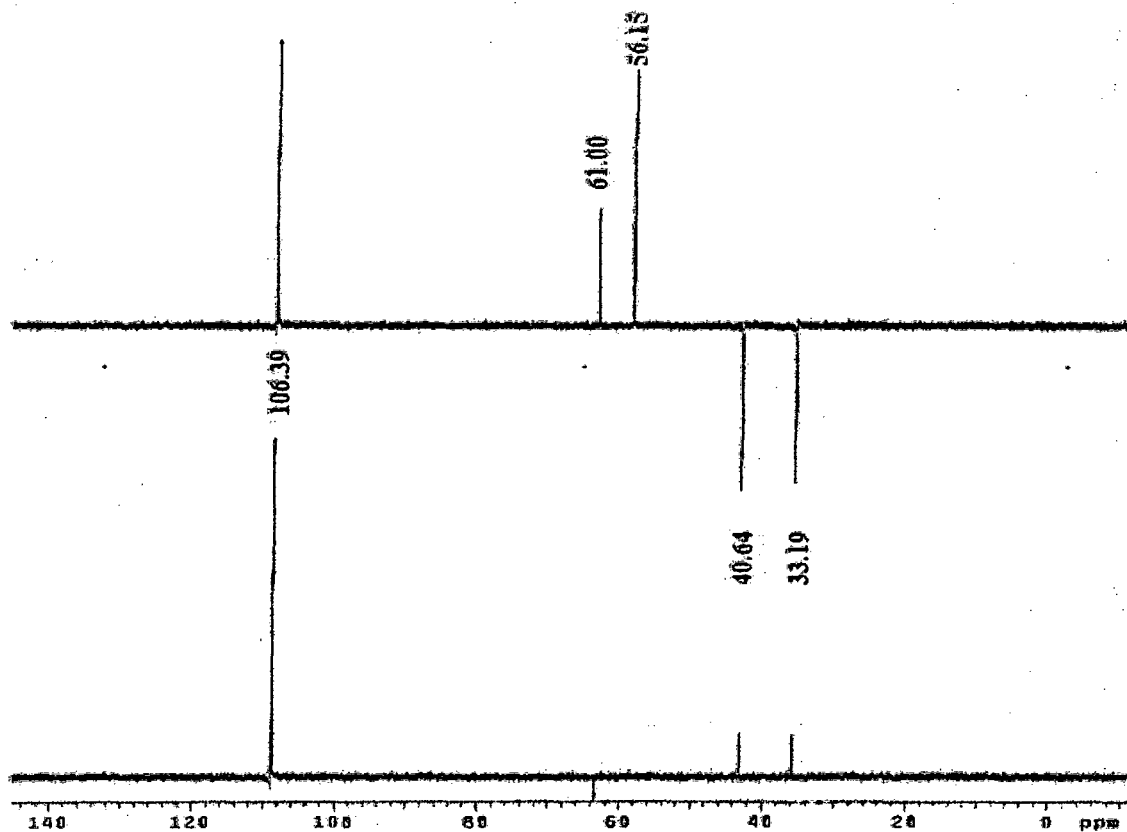
$$\delta \text{ (ppm)} = 39,8; 43,2; 56,0; 60,8; 105,6; 135,3; 136,3; 153,1$$

ii. **Bailey & Legault – 1983³¹ : Mescalina (base libre y clorhidrato)**

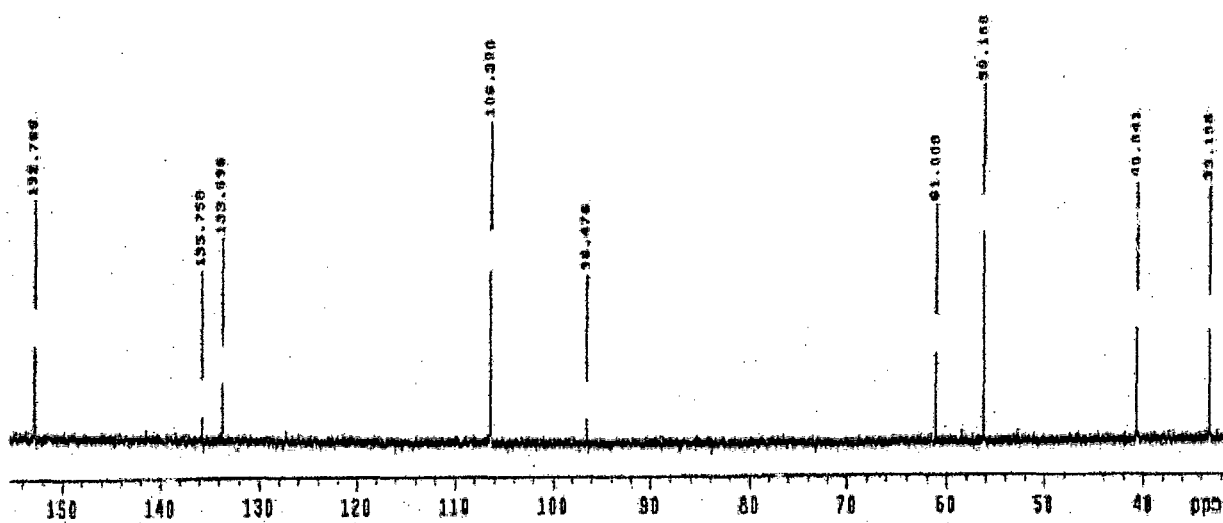
Proporcionan los desplazamientos químicos de RMN¹³C (20,1 MHz) de protones desacoplados para trimetoxifeniletilaminas mono- y disustituidas, así como anfetaminas, obtenidos en un Espectrómetro RMN Bruker WP80 Transformada de Fourier. Los desplazamientos químicos para la mescalina (base libre), disuelta en CDCl₃ y el clorhidrato de mescalina, disuelta en D₂O, se presentan en la Tabla 4.

iii. **Flores - 2000¹ : Sulfato de mescalina dihidratado**

Proporcionan los espectros RMN¹³C DEPT 90 (125 MHz) en CDCl₃ y RMN¹³C de protones desacoplados en D₂O del sulfato de mescalina dihidratado, aislado del cactus *E. pachanoi*, y obtenidos en un Espectrómetro RMN Varian – Inova 500 (Figura 15).



(a)



(b)

Figura 15. Espectros de RMN^{13}C (125 MHz): (a) DEPT 90 en CDCl_3 y (b) Protones desacoplados en D_2O del sulfato de mesquite dihidratado (Flores - 2000).

iv. Comparación de espectros RMN¹³C

En la Tabla 4, se resumen los desplazamientos químicos de todos los carbonos de la mescalina (base libre, clorhidrato y sulfato dihidratado) presentados anteriormente. En esta Tabla 4, hemos incluido los valores de desplazamientos químicos que obtuvimos en el espectro de RMN¹³C del sulfato de mescalina dihidratado que aislamos del cactus *E. peruviana*, disuelto en D₂O (los cuales se presentan en la Sec. II. I. 4, Pág. 83); y se observa la correspondencia que hay entre los valores encontrados y aquellos de Flores - 2000¹.

Tabla 4. Desplazamientos químicos (δ , ppm) de los átomos de carbono en el espectro RMN¹³C de distintos derivados de la mescalina.

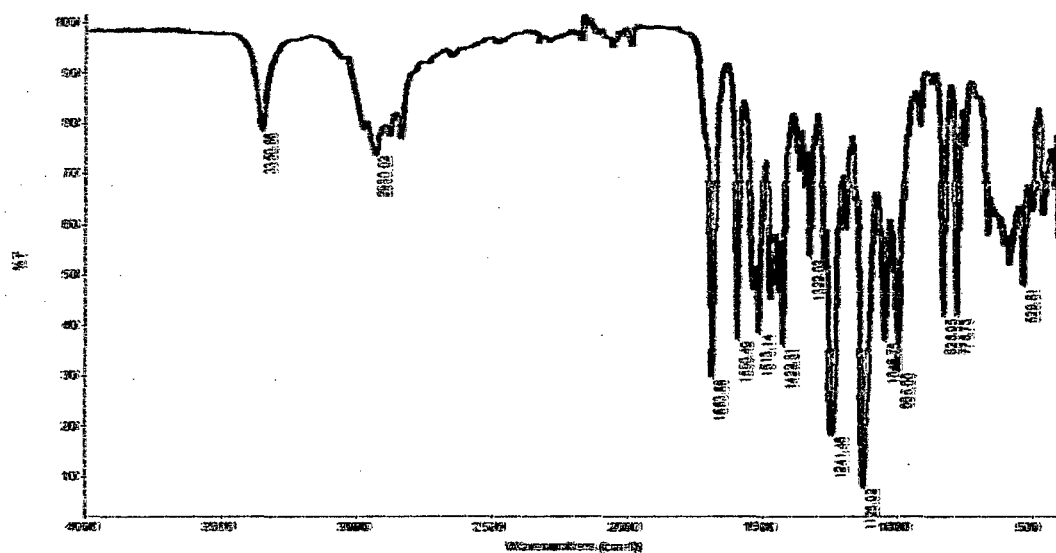
Numeración del átomo de Carbono	Mescalina·H ₂ SO ₄ ·2H ₂ O		Mescalina·HCl	Mescalina	
	Tesis Baldera (2014)	Flores (2000)	Bailey & Legault (1983)	Soderquist, J., <i>et al.</i> (2006)	Soderquist, J., <i>et al.</i> (2006)
	D ₂ O	D ₂ O			
C-1	33,00	33,19	35,77	40,39	39,8
C-2	40,45	40,64	43,30	43,30	43,2
C-3	56,01	56,15	58,97	56,30	56,0
C-4	60,84	61,00	63,71	60,97	60,8
C-5	106,25	106,39	109,32	106,28	105,6
C-6	133,51	133,69	136,34	135,86	135,3
C-7	135,60	135,75	138,83	137,07	136,3
C-8	152,61	152,76	155,59	153,65	153,1

d) Espectroscopía de Infrarrojo, IR

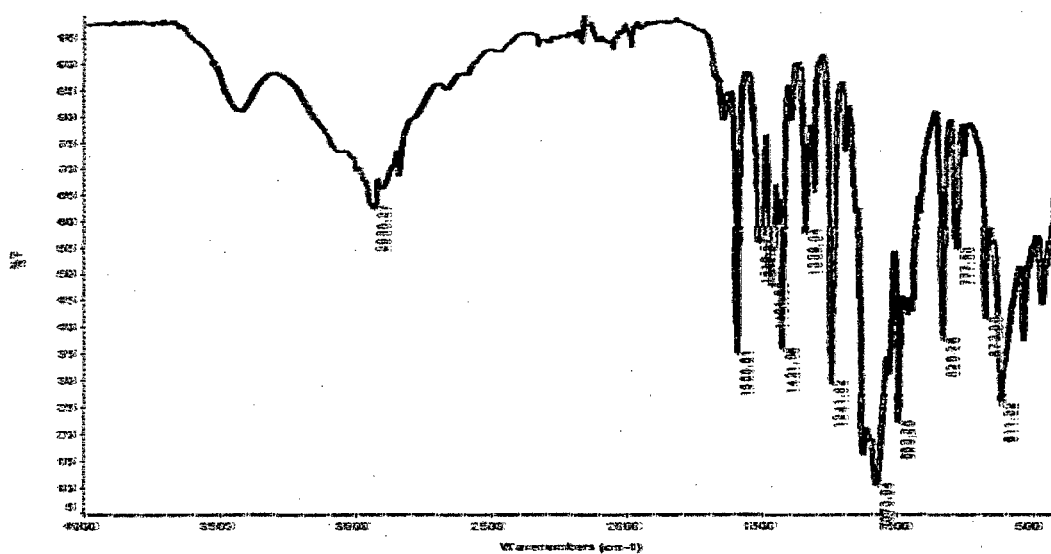
En la bibliografía se presentan los espectros de IR de la mescalina (base libre), del clorhidrato de mescalina y del sulfato de mescalina dihidratado. A continuación se describen los espectros correspondientes a este último compuesto, mientras que los espectros de los dos primeros se encuentran en el Anexo 1.

i. SWGDRUG - 2005²⁴

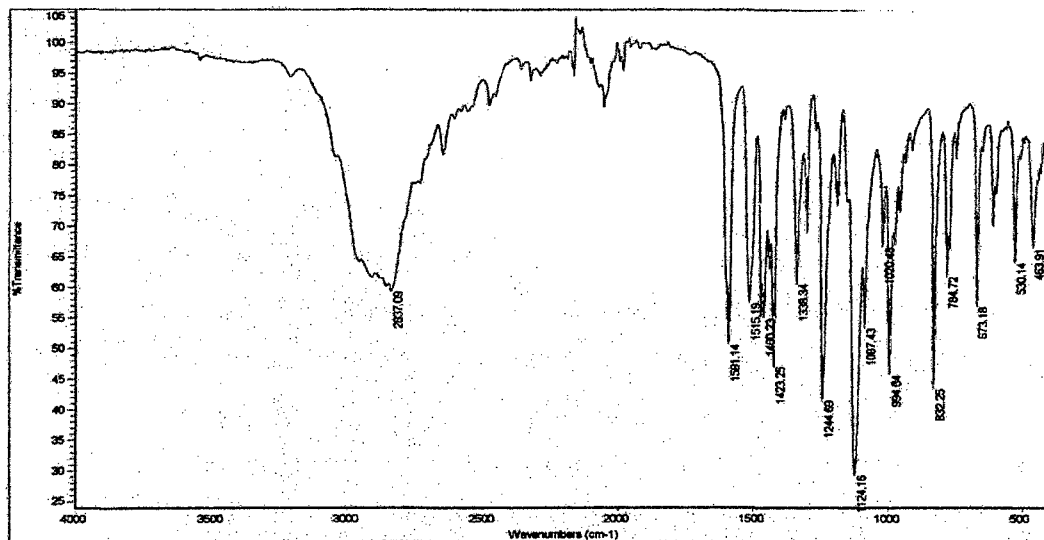
Presenta los espectros infrarrojos de reflexión atenuada (FTIR-ATR) en fase sólida para distintos derivados de la mescalina: base libre (a), sulfato (b) y clorhidrato (c). Además del espectro IR para la mescalina en fase gaseosa (d) (Figura 16).



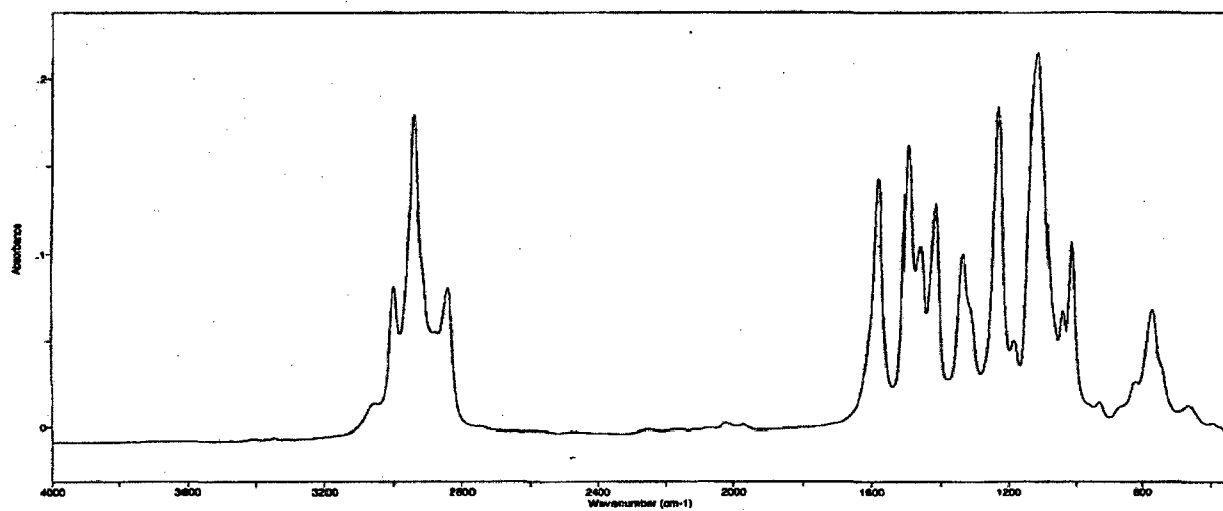
(a)



(b)



(c)



(d)

Figura 16. Espectros FTIR-ATR en fase sólida de (a) mesalina como base libre, (b) sulfato de mesalina, (c) clorhidrato de mesalina y (d) espectro FTIR en fase gaseosa para la mesalina (SWGDRUG - 2005).

ii. Flores - 2000¹

Proporciona el espectro IR de reflectancia difusa para el sulfato dihidratado de mescalina en KBr, aislado del cactus *E. pachanoi*, y obtenido en un Espectrofotómetro Infrarrojo Shimadzu FTIR 800-DRS800 (Figura 17).

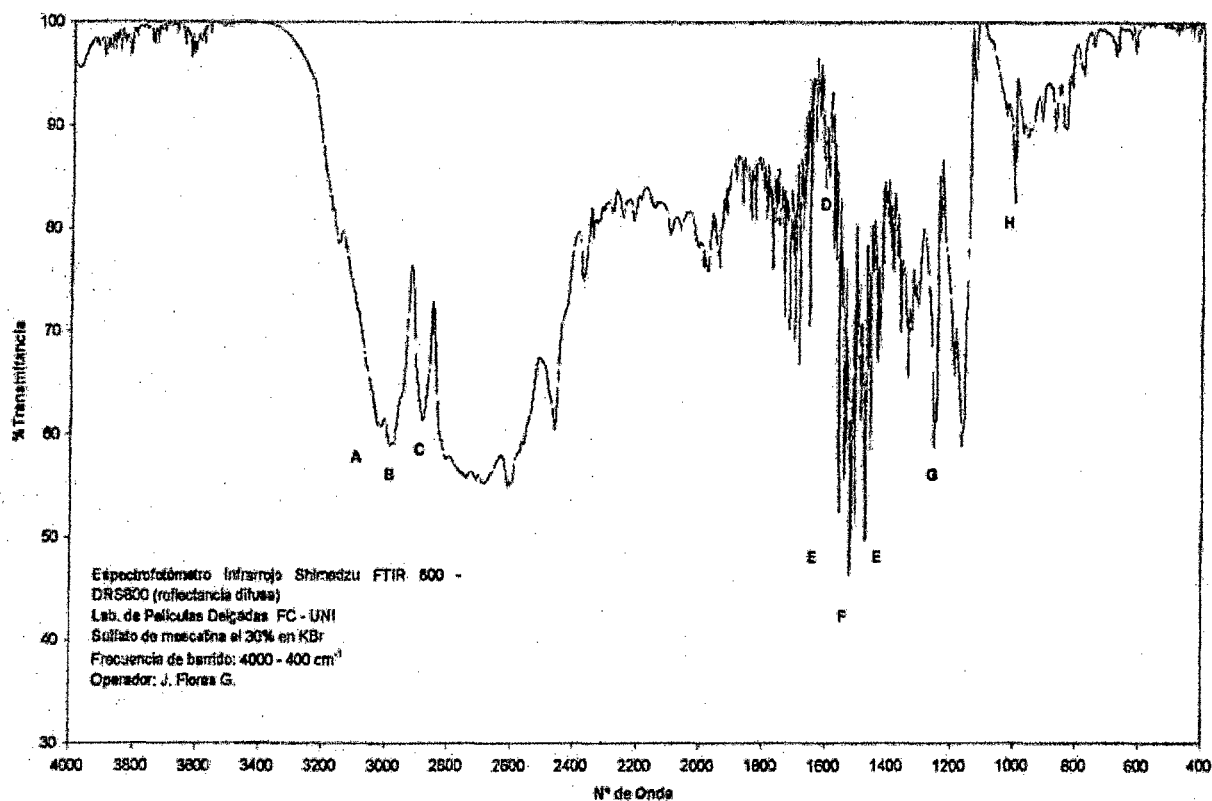


Figura 17. Espectro FTIR del sulfato dihidratado de mescalina en KBr (Flores - 2000).

iii. National Institute of Standards and Technology (NIST) - 2014²²

El NIST Chemistry WebBook a través de la siguiente dirección web: <http://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=B6005171&Mask=80#IR-Spec> proporciona el espectro infrarrojo (IR) del sulfato dihidratado de mescalina (P. fusión = 183–186 °C), obtenido en 1,2 mg de mescalina/200 mg KBr y en un equipo Perkin-Elmer 21 (Grating) con un filtro de 10 micrones (Figura 18).

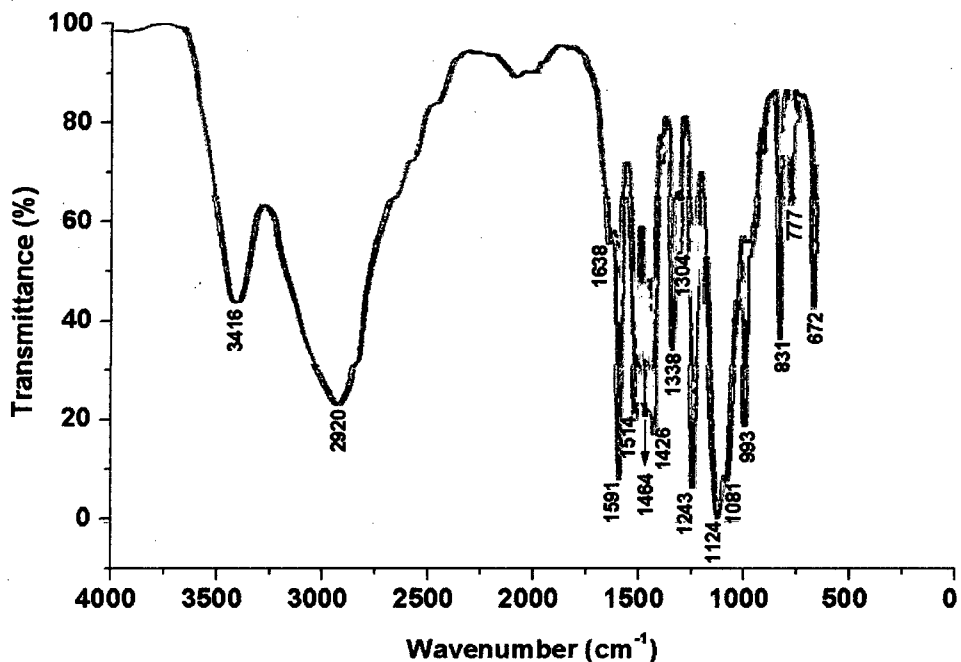


Figura 18. Espectro Infrarrojo (IR) del sulfato dihidratado de mesquite en KBr (NIST Chemistry WebBook - 2014).

iv. Comparación de los espectros IR

En la Tabla 5, se resumen las bandas características del sulfato dihidratado de mesquite reportados por SWGDRUG - 2005²⁴, Flores - 2000¹ y NIST - 2014²². En esta Tabla 5 hemos incluido los valores de las bandas características que obtuvimos en el espectro IR del sulfato de mesquite dihidratado que aislamos del cactus *E. peruviana*, y se observa la correspondencia que hay entre los valores encontrados y aquellos reportados en la bibliografía.

Tabla 5. Bandas características del espectro Infrarrojo (IR) para el sulfato dihidratado de mescalina

Banda	ν^{-1} (cm ⁻¹)				Modo vibracional
	Tesis Baldera (2014)	SWGDRUG (2005)	Flores (2000)	NIST (2014)	
A	3437	-	-	3416	Estiramiento N-H (NH ₃ ⁺)
B	-	-	3021	-	Estiramiento C-H Aromático
C	2943	2930,27	2988	2920	Estiramiento C-H (CH ₂ , -OCH ₃)
D	-	-	2884	-	(NH ₃ ⁺)
E	-	2837	-	-	Estiramiento C-H (CH ₂)
F	1633	-	-	1638	Flexión N-H (NH ₃ ⁺) simétrica
G	-	-	1603, 1592	-	Flexión N-H (NH ₃ ⁺) asimétrica
H	1589	1588,81	1559	1591	Estiramiento anular C-C
I	-	-	1522	-	Flexión N-H (NH ₃ ⁺) simétrica
J	1514	1510,57	-	1514	Flexión C-H (O-CH ₃) simétrica
K	-	-	1472	-	Estiramiento anular C-C
L	1470,	1461,65;	-	1464,	Estiramiento C-H (CH ₂ , -OCH ₃) simétrico
M	1423	1421,96	-	1426	Estiramiento anular C-C
N	1337	1338.04	-	1338	Estiramiento C-H (CH ₂ , -OCH ₃) simétrico
					Estiramiento anular C-C Estiramiento C-O-C simétrico

(... continuación de la Tabla 5. Bandas características del espectro Infrarrojo (IR) para el sulfato dihidratado de mescalina.)

Banda	ν^{-1} (cm ⁻¹)				Modo vibracional
	Tesis Baldera (2014)	SWGDRUG (2005)	Flores, J. (2000), Reyna & Flores (2001)	NIST (2014)	
Ñ	1304	-	-	1304	Aleteo (wag) C-H (CH ₂)
O	1242				Estiramiento C-O-C
P	1188	1241,82	1255	1243	asimétrico
Q	1128	-	-	1124	Aleteo C-H (-OCH ₃)
R	1082	1073,94	-	1081	Estiramiento C-O-C
S	-	-	1001	-	simétrico
T	995	993,26	-	993	Aleteo
U	831	829,26	-	831	y
V	777	777,53	-	777	torsión
W	673	672,00	-	672	C-H anular
X	619	611,22	-	-	Tijereteo (scissoring)
Y	528	-	-	-	C-C anular en el plano
Z	463	-	-	-	Aleteo, torsión C-C anular fuera del plano
					Deformación del anillo aromático

En la Figura 19, se evidencia la correlación de los espectros IR del sulfato dihidratado de mescalina aislado del cactus *E. peruviana* y aquel reportado por el NIST (1964) a través de la superposición de los mismos.

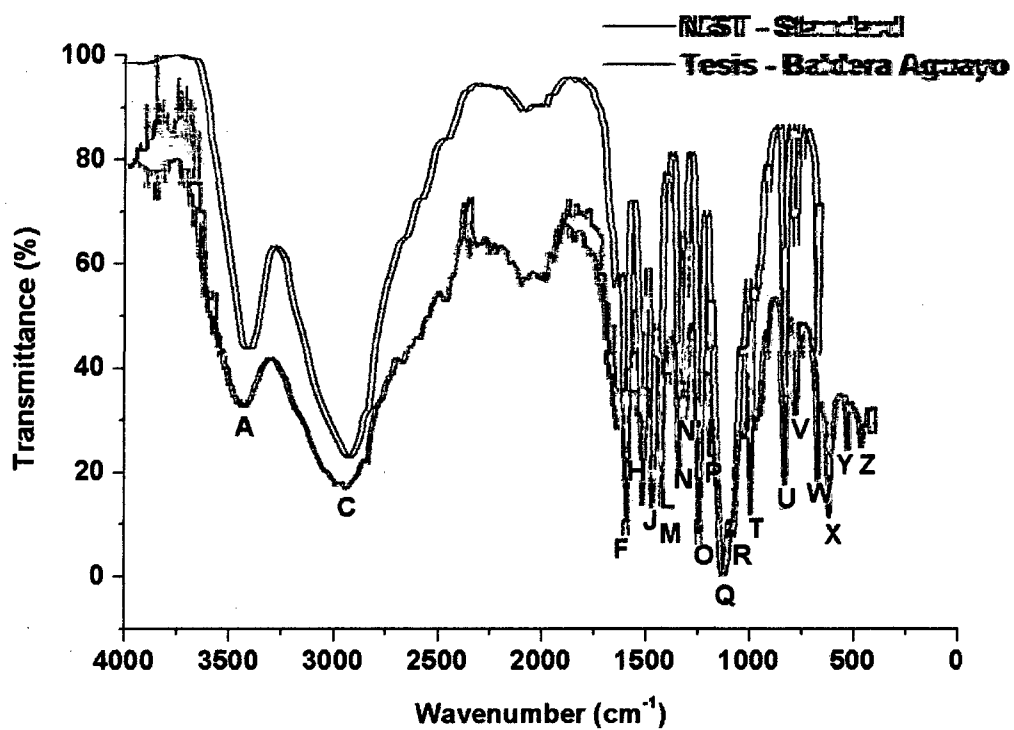


Figura 19. Comparación de los espectros infrarrojo (IR) del sulfato dihidratado de mescalina en KBr reportados por el NIST – 2014 y Pedro A. Baldera Aguayo - 2014.

e) Espectroscopía de Ultravioleta, UV

En la bibliografía se reportan cinco espectros diferentes de UV del sulfato de mescalina dihidratado^{1,23,27,29,34}. A continuación se describen los espectros correspondientes a Mills, T., *et al.* - 2006²³, Flores - 2000¹ y Salomon & Bina - 1946³⁴, mientras que los espectros restantes^{27,29} se encuentran en el Anexo 2.

i. Mills III, T., et al. - 2006²³

Reportan el espectro ultravioleta (UV) para la mescalina en ácido sulfúrico 0,2 N de donde se obtuvo el máximo de absorción (o mínimo de transmitancia) a 268 nm (en el rango de 220 – 340 nm). Ellos emplearon los espectrofotómetros de arreglo de diodos HP 8450A (línea -) y HP 8541A (línea - -), obteniéndose en ambos casos resultados similares tal como lo muestra la Figura 20.

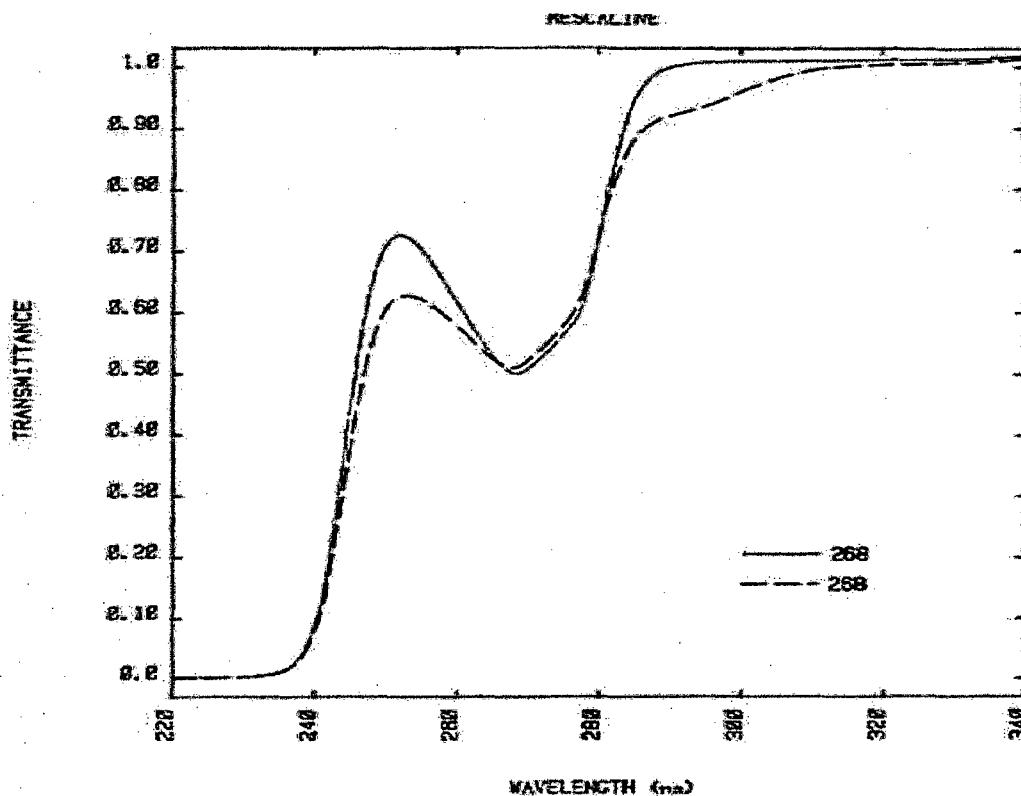


Figura 20. Espectro UV de la mescalina en $H_2SO_4(ac)$ 0,2 N (Mills III, T., *et al.* - 2006).

ii. Flores - 2000¹

Proporciona el espectro UV del sulfato dihidratado de mescalina en etanol al 80 % en agua, el cual presenta un máximo de absorción a 268 nm. Este espectro fue obtenido en un Espectrofotómetro UV Perkin Elmer – Lambda 10 (Figura 21).

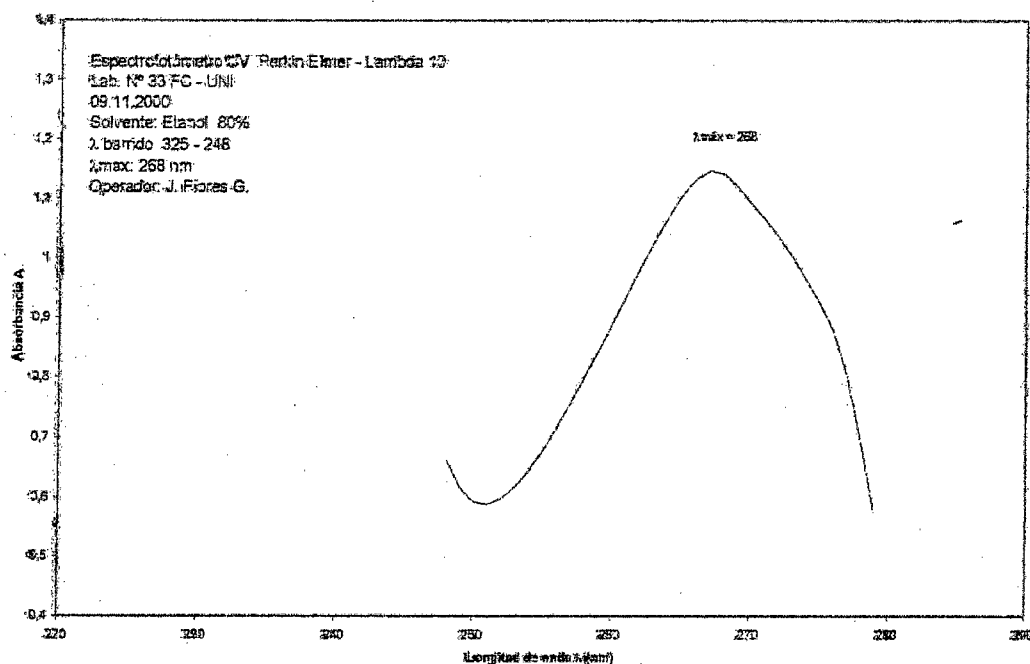


Figura 21. Espectro UV del sulfato dihidratado de mescalina en etanol al 80 % en agua (Flores - 2000).

iii. Salomon & Bina - 1946³⁴

Proporcionan el espectro UV del sulfato de mescalina obtenido utilizando un espectrofotómetro Beckman Quartz. A partir de este espectro se deduce que el máximo de absorción es 270 nm (Figura 22).

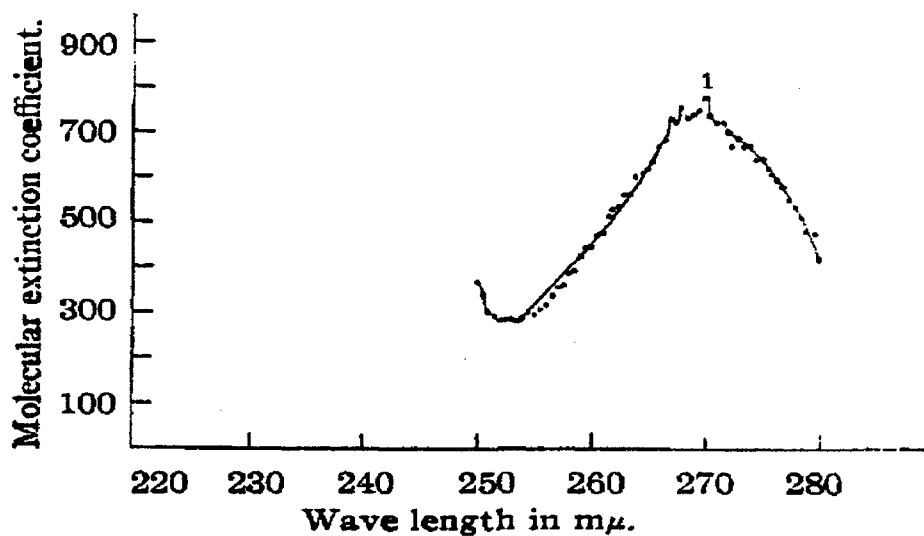


Figura 22. Espectro UV del sulfato de mescalina en etanol al 80 % (Salomon & Bina - 1946).

iv. Comparación de los espectros UV

En la Tabla 6, se resumen los máximos de absorción de la mescalina reportados por Mills III, T., *et al.* - 2006²³, Flores - 2000¹ y Salomon & Bina - 1946³⁴. En esta Tabla 6 hemos incluido el valor del máximo de absorción que obtuvimos en el espectro UV del sulfato de mescalina dihidratado que aislamos del cactus *E. peruviana*, y se observa la correspondencia que hay entre los valores encontrados y aquellos reportados en la bibliografía.

Tabla 6. Máximos de absorción para mescalina

Máximo de absorción ($\lambda_{\text{máx}}$)			
(nm)			
Tesis Baldera (2014)	Mills III, T., <i>et al.</i> (2006)	Flores (2000)	Salomon & Bina (1946)
269	268	268	270

5. Biosíntesis de la mescalina

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

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

La biosíntesis de la mescalina está directamente relacionada con el estudio de la biosíntesis de los alcaloides del peyote (*Lophora williamssi*), así, dos de las principales revisiones sobre esta planta (Anderson - 1991³⁵ y Kapadia & Faye - 1970³⁶) presentan el mismo esquema biosintético, el cual considera a la tirosina (ii) como el principal

precursor de la mescalina, indicando que este precursor puede formarse a partir de la fenilalanina (i) (ver Fig. 23).

Asimismo, Agurell - 1969⁶ presenta este mismo esquema, mientras que Agurell, S., *et al.* - 1967³⁷, Lundström & Agurell - 1968³⁸, 1969³⁹, Lundström - 1971⁴⁰ reportan la presencia de la 3,4-dimetoxi-5-hidroxifeniletamina (viii) en la ruta de la biosíntesis de la mescalina. Este último alcaloide ha sido aislado del cactus "San Pedro Macho" (ver Sec. A. 1. b.)

Los trabajos con *Echinopsis pachanoi* revelaron la presencia de las especies (v.b) y (vii), productos que no han sido encontrados en el peyote. Los trabajos con precursores marcados demostraron que en este cactus, la mescalina se formaba por la misma secuencia biogenética que en el peyote y, además se pudo comprobar, debido a la mayor incorporación de los intermediarios (iii.a) y (v.a), que en este cactus es más probable que se dé la siguiente secuencia: ii → iii.a → iv.a → v.a → vi (Kapadia & Favez - 1970³⁶).

6. Síntesis de la mescalina

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

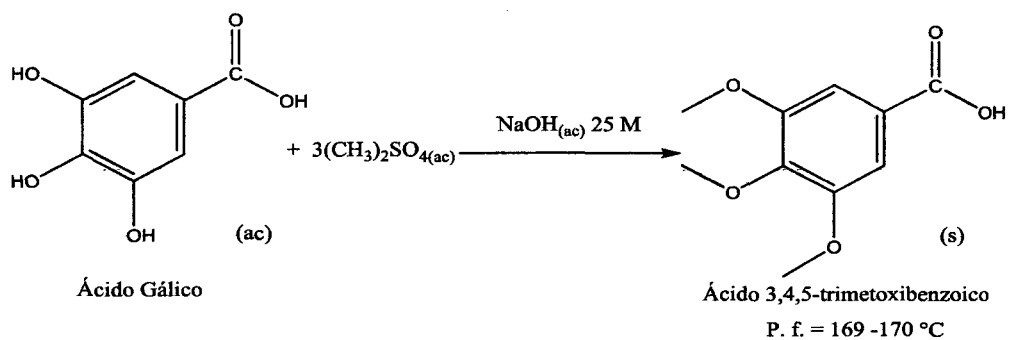
La primera síntesis de la mescalina fue realizada por Späth¹⁹ en 1919, y Downing – 1962⁴¹ refiere que desde entonces se han reportado al menos nueve procesos de síntesis de este compuesto, y proporciona las referencias de base respectivas. Además, describe esquemáticamente tres de estos procesos, entre ellos la síntesis inicial de Späth y la síntesis de Tsao - 1951¹⁸.

Asimismo, Ikan - 1991²⁷, refiere seis procesos de síntesis de la mescalina proporcionando las referencias de base, y presenta el procedimiento experimental detallado de la síntesis originalmente por Tsao.

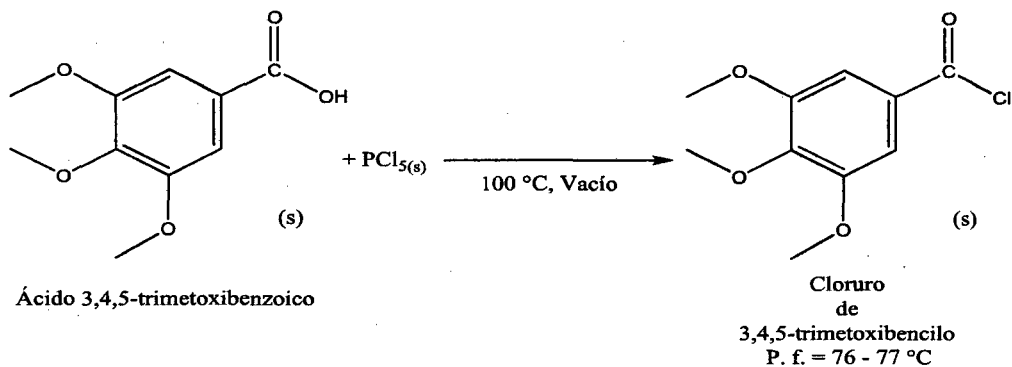
Finalmente, después de haber consultado las referencias de base proporcionadas por Downing, Patel – 1968¹⁶ y Kapadia & Fayez – 1970³⁶ y, además, de realizar la búsqueda bibliográfica concerniente a la síntesis de mescalina en el período 1970 – 2014, se han encontrado 16 trabajos relacionados a la síntesis de dicho compuesto. En la presente tesis presentamos 5 de los 16 métodos de síntesis encontrados, dos (2) de los cuales describiremos a continuación, mientras que los 03 métodos más recientes se encuentran descritos esquemáticamente en el Anexo 3.

a) **Síntesis 1.- Método de Späth – 1919¹⁹**

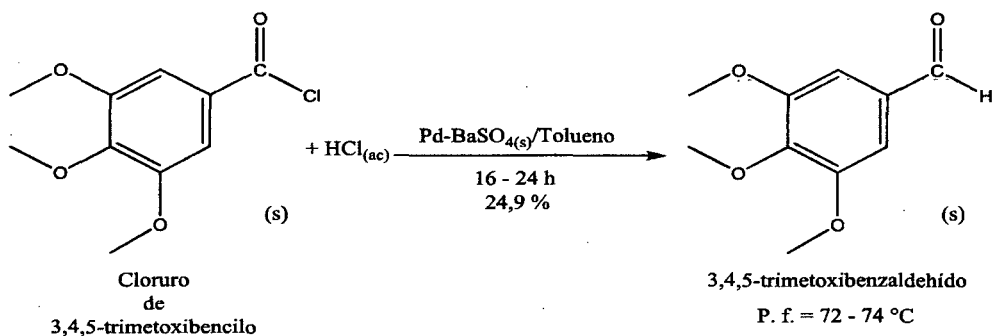
i. **Síntesis del Ácido 3,4,5-trimetoxibenzoico**



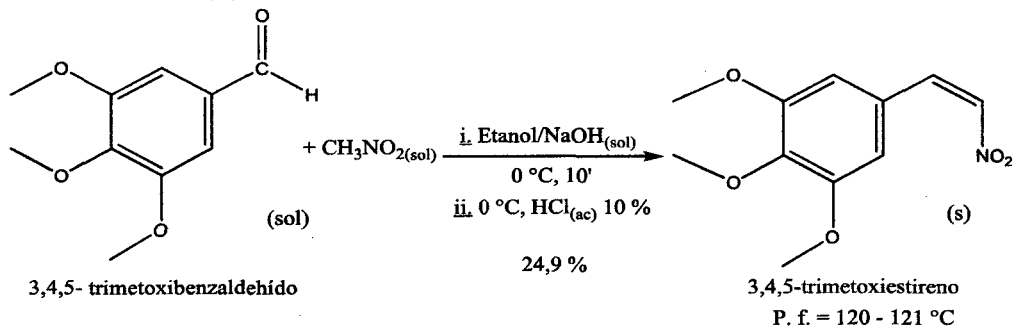
ii. **Síntesis del Cloruro de 3,4,5-trimetoxibencilo**



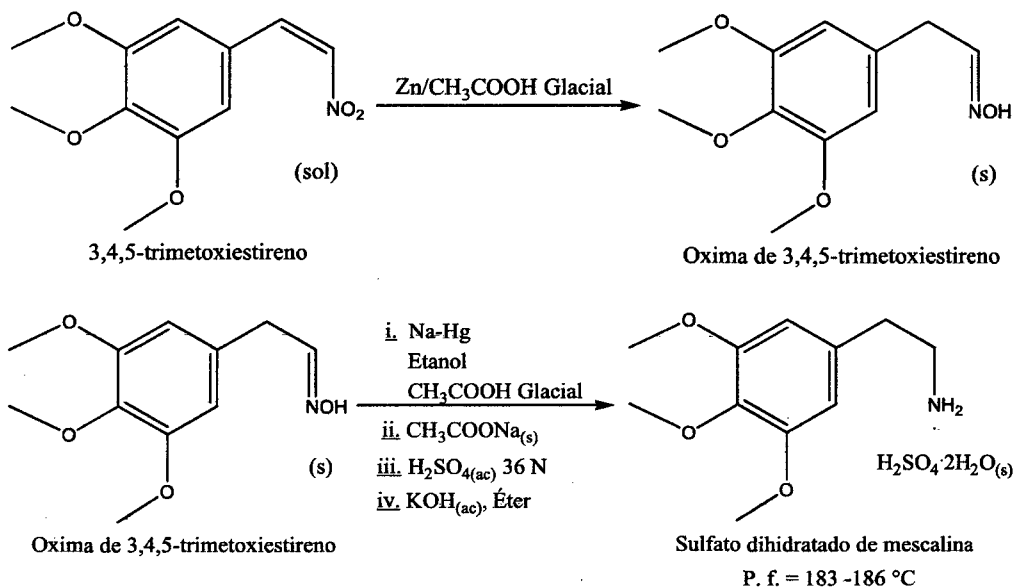
iii. **Síntesis del 3,4,5-trimetoxibenzaldehído**



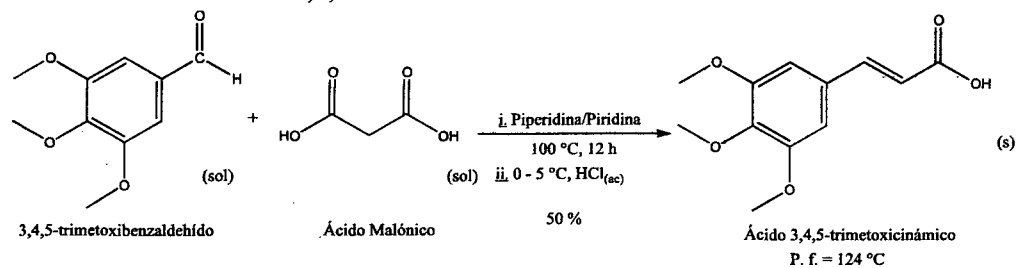
iv. **Síntesis del 3,4,5-trimetoxiestireno**



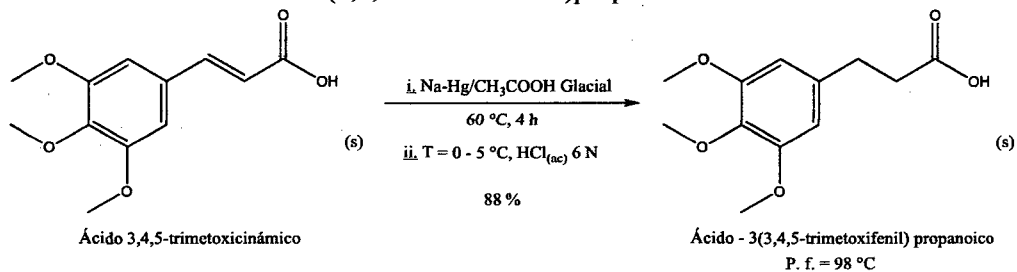
v. Síntesis del Sulfato dihidratado de mescalina

b) Síntesis 2.- Método de Slotta & Heller – 1930⁴³

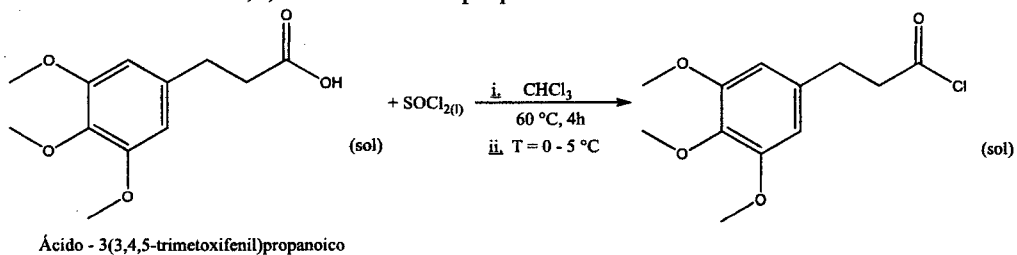
i. Síntesis del Ácido 3,4,5-trimetoxicinámico

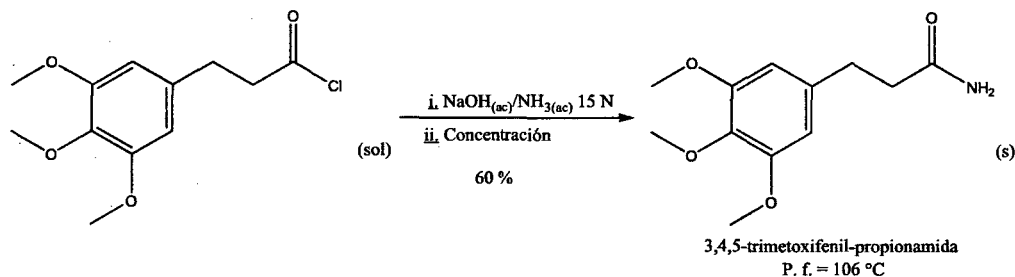


ii. Síntesis del Ácido - 3(3,4,5-trimetoxifenil)propanoico

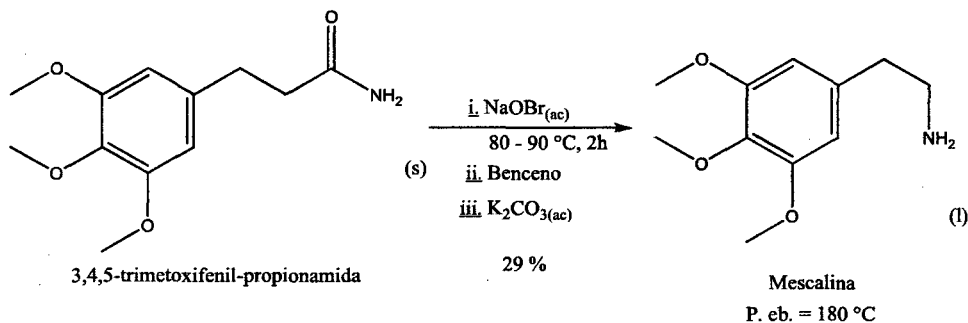


iii. Síntesis de la 3,4,5-trimetoxifenilpropionamida





iv. Síntesis de la Mescalina



B. ESTUDIOS QUÍMICOS GENERALES

1. Análisis cualitativo – Marcha Fitoquímica

Se han revisado tres procedimientos citados en la bibliografía:

- a) Reyna – 2012⁵⁷, basado en Rondina & Coussio – 1969³ (Anexo 4)
- b) Lock - 1994⁵⁸
- c) Miranda - 2002⁵⁹

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

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

En esta tesis se ha seguido el procedimiento descrito por Reyna - 2012 (Anexo 4).

* 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.

2. Test de alcaloides

Para la detección cualitativa de alcaloides presentes en plantas o en sus extractos se utilizan diversos test (reacciones de precipitación y coloración), algunos de ellos se les consideran como generales y otros específicos. Se ha escogido dos de ellos: Mayer y Dragendorff, por ser pruebas generales para alcaloides, los cuales se describen en el Anexo 5.

3. Análisis cuantitativo de alcaloides

Se revisaron dos procedimientos referentes a la determinación cuantitativa de alcaloides en muestras vegetales: el método empleado por Hoet & Ríos Chu - 1980⁶⁰, el cual es adaptado a partir de aquel descrito en la 17th edición de la Farmacopea de los Estados Unidos - 1965⁶¹, y el descrito en la 5^{ta} edición de la European Pharmacopoeia - 2005^{62*}, empleado por Bozkurt Sarikaya, B., *et al.* - 2012⁶³.

A continuación se describirán dichos métodos, los cuales, para su mejor comprensión, se presentan subdivididos en subtítulos (muestra utilizada, extracción sólido - líquido, separación líquido - líquido, eliminación de las bases volátiles residuales y determinación cuantitativa de los alcaloides).

a) Procedimiento de Hoet & Ríos Chu - 1980⁶⁰

“Estudio cuantitativo de los alcaloides totales en *Datura stramonium* del Perú. Metodología”

- **Muestra utilizada**
Muestra vegetal seca y pulverizada.
- **Extracción sólido - líquido (Obtención del Extracto Bruto Orgánico, EBO)**
 - i. Basificación de la muestra con una solución de amoníaco concentrado $\text{NH}_3(\text{cc})$ 15 N.
 - ii. Maceración con una mezcla de etanol:éter etílico (20:40 mL).
 - 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, obteniéndose así el EBO.

* Se empleó esta versión (5.0) debido a que no se tuvo acceso, por razones económicas, a la versión más actual: European Pharmacopoeia 8.2 - 2014.

- **Separación líquido – líquido (Obtención del Extracto Bruto de Alcaloides, EBA)**
- v. Disolución del EBO con una mezcla de 50 mL de éter etílico - cloroformo y extracción de los alcaloides, como sales, mediante la adición de una solución acuosa de ácido sulfúrico $\text{H}_2\text{SO}_{4(\text{ac})}$ 0,5 N. (4 x 50 mL).
- vi. Basificación de la solución ácida con una solución de amoníaco acuoso NH_3 ($\text{pH} = 11$), y extracción de los alcaloides como bases libres en una mezcla de éter – cloroformo (1:1) (4 x 50 mL).
- vii. Evaporación del solvente orgánico, obteniéndose así el EBA.
- **Eliminación de las bases volátiles residuales**
- viii. El EBA se coloca en baño maría hirviendo durante 15 minutos.
- ix. El extracto se disuelve en cloroformo y luego se evapora el solvente hasta sequedad.
- x. Nuevamente el extracto se somete a baño hirviendo durante 15 minutos.
- **Determinación de los alcaloides**
- xi. Disolución del EBA en cloroformo CHCl_3 .
- xii. Adición de 20 mL de solución estandarizada de ácido sulfúrico $\text{H}_2\text{SO}_{4(\text{ac})}$ 0,02 N.
- xiii. Titulación del exceso de ácido con una solución estandarizada de hidróxido de sodio $\text{NaOH}_{(\text{ac})}$ 0,02 N usando fenolftaleína como indicador.

b) Procedimiento de la 5th Ed. European Pharmacopoeia – 2005⁶²

“Belladonna Leaf Dry Extract, Standardised. Belladonna folli extractum siccum normatum”

- **Muestra utilizada**
Muestra vegetal seca y pulverizada.
- **Extracción sólido – líquido (Obtención del Extracto Bruto Orgánico, EBO)**
- i. Basificación de la muestra con una mezcla de 40 mL de amoníaco concentrado $\text{NH}_{3(\text{cc})}$ 15 N y agua destilada (1:3) a temperatura ambiente durante 30 min.
- ii. Extracción de la muestra con una mezcla de 40 mL de cloroformo – éter etílico (1:3) (x 4), verificando si la extracción es completa mediante el test de Mayer.
- iii. Evaporación de los solventes orgánicos hasta un volumen de 50 mL, obteniéndose así el EBO.

- **Separación líquido – líquido (Obtención del Extracto Bruto de Alcaloides, EBA)**
 - iv. Disolución del EBO en un volumen de éter etílico no menor a 2,1 veces el volumen del EBO, y extracción de los alcaloides, como sales, mediante la adición de una solución acuosa de ácido sulfúrico $\text{H}_2\text{SO}_{4(\text{ac})}$ 0,5 N. (5 x 25 mL).
 - v. Basificación de la solución ácida con una solución de amoníaco acuoso NH_3 ($\text{pH} = 11 - 12$), y extracción de los alcaloides como bases libres con cloroformo (4 x 30 mL).
 - vi. Secado de los extractos orgánicos con sulfato de sodio anhidro durante 30 min. El sulfato de sodio hidratado se lava con cloroformo (4 x 10 mL).
 - vii. Evaporación del solvente orgánico, obteniéndose así el EBA.
- **Eliminación de las bases volátiles residuales**
 - viii. El sólido obtenido se seca a 100 – 105 °C durante 15 minutos. Luego, se adiciona una pequeña cantidad de cloroformo y se lleva hasta sequedad en el rotavapor.
 - ix. Nuevamente el sólido se seca a 100 – 105 °C durante 15 minutos.
- **Determinación de los alcaloides**
 - x. Disolución del EBA en cloroformo CHCl_3 .
 - xi. Adición de 5 mL de solución estandarizada de ácido sulfúrico $\text{H}_2\text{SO}_{4(\text{ac})}$ 0,02 N.
 - xii. El solvente orgánico se evapora en baño maría.
 - xiii. Titulación del exceso de ácido con una solución estandarizada de hidróxido de sodio $\text{NaOH}_{(\text{ac})}$ 0,02 N empleando un potenciómetro con electrodo de vidrio para determinar el punto de equivalencia.

En la presente tesis se emplearon ambos métodos con el objetivo de comparar los resultados obtenidos y así determinar cuál de las anteriores metodologías es la más adecuada para la cuantificación total de alcaloides en muestras vegetales. Los métodos fueron aplicados con algunas modificaciones, siendo la principal la observación del punto final de la cuantificación mediante titulación potenciométrica (ver Tabla 7).

En la Tabla 7 se hace un resumen comparativo entre ambos procedimientos.

Tabla 7. Comparación de los métodos de análisis cuantitativo de alcaloides descritos por Hoet & Ríos Chu - 1980 y European Pharmacopoeia 5th Ed. - 2005

NATURALEZA DE LAS OPERACIONES		TESIS P. BALDERA - 2014	
		HOET & RÍOS - 1980	EUROPEAN PHARMACOPOEIA - 2005
EXTRACCIÓN	PESO DE LA MUESTRA	6 g	6 g
	DESENGRASE	No se realiza	No se realiza
	ALCALINIZACIÓN	Amoníaco concentrado (8 mL)	Amoníaco concentrado - agua, 1:3 (40 mL)
	SOLVENTE	Etanol-éter, 1:2 (60 mL)	Cloroformo - éter, 1:3 (40 mL)
	FORMA DE EXTRACCIÓN	Continua: 8 h a 40 °C	Maceración
	SEPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN EXTRACTORA	Extracción con Éter etílico en soxhlet	Lavado en pera de decantación (x 4)
	VERIFICACIÓN DE LA EXTRACCIÓN	Reactivo de Mayer	Reactivo de Mayer
SEPARACIÓN	PURIFICACIÓN Y ELIMINACIÓN DE PIGMENTOS Y OTRAS FRACCIONES SOLUBLES	• Evaporación del solvente en rotavapor.	• Evaporación del solvente en rotavapor hasta 50 mL.
		• Reemplazo del solvente con la mezcla éter - cloroformo (50 mL).	• Reemplazo del solvente con éter (105 mL).
		• Paso de los alcaloides a una solución de ácido sulfúrico 0,5 N (4 x 50 mL).	• Paso de los alcaloides a una solución de ácido sulfúrico 0,5 N (5 x 25 mL).
		• Basificación de la solución ácida con amoníaco acuoso (pH = 11) y retorno de los alcaloides libres a una mezcla de éter - cloroformo, 1:1 (4 x 50 mL).	• Basificación de la solución ácida con amoníaco acuoso (pH = 11 - 12) y retorno de los alcaloides libres con cloroformo (4 x 30 mL).
		• Evaporación del solvente.	• Evaporación del solvente en rotavapor.
	ELIMINACIÓN DE LAS BASES VOLÁTILES	• 15 minutos en baño María hirviente.	• 15 minutos en estufa a 100 - 105 °C.
		• Redisolución del residuo en cloroformo.	
		• Evaporación a sequedad.	
		• 15 minutos en baño maría hirviente.	• 15 minutos en estufa a 100 - 105 °C.
		• Redisolución del residuo en cloroformo.	
CUANTIFICACIÓN	TITULACIÓN ÁCIDO - BASE	• Adición de 20 mL de H ₂ SO ₄ 0,02 N.	• Adición de 5 mL de H ₂ SO ₄ 0,02 N. • Evaporación del cloroformo en el rotavapor.
		• Titulación del exceso de ácido con NaOH 0,02N.	
		• Redisolución del residuo en cloroformo.	
	OBSERVACIÓN DEL PUNTO FINAL	Titulación Potenciométrica	

4. Aislamiento de alcaloides

En esta sección se presentan dos procedimientos para el aislamiento de mescalina presentes en el cactus “San Pedro Hembra” (*E. pachanoi*).

a) Procedimiento de Flores – 2000¹ relativo al Estudio Químico del Cactus ‘San Pedro Hembra’ (*Echinopsis pachanoi*)

- **Muestra utilizada**

Tallos del cactus “San Pedro Hembra” (Adquiridos en el Mercado Modelo de Chiclayo, Lambayeque – Perú, Recolector: V. Reyna), secos y pulverizados.

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

- i. Desengrase del material vegetal, seco y molido con n-hexano durante una noche a temperatura ambiente.
- ii. Alcalinización con amoníaco concentrado $\text{NH}_3(\text{cc})$ 15 N.
- iii. Extracción con solventes:
 - a. Maceración con una mezcla de metanol-cloroformo (1:1) (400 mL) durante una noche temperatura ambiente.
 - b. Maceración con una mezcla de solventes constituida por metanol – cloroformo – acetato de etilo (1:1:4) (600 mL) durante una noche a temperatura ambiente.
- iv. Eliminación de los solventes en rotavapor (40 °C, 150 – 400 mbar): Extracto Bruto Orgánico (EBO).

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

- v. Disolución del EBO con solución acuosa de ácido sulfúrico $\text{H}_2\text{SO}_4(\text{ac})$ 0,5 N.
- vi. Lavado con cloroformo, se descarta la fase orgánica.
- vii. Alcalinización del extracto acuoso con solución de amoníaco acuoso $\text{NH}_3(\text{ac})$ 7,5 N ($\text{pH} = 9$).
- viii. Extracción de los alcaloides libres con cloroformo.
- ix. Evaporación del solvente en rotavapor (40 °C, 150 – 400 mbar).
- x. Lavado del sólido con cloroformo para eliminar las bases volátiles (NH_3): Extracto Bruto de Alcaloides (EBA).

- **Purificación e Identificación**

- xi. Disolución del EBA en 3 mL de etanol.

- xii. Precipitación de la sal del alcaloide con $\text{H}_2\text{SO}_{4(\text{ac})}$ 1 % lentamente a 5 °C.
- xiii. Separación por filtración (papel Whatman 40)
- xiv. Lavado con etanol helado a través de papel filtro.
- xv. Identificación
 - a) Clásica: Punto de fusión (185 – 186 °C), Cromatografía de Capa Fina ($R_f = 0,82$ en cloroformo – acetona - amoníaco 15 N, 10:17:1).
 - b) Espectroscopía: Masas, RMN^1H , ^{13}C , IR y UV.

- **Resultados**

Aislamiento e identificación de la mescalina (sulfato dihidratado) de los tallos del cactus “San Pedro Hembra” (*Echinopsis pachanoi* Britton y Rose).

b) Procedimiento de Crosby & McLaughlin – 1973¹³

“Cristalización de Mescalina-HCl y 3-metoxitiramina-HCl a partir de *Trichocereus pachanoi*”

- **Muestra utilizada**

Tallos del cactus *T. pachanoi* comprado en USA.

- **Obtención del Extracto Bruto Orgánico (EBO)**

- i. La muestra se corta en rodajas, se liofiliza y se pulveriza.
- ii. Desengrase, alcalinización y extracción por percolación con cloroformo de 255 g de muestra seca.

Se obtienen 4 L de percolado que se concentran a un jarabe viscoso.

- **Obtención del Extracto Bruto de Alcaloides (EBA)**

- iii. Disolución del jarabe viscoso con una solución de ácido clorhídrico $\text{HCl}_{(\text{ac})}$ 1 N (4 x 350 mL).
- iv. Combinación y filtrado de los extractos acuosos. Extracción (2 veces) con volúmenes iguales de cloroformo y éter etílico, respectivamente.
- v. Ajuste del $p\text{H}$ de la capa acuosa ácida a 8,5; 9,5 y 10,5 con una solución de hidróxido de sodio $\text{NaOH}_{(\text{ac})}$ 7,5 N. A cada valor de $p\text{H}$, la fracción acuosa se extrae con volúmenes iguales de cloroformo y éter etílico.
- vi. Secado de los extractos orgánicos con sulfato de sodio anhidro, y concentración al vacío.
- vii. Disolución de la fracción de alcaloides resultante en etanol (1 mL por cada 15 g de droga seca); si es necesario se filtra.

La disolución etanólica se adiciona a una columna de resina de intercambio iónico Amberlita IRA 401 en forma hidróxido (OH) (20 g en 100 g de planta seca). La columna se lava con etanol, continuándose hasta que las fracciones efluentes sean incoloras. Estos extractos etanólicos se evaporan a sequedad sobre un baño de vapor, obteniéndose el extracto de alcaloides no fenólicos (mescalina).

- viii. La fracción no fenólica se disuelve con una solución de ácido clorhídrico $\text{HCl}_{(\text{ac})}$ 0,5 N y se vuelve a tratar como se indica en las etapas iii a v.

- **Purificación e Identificación**

- ix. Disolución del residuo de base libre en una pequeña cantidad de etanol absoluto.
- x. Adición de una solución de ácido clorhídrico $\text{HCl}_{(\text{ac})}$ 5 % en etanol absoluto y disminución del pH a 2.
- xi. Adición de éter etílico para inducir la cristalización y luego de enfriar se obtiene 989 mg de clorhidrato de mescalina.
- xii. Identificación
 - a) Clásica: Punto de fusión = 184 – 185 °C.

- **Resultados**

Aislamiento e identificación de la mescalina (clorhidrato) de los tallos del cactus *Trichocereus pachanoi*.

c) Comparación de procedimientos

Los cuatro procedimientos de aislamiento de alcaloides presentados, dos en la sección A.2 (Págs. 9 - 10) y dos en esta sección, siguen dos grandes etapas para la obtención del Extracto Bruto de Alcaloides (EBA), con la diferencia de que el método propuesto por Cjuno, M., *et al.* – 2009⁸ no realiza el desengrase de la muestra vegetal.

Teniendo en cuenta las similitudes y diferencias de todos los métodos ya descritos, y considerando que al momento de realizar el trabajo experimental de la presente tesis se contaba con poca disponibilidad de solventes*, se optó por no desengrasar la muestra vegetal. A continuación se resume el esquema general de trabajo para la obtención del EBA en el presente trabajo de investigación:

* La solicitud de subvención presentada ante el II – FC en diciembre del 2012 no fue aprobada.

- **Extracción sólido – líquido (Obtención del Extracto Bruto Orgánico, EBO)**
 - i. Extracción con solución ácida (maceración)
Esta etapa tiene como objeto la extracción exhaustiva de las bases alcaloidales.
- **Separación líquido – líquido (Obtención del Extracto Bruto de Alcaloides, EBA)**
 - ii. Alcalinización (con $\text{NaOH}_{(\text{ac})}$) de la fase acuosa
Mediante la alcalinización de los extractos acuosos ácidos las sales de alcaloides retornan a su forma de bases libres.
 - iii. 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.
 - iv. Eliminación del solvente por destilación a presión reducida y obtención del EBA.

5. Identificación espectroscópica de compuestos orgánicos (Reyna -2011)

Actualmente está plenamente establecido que las cinco técnicas espectroscópicas, 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), son las herramientas principales para la determinación de la estructura de los compuestos orgánicos.

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

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

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

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

a) Espectrometría de Masas (EM)

En un espectro de masas, las moléculas que se encuentran en estado gaseoso y a baja presión son bombardeadas con un haz de electrones de alta energía (70 eV o 1600 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 “ión molecular” y se lo representa por M^+ .

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.

Esta técnica de ionización se conoce como “Ionización electrónica” (EI) y ha sido utilizada hasta la actualidad. Existen otras técnicas de ionización, siendo la técnica de “electrospray” (ESI) la que ha adquirido más importancia en los últimos años debido a que permite la determinación exacta de la masa molecular de un compuesto, obteniéndose espectros de masa de alta resolución (HRMS) (Para una información más detallada revisar “Mass spectrometry basics” de Herbert, C. G., 2003).

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 los iones es unitaria); obteniéndose así el espectro de masas.

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.

Es necesario tener en cuenta que la espectrometría de masas es una técnica destructiva, es decir, la muestra utilizada en el análisis no se recupera. Afortunadamente, la cantidad de muestra utilizada es del orden de miligramos.

b) Espectroscopía de Resonancia Magnética 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 solo 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, 300, 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 observación 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 las 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, proporcionan 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 corresponden a cada señal;
- iii. El “acoplamiento espín - espín”, 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 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 espín – espín correspondientes.

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

c) Espectroscopía de Resonancia Magnética de Carbono (RMN¹³C)

La RMN¹³C se ha convertido en la técnica principal para elucidar la estructura de compuestos orgánicos. Mientras la RMN¹H nos permite identificar los protones enlazados a la estructura de la molécula, la RMN¹³C nos permite identificar a los átomos de carbono; por ello, la RMN¹³C es un complemento perfecto de la RMN¹H para elucidar la estructura completa de un compuesto.

Igual que en el isótopo de hidrógeno, ¹H, el núcleo del isótopo de carbono-13, ¹³C, tiene un número de espín $I = \frac{1}{2}$, que permite utilizarlo ya que dará una señal en espectroscopía de RMN, y por ello, los principios físicos de la RMN¹³C son los mismos que los de la RMN¹H. Sin embargo, se presenta una diferencia. En la RMN¹H se estudia al isótopo natural más común del hidrógeno, ¹H, cuya abundancia es del 99,98 % del total de hidrógenos. Por el contrario, en la RMN¹³C se estudia al isótopo de carbono menos abundante, al ¹³C, que constituye el 1,1 % del elemento carbono, lo que genera menor sensibilidad. Esta deficiencia deviene en una ventaja, en razón de que no se observan los desdoblamientos del tipo

$^{13}\text{C} - ^{13}\text{C}$ en los espectros RMN^{13}C , a pesar que dichos núcleos vecinos pueden desdoblar sus señales entre sí, pero las probabilidades que se encuentren dos núcleos de ^{13}C resultan muy escasas.

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

Otra desventaja es que debe utilizarse una cantidad de muestra mayor (aproximadamente 10 - 20 mg) que la requerida para obtener un espectro de RMN^1H (aproximadamente 1 - 3 mg).

Al igual que la RMN^1H , la RMN^{13}C proporciona información del entorno electrónico en el que se encuentra cada átomo de carbono en la molécula. Los desplazamientos químicos de la RMN^{13}C son más o menos paralelos a los de la RMN^1H . El compuesto de referencia, tetrametilsilano, $(\text{CH}_3)_4\text{Si}$, TMS, absorbe a un campo alto, mientras que los átomos de carbono aldehídico y carboxílico lo hacen a campos más bajos.

Los desplazamientos químicos en la RMN^{13}C son mucho mayores que los observados en la RMN^1H , extendiéndose la zona de absorción en el rango de 0 a 250 ppm (δ) hacia campo bajo de la señal del TMS. Esto hace que los espectros de RMN^{13}C sean más sencillos que los de hidrógeno, ya que en un espectro de ^{13}C es poco probable que se observen señales sobrepuestas.

Existen tres clases de espectros de RMN^{13}C : en uno se observa los acoplamientos espín - espín $^{13}\text{C} - ^1\text{H}$ (espectro acoplado a ^1H), y en los otros no (espectro desacoplado a ^1H y DEPT):

- i. 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 espín - espín. El desacoplamiento se hace electrónicamente irradiando la muestra con una segunda radiofrecuencia. Dado que no hay desdoblamiento de señales, la señal de cada grupo de átomos de carbono magnéticamente equivalentes aparece como un "singulete". Este tipo de espectro permite determinar, de una manera

- sencilla, el número de átomos de carbono diferentes en la molécula, que corresponde al número de señales que aparecen en el espectro.
- ii. En los **espectros de RMN¹³C acoplado a ¹H** no se suprime el acoplamiento ¹³C – ¹H y, en este caso, la señal de cada carbono se desdobra por acción de los protones directamente enlazados a él, aplicándose también la regla “n + 1”, donde n es el número de átomos de hidrógeno enlazados al átomo de carbono que se analiza. Así, un carbono cuaternario (enlazado a cuatro grupos alquílicos y sin H enlazado a él) presenta una señal singulete; un carbono terciario (que solo tiene 1H enlazado) presenta un doblete; un carbono secundario (que tiene 2H) presenta un triplete y un carbono primario (un grupo metilo, CH₃) presentará un cuadruplete.
 - iii. Los **espectros de RMN¹³C – DEPT (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer, Transferencia por polarización aumentada y no distorsionada)** permiten distinguir el tipo de carbono CH₃, CH₂, CH o C_{cuaternario}, al que pertenece una determinada señal. En particular, es especialmente útil para superar la confusión de un espectro de RMN¹³C acoplado a ¹H en el que se superponen las señales multipletes próximas. El experimento DEPT consta de tres espectros: un primer espectro registrado con pulsos de 45° (DEPT - 45) en el que aparecen señales de CH, CH₂ y CH₃; un segundo espectro registrado con pulsos de 90° (DEPT – 90) que solo muestra las señales de los carbonos unidos a un solo hidrógeno (CH); y por último un tercer espectro registrado con pulsos de 135° (DEPT – 135) en el que aparecen señales positivas para CH y CH₃, absorciones negativas para CH₂, y en el que los carbonos cuaternarios carecen de señal.

d) Espectroscopía de Infrarrojo (IR)

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

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

A diferencia de los espectros de masas y de RMN, los espectros 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 de las bandas de absorción de ambos espectros es una excelente evidencia de identidad. **No es posible que dos compuestos cualesquiera, excepto los enantiómeros ópticos, tengan el mismo espectro de IR.**

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

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

e) **Espectroscopía de Ultravioleta (UV)**

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

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

Los espectros UV proporcionan menor información acerca de la estructura de los compuestos, que aquella proporcionada por los espectros de masas y de RMN, y

se aplica principalmente y prácticamente de manera exclusiva al estudio de sistemas conjugados, tales como:

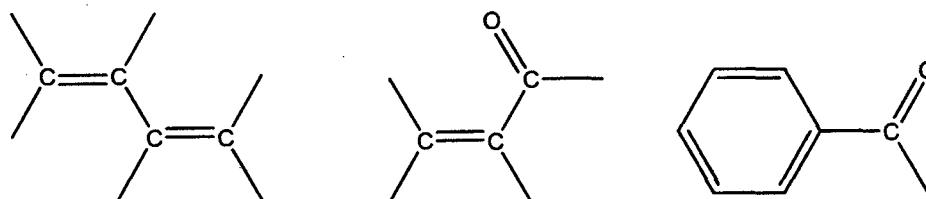


Figura 24. Ejemplos de sistemas conjugados.

La espectrometría UV toma ventaja de esta selectividad en caracterizar solo 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 (η). Así para el grupo carbonilo se tiene:

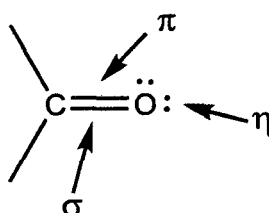


Figura 25. Orbitales moleculares presentes en el grupo carbonilo, C=O.

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

II. PARTE

EXPERIMENTAL

PRESENTACIÓN

Esta investigación del cactus “San Pedro Macho” (*Echinopsis peruviana*) se inició durante el Per. Acad. 2012 – I (marzo – julio 2012) con el “Estudio cuantitativo de alcaloides en el cactus ‘San Pedro Macho’ (*E. peruviana*)” como tema del curso CQ022 Proyecto de Tesis II, estudio que continuó en el mes de octubre del 2012 con la inscripción como tema de Tesis de Licenciatura en Ciencias con Mención en Química (Número de Registro 465 del 05 de noviembre del 2012) con el título: Estudio Químico del cactus “San Pedro Macho” (*Echinopsis peruviana*).

Los tallos del cactus “San Pedro Macho” estudiados en esta tesis fueron recolectados en el distrito de Huancaya (Reserva Paisajística Nor Yauyos – Cochas, Provincia de Yauyos, Departamento de Lima), el viernes 08 de agosto del 2008 (aprox. 2500 m.s.n.m.); y ese mismo día transportados a Lima, ingresando a nuestro laboratorio el sábado 09 de agosto a las 11 h, donde de inmediato se inició el proceso de secado y molienda, guardándose en frascos herméticos (28 de agosto del 2008) hasta el día en que nosotros iniciamos nuestra investigación.

La primera parte del trabajo experimental que realicé como parte de la tesis, el análisis cualitativo de metabolitos secundarios o “marcha fitoquímica”, el análisis cuantitativo de alcaloides y el aislamiento e identificación preliminar del sulfato de mescalina (determinación del punto de fusión y CCF) se realizaron en el ambiente de Investigación de Química de Productos Naturales (C3 – 175), en el período comprendido entre octubre del 2012 y julio del 2013), demandando un trabajo aproximado de 5 meses de trabajo efectivo (5 días por semana, 8 horas por día).

La segunda parte de este trabajo, que consistió en la identificación espectroscópica del sulfato de mescalina (espectros de masas, de RMN y UV) fue realizado por el autor de esta tesis en el período del 18 de abril al 31 de mayo del 2013, última etapa de la estadía de investigación realizada en The Yan Lab del Departamento de Química de la Universidad de Yale (USA), dirigido por la Dra. Elsa C. Y. Yan.

Adicionalmente, se realizó el análisis porcentual de elementos (% C, H, N, O, S) en el Servicio de Microanálisis del Institut de Chimie des Substances Naturelles del Centre National de la Recherche Scientifique ICSN – CNRS, de Gif Sur Yvette (Francia), gracias a la colaboración del Dr. Bernard Delpech, durante la visita que realizó el asesor de esta tesis, Dr. Victor Reyna al mencionado centro de investigación el 10 de setiembre del 2013.

Asimismo, el espectro de Infrarrojo (IR) fue realizado por el Quím. Jorge Muñante F. (compañía Electromédica Peruana S. A. – EMPESA) en Lima, el 07 de diciembre del 2012.

En resumen, la ejecución de esta tesis involucró la realización de las principales etapas que comprende la investigación Fitoquímica, las que se enumeran a continuación:

METODOLOGÍA DE INVESTIGACIÓN PARA EL ESTUDIO QUÍMICO (ALCALOIDES) DE PLANTAS MEDICINALES ⁶⁵

Trabajo preliminar

- A. Selección y recolección de la planta
- B. Estudio etnobotánico y etnomedicinal de la planta
- C. Determinación sistemática (identificación botánica)
- D. Estudio bibliográfico

Trabajo experimental en el laboratorio (alcaloides)

Secado y molienda de la planta

- E. Análisis cualitativo (marcha fitoquímica)
- F. Análisis cuantitativo de alcaloides
- G. Aislamiento de compuestos puros
 - a) Extracción sólido – líquido de la planta: Extracto Bruto Orgánico (EBO)
 - b) Separación líquido – líquido: Extracto Bruto de Alcaloides (EBA)
 - c) Purificación: Aislamiento de cada alcaloide puro
(Cromatografía/recristalización/preparación de derivados)
- H. Identificación del compuesto puro
 - a) Procedimientos clásicos: punto de fusión, composición centesimal, CCF.
 - b) Procedimientos espectroscópicos: Masas, RMN¹H, RMN¹³C, IR y UV.

TRABAJO PRELIMINAR

A. Selección y recolección de la planta. Cactus “San Pedro Macho” (*E. peruviana*)

Se seleccionó el estudio de los tallos del cactus “San Pedro Macho” (*Echinopsis peruviana*) por dos motivos:

- i. En primer lugar, por disponer de suficiente material vegetal para realizar el estudio químico, y

- ii. en segundo lugar, por tratarse de una especie estrechamente relacionada con el cactus “San Pedro Hembra” (*E. pachanoi*), que ha sido tema de Tesis de Licenciatura en nuestro laboratorio (Flores – 2000¹), y no haberse realizado ningún estudio químico precedente con este cactus cultivado en el Perú.

Los tallos del cactus “San Pedro Macho” (*E. peruviana*) fueron recolectados en el distrito de Huancaya (Reserva Paisajística Nor Yauyos – Cochas, Provincia de Yauyos, Departamento de Lima), por los Doctores Victor Reyna P. y Michel Sauvain (Institut de Recherche pour le Développement – Francia), el día viernes 08 de agosto del 2008 a las 13h05 – 13h40, un día con sol intenso, aproximadamente a 2500 m.s.n.m. *. El lugar de la recolección se ubica en la carretera Cañete – Lunahuana – Yauyos – Huancaya, a 30 km luego de pasar el desvío que dirige a Yauyos y a 19 km de Huancaya, en la ladera derecha adyacente a la carretera afirmada que conduce a Huancaya (Fotos 1 y 2), carretera que va siguiendo el curso del río Cañete.

El lugar de la recolección fue propuesto por el Dr. Carlos Ostolaza Nano, reconocido especialista en Cactáceas del Perú y en el extranjero (Ostolaza – 2011⁶⁷), quien durante el mes de noviembre del 2006 había realizado un viaje de exploración de los cactus que habitan en los valles del río Cañete (Provincia de Yauyos), informando que en toda esta región, en particular en las carreteras hacia Laraos y Huancaya (2400 – 3400 m.s.n.m.) y en la carretera hacia Yauyos (2000 - 3100 m.s.n.m.), existe un gran número de cactus de la especie *E. peruviana*. En este valle los cactus *E. peruviana* son más altos, más gruesos y se encuentran en una población más abundante. El Dr. Ostolaza verificó que en esta región no crece la especie relacionada “San Pedro Hembra” (*E. pachanoi*) (Ostolaza, C., *et al.* – 2007⁷⁶, Pp. 220 – 225, Figuras 24 y 25).

Se tenía previsto la participación del Dr. Carlos Ostolaza N. en este viaje, pero lamentablemente una afección a su salud le impidió acompañarnos, asegurándonos que nos resultaría fácil encontrar ejemplares del cactus “San Pedro Macho” (*E. peruviana*), en dicha región, tal como ocurrió.

* Lamentablemente no disponemos de altímetro ni equipo GPS.



Foto 1. Cactus “San Pedro Macho” (*Echinopsis peruviana*), Yauyos – Lima (2500 m.s.n.m.)
(Foto M. Sauvain).



Foto 2. Lugar de la recolección del cactus “San Pedro Macho” (*Echinopsis peruviana*), ladera del río Cañete en Yauyos – Lima (2500 m.s.n.m.) (Foto M. Sauvain).

B. Estudio etnobotánico y Etnomedicinal

A diferencia de la especie relacionada, el “San Pedro Hembra” o simplemente llamado San Pedro (*E. pachanoi*), el cactus “San Pedro Macho” (*E. peruviana*) no se utiliza en medicina tradicional, debido a la presencia de grandes, gruesas y abundantes espinas que hacen difícil su manipulación.

En cambio, el cactus “San Pedro Hembra” (*E. pachanoi*) constituye la principal entre todas las plantas medicinales utilizadas por los curanderos del norte del Perú, siendo considerada como una planta maestra y sagrada. Su utilización se da en la preparación de la bebida San Pedro (decocción en agua de este cactus) y su ingestión durante las denominadas Mesas con San Pedro^{1-2, 70-71}, cuyo uso se remonta a épocas prehispánicas⁶⁶⁻⁶⁸.

Sin embargo, varios cerámicos prehispánicos representan el uso de cactus espinosos, tal como se observa en la Foto 3, aunque no es posible identificar de qué especie se trata.

C. Determinación sistemática (identificación botánica)

Las muestras de “San Pedro Macho” (*E. peruviana*) fueron identificadas por el Dr. Carlos Ostolaza Nano, reconocido especialista en cactáceas (Ostolaza – 2011⁶⁷), luego de su coleta en una región previamente estudiada por él (Ostolaza, C., *et al.* – 2007⁷⁶). En el Anexo 6 se reproduce la descripción que el Dr. Ostolaza hace del cactus “San Pedro Macho” y “San Pedro Hembra”, respectivamente.

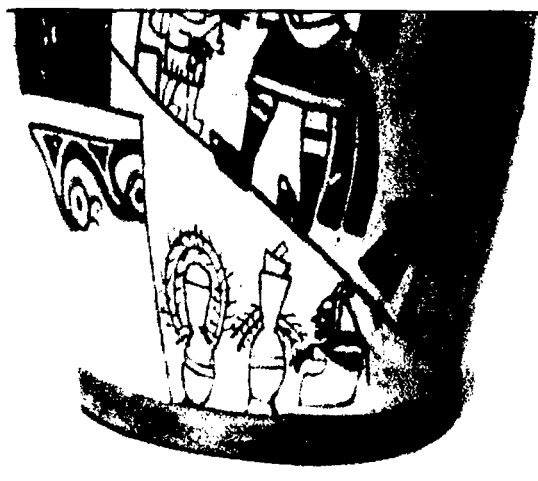
D. Estudio bibliográfico

La investigación precedente que realizó J. Flores, bajo la supervisión del Dr. V. Reyna, como tema de Tesis de Licenciatura: “Estudio Químico del cactus ‘San Pedro’ (*Echinopsis pachanoi* Britton y Rose), Lima- Perú, 2000, proporcionó los textos generales así como los artículos correspondientes en donde se describe al género *Echinopsis*.

Adicionalmente, el autor de esta Tesis de Licenciatura realizó la búsqueda de las referencias bibliográficas relacionadas a la mescalina, correspondientes al período de 2000 – 2014, y en particular a aquellas referidas a la cuantificación de alcaloides en cactus.



(a)



(b)



(c)



(d)

Foto 3. Cerámicas Moche. En (a) y (b) se observa la preparación de una bebida a partir de un cactus con espinas. En (c) y (d) se observa a un sacerdote quien da un tratamiento especial al cactus debajo de él. Museo de Antropología, Arqueología e Historia, Lima, Junín 1988 (V. Reyna).

TRABAJO EXPERIMENTAL EN EL LABORATORIO

Secado y Molienda de la planta*

Del material recolectado en Huancaya (08. Ago. 08) se tomaron dos pedazos (tallos completos) que pesaron 2,843 kg (F08 - 2) y 2,061 kg (F08 - 3) respectivamente, el día sábado 09 de agosto del 2008 cuando ingresaron al laboratorio.

Debido a la dificultad para secar la pulpa de estos cactus en estufa a baja temperatura (menos de 45 °C), pues debido a su gran contenido de agua ocasiona la descomposición de la muestra (hongos), se decidió separar la corteza de la pulpa, y solo trabajar con la corteza.

Para ello se procesaron los dos cactus, separando la corteza con ayuda de un cuchillo de cocina (de acero inoxidable). Las tiras de corteza se colocaron directamente en el plato del horno de microondas (MD 1430WE) y se colocaron a secar de manera diferente cada una de ellas:

- i. La muestra F08 - 2 se secó inicialmente en microondas durante 1' (un minuto), 1' (un minuto) y 3' (tres minutos) con la opción "Descongelar Pescado", repitiendo este procedimiento dos veces más (en total 3 veces). Debido a que la muestra aún continuaba húmeda, se decidió completar su secado en la estufa "Memmert" a 40 °C durante 24 h.
- ii. Para la muestra F08 - 3 se decidió emplear solo el microondas; sin embargo, en vista de que la opción "Descongelar Pescado" no permite secar por completo a la muestra, se optó por cambiar de procedimiento y emplear la opción "Descongelar Pescado 1,1" la cual requiere un mayor período de tiempo para su realización (28 min y 33 seg). Este procedimiento se repitió dos veces más (en total 3 veces), haciendo un total de (calentamiento) de 85 min y 15 seg. (Ver Tabla 8)

Una vez secas las muestras se pulverizaron a grano fino con la ayuda de un molino doméstico "Moulinex" (750 W) (Foto 4).

* Esta etapa fue realizada por la profesora Elena Cándor C. en el mes de agosto del 2008: el secado entre el martes 12 y el miércoles 27 mientras que la molienda durante el lunes 25 y el jueves 28.

Tabla 8. Secado y molienda del cactus “San Pedro Macho” (*E. peruviana*) (Muestras recolectadas en el distrito de Huancaya – Prov. Yauyos – Dpto. Lima, el viernes 08 de agosto del 2008)

Muestra	Peso	Condiciones de secado			Molienda (Fecha)	Peso ^a
	fresco	(solo de la corteza)				seco
	(g)	Fecha	Microondas	Estufa		(g)
F08 – 2	2843	12 – 27 Ago.08	Sí	40 °C	25 – 28 Ago.08	603
F08 – 3	2061		Sí	-		392

^a Solo se trabajó con la corteza del cactus, se desechó la pulpa.

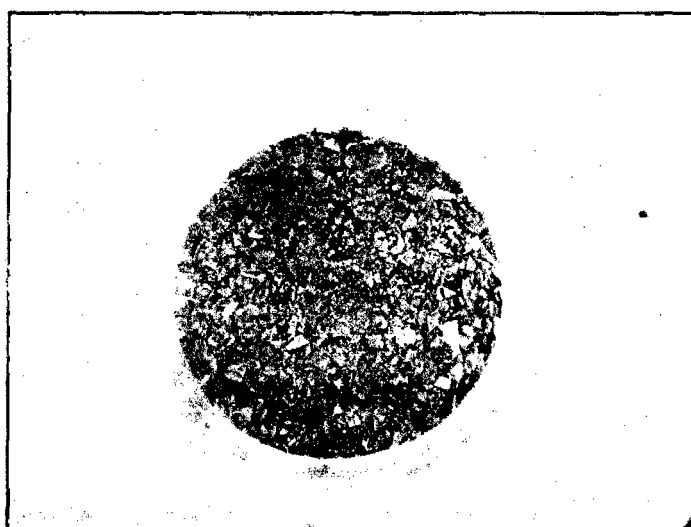


Foto 4. Muestra F08 – 2 seca y pulverizada (Foto P. Baldera Aguayo).

E. Análisis cualitativo (Marcha Fitoquímica)

1. **Muestra:** 6 g de muestra seca y pulverizada del cactus “San Pedro Macho” (*E. peruviana*). Se realizaron dos análisis, con resultados similares:

a) Primer análisis: 10 – 15 de junio del 2013 (muestra F08 – 2)

b) Segundo análisis: 02 – 06 de julio del 2013 (muestra F08 – 3)

2. **Procedimiento:** Reyna – 2012⁵⁷, de acuerdo a Rondina & Coussio – 1969³ (Ver Anexo 4).

3. Resultados

Las dos muestras analizadas dieron resultados similares, los cuales se detallan en el Anexo 7 y se resumen a continuación:

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

b) No contiene: Taninos, flavonoides, quinonas, antronas o antranoles, leucoantocianidinas y saponinas.

Además, precedentemente, del 02 – 24 de octubre del 2008 se realizó el análisis de la muestra F08 – 2, por el estudiante Marcelo Bazán bajo la supervisión de la profesora Elena Córdor C., y se obtuvieron los mismos resultados (ver Anexo 7).

F. Análisis cuantitativo de alcaloides

En nuestra tesis se analizó la muestra F08 – 2 utilizando dos procedimientos diferentes para la determinación cuantitativa de alcaloides (ver Tabla 9):

- i. Belladonna leaf dry extract, standardised - 5^{ta} Edición de European Pharmacopoeia – 2005⁶² y Bozkurt Sarikaya, B., *et al.* – 2012⁶³
- ii. Estudio cuantitativo de los alcaloides totales en *Datura stramonium* del Perú. Metodología - Hoet & Ríos Chu – 1980⁶⁰

En ambos procedimientos se analizan 6,0 g de muestra vegetal.

1. Procedimiento 1 – Belladonna leaf dry extract, standardised (European Pharmacopoeia 5.0 – 2005⁶²)

Se realizaron cuatro análisis entre el 29 de junio y 06 de julio del 2013. A continuación se describe el primer análisis:

Muestra: 6,0 g de muestra F08 – 2 (M1)

a) Extracción sólido – sólido (*Obtención del Extracto Bruto Orgánico, EBO*)

Alcalinización con amoníaco concentrado NH_{3(cc)} 15 N

- i. La muestra de cactus (6,0 g, seca y pulverizada) se alcaliniza con 40 mL de una mezcla de NH_{3(cc)} 15 N – agua destilada (1:3) a temperatura ambiente durante 30 min.

Extracción por solventes

- ii. La muestra alcalinizada se lava con 40 mL de una mezcla de cloroformo - éter etílico (1:3), hasta que la solución orgánica dé prueba negativa de alcaloides mediante el test de Mayer (x 4).
- iii. La mezcla orgánica se concentra en rotavapor hasta un volumen de 50 mL, obteniéndose así el Extracto Bruto Orgánico (EBO).

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

Extracción del Extracto Bruto Orgánico con solución ácida

- iv. El extracto bruto orgánico se disuelve con un volumen de éter etílico no menor a 2,1 veces el volumen del EBO. La mezcla orgánica se coloca en un embudo de separación, previamente enjuagado con éter etílico, y se extrae con una solución de H₂SO_{4(ac)} 0,5 N

(5 x 25 mL) hasta que la solución orgánica dé prueba negativa de alcaloides mediante el test de Mayer. Luego, se elimina la fase orgánica.

Alcalinización del extracto acuoso con disolución de amoníaco

- v. Los extractos ácidos se alcalinizan con $\text{NH}_3(\text{cc})$ 15 N hasta $\text{pH} = 11 - 12$.

Extracción de alcaloides con solventes orgánicos

- vi. El extracto acuoso básico se extrae con cloroformo (4 x 30 mL) hasta que la solución acuosa presente test de Mayer negativo. Se elimina la fase acuosa.
- vii. Los extractos orgánicos se secan con sulfato de sodio anhidro y se deja reposar la mezcla durante 30 min, con agitación ocasional. Luego de filtrar el líquido, el sulfato de sodio se lava con cloroformo (4 x 10 mL).
- viii. Los extractos clorofórmicos se concentran en rotavapor hasta sequedad (40 °C, 200 – 300 mbar), obteniéndose el Extracto Bruto de Alcaloides (EBA).

c) Eliminación de las bases volátiles

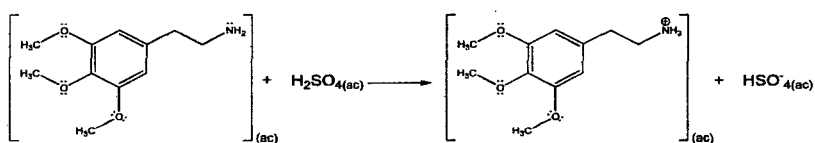
- ix. El sólido obtenido se seca en la estufa a 100 – 105 °C durante 15 min. Luego, se agrega una pequeña cantidad de cloroformo y se lleva hasta sequedad en el rotavapor. Finalmente, se coloca el sólido obtenido en la estufa a 100 – 105 °C durante 15 min, obteniéndose el Extracto Bruto de Alcaloides (EBA = 17,2 mg) como una resina de color pardo.

d) Titulación. Determinación potenciométrica

- x. El extracto bruto de alcaloides se disuelve en unos mililitros de cloroformo. Luego se agrega 5 mL de solución estandarizada de $\text{H}_2\text{SO}_4(\text{ac})$ 0,0230 N, con una pipeta graduada. El solvente orgánico se elimina en el rotavapor quedando una solución acuosa ácida que contiene alcaloides en forma de sales.
- xi. La solución acuosa ácida se titula con una solución estandarizada de $\text{NaOH}(\text{ac})$ 0,0225 N, utilizando un potenciómetro* con electrodo de vidrio para determinar el punto de equivalencia. El análisis de la curva de titulación (ver Anexo 13) muestra que el punto de equivalencia corresponde a la adición de 2,73 mL de base, $\text{NaOH}(\text{ac})$.

e) Cálculo de la cantidad y del porcentaje de alcaloides en la muestra

- i. Al agregar un exceso de solución de ácido sulfúrico $\text{H}_2\text{SO}_4(\text{ac})$ (5 mL, 0.0230 N) al Extracto Bruto de Alcaloides, ocurre la reacción:



* Potenciómetro PL – 700 PV (Laboratorio de Investigación de Biopolímeros y Metalofármacos “LIBIPMET” de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Ingeniería).

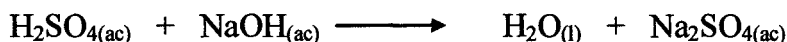
y se tiene que:

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

donde:

$$\text{N}^\circ \text{ meq ácido total} = \text{N} \times \text{V} = 0,0230 \times 5 = 0,1152 \text{ meq} \quad \dots (\beta)$$

- ii. El ácido sulfúrico $\text{H}_2\text{SO}_{4(\text{ac})}$ sobrante, que queda sin reaccionar con el alcaloide, se titula con 2,73 mL de solución de hidróxido de sodio $\text{NaOH}_{(\text{ac})}$ 0,0225 N, según la ecuación:



y en el punto de equivalencia se cumple que:

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

- iii. La cantidad (meq) de hidróxido de sodio ($\text{N} = 0,0225$ y $\text{V} = 2,73$ mL) se determina por la relación: $\text{N}^\circ \text{ meq} = \text{N} \times \text{V}$ (mL)

$$\text{N}^\circ \text{ meq base} = \text{N}_{\text{NaOH}} \times \text{V}_{\text{NaOH}}$$

$$\text{N}^\circ \text{ meq}_{(\text{NaOH})} = 0,0225 \text{ N} \times 2,73 \text{ mL}$$

$$\text{N}^\circ \text{ meq}_{(\text{NaOH})} = 0,0615 \text{ meq}$$

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

$$\text{N}^\circ \text{ de meq } (\text{H}_2\text{SO}_4) \text{ sobrante} = 0,0615 \text{ meq} \quad \dots (\theta)$$

- v. La cantidad de meq de ácido sobrante se determina por la relación (γ)

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

$$\begin{aligned} \text{N}^\circ \text{ meq de alcaloide} &= \text{N}^\circ \text{ meq de ácido total} - \text{N}^\circ \text{ meq de ácido (sobrante)} \\ &= 0,1152 \text{ meq} - 0,0615 \text{ meq} \\ &= 0,0537 \text{ meq} \end{aligned}$$

- vi. La cantidad (en mg) de alcaloides (expresados como mescalina) se determina teniendo en cuenta que:

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

donde θ es el número de hidrógenos intercambiados en la reacción ácido - base (para la mescalina $\theta = 1$) y M es el peso molecular de la sustancia (para la mescalina $\text{M} = 211,2610$ g/mol).

Luego:

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

$$\text{W} = 0,0537 \times 211,2610$$

$$\text{W} = 11,34 \text{ mg de mescalina (en 6.00 g de muestra seca)}$$

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

$$\begin{array}{ccc} 6,00 \text{ g} & \longrightarrow & 100 \% \\ 11,34 \times 10^{-3} \text{ g} & \longrightarrow & \% \text{ de alcaloides (como mescalina)} \end{array}$$

$$\% \text{ de alcaloides (como mescalina)} = \frac{11,34 \times 10^{-3} \times 100}{6,00} = 0,19\%$$

2. Procedimiento 2 - Estudio cuantitativo de los alcaloides totales en *Datura stramonium* del Perú. Metodología (Hoet & Ríos Chu – 1980⁶⁰)

Se realizaron dos análisis el 06 de julio del 2013. A continuación se describe el primero de ellos:

Muestra: 6,0 g de muestra F08 – 2 (M5)

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

Alcalinización con amoníaco concentrado NH_{3(cc)} 15 N

i. La muestra de cactus (6,0 g, seca, pulverizada y sin desengrasar) se coloca en un cartucho de tocuyo y se alcaliniza con 8 mL de NH_{3(cc)} 15 N, a temperatura ambiente, durante 1 hora.

Extracción por solventes

ii. La muestra alcalinizada (que se encuentra dentro del cartucho de tocuyo) se coloca en el equipo soxhlet y se adiciona 60 mL de una mezcla de etanol - éter etílico (1:2) y se deja macerar, a temperatura ambiente, durante una noche.

iii. Al día siguiente, se adiciona una cantidad adicional de la misma mezcla de solventes y se extrae en soxhlet durante 14 horas.

iv. La mezcla orgánica se concentra en rotavapor sin llegar a sequedad (40 °C, 200 – 300 mbar), obteniéndose el Extracto Bruto Orgánico (EBO).

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

Extracción del Extracto Bruto Orgánico con solución ácida

v. El extracto bruto orgánico se disuelve con 50 mL de cloroformo – éter etílico (1:1), se coloca en un embudo de separación de 250 mL y se extrae con una solución de H₂SO_{4(ac)} 0,5 N (5 x 50 mL), hasta que la solución orgánica dé prueba negativa de alcaloides mediante el test de Mayer. Luego, se elimina la fase orgánica.

Alcalinización del extracto acuoso con disolución de amoníaco

vi. Los extractos ácidos se alcalinizan con NH_{3(cc)} 15 N hasta pH = 11 – 12.

Extracción de alcaloides con solventes orgánicos

vii. El extracto acuoso básico se extrae con una mezcla de cloroformo – éter etílico (1:1) (5 x 50 mL) hasta que la solución acuosa presente test de Mayer negativo. Luego, se elimina la fase acuosa.

viii. Los extractos orgánicos se secan con sulfato de sodio anhidro y se deja reposar la mezcla y, previa filtración, se transvasan a un balón de 500 mL y se concentran en el rotavapor hasta sequedad (40 °C, 200 – 300 mbar), obteniéndose el Extracto Bruto de Alcaloides (EBA).

c) Eliminación de las bases volátiles

- ix. El sólido obtenido se disuelve con 5 mL de cloroformo y se coloca durante 15 min en baño maría. Luego, esta solución se concentra en el rotavapor, para eliminar el solvente y se repite un total de 5 veces. Este proceso tiene por objeto la eliminación total del $\text{NH}_3(\text{cc})$ presente en la muestra.
- x. Finalmente, se lleva a sequedad en el rotavapor, obteniéndose el Extracto Bruto de Alcaloides (EBA = 7,1 mg) como una resina de color pardo.

d) Titulación. Determinación potenciométrica

- xi. El extracto bruto de alcaloides, contenido en un balón de 100 mL, se disuelve en 5 mL de cloroformo. Luego se agrega 10 mL de solución estandarizada de $\text{H}_2\text{SO}_4(\text{ac})$ 0,0197 N, con una pipeta graduada. El solvente orgánico se elimina en el rotavapor quedando una solución acuosa ácida que contiene alcaloides en forma de sales.
- xii. La solución acuosa ácida se titula con una solución estandarizada de $\text{NaOH}(\text{ac})$ 0,0208 N, utilizando un potenciómetro* con electrodo de vidrio para determinar el punto de equivalencia. El análisis de la curva de titulación (ver Anexo 13) muestra que el punto de equivalencia corresponde a la adición de 7,73 mL de base, $\text{NaOH}(\text{ac})$.

e) Cálculo de la cantidad y del porcentaje de alcaloides en la muestra

El cálculo de la cantidad y del porcentaje de alcaloides en las muestras M2 – M6, se realiza según lo indicado en el acápite e). del Procedimiento 1 en la página 67. A continuación se presentan estos resultados en la Tabla 9.

Tabla 9. Porcentaje (%) de alcaloides presentes en la corteza del cactus “San Pedro Macho” (muestra F08 – 2, peso = 6.0 g en cada caso)

Muestra	Procedimiento	Volumen de $\text{H}_2\text{SO}_4(\text{ac})$ (mL)	Punto de equivalencia V_{NaOH} (mL)	Mescalina (mg)	% de alcaloides (como mescalina)	% alcaloides (Promedio)
M1	1	5,00	2,73	11,34	0,19	
M2	1	5,00	3,27	8,80	0,15	0,19
M3	1	5,00	2,68	11,61	0,19	
M4	1	5,00	1,77	13,06	0,22	
M5	2	10,00	7,73	7,77	0,13	-
M6	2	10,00	8,50	4,42	0,07	-

* Potenciómetro PL – 700 PV (Laboratorio de Investigación de Biopolímeros y Metalofármacos “LIBIPMET” de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Ingeniería) colaboración de la Srta. Josseline S. Ramos Figueroa, Bachiller miembro de dicho grupo de investigación.

Como se observa en la Tabla 9 se presenta mucha diferencia en los dos resultados – porcentaje de mescalina obtenidos mediante el Procedimiento 2 (Hoet & Ríos Chu – 1980⁶⁰), por lo que se decide descartar estos valores.

Luego, el porcentaje de alcaloides se determina promediando los resultados obtenidos mediante el Procedimiento 1 (European Pharmacopoeia 5.0 – 2005⁶²), el cual proporciona un valor de 0,19 % de alcaloides presentes en la corteza del cactus “San Pedro Macho” (*E. peruviana*). Este resultado es muy similar a aquel obtenido por Cjuno, M., *et al.* – 2009⁸ y Ogunbodede, O., *et al.* – 2010⁹, 0,25 % y 0,24 % respectivamente, de mescalina en la corteza del cactus “San Pedro Macho”; y muy inferior al 0,817 % reportado por Pardani, J., *et al.* – 1977⁵, quienes analizan la corteza y la pulpa del cactus (ver Tabla 1, Pág. 8).

Finalmente, es preciso indicar que en la bibliografía se presenta el análisis del alcaloide mescalina mediante HPLC (Ogunbodede, O., *et al.* – 2010⁹) el cual se tenía planeado realizarlo en el Laboratorio de Cromatografía del Departamento de Química de la Universidad Nacional de San Antonio de Abad (Cusco – Perú) bajo la dirección del Prof. Carlos Serrano; sin embargo, las limitaciones de recursos económicos* no permitieron llevar a cabo el mencionado análisis por HPLC.

G. Aislamiento de la mescalina como sulfato dihidratado

Como se describió en la metodología de investigación (Pág. 60) el aislamiento de compuestos puros comprende tres etapas:

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

Para el aislamiento de la mescalina se emplearon dos muestras de la corteza del cactus “San Pedro Macho” (*E. peruviana*), F08 – 2 y F08 – 3 (100 g de cada una), trabajo realizado del 12 de diciembre del 2012 al 07 de enero del 2013.

Ahora se procederá a describir el procedimiento realizado en cada una de estas etapas, hasta lograr la obtención del alcaloide puro, aplicado a la primera muestra F08 – 2.

* La solicitud de subvención económica del proyecto “Estudio Químico del cactus ‘San Pedro Macho’ (*Echinopsis peruviana*) fue rechazado por el Instituto de Investigación de la Facultad de Ciencias - UNI (Diciembre 2012) así como por el Instituto General de Investigación (IGI) de la UNI (Agosto 2013).

1. Extracción sólido – líquido: Obtención del Extracto Bruto Orgánico (EBO)

a) Extracción con solventes

- i. En un frasco Erlenmeyer de 2 L, dispuesto sobre una plancha de calentamiento, se coloca 1 L de ácido sulfúrico $H_2SO_{4(ac)}$ 0,5 N y se lleva a ebullición. Se retira la fuente de calentamiento y enseguida se agregan los 100 g de la corteza del cactus seco y pulverizado, y se deja en reposo durante 24 horas.
- ii. El solvente de extracción se separa mediante filtración al vacío (matraz Kitasato de 2 L), usando una bomba de vacío y papel de filtro “rápido”. Sin embargo, se produce una emulsión de la mezcla que resulta difícil de resolver (Foto 5). Para superar esta situación se realizaron dos procesos sucesivos:
 - Se separa la mayor parte del sólido con ayuda de coladores de metal (empleados usualmente para repostería puesto que su malla es la más fina), quedando el líquido aún emulsionado.
 - Para resolver esta emulsión se realizó la centrifugación* del líquido (10 000 rpm), utilizando tubos de plástico para centrifuga de 50 mL (marca Falcon, en forma de lápiz).
- iii. Se repite una vez más, la extracción por maceración con 1 L de $H_2SO_{4(ac)}$ 0,5 N, procediendo de la misma manera. En ambos casos se vuelve a formar emulsión, que nuevamente se resuelve de la misma manera.
- iii. Luego, se realiza una extracción con 1 L de agua destilada.
- iv. Se reúnen todos los extractos acuosos ácidos (3,1 L) y se guardan en un frasco de vidrio de 4 L de color ámbar: Extracto Bruto Orgánico (EBO).

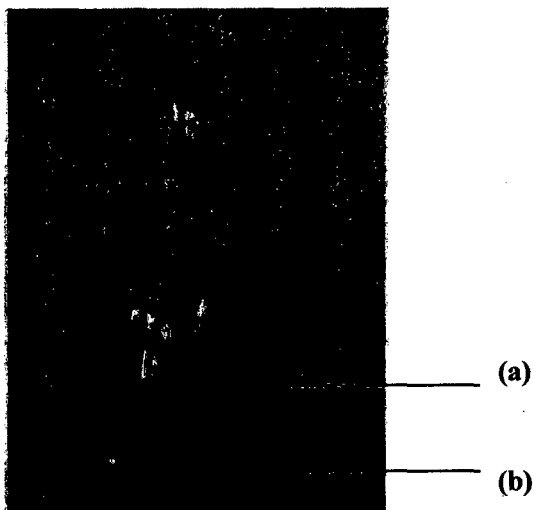


Foto 5. Extracción sólido – líquido. Se puede observar la presencia de la fase superior acuosa (a) y la emulsión formada (b) (Foto P. Baldera Aguayo).

* Centrifuga Eppendorf 5810 R, Laboratorio de Películas Delgadas (Facultad de Ciencias – UNI), colaboración del Sr. Antony Bazán, estudiante miembro de dicho grupo de investigación.

2. Separación líquido – líquido: Obtención del Extracto Bruto de Alcaloides (EBA)**b) Alcalinización del extracto con solución de hidróxido de sodio $\text{NaOH}_{(ac)}$ 6 N**

v. El extracto acuoso ácido (3,1 L, $pH = 1,0$) se alcaliniza hasta $pH 12$ con 300 mL de $\text{NaOH}_{(ac)}$ 6 N (pureza del $\text{NaOH} = 98,2\%$).

c) Extracción de alcaloides con solventes orgánicos

- vi. El extracto acuoso alcalino (3,4 L) se separa mediante filtración al vacío (matraz Kitasato de 2 L), usando una bomba de vacío y papel de filtro “lento”. El líquido filtrado se divide en 12 porciones de 300 mL, debido a que se empleará un embudo de decantación de 500 mL. Cada porción de 300 mL de fase acuosa se extrae con 30 mL de cloroformo, de manera que la proporción entre el Extracto Acuoso: cloroformo sea de 10:1. Esta extracción se repite una segunda vez.
- vii. En algunos casos se forma emulsión, y para resolverla se procede de la siguiente manera:
- Se deja en reposo durante 1 h. Luego de ello si la emulsión persiste, la mezcla orgánica se lava con una solución semisaturada de $\text{Na}_2\text{SO}_{4(s)}$ (1 g de sal anhidra en 10 mL de agua destilada).
 - O se deja en reposo durante 24 h.
- viii. Los extractos clorofórmicos se juntan (500 mL), y se secan con sulfato de sodio $\text{Na}_2\text{SO}_{4(s)}$, y previa filtración con papel de filtro “lento”, se transvasan a un balón de 1 L para concentrar en el rotavapor hasta sequedad (40 °C, 200 – 300 mbar). Finalmente se obtiene 4,75 g de Extracto Bruto de Alcaloides (EBA). Si el EBA aún presenta impurezas (remanentes de la emulsión previamente resuelta) se redisuelve en 10 mL de cloroformo y se filtra en papel “lento”. Luego se concentra hasta sequedad en el rotavapor (40 °C, 200 – 300 mbar).

3. Purificación. Preparación del sulfato de mescalina dihidratado

- viii. El EBA (4,74 g) se disuelve con 4 mL de etanol y se coloca en un tubo de ensayo ($\phi = 2,5$ cm, $h = 11,5$ cm) y se coloca en un baño de hielo (5 °C).
- ix. Luego, se agrega (gota a gota) 2 mL de solución de ácido sulfúrico $\text{H}_2\text{SO}_{4(ac)}$ al 1 %, observándose la inmediata precipitación del sulfato de mescalina, como finas partículas blancas (ver Foto 6). Se deja en reposo, a dicha temperatura durante 24 h.
- x. El líquido sobrenadante se separa con ayuda de un gotero, y el sólido aún húmedo que queda en el tubo se recristaliza con etanol: Se agrega 5 mL de etanol y se lleva a ebullición en un “baño María”.
- xi. Cuando todo se haya disuelto se retira el tubo del baño y se deja enfriar a temperatura ambiente.

- xii. Al enfriarse, se observa la precipitación de finos cristales blancos (Foto 6). Luego de 10 minutos, se coloca el tubo en el refrigerador, a 5 °C, hasta el día siguiente (24 h).
- xiii. Se filtra el líquido sobrenadante, de color amarillo pálido, a través de un embudo de placa porosa Pyrex ($\phi = 4,5$ cm), y se lava el sulfato de mescalina con 1 – 2 mL de etanol helado.
- xiv. Se deja secar el sulfato de mescalina a temperatura ambiente durante 1 hora y luego en la estufa “Memmert” a 40 °C, hasta peso constante, obteniéndose 137,77 mg de sulfato de mescalina.



Foto 6. Preparación del sulfato de mescalina dihidratado (Foto Pedro Baldera Aguayo).

El tratamiento de la muestra F08 – 3 (100 g), siguiendo este mismo procedimiento, proporcionó 0,61 g de EBA y a partir de ello, 17,8 mg de sulfato de mescalina dihidratado.

Esta diferencia de resultados (137,77 mg y 17,8 mg de sulfato de mescalina dihidratado), para las muestras F08 – 2 y F08 – 3, respectivamente, que son dos “trozos” de cactus recolectados del mismo espécimen, podría deberse a la diferencia en la forma de secado que se utilizó para el tratamiento de cada una de estas muestras.

H. Identificación Clásica del sulfato de mescalina dihidratado

La identificación del sulfato de mescalina dihidratado se realizó mediante métodos clásicos (punto de fusión, comportamiento cromatográfico – CCF, análisis porcentual) y la determinación estructural a través de del análisis de sus espectros de Masas (IE), RMN^1H , RMN^{13}C , IR y UV.

La muestra analizada fue el sólido cristalino de color blanco obtenido precedentemente, a partir de la muestra F08 – 2 (Sec.G, Pág. 72)

1. Características del producto.- Sólido cristalino blanco

2. Determinación del Punto de Fusión

a) Condiciones de trabajo

i. **Equipo:** IA9000 Digital Melting Point

ii. **Laboratorio:** Lab. N°12 (LABICER), FC – UNI

iii. **Operador:** Bach. Josseline S. Ramos Figueroa (Personal de LABICER)

iv. **Fecha:** 07 de enero del 2013

b) Resultados

Punto de Fusión: 184 °C

Referencias – Sulfato de mescalina dihidratado

i. 183 °C, Flores – 2000¹

ii. 183 – 186 °C, The Merc Index – 1996¹⁵

3. Comportamiento cromatográfico (Cromatografía en Capa Fina – CCF)

Laboratorio: Lab. N °12 – Química de Productos Naturales, FC – UNI.

Operador: Bach. Pedro A. Baldera Aguayo

Fecha: 07 de enero del 2013

a) Cromatograma N °1 (Condiciones propuestas por Cjuno, M., *et al.* - 2010⁷⁵)

i. Adsorbente : Sílica Gel 60F – 254 (Merck)

ii. Eluyente : Acetato de etilo – Metanol (8,5:1,0)

iii. Revelador: Fluorescamina y luz UV

iv. Resultados: $R_f = 0,66$

v. Referencia: $R_f = 0,68$ (Cjuno, M., *et al.* – 2010⁷⁵)

vi. Conclusiones: La muestra corresponde al sulfato de mescalina dihidratado.

b) Cromatograma N°2 (Condiciones propuestas por Doetsch, P. W., *et al.* – 1980⁷⁴)

i. Adsorbente : Sílica Gel 60F – 254 (Merck)

ii. Eluyente : Éter etílico – ácido acético glacial (19:1)

iii. Revelador: Fluorescamina y luz UV

iv. Resultados: $R_f = 0,54$

v. Referencia: $R_f = 0,41$ (Doetsch, P. W., *et al.* – 1980⁷⁴)

vi. Conclusiones: La muestra corresponde al sulfato de mescalina dihidratado.

4. Análisis porcentual de carbono, hidrógeno, nitrógeno, oxígeno y azufre

a) Condiciones de trabajo

i. **Equipo :** Analizador ELEMENTAR – vario Micro cube (C, H, N, S por combustión; O por pirólisis)

- ii. **Laboratorio:** Service de Microanalyse, Institut de Chimie des Substances Naturelles del Centre National de la Recherche Scientifique, ICSN – CNRS, de Gif Sur Yvette, Francia (Colaboración del Dr. Bernard Delpech, investigador del ICSN)
- iii. **Operador:** Personal especializado del laboratorio – ICSN.
- iv. **Fecha:** 10 de setiembre del 2013
- v. **Muestra:** Sulfato de mescalina dihidratado
- b) **Resultados** (Ver Anexo 9)

Tabla 10. Análisis porcentual encontrado para el sulfato de mescalina dihidratado

Elemento	Exp. 1	Exp. 2.	Promedio
	%	%	%
C	47,37	47,25	47,31
H	7,11	7,02	7,07
N	5,16	4,99	5,08
O	34,77	34,76	34,77
S	5,77	5,69	5,73

c) **Análisis de resultados**

- i. Se asume que tiene 100 g de muestra:

Tabla 11. Cálculo del N° moles de cada elemento para el sulfato de mescalina dihidratado

Elemento	Exp. 1 %	Exp. 2 %	Promedio %	Peso (g)	Peso atómico (g/mol)	N° moles (Peso/ peso atómico)	Relación entre elementos
C	47,37	47,25	47,31	47,31	12,011	3,94	22
H	7,11	7,02	7,07	7,07	1,008	7,01	40
N	5,16	4,99	5,08	5,08	14,007	0,36	2
O	34,77	34,76	34,77	34,77	15,999	2,17	12
S	5,77	5,69	5,73	5,73	32,06	0,18	1

- ii. Relación del número de moles de átomos de los 5 elementos considerados (obtenido en el ICSN):

C: $3,94/0,18 = 22$; H: $7,01/0,18 = 40$; N: $0,36/0,18 = 2$; O: $2,17/0,18 = 12$ y S: $0,18/0,18 = 1$
Luego, relación C/H/N/O/S: 22/40/2/12/1

- iii. Relación del número de moles de los elementos presentados en el sulfato de mescalina dihidratado, $C_{22}H_{36}N_{22}O_{10}S \cdot 2H_2O$ ($C_{22}H_{40}N_{22}O_{12}S$): Relación de C/H/N/O/S: 22/40/2/12/1

d) Conclusión

El análisis porcentual de la muestra corresponde al sulfato de mescalina dihidratado.

Observación.- En mayo del 2013 se realizó un análisis porcentual de carbono, hidrógeno y nitrógeno para el sulfato dihidratado de mescalina; sin embargo, los resultados que se registraron (valores promedio: C 48,09%; H 6,41% y N 4,87%) proporcionaron una relación incorrecta del número de moles de los 5 átomos presentes en el sulfato de mescalina dihidratado debido a que la muestra no estaba debidamente seca antes de realizar el análisis (ver Anexo 10). Dicha muestra fue nuevamente recristalizada en etanol, 2 veces, y secada previamente a llevarla a Francia, donde se realizó el análisis porcentual (ICSN – CNRS).

I. Identificación Espectroscópica del sulfato de mescalina dihidratado

La determinación estructural del sulfato de mescalina dihidratado obtenido del cactus “San Pedro Macho” (*E. peruviana*) (aislado de la muestra F08 – 2) se realizó mediante el análisis de sus espectros de masas, de RMN¹H, RMN¹³C y UV, registrados por el autor de esta tesis durante los meses de abril – mayo del 2013 en la Universidad de Yale (USA).

Además, el espectro IR fue registrado, a nuestro pedido, por el Quím. Jorge Muñante F. de la empresa Electromédica Peruana S. A. (EMPESA) en Lima – Perú el 07 de diciembre del 2012.

1. Espectro de masas – EI (70eV) (Espectro 1)

a) Condiciones de trabajo

i. **Equipo:** Agilent Technologies 5973 Network Mass Selective Detector (MSD). Tipo: GC/MS. Modo de Ionización: EI.

ii. **Laboratorio:** Chemical and Biophysical Instrumentation Center (CBIC), Yale University, USA.

iii. **Operador:** Pedro A. Baldera Aguayo

iv. **Fecha:** 22 de mayo del 2013

v. **Concentración de la muestra:** 16 mg/650 uL D₂O (alícuota)

b) Características del espectro

m/z: 211 (11,37 %, ion molecular), 182 (pico base, 100 %), 167 (50,41 %), 151 (17,63 %)

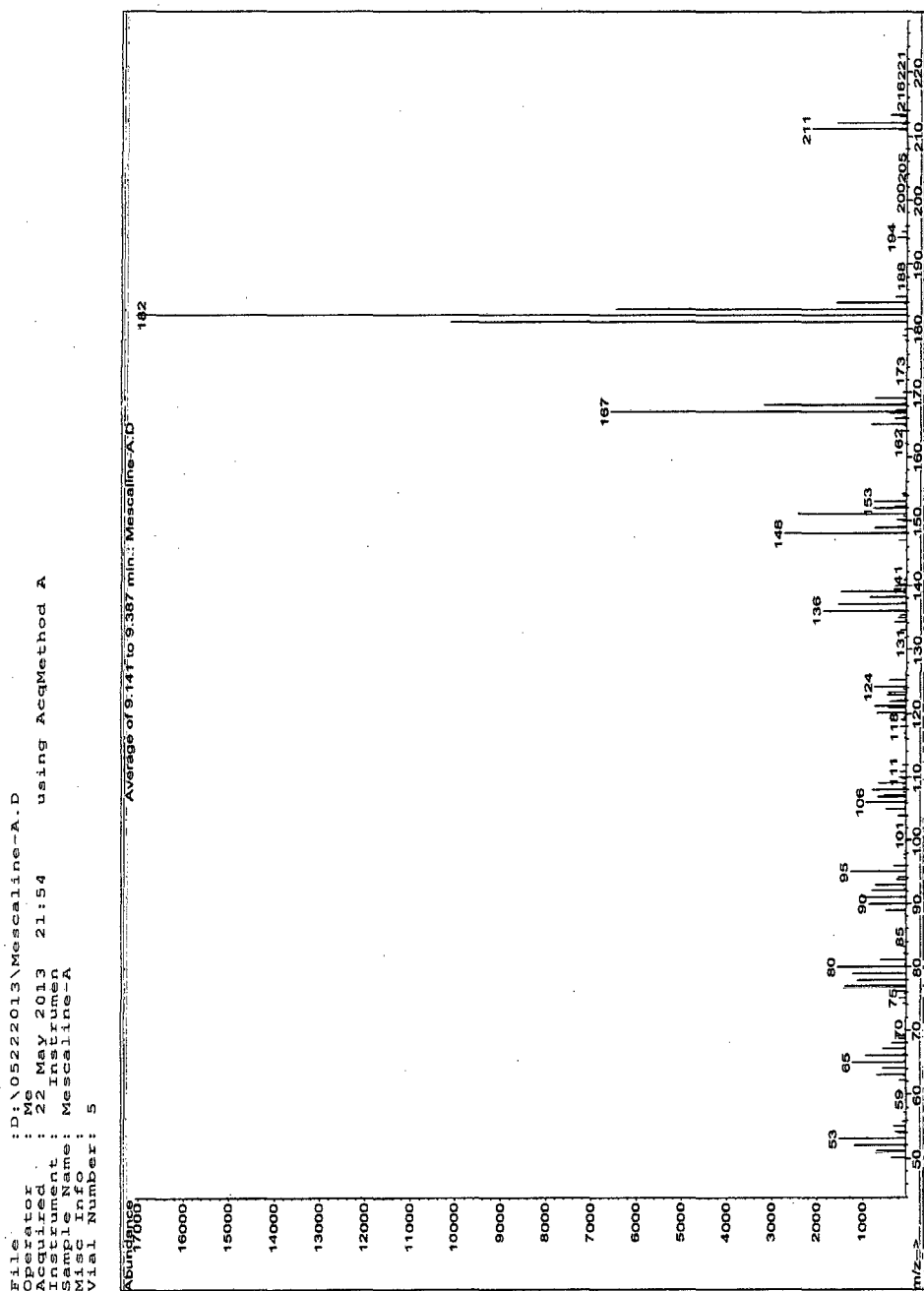
c) Análisis del espectro

La identificación de los cuatro fragmentos iónicos correspondientes a los picos m/z 211, 182, 167 y 151, y las ecuaciones de fragmentación respectivas, se han descrito precedentemente (Sec. A. 4. a), Pág. 19).

El espectro de masas del sulfato de mescalina dihidratado obtenido a partir del cactus "San Pedro Macho" (*E. peruviana*) es similar a los espectros registrados en la bibliografía (Sec. A. 4. a), Pág. 12).

d) Conclusión

Existe correspondencia entre el espectro de masas obtenido para nuestro compuesto y aquellos publicados en la bibliografía para la mescalina.



Espectro 1. Espectro de masas (EI) del sulfato de mescalina dihidratado obtenido a partir del cactus "San Pedro Macho" (*E. peruviana*)

2. Espectro de RMN¹H – DMSO (Espectro 2)

a) Condiciones de trabajo

- i. **Equipo:** Bruker Avance 500 MHz
- ii. **Laboratorio:** Chemical and Biophysical Instrumentation Center (CBIC), Yale University, USA.
- iii. **Operador:** Pedro A. Baldera Aguayo
- iv. **Fecha:** 21 de mayo del 2013
- v. **Concentración de la muestra:** 1 mg/600 uL DMSO-*d*₆

b) Características del espectro

δ (ppm): 2,67 (2H, t); 2,89 (2H, t); 3,32 (NH₂ solapado por la señal HOD, s); 3,62 (3H, s); 3,76 (6H, s); 6,52 (2H, s)

c) Análisis del espectro

La correspondencia entre los valores de desplazamientos químicos y cada uno de los protones pertenecientes a la estructura de la mescalina se indican a continuación, en la estructura de la molécula (Figura 26) y en la Tabla 12.

d) Conclusión

El espectro RMN¹H obtenido corresponde a lo esperado para la estructura de la mescalina así como existe correspondencia para nuestro compuesto y aquellos publicados en la bibliografía (ver Tabla 3, Pág. 23)

Observación.- Un espectro de RMN¹H similar, pero de menor resolución, fue obtenido en el ICSN – CNRS de Gif Sur Yvette (Francia), gracias a la colaboración del Dr. B. Delpech, durante la visita que realizó el Dr. V. Reyna en el mes de setiembre del 2013 (Ver Anexo 11).

3. Espectro de RMN¹H – D₂O (Espectro 3)

a) Condiciones de trabajo

- i. **Equipo:** Bruker Avance 500 MHz
- ii. **Laboratorio:** Chemical and Biophysical Instrumentation Center (CBIC), Yale University, USA.
- iii. **Operador:** Pedro A. Baldera Aguayo
- iv. **Fecha:** 30 de mayo del 2013
- v. **Concentración de la muestra:** 1 mg/600 uL D₂O

b) Características del espectro

δ (ppm): 2,94 (2H, t); 3,26 (2H, t); 3,75 (3H, s); 3,85 (6H, s); 6,67 (2H, s)

c) Análisis del espectro

La correspondencia entre los valores de desplazamientos químicos y cada uno de los protones pertenecientes a la estructura de la mescalina se indican en la estructura de la molécula (Figura 26) y en la Tabla 12.

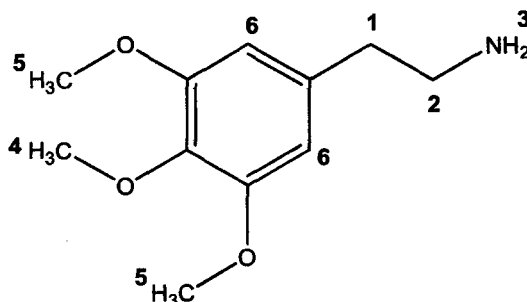


Figura 26. Asignaciones de los átomos de hidrógeno en la mescalina.

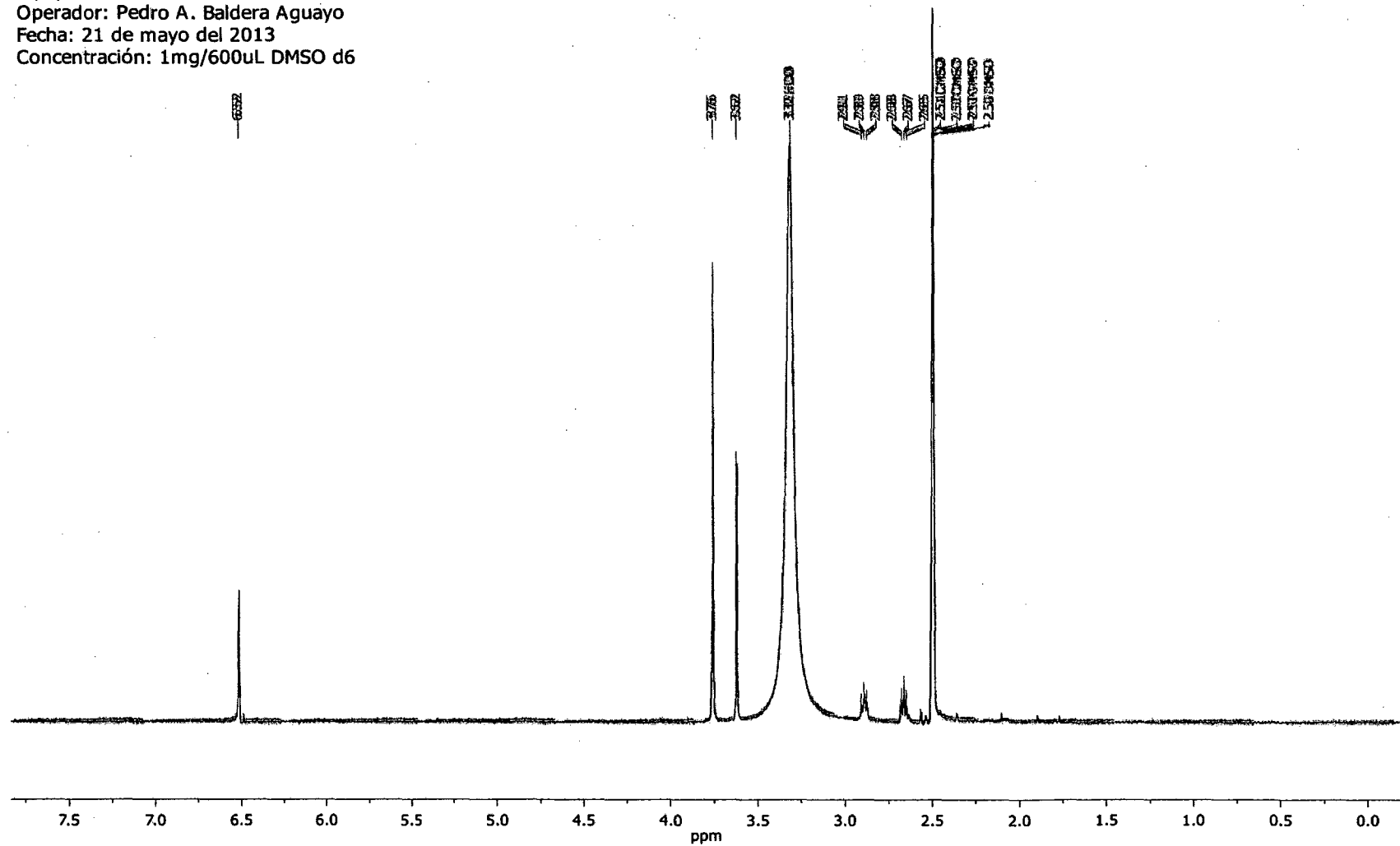
Tabla 12. Datos del espectro RMN¹H del sulfato de mescalina dihidratado (500 MHz) en DMSO y D₂O

δ (ppm)		Nº de átomo de Hidrógeno	Tipo de señal	Integración
DMSO	D ₂ O			
2,67	2,94	1	t	2H
2,89	3,26	2	t	2H
3,32	-	3	s	2H
3,62	3,75	4	t	3H
3,76	3,85	5	s	6H
6,52	6,67	6	s	2H

d) Conclusión

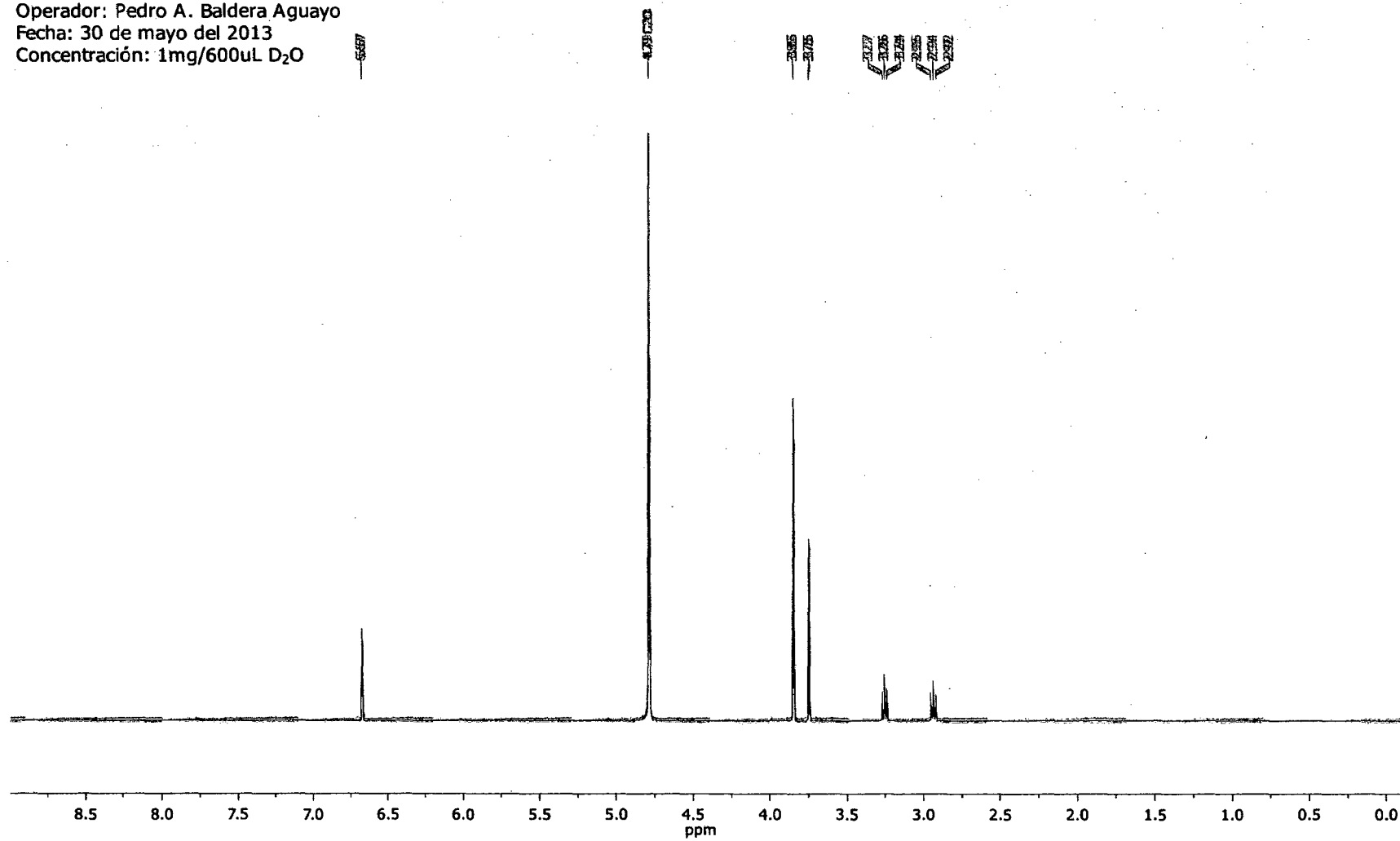
Los espectros RMN¹H obtenidos corresponden a lo esperado para la estructura de la mescalina. Además, existe correspondencia para nuestro compuesto y aquellos publicados en la bibliografía (ver Tabla 3, Pág. 23).

Espectro RMN ^1H
Equipo: Bruker 500a
Operador: Pedro A. Baldera Aguayo
Fecha: 21 de mayo del 2013
Concentración: 1mg/600uL DMSO d6



Espectro 2. Espectro de RMN ^1H (500 MHz) del sulfato de mesalina dihidratado en DMSO obtenido a partir del cactus "San Pedro Macho" (*E. peruviana*).

Espectro RMN ^1H
Equipo: Bruker 500b
Operador: Pedro A. Baldera Aguayo
Fecha: 30 de mayo del 2013
Concentración: 1mg/600uL D_2O



Espectro 3. Espectro de RMN ^1H (500 MHz) del sulfato de mesquite dihidratado en D_2O obtenido a partir del cactus "San Pedro Macho" (*E. peruviana*).

4. Espectro de RMN¹³C (Espectros 4 y 5)

a) Condiciones de trabajo

i. **Equipo:** Bruker Avance 500 MHz

ii. **Laboratorio:** Chemical and Biophysical Instrumentation Center (CBIC), Yale University, USA.

iii. **Operador:** Pedro A. Baldera Aguayo

iv. **Fecha:** 30 de mayo del 2013

v. **Concentración de la muestra:** 10 mg/600 uL D₂O

b) Características del espectro DEPT – 135 (Espectro 4)

Este espectro nos muestra los carbonos primarios y terciarios en la parte superior, y los carbonos secundarios en la parte inferior.

i. Señales en la parte superior:

δ (ppm): 56,0; 60,84; 106,25

ii. Señales en la parte inferior:

δ (ppm): 32,99; 40,45

c) Características del espectro de desacoplamiento de protón de banda ancha (Espectro 5)

En este espectro aparecen todos los átomos de carbono de la molécula.

δ (ppm): 32,99; 40,45; 56,01; 60,84; 106,25; 133,51; 135,60; 152,61

d) Análisis del espectro DEPT – 135 y Desacoplamiento de protón de banda ancha

i. Carbonos primarios (CH₃)

Las siguientes dos señales presentes en los espectros DEPT – 135 y Desacoplamiento de protón de banda ancha corresponden a los tres carbonos terciarios presentes en la mesalina:

δ (ppm): 56,01 (2C, C – 3); 60,84 (1C, C – 4)

ii. Carbonos secundarios (CH₂)

Las dos señales de la parte inferior del espectro DEPT – 135 corresponden a los dos carbonos secundarios presentes:

δ (ppm): 32,99 (1C, C – 1); 40,45 (1C, C – 2)

iii. Carbonos terciarios (CH)

La señal presente en los en los espectros DEPT – 135 y Desacoplamiento de protón de banda ancha corresponde a los dos carbonos terciarios presentes en la mesalina:

δ (ppm): 106,25 (2C, C – 5)

iv. Carbonos cuaternarios (C)

Las tres señales registradas en el espectro de Desacoplamiento de protón de banda ancha corresponden a los cuatro átomos de carbonos cuaternarios:

δ (ppm): 133,51 (1C, C – 6); 135,60 (1C, C – 7); 152,61 (2C, C – 8)

La correspondencia entre los valores de desplazamientos químicos y cada uno de los átomos de carbono pertenecientes a la estructura de la mescalina se indican en la estructura de la molécula (Figura 27) y en la Tabla 13.

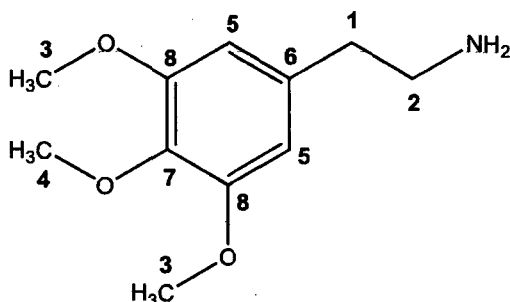


Figura 27. Asignación de los átomos de carbono en la mescalina.

Tabla 13. Desplazamientos químicos, δ (ppm), de los átomos de carbono de la mescalina en D_2O

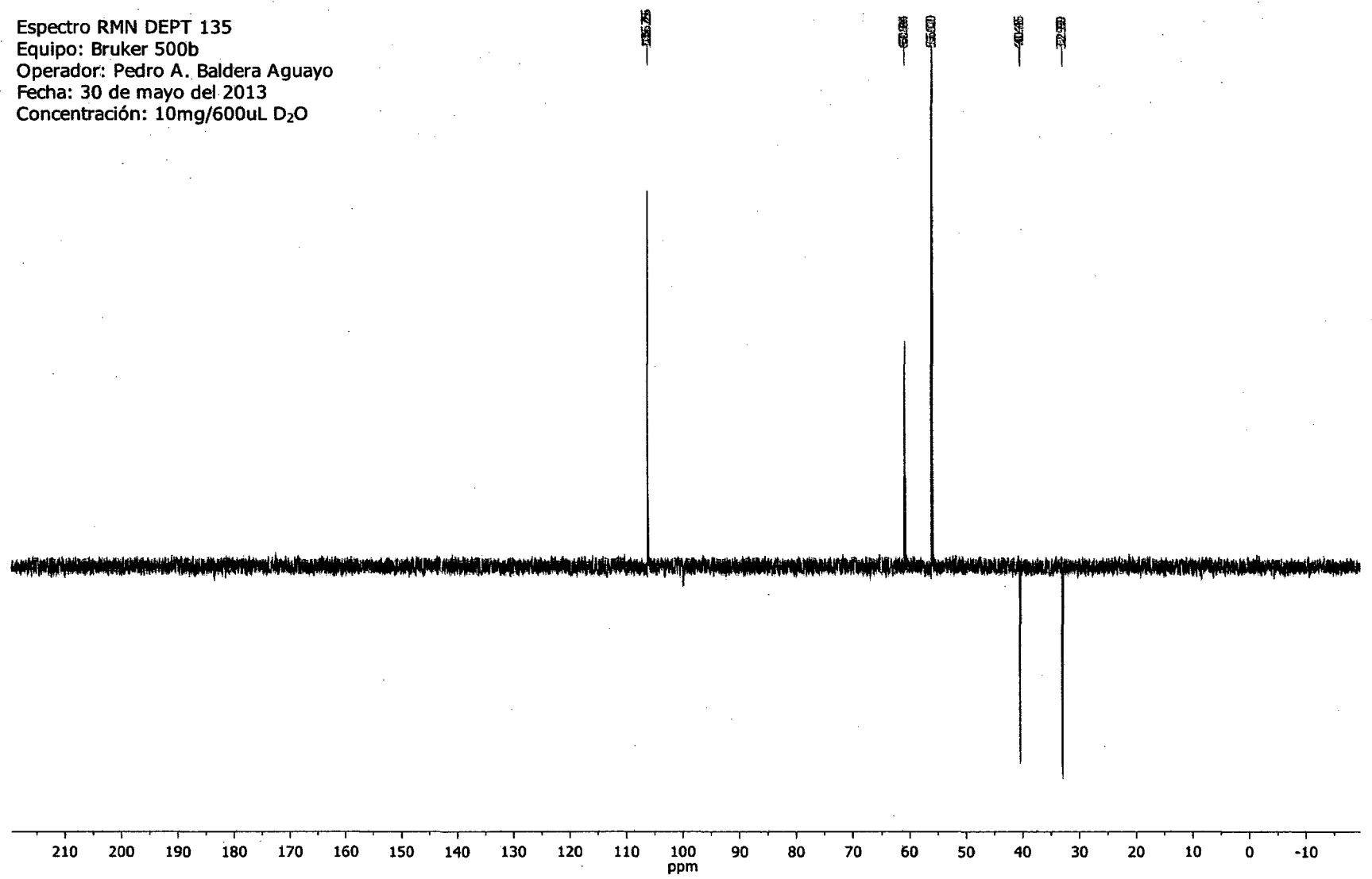
δ (ppm)	Nº de átomo de Carbono	Tipo de Carbono
32,99	C – 1	CH ₂ (secundario)
40,45	C – 2	CH ₂ (secundario)
56,01	C – 3	CH ₃ (primario)
60,84	C – 4	CH ₃ (primario)
106,25	C – 5	CH (terciario)
133,51	C – 6	C (cuaternario)
135,60	C – 7	C (cuaternario)
152,61	C – 8	C (cuaternario)

e) Conclusión

Los espectros DEPT – 135 y Desacoplamiento de protón de banda ancha presentados corresponden a lo esperado para la estructura de la mescalina. Además, existe correspondencia para nuestro compuesto y aquellos publicados en la bibliografía (ver Tabla 4, Pág. 26).

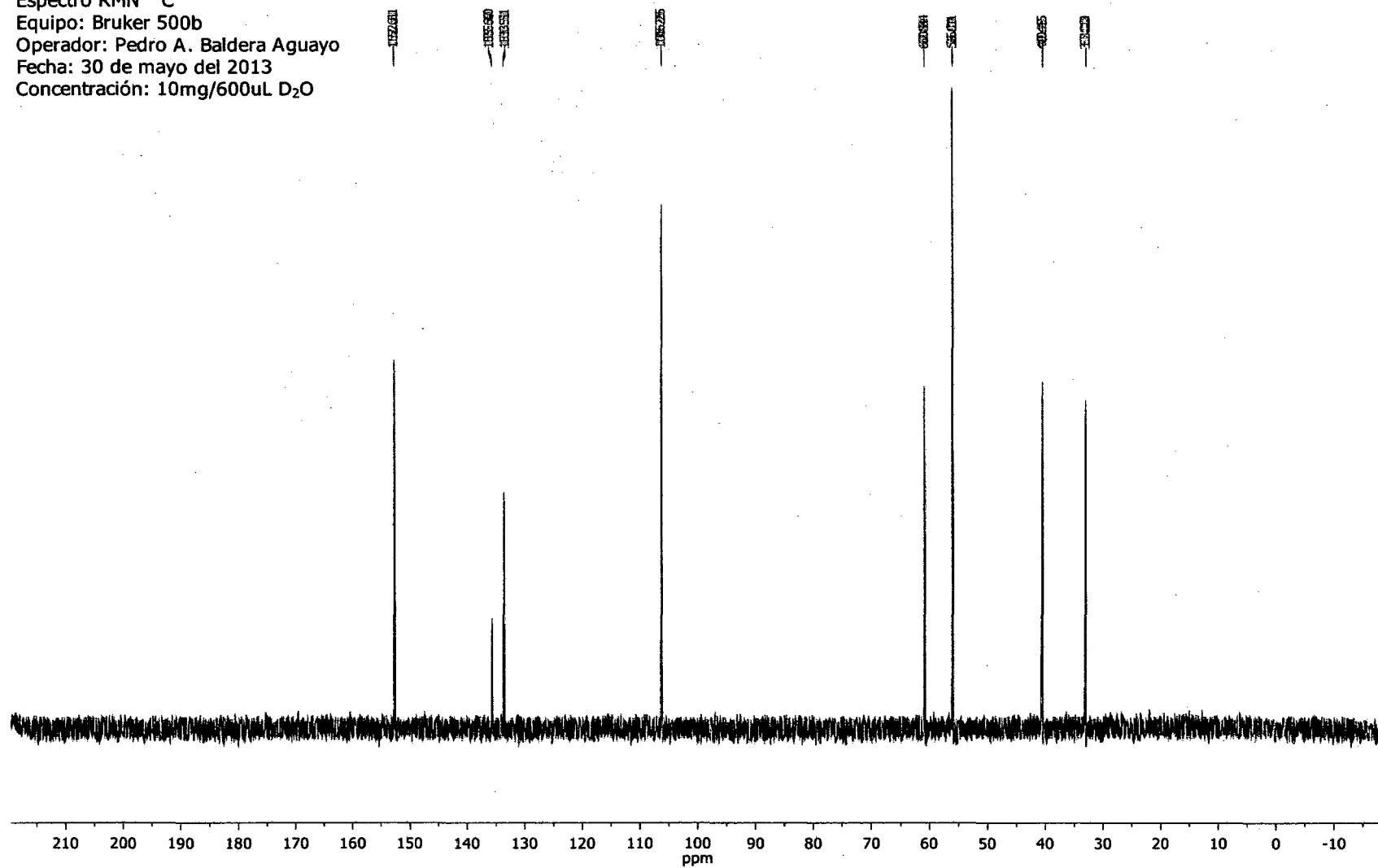
Observación.- Un espectro de RMN¹³C similar, pero de menor resolución, fue obtenido en el ICSN – CNRS de Gif Sur Yvette (Francia), gracias a la colaboración del Dr. B. Delpech, durante la visita que realizó el Dr. V. Reyna en el mes de setiembre del 2013 (Ver Anexo 12).

Espectro RMN DEPT 135
Equipo: Bruker 500b
Operador: Pedro A. Baldera Aguayo
Fecha: 30 de mayo del 2013
Concentración: 10mg/600uL D₂O



Espectro 4. Espectro DEPT – 135 (500 MHz) del sulfato de mesquite dihidratado en D₂O obtenido a partir del cactus “San Pedro Macho” (*E. peruviana*)

Espectro RMN ^{13}C
Equipo: Bruker 500b
Operador: Pedro A. Baldera Aguayo
Fecha: 30 de mayo del 2013
Concentración: 10mg/600uL D_2O



Espectro 5. Espectro RMN ^{13}C (500 MHz) del sulfato de mesalina dihidratado en D_2O obtenido a partir del cactus "San Pedro Macho" (*E. peruviana*)

5. Espectro de IR (Anexo 13)

a) Condiciones de trabajo

i. **Equipo:** Espectrofotómetro Infrarrojo Shimadzu FTIR

ii. **Laboratorio:** Electromédica Peruana S. A. (EMPESA)

iii. **Operador:** Quím. Jorge Muñante F.

iv. **Fecha:** 07 de diciembre del 2012

v. **Concentración de la muestra:** 0,36 mg de sulfato de mescalina dihidratado. Se preparó una pastilla que contiene la muestra en bromuro de potasio $KBr_{(s)}$.

b) Características del espectro

ν^{-1} (cm^{-1}): 3437, 2943, 2837, 1633, 1589, 1514, 1470, 1423, 1337, 1304, 1242, 1188, 1128, 1082, 995, 831, 777, 673, 619, 528, 463.

c) Análisis del espectro

Tabla 14. Bandas características del espectro IR del sulfato de mescalina dihidratado

Banda	ν^{-1} (cm^{-1})	Modo vibracional
A	3437	Estiramiento N-H (NH_3^+)
C	2943	Estiramiento C-H (CH_2 , $-OCH_3$)
F	1633	Flexión N-H (NH_3^+) simétrica
H	1589	Estiramiento anular C-C
J	1514	Flexión C-H ($O-CH_3$) simétrica
L, M	1470, 1423	Estiramiento C-H (CH_2 , $-OCH_3$) simétrico Estiramiento anular C-C
N	1337	Estiramiento C-H (CH_2 , $-OCH_3$) simétrico, Estiramiento anular C-C, Estiramiento C-O-C simétrico
N'	1304	Aleteo (wag) C-H (CH_2)
O, P	1242, 1188	Estiramiento C-O-C asimétrico Estiramiento S-O (SO_4^{2-}) Aleteo C-H ($-OCH_3$)
Q	1128	Estiramiento C-O-C simétrico
R	1082	Aleteo C-H (CH_2)

(... continuación de la Tabla 13. Bandas características del espectro IR del sulfato de mescalina dihidratado)

Banda	ν^{-1} (cm ⁻¹)	Modo vibracional
T	995	
U	831	Aleteo y torsión C-H anular
V	777	
W	673	Aleteo S-O (SO ₄ ²⁻), Aleteo y torsión C-H anular
X	619	Tijereteo (scissoring) C-C anular en el plano
Y	528	Aleteo, torsión C-C anular fuera del plano
Z	463	Deformación del anillo aromático

d) Conclusión

Las bandas características del espectro IR obtenido corresponden a lo esperado para los grupos funcionales presentes en la mescalina. Además, existe correspondencia para nuestro compuesto y aquellos publicados en la bibliografía (ver Tabla 5, Pág. 31).

6. Espectro de UV (Anexo 14)

a) Condiciones de trabajo

- i. **Equipo:** UV – Visible Spectrophotometer Shimadzu UV - 2450
- ii. **Laboratorio:** The Yan Lab at the Department of Chemistry, Yale University, USA.
- iii. **Operador:** Pedro A. Baldera Aguayo
- iv. **Fecha:** 18 de abril del 2013
- v. **Concentración de la muestra:** 1 mg/mL Etanol al 80 % en agua

b) Características del espectro

$\lambda_{\text{máx}}$: 269 nm correspondiente a una transición electrónica $\pi \rightarrow \pi^*$ (200 – 400 nm).

c) Análisis del espectro

El máximo de absorción obtenido es análogo a aquellos reportados por Mills, T., *et al.* - 2006²³, Flores – 2000¹ y Salomon & Bina – 1946³⁴ (ver Sec. A. 4., e), Pág. 34), Ikan – 1991²⁷ y Becker – 1985²⁹ (ver Anexo 2).

d) Conclusión

Existe correspondencia entre el espectro UV obtenido para nuestro compuesto y aquellos publicados en la bibliografía (ver Tabla 6).

III. RESULTADOS

Y

CONCLUSIONES

RESULTADOS

1. A partir de 100 g de la corteza del tallo, seca y pulverizada, del cactus “San Pedro Macho” (*Echinopsis peruviana*) se obtuvo mediante extracción por solventes y partición líquido - líquido 4,74 g de Extracto Bruto de Alcaloides. Su purificación mediante la formación del sulfato de mescalina dihidratado proporcionó 137,77 mg de un sólido cristalino de color blanco.

La caracterización de dicha sustancia se realizó mediante su punto de fusión (P. f. 184 °C), el análisis porcentual de elementos (C 47,31 %; H 7,07 %; N 5,08 %; O 34,77 %; S 5,73 %), y sus espectros de masas, RMN¹H, RMN¹³C, IR y UV; correspondiendo todos ellos a los valores y características referidas en la bibliografía.

2. El análisis cualitativo de los metabolitos secundarios o “marcha fitoquímica” presentes en el cactus, de acuerdo a Rondina & Coussio – 1969³, indica que contiene: Aminogrupos primarios y/o secundarios (++) , grupos fenólicos libres (+), triterpenoides y/o esteroides (+), alcaloides (+++), catequinas (+).
3. El análisis cuantitativo del total de alcaloides contenidos en la corteza de los tallos del cactus “San Pedro Macho” (*E. peruviana*), mediante el procedimiento de la European Pharmacopoeia 5.0 – 2005⁶² proporciona 0,19 %. Este valor se encuentra comprendido en el rango de porcentajes de alcaloides para el “San Pedro Macho” publicados en la bibliografía (ver Tabla 1, Pág. 8).

CONCLUSIONES

1. A partir de la corteza de los tallos del cactus “San Pedro Macho” (*E. peruviana*) se aisló la mescalina como su sal, el sulfato dihidratado, el cual ha sido identificado mediante su punto de fusión, análisis elemental de sus elementos, espectros de masas, RMN¹H, RMN¹³C, IR y UV, y la comparación de éstos con lo publicado en la bibliografía.
2. Se realizó el análisis cualitativo de los metabolitos secundarios o “Marcha Fitoquímica” presentes en el cactus, de acuerdo a Rondina & Coussio – 1969³, logrando verificar la presencia de: Aminogrupos primarios y/o secundarios (++) , grupos fenólicos libres (+), triterpenoides y/o esteroides (+), alcaloides (+++), catequinas (+).
3. Se realizó el análisis cuantitativo del total de alcaloides contenidos en la corteza de los tallos del cactus “San Pedro Macho” (*E. peruviana*), según el procedimiento de la European Pharmacopoeia 5.0 – 2005⁶², habiendo obtenido 0,19 %.

IV. RECOMENDACIONES

RECOMENDACIONES

1. El proceso de secado del cactus completo (corteza y pulpa) a bajas temperaturas, 40 -50 °C, resulta un proceso lento, por lo que se requiere disponer de estufas amplias, que actualmente no disponemos, y mejor aún adquirir equipos de liofilización para el secado de muestras sólidas, en los cuales las condiciones de bajas temperaturas y presión son ideales para el secado de productos naturales, pero que su alto costo impide su adquisición en nuestro laboratorio.
2. La determinación cuantitativa del contenido de mescalina en cactus se puede realizar por diferentes métodos de alta sensibilidad, como la Cromatografía Líquida de Alta Performancia (HPLC). Para ello es necesario contar con estándares de grado de pureza HPLC y con el equipo de HPLC, el cual es demasiado costoso para poder ser adquirido en nuestro laboratorio.
3. Durante el proceso de extracción sólido – líquido se pueden formar emulsiones difíciles de resolver por los métodos clásicos como: variación de pH, filtración al vacío, adición de sales solubles, etc. En cambio, si se cuenta con acceso a un equipo de ultracentrífuga, este debe de ser empleado para resolver la emulsión de forma rápida y sin pérdidas cuantiosas de solvente, a diferencia del empleo de los métodos clásicos.

V. BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Flores, J., Estudio Químico del Cactus San Pedro (*Echinopsis pachanoi* Britton y Rose), Tesis de Licenciatura en Ciencias Mención Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Ingeniería, Lima, 2000, 103 páginas.
2. Reyna, V. y Flores, J., *Quepo*, 15, 28-37 (2001). "El uso del cactus San Pedro (*E. pachanoi*) en medicina tradicional peruana".
Nota.- Quepo es la revista de la sociedad peruana de cactus y suculentas del Perú.
3. Rondina R. y Coussio, J., *Revista de Investigación Agropecuaria*, INTA (Buenos Aires, Argentina), Serie 2, Vol. VI, N°22, 351-366 (1969). "Estudio Fitoquímico de Plantas Medicinales Argentinas".
4. Villacrés O. V., Bioactividad de Plantas Amazónicas, Ed. Abya-Yala, Ecuador, 1995, Pp. 154 – 171.
5. Pardanani, J. H., McLaughlin, J. L., Kondrat, R. W. and Cooks, R. G., *Lloydia*, 40, 585 – 590 (1977). "Cactus Alkaloids. XXXVI. Mescaline and Related Compounds from *Trichocereus peruviana*".
6. Agurell, S., *Lloydia*, 32, 206 – 216 (1969). "Cactaceae Alkaloids. I."
7. Trout, Notes on San Pedro & Related *Trichocereus* species, A Guide to assist in their visual recognition; with notes on Botany, Chemistry & History, Written, compiled &/or edited by Keeper of the Trout & Friends, Sacred Cacti 3rd Ed. Part B, 2011, Pp. 197 – 198.
8. Cjuno, M., Choquenaira, J., Quispe, P., Serrano, C., Tomaylla, C., *Quepo (Perú)*, 23, 38-45 (2009). "El género *Trichocereus*, ecología y contenido mescalínico".
Observación.- El género botánico *Trichocereus* es considerado sinonimia con *Echinopsis*.
9. Ogunbodede, O., McCombs, D., Trout, K., Daley, P. and Terry, M., *J. of Ethnopharmacology*, 131, 356-362 (2010). "New mescaline concentrations from 14 taxa / cultivars of *Echinopsis* spp. (Cactaceae) ('San Pedro') and their relevance to shamanic practice".
10. Djerassi, C., Liu, L. H., Farkas, E., Lippman, A. E., Lemin, A. J., Geller, L. E., McDonald, R. N., Taylor, B. J., *J. Amer. Chem. Soc.*, 55, 1200 – 1203 (1955). "Terpenoids. XI. Investigation of nine cactus species. Isolation of two new triterpenes, stellatogenin and machaeric acid".
11. Turner, J. W. and Heyman, J. J., *J. Org. Chem.*, 25, 2250 – 2251 (1960). "The Presence of Mescaline in *Opuntia cylindrical*".
12. Poisson, M., *Ann. Pharm. Fr.*, 18, 764 – 765 (1960). "Presence de Mescaline dans une Cactacée Péruvienne".

13. Crosby, D. M. and McLaughlin, J. L., *Lloydia*, 36, 416 – 418 (1973). “Cactus Alkaloids. XIX. Crystallization of Mescaline HCl and 3-Methoxytyramine HCl from *Trichocereus pachanoi*”.
14. Ma, W. W., Jiang, X. Y., Cooks, R. G., McLaughlin, J. L., Gibson, A. C., Zeylemaker, F., Ostolaza, C. N., *J. Nat. Prod.*, 49, 735 – 737 (1986). “Cactus Alkaloids, LXI. Identification of Mescaline and Related Compounds in Eight Additional Species Using TLC and MS/MS”.
15. Budavari, S., O’Neil, M. J., Smith, A., Heckelman, P. E., & Kinneary, J. F. “The Merck Index”, Ed. 11, 1996, Pp. 1007 – 1008 (Mescaline).
16. Patel, A. R., *Fortschritte der Arzneimittelforschung*, 11, 11 – 47, (1968). “Mescaline and Related Compounds”.
17. Hahn, G. and Rumpf, R., *Ber.*, 71B, 2141 (1938). “Über β -[Oxy-phenyl]-äthylamine und ihre Umwandlungen, II. Mitteil. : Synthese des Mezcalin”.
18. Tsao, M., *J. Amer. Chem. Soc.*, 73, 5945 – 5946 (1951). “A New Synthesis of Mescaline”.
19. Späth, E. *Monatsh*, 40, 129 (1919). “Über die *Anhalonium*-Alkaloide. I. Anhalin und Mezcalin”.
20. Benington, F. and Morin, R., *J. Amer. Chem. Soc.*, 73, 1353 (1951). “An Improved Synthesis of Mescaline”.
21. Reti, L. and Castrillón, J. A., *J. Amer. Chem. Soc.*, 73, 1767 – 1769 (1951). “Cactus Alkaloids. I. *Trichocereus terscheckii* (Parmentier) Britton and Rose”.
22. Stein, S. E., Mass Spectra in NIST Chemistry WebBook, NIST Standard Reference Database Number 69, Eds. P.J. Linstrom and W.G. Mallard, National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg MD, 20899, [http://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C54046&Units=SI&Mask=200#Mass - Spec](http://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C54046&Units=SI&Mask=200#Mass-Spec), (retrieved February 28, 2014).
23. Mills III, T., Conrad, J., Matchett, C., Simon, M., Burns, M., Ollis, R., *Instrumental Data for Drug Analysis*, 3rd Ed., Taylor & Francis, US, Vol. 3, 2006, Pp. 1862 – 1863.
24. Scientific Working Group for the Analysis of Seized Drugs (SWGDRUG), *Peyote & Mescaline*, June 27 (2005), <http://www.swgdrug.org/Monographs/PEYOTE.pdf> (retrieved February 28, 2014).
25. Henry, J. L., Epley, J. and Rohrig, T., *J. Anal. Toxicol.*, 27, 381 – 382 (2003). “The Analysis and Distribution of Mescaline in Postmortem Tissues”.
26. Fucci, N. and Chiarotti, M., *Forensic Sci. Int.*, 82, 165 – 169 (1996). “Mescaline in multi-coloured statuettes”.

27. Ikan, R., *Natural Products. A Laboratory Guide*, 2th Ed., Academic Press, Inc., US, 1991, Pp. 243 – 246 (Synthesis of Mescaline).
28. Division of Narcotic Drugs, United Nations Office at Vienna, Vienna International Centre., *Recommended Methods for Testing Peyote Cactus (Mescal Buttons)/Mescaline and Psilocybe Mushrooms/Psilocybin – Manual for use by National Narcotics Laboratories*, United Nations, New York (US), 1989, Pp. 6 – 19.
29. Becker, H. *Pharmazie in unserver Zeit*, 5, 129 – 137 (1985). “Inhaltsstoffe der Kaktee *Lophophora williamsii*”.
30. Soderquist, J., Kock, I. and Estrella, M., *Organic Process Research & Development*, 10, 1076 – 1079 (2006). “Reductive Cleavage of Acetals and Ketals with 9-Borabicyclo[3.3.1]nonane”.
31. Bailey, K. and Legault, D., *Organic Magnetic Resonance*, 21 (6), 391 – 396 (1983). “¹³C NMR Spectra and Structure of Mono-, Di- and Trimethoxyphenylethylamines and Amphetamines”.
32. Khan, J. I., *et al.*, *Basic Principles of Forensic Chemistry*. Phenethylamines, Springer Science+Business Media, LLC 2012, Pp. 157 – 176.
33. Lum, P. W. L. and Lebish, P., *J. Forens. Sci. Soc.*, 14, 63 – 69 (1974). “Identification of Peyote via Major Non-Phenolic Peyote Alkaloids”.
34. Salomon, K. and Bina, A. F., *J. Amer. Chem. Soc.*, 63, 2403 (1946). “Ultraviolet Absorption Spectra of Mescaline Sulfate and β -Phenylethylamine Sulfate”.
35. Anderson, E., “Peyote. The Divine Cactus”, The University of Arizona Press, 1991, 243 págs.
36. Kapadia, G. and Fayez, M., *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 59, 1699 – 1727 (1970). “Peyote Constituents: Chemistry, Biogenesis, and Biological Effects”.
37. Agurell, S., Lundström, J. and Sandberg, F., *Tetrahedron Letters*, 26, 2433 – 2435 (1967). “Biosynthesis of Mescaline in Peyote”.
38. Lundström, J. and Agurell, S., *Tetrahedron Letters*, 42, 4437 – 4440 (1968). “Biosynthesis of Mescaline and Anhalamine in Peyote. II^a”.
39. Lundström, J. and Agurell, S., *Tetrahedron Letters*, 39, 3371 – 3374 (1969). “A Complete Biosynthetic Sequence From Tyrosine to Mescaline in Two Cactus Species”.
40. Lundström, A., *Acta Chem. Scand.*, 25, 3489 – 3499 (1971). “Biosynthesis of Mescaline and Tetrahydroisoquinoline Alkaloids in *Lophophora williamsii* (Lem.) Coult. Occurrence and Biosynthesis of Catecholamine and Other Intermediates”.
41. Downing, D., *Quart. Rev.*, 16, 133 – 162 (1962). “The Chemistry of the Psychotomimetic Substances”.

42. Heffter, A. und Capellmann, R., *Ber.*, 38, 3634 – 3640 (1905). "Versuche zur Synthese des Mezcalins".
43. Slotta, K. H. und Heller, H., *Ber.*, 63B, 3029 – 3044 (1930). "Über β -Phenyl-äthylamine. I. Mittel.: Mezcalin und mezcalin-ähnliche Substanzen".
44. Kindler, K. and Peschke, W., *Arch. Pharm.*, 270, 410 – 413. "Über neue und über verbesserte Wege zum Aufbau von pharmakologisch wichtigen Amininen VI. Über Synthesen des Meskalins".
45. Slotta, K. H. and Szyszka, G., *J. Prakt. Chem.*, 137, 339 – 351. "Über β -Phenyl-äthylamine. III. Neue Darstellung von Mescaline".
46. Hahn, G. and Wassmuth, H., *Ber.*, 67B, 696 (1934). "Über β -[Oxy-phenyl]-äthylamine und ihre Umwandlungen, I. Mittel. : Synthese des Mezcalins".
47. Banholzer, K., Campbell, T. und Schmid, H., *Helv. Chim. Acta*, 35, 1577 – 1581 (1952). "Notiz über eine neue Synthese von Mezcalin, N-Methyl- und N-Dimethylmezcalin".
48. Hadáček, J., Michalský, J. and Macholán, L., *Chem. Listy*, 49, 271 (1955). "Synthesis of mescaline".
49. Amos, D., *Aust. J. Pharm.*, 45, 529 – 534 (1964). "Preparation of Mescaline from Eucalypt Lignin".
50. Abdel-Rahman, M. O., Aboul-Enein, M. N. and Taha, R. M., *J. Chem. UAR*, 11, 401 (1968). "An improved method for the synthesis of mescaline".
51. Aboul-Enein, M. N. and Eid, A., *Acta Pharm. Suecia.*, 16, 267 – 270 (1979). "A Novel Route for the Synthesis of Mescaline".
52. Rose-Munch, F., Chavignon, R., Tranchier, JP., Gagliardini, V. and Rose, E., *Inorg. Chim. Acta*, 300-302, 693 – 697 (2000). "Mescaline synthesis via tricarbonyl (η^6 - 1, 2, 3 - trimethoxybenzene) chromium complex.
53. Gagliardini, V., Onnikian, V., Rose-Munch, F. and Rose, E., *Inorg. Chem. Acta*, 259, 265 - 271 (1997). "Chromium hydride intermediates in the case of *cine* and *tele-meta* nucleophilic aromatic substitution on arenetricarbonylchromium complexes".
54. Boutonnet, J. C., Levisalles, J., Rose-Munch, F., Rose, E., Precigoux, G. and Leroy, F., *J. Organomet. Chem.*, 290, 153 – 164 (1985). "Structure radiocristallographique du veratrole-chrome-tricarbonyle; etudes RMN 1H d'arene-chrome-tricarbonyles ortho-disubstitues et regioselectivite de l'addition α -cyanocarbanion".
55. Rose-Munch, F., Rose, E., Semra, A., *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1108 – 1109 (1986). "*tele*-Substitution in arenetricarbonylchromium complexes involving a hydrogen migration".

56. Chandrasekhar, S. and Sridhar, M., *Tetrahedron Letters*, 41, 4685 – 4688 (2000).
“An α -aminomethyl carbanion equivalent via a novel Barbier reaction: (1*H*-naphthol[1,8-*de*]-1, 2, 3 – triazin – 2 – yl)methyl anion”.
57. Reyna, V., *Marcha Fitoquímica, Práctica de Laboratorio (Separata)*, Curso de Química de Productos Naturales – CQ046, Escuela Profesional de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Ingeniería (UNI), Lima, 2012, 5 págs.
58. Lock de Ugaz, O., *Investigación Fitoquímica*, Fondo Editorial, Pontificia Universidad Católica del Perú, Lima, 1994, Pp. 4 – 7.
59. Miranda, M., *Farmacognosia y Productos Naturales*, Universidad de La Habana, Cuba, 2002, Pp. 41 – 49.
60. Hoet, P. y Ríos Chu, M., *Bol. Soc. Quím. del Perú*, 46, 113 - 121 (1980). “Estudio cuantitativo de los alcaloides totales en *Datura stramonium* del Perú. Metodología”.
61. United States Pharmacopoeia – USP, 17th Ed., 1965, Pp. 913. “Alkaloidal Drug Assays; Proximate Assays”.
62. European Pharmacopoeia, Council of Europe. “European Pharmacopoea 5.0”, Fifth Edition (2005), Pp. 1060-1061.
63. Bozkurt Sarikaya, B., Unver Somer, N., Onur, M. A., *Turk J. Pharm. Sci.*, 9 (1), 61-66 (2012). “Quantitative Determinations on *Galanthus Rizehensis*”.
64. Reyna, V., *Apuntes del curso de Química Orgánica IV - CQ 442* (Espectrometría de Masas, de RMN, IR, UV en separatas), Escuela Profesional de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Ingeniería (UNI), Lima, 2011.
65. Reyna Pinedo, V., Libro de Resúmenes del Primer Curso Nacional de Plantas Medicinales y Fitoterapia – Fito 2001, Instituto de Fitoterapia Americano, Lima, 06 – 12 Agosto del 2001, Pág. 26.
66. Ostolaza Nano, C., *Boletín de Lima*, 6, 40 – 42 (1980). “El San Pedro”.
67. Ostolaza Nano, C. “101 Cactus del Perú”, 1ra Ed. Ministerio del Ambiente, 2011, Pp. 13, 122-123.
68. Feldman García, L. “El cactus San Pedro: Su función y significado en Chavín de Huántar y la tradición religiosa de los andes centrales”. Tesis de Maestría en Arqueología Andina, Facultad de Ciencias Sociales, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, 2006, Pp. 15 – 18.
69. Girault, Louis. Kallawalla. “Guérisseurs Itinérants Des Andes”, Ed. De L’Orstom, Paris, 1984, Pp. 328 – 330.
70. Reyna P., Victor, Carbajal F., Marco y Carbajal R., Jorge, *Cult. Drog.*, 14 (16), 79 – 88 (2009). “Estudio etnomedicinal de las mesas con San Pedro. Verificación de casos de curación”.

71. Reyna P., Victor, Carbajal F., Marco y Carbajal R., Jorge, *Cult. Drog.*, 15 (17), 29 – 46 (2010). “Estudio etnomedicinal de las mesas con San Pedro II. Mesas de Don Marco Carbajal F. Año 2009”.
72. Schultes, R. E., Hofmann, A., *Plantas de los Dioses. Orígenes del Uso de los Alucinógenos*, Fondo de Cultura Económica, México, 1993, (c. 1979), Pp. 154 – 171 (*Trichocereus*).
73. Cabieses, F., *Apuntes de Medicina Tradicional*, CONCYTEC, Lima, 1993, Pp. 396 – 401.
74. Doetsch, P. W., Cassady, J. M. and McLaughlin, J. L., *J. Chromatogr.*, 189, 79 – 85 (1980). “Cactus Alkaloids. XL. Identification of Mescaline and other β – phenethylamines in *Pereskia*, *Pereskopsis* and *Islaya* by use of Fluorescamine conjugates”.
75. Cjuno, M., Choquenaira, J., Serrano, C., *Quepo (Perú)*, 24, 20 - 27 (2010). “Cuantificación de mescalina en cactus por cromatografía, rastreo digital y procesamiento de imagen”.
76. Ostolaza, C., Ceroni, A., Zapata, J., Cortéz, J., Salinas, L. and García, E., *Cactus World*, 25 (4), 215 – 226 (2007). “Cacti of the Cañete river basin, Lima, Peru: a research and conservation study”.

VI. ANEXOS

ANEXO 1

Espectros IR de mescalina (base libre) y clordhirato de mescalina

i. Khan, J., *et al.* – 2012³²

Muestra el espectro infrarrojo (IR) para el clorhidrato de mescalina, indicando las bandas de absorción más características del compuesto en las regiones de $3000 - 3500 \text{ cm}^{-1}$ y $1500 - 2200 \text{ cm}^{-1}$, tal como se muestra en la Figura 28.

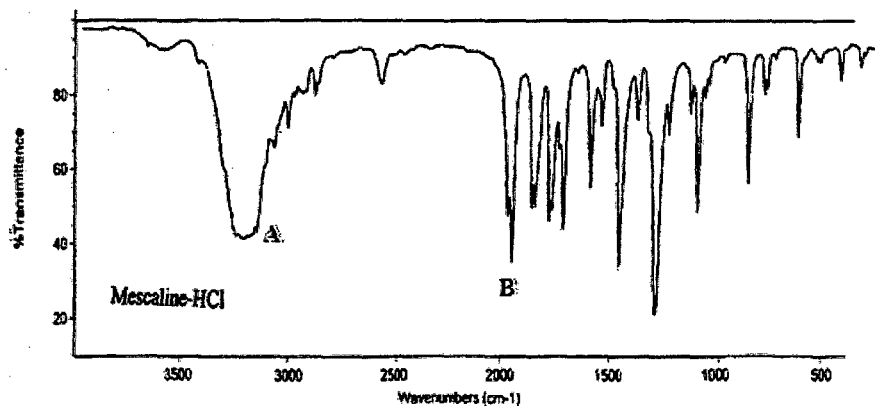


Figura 28. Espectro FTIR del clorhidrato de mescalina (Khan, J., *et al.*, 2012).

ii. Cjuno, M., *et al.* – 2009⁸

Proporcionan el espectro IR del clorhidrato de mescalina aislado del cactus *T. puquiensis* recolectado en la localidad de Chaviña, provincia de Lucanas, departamento de Ayacucho (a 3200 m.s.n.m.) en febrero del 2008.

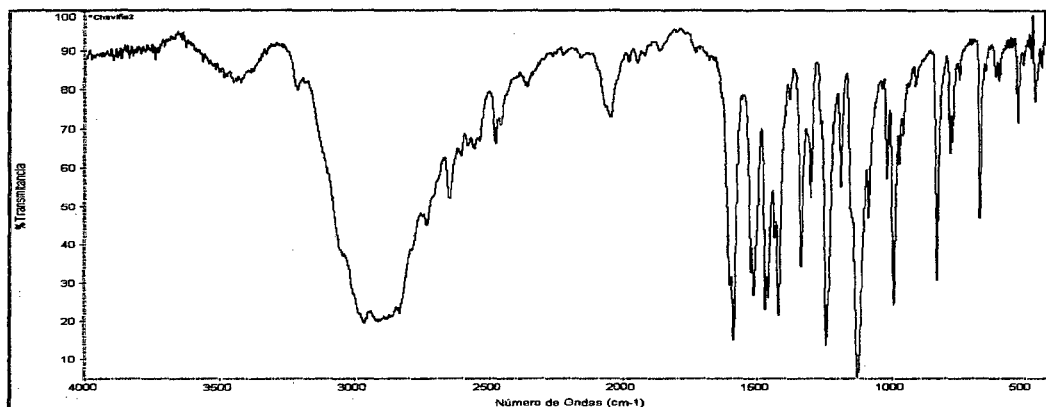


Figura 29. Espectro IR del clorhidrato de mescalina proveniente de la muestra de Chaviña en Ayacucho. La señal a 2000 cm^{-1} se debe a la presencia de CO_2 (Cjuno, M., *et al.*, 2009).

iii. Mills III, T., et al. – 2006²³

Proporciona el espectro infrarrojo (IR) para el clorhidrato de mescalina. En este espectro aparecen las bandas de absorción más características del compuesto: 1590 (A), 1245 (B), 1125 (C) y 998 cm^{-1} (D) (ver Figura 30).

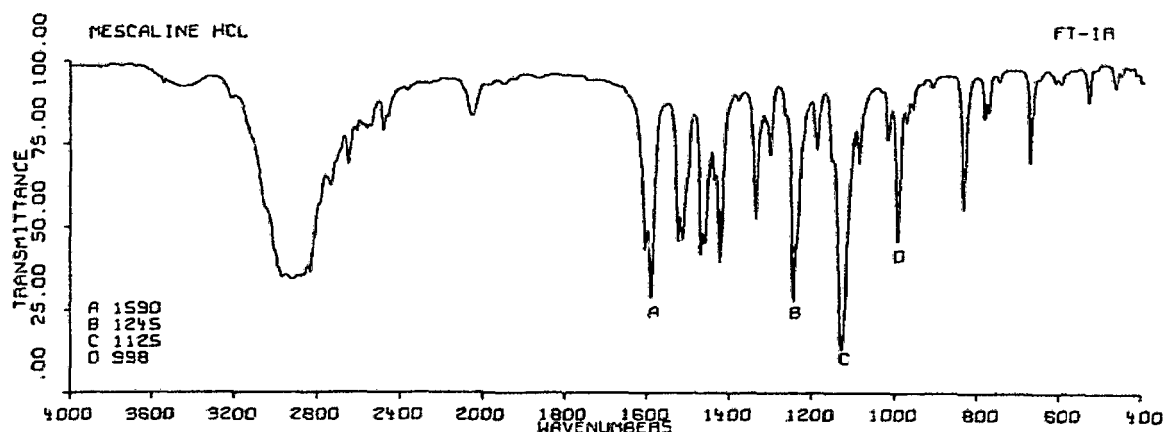


Figura 30. Espectro FTIR del clorhidrato de mescalina (Mills III, T., *et al.*, 2006).

iv. Recommended Methods for Testing Peyote Cactus – 1989²⁸

Reporta los picos característicos de los espectros infrarrojos de distintos compuestos de mescalina: base libre, sulfato y clorhidrato: 1591, 1513, 1245, 1130, 995, 853 y 670 cm^{-1} .

v. Becker – 1985²⁸

Proporciona el espectro IR del sulfato de mescalina en KBr, tal como se muestra en la Figura 31.

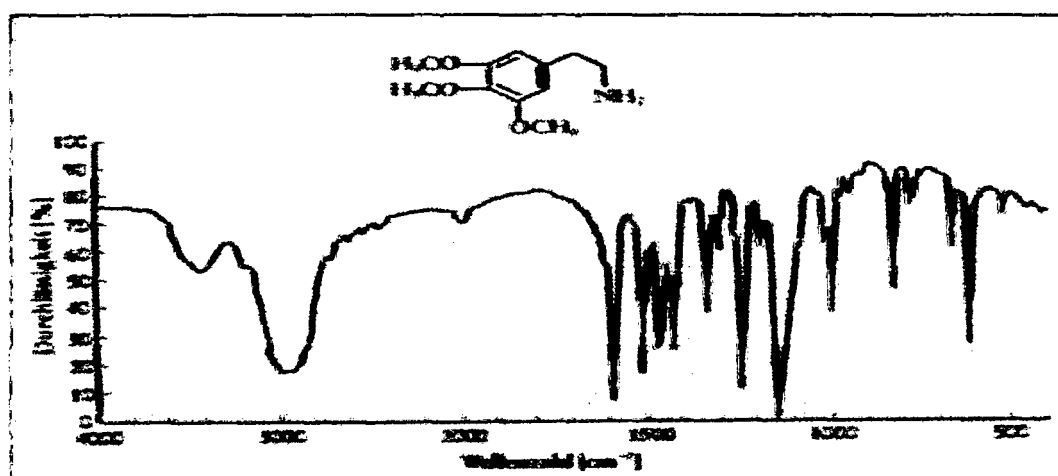


Figura 31. Espectro IR del sulfato de mescalina en KBr (Becker, H., 1985).

vi. Lum & Lebish – 1974³³

Proporciona el espectro IR de la mescalina en solución de CHCl_3 obtenido a partir de 2 g de muestra de Peyote.

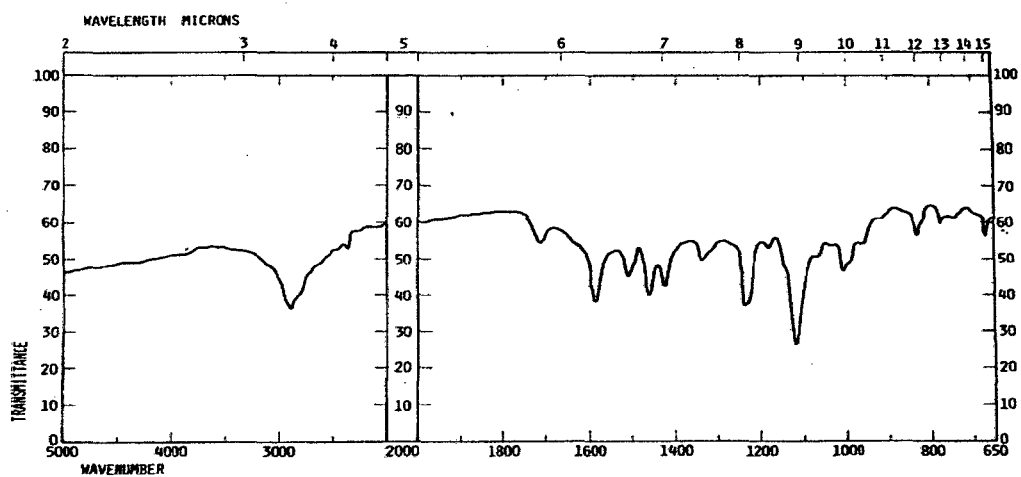


Figura 32. Espectro IR de la mescalina en CHCl_3 (Lumph, P. and Lebish, P., 1974).

Anexo 2

Espectros uv del sulfato de mescalina dihidratado

i. Ikan – 1991²⁷

Reporta que los máximos de absorción del sulfato de mescalina son 264, 266 y 269 nm.

ii. Becker – 1985²⁹

Muestra el espectro UV del sulfato de mescalina en ácido sulfúrico 0,5 N, de donde se obtuvo el máximo de absorción a 268 nm.

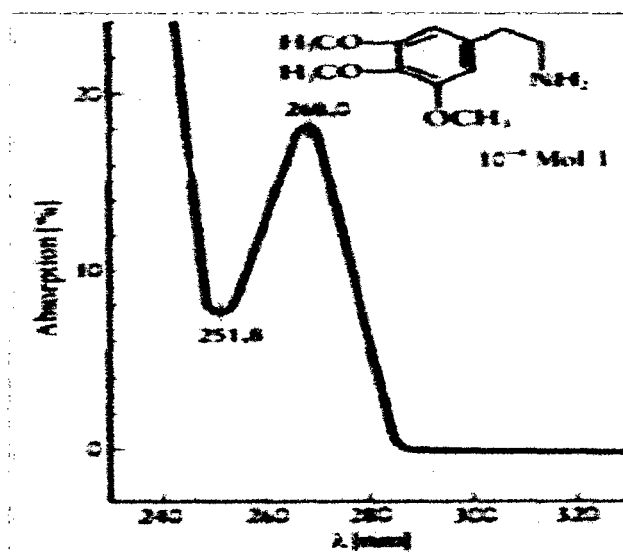
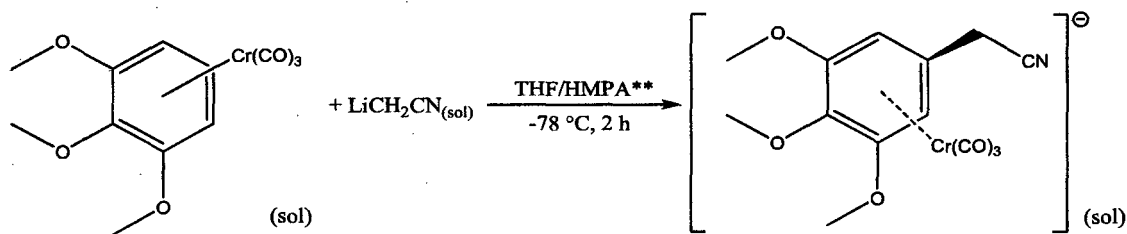


Figura 33. Espectro UV del sulfato de mescalina en H_2SO_4 0,5 N (Becker, H., 1985).

Anexo 3

Síntesis de mescalina

a) Síntesis 13.- Método de Rose-Munch, F., *et al.* – 2000⁵²i. Síntesis del Anión (η^5 -ciclohexadienil) cromo

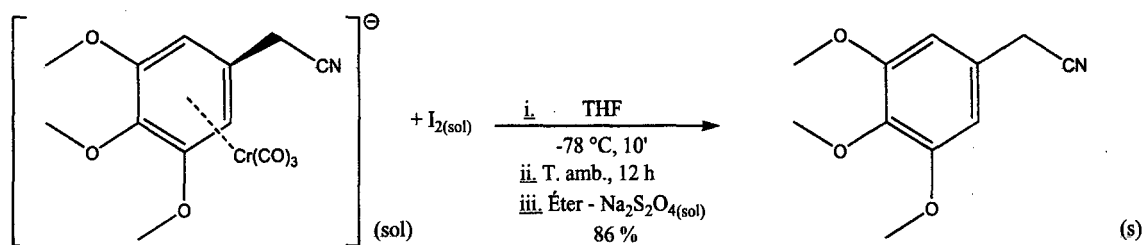
(η^6 -1,2,3-trimetoxibenceno) cromo*

Anión (η^5 -ciclohexadienil) cromo

* Sintetizado según Ref. 53 – 55.

** HMPA: Hexametilfosforamida (Hexamethylphosphoramide). Solvente para compuestos organometálicos e ideal para las reacciones de liticiación.

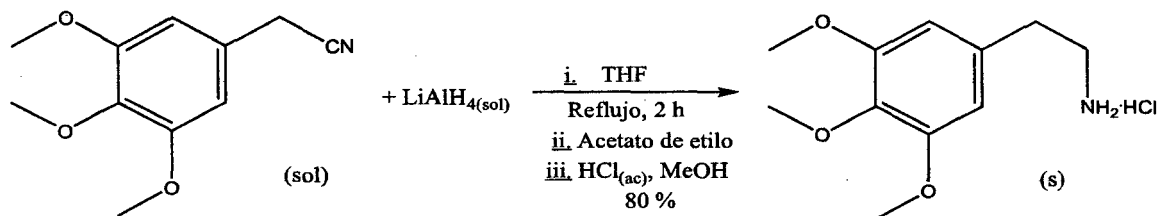
ii. Síntesis del 3,4,5-trimetoxifenilacetonitrilo



Anión (η^5 -ciclohexadienil) cromo

3,4,5-trimetoxifenilacetonitrilo

iii. Síntesis del clorhidrato de mescalina



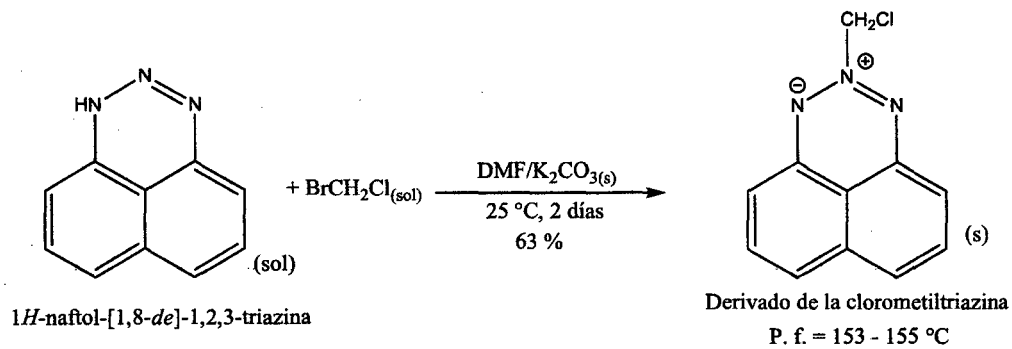
3,4,5-trimetoxifenilacetonitrilo

Clorhidrato de mescalina

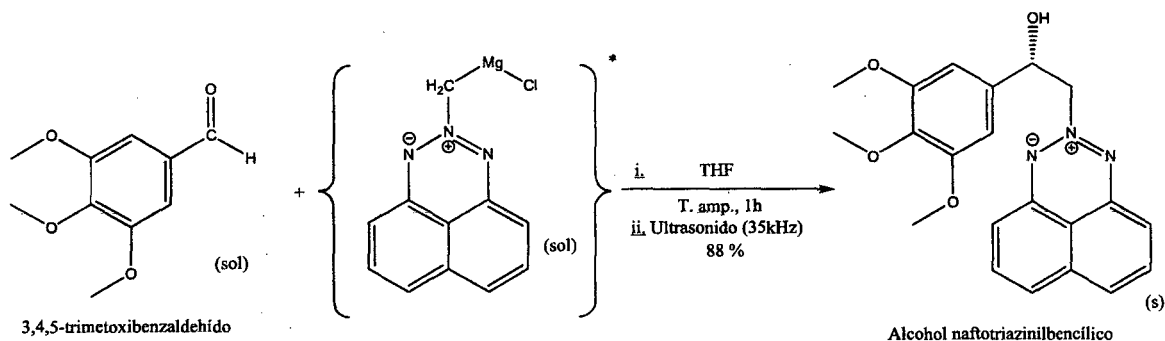
P. f. = 181 °C

b) Síntesis 14.- Método de Chandrasekhar & Sridhar – 2000⁵⁶

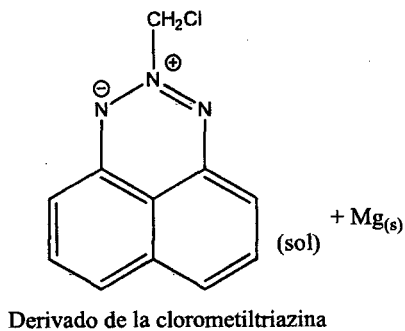
i. Síntesis del derivado de la clorometiltriazina



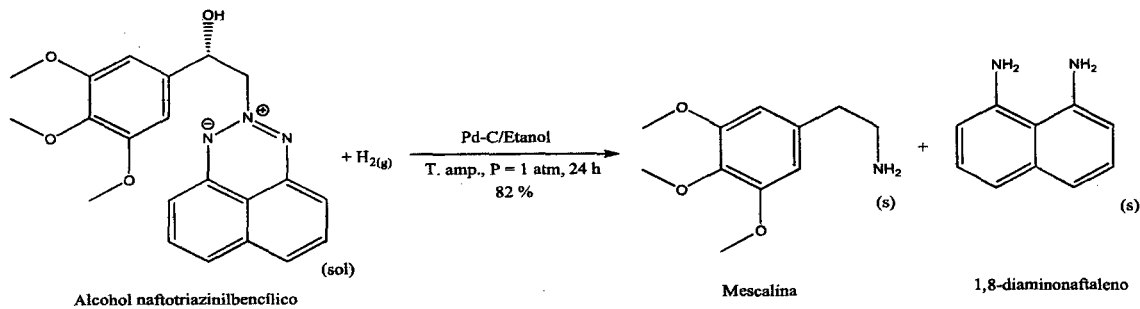
ii. Síntesis del Alcohol naftotriazinilbencílico



(*) se forma a partir de:

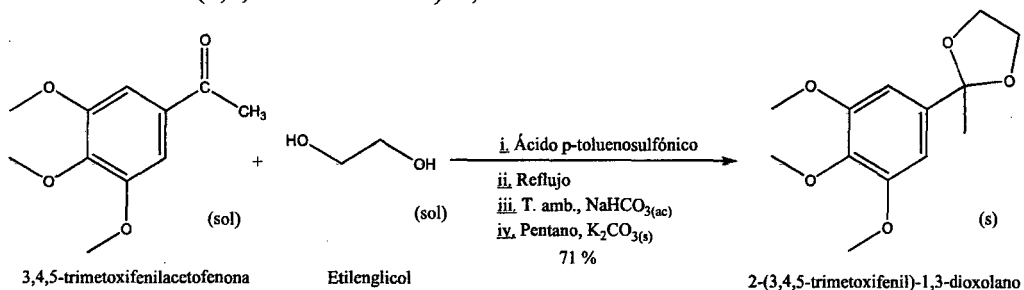


iii. Síntesis de la mescalina

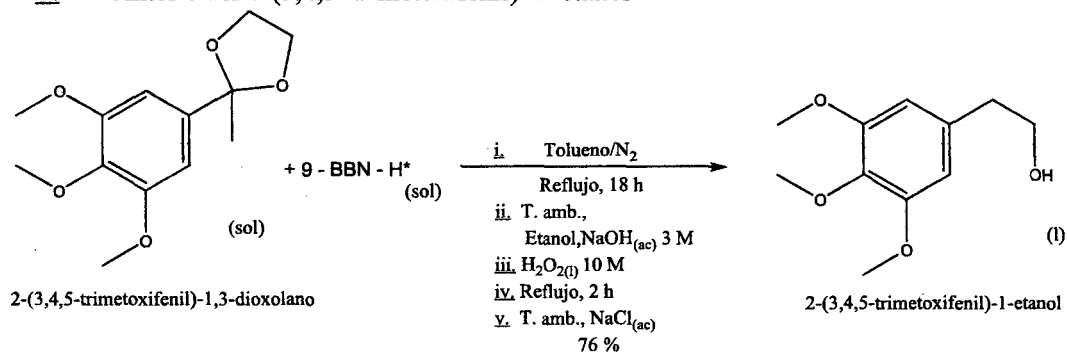


c) **Síntesis 15.- Método de Soderquist, J., et al. – 2006³⁰**

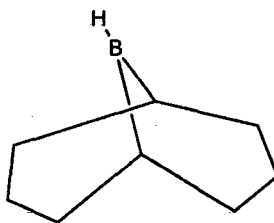
i. **Síntesis del 2-(3,4,5-trimetoxifenil)-1,3-dioxolano**



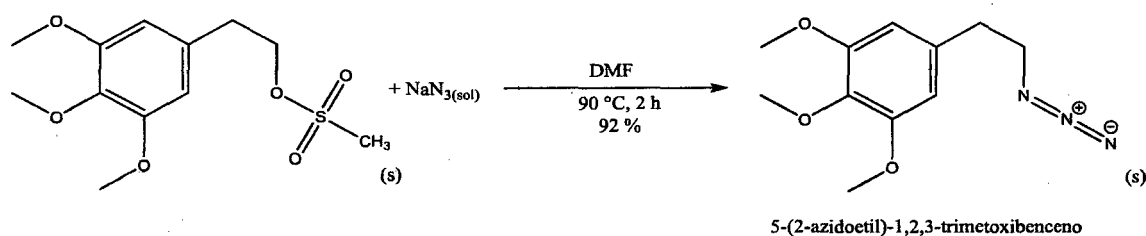
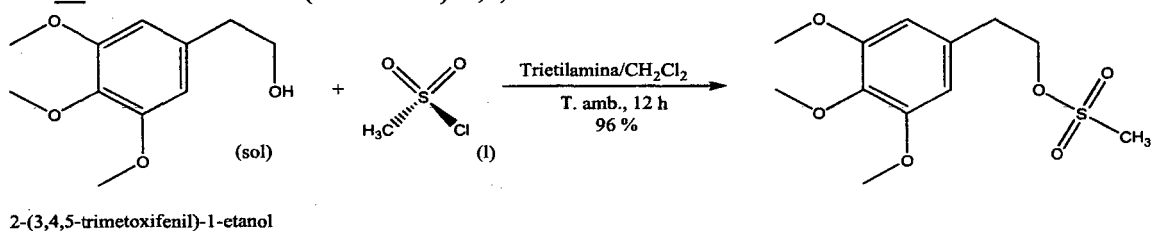
ii. **Síntesis del 2-(3,4,5-trimetoxifenil)-1-etanol**



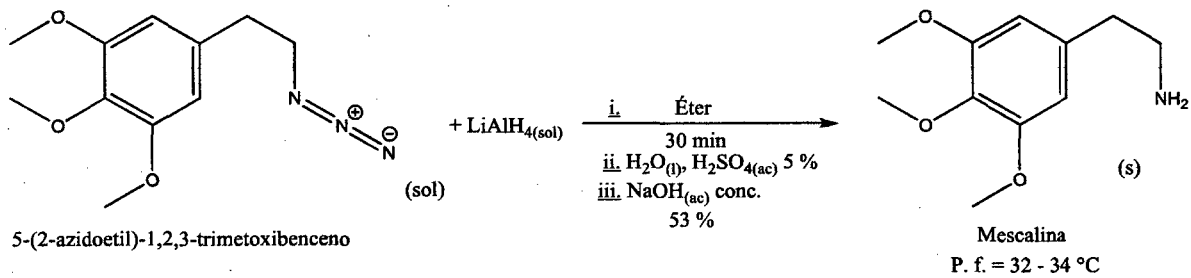
*Donde 9-BBN-H, 9-borabicyclo(3.3.1)nonano, es:



iii. **Síntesis del 5-(2-azidoetil)-1,2,3-trimetoxibenceno**



iv. Síntesis de la mescalina



Anexo 4

Marcha fitoquímica (Reyna – 2012)

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

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

A. OBTENCIÓN DE LAS FRACCIONES

1. Fracción (a)

- i. En un balón de 100 mL se coloca en maceración **5 g de muestra seca** y pulverizada con 50 mL de metanol, durante 20 horas a temperatura ambiente.
- ii. Luego, la mezcla se somete a reflujo durante 4 horas; se filtra en caliente, a través de un papel de filtro “rápido”, lavando el residuo sobre el papel de filtro con metanol. El extracto metanólico se coloca en una fiola de 50 mL y se completa a la marca.
- iii. Se separan 5 mL del extracto, lo que constituye la fracción (a). Se descarga el residuo sólido.

2. Fracción (b)

- i. El resto (45 mL) de la solución anterior se lleva a sequedad en el rotavapor.
- ii. El residuo obtenido se extrae con 10 mL de ácido clorhídrico $\text{HCl}_{(\text{ac})}$ al 1 %, calentando ligeramente ($50\text{ }^{\circ}\text{C}$), y se filtra sobre papel de filtro lento. Esta operación se repite en las mismas condiciones con 5 mL de ácido clorhídrico $\text{HCl}_{(\text{ac})}$ al 1 %, a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$. Las soluciones ácidas se reciben en un Erlenmeyer de 50 mL y se guarda para ser utilizados posteriormente (ver Sec. 3. i.)
- iii. El residuo sólido se disuelve en 5 mL de cloroformo, con ayuda de calor ($50\text{ }^{\circ}\text{C}$) y fuerte agitación, y luego se filtra a través de un embudo pequeño utilizando papel de filtro “lento”. El líquido filtrado se seca con sulfato de sodio anhidro, obteniéndose la fracción (b). El residuo sólido se descarta.

3. Fracción (c)

- i. La solución ácida obtenida en 2. ii, se basifica con amoníaco $\text{NH}_3_{(\text{ac})}$ 7,5 N hasta $\text{pH } 9 - 10$.
- ii. Luego, se extrae con cloroformo (2x25 mL). La parte acuosa se guarda para tratamiento posterior (ver Sec. 4.i.)

- iii. La fase clorofórmica se lava con 10 mL de agua destilada. Se reúne el agua del lavado con la fase acuosa obtenida en la etapa anterior (ii).
- iv. La fase clorofórmica se seca con sulfato de sodio anhidro y se filtra "rápido". El filtrado constituye la fracción (c).

4. Fracción (d)

- i. La fase acuosa básica obtenida en la sección anterior (ii y iii) se semisatura con sulfato de sodio (0,1 g de sal anhidra por mL de solución) y se filtra "rápido". Se extrae con cloroformo:etanol (3:2) (2x25 mL). Guardar la fase acuosa (ver Sec. 5)
- ii. La fase orgánica (50 mL) se lava con una solución semisaturada de sulfato de sodio (1 g de la sal anhidra en 10 mL de agua destilada). El lavado acuoso se guarda junto con la obtenida en la etapa anterior.
- iii. La fase orgánica se seca con sulfato de sodio anhidro y se filtra rápido, obteniéndose la fracción (d).

5. Fracción (e)

- i. Las fases acuosas obtenidas en la sección precedente (i y ii) constituyen la fracción (e).

6. Fracción (f)

- i. En un tubo de ensayo limpio y seco (de 18x160 mm), se coloca **1 g de muestra seca** y pulverizada y 10 mL de agua destilada; se agita la mezcla y se calienta en un baño de aceite durante 10 – 15 minutos.
- ii. Se filtra en caliente a través de papel de filtro rápido y se completa a 10 mL, dejando enfriar a temperatura ambiente. Esto constituye la fracción (f).

B. PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS

1. Aminogrupos primarios o secundarios (Prueba de ninhidrina)

Nota.- Se realiza sobre las fracciones (a) y (f).

- i. Tomando cuidado de no tocar la parte central con los dedos, se preparan tres trozos de papel de filtro "lento" de 2x3 de longitud, y se los dispone sobre una placa de vidrio. Luego con ayuda de una pipeta Pasteur se coloca, en el centro de cada uno, una gota de las siguientes muestras: fracción (a), la fracción (f) y agua destilada (sirve como referencia). Los tres papeles con sus respectivas muestras se dejan secar a temperatura ambiente.

- ii. Luego se agrega 1 gota de la solución de ninhidrina al 0,2 % en etanol sobre la parte central de cada uno de los tres papeles anteriores.
- iii. Los tres papeles se colocan durante 30 minutos dentro de una estufa a 110 – 120 °C.

Observación e interpretación de resultados: La presencia de un color violeta sobre el papel indica prueba positiva.

2. Grupos fenólicos libres (Prueba con reactivo férrico)

Nota.- Se realiza sobre la fracción (a).

- i. El resto de la fracción (a) (aproximadamente 5 mL) se lleva a sequedad en el rotavapor en un balón de 200 mL.
- ii. El residuo se disuelve en 0,5 mL de agua destilada y se filtra (si es necesario) a través de un embudo pequeño utilizando papel de filtro “lento”; se reciben los filtrados (“solución a”), en un tubo de ensayo (13x100 mm).
- iii. Se coloca dos gotas de la “solución a” en una luna de reloj ($\phi = 75$ mm); luego, se adiciona 1 gota de la solución de cloruro férrico al 1 % y se mezcla.

Observación e interpretación de resultados: En caso de prueba positiva se observará un color azul o verde.

3. Taninos (Prueba de la Gelatina)

Nota.- Se realiza sobre la “solución a” obtenida en la sección precedente (2.ii)

Se colocan 4 gotas de “solución a” en una luna de reloj ($\phi = 75$ mm); y se adicionan dos gotas de la solución de gelatina al 0,5 %. Se realiza la misma operación con dos gotas de agua destilada como referencia. Conviene realizar esta prueba sobre un fondo negro u oscuro para una mejor observación del resultado esperado.

Observación e interpretación de resultados: La presencia de un precipitado blanco nos indicará que la prueba es positiva.

4. Flavonoides (Reacción de Shinoda) (excepto chalconas, dihidrochalconas, auronas, catequinas e isoflavonas)

Nota.- Se realiza sobre la fracción (d) y (e).

a) Tratamiento de la fracción (d)

- i. La fracción (d) se coloca en un balón de 100 mL y se lleva a sequedad.
- ii. Sobre el residuo se agrega 2,5 mL de etanol agitándose hasta disolución, dentro de un “baño María” a 50 °C. Luego se filtra a través de un embudo pequeño y papel de

filtro "lento", recibiéndose el filtrado en un tubo de ensayo (13x100 mm). Esto constituye la "solución d".

- iii. En un tubo de ensayo (13x100 mm) limpio y seco se colocan 3 gotas de la "solución d", 2 mL de agua destilada, 1 mL de HCl_(ac) 12 N y limaduras de magnesio. Se agita y luego se deja en reposo durante 5 minutos.
- iv. Se adicionan 6 gotas de alcohol amílico y se agita; luego, se deja en reposo y se observa la coloración de la fase amílica.

b) Tratamiento de la fracción (e)

- v. Se emplean directamente 2 mL de la fracción (e) y se sigue lo indicado en las etapas iii y iv precedentes.

Observación e interpretación de resultados: La presencia de un color rojo o rosado en la fase amílica nos indicará una prueba positiva.

5. Triterpenoides y esteroides (Reacción de Liebermann – Burchard)

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

Nota.- Se realiza sobre las fracciones (b), (c), y la "solución d" (corresponde a la fracción (d), ver 4. a. ii)

a) Tratamiento de las fracciones (b) y (c)

- i. Se separan 4 mL de la fracción (c) y se llevan hasta sequedad. Luego se disuelve con cloroformo (0,2 mL). Esta solución la denominaremos "solución c".
- ii. En una placa de toque se colocan en posiciones diferentes, 2 gotas de la fracción (b) y de la "solución c", respectivamente. Luego, se agregan 2 gotas de anhídrido acético sobre ellas y se mezcla bien.
- iii. Seguidamente se adicionan 2 gotas de ácido sulfúrico concentrado.

b) Tratamiento de la "solución d"

- iv. Se colocan 5 gotas de la "solución d" (ver Sec. 4. a. ii) en un tubo de ensayo (7x60 mm) y se lleva a sequedad en el rotavapor. El residuo se disuelve en 2 gotas de cloroformo. Luego se siguen las etapas ii y iii precedentes.

Observación e interpretación de resultados: La formación de anillos de color naranja, azul o verde nos indicará prueba positiva.

6. Naftaquinonas y antraquinonas, antronas o antranoles (Reacción de Bornträger)

Nota.- Se realiza sobre la fracción (b).

El resto de la fracción (b) se dispone en un tubo de ensayo (13x100 mm), se añade 5 mL de hidróxido de sodio al 5 % y se agita.

Observación e interpretación de resultados: La presencia de un color rosado nos indicará prueba positiva.

7. Alcaloides (Test de Dragendorff, Mayer y Wagner)

Nota.- Se realiza sobre la fracción (c) y la "solución d" (correspondiente a la fracción (d), ver 4. a. ii).

a) Tratamiento de la fracción (c)

- i. El resto de la fracción (c) se lleva a sequedad.
- ii. Luego se extrae con 2,5 mL de ácido clorhídrico $\text{HCl}_{(\text{ac})}$ al 1 %, calentando ligeramente (50°C). Se filtra si fuera necesario.
- iii. De la solución ácida obtenida, se disponen 3 gotas por separado, en dos lunas de reloj ($\phi = 75$ mm) y se adiciona en cada caso 2 gotas de los reactivos de Dragendorff, Mayer y Wagner, respectivamente.

b) Tratamiento de la "solución d"

- i. Se dispone 5 gotas de la "solución d" en un tubo de ensayo (7x60 mm) y se lleva a sequedad. El residuo se disuelve en 4 gotas de ácido clorhídrico $\text{HCl}_{(\text{ac})}$ al 1 %.
- ii. Se filtra a través de papel filtro "lento"; se reparte el filtrado en dos lunas de reloj y se adiciona los reactivos de Dragendorff, Mayer y Wagner, respectivamente.

Observación e interpretación de resultados: La formación de un precipitado naranja y crema, respectivamente nos indicará prueba positiva.

8. Leucoantocianidinas y catequinas (Reacción de Rosenbeim)

Nota.- Se realiza sobre la fracción (e) y la "solución d" (correspondiente a la fracción (d), ver 4. a. ii).

a) Tratamiento de la "solución d"

- i. En un tubo de ensayo (13x100 mm) se colocan 3 gotas de la "solución d" y 2 mL de agua destilada.
- ii. Luego se adiciona 1 mL de ácido clorhídrico concentrado $\text{HCl}_{(\text{ac})}$ 12 N.

- iii. Se agita y se calienta en “baño María” durante 10 minutos.
- iv. Se deja enfriar la mezcla; luego se adicionan 6 gotas de alcohol amílico y se agita.
- v. Después de dejar reposar la mezcla se observa la fase amílica.

b) Tratamiento de la fracción (e)

Para el caso de la fracción (e) se emplea 2 mL y se siguen los pasos ii, iii, iv y v.

Observación e interpretación de resultados: La presencia de color rojo (leucoantocianidinas) o marrón (catequinas) en la fase amílica nos indicará prueba positiva.

9. Saponinas (Prueba de la Espuma)

Nota.- Se realiza sobre la fracción (f).

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

Observación e interpretación de resultados: Si después de los 15 minutos de reposo la altura de la espuma es mayor o igual a 5 mm, nos indicará prueba positiva.

Anexo 5

Análisis cualitativo para la detección de alcaloides presentes en plantas (Reyna – 2012)

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

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

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

A. TEST DE MAYER

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

1. Procedimiento

- i. Se colocan 0,5 g de hojas desmenuzadas o pulverizadas en un tubo de ensayo de 18x150 mm (para pruebas comparativas deberá hacerse con muestras debidamente pesadas y las mismas cantidades).
- ii. Se adiciona 10 mL de etanol y se coloca en un “baño María” (baño de aceite a 90 °C), y se hace hervir por 5 minutos.
- iii. Se filtra la solución etanólica, a través de papel filtro “rápido” y un embudo de vidrio pequeño, recibiendo los filtrados en un tubo de ensayo seco de 18x150 mm.
- iv. Se concentra la solución etanólica a sequedad. Para esto hay tres alternativas:
 - Utilizando “baño María”
 - Utilizando el rotavapor
 - Utilizando un “mechero de bolsillo”
- v. Una vez seco, se deja enfriar y sobre el residuo se agrega de 2 a 5 gotas de una solución de ácido clorhídrico al 2 %. Se agita el tubo de manera de disolver todas las partículas sólidas.

- vi. Se filtra el líquido (debe tenerse un filtrado completamente limpio) a dos tubos de ensayo de 13x100 mm secos de modo que en cada uno haya volúmenes aproximadamente iguales.
- vii. Separadamente, a cada uno de los tubos se le agrega, gota a gota, 2 gotas de "reactivo de Mayer" y se observan los cambios que se producen.

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

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

2. Reactivo de Mayer

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

B. TEST DE DRAGENDORFF

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

1. Procedimiento

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

2. Reactivo de Dragendorff

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

ANEXO 6

“San Pedro Macho” (*Echinopsis peruviana*) y “San Pedro Hembra” (*Echinopsis pachanoi*)

Referencia.- Ostolaza Nano, C. “101 Cactus del Perú”, 1ra Ed., Ministerio del Ambiente, 2011, Pp. 120 – 123.

1. “San Pedro Macho”

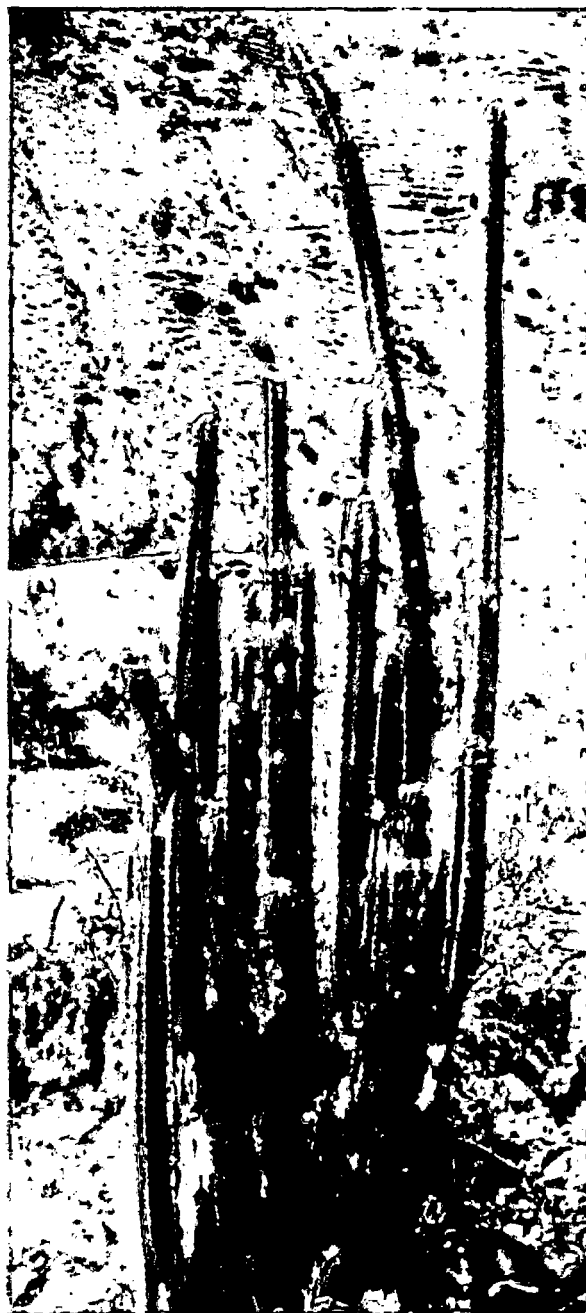
Echinopsis peruviana

(Britton & Rose) Friedrich & Rowley

“Se diferencia de *E. pachanoi* (San Pedro Hembra) en tener fuertes espinas...”

Cuerpo erecto al inicio, a veces se arquea y cuelga de los riscos, llega a 5 m de largo, azul – verdoso, de 6 a 15 cm de diámetro; 4 a 8 costillas anchas y redondeadas; 10 espinas desiguales de 4 cm de largo. Flores infundibuliformes, blancas, fragantes, 22 a 25 cm de largo. Fruto de 5 cm de largo y diámetro, verde, redondeado, dehiscente.

Se encuentra en toda la Región Lima, de Cajatambo a Cañete de 2000 a 3000 m.s.n.m.



2. "San Pedro Hembra"

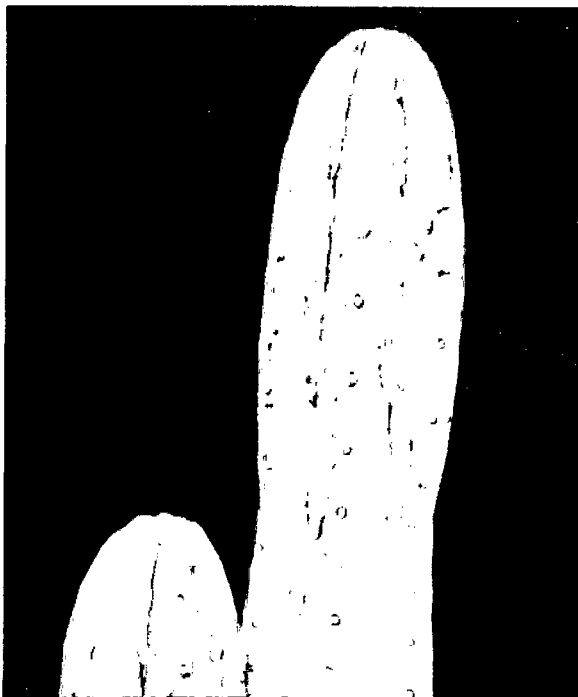
Echinopsis pachanoi

(Britton & Rose) Friedrich & Rowley,
IOS Bull. 3(3), 96, 1974

Nombre común: "San Pedro"

Planta arbórea, 3 a 6 m de alto, ramas numerosas azul-verdoso, 6 a 8 costillas, anchas y redondeadas, con depresión transversal sobre las areolas, espinas generalmente ausentes o escasas, pequeñas, 1 cm desiguales, amarillo-marrón. Flor de 23 cm de largo, blancas, con pelo negro.

Distribución: Descrita en Cuenca, Ecuador, 2000 - 3000 m.s.n.m.; llega a Huancabamba, Piura; Quebrada Santa Cruz, Cordillera Blanca, Ancash, 3300 m.s.n.m.



2. Los tallos de *E. pachanoi* tienen pocas costillas, areolas pequeñas y espinas tan pequeñas o ausentes que los emplean como un excelente porta-objetos de otras especies.



3. Una flor de *E. pachanoi* en su cercado a la mañana siguiente a estar cerca de mediodía.

Anexo 7

Resultados de la marcha Fitoquímica del cactus "San Pedro Macho" (2008)

RESULTADOS DE LA MARCHA FITOQUÍMICA PRELIMINAR

Muestra (Nombre común y científico) : San Pedro Macho (*Echinopsis peruvianus*)
 Procedencia : Yauyos
 Cantidad de la muestra : 5 g (Corteza)
 Fecha de Análisis : 2 - 24 .Oct.2008
 Analista : Marcelo Bazán (Sup. Elena Córdor C.)
 Tesis : -

Prueba N°	Principio Activo	Pruebas de coloración	Fracción	Resultados (*)	Observaciones (color de soluciones y/o precipitados)
01	Aminogrupos primarios y/o secundarios	Ninhidrina	a	+	Mancha violeta
			f	+	Mancha violeta
02	Grupos fenólicos libres	Cloruro férrico	a	+	Coloración verde
03	Taninos	Gelatina	a	-	Ausencia de precipitado
04	Triperenos y esteroides	Reacción de Liebermann Burchard	b	++	Coloración verde intenso
			c	-	Ausencia de coloración
			d	-	Ausencia de coloración
05	Quinonas, antronas o antranofes	Reacción de Borntrager	b	-	Ausencia de coloración
06	Alcaloides	Reacción de Dragendorff	c	+++	Precipitado abundante
			d	+++	Precipitado abundante
		Reactivo de Mayer	c	+++	Precipitado abundante
			d	++	Precipitado
		Reactivo de Wagner	c	++	Precipitado
			d	++	Precipitado
07	Leucoantocianidinas (rojo), catequinas (marrón)	Reacción de Rosembeim	d	-	Ausencia de coloración
			e	++	Fase amilica de color marrón
08	Flavonoides excepto chalconas, auronas, catequinas e isoflavonas	Reacción de Shinoda	d	-	Coloración amarilla
			e	-	Coloración amarilla
09	Saponinas	Prueba de la espuma	f	-	Ausencia de espuma

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

Para aminogrupos y triterpenos-esteroides, la observación macroscópica del color de la prueba no guarda relación con la cantidad de sustancia presente.

RESUMEN DE RESULTADOS: CONTIENE.- Amino grupos primarios y/o secundarios, grupos fenólicos libres, catequinas, triterpenos y esteroides y alcaloides
 NO CONTIENE.-Taninos, quinonas, antronas o antranofes, leucoantocianidinas, flavonoides y saponinas.

Fecha del Informe: 1.Dic.2008

Nombre: Quím. Elena Córdor C.

Firma: *Elena Córdor*

Anexo 8

Resultados de la marcha Fitoquímica del cactus "San Pedro Macho" (2013)

Clase de Producto Natural	Pruebas de coloración o precipitación	Fracción	Resultados (*)	Observaciones
Aminogrupos primarios o secundarios	Ninhidrina	a	++	Mancha violeta
		f	++	Mancha violeta
Grupos fenólicos libres	Cloruro férrico	a	+	Coloración verde clara
Taninos	Gelatina	a	-	Ausencia de precipitado
Flavonoides excepto chalconas, auronas catequinas e isoflavononas	Reacción de Shinoda	d	-	Ausencia de coloración
		e	-	Ausencia de coloración
Triterpenoides y/o esteroides	Reacción de Liebermann Burchard	b	+	Coloración anaranjada – ámbar
		c	-	Ausencia de coloración
		d	-	Ausencia de coloración
Quinonas, antronas o antranoles	Reacción de Borntrager	b	-	Ausencia de coloración
Alcaloides	Reactivo de Dragendorff	c	+++	Precipitado de color anaranjado
		d	++	Precipitado de color anaranjado
	Reactivo de Mayer	c	+++	Precipitado de color crema
		d	++	Precipitado de color crema
	Reactivo de Wagner	c	+++	Precipitado de color anaranjado – crema
		d	++	Precipitado de color anaranjado – crema
Leucoantocianidinas (rojo), Catequinas (marrón)	Reacción de Rosenheim	d	-	Ausencia de coloración
		e	+	Fase amílica de color pardo – marrón
Saponinas	Prueba de la espuma	f	-	Ausencia de espuma

(*) Convención (+++) abundante; (++) regular; (+) poco, (-) negativo.

Anexo 9


Análisis porcentual de carbono, hidrógeno, nitrógeno, oxígeno y azufre del sulfato de mescalina dihidratado a partir del cactus "San Pedro Macho" (*E. peruviana*) (ICSN – CNRS, Francia)

Service de Microanalyse
ICSN - CNRS, 91193 Gif sur Yvette Cedex tél. 01 69 32 30 68

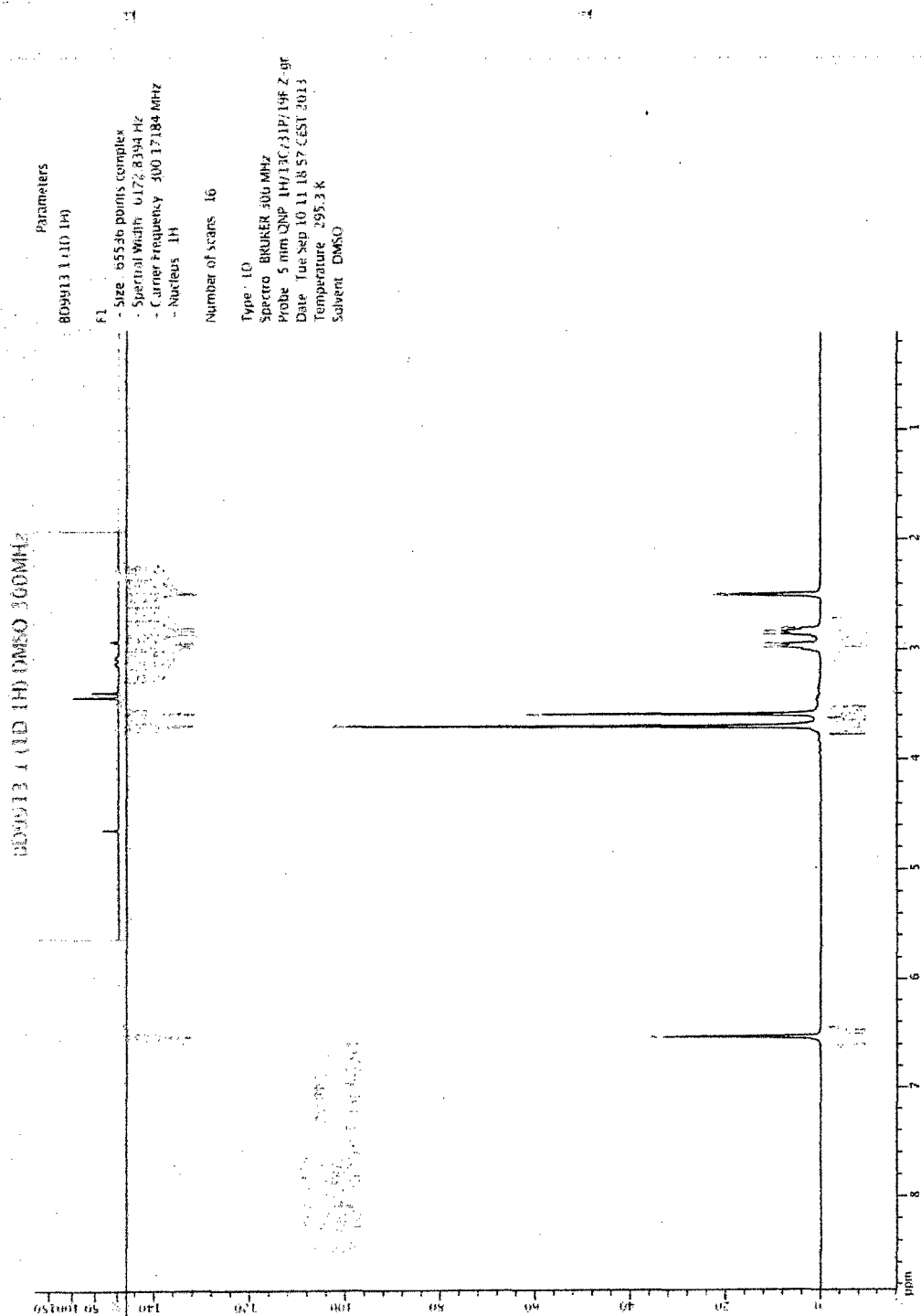
Analyse n° 15332 du 10.09.2013
A l'attention de M^r DELPECH Bernard
Téléphone: 4582 P&F Product: 609913

CNRS UPR 2301 **Service Delpech**
CNRS-ICSN
avenue de la Terrasse
91193 Gif sur Yvette cedex

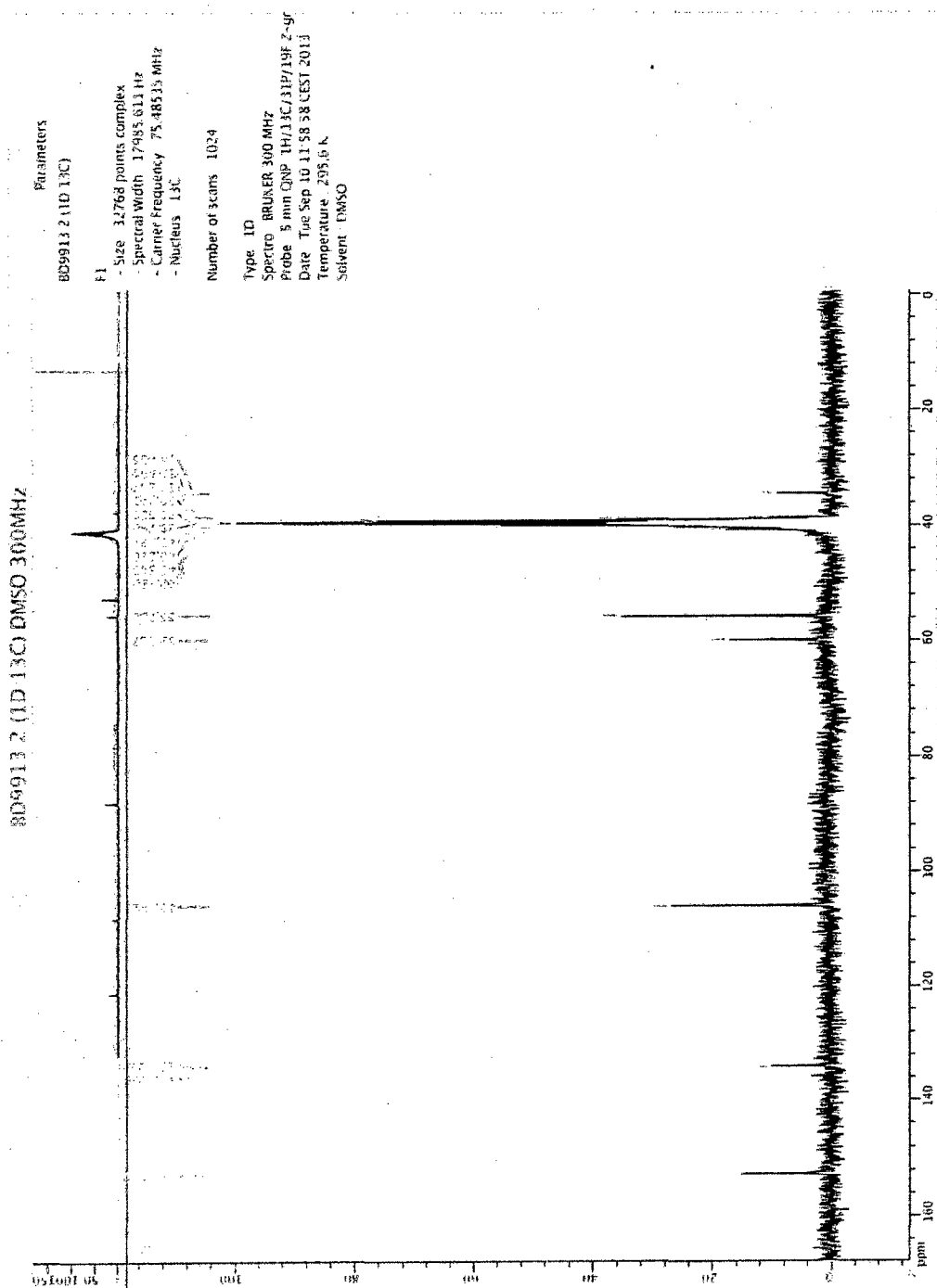
ELEMENT	RESULT 1	RESULT 2	UNITE :
% CARBONE	47.37	47.25	
% HYDROGENE	7.01	7.01	
% AZOTE	5.16	4.99	
% OXYGENE	34.77	34.75	
% SULFURE	5.77	5.69	



Anexo 10

Espectro RMN¹H (300 MHz) del sulfato de mescalina dihidratado obtenido a partir del cactus "San Pedro Macho" (*E. peruviana*)

Anexo 11

Espectro RMN¹³C (300 MHz) del sulfato de mescalina dihidratado obtenido a partir del cactus "San Pedro Macho" (*E. peruviana*)

Anexo 12

Determinación del punto de equivalencia de la valoración potenciométrica

(Ver Sec. F. Análisis cuantitativo de alcaloides, Pág. 66)

Para obtener el punto final de la valoración ácido – base, se graficaron las curvas de la primera derivada y segunda derivada, las cuales tienen la forma $\Delta pH/\Delta V$ vs \bar{V} y $\Delta^2 pH/\Delta V^2$ vs \bar{V} , (Tabla 15), respectivamente, donde los puntos $\Delta pH/\Delta V$ y \bar{V} se calcularon tomando en cuenta dos valores de pH y volumen de base consecutivos, así tenemos por ejemplo para los dos primeros valores de la Tabla 15:

$$\Delta pH/\Delta V = \frac{pH_2 - pH_1}{V_2 - V_1} = \frac{1,95 - 1,82}{0,50 - 0,00} = 0,26$$

$$\bar{V} = \frac{V_2 + V_1}{2} = \frac{0,50 + 0,00}{2} = 0,25$$

De igual forma se calculan los valores para la curva de la segunda derivada, donde los puntos $\Delta^2 pH/\Delta V^2$ y \bar{V} se calcularon tomando en cuenta dos valores de $\Delta pH/\Delta V$ y volumen medio de base consecutivos \bar{V} , calculados para la curva de la primera derivada, así tenemos por ejemplo para los dos primeros valores $\Delta^2 pH/\Delta V^2$ y \bar{V} , de la Tabla 15:

$$\Delta^2 pH/\Delta V^2 = \frac{(\Delta pH_2/\Delta V_2) - (\Delta pH_1/\Delta V_1)}{V'_2 - V'_1} = \frac{0,30 - 0,26}{0,75 - 0,25} = 8,00E-02$$

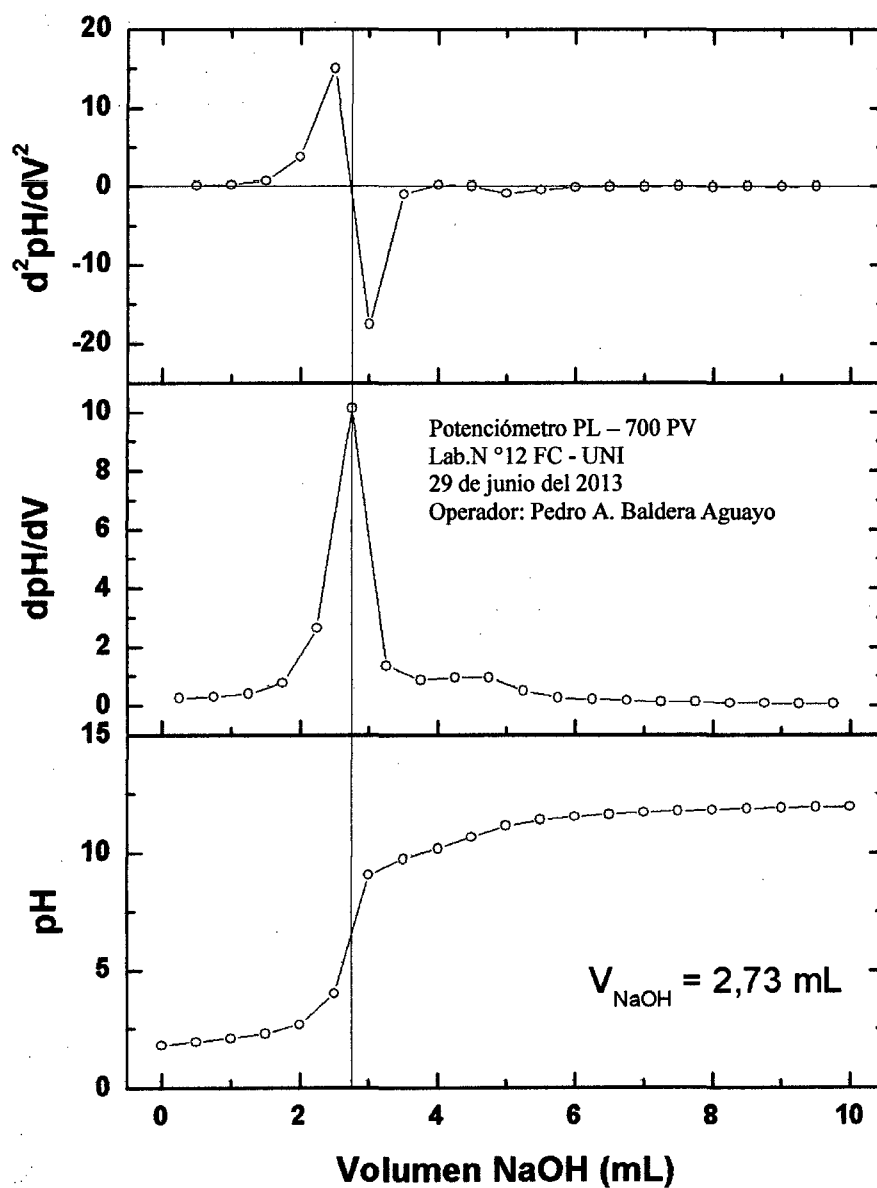
$$\bar{V}' = \frac{V_2 + V_1}{2} = \frac{0,75 + 0,25}{2} = 0,50$$

Se toman como punto final al segundo punto máximo de la primera derivada, y la intersección con el eje de abscisas de la derivada segunda, pues éste corresponde a la valoración completa del H_2SO_4 , el cual se encuentra en exceso. Al observar estos puntos en la Gráfica 1, el punto final se encuentra a 2,73 mL de $NaOH_{(ac)}$.

Los puntos finales para el resto de muestras se determinaron bajo el procedimiento ya detallado (Ver Gráficas 2 - 6).

Tabla 15. Datos de la curva de titulación potenciométrica de la muestra M1 según European Pharmacopoeia 5.0 – 2005

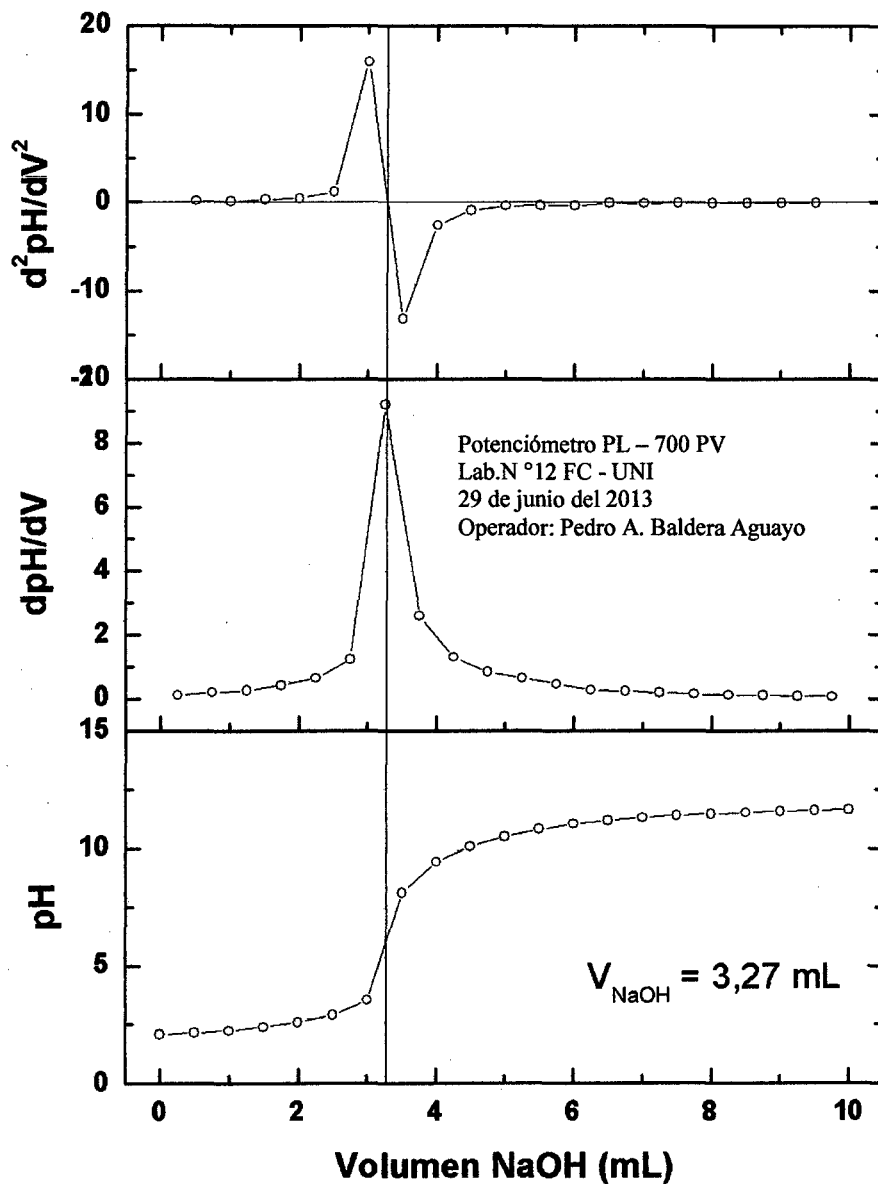
V (mL)	pH	\bar{V} (mL)	$\Delta pH/\Delta V$	\bar{V} , (mL)	$\Delta^2 pH/\Delta V^2$
0,00	1,82	0,25	0,26	0,50	8,00E-02
0,50	1,95	0,75	0,30	1,00	2,00E-01
1,00	2,10	1,25	0,40	1,50	7,20E-01
1,50	2,30	1,75	0,76	2,00	3,76E+00
2,00	2,68	2,25	2,64	2,50	1,50E+01
2,50	4,00	2,75	10,14	3,00	-1,76E+01
3,00	9,07	3,25	1,36	3,50	-1,00E+00
3,50	9,75	3,75	0,86	4,00	2,00E-01
4,00	10,18	4,25	0,96	4,50	0,00E+00
4,50	10,66	4,75	0,96	5,00	-9,20E-01
5,00	11,14	5,25	0,50	5,50	-4,80E-01
5,50	11,39	5,75	0,26	6,00	-1,20E-01
6,00	11,52	6,25	0,20	6,50	-8,00E-02
6,50	11,62	6,75	0,16	7,00	-8,00E-02
7,00	11,70	7,25	0,12	7,50	0,00E+00
7,50	11,76	7,75	0,12	8,00	-8,00E-02
8,00	11,82	8,25	0,08	8,50	7,11E-15
8,50	11,86	8,75	0,08	9,00	-4,00E-02
9,00	11,90	9,25	0,06	9,50	7,11E-15
9,50	11,93	9,75	0,06		
10,00	11,96				



Gráfica 1. Curva de Titulación Potenciométrica de la muestra M1 según European Pharmacopoeia 5.0 – 2005 (Ver Sec. F. Análisis cuantitativo de alcaloides, Pág. 66).

Tabla 16. Datos de la curva de titulación potenciométrica de la muestra M2 según European Pharmacopoeia 5.0 – 2005

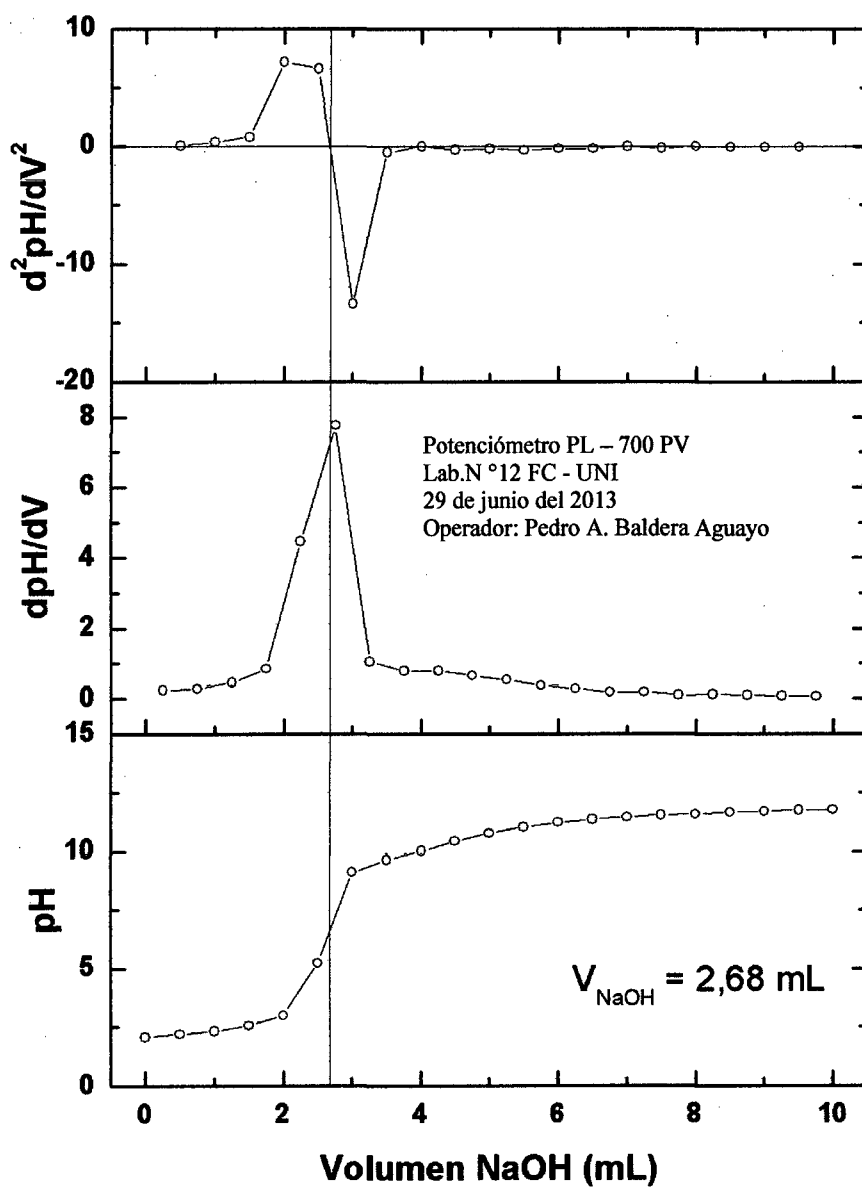
V (mL)	pH	\bar{V} (mL)	$\Delta pH/\Delta V$	\bar{V} , (mL)	$\Delta^2 pH/\Delta V^2$
0,00	2,09	0,25	0,12	0,50	1,60E-01
0,50	2,15	0,75	0,20	1,00	1,20E-01
1,00	2,25	1,25	0,26	1,50	3,20E-01
1,50	2,38	1,75	0,42	2,00	4,40E-01
2,00	2,59	2,25	0,64	2,50	1,20E+00
2,50	2,91	2,75	1,24	3,00	1,59E+01
3,00	3,53	3,25	9,20	3,50	-1,32E+01
3,50	8,13	3,75	2,60	4,00	-2,60E+00
4,00	9,43	4,25	1,30	4,50	-9,20E-01
4,50	10,08	4,75	0,84	5,00	-4,00E-01
5,00	10,50	5,25	0,64	5,50	-3,60E-01
5,50	10,82	5,75	0,46	6,00	-3,60E-01
6,00	11,05	6,25	0,28	6,50	-8,00E-02
6,50	11,19	6,75	0,24	7,00	-1,20E-01
7,00	11,31	7,25	0,18	7,50	-8,00E-02
7,50	11,40	7,75	0,14	8,00	-4,00E-02
8,00	11,47	8,25	0,12	8,50	-4,00E-02
8,50	11,53	8,75	0,10	9,00	-4,00E-02
9,00	11,58	9,25	0,08	9,50	-4,00E-02
9,50	11,62	9,75	0,06		
10,00	11,65				



Gráfica 2. Curva de Titulación Potenciométrica de la muestra M2 según European Pharmacopoeia 5.0 – 2005 (Ver Sec. F. Análisis cuantitativo de alcaloides, Pág. 66).

Tabla 17. Datos de la curva de titulación potenciométrica de la muestra M3 según European Pharmacopoeia 5.0 – 2005

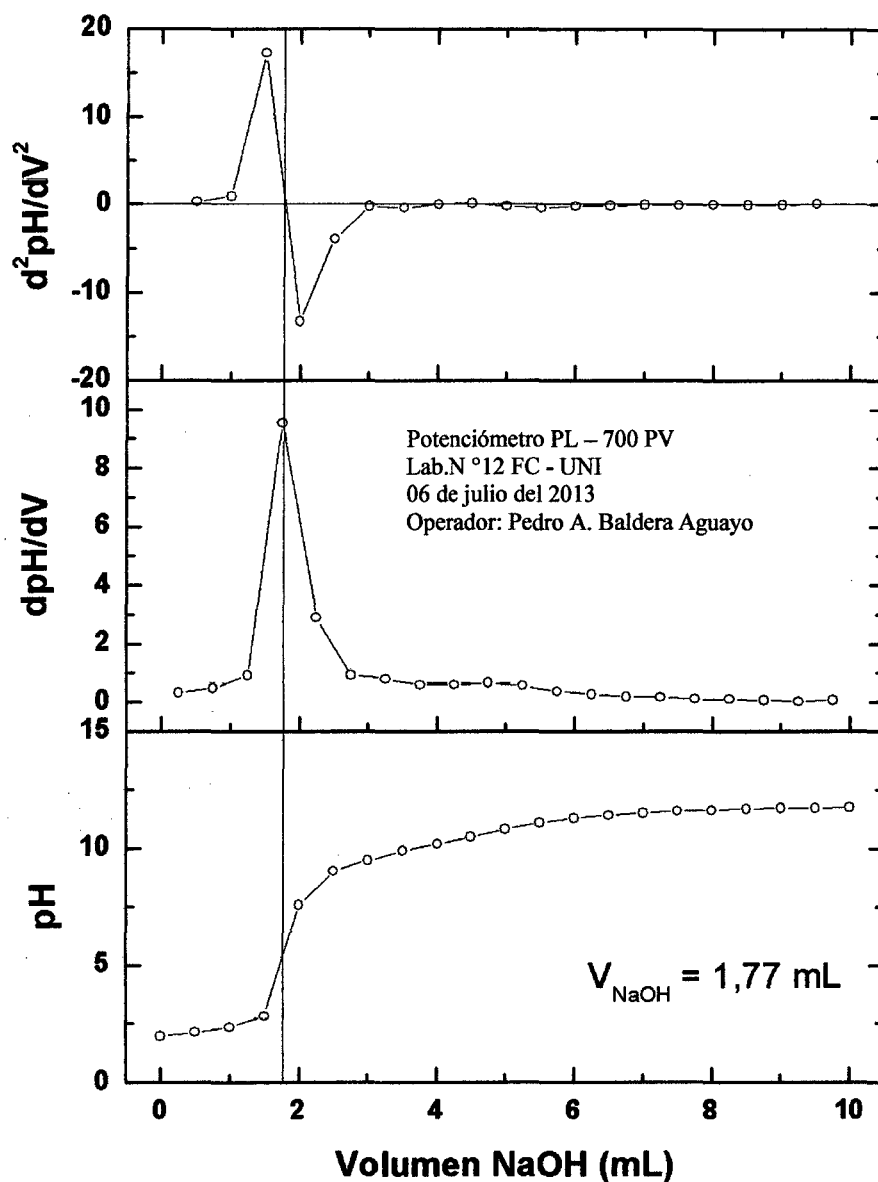
V (mL)	pH	\bar{V} (mL)	$\Delta pH/\Delta V$	$\bar{V},$ (mL)	$\Delta^2 pH/\Delta V^2$
0,00	2,08	0,25	0,24	0,50	8,00E-02
0,50	2,20	0,75	0,28	1,00	3,60E-01
1,00	2,34	1,25	0,46	1,50	8,00E-01
1,50	2,57	1,75	0,86	2,00	7,20E+00
2,00	3,00	2,25	4,46	2,50	6,60E+00
2,50	5,23	2,75	7,76	3,00	-1,34E+01
3,00	9,11	3,25	1,06	3,50	-5,20E-01
3,50	9,64	3,75	0,80	4,00	7,11E-15
4,00	10,04	4,25	0,80	4,50	-2,80E-01
4,50	10,44	4,75	0,66	5,00	-2,40E-01
5,00	10,77	5,25	0,54	5,50	-3,20E-01
5,50	11,04	5,75	0,38	6,00	-2,00E-01
6,00	11,23	6,25	0,28	6,50	-2,00E-01
6,50	11,37	6,75	0,18	7,00	-7,11E-15
7,00	11,46	7,25	0,18	7,50	-1,60E-01
7,50	11,55	7,75	0,10	8,00	4,00E-02
8,00	11,60	8,25	0,12	8,50	-4,00E-02
8,50	11,66	8,75	0,10	9,00	-4,00E-02
9,00	11,71	9,25	0,08	9,50	-4,00E-02
9,50	11,75	9,75	0,06		
10,00	11,78				



Gráfica 3. Curva de Titulación Potenciométrica de la muestra M3 según European Pharmacopoeia 5.0 – 2005. (Ver Sec. F. Análisis cuantitativo de alcaloides, Pág. 66)

Tabla 18. Datos de la curva de titulación potenciométrica de la muestra M4 según European Pharmacopoeia 5.0 – 2005

V (mL)	pH	\bar{V} (mL)	$\Delta pH/\Delta V$	\bar{V} , (mL)	$\Delta^2 pH/\Delta V^2$
0,00	1,97	0,25	0,32	0,50	2,80E-01
0,50	2,13	0,75	0,46	1,00	9,20E-01
1,00	2,36	1,25	0,92	1,50	1,72E+01
1,50	2,82	1,75	9,54	2,00	-1,33E+01
2,00	7,59	2,25	2,90	2,50	-3,96E+00
2,50	9,04	2,75	0,92	3,00	-2,40E-01
3,00	9,50	3,25	0,80	3,50	-4,00E-01
3,50	9,90	3,75	0,60	4,00	7,11E-15
4,00	10,20	4,25	0,60	4,50	1,20E-01
4,50	10,50	4,75	0,66	5,00	-2,00E-01
5,00	10,83	5,25	0,56	5,50	-4,00E-01
5,50	11,11	5,75	0,36	6,00	-2,00E-01
6,00	11,29	6,25	0,26	6,50	-1,60E-01
6,50	11,42	6,75	0,18	7,00	-4,00E-02
7,00	11,51	7,25	0,16	7,50	-1,20E-01
7,50	11,59	7,75	0,10	8,00	-7,11E-15
8,00	11,64	8,25	0,10	8,50	-8,00E-02
8,50	11,69	8,75	0,06	9,00	-8,00E-02
9,00	11,72	9,25	0,02	9,50	8,00E-02
9,50	11,73	9,75	0,06		
10,00	11,76				

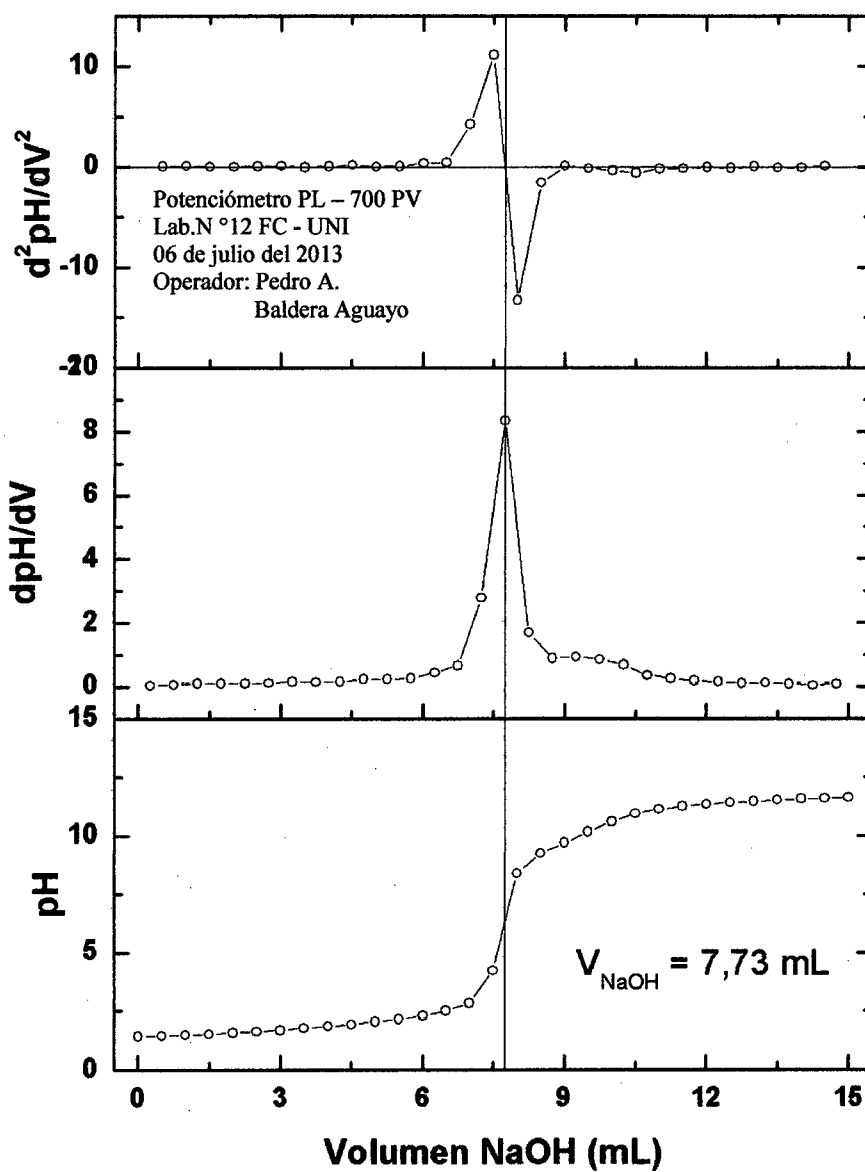


Gráfica 4. Curva de Titulación Potenciométrica de la muestra M4 según European Pharmacopoeia 5.0 – 2005 (Ver Sec. F. Análisis cuantitativo de alcaloides, Pág. 66).

Tabla 19. Datos de la curva de titulación potenciométrica de la muestra M5 según

Hoet & Ríos Chu – 1980

V (mL)	pH	\bar{V} (mL)	$\Delta pH/\Delta V$	\bar{V} , (mL)	$\Delta^2 pH/\Delta V^2$
0,00	1,43	0,25	0,04	0,50	4,00E-02
0,50	1,45	0,75	0,06	1,00	8,00E-02
1,00	1,48	1,25	0,10	1,50	0,00E+00
1,50	1,53	1,75	0,10	2,00	-8,88E-16
2,00	1,58	2,25	0,10	2,50	4,00E-02
2,50	1,63	2,75	0,12	3,00	8,00E-02
3,00	1,69	3,25	0,16	3,50	-4,00E-02
3,50	1,77	3,75	0,14	4,00	4,00E-02
4,00	1,84	4,25	0,16	4,50	1,60E-01
4,50	1,92	4,75	0,24	5,00	0,00E+00
5,00	2,04	5,25	0,24	5,50	4,00E-02
5,50	2,16	5,75	0,26	6,00	3,60E-01
6,00	2,29	6,25	0,44	6,50	4,40E-01
6,50	2,51	6,75	0,66	7,00	4,24E+00
7,00	2,84	7,25	2,78	7,50	1,11E+01
7,50	4,23	7,75	8,34	8,00	-1,33E+01
8,00	8,40	8,25	1,70	8,50	-1,60E+00
8,50	9,25	8,75	0,90	9,00	8,00E-02
9,00	9,70	9,25	0,94	9,50	-1,60E-01
9,50	10,17	9,75	0,86	10,00	-3,60E-01
10,00	10,60	10,25	0,68	10,50	-6,40E-01
10,50	10,94	10,75	0,36	11,00	-2,00E-01
11,00	11,12	11,25	0,26	11,50	-1,60E-01
11,50	11,25	11,75	0,18	12,00	-4,00E-02
12,00	11,34	12,25	0,16	12,50	-1,20E-01
12,50	11,42	12,75	0,10	13,00	4,00E-02
13,00	11,47	13,25	0,12	13,50	-8,00E-02
13,50	11,53	13,75	0,08	14,00	-8,00E-02
14,00	11,57	14,25	0,04	14,50	8,00E-02
14,50	11,59	14,75	0,08		
15,00	11,63				

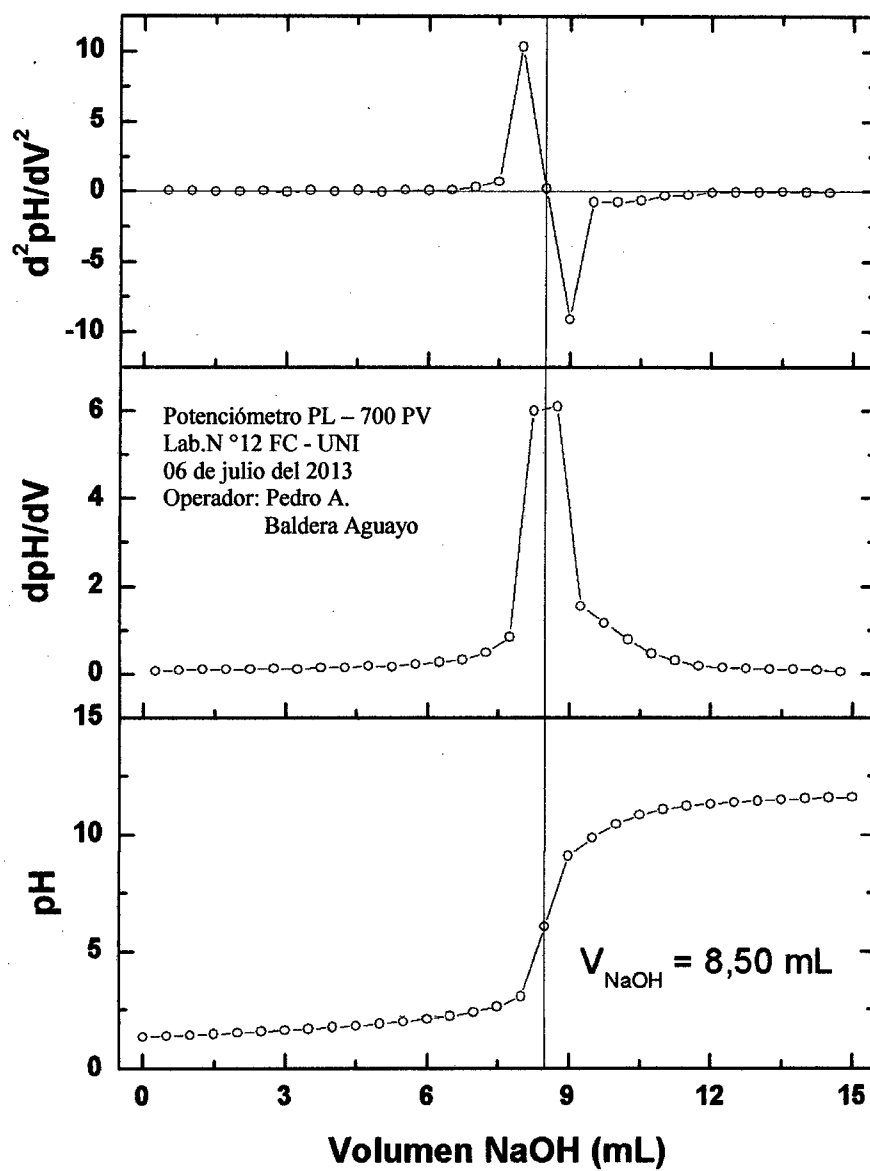


Gráfica 5. Curva de Titulación Potenciométrica de la muestra M5 según Hoet & Ríos Chu – 1980 (Ver Sec. F. Análisis cuantitativo de alcaloides, Pág. 66).

Tabla 20. Datos de la curva de titulación potenciométrica de la muestra M6 según

Hoet & Ríos Chu – 1980

V (mL)	pH	\bar{V} (mL)	$\Delta pH/\Delta V$	\bar{V} , (mL)	$\Delta^2 pH/\Delta V^2$
0,00	1,35	0,25	0,06	0,50	4,00E-02
0,50	1,38	0,75	0,08	1,00	4,00E-02
1,00	1,42	1,25	0,10	1,50	0,00E+00
1,50	1,47	1,75	0,10	2,00	0,00E+00
2,00	1,52	2,25	0,10	2,50	4,00E-02
2,50	1,57	2,75	0,12	3,00	-4,00E-02
3,00	1,63	3,25	0,10	3,50	8,00E-02
3,50	1,68	3,75	0,14	4,00	0,00E+00
4,00	1,75	4,25	0,14	4,50	8,00E-02
4,50	1,82	4,75	0,18	5,00	-4,00E-02
5,00	1,91	5,25	0,16	5,50	1,20E-01
5,50	1,99	5,75	0,22	6,00	8,00E-02
6,00	2,10	6,25	0,26	6,50	1,20E-01
6,50	2,23	6,75	0,32	7,00	3,20E-01
7,00	2,39	7,25	0,48	7,50	7,20E-01
7,50	2,63	7,75	0,84	8,00	1,03E+01
8,00	3,05	8,25	6,00	8,50	2,00E-01
8,50	6,05	8,75	6,10	9,00	-9,12E+00
9,00	9,10	9,25	1,54	9,50	-7,60E-01
9,50	9,87	9,75	1,16	10,00	-7,60E-01
10,00	10,45	10,25	0,78	10,50	-6,40E-01
10,50	10,84	10,75	0,46	11,00	-3,20E-01
11,00	11,07	11,25	0,30	11,50	-2,40E-01
11,50	11,22	11,75	0,18	12,00	-8,00E-02
12,00	11,31	12,25	0,14	12,50	-4,00E-02
12,50	11,38	12,75	0,12	13,00	-4,00E-02
13,00	11,44	13,25	0,10	13,50	-7,11E-15
13,50	11,49	13,75	0,10	14,00	-4,00E-02
14,00	11,54	14,25	0,08	14,50	-8,00E-02
14,50	11,58	14,75	0,04		
15,00	11,60				



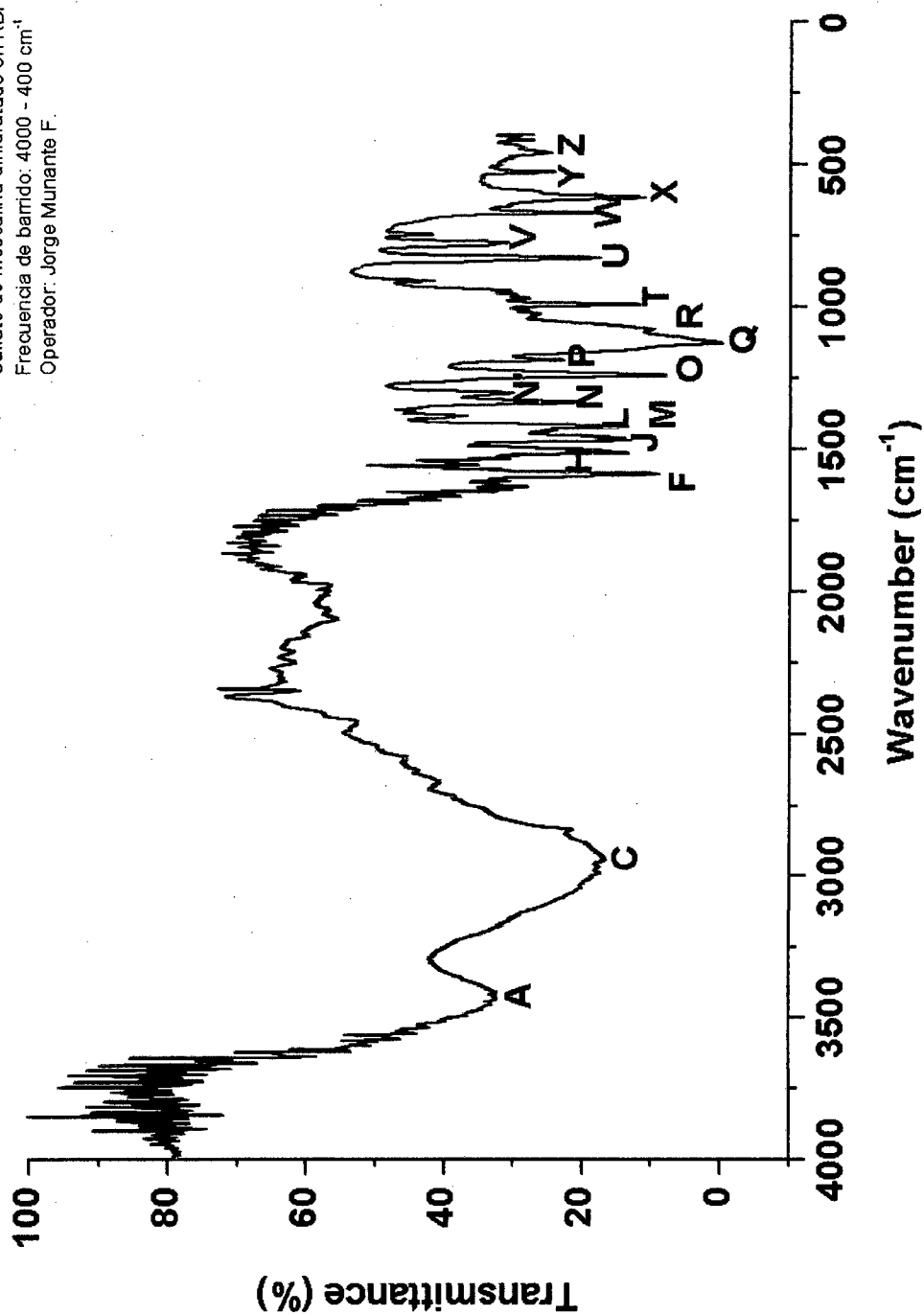
Gráfica 6. Curva de Titulación Potenciométrica de la muestra M6 según Hoet & Ríos Chu – 1980 (Ver Sec. F. Análisis cuantitativo de alcaloides, Pág. 66).

Anexo 13

Espectro IR del sulfato de mescalina dihidratado en KBr obtenido a partir del cactus "San Pedro Macho" (*E. peruviana*)

(Ver Sec. I.5. Identificación espectroscópica del sulfato de mescalina dihidratado, Pág. 87)

Espectrofotometro Infrarrojo Shimadzu FTIR
EMPESA
Sulfato de mescalina dihidratado en KBr
Frecuencia de barrido: 4000 - 400 cm^{-1}
Operador: Jorge Murante F.



Anexo 14

**Espectro UV del sulfato de mescalina dihidratado en etanol al 80 % en agua
obtenido a partir del cactus "San Pedro Macho" (*E. peruviana*)**

(Ver Sec. I.6. Identificación espectroscópica del sulfato de mescalina dihidratado, Pág. 88)

