

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE INGENIERÍA**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**ESCUELA PROFESIONAL DE QUÍMICA**



**“ESTUDIO QUÍMICO DE LAS HOJAS DE LA  
MISHA RASTRERA (*Datura candida*)”**

**TESIS**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE**

**LICENCIADO EN QUÍMICA**

**BILLY JOEL CABANILLAS AMADO**

**LIMA – PERU**

**2008**

*A mis padres, por su apoyo  
y motivación para siempre  
seguir adelante.*

## AGRADECIMIENTOS

Deseo agradecer particularmente al Dr. Víctor Reyna Pinedo, profesor principal de la Facultad de Ciencias y director de esta tesis, por acogerme en su grupo de Investigación de Productos Naturales, por su disponibilidad y por sus consejos brindados durante la realización del presente trabajo de investigación.

También deseo enviar un agradecimiento los miembros del Grupo de Investigación de Química de Productos Naturales, en especial a la M.Sc. Virginia Torpoco C. y a la Lic. Elena Cóndor C., por sus invaluable aportes en mi preparación para el trabajo en el laboratorio; a la M.Sc. Blga. Joaquina Albán (Universidad Nacional Mayor de San Marcos) por la determinación botánica del material vegetal.

Asimismo, me gustaría dar un agradecimiento especial al Dr. Christian Marazano, director de investigación del Institut de Chimie des Substances Naturelles de Gif sur Yvette (Francia), por su apoyo y facilidades brindadas, durante mi permanencia en su equipo de investigación, tanto en el desarrollo de la purificación de los extractos de *D. candida* como en el trabajo del Master que realicé durante los años 2005-2006.

Una mención especial para Bernard Delpech, investigador del ICSN, por su siempre abierta disposición para hablar de química, un profesional modelo.

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

## RESUMEN

La Misha rastrera (*Datura candida*) se emplea en la medicina tradicional peruana, y sus constituyentes puros (el alcaloide escopolamina) se utilizan como espasmolítico, anticolinérgico, narcótico y anestésico.

Las hojas de *D. candida* contienen alcaloides del tipo tropánico, principalmente escopolamina, conocida también como hioscina (Evans, Bristol, & Lampard, 1969).

En el presente trabajo de tesis se ha aislado los dos principales alcaloides de las hojas de la Misha rastrera, la escopolamina y norescopolamina, los cuales han sido caracterizados por sus espectros de Masas, RMN<sup>1</sup>H, RMN<sup>13</sup>C, COSY, HMQC y HMBC.

Griffin (1966) y Evans *et al.* (1969) realizaron el análisis cuantitativo de alcaloides presentes en la *Datura candida*, reportando que el porcentaje total de alcaloides en las hojas (secas) fluctúa entre 0,30 a 0,86%. En nuestro laboratorio se realizó la determinación cuantitativa del total de alcaloides de las hojas de la Misha rastrera, habiendo obtenido 0,45% (procedimiento de Pelt *et al.*, 1967).

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

# ESTUDIO QUÍMICO DE LAS HOJAS DE LA MISHA RASTRERA (*Datura candida* (Pers.) Saff.)

## CONTENIDO

Introducción	1
Objetivos de la tesis	3
<b>I. ESTUDIO BIBLIOGRÁFICO</b>	
<b>A. Estudios químicos precedentes relativos a las hojas de <i>Datura candida</i></b>	<b>5</b>
1. Composición Química de las hojas de <i>Datura candida</i>	5
a) Análisis cualitativo (marcha fitoquímica)	5
b) Principales alcaloides presentes en las hojas de <i>D. candida</i>	5
c) Análisis cuantitativo de alcaloides en las hojas de <i>D. candida</i>	8
d) Compuestos volátiles presentes en flores y hojas de <i>D. candida</i>	10
2. Aislamiento de alcaloides de las hojas de <i>Datura candida</i>	10
a) Procedimiento de Griffin (1966)	10
b) Procedimiento de Evans, Bristol & Lampard (1969)	12
3. Identificación clásica de la escopolamina, norescopolamina y derivados	14
a) Cromatografía en capa fina-CCF	14
b) Punto de fusión	14
4. Identificación espectroscópica de la escopolamina	15
a) Espectro de Masas de la escopolamina	15
b) Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno, RMN <sup>1</sup> H	19
c) Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de Carbono, RMN <sup>13</sup> C	22
d) Espectro de Correlación Homonuclear, COSY	25
e) Espectro de Correlación Heteronuclear a larga distancia, COLOC	26
f) Espectro Ultravioleta, UV	27
g) Espectro Infrarrojo, IR	28
5. Biosíntesis de la escopolamina	28
6. Síntesis de la escopolamina	31
<b>B. Estudios químicos generales</b>	<b>35</b>
1. Análisis cualitativo (marcha fitoquímica)	35

2. Test de alcaloides	35
3. Análisis cuantitativo de alcaloides	36
a) Procedimiento de Pelt <i>et al.</i> (1967)	36
b) Procedimiento de la 20 <sup>th</sup> ed. U.S. Pharmacopoeia-USP (1980)	37
4. Aislamiento de alcaloides	40
a) Procedimiento de Reyna & Torpoco (1994)	40
b) Procedimiento de Robins <i>et al.</i> (1993)	41
c) Comparación de Procedimientos	42
5. Identificación espectroscópica de compuestos orgánicos	43
a) Espectrometría de Masas, EM	43
b) Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno	45
c) Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear de Carbono	46
d) Espectroscopía de Resonancia Magnética Bidimensional	49
e) Espectroscopía de Infrarrojo, IR	51
f) Espectroscopía de Ultravioleta, UV	52

## II. PARTE EXPERIMENTAL

Presentación	55
Metodología de investigación para el estudio químico (alcaloides) de plantas medicinales	56
<b>TRABAJO PRELIMINAR</b>	<b>57</b>
A. Selección y colección de la planta	57
B. Estudio etnobotánico y etnomedicinal	57
C. Determinación (identificación) botánica	59
<b>TRABAJO EXPERIMENTAL EN EL LABORATORIO</b>	<b>59</b>
Secado y molienda de la planta	59
<b>D. Análisis Cualitativo (Marcha Fitoquímica)</b>	<b>60</b>
1. Muestra. Cantidad de muestra por análisis	60

2.	Procedimiento	60
3.	Resultados	60
<b>E.</b>	<b>Análisis Cuantitativo de Alcaloides</b>	<b>60</b>
1.	Muestra. Cantidad de muestra por análisis	60
2.	Procedimiento	61
	a) Extracción sólido-líquido: Obtención del Extracto Bruto Orgánico	61
	b) Separación líquido-líquido: Obtención del Extracto de Alcaloides	61
	c) Eliminación de las bases volátiles	62
	d) Titulación. Determinación potenciométrica	62
3.	Cálculo de la cantidad y del porcentaje de alcaloides en la muestra	63
<b>F.</b>	<b>Aislamiento de compuestos puros</b>	<b>65</b>
1.	Extracción sólido-líquido: Obtención del Extracto Bruto Orgánico	66
2.	Separación líquido-líquido: Obtención del Extracto Bruto de Alcaloides	67
3.	Purificación por cromatografía	68
4.	Análisis preliminar por cromatografía en capa fina-CCF	69
5.	Cromatografía de columna-CC	70
6.	Cromatografía en placa preparativa-CPP	74
<b>G.</b>	<b>Identificación Espectroscópica de la escopolamina</b>	<b>77</b>
1.	Espectro de Masas-HRMS	77
2.	Espectro de Masas-EI	79
3.	Espectro de RMN <sup>1</sup> H	81
4.	Espectros de RMN <sup>13</sup> C	84
5.	Espectro <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H COSY	90
6.	Espectro HMQC	94
7.	Espectro HMBC	97
<b>H.</b>	<b>Identificación Espectroscópica de la norescopolamina</b>	<b>100</b>
1.	Espectro de Masas-HRMS	100
2.	Espectro de Masas-EI	101
3.	Espectro de RMN <sup>1</sup> H	104
4.	Espectros de RMN <sup>13</sup> C	107
5.	Espectro <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H COSY	113
6.	Espectro HMQC	116
7.	Espectro HMBC	119

### III. RESULTADOS Y CONCLUSIONES

Resultados	123
Conclusiones	124

### IV. BIBLIOGRAFÍA

125

### V. ANEXOS

Anexo 1. Interpretación detallada del espectro de RMN <sup>1</sup> H de la Escopolamina	132
Anexo 2. Marcha fitoquímica preliminar (Reyna, 1999-b)	137
Anexo 3. Análisis cualitativo para la detección de alcaloides presentes en plantas (Reyna, 1992)	144
Anexo 4. Características Botánicas de <i>Datura candida</i>	147
Anexo 5. Identificación Botánica de <i>Datura candida</i>	148
Anexo 6. Resultados de la marcha fitoquímica de las hojas de la Misha rastrera ( <i>D. candida</i> )	149
Anexo 7. Curva de titulación potenciométrica de la escopolamina	150
Anexo 8. Dispositivo columna flash utilizado en el aislamiento de alcaloides de <i>D. candida</i>	151
Anexo 9. Espectro RMN de la fracción 1 de CC1 (CC1.f1)	152

## 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 como colorantes, insecticidas, aromatizantes, etc.

La investigación científica de las plantas medicinales involucra dos grandes partes:

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, involucra el aislamiento e identificación, mediante técnicas espectroscópicas (Masas, Resonancia magnética nuclear o difracción de rayos X), de la(s) molécula(s) presente(s) en mayor cantidad, o aquella(s) a la que se atribuye una actividad específica.

La presente tesis, en la línea de Química Orgánica de Productos Naturales, comprende el estudio químico de los alcaloides presentes en las hojas de la Misha rastrera (*Datura candida*) y significó para mí poner en práctica los conocimientos adquiridos en los cuatro cursos básicos semestrales de Química Orgánica, los cursos de Proyecto de Tesis I CQ 561, Proyecto de Tesis II CQ 562 y del curso electivo CQ 046-Química de los Productos Naturales; y complementarlos con el trabajo realizado, como parte de mis estudios del Master, en los laboratorios del Institut de Chimie des Substances Naturelles (ICSN) (Gif-sur-Ivette, Francia). Este conjunto de conocimientos me permitió conocer (i) qué clase de compuestos están presentes, (ii) cuál es la cantidad de

alcaloides que contiene y iii cuál es el alcaloide principal contenido en las hojas de la Misha rastrera.

Este trabajo de tesis comprendió las siguientes actividades:

- i Trabajo experimental en laboratorio químico, realizado en el ambiente de Investigación de Química de Productos Naturales (C3-175), ubicado en el Laboratorio N°12 (pabellón C) de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Ingeniería, que comprendió el secado y molienda de las hojas del toe (*Datura candida*), el análisis cualitativo (marcha fitoquímica), el análisis cuantitativo del total de alcaloides y la obtención de los extractos de alcaloides.
- ii La parte más importante de esta tesis, la purificación de la escopolamina, el principal alcaloide presente en las hojas de esta planta, y de la norescopolamina, un alcaloide secundario, se realizaron en el ambiente N°425 del equipo 39 del ICSN. Las purificaciones de ambos compuestos se llevaron a cabo mediante cromatografía en columna (CC) y cromatografía en placa preparativa (CPP).
- iii Identificación espectroscópica de la escopolamina y la norescopolamina mediante el análisis de los espectros de Masas y de Resonancia Magnética Nuclear (RMN<sup>1</sup>H, RMN<sup>13</sup>C, COSY, HMQC y HMBC).
- iv Análisis de la información bibliográfica relativa a los estudios químicos de las hojas de la Misha rastrera (*D. candida*), y de los dos alcaloides aislados.

Todo este trabajo demandó, en promedio, una dedicación de 6 meses (considerando el trabajo de 8 horas/día, durante 5 días/semana), y se realizó en el período de marzo del 2003 a abril del 2004.

## OBJETIVOS

Los objetivos de la presente tesis son los siguientes:

- 1 Aislar e identificar (espectroscópicamente) los principales alcaloides presentes en las hojas de la Misha rastrera (*Datura candida*),
- 11 el análisis cualitativo (marcha fitoquímica) de los metabolitos secundarios presentes en las hojas de la Misha rastrera, y
- 111 el análisis cuantitativo del total de alcaloides contenido en las hojas de la planta.

El objetivo principal es el primero, esto es, el aislamiento e identificación de los principales alcaloides contenidos en las hojas de la Misha rastrera, que llevó al estudio y experimentación de los diversos procedimientos de aislamiento de alcaloides y de las técnicas de identificación espectroscópicas.

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

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

***ESTUDIO***

***BIBLIOGRÁFICO***

## **A. Estudios químicos precedentes relativos a las hojas de *Datura candida***

Las plantas de la familia *Solanaceae* de los géneros *Atropa*, *Datura* (o *Brugmansia*), *Duboisia*, *Hyoscyamus* y *Scopolia*, se consideran una rica fuente de alcaloides tropánicos con interés medicinal, siendo los principales la escopolamina y la hiosciamina, los cuales actúan como agentes anticolinérgicos en el sistema nervioso parasimpático y se utilizan como midriáticos y espasmolíticos. No obstante que se ha conseguido la síntesis de estos alcaloides, hasta la fecha la escopolamina se produce exclusivamente a partir de plantas (Shimomura *et al.*, 1995: 395).

### **1. Composición Química de las hojas de *Datura candida***

#### **a) Análisis cualitativo (marcha fitoquímica)**

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

En la bibliografía revisada no se ha encontrado ningún trabajo de análisis cualitativo de las hojas de *Datura candida*.

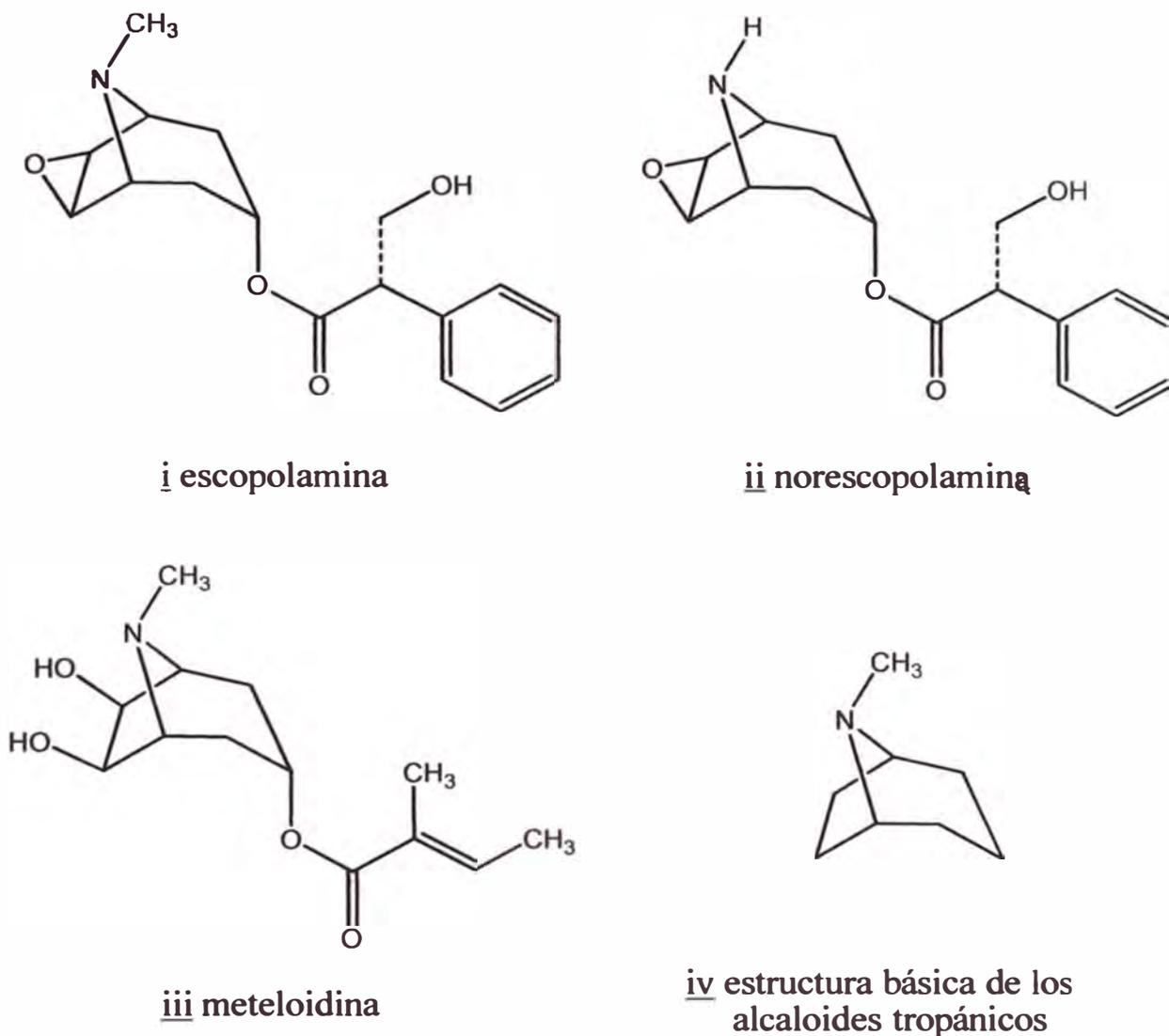
#### **b) Alcaloides presentes en las hojas de *Datura candida***

En la bibliografía se reportan tres trabajos relativos a los alcaloides presentes en las hojas de *Datura candida*.

\* **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.

Griffin (1966), encontró que las hojas de *D. candida* cultivada en Brisbane (Australia), *Datura candida sens. lat.*, contienen **escopolamina (i)** y **meteloidina (iii)** como sus alcaloides principales, junto con pequeñas cantidades de **norescopolamina (ii)**, norhiosciamina y una base no identificada. En la Figura 1 se muestran las estructuras de estos alcaloides, y la estructura básica de los alcaloides tropánicos (**iv**).



**Figura 1.** Principales alcaloides presentes en las hojas de *D. candida*

La extracción de alcaloides se realizó mediante partición ácido-base y la purificación del Extracto Bruto de Alcaloides se llevó a cabo mediante cromatografía de partición en columna sobre kielselgur. Las cantidades de

alcaloides purificados fueron: escopolamina (0,43 g), meteloidina (0,12 g), norescopolamina (13 mg), norhiosciamina (25 mg) y base no identificada (15 mg). Los alcaloides fueron identificados mediante el punto de fusión de sus picratos y el análisis de sus elementos (Griffin, 1966).

Evans, Bristol & Lampard (1969) encontraron que las partes aéreas de *D. candida* (Pers.) Saff., cultivada en Nottingham (Inglaterra), contienen **escopolamina** como el alcaloide principal, junto con pequeñas cantidades de **norescopolamina**, **meteloidina**, atropina, oscina y noratropina. Estos resultados indican que existe poca diferencia cualitativa entre los alcaloides de esta planta y de la especie estrechamente relacionada de *D. candida* sens. lat. publicada por Griffin (1966).

Evans & El Imann (1990) analizaron las partes aéreas de una muestra cultivada de *Datura candida*, denominada “Flinthan Hall” y encontraron la siguiente composición: escopolamina como el alcaloide principal (no indica cantidad), norhiosciamina, 6 $\beta$ -acetoxi-3 $\alpha$ -tigloiloxitropano, tigloidina, 6 $\beta$ -tigloyloxitropan-3 $\alpha$ -ol, 3 $\alpha$ -tigloiloxitropan-6 $\beta$ -ol, hiosciamina, atropina, noratropina, 6 $\beta$ -hidroxi-hiosciamina, tropan-3 $\alpha$ -ol. Es decir, solo la escopolamina y la norhiosciamina son los únicos alcaloides que también están presentes en la especie estudiada por Evans, Bristol & Lampard (1969).

Estos resultados tan diferentes se explican si se tiene en cuenta que la especie *Datura candida* es una planta que en el proceso de su cultivo, puede ser modificada taxonomicamente alterando la forma de sus hojas, flores y frutos, cambios que se dan también a nivel citológico y en su composición química, por lo que estos diferentes “cultivares” resultan tan diferenciados en su composición química\*.

Así, Griffin (1992) reporta el aislamiento de un nuevo alcaloide, la 6,7-epoxilitorina, de las hojas de una planta híbrida que identifica como *Datura*

---

\* Comunicación Personal Dr. Victor Reyna P. y Blga. J. Alban C.

*candida* cultivar, cultivada en Queensland (Australia) y que tiene sus flores color salmón.

Asimismo, Griffin (1966) realizó el análisis de las otras partes de la *Datura candida* aislando de las flores los alcaloides escopolamina (0,225 g), norescopolamina (13 mg) y meteloidina (12 mg); de los tallos aisló escopolamina (1,91 g), hiosciamina (0,23 g), metelodina (0,30 g), tropina (25 mg) y norhiosciamina (48 mg), de las raíces escopolamina (0,301 g), hiosciamina (62 mg), atropina (45 mg), norhiosciamina (41 mg), tropina (16 mg) y 3,6-ditigloiloxitropano (7 mg).

Evans, Bristol & Lampard (1969) analizaron las raíces de *D. candida* encontrando los siguientes alcaloides: 3 $\alpha$ ,6 $\beta$ -ditigloiloxitropan-7 $\beta$ -ol, 3 $\alpha$ -tigloiloxitropano, norescopolamina, meteloidina, hiosciamina, atropina y noratropina.

### c) Análisis cuantitativo (contenido) de alcaloides en las hojas de *Datura candida*

Griffin (1966) reporta el contenido de alcaloides totales y de escopolamina, respectivamente, en las hojas y otras partes de *Datura candida*, ver Tabla 1.

**Tabla 1.** Contenido de alcaloides en *Datura candida*

Referencia (procedencia de la muestra)	Parte analizada	Escopolamina %	Alcaloides Totales %
	<b>Hojas</b>	<b>0,62</b>	<b>0,86</b>
Griffin (1966)	Flores	0,53	0,60
(Brisbane, Australia)	Tallos	0,32	0,44
	Raíces	0,10	0,26
Evans, Bristol & Lampard (1969)			
(Nottingham, Inglaterra, N° 2945)	<b>Hojas</b>	<b>0,15</b>	<b>0,43</b>
(Honolulu, Hawaii, N° 1942)	<b>Hojas</b>	<b>0,10</b>	<b>0,32</b>
(Honolulu, Hawaii, N° 1851)	<b>Hojas</b>	<b>0,16</b>	<b>0,30</b>

Evans, Bristol & Lampard (1969) también proporcionan el análisis de *D. candida* sembrada en Honolulu-Hawai (a partir de plantas procedentes del valle de Sibundoy-Colombia).

Griffin (1966) indica que las muestras fueron analizadas mediante el método de Evans & Wellendorf (1959) y Evans & Partridge (1952): extracción clásica de los alcaloides (de *Datura stramonium*) con un solvente orgánico, de la muestra vegetal basificada (5g), seguida de la partición ácido-base para la obtención del EBA. La mezcla de alcaloides fueron purificados mediante cromatografía en columna (con kieselguhr) utilizando como eluentes éter de petróleo, tetracloruro de carbono, éter y cloroformo, respectivamente. Los alcaloides puros (escopolamina e hiosciamina) fueron cuantificados mediante titulación con ácido, a medida que fueron separados de la columna.

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

Padula *et al.* (1976) reportan la determinación cuantitativa del total de alcaloides utilizando el método propuesto por la U.S. Pharmacopoeia, y la determinación selectiva de escopolamina utilizando cromatografía de gases, en *Datura ferox* colectada en Argentina.

Asimismo, en la bibliografía se reporta el uso de la cromatografía líquida de alta resolución – HPLC para el análisis cuantitativo de escopolamina e hiosciamina en otras especies de *Datura* (Vitale *et al.*, 1995: *D. ferox*, semillas; Robins *et al.*, 1987: *D. stramonium*, <haire root cultures>).

**d) Compuestos volátiles presentes en flores y hojas de *D. x candida***

Kite & Leon (1995) realizaron un estudio para identificar los compuestos volátiles de *Datura x candida*, cultivada en Kew-Inglaterra, presentes en hojas y flores, encontrando que las flores contienen indol en porcentaje muy bajo (0,2-1.1%) y, además, indican la presencia de benzenoides, monoterpenoides y sesquiterpenoides, donde los compuestos mayoritarios son el *trans*-ocimeno (38-52%) y el 1,8-cineol (5-19%). Las hojas al igual que las flores contienen benzenoides, monoterpenoides y sesqui-terpenoides donde predomina el perilleno (14-25%) y la dendrolasina (8,8-13%).

**2. Aislamiento de alcaloides de las hojas de *Datura candida***

Griffin (1966) y Evans *et al.* (1969) describen el aislamiento de los alcaloides contenidos en las hojas y en las partes aéreas, respectivamente, de *Datura candida*, así como en las raíces de esta planta.

En la bibliografía se encuentran numerosos artículos referidos al aislamiento de escopolamina y de los otros alcaloides presentes en otras especies de *Datura*, como la *Datura sanguinea* (Evans *et al.*, 1965 y 1966) y la *Datura ferox* (Vitale *et al.*, 1995).

A continuación se describen los procedimientos publicados por Griffin (1966) y Evans *et al.* (1969), 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 Griffin (1966)**

“Alkaloids in *Datura*. Section *Brugamansia*. The peach flowered form of *Datura candida* sens. lat.”.

***Muestra utilizada***

Hojas pulverizadas de *Datura candida sens lat.* cultivada en Queensland-Australia (237g).

***Extracción sólido-líquido (Obtención del Extracto bruto orgánico, EBO)***

- i Alcalinización de la muestra: La muestra se mezcló con hidróxido de calcio y agua. Se dejó en reposo por una hora.
- ii Se extrajo con éter etílico en un equipo Soxhlet y luego de la evaporación del solvente se obtuvo el EBO.

***Separación sólido-líquido (Obtención del Extracto bruto de alcaloides, EBA)***

- iii El EBO se disolvió en etanol, luego se neutralizó\* y se diluyó con un poco de agua y se filtró.
- iv Los alcaloides básicos se liberaron de la solución acuosa ácida adicionando cantidades sub-equivalentes de álcali\* 1N (5mL), las cuales se extrajeron con cloroformo. Luego de evaporar los extractos se obtuvieron 6 fracciones denominadas: L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub>, L<sub>3</sub>, L<sub>4</sub>, L<sub>5</sub> y L<sub>6</sub>.

Los extractos se analizaron mediante CCF (alumina, CHCl<sub>3</sub>/EtOH, 50:50).

***Purificación cromatográfica***

- v Los extractos combinados L<sub>1</sub>+L<sub>2</sub> se sometieron a cromatografía en columna (preparada con 20 g de Kieselguhr y 10 mL de una solución buffer de fosfato 0,5 M de pH 6,6), cuya elusión con diferentes solventes dio los siguientes resultados:

- éter de petróleo: base no identificada (3 mg).
- éter etílico: escopolamina (0,19g).
- cloroformo: trazas de norescopolamina (5 mg).

- vi Los extractos combinados L<sub>3</sub>+L<sub>4</sub> (0,45 g) se neutralizaron y se trataron con una solución de picrato de sodio, proporcionando el picrato de escopolamina (p.f. 188°C).

El líquido madre fue sometido a cromatografía en columna (alumina), cuya elución dio los siguientes resultados:

- éter: etanol (95:5): escopolamina (50 mg).

---

\* En la referencia citada no se indican el ácido y la base (álcali) que fueron utilizados.

- éter: etanol (90:10): norescopolamina (8 mg).

vii Los extractos combinados L<sub>5</sub>+L<sub>6</sub> (0,45 g) se sometieron a cromatografía en columna de Kieselguhr y buffer de fosfato 0,5 M de pH 6,4, cuya elución dio los siguientes resultados:

- éter etílico: escopolamina (0,195g) y meteloidina (0,1g).

- cloroformo: mezcla de meteloidina (20 mg), hiosciamina (15 mg) y norhiosciamina (25 mg).

### ***Identificación***

Los alcaloides fueron identificados mediante el punto de fusión de los respectivos picratos.

En algunos casos se realizó el análisis centesimal de elementos.

### **b) Procedimiento de Evans, Bristol & Lampard (1969)**

“The alkaloids of Genus *Datura*. Section *Brugmansia*. Part IV. Tree *Datura* drugs (*Datura candida* cvs.) of the Colombian Sibundoy”.

### ***Muestra utilizada***

Partes aéreas pulverizadas de *Datura candida* cultivada en Nottingham-Inglaterra (500g).

### ***Extracción sólido-líquido (Obtención del Extracto bruto orgánico, EBO)***

**Observación.-** Evans *et al.* (1969) refieren que siguieron el procedimiento descrito por Evans & Pe Than (1962).

i Alcalinización de la muestra: La muestra se humedeció con agua (200 mL) durante una noche. Se mezcló, bajo agitación, con hidróxido de calcio (30 g) y la mezcla se maceró con éter (500 mL) durante tres horas.

ii El extracto etéreo se decantó, y la muestra vegetal se extrajo mediante percolación con más éter (6 L); juntándose los dos extractos orgánicos.

iii La evaporación del éter hasta 100 mL produce la deposición de material sólido que debe ser separado mediante filtración sobre papel de filtro.

***Separación cromatográfica (Obtención del Extracto bruto de alcaloides, EBA)***

- iv El concentrado final (aprox. 100 mL) fue purificado parcialmente sobre una columna empacada con Kieselguhr (60 g) y ácido sulfúrico 5N (30 mL), utilizando éter (460 mL) para eluir los pigmentos coloreados y, posteriormente, cloroformo amoniacal (2 L) para coleccionar los alcaloides. La evaporación del cloroformo proporcionó un residuo de consistencia gomosa (EBA).

***Purificación cromatográfica***

- v El EBA se trató en una columna empacada con kieselguhr y una solución buffer de fosfato 0,5 M de pH 6,6. A continuación se eluyó la columna con solventes de polaridad creciente, los resultados obtenidos fueron los siguientes:

- éter de petróleo: no contiene alcaloides.
- éter etílico: escopolamina (0,1g) y una base no identificada (de  $R_f$  igual al de la apoescopolamina).
- cloroformo: mostró ser una mezcla de varios compuestos por lo que fue resuelta en cinco fracciones (a-e):

Fracción a: norescopolamina (13 mg).

Fracción b: meteloidina (0,01g) y atropina (20 mg).

Fracción c: mezcla de derivados que no cristalizan (44 mg).

Fracción d: oscina (0,18g).

Fracción e: oscina y noratropina.

***Identificación***

Los alcaloides fueron identificados mediante el punto de fusión de los respectivos picratos.

En algunos casos se realizaron los análisis centesimales de elementos y se obtuvieron los espectros de IR.

### 3. Identificación clásica de la escopolamina, norescopolamina y derivados

#### a) Cromatografía en capa fina-CCF

##### i Vora *et al.* (1983)

Adsorbente: Sílica gel (Analtech, Inc., USA)

Eluente\*: THF : CHCl<sub>3</sub> (1:1)

- R<sub>f</sub> (escopolamina): 0,19

- R<sub>f</sub> (norescopolamina): 0,34

##### ii Mulholland *et al.* (1993)

Adsorbente: Silica gel (Merck F254).

Eluente\*: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : Et<sub>2</sub>O : EtOH : Et<sub>3</sub>N (10:10:1:1)

- R<sub>f</sub> (escopolamina): 0,65

- R<sub>f</sub> (norescopolamina): 0,8

##### iii Robins *et al.* (1993)

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

Eluente\*: AcOEt-*i*PrOH-NH<sub>3(ac)</sub> 25% (45:35:10)

- R<sub>f</sub> (escopolamina): 0,61

#### b) Punto de fusión

##### i Escopolamina: Líquido viscoso. Forma un cristal monohidratado.

59 °C (The Merck Index, 1996)

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

188 °C (Griffin, 1966)

187-188 °C (Evans & Pe Than, 1961).

##### ii Norescopolamina:

- Picrato de norescopolamina: 232 °C (Griffin, 1966)

\* THF: tetrahidrofurano; Et<sub>2</sub>O: éter etílico; EtOH: etanol; Et<sub>3</sub>N: trietilamina; AcOEt: acetato de etilo; *i*-PrOH: isopropanol.

232-233 °C (Bristol *et al.*, 1969)

232-233 °C (Southon, 1989)

- Clorhidrato de norescopolamina: 205 °C (Southon, 1989).

#### 4. Identificación espectroscópica de la escopolamina

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 Espectrometría de Masas (EM), la Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno (RMN<sup>1</sup>H) y de Carbono (RMN<sup>13</sup>C), la espectroscopía de Correlación Homonuclear (COSY), Correlación Heteronuclear (HMQC) y Correlación Heteronuclear de enlace múltiple (HMBC), así como la espectroscopía de Infrarrojo (IR) y de Ultravioleta (UV).

##### a) Espectro de Masas de la escopolamina

Vitale *et al.* (1995) proporcionan el espectro de masas de la escopolamina (aislada de *D. ferox*), ver Figura 2, explicando la formación de alguno de sus picos principales. Ellos utilizaron un equipo acoplado de cromatografía de gases-espectrómetro de masas VG TRIO-2 (Scan EI<sup>+</sup> 7,78e<sup>4</sup>).

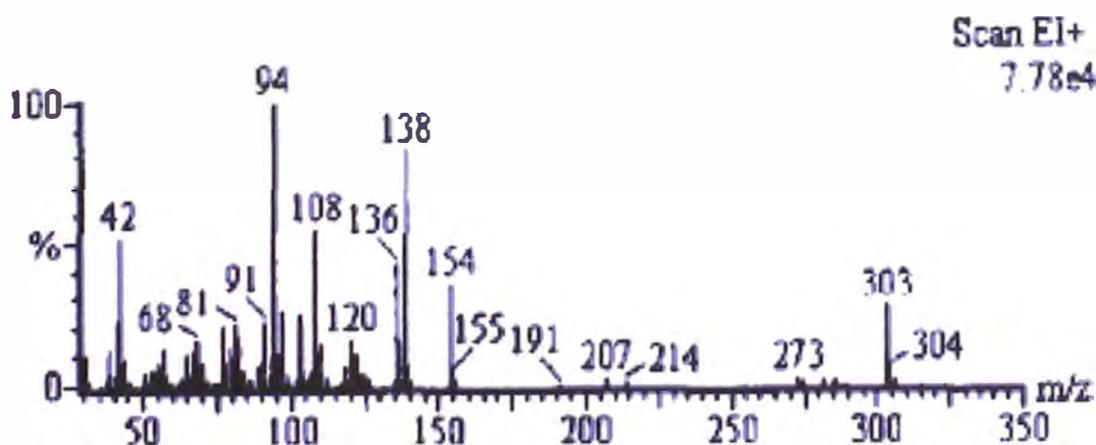


Figura 2.- Espectro de masas (EI) de la escopolamina (Vitale *et al.*, 1995)

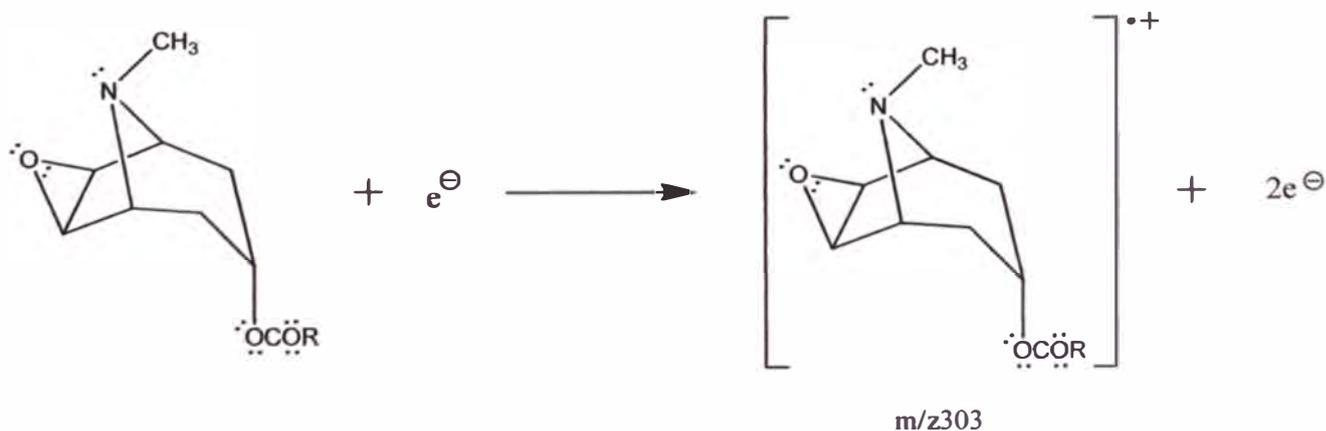
Asimismo, Whitte *et al.* (1987) proporcionan los valores de los principales iones (y su abundancia relativa) del espectro de masas de la escopolamina: 303 (28%), 154 (40%), 138 (64%), 137 (24%), 136 (33%), 108 (41%), 94 (100%).

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

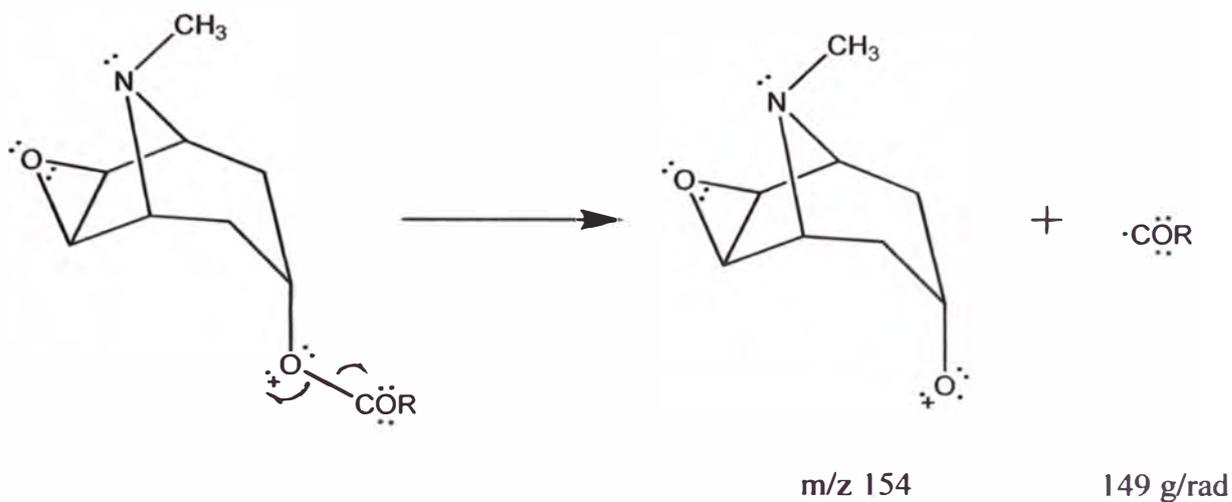
El espectro de masas obtenido del alcaloide puro, escopolamina, que hemos aislado de las hojas de *D. candida* es similar a aquel publicado por Vitale *et al.* (1995).

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

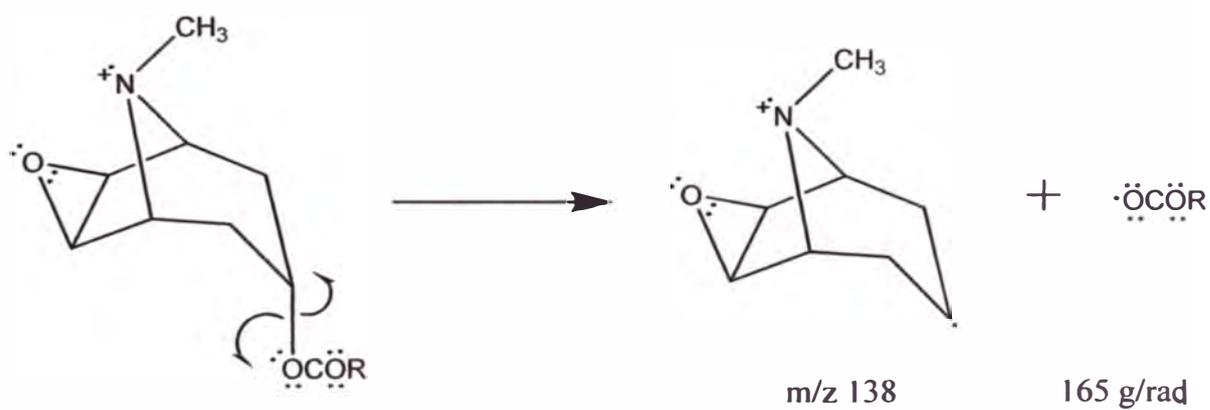
1  $M^+ 303, R=CHCH_2OHPH$



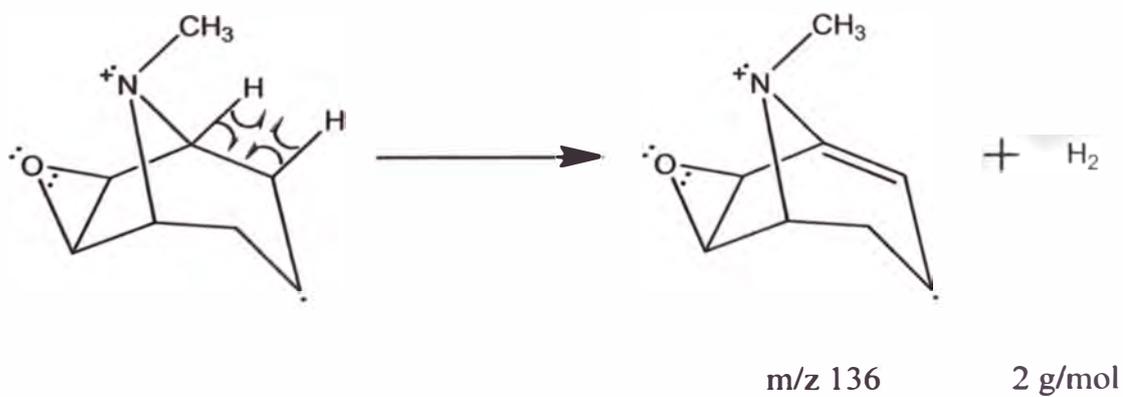
ii  $m/z$  154 ( $M^+ - \text{COR}$ )



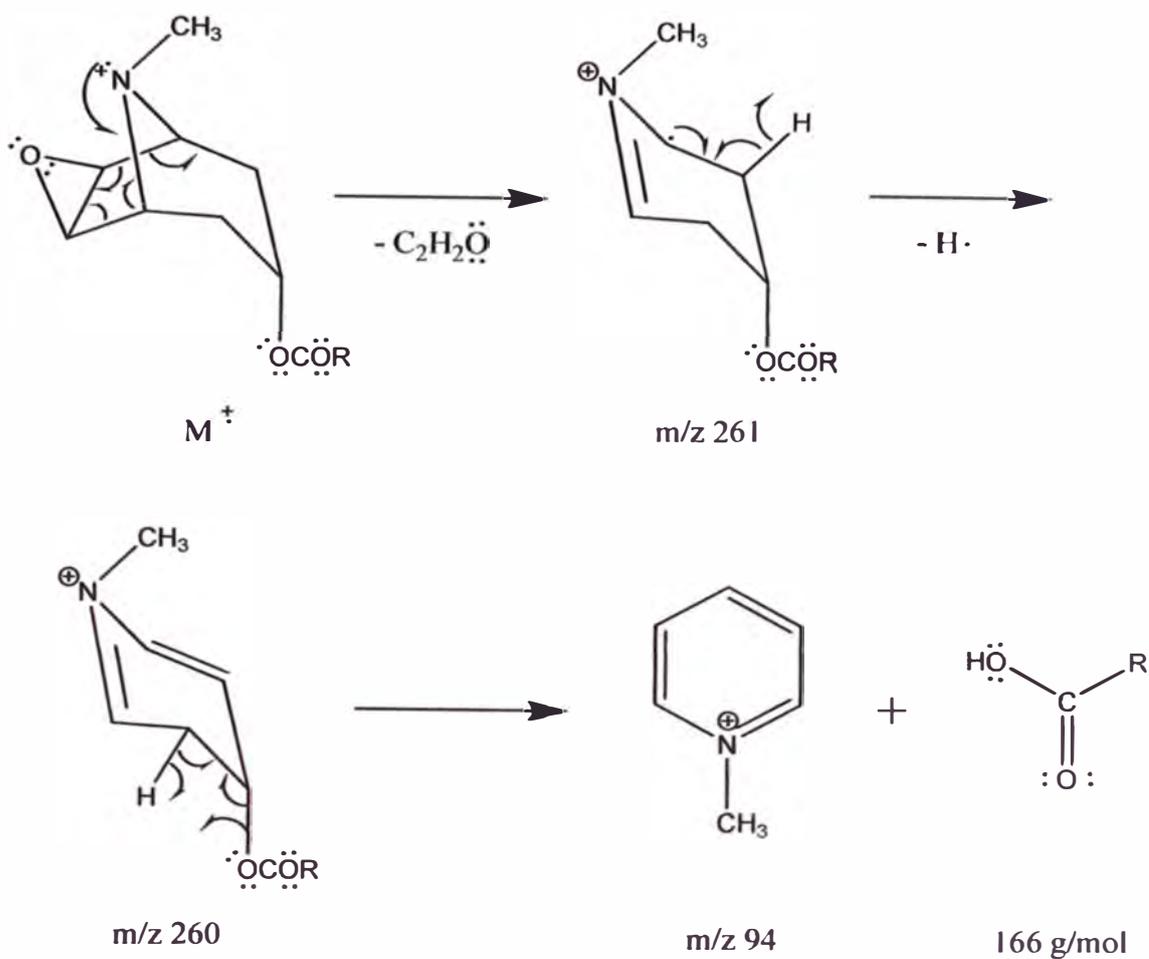
iii  $m/z$  138 ( $M^+ - \text{OCOR}$ )



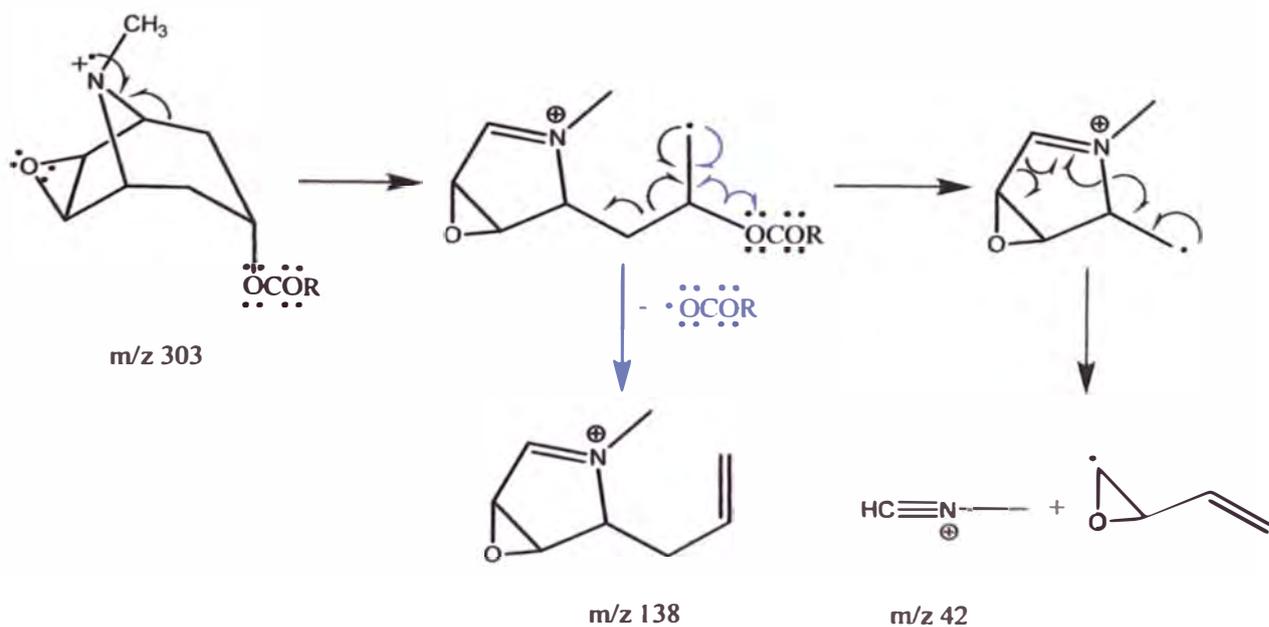
iv  $m/z$  136 ( $138 - \text{H}_2$ )



v  $m/z$  94



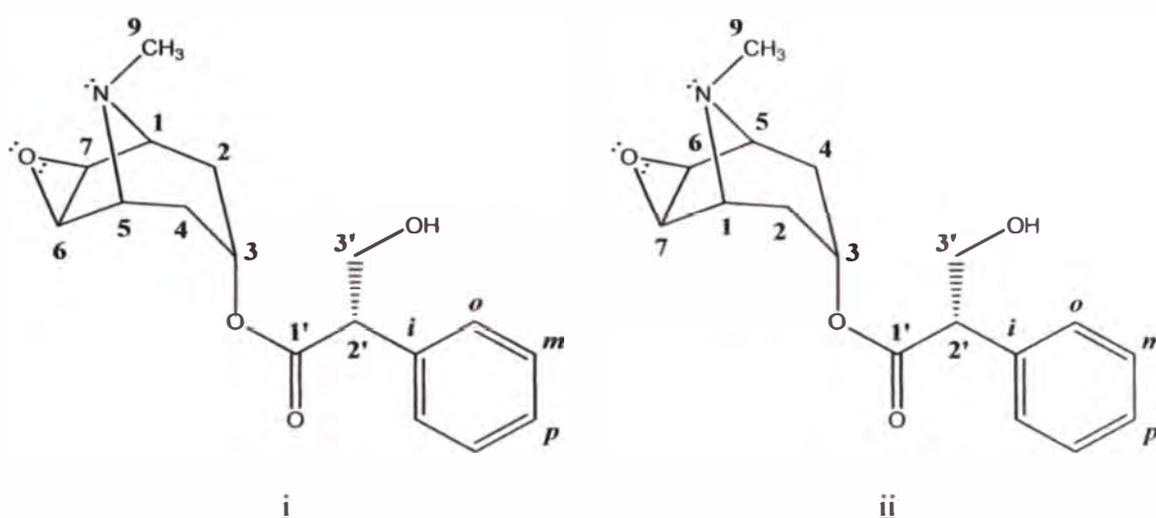
vi  $m/z$  42



## b) Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno, RMN<sup>1</sup>H

En la bibliografía se encuentra que para el estudio espectroscópico de la escopolamina se han utilizado dos notaciones para la numeración de los átomos del ciclo tropánico:

- 1 la notación propuesta por Sarazin *et al.*, (1991), ver Figura 3, que es la más aceptada (Lounasmaa & Tamminen, 1993); y
- 11 la propuesta por Chazin & Colebrook (1986), también utilizada por Robins *et al.* (1993).



**Figura 3.** Numeración de la estructura de la escopolamina propuestas por: (i) Sarazin *et al.* (1991) y (ii) por Chazin & Colebrook (1986).

Para la interpretación de los espectros de RMN que se hará en esta tesis se adopta la notación de Sarazin *et al.* (1991).

Tal como es reconocido en la revisión realizada por Lounasmaa & Tamminen (1993) sobre alcaloides tropánicos, Sarazin *et al.* (1991) reportaron la asignación espectral por RMN<sup>1</sup>H y RMN<sup>13</sup>C, completa e inequívoca, de la escopolamina (base libre) en CDCl<sub>3</sub>.

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

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

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

**Tabla 2.** Desplazamientos químicos ( $\delta$ , ppm) de los átomos de hidrógeno en el espectro RMN<sup>1</sup>H de la escopolamina en CDCl<sub>3</sub>.

Numeración del átomo de Hidrógeno	Sarazin <i>et al.</i> (1991)	Tesis Cabanillas (2006)	Chazin & Colebrook (1986)	Robins <i>et al.</i> (1993)
H-1	2,94	2,98	2,97	2,88
H-2ax	1,99	2,03	2,02	1,93
H-2eq	1,31	1,34	1,31	1,25
H-3	4,98	5,02	5,02	4,92
H-4ax	2,08	2,12	2,11	2,01
H-4eq	1,55	1,58	1,58	1,49
H-5	3,08	3,12	3,11	3,00
H-6	3,37	3,38	3,38	3,31
H-7	2,70	2,67	2,66	2,66
H-9	2,42	2,45	2,45	2,36
H-2'	3,72	3,75	3,75	3,65
H-3a'	4,30	4,16	4,17	4,92
H-3b'	3,77	3,81	3,81	3,71
H- <i>o</i>	7,21	7,22	6,72	-
H- <i>m</i>	7,29	7,31	7,35	-
H- <i>p</i>	7,18	7,44	7,30	-

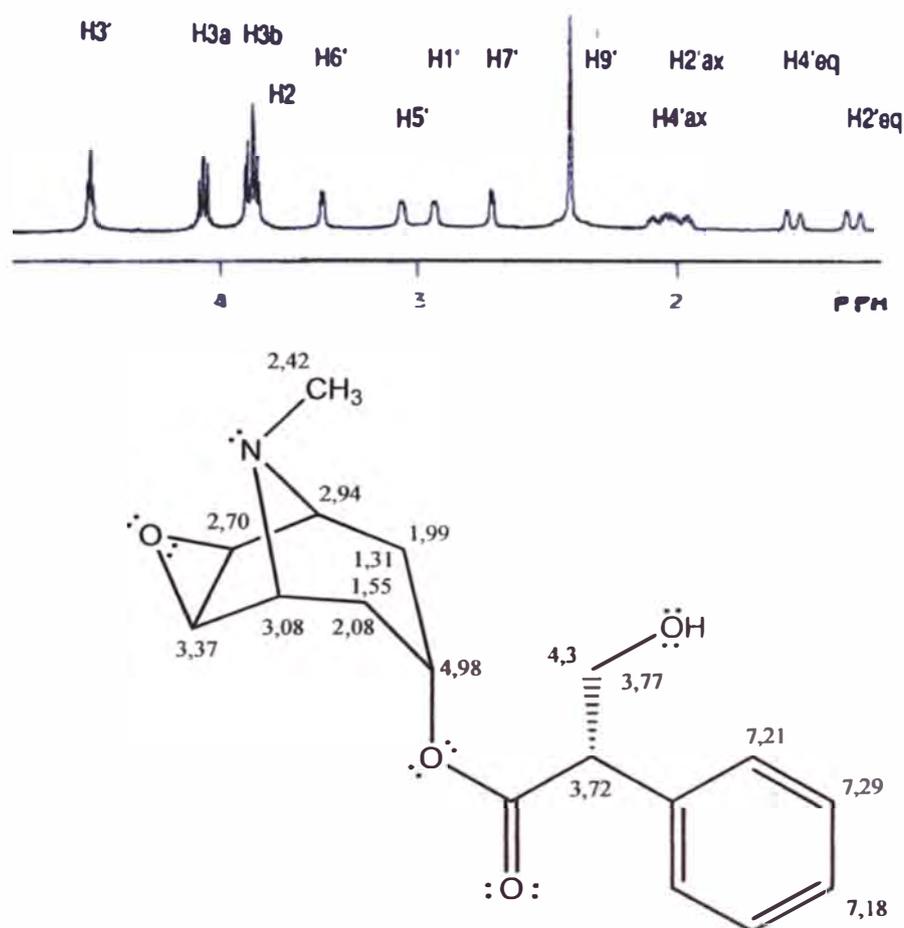
**Nota.-** En ninguna de las referencias citadas se representa el espectro RMN<sup>1</sup>H de la escopolamina. Sarazin *et al.* (1991), presenta una parte de dicho espectro en el espectro COSY, el cual se reproduce en la Figura 4.

En la Tabla 2 se presentan los desplazamientos químicos de todos los protones de la escopolamina (base libre) en CDCl<sub>3</sub> del espectro de RMN<sup>1</sup>H reportados por Sarazin *et al.* (1993), Chazin & Colebrook (1986) y Robins *et al.* (1993).

Además, en la Tabla 2 se incluyen los valores de desplazamientos químicos que obtuvimos en el espectro de RMN<sup>1</sup>H de la escopolamina que aislamos de

la hojas de *Datura candida*, en  $\text{CDCl}_3$ , y se observa la correspondencia que hay entre los valores encontrados y aquellos de Sarazin *et al.* (1991).

En la Figura 4 se reproducen la porción del espectro de  $\text{RMN}^1\text{H}$  publicado por Sarazin *et al.* (1991) en la cual también se incluye la estructura de la escopolamina con los valores de desplazamiento químicos de cada átomo de hidrógeno.



**Figura 4.** Espectro de  $\text{RMN}^1\text{H}$  (300 MHz) en  $\text{CDCl}_3$  (Sarazin *et al.*, 1991), y estructura de la escopolamina, mostrando los desplazamientos químicos ( $\delta$ , ppm).

El análisis detallado del espectro  $\text{RMN}^1\text{H}$  de la escopolamina se presenta en el Anexo 1.

### c) Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de Carbono, $\text{RMN}^{13}\text{C}$

Como se refirió en la sección b) precedente, Sarazin *et al.* (1991) realizaron la asignación espectral por  $\text{RMN}^1\text{H}$  y  $\text{RMN}^{13}\text{C}$ , completa e inequívoca, de la

escopolamina (base libre) en solución de cloroformo deuterado  $\text{CDCl}_3$ , proporcionando los valores de desplazamiento químico de cada uno de los átomos de carbono de la molécula, a partir del espectro de  $\text{RMN}^{13}\text{C}$  con y sin acoplamiento de  $^1\text{H}$ . Resultados similares fueron reportados por Woolley & Ansarin (1995), tal como se presenta en la Tabla 3.

**Tabla 3.** Desplazamientos químicos ( $\delta$ , ppm) de los átomos de carbono de la escopolamina en  $\text{CDCl}_3$ .

Número de átomo de carbono	Sarazin <i>et al.</i> (1991)	Woolley & Ansarin (1995)	Tesis Cabanillas (2006)
C-1	57,8	57,8	57,7
C-2	30,8	30,9	30,7
C-3	66,9	66,8	66,9
C-4	31,0	31,1	30,9
C-5	57,9	58,0	57,8
C-6	56,4	56,3	56,4
C-7	56,0	55,9	55,9
C-9	42,2	42,2	42,1
C-1'	171,8	171,7	171,9
C-2'	54,4	54,7	54,3
C-3'	64,0	63,9	64,0
C- <i>i</i>	135,8	135,8	135,6
C- <i>o</i>	128,1	128,9	128,1
C- <i>m</i>	129,0	128,5	129,0
C- <i>p</i>	127,9	128,0	128,0

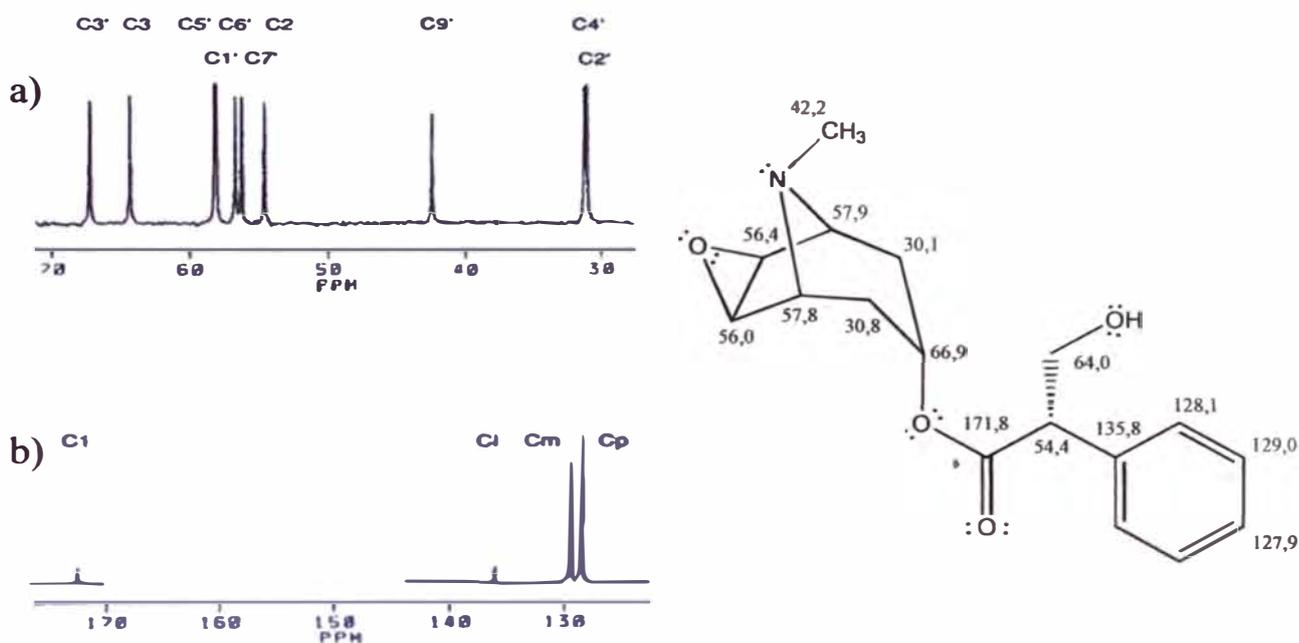
Asimismo, la Tabla 3 incluye los valores de los desplazamientos químicos de los átomos de carbono obtenido del espectro  $\text{RMN}^{13}\text{C}$  en  $\text{CDCl}_3$  de la escopolamina que se aislaron de las hojas de la Misha rastrera (*D. candida*).

Sarazin *et al.* (1991) interpretan el espectro de  $\text{RMN}^{13}\text{C}$  de la escopolamina según:

- 1 La señal a 171,8 ppm se atribuye claramente al átomo de carbono de la función éster  $\text{R-COO-R}'$  (C-1).
- 11 Las señales de los átomos de carbono del anillo aromático,  $\text{C}_6\text{H}_5^-$ , están en el rango 125-140 ppm.

- iii El desplazamiento químico del átomo de carbono “*para*” (C-*p*,  $\delta = 127,9$  ppm) se obtuvo por comparación de la intensidad de su señal en el espectro de RMN<sup>13</sup>C desacoplado.
- iv La señal a 135,8 ppm fue correctamente atribuida al carbono “*ipso*” (C-*i*) por medio de experimentos DEPT.
- v Las asignaciones del carbono “*orto*” y “*meta*” precedentes, han sido reportadas posiblemente al azar o de forma invertida, por consiguiente, usamos el espectro de RMN<sup>13</sup>C acoplado para obtener los acoplamientos C-H. Así, las señales a 129,0 ppm y 128,1 ppm, pueden ser inequívocamente atribuidas a los carbonos “*meta*” (C-*m*) y “*orto*” (C-*o*), respectivamente.
- vi En el espectro de RMN<sup>13</sup>C desacoplado, se observaron diez señales en la región debajo de 70 ppm, lo cual indica que todos los carbonos del ciclo de tropano no son magnéticamente equivalentes. Luego, es posible identificar a la señal del metilo (C-9) a 42,2 ppm y las de los metilenos a 30,8, 31,0 y 64,0 ppm, mediante los experimentos DEPT.
- vii Para completar las asignaciones de RMN<sup>13</sup>C fue necesario el uso de experimentos de correlación homo y heteronuclear. El espectro de correlación heteronuclear de larga distancia permitió determinar a que lado del anillo de tropano pertenecen estos carbonos, teniendo en cuenta su plano de simetría.
- viii El carbono de la función éster R-COOR' y los carbonos “*ipso*” y “*orto*” del anillo fenilo, tienen un acoplamiento de rango largo con el mismo protón, el cual puede corresponder solamente a H-2' (3,72 ppm).
- ix La señal de menor valor (30,8 ppm), de las dos últimas señales de metilenos sin asignación, corresponde a C-2 y la señal a 31,0 ppm a C-4.
- x A partir del espectro de correlación heteronuclear, la señal del carbono a 57,8 ppm es asignado a C-1 y similarmente, la señal a 57,9 ppm se atribuye a C-5.
- xi Finalmente, el espectro de correlación heteronuclear de larga distancia revela que la señal a 56 ppm pertenece a C-7 por sus correlaciones con H-2 y H-5, por razones similares la señal a 56,4 ppm se atribuye a C-6.

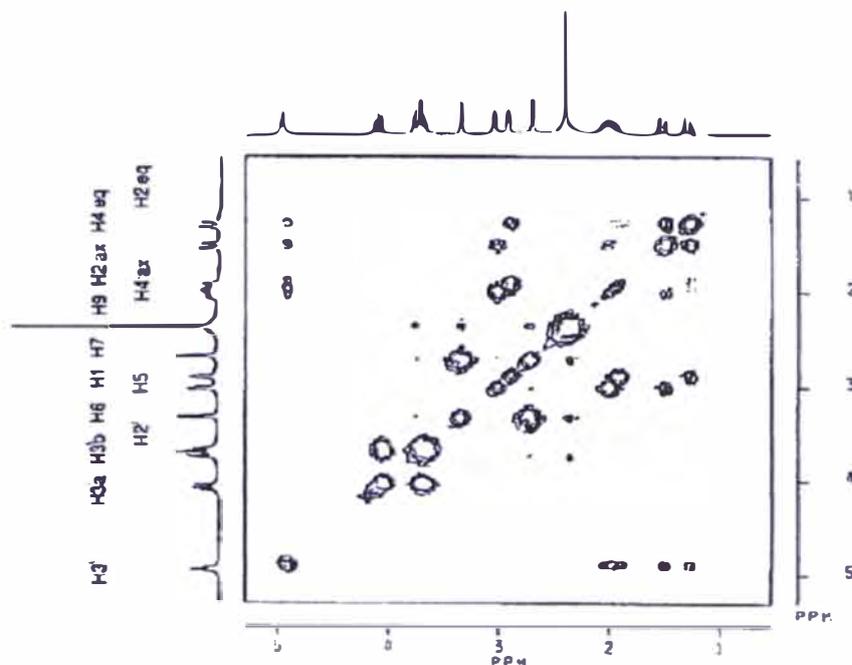
El espectro de RMN<sup>13</sup>C de la escopolamina en CDCl<sub>3</sub>, ha sido presentado por Sarazin *et al.* (1991) como parte del espectro de correlación heteronuclear de larga distancia, y se presenta en la Figura 5, en la cual se incluye la estructura de la escopolamina, mostrando los desplazamientos químicos ( $\delta$ , ppm) de los átomos de carbono.



**Figura 5.** Espectro de RMN<sup>13</sup>C (75 MHz) de la escopolamina en CDCl<sub>3</sub> a) campo alto y b) campo bajo (Sarazin *et al.*, 1991), y estructura de la escopolamina mostrando los desplazamientos químicos ( $\delta$ , ppm) de los átomos de carbono.

#### d) Espectro de Correlación Homonuclear, COSY

El espectro COSY para la escopolamina proporcionado por Sarazin *et al.* (1991) se muestra en la Figura 6.



**Figura 6.** Espectro COSY (300 MHz) de la escopolamina en  $\text{CDCl}_3$  (Sarazin *et al.*, 1991).

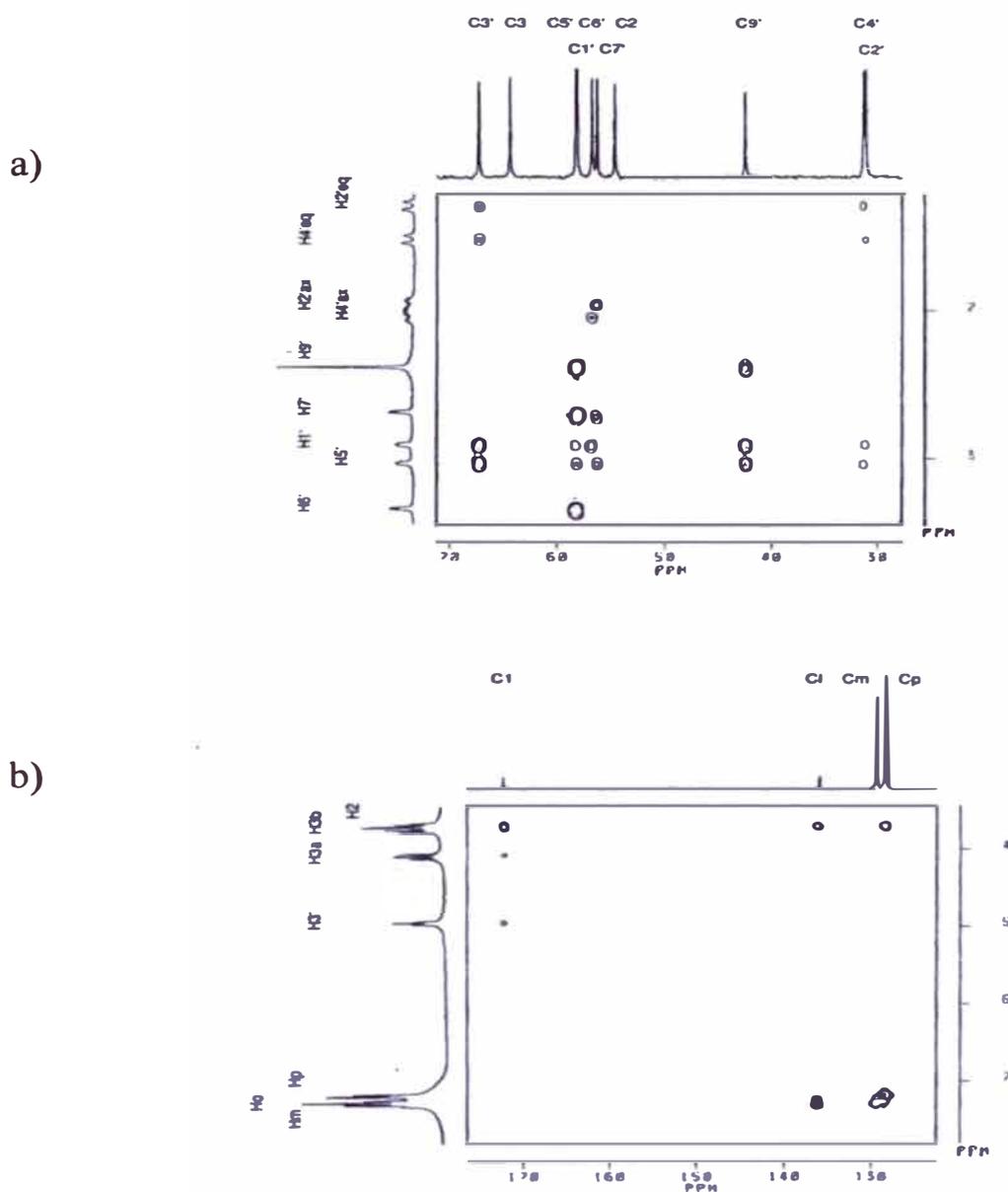
En la Tabla 4 se muestran las correlaciones existentes entre los protones de la escopolamina tomadas del espectro COSY, así como las constantes de acoplamiento halladas.

**Tabla 4.** Correlaciones COSY (300 MHz) y constantes de acoplamiento (Hz) para la escopolamina en  $\text{CDCl}_3$ .

H	$\delta$ (ppm)	Correlaciones COSY y constantes de acoplamiento ( $J_{\text{H-H}}$ , Hz)
H-2eq	1,31	H-5 (1,5), H-3 (0,6), H-4eq (1,4), H-2ax (-15)
H-4eq	1,55	H-5 (1,5), H-3 (0,6), H-2eq (1,4), H-4ax (-15)
H-2ax	1,99	H-3 (5,0), H-5 (3,9)
H-4ax	2,08	H-3 (5,0), H-5 (3,9)
H-7	2,70	H-6 (3,0)
H-1	2,94	H-2ax (3,9), H-2eq (1,5)
H-5	3,08	H-4ax (3,9), H-4eq (1,5)
H-6	3,37	H-7 (3,0)
H-2'	3,72	H-3'a (9,2), H-3'b (5,7)
H-3'b	3,77	H-2' (5,7), H-3'a (-10)
H-3'a	4,30	H-2' (9,2)
H-3	4,98	H-4ax (5,0), H-2eq (0,6), H-4eq (0,6)
H-p	7,18	H-2ax (5,0)

### e) Espectro de Correlación Heteronuclear a larga distancia, COLOC

Sazarin *et al.* (1991) proporcionan el espectro de correlación heteronuclear a larga distancia COLOC para la escopolamina, tal como se muestra en la Figura 7.



**Figura 7.** Espectro COLOC (300 MHz) de la escopolamina en  $\text{CDCl}_3$  a) campo alto y b) campo bajo (Sarazin *et al.*, 1991).

La información de la correlaciones obtenidas del espectro COLOC (Figura 7) y las constantes de acoplamiento ( $^2J_{\text{C,H}}$  y  $^3J_{\text{C,H}}$ ) se muestran en la Tabla 5.

**Tabla 5.** Correlaciones COLOC y constantes de acoplamiento (Hz) para la escopolamina en CDCl<sub>3</sub>.

C	$\delta$ (ppm)	Correlaciones COLOC y constantes de acoplamiento ( <sup>n</sup> J <sub>C-H</sub> , Hz)
C-2	30,8	H-1 (1,2); H-4eq (3,8)
C-4	31,0	H-5 (1,2); H-2eq (3,8)
C-9	42,2	H-1 (3,0); H-5 (3,0)
C-7	56,0	H-2ax (7,0); H-5 (7,0)
C-6	56,4	H-1 (7,0); H-4ax (7,0)
C-1	57,8	H-3 (5,0); H-5 (5,0); H-6 (5,0)
C-5	57,9	H-3 (5,0); H-1 (5,0); H-7(5,0),
C-3'	64,0	H-2' (-5,5); H-9 (5,0)
C-3	66,9	H-4eq (-7,0); H-1 (7,0); H-5 (7,0)
C-p	127,9	H-o (7,0), H-2eq (-7,0)
C-o	128,1	H-p (6,5), H-o (6,5)
C-m	129,0	H-m (7,5), H-2' (6,5)
C-i	135,8	H-3'b (7,0), H-o (2,0)
C-1'	171,8	H-3 (3,5), H-3'a (3,5), H-3'b (7,0), H-2' (7,0), H-m (7,0)

#### f) Espectro Ultravioleta, UV

Mills *et al.* (2006) muestran el espectro ultravioleta (UV) para la escopolamina en ácido sulfúrico 0,2N (en el rango de 200-340 nm), de donde se obtuvo el mínimo de transmitancia (o máximo de absorción) a 257 nm. Ellos utilizaron los espectrómetros de arreglo de diodos HP 8450A (línea -) y HP 8451A (línea --), obteniéndose en ambos casos resultados similares tal como lo muestra la Figura 8.

#### g) Espectro Infrarrojo, IR

Mills *et al.* (2006) muestran el espectro infrarrojo (IR) para la escopolamina en KBr. Este espectro aparecen las bandas de absorción más características del compuesto, tal como se muestra en la Figura 9.

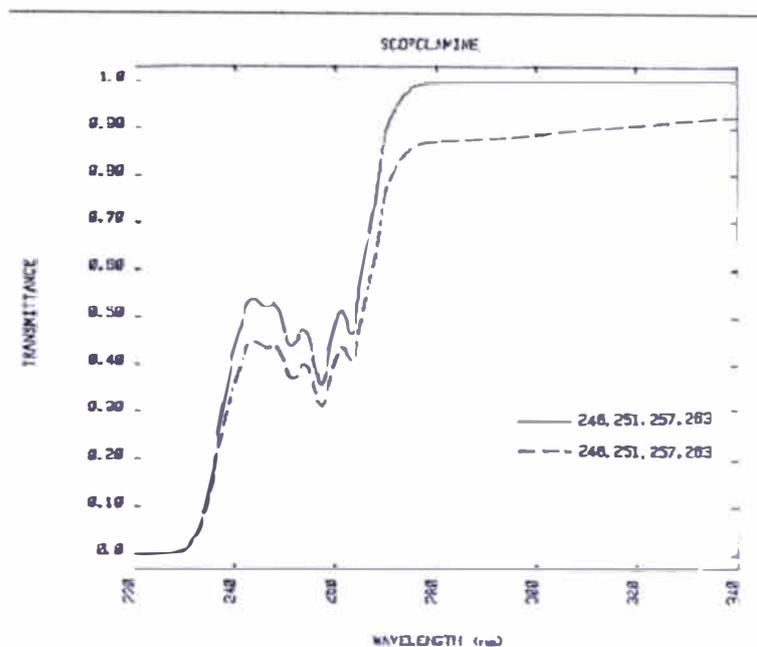


Figura 8. Espectro UV de la escopolamina en  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,2N (Mills *et al.*, 2006).

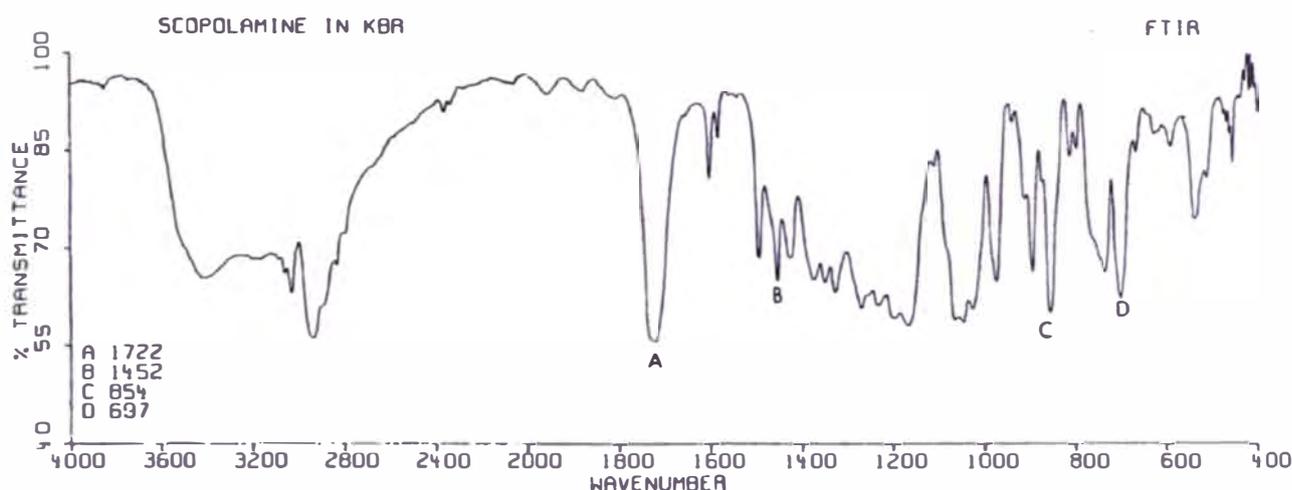


Figura 9. Espectro IR de la escopolamina en KBr (Mills *et al.*, 2006).

## 5. Biosíntesis de la escopolamina

Paralelamente al desarrollo de la química orgánica de síntesis, desde los primeros años del siglo XX, los científicos intentaron explicar la biosíntesis de los constituyentes químicos presentes en las plantas, presentando hipótesis relativas a la secuencia de transformaciones que experimentaba un determinado compuesto de partida (el precursor) hasta transformarse en el

compuesto aislado de la planta (la denominada ruta biosintética), basándose únicamente en las posibles reacciones químicas que podría realizarse a partir del precursor.

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

La biosíntesis de los alcaloides tropánicos y en particular de la escopolamina, considera a la **L-ornitina (i)**, la cual se produce partir de la L-arginina, como el principal precursor de este tipo de alcaloides (Dewick, 2002). Este mecanismo incluye un intermediario muy importante la formación de un catión pirrodilínico (**ii**), tal como se muestra en la Figura 10.

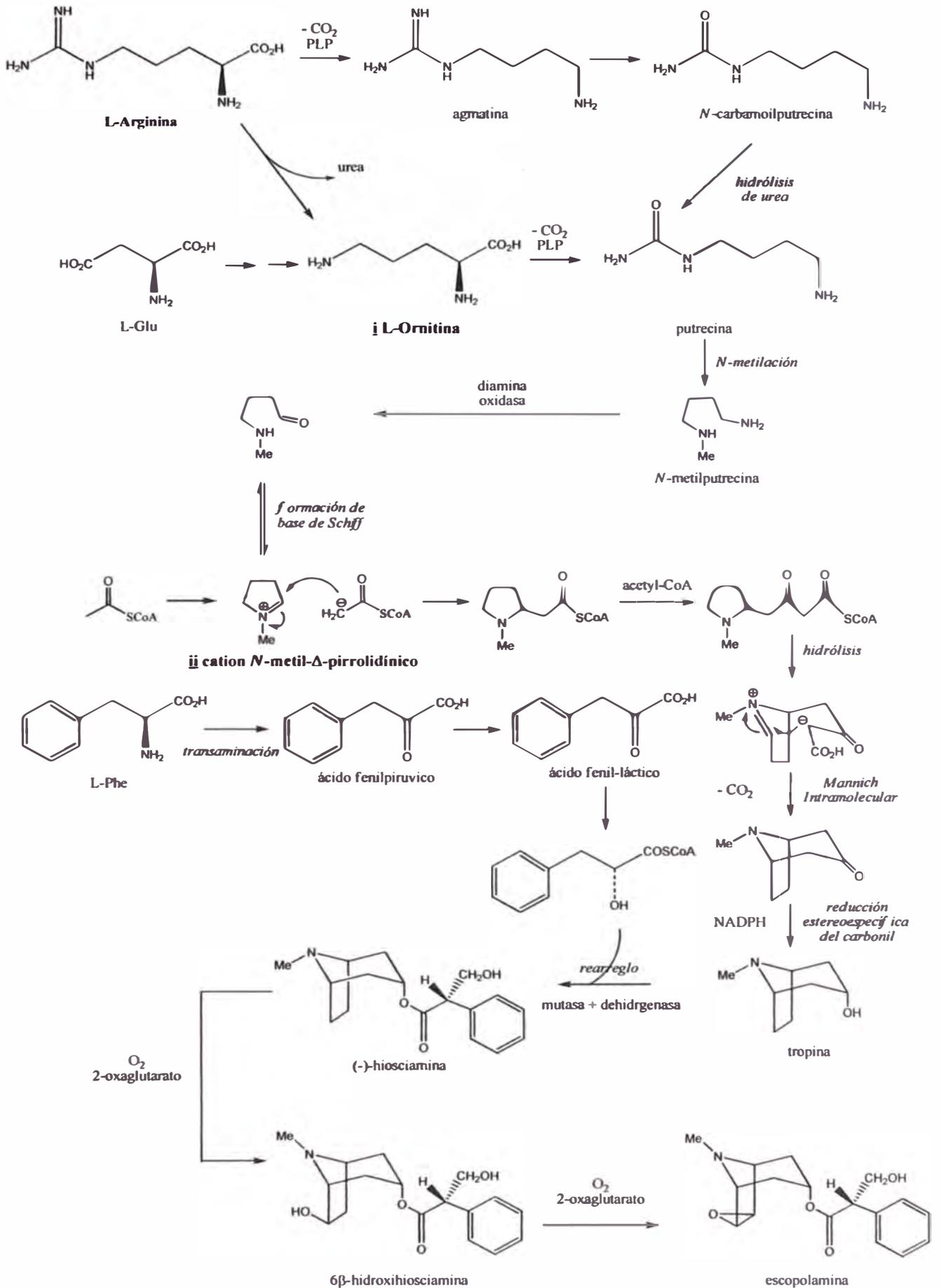


Figura 10. Ruta biosintética de la escopolamina (Dewick, 2002)

## 6. Síntesis de la escopolamina

Los alcaloides de tropano son una clase importante de productos naturales pues algunos de ellos muestran una muy interesante actividad farmacológica, tal como el caso de la escopolamina que actúa como analgésico y antiespasmódico (Vitale *et al.*, 1995); es debido a estas propiedades que durante años los químicos se han interesado en su síntesis.

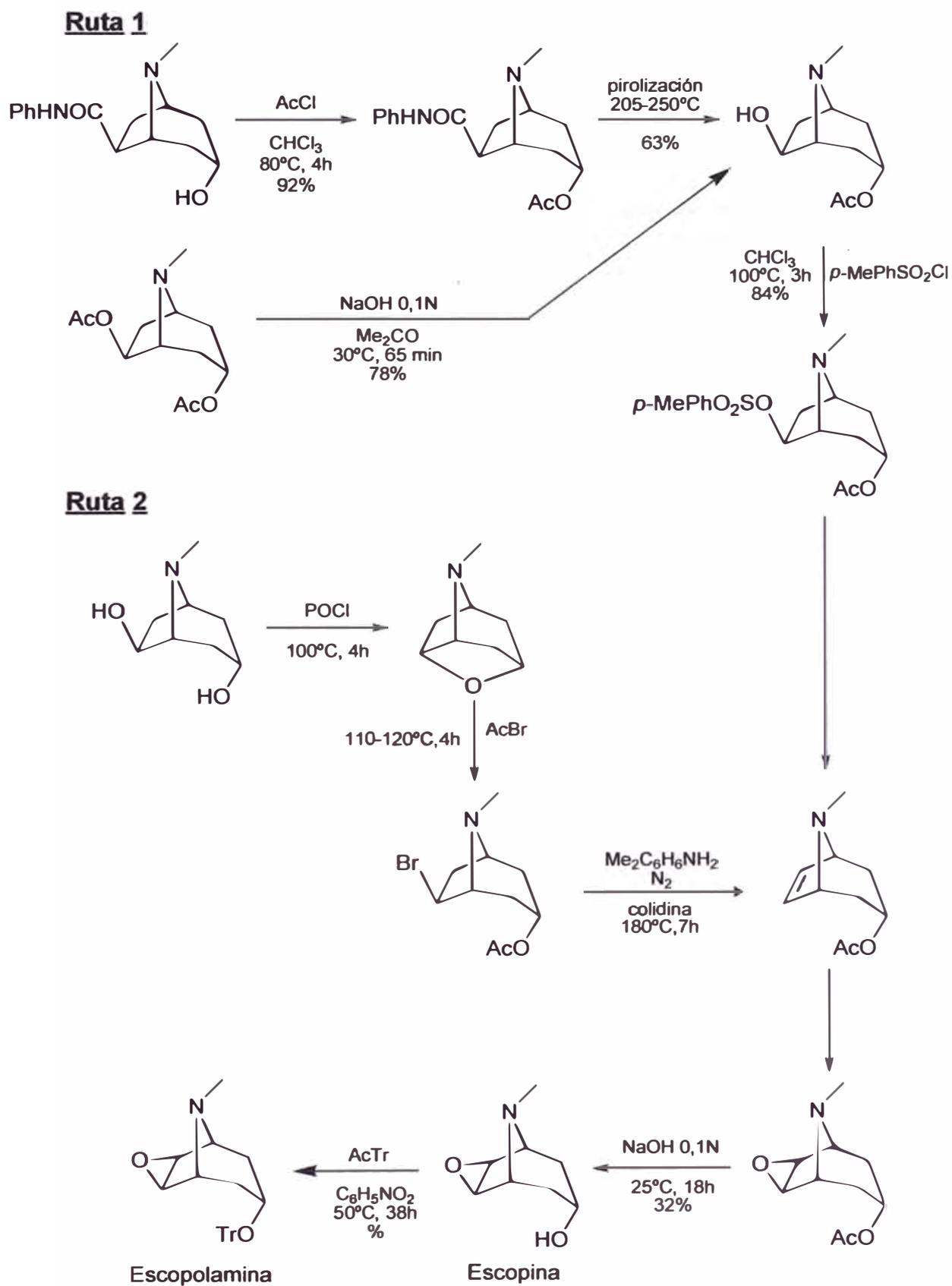
La primera síntesis de la escopolamina fue llevada a cabo por Fodor *et al.* (1959), utilizando técnicas clásicas de síntesis. Ellos mostraron la escopina como el compuesto de base para llegar a la escopolamina, desafortunadamente, la última etapa (epoxidación) para obtener la escopina demora siete días y no muestra una conversión completa.

En 1991, Bäckvall *et al.* utilizaron una novedosa y elegante técnica para la síntesis de escopina. Las reacciones catalizadas por paladio fueron la base de su trabajo con lo que lograron mejorar los rendimientos con respecto al trabajo presentado por Fodor *et al.* (1959).

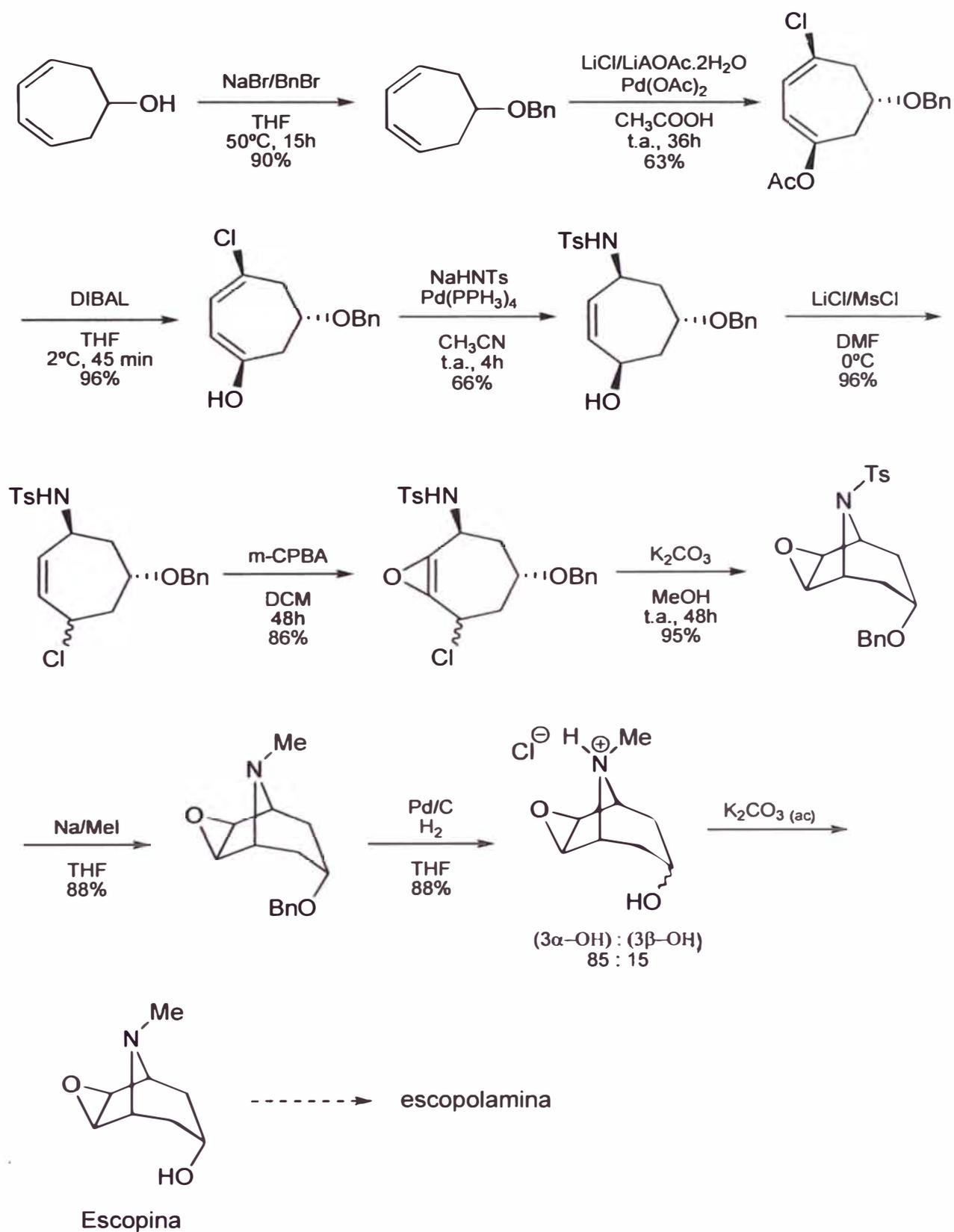
Posteriormente, Malpass *et al.*, (1996) publicaron la segunda síntesis total de la escopina, y tal como lo presentaron sus autores, este trabajo complementó aquel realizado por Bäckvall *et al.* (1991).

A continuación, se describen los trabajos de Fodor *et al.* (1959), Bäckvall *et al.* (1991) y Malpass *et al.* (1996) indicando las etapas y los rendimientos obtenidos en cada una de las reacciones.

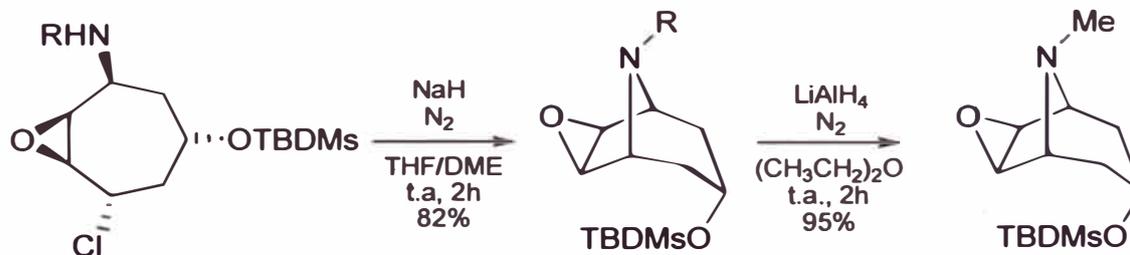
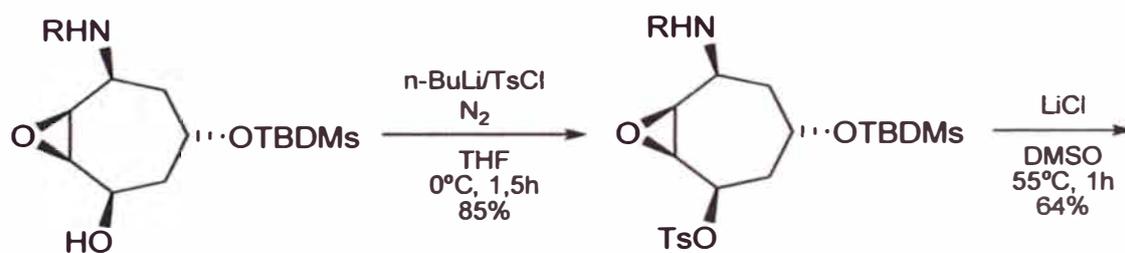
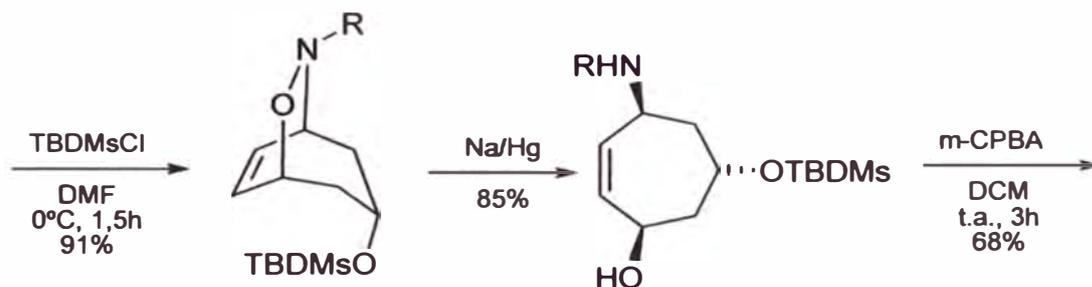
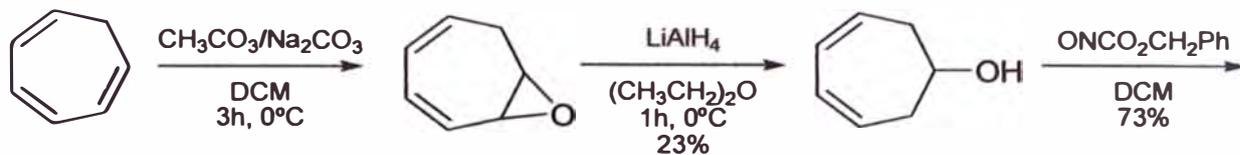
a) Síntesis 1.- Método de Fodor *et al.* (1959)



**b) Síntesis 2.- Método de Blackvall *et al.* (1991)**



c) **Síntesis 3.-** Método de Malpass *et al.* (1996)



<sup>1</sup> TBDMs = *terbutil dimetil silano*

## **B. Estudios químicos generales**

### **1. Análisis cualitativo (marcha fitoquímica)**

Se han revisado tres procedimientos citados en la bibliografía:

- a) Reyna (1999-b), basado en Rondina & Coussio (1969) (Anexo 2).
- b) Lock (1994).
- c) Miranda (2002).

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

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

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

### **2. Test de alcaloides**

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

---

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

### 3. Análisis cuantitativo de alcaloides

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

#### a) Procedimiento de Pelt *et al.* (1967)

*“Comparación de diversos métodos oficiales para la cuantificación de alcaloides de Solanáceas”.*

##### ***Muestra utilizada***

Muestra vegetal seca y pulverizada.

##### ***Extracción sólido-líquido (Obtención del Extracto bruto orgánico, EBO)***

- I La muestra se alcaliniza con una solución de amoníaco concentrado  $\text{NH}_3(\text{ac})$  15 N.
- II Se macera durante doce horas con una de las siguientes mezclas de solventes: etanol-cloroformo (1:2), etanol-éter etílico (1:2) ó éter etílico-cloroformo (3:1).
- III Se extrae con éter etílico usando un soxhlet, verificándose si la extracción es completa mediante el test de Mayer.
- IV Los solventes orgánicos se evaporan, obteniéndose así el EBO.

##### ***Separación líquido-líquido (Obtención del Extracto bruto de alcaloides, EBA)***

- v El EBO se disuelve con una mezcla de éter etílico-cloroformo y los alcaloides se extraen como sales mediante la adición de una solución acuosa de ácido sulfúrico  $\text{H}_2\text{SO}_4(\text{ac})$  0,5 N.

vi La solución ácida se alcaliniza con una solución de amoníaco concentrado  $\text{NH}_3(\text{ac})$  15 N, y los alcaloides se extraen, como bases libres, con una mezcla de éter-cloroformo.

vii Los solventes orgánicos se evaporan, 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 maría hirviendo durante 15 minutos.

***Determinación de los alcaloides***

xi El EBA se disuelve en cloroformo.

xii Se adicionan 50 mL de solución estandarizada de ácido sulfúrico  $\text{H}_2\text{SO}_4(\text{ac})$  0,02 N.

xiii El solvente orgánico se evapora en baño maría.

xiv El extracto se filtra y se lava el filtrado.

xv Se adiciona indicador rojo de metilo.

xvi El exceso de ácido se titula con una solución estandarizada de hidróxido de sodio  $\text{NaOH}(\text{ac})$  0,02 N.

Hoet & Rios (1980) proporcionaron el procedimiento experimental sugerido por Pelt *et al.* (1967).

**b) Procedimiento de la 20<sup>th</sup> ed. U.S. Pharmacopoeia-USP (1980)**

*“Análisis cuantitativo de alcaloides”*

***Muestra utilizada***

Muestra vegetal seca (a baja temperatura) y molida.

***Extracción sólido-líquido (Obtención del Extracto bruto orgánico, EBO)***

Se contemplan tres métodos:

**1.a Maceración.-** Se deja macerar la muestra con el solvente o mezcla de solventes y se alcaliniza con amoníaco, de 12 a 24 horas. El sólido (sin alcaloides) se decanta y se separa del extracto.

**i.b Percolación.-** Se satura una cantidad exactamente pesada de muestra con el solvente o mezcla especificada en un recipiente. Después de un reposo de 5 minutos, se alcaliniza con una solución de amoníaco  $\text{NH}_3(\text{ac})$ , mezclando luego completamente. La mezcla se trasvasa a un percolador cilíndrico empacado con algodón y se deja macerar de 1 a 12 horas. Finalmente, se deja percolar lentamente con el solvente hasta que la muestra quede exenta de alcaloides (test de Valser).

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

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

Se extrae por un tiempo determinado o hasta extracción completa.

***Separación líquido-líquido (Obtención del Extracto bruto de alcaloides, EBA)***

11 Se extraen los alcaloides del solvente orgánico agitando con un ácido, luego se alcaliniza la solución, con un hidróxido alcalino, y se extrae con un solvente inmiscible.

111 Se evapora la solución de alcaloides purificados con un baño de vapor o con corriente de aire, obteniéndose así el EBA.

***Determinación de los alcaloides***

1v Se adiciona 1 mL de alcohol neutro o éter y una cantidad exactamente medida de ácido estandarizado (una y media o dos veces el volumen que se estima será consumido por los alcaloides) y se calienta ligeramente para asegurar la disolución total de los alcaloides.

v Se titula el exceso de ácido con una solución alcalina estandarizada usando como indicador rojo de metilo.

En la presente tesis se ha seguido el método de Pelt *et al.* (1967), con ciertas modificaciones, siendo la principal la observación del punto final de la cuantificación de alcaloides mediante titulación potenciométrica (ver Tabla 6).

**Tabla 6.** Comparación del método de análisis cuantitativo de alcaloides descrito por Pelt *et al.* (1967) y tesis Cabanillas (2008)

NATURALEZA DE LAS OPERACIONES		Pelt <i>et al.</i> (1967)	Tesis Cabanillas (2008)	
EXTRACCIÓN	PESO DE LA MUESTRA	10 g	10 g	
	DESENGRASE	No se realiza		
	ALCALINIZACIÓN	Amoníaco concentrado (8 mL)		
	SOLVENTE	alcohol 95°-cloroformo, 1:2 (30 mL) ó etanol-éter, 1:2 (30 mL) ó éter-cloroformo, 3:1 (150 mL)	Etanol-éter, 1:2 (60 mL.)	
	FORMA DE EXTRACCIÓN	i Maceración: 12 hrs, agitación, o una combinación de ambas.	Maceración 24 h sin agitación.	
		ii Extracción con éter etílico en soxhlet		
	SEPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN EXTRACTORA	Evaporación del solvente		
RESULTADOS	Obtención del extracto bruto orgánico - EBO			
SEPARACIÓN	ELIMINACIÓN DE PIGMENTOS Y OTRAS IMPUREZAS	Disolución del sólido con la mezcla éter-cloroformo, 1:10.		
		Paso de los alcaloides a una solución de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,5 N.		
		Alcalinización de la solución ácida con solución amoníaco y retorno de los alcaloides libres a una mezcla de éter-cloroformo.		
		Evaporación del solvente.		
ELIMINACIÓN DE LAS BASES VOLATILES	15 minutos en baño maría hirviente.			
	Disolución del sólido en cloroformo.			
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Evaporación a sequedad.</li> <li>• 15 minutos en baño maría hirviente.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Evaporación en el rotavapor.</li> <li>• Repetición de la operación 4 veces.</li> </ul>		
CUANTIFICACIÓN	TITULACIÓN ÁCIDO-BASE	Redisolución del residuo en cloroformo.		
		• Adición de 20 mL de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,02 N.	• Adición de 30 mL de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,02 N.	
		Evaporación del cloroformo en el rotavapor.		
		• Filtración y lavado del filtrado.	-	
		Titulación del exceso de ácido con NaOH 0,02 N.		
OBSERVACIÓN DEL PUNTO FINAL	Rojo de metilo	Titulación potenciométrica		

#### 4. Aislamiento de alcaloides

En esta sección se presentan dos procedimientos para el aislamiento de alcaloides.

##### a) Procedimiento de Reyna & Torpoco (1994)

###### ***Muestra utilizada***

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

###### ***Extracción sólido-líquido (Obtención del Extracto bruto orgánico, EBO)***

- i El material vegetal se desengrasa con éter de petróleo (50-90 °C).
- ii Se alcaliniza con una solución acuosa de amoníaco  $\text{NH}_3(\text{ac})$  5%.
- iii La mezcla se extrae a reflujo con etanol.
- iv El solvente se elimina solvente por destilación simple: se obtiene el EBO.

###### ***Separación líquido-líquido (Obtención del Extracto bruto de alcaloides, EBA)***

- v El EBO se disuelve con una solución de ácido sulfúrico  $\text{H}_2\text{SO}_4(\text{ac})$  2,0 N.
- vi La solución acuosa ácida se lava con diclorometano, se descarta la fase orgánica.
- vii El extracto acuoso se alcaliniza con carbonato de sodio y se extraen los alcaloides libres con cloruro de metileno.
- viii El extracto orgánico se concentra por destilación simple: se obtiene el EBA.

###### ***Purificación e Identificación***

- ix El EBA se purifica mediante CPP\* y CC: Obtención del alcaloide N,N-Dimetiltriptamina puro.
- x Identificación: Espectro de Masas y de  $\text{RMN}^1\text{H}$  del alcaloide.

###### ***Resultados***

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

---

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

## b) Procedimiento de Robins *et al.* (1993)

### *Muestra utilizada*

Raíces de *Datura sp.*

### *Extracción sólido-líquido (Obtención del Extracto bruto orgánico, EBO)\**

- 1 Las raíces se maceran con metanol y el extracto orgánico se separa y se concentra al vacío y hasta sequedad, obteniéndose el EBO.

### *Separación líquido-líquido (Obtención del Extracto bruto de alcaloides, EBA)*

- 11 El extracto bruto orgánico se disuelve con 100 mL de ácido clorhídrico HCl<sub>(ac)</sub> 1,0 M.
- 111 La solución ácida se lava con cloruro de metileno (6 x 75mL), descartándose la fase orgánica.
- 1V La fase acuosa ácida se alcaliniza con amoníaco NH<sub>3(ac)</sub> 15 N.
- v La fase acuosa alcalina se extrae con cloroformo (4 x 100 mL).
- v1 Las fases orgánicas se reúnen, se secan con sulfato de sodio anhidro Na<sub>2</sub>SO<sub>4(s)</sub>, se filtran, y se concentran: se obtiene el EBA.

### *Purificación e Identificación*

- v11 Purificación mediante cromatografía en placa preparativa (Kieselgel G, 0,25 mm de espesor; eluente: AcOEt-*i*-PrOH-25%NH<sub>3</sub> (45:35:10)), obteniéndose alcaloides puros.
- viii Identificación: mediante espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno, RMN<sup>1</sup>H.

### *Resultados*

Aislamiento e identificación de los alcaloides escopolamina e hiosciamina.

---

\* Robins *et al.* (1993) no realizan la alcalinización inicial de la muestra vegetal.

### c) Comparación de procedimientos

Los cuatro procedimientos de aislamiento de alcaloides presentados, dos en la sección I.A.2 (págs. 10 y 14) y dos en esta sección, siguen dos grandes etapas para la obtención del Extracto Bruto de Alcaloides, con la diferencia que el método propuesto por Robins *et al.* (1993) no realiza la alcalinización de la muestra vegetal. El procedimiento experimental de Robins *et al.* (1993) ha sido escogido para la realización esta investigación. Este esquema de trabajo se resume a continuación.

#### ***Extracción sólido-líquido (Obtención del Extracto bruto orgánico, EBO)***

##### 1 *Desengrase con solventes orgánicos*

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

##### 11 *Extracción con solventes (maceración, reflujo o soxhlet)*

Esta etapa tiene como objeto la extracción exhaustiva de las bases alcaloidales, verificado por un test de alcaloides (Mayer o Dragendorff).

##### 111 *Eliminación del solvente por destilación a presión reducida y obtención del EBO.*

#### ***Separación líquido-líquido (Obtención del Extracto bruto de alcaloides, EBA)***

##### 1V *Disolución del EBO con ácidos, $H_2SO_{4(ac)}$ o $HCl_{(ac)}$*

Esta etapa tiene como objetivo extraer los alcaloides como sales.

##### V *Lavado con solventes orgánicos (éter de petróleo, cloruro de metileno, y/o cloroformo) y eliminación del solvente orgánico*

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

##### VI *Alcalinización (con $Na_2CO_{3(ac)}$ , $NaOH_{(ac)}$ ó $NH_{3(ac)}$ ) de la fase acuosa*

Mediante la alcalinización de los extractos acuosos ácidos las sales de alcaloides retoman a su forma de bases libres.

vii *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.

viii *Eliminación del solvente por destilación a presión reducida y obtención del EBA.*

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

Actualmente está plenamente establecido que las cinco técnicas espectroscópicas, a saber, la Espectrometría de Masas (EM), la espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno (RMN<sup>1</sup>H) y de Carbono (RMN<sup>13</sup>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 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 espectrómetro 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 ó 1600 Kcal/mol), y uno de los efectos que este bombardeo produce es desprender uno de los electrones de la molécula y producir un ión de carga positiva (con un número impar de electrones, un catión radical) al que se denomina “ión molecular” y se lo representa por  $M^{\dot{+}}$ .

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

Esta técnica de ionización se conoce como “Ionización electrónica” (EI) y ha sido la más 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)\*

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

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

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

---

\* Para una información más detallada revisar “Mass spectrometry basics” de Herbert, C.G., 2003.

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.

En este trabajo de investigación se ha obtenido los espectros de masas, de los dos alcaloides que aislados, utilizando las dos técnicas de ionización mencionadas: En los espectros 2 y 11 (Págs. 80 y 103) se utilizó la técnica de ionización electrónica, y en los espectros 1 y 10 (Págs. 78 y 102) se utilizó la técnica de electrospray.

## **b) Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno, RMN<sup>1</sup>H**

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

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

Los instrumentos conocidos como espectrómetros de RMN permiten medir la absorción de energía en los núcleos de hidrógeno (de un compuesto orgánico). Estos instrumentos están diseñados de manera que irradian al compuesto con energía electromagnética de frecuencia constante (60, 80, 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 absorción es registrada por el instrumento como una señal (un pico o una serie de picos) sobre una hoja de papel calibrado.

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

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

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

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

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

### c) **Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear de Carbono, RMN<sup>13</sup>C**

La RMN<sup>13</sup>C se ha convertido en la técnica principal para dilucidar la estructura de compuestos orgánicos. Mientras la RMN<sup>1</sup>H nos permite

identificar los protones enlazados a la estructura de la molécula, la RMN<sup>13</sup>C nos permite identificar los átomos de carbono; por ello, la RMN<sup>13</sup>C es un complemento perfecto de la RMN<sup>1</sup>H para dilucidar la estructura completa de un compuesto.

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

Una desventaja de la baja abundancia isotópica del <sup>13</sup>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<sup>13</sup>C.

Otra desventaja es que debe utilizarse una cantidad de muestra mayor (aproximadamente 20 mg) que la requerida para obtener un espectro de RMN<sup>1</sup>H (aproximadamente 4 mg).

Al igual que la RMN<sup>1</sup>H, la RMN<sup>13</sup>C proporciona información del entorno electrónico en el que se encuentra cada átomo de carbono en la molécula. Los desplazamientos químicos en la RMN<sup>13</sup>C son más o menos paralelos a los de la RMN<sup>1</sup>H. El compuesto de referencia, tetrametilsilano, (CH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>Si, TMS, absorbe a campo alto, mientras que los átomos de carbono aldehídico y carboxílico lo hacen a campos más bajos.

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

Existen tres clases de espectros de RMN<sup>13</sup>C: en uno se observa los acoplamientos spin-spin <sup>13</sup>C-<sup>1</sup>H (espectro acoplado a <sup>1</sup>H), y en los otros no (espectro desacoplado a <sup>1</sup>H, DEPT).

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

En los **espectros de RMN<sup>13</sup>C acoplado a <sup>1</sup>H** no se suprime el acoplamiento <sup>13</sup>C-<sup>1</sup>H y, en este caso, la señal de cada carbono se desdobra por acción de los protones directamente enlazados a él, aplicándose también la regla “n + 1” donde n es el número de átomos de hidrógeno enlazados al átomo de carbono que se analiza. Así, un carbono cuaternario (enlazado a cuatro grupos alquílicos y sin H enlazado a él) presenta una señal singulete; un carbono terciario (que sólo tiene 1H enlazado) presenta un doblete; un carbono secundario (que tiene 2H) presenta un triplete y un carbono primario (un grupo metilo, CH<sub>3</sub>) presentará un cuadruplete.

Los **espectros de RMN<sup>13</sup>C-DEPT\*** permiten distinguir el tipo de carbono CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>, CH o C<sub>cuaternario</sub>, al que pertenece una determinada señal. En particular, es especialmente útil para superar la confusión de un espectro de RMN<sup>13</sup>C acoplado a <sup>1</sup>H 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, CH<sub>2</sub> y CH<sub>3</sub>; 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 CH<sub>3</sub>, absorciones negativas para CH<sub>2</sub>, y en el que los carbonos cuaternarios carecen de señal.

#### **d) Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear Bidimensional**

El desarrollo espectroscopia de resonancia nuclear bidimensional aparece debido de la imposibilidad de resolver muchos de los picos que aparecen en los espectros de RMN<sup>1</sup>H y RMN<sup>13</sup>C de una molécula.

Existen diversos espectros de resonancia magnética nuclear de dos dimensiones, y entre los más utilizados se encuentran los espectros de RMN bidimensional homonuclear COSY , y de RMN bidimensional heteronuclear HMB y HMQC, los cuales han sido utilizados en esta tesis.

##### **i El espectro <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY**

El espectro <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY<sup>♦</sup> es una alternativa a la elucidación de acoplamientos spin-spin, a través de un diagrama de entorno. En este diagrama, los desplazamientos químicos del espectro RMN<sup>1</sup>H monodimensional de hidrógenos son plotados en ambos ejes de frecuencia. El resultado es un diagrama con simetría cuadrada. La proyección del espectro

\* DEPT: Distortionless Enhancement by Polarization Transfer (transferencia por polarización aumentada y no distorsionada)

♦ COSY: Correlated Spectroscopy (Espectroscopía de Correlación).

RMN<sup>1</sup>H monodimensional aparece a lo largo de la diagonal. Además, existen otras señales fuera de la diagonal, llamadas “correlaciones” o “señales de cruce”, producto del acoplamiento de un protón con algún otro. (ver Espectros 7 y 16, págs. 93 y 115)

Cada interacción entre protones puede ser determinada tomando una señal de la diagonal y unirla con su par del otro lado de la diagonal a través de las dos marcas (correspondientes a cada protón) en la diagonal de manera de formar un cuadrado.

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

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

## ii El espectro HMQC

El espectro HMQC<sup>\*</sup> permite obtener información sobre la conectividad<sup>\*</sup> <sup>13</sup>C-<sup>1</sup>H. En el espectro HMQC el espectro de <sup>1</sup>H es presentado en el eje horizontal y el espectro de <sup>13</sup>C de banda ancha desacoplada está presente en el eje vertical. Las coordenadas de cada señal de correlación dentro del diagrama nos indica la conectividad (de un enlace) existente entre uno o mas núcleos. (ver espectros 8 y 17, págs. 96 y 118).

El término HMQC es un acrónimo de secuencias de pulso usados para correlaciones inversas de desplazamientos químicos carbón-protón. Este experimento es muy sensitivo y detecta correlación de un solo enlace carbón-protón en pocos minutos a diferencia de las 4 horas que necesita un experimento HETCOR.

\* HMQC: Heteronuclear Multiple Quantum Coherence (Correlación heteronuclear de quantum múltiple).

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

### iii El espectro HMBC

El espectro HMBC\* es una modificación del espectro HMQC, y a diferencia de este último permite la determinación de la conectividad  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  a larga distancia (dos y tres enlaces), y de esta manera se puede solucionar completamente los problemas que se presenta con los otros experimentos bidimensionales, ya que brinda una información completa.

El diagrama de espectro es similar al del espectro HMQC, en el eje axial vertical se presenta el espectro RMN $^{13}\text{C}$  y en el eje horizontal el espectro RMN $^1\text{H}$ , y la determinación de las correlaciones se puede efectuar de la misma manera.

Su mayor aplicación incluye las asignaciones de resonancias de núcleos de carbonos y nitrógenos no protonados, y la correlación de rango amplio de carbonos protonados que están separados por carbonos no protonados y otros heteronucleos. (ver espectros 9 y 18, págs. 99 y 121).

### e) Espectroscopía de Infrarrojo, IR

El espectro de infrarrojo de un compuesto es una representación gráfica de la longitud de onda  $\lambda$  ó del número de onda  $\nu^{-1}$ , en el rango de radiación infrarroja (4000 a 200  $\text{cm}^{-1}$ ), 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  $\nu^{-1}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ), y en longitud de onda  $\lambda$  ( $\mu\text{m}$ ); y es importante tener presente –para propósitos de comparación entre espectros– que un espectro lineal en número de onda  $\nu^{-1}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) tiene una apariencia muy diferente de aquel que es lineal en longitud de onda  $\lambda$  ( $\mu\text{m}$ ).

A diferencia de los espectros de masas y de RMN, los espectros IR aún de moléculas muy simples pueden ser extremadamente complejos. Sin embargo,

\* HMBC: Heteronuclear Multiple Bond Coherence (Coherencia Heteronuclear de Enlace Múltiple).

el químico orgánico toma ventaja de esta complejidad cuando compara el espectro de un compuesto desconocido con aquel de una muestra de referencia: la correlación de las bandas de absorción de ambos espectros es una excelente evidencia de identidad. **No es posible que dos compuestos cualesquiera, excepto los enantiómeros ópticos, tengan el mismo espectro de IR.**

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

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

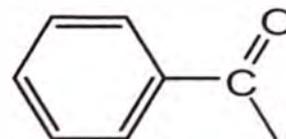
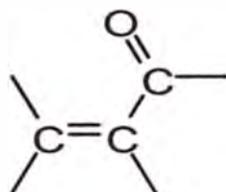
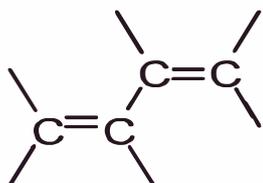
#### f) **Espectroscopía de Ultravioleta, UV**

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

La posición de la absorción UV se especifica como  $\lambda_{\text{máx}}$  (nm), es decir la longitud de onda del punto máximo de la curva de absorción, la cual

corresponde a la longitud de onda de la radiación cuya energía es la requerida para que se produzca una transición electrónica.

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



***PARTE***

***EXPERIMENTAL***

## PRESENTACIÓN

Esta investigación de la “Misha rastrera” (*Datura candida*) se inicia durante el Per. Acad. 2002-1 (Abril-Agosto 2002) con el análisis cualitativo (marcha fitoquímica) de las semillas y tallos de esta planta como tema del curso CQ 561 - Proyecto de Tesis I, estudio que continuó en el siguiente periodo académico 2002-2 (Setiembre-Diciembre 2002) con el análisis cuantitativo de alcaloides presentes en la hojas de *D. candida*, como tema del curso CQ 562 - Proyecto de Tesis II.

Posteriormente, el tema de estudio de esta planta fue inscrito como tema de Tesis de Licenciatura en Ciencias-Mención Química, con número de Registro 209 de fecha 04 de febrero del 2003 con el título “Estudio químico de las hojas de la misha rastrera flor blanca *Brugmansia candida*”.

Las hojas de “Misha rastrera” estudiadas en esta tesis fueron colectadas en el mes de agosto de 2001 en la ciudad de Huancabamba (Dpto. Piura, 2000 m.s.n.m).

La primera parte del trabajo experimental, desde el secado de la planta hasta la obtención del Extracto Bruto de alcaloides, se realizaron en el ambiente de Investigación de Química de Productos Naturales (C3-175), en el periodo comprendido entre enero del 2003 y enero del 2004, demandando un trabajo aproximado de 6 meses de trabajo efectivo. Durante este período, no tuvimos éxito en lograr la purificación, mediante cromatografía en columna, de los extractos de alcaloides.

La segunda parte del trabajo experimental, que consistió en la purificación de los Extractos Brutos de alcaloides mediante cromatografía en columna seguida de cromatografía en capa preparativa, con el aislamiento de los alcaloides escopolamina y norescopolamina, y la identificación de estos alcaloides mediante métodos espectroscópicos, fue realizada por el autor de esta tesis en el Ambiente N° 425 perteneciente al Equipo 39 del Institut de Chimie des

Substances Naturelles (ICSN), dirigido por el Dr. Christian Marazano, ubicado en Gif sur Yvette (Francia), entre el 07 de agosto y el 13 de setiembre del 2006, luego de los estudios de Master 2 que realicé en la Université de Paris - XI y en el ICSN en el período Setiembre 2005-Julio 2006.

La ejecución de esta tesis involucró la realización de cada una de las etapas que comprende la investigación fitoquímica, tal como se describe a continuación.

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

### **Trabajo Preliminar**

- A. Selección y colección 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
  - b) Separación líquido-líquido: Extracto Bruto de Alcaloides
  - c) Purificación: Aislamiento de cada alcaloide puro  
(Cromatografía/recristalización/preparación de derivados)
- H. Identificación del compuesto puro
  - a) Proced. Clásicos: punto de fusión, composición centesimal, CCF
  - b) Proced. Espectroscópicos: Masas, RMN<sup>1</sup>H, RMN<sup>13</sup>C

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

## **TRABAJO PRELIMINAR**

### **A. Selección y colección de la planta**

Se seleccionó el estudio de las hojas de *Datura candida* por dos motivos. En primer lugar, por haber logrado coleccionar suficiente cantidad de material vegetal para realizar el estudio químico y, en segundo lugar, por tratarse de una especie del mismo género que el Toe o “Misha Toro” (*Datura sanguinea*), la cual estaba siendo investigada en nuestro laboratorio y que ha sido tema de dos tesis de licenciatura correspondientes al estudio químico de sus semillas (Condór, 2004) y hojas (Muedas, 2006).

Las hojas de “Misha rastrera” (*D. candida*) se colectaron en la provincia de Huancabamba (Dpto. Piura) en tres lugares diferentes: en el Jardín Botánico del Instituto de Medicina Tradicional INMETRA (ubicado en las afueras de la ciudad), en el jardín de una casa en el barrio Chalaco de la ciudad, y en el borde de la carretera de Huancabamba al distrito de Sondor, cerca al puente Shantaco, el día Jueves 2 de julio del 2001, durante el viaje que realizaron los integrantes del Grupo de Investigación de Química de Productos Naturales, bajo la dirección del Dr. Víctor Reyna Pinedo, colectándose 8,8 Kg de hojas frescas.

### **B. Estudio etnobotánico y etnomedicinal**

El empleo de plantas con constituyentes psicoactivos en la medicina tradicional del Perú ha sido parte de un legado cultural de siglos. La utilización de determinada planta está condicionada a la distribución de las mismas a lo largo del territorio nacional, o de la tarea para la cual va a ser utilizada. Entre estas plantas podemos mencionar a la coca (*Erithroxylum sp.*) de amplia distribución nacional; el “San Pedro” (*Echinopsis pachanoi*), utilizadas por los curanderos del norte o el binomio “ayahuasca”

(*Banisteriopsis caapi*) y "chacrana" (*Psychotria viridis*), utilizadas en la preparación de la bebida "ayahuasca" en toda la amazonía.

Las plantas del género *Datura* también conocidas por nombres nativos como borrachero, campanilla, maicoa, floripondia, huanto, toé o tanga, son de amplia distribución a lo largo de toda la cordillera de los andes.

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

Schultes (1976) señala que en varias comunidades nativas del Perú utilizan las *Daturas* para comunicarse con sus ancestros. Asimismo, señala que en Matucana la gente indica que el uso de estas plantas ayuda a revelar los tesoros escondidos en las huacas, de allí su apelativo de "huaca" o "huacachaca" (planta de la tumba).

En el norte peruano al género *Datura* se le conoce como "mishas". DeFeo (2003) señala que *D. candida* (Pers.), a la que denomina "misha curandera", es utilizada como analgésico contra dolores traumáticos o reumáticos. Las hojas frescas se colocan en la parte de dolor del cuerpo por 8 días, cambiándolos tan a menudo para mantener la parte afectada húmeda. El tinte es utilizado para eliminar dolores de cabeza por la absorción a través de la mucosa nasal ("shingada"), y simultánea frotación de la cabeza y los miembros con la misma preparación; estas administraciones se repiten tres veces al día por 3 días consecutivos.

De igual manera, Bussmann & Sharon (2006) reportan el uso de la *D. candida* en forma oral y tópica en la cura de diarreas, úlceras, quistes y la protección contra el mal de aire, mal de ojo y de la envidia.

En el Anexo 4 se describen las características botánicas de esta planta.

### C. Determinación (identificación) botánica

La “Misha rastrera” (Foto 1), fué identificada como *Datura candida* (Pers.) Saff., por la M.Sc. Blga. Joaquina Albán Castillo\* (ver constancia en Anexo 5).



Foto 1. Hojas y flores de la Misha rastrera (*D. candida*), Huancabamba, Dpto. Piura, agosto 2002 (Foto V. Reyna)

## **TRABAJO EXPERIMENTAL EN EL LABORATORIO**

### **Secado Molienda de la planta**

Las hojas de “Misha rastrera” se secaron en una estufa “Labor” a 40 °C, durante cinco días. La muestra seca se pulverizó a grano fino en un molino doméstico.

---

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

## D. Análisis Cualitativo (Marcha Fitoquímica)

1. **Muestra:** 6 g de hojas secas y pulverizadas de “Misha rastrea” (*D. candida*). Se realizaron tres análisis, con resultados similares:
  - a) Primer análisis: 22-24.Junio.2006 (muestra colectada cerca del puente Shantaco, Huancabamba-Piura, 02.Julio.2001).
  - b) Segundo análisis: 23-26.Junio.2006 (muestra colectada en casa ubicada en el barrio Chalaco, Huancabamba-Piura, 02.Julio.2001).
  - c) Tercer análisis: 12-13.Nov.2006 (muestra colectada en el Jardín Botánico del INMETRA, Huancabamba-Piura, 02.Julio.2001).
2. **Procedimiento:** Reyna (1999-b), de acuerdo a Rondina & Coussio (1969) (ver Anexo 2).

### 3. Resultados

Las tres muestras analizadas dieron resultados similares, los cuales se detallan en el Anexo 6 y se resumen a continuación:

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

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

- b) **No contiene:** Flavonoides, quinonas, antranas, antranoles y leucoantocianidinas.

## E. Análisis Cuantitativo de Alcaloides

1. **Muestra:** 10 g de hojas de “Misha rastrea” (*D. candida*). Se efectuó el estudio de una muestra de esta planta a la cual se le realizó dos análisis de determinación cuantitativa:

a) Muestra colectada en casa ubicada en el Barrio Chalaco, Huancabamba-Piura, 02.Jul.2001.

I Primer análisis 25.Feb.-12.Mar.2004.

II Segundo análisis : 25.Feb.-12.Mar.2004.

## 2. Procedimiento (descripción del primer análisis)

*Referencia.- Hoet & Rios (1980).*

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

#### *Alcalinización con amoníaco concentrado $NH_{3(ac)}$ 15 N*

I Se colocaron diez gramos (10g) de la muestra seca (sin desengrasar) en un cartucho de tocuyo y se humedeció con 8 mL de amoníaco concentrado  $NH_{3(ac)}$  15 N y se le dejó en reposo durante 1 hora.

#### *Extracción por solventes*

II A la muestra alcalinizada (que se encontraba dentro del cartucho y colocada en el equipo soxhlet) se le adicionó 60 mL de una mezcla etanol/éter (20:40) y se dejó macerar, a temperatura ambiente, durante una noche.

III Seguidamente se adicionó a la mezcla anterior una cantidad adicional de la misma mezcla de solventes y se extrajo en soxhlet (en baño maría) durante 14 horas.

IV La mezcla orgánica se concentró en el rotavapor\* (35°C, 200- 300 mbar), sin llegar a sequedad, obteniéndose así el Extracto Bruto Orgánico, de color verde oscuro (que no se pesó debido a la continuación del proceso).

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

#### *Extracción del Extracto Bruto Orgánico con solución ácida*

I El extracto bruto orgánico se disolvió con 50 mL de éter-cloroformo (1:1), se colocó en un embudo de separación de 250 mL y se extrajo con una solución

\* Rotavapor Buchi R-118.

de ácido sulfúrico  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (ac) 0,5 N (5x50mL) hasta que la solución orgánica dió prueba negativa de alcaloides mediante el test de Mayer. Se eliminó la fase orgánica.

#### ***Alcalinización del extracto acuoso con disolución de amoníaco***

- ii Los extractos ácidos combinados (aprox. 250 mL) fueron llevados a pH 11 con amoníaco diluido.

#### ***Extracción de alcaloides con solventes orgánicos***

- iii El extracto acuoso básico se extrajo con una mezcla éter-cloroformo (1:1) (5 x 50mL) hasta que la solución acuosa dio test de Mayer negativo. Se eliminó la fase acuosa.
- iv Los extractos orgánicos se secaron con sulfato de sodio anhidro y, previa filtración, se transvasaron a un balón de 500 mL y se concentraron en el rotavapor (35 °C, 200-300 mbar) hasta sequedad, obteniéndose el Extracto Bruto de alcaloides.

#### **c) Eliminación de las bases volátiles**

- i El sólido obtenido se disolvió con una pequeña cantidad de cloroformo y se colocó durante 15 minutos en baño maría. Esta solución se llevó a concentrar al rotavapor, para eliminar el solvente. Se repitió esta operación un total de 5 veces. Este proceso tuvo por objeto la eliminación total de la base amoníaco  $\text{NH}_3$  (g).
- ii Finalmente, se llevó a sequedad en el rotavapor, obteniéndose así el Extracto Bruto de Alcaloides (EBA = 29,7 mg) como una resina de color pardo.

#### **d) Titulación. Determinación potenciométrica**

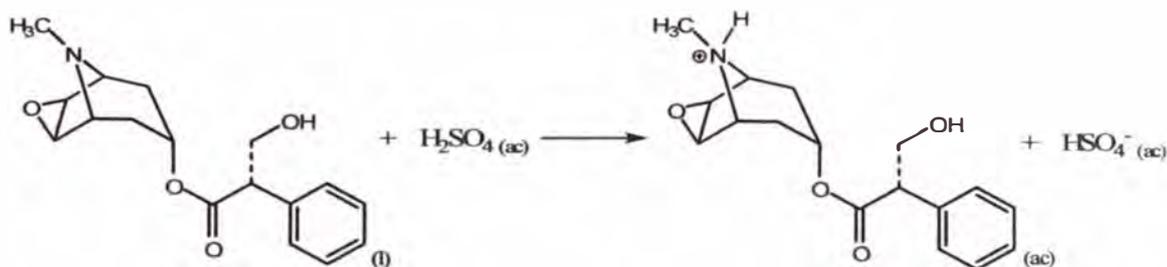
- i El extracto bruto de alcaloides, contenido en un balón de 250 mL, se disolvió con 20 mL de cloroformo. Luego, se agregó 30 mL de solución estandarizada de ácido sulfúrico  $\text{H}_2\text{SO}_4$ (ac) 0,0238 N, con una pipeta graduada. El solvente orgánico se eliminó en el rotavapor quedando una solución acuosa ácida que

contiene alcaloides en forma de sales, la cual se trasvasó a un erlenmeyer de 150 mL.

- 11 Se tituló la solución ácida con una solución estandarizada de hidróxido de sodio  $\text{NaOH}_{(\text{ac})}$  0,0203N, utilizando un potenciómetro\* con electrodo de vidrio para determinar el punto de equivalencia. El análisis de la curva de titulación (ver Anexo 7) muestra que el punto de equivalencia corresponde a la adición de 27,9 mL de base,  $\text{NaOH}_{(\text{ac})}$

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

- 1 Al agregar un exceso de solución de ácido sulfúrico  $\text{H}_2\text{SO}_{4(\text{ac})}$  (30 mL, 0,0238N) al Extracto Bruto de Alcaloides, ocurre la reacción:



y se tiene que:

$$\text{N}^{\circ}\text{meq} (\text{H}_2\text{SO}_4) \text{ en exceso} = \text{N}^{\circ}\text{meq} (\text{H}_2\text{SO}_4) \text{ total} - \text{N}^{\circ}\text{meq} \text{ alcaloide} \quad (\alpha)$$

donde:

$$\text{N}^{\circ} \text{meq} (\text{H}_2\text{SO}_4) \text{ total} = \text{N} \times \text{V} = 0,0238 \times 30 = \mathbf{0,714 \text{ meq}} \quad (\beta)$$

- 11 El ácido sulfúrico  $\text{H}_2\text{SO}_{4(\text{ac})}$  en exceso, que queda sin reaccionar con el alcaloide, se titula con 27,9 mL de solución de hidróxido de sodio  $\text{NaOH}_{(\text{ac})}$  0,0203 N, según la ecuación:



y en el punto de equivalencia se cumple que:

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

$$N^{\circ} \text{ meq. (H}_2\text{SO}_4\text{) en exceso} = N^{\circ} \text{ meq. (NaOH)} \quad (\gamma)$$

iii La cantidad de hidróxido de sodio (meq) se determina por la relación:

$$\begin{aligned} N^{\circ} \text{ meq (NaOH)} &= N_{\text{NaOH}} \times V_{\text{NaOH}} \\ &= 0,0203 \text{ N} \times 27,90 \text{ mL} \end{aligned}$$

$$N^{\circ} \text{ meq (NaOH)} = 0,566 \text{ meq}$$

iv La cantidad de meq de ácido sobrante se determina por la relación ( $\gamma$ ):

$$N^{\circ} \text{ de meq (H}_2\text{SO}_4\text{) exceso} = \mathbf{0,566 \text{ meq}}$$

v La cantidad (en meq) de alcaloides presentes se determina reemplazando las cantidades ( $\beta$ ) y ( $\epsilon$ ) en la relación ( $\alpha$ ):

$$\begin{aligned} N^{\circ} \text{ meq alcaloide} &= N^{\circ} \text{ meq (H}_2\text{SO}_4\text{) total} - N^{\circ} \text{ meq (H}_2\text{SO}_4\text{) (exceso)} \\ &= 0,714 \text{ meq} - 0,566 \text{ meq} \\ &= \mathbf{0,148 \text{ meq}} \end{aligned}$$

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

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

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

Luego:

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

$$m = 0,148 \times 303,36$$

$$\mathbf{m = 44,9 \text{ mg de escopolamina (en 10 g de muestra seca)}}$$

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

$$\begin{array}{l} 10 \text{ g} \quad \longrightarrow \quad 100\% \\ 44,9 \times 10^{-3} \text{ g} \quad \longrightarrow \quad \% \text{ de alcaloides (como escopolamina)} \end{array}$$

$$\% \text{ de alcaloides (como escopolamina)} = \frac{44,9 \times 10^{-3} \times 100}{10} = 0,45\%$$

En el segundo análisis se obtuvo en mismo resultado (0,45%).

*Nota.- Este resultado se encuentra comprendido en el rango de porcentaje de alcaloides reportado en la literatura (pág. 8).*

## **F. Aislamiento de compuestos puros**

Como se describió en la metodología de investigación (pág. 56) el aislamiento de compuestos puros comprende tres etapas:

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

Las muestras de la Misha rastrera (*D. candida*) utilizadas, secas y pulverizadas, fueron colectadas en la ciudad de Huancabamba.

Las dos primeras etapas, hasta la obtención del EBA, se realizaron en 5 oportunidades (ver Tabla 7, pág. 68).

La tercera etapa, la purificación del EBA mediante técnicas cromatográficas, se realizó en el Institut de Chimie des Substances Naturelles, en Gif-sur-Ivette (Francia), entre los meses de agosto y setiembre del 2006, habiendo logrado la purificación de los alcaloides escopolamina y norescopolamina. Un ensayo de purificación mediante cromatografía en columna, realizado en nuestro laboratorio de la UNI, no proporcionó resultados favorables.

Ahora se procederá a describir el procedimiento realizado en cada una de estas etapas, hasta lograr la obtención de alcaloides puros.

## **1. Extracción sólido-líquido: *Obtención del Extracto bruto orgánico*** (descripción del primer ensayo)

### **a) Desengrase con n-hexano**

- 1 En un frasco erlenmeyer de 1 L se colocó 150 g de la muestra y se adicionó 300 mL de n-hexano. La mezcla se puso en agitación\*, a temperatura ambiente, durante 10 horas, y luego se dejó en reposo hasta el día siguiente.
- 11 El líquido sobrenadante de color verde oscuro fue separado por decantación y luego con ayuda de una pipeta volumétrica de 50 mL. Al sólido restante se adicionó una nueva porción de 300 mL de n-hexano y se colocó bajo agitación. Este procedimiento se realizó 23 veces.
- 111 Finalmente, el sólido húmedo se transfirió a una bandeja de 17 cm x 26 cm, cubierta con papel de aluminio y se dejó secar al aire a la temperatura del ambiente.

### **b) Extracción con solventes**

- 1 La muestra seca se colocó nuevamente en un frasco erlenmeyer de 1L y se le adicionó 300 mL de metanol. La mezcla fue sometida a dos horas de agitación\*, y se dejó en reposo durante toda la noche.
- 11 Al igual que en la etapa anterior el líquido sobrenadante de color verde oscuro fue separado con una pipeta volumétrica de 50 mL y la muestra fue macerada con 300 mL de metanol. Esta operación se repitió una tercera vez, verificándose con el test de Mayer la extracción total de alcaloides.

### **c) Eliminación del solvente**

Los extractos metanólicos, se juntaron y luego se concentraron en el rotavapor (30-40 °C, 200 mbar), hasta sequedad, obteniéndose el Extracto Bruto Orgánico, de color verde oscuro, que pesó 12,6g.

---

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

## **2. Separación líquido-líquido: Obtención del Extracto bruto de alcaloides (descripción del primer ensayo)**

### **a) Disolución del extracto bruto orgánico con solución ácida**

- I El extracto bruto orgánico se disolvió en 20 mL de cloroformo y se colocó en un embudo de separación de 250 mL. Esta solución se extrajo con 100 mL de ácido clorhídrico  $\text{HCl}_{(\text{ac})}$  1N.
- II Esta operación se repitió tres veces. La solución orgánica remanente dio prueba negativa de alcaloides (test de Mayer) y se descartó.
- III Los extractos acuosos ácidos, de color marrón claro, se reunieron (volumen total = 300 mL) y se colocaron en un embudo de separación de 1 L.

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

La disolución acuosa ácida se alcalinizó con 110 mL de  $\text{NH}_{3(\text{ac})}$  15 N hasta  $\text{pH} = 11$ . Se observó el oscurecimiento de la disolución.

### **c) Extracción de alcaloides con solventes orgánicos**

- I La fase acuosa básica (en el embudo de separación) se extrajo con 100 mL cloroformo (x3) y 100 mL de diclorometano (x2). La fase acuosa quedó exenta de alcaloides (test de Mayer negativo).
- II Los extractos orgánicos se colocaron en un balón de 2 L y se concentraron en el rotavapor (35-40 °C, 200 mbar) hasta sequedad.
- III Sobre el residuo de alcaloides se agregó 100 mL de cloroformo y se llevó a sequedad en el rotavapor (35-40°C, 200 mbar), repitiéndose esta operación un total de cinco veces. Esto tiene por objeto eliminar las bases volátiles (amoníaco,  $\text{NH}_{3(\text{g})}$ ) que estuvieran disueltas en el extracto.
- IV Finalmente, se obtuvo 153,3 mg del Extracto Bruto de Alcaloides (EBA.1), como un gel, de color marrón claro. El análisis por CCF nos indica que el extracto contiene escopolamina.

Siguiendo este mismo procedimiento se lograron aislar en el laboratorio cinco extractos brutos de alcaloides, cuyas cantidades se muestran en la Tabla 7.

**Tabla 7.** Obtención de los Extractos brutos de alcaloides – EBA.

Código de la muestra	Material vegetal		Masa del EBA (mg)
	Masa (g)	Procedencia (fecha de colección)	
EBA.1	150	Barrio chalaco (02.Ago.01)	153
EBA.2			119
EBA.3			135
EBA.4	600	Puente Shantaco (02.Ago.01)	1964
EBA.5	300	Jardín Botánico (02.Ago.01)	827

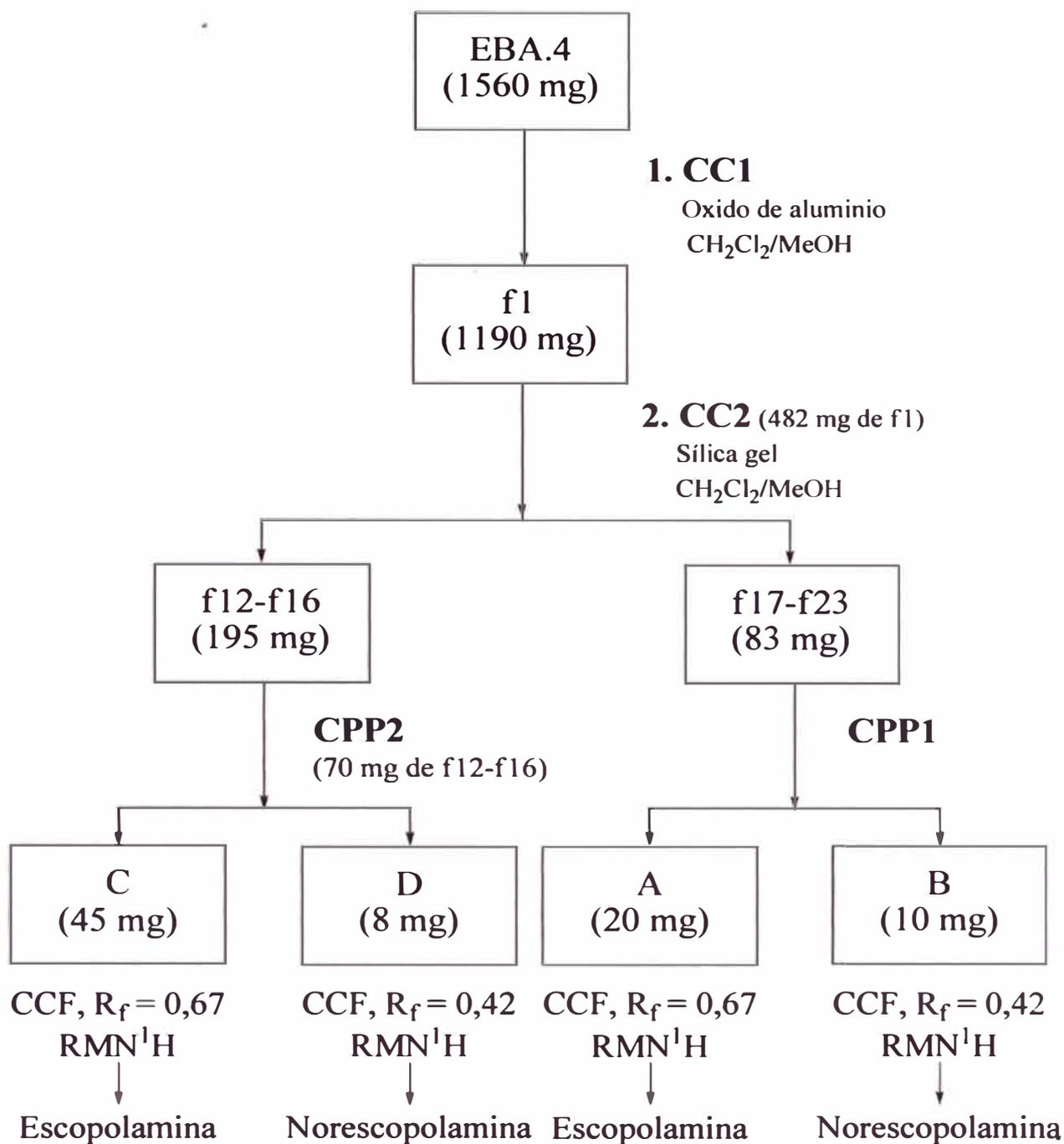
### 3. Purificación por cromatografía

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

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

Los procedimientos de CCF y CC se realizaron tanto en los laboratorios de la UNI en Lima, como en el Institut de Chimie des Substances Naturelles - ICSN de Gif-Sur-Ivette (Francia); mientras que todas las CPP se realizaron en el ICSN (Francia).

La purificación del EBA y la obtención de los dos alcaloides, la escopolamina y la norescopolamina, se logró durante la estadía en el ICSN (Francia) mediante tres purificaciones consecutivas, las dos primeras mediante CC y la purificación final por CPP, tal como se describe en las Sec.5 y Sec.6, y se resume esquemáticamente a continuación:



**Figura 11.** Esquema de purificación por cromatografía del EBA.4

#### 4. Análisis preliminar por cromatografía en capa fina-CCF

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

**a) Condiciones de trabajo**

- 1 Muestra: Extracto Bruto de Alcaloide (EBA.4), obtenida en la Sec. F precedente (pág. 65).
- 11 Referencia: Patron de escopolamina ( $R_f = 0,66$ ) y de atropina ( $R_f = 0,1$ ).
- 111 Placa: Placa de Sílica. Kieselgel 60 F<sub>254</sub>, 0,2 mm (Riedel de Haën, DC).
- 1V Eluente: Cloroformo-metanol (1:1).
- v Revelador: Reactivo de Dragendorff modificado por Munier.

**b) Procedimiento:** La aplicación de las muestras, el desarrollo del cromatograma y el revelado de las placas son procedimientos descritos en los textos y guías de prácticas de química orgánica.

**c) Observaciones:** El resultado de este trabajo preliminar nos indica la presencia de dos alcaloides ( $R_f = 0,66$  y  $R_f = 0,2$ ), que tienen un polaridad marcadamente diferenciada, lo cual ayudó para su separación mediante columna cromatográfica.

**5. Cromatografía en columna-CC**

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

Debido a la complejidad de la mezcla de alcaloides y con la finalidad de obtener compuestos completamente puros se desarrollaron dos columnas cromatográficas, la primera utilizando como adsorbente Oxido de Aluminio y la segunda utilizando silica gel. El procedimiento llevado a cabo para ambas columnas se describe a continuación.

**5.1. Cromatografía en columna 1 - CC1****a) Condiciones de trabajo**

- 1 Muestra: EBA.4 (1560 mg), ver sección. F.2.
- 11 Características de la Columna:  $\varnothing = 2,6$  cm; altura del adsorbente: 13,5 cm.

- 111** Adsorbente: 65 g de Oxido de Aluminio 90 estandarizado – Merck. Grado de actividad II-III.
- 1v** Eluente: Mezclas de diclorometano y metanol, de polaridad creciente.
- b) Procedimiento** (El esquema del dispositivo experimental se ilustra en el Anexo 8)
- 1** En la base de la columna se colocó una pequeña cantidad de algodón con la finalidad de impedir la salida del absorbente. Seguidamente, se agregó diclorometano hasta tres cuartos de altura de la columna para finalmente agregar de manera homogénea la alúmina hasta una altura de 20 cm.
- 11** Luego, se aplicó aire comprimido a través de la columna produciéndose la disminución en la altura de la alúmina producto de la compresión. Se retiró el sistema de presión, se agregó más eluente a la columna y se volvió aplicar aire comprimido. La adición de solvente continuó hasta que no se observó cambio en la altura del adsorbente. Además, se verificó que el flujo de salida del solvente fuera de aproximadamente 85 gotas/minuto y durante toda la separación se tuvo cuidado de que el nivel del eluente no descendiera por debajo de la parte superior del empaque de absorbente.
- 111** El extracto bruto de alcaloides – EBA.4 se disolvió en la mínima cantidad posible de cloroformo\* y la disolución se colocó con ayuda de una pipeta sobre la parte superior del empaque de adsorbente. Se hizo eluir el extracto aproximadamente 1 cm. Finalmente, se colocó una capa de arena en la parte superior del empaque.
- 1v** Se adicionó cuidadosamente diclorometano y se eluyó la columna hasta recibir una fracción de 100 mL de eluente en un balón de 250 mL; a esta fracción se le denominó fracción 1, fl.
- v** El diclorometano puro se cambió por mezclas de diclorometano y metanol de polaridad creciente.

\* La muestra se solubilizó en cloroformo debido a que presentaba mejor solubilidad en este solvente.

**vi** Todas las soluciones presentaban una coloración amarilla de diferentes intensidades, y fueron llevadas a sequedad en el rotavapor (35°C, 100 PSI).

**c) Resultados**

**i** Se obtuvieron 12 fracciones, las cuales contenían sustancias de color pardo-marrón de aspecto resinoso y cuyos pesos se muestran en la Tabla 8.

**Tabla 8.** Fracciones obtenidas en la cromatografía en columna 1 - CC1

<b>Fracción</b>	<b>Eluente</b>	<b>Volumen de la fracción (mL)</b>	<b>Masa del extracto (mg)</b>
f1	DCM	100	1190
f2	1%DCM-MeOH	100	62
f3	5% DCM-MeOH	100	3
f4	10% DCM-MeOH	100	1
f5	25%DCM-MeOH	100	11
f6	50%DCM-MeOH	100	26
f7	MeOH	200	15

*Nota.- DCM = diclorometano, MeOH = metanol.*

- ii** La cromatografía en capa fina (CCF) de estas fracciones mostró la presencia de alcaloides en las fracciones 1 y 2, debido a que revelaron positivo frente al reactivo de Dragendorff.
- iii** El análisis de resonancia magnética nuclear de protón de la fracción 1 (ver Anexo 9) indicó la presencia de escopolamina junto con otro alcaloide, por lo que se requería realizar una purificación adicional a esta fracción.
- iv** Los alcaloides deberían separarse bien sobre un adsorbente polar, como la alúmina, pero los resultados no fueron satisfactorios: casi toda la muestra fue eluida con el primer eluente (diclorometano, ver Tabla 8). Por ello se decidió realizar una segunda cromatografía en columna, esta vez utilizando silica gel como adsorbente (ver Sec. F.5.2).

## 5.2. Cromatografía en columna 2 (CC2)

### a) Condiciones de trabajo

- I Muestra: 482 mg de CC1.fl.
- II Características de la Columna:  $\emptyset = 1,9$  cm,  $h$  adsorbente: 14,5 cm (14g).
- III Adsorbente\*: Sílice SDS 60A CC (Granulometría 35-70  $\mu\text{m}$ ; superficie másica: 550  $\text{m}^2/\text{g}$ ; pH (5% suspensión) = 7).
- IV Eluente: Mezclas de diclorometano y metanol, de polaridad creciente.

### b) Procedimiento

- I La preparación de la columna, la colocación del empaque de sílice y la introducción de la muestra se realizaron tal como se describió precedentemente.
- II Se adicionó cuidadosamente diclorometano sobre el empaque y se hizo eluir la columna hasta recibir fracciones de aproximadamente 8 mL, en tubos de 13x100 mm.
- III Se continuó la elución de la columna con mezclas de diclorometano y metanol, de polaridad creciente.

### c) Resultados

- I Se obtuvieron en total 33 fracciones, todas ellas presentaban una coloración amarilla con diferentes intensidades. El análisis mediante CCF de las fracciones, utilizando el reactivo de Dragendorff como revelador, permitió juntar las fracciones que tenían un contenido similar de alcaloides.
- II Las fracciones una vez reunidas se llevaron a sequedad en el rotavapor (35 °C, 100 PSI) y luego pesadas. Los resultados se muestran en la Tabla 9.
- III El análisis de resonancia magnética nuclear de protón de las fracciones f12-f16 y f17-f23 indicó la presencia de dos compuestos. Luego, se separaron tales mezclas mediante cromatografía en placa preparativa.

**Tabla 9.** Fracciones obtenidas en la cromatografía en columna 2 - CC2

<b>Código de la fracción</b>	<b>Eluente</b>	<b>Peso del extracto (mg)</b>
f9-f11	10% DCM-MeOH	103
f12-f16	10% DCM-MeOH	195
f17-f23	10% DCM-MeOH	83
f28-f33	25% DCM-MeOH	63

## 6. Cromatografía en placa preparativa-CPP

Se realizaron las purificaciones de las fracciones f12-f16 y f17-f23, respectivamente, mediante cromatografía en capa preparativa de cada una de dichas fracciones por separado.

### 6.1. Cromatografía en placa preparativa 1 - CPP1

#### a) Condiciones de trabajo

- i Muestra: f17-f23 (83 mg), ver Tabla 9.
- ii Adsorbente: Placas de Sílice F254, 2mm de espesor (Merck).
- iii Eluente: Cloroformo-EtOH-NH<sub>3</sub> (100:10:1) (Volumen: 150 mL).
- iv Revelador: Reactivo de Dragendorff modificado por Munier.

#### b) Procedimiento

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

- i La muestra se dividió en tres porciones y estas se aplicaron en tres placas cromatográfica diferentes.

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

- ii Las muestras se aplicaron a 2 cm del borde de la placa cromatográfica con ayuda de una pipeta pasteur y se realizaron dos eluciones consecutivas de la misma placa.
- 111 Luego de la segunda elución, se cubrió la placa con papel de aluminio, dejándose descubierto una distancia de 2 cm del lado derecho. El revelado con el reactivo de Dragendorff indicó nuevamente la presencia de dos alcaloides, denominando A al compuesto de mayor  $R_f$  y B al de menor  $R_f$ .
- 1v Con ayuda de la luz UV y de una espátula de metal se delimitaron las dos zonas correspondientes a los dos alcaloides diferentes (A y B), y se procedió a raspar suavemente el adsorbente con ayuda de una espátula de 0,5 cm de ancho, recibiendo en papel de aluminio.
- v. Los alcaloides contenidos en el adsorbente se recuperaron por percolación. Para ello se preparó un sistema de filtración, colocándose un embudo de vidrio, con una pequeña cantidad de algodón, sobre un aro fijado a un soporte. Luego, se colocó el adsorbente en el embudo y se hizo pasar 10 mL de metanol. La solución ligeramente amarilla se recogió en un balón de 25 mL y se llevó a sequedad (35°, 90PSI).

### c) Resultados

- 1 Se obtuvieron dos alcaloides de diferentes  $R_f$ :
  - A = 20 mg ( $R_f = 0,67$ , corresponde a la escopolamina).
  - B = 10 mg ( $R_f = 0,42$ , corresponde a la norescopolamina).
- 11 Se obtuvieron inmediatamente los espectros de RMN<sup>1</sup>H:
  - A: Espectro 3: Corresponde a la escopolamina.
  - B: Espectro 12: Corresponde a la norescopolamina.
- 111 Se solicitó\* los espectros de masas (HRMS) de ambas fracciones, con los siguientes resultados:
  - A: Espectro 1: Corresponde a la escopolamina.

\* Servicio de Análisis por Espectrometría de Masas del ICSN de Gif-Sur-Ivette

B: Espectro 10: Corresponde a la norescopolamina.

## 6.2. Cromatografía en placa preparativa 2 – CPP2

### a) Condiciones de trabajo

- I Muestra: f12-f16 (70 mg)\*, ver Tabla 9.
- II Adsorbente: Placas de Sílice F254, 2mm de espesor, (20 x 20cm) (Merck).
- III Eluente: Cloroformo-EtOH-NH<sub>3</sub> (100:10:1) (Volumen: 150 mL).
- IV Revelador: Reactivo de Dragendorff modificado por Munier.

### b) Procedimiento

El procedimiento seguido para la resolución de esta placa preparativa es el mismo descrito para CPP1 (ver ítem precedente).

### c) Resultados

- I Se obtuvieron dos alcaloides de diferentes R<sub>f</sub>:
  - C = 45 mg (R<sub>f</sub> = 0,67, corresponde a la escopolamina).
  - D = 8 mg (R<sub>f</sub> = 0,42, corresponde a la norescopolamina).
- II Se obtuvieron inmediatamente los espectros de RMN<sup>1</sup>H:
  - C: Espectro 3: Corresponde a la escopolamina.
  - D: Espectro 12: Corresponde a la norescopolamina.
- III Se solicitaron los espectros de masas (HRMS) de ambas fracciones, con los siguientes resultados:
  - C: Espectro 1: Corresponde a la escopolamina.
  - D: Espectro 10: Corresponde a la norescopolamina.

**Conclusión:** A partir del extracto bruto de alcaloides obtenido de las hojas de la “Misha rastrera” (*Datura candida*) se lograron aislar los alcaloides mayoritarios, escopolamina (principal) y norescopolamina.

\* Solo se tomaron 70 mg de muestra (de los 195 mg obtenidos para f12-16) debido a la carencia de más placas para realizar el análisis.

## G. Identificación Espectroscópica de la escopolamina\*

La determinación estructural de la escopolamina obtenida de las hojas de la “Misha rastrera” (*D. candida*) se realizó mediante el análisis de sus espectros de Masas (HRMS e IE), RMN<sup>1</sup>H, RMN<sup>13</sup>C, COSY, HMQC, HMBC e IR.

La muestra analizada fue la fracción A obtenida en la sección precedente (CPP1, pág. 74).

### 1. Espectro de masas - HRMS (Espectro 1)

#### a) Condiciones de trabajo

- i Equipo: Espectrómetro de masas Waters – Micromass. Tipo: ESI-TOF. Modo de Ionización: ESI/Alta resolución.
- ii Laboratorio: Laboratorio de Espectrometría de Masas. Institut de Chimie des Substances Naturelles - ICSN, Gif-sur-Ivette, Francia.
- iii Operador: Personal especializado del laboratorio – ICSN.
- iv Fecha: 21.Ago.06.
- v Muestra: Alcaloide A (CPP1/f17-23, pág. 74).

#### b) Características del espectro

**m/z:** 304,1 (100%, [M + H]<sup>+</sup>); 305,2 (10,3%, [M + 2H]<sup>+</sup>); 326,2 (4,3%, [M + Na]<sup>+</sup>).

#### c) Análisis del espectro

El pico a 304,1 y 305,2 m/z corresponde a los iones formados por la molécula con uno y dos átomos de hidrógeno respectivamente. El pico a 326,6 representa al ion formado por la molécula con un átomo de sodio.

Luego, la masa del compuesto aislado será 303,1. El valor de masa exacta dado por el equipo es 304,1549.

---

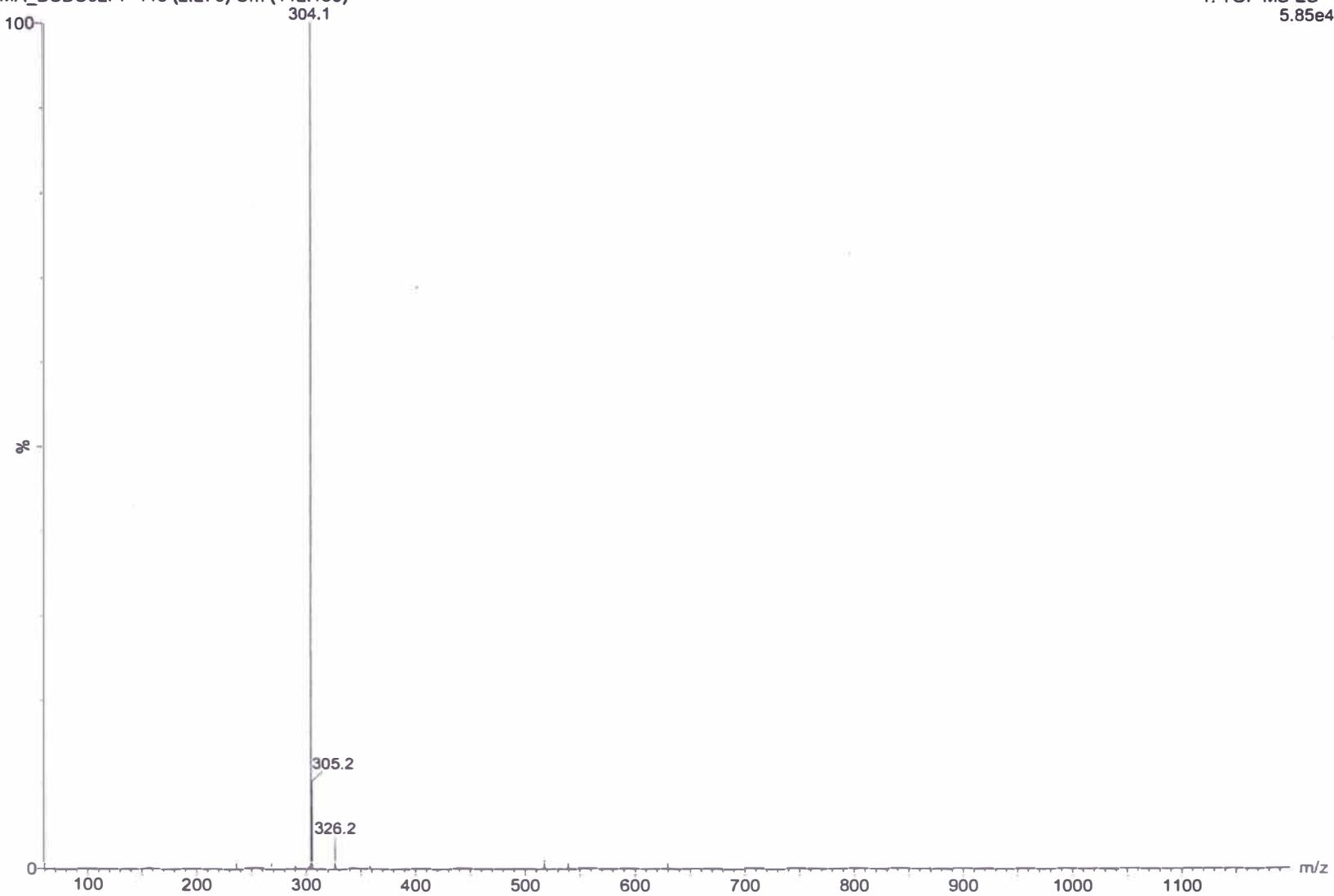
\* Todos los espectros (Masas, RMN<sup>1</sup>H, RMN<sup>13</sup>C, etc.) fueron obtenidos durante la estadía de investigación que realizó el autor de esta tesis en el ICSN de Gif-Sur-Ivette (Francia).

## d) Conclusión

El valor de masa obtenido corresponde a la masa molecular de la escopolamina.

1: TOF MS ES+  
5.85e4

20033 / CABANILLAS / BC BC 02 PP / CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> + MeOH  
MA\_BCBC02PP 113 (2.270) Cm (112:136)



**Espectro 1.** Espectro de masas de alta resolución (HRMS) de la escopolamina obtenida de las hojas de *D. candida*.

## 2. Espectro de masas – EI (70eV) (Espectro 2)

### a) Condiciones de trabajo

- i Equipo: Espectrómetro de masas Thermo-Finnigan. Tipo: GC/MS Quadripole. Modo de Ionización: IE.
- ii Laboratorio: Laboratorio de Espectrometría de Masas, Institut de Chimie des Substances Naturelles - ICSN, Gif-sur-Ivette, Francia.
- iii Operador: Personal especializado del laboratorio – ICSN.
- iv Fecha: 21.Ago.06.
- v Muestra: Alcaloide A (CPP1/f17-23, pág. 74).

### b) Características del espectro

**m/z:** 303 (8,8%, ión molecular); 154 (17,3%); 138 (90,9%); 136 (45,2%); 94 (pico base, 100%).

### c) Análisis del espectro

La identificación de los cinco fragmentos iónicos correspondientes a los picos  $m/z$  303, 154, 138, 136 y 94, y las ecuaciones de fragmentación respectivas, se han descrito precedentemente (pág. 15).

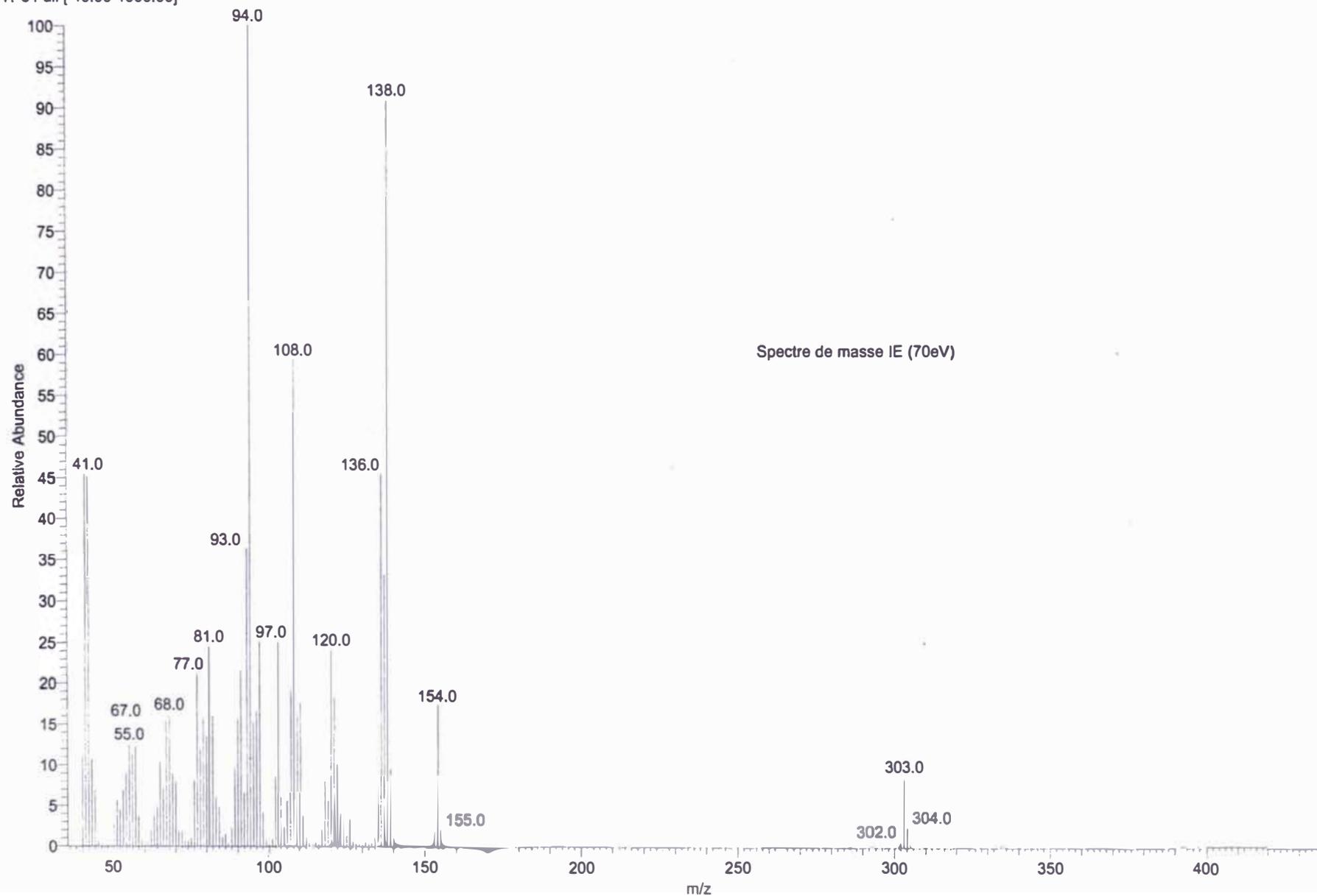
El espectro de masas de la escopolamina obtenida a partir de las hojas de la misha rastrera (*Datura candida*) es similar al espectro registrado por Vitale *et al.* (1995), ver sección Sec. I.4.a (pág. 15).

### d) Conclusión

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

21/08/06 11:09:56

BC BC 02 PP#9-41 RT: 0.17-0.59 AV: 33 SB: 13 0.06-0.07, 1.12-1.25 NL: 4.30E6  
T: c Full [ 40.00-1000.00]



**Espectro 2.** Espectro de masas EI de la escopolamina obtenida de las hojas de *D. candida*.

### 3. Espectro de RMN<sup>1</sup>H (Espectro 3)

#### a) Condiciones de trabajo

- i Equipo: Bruker AC-300 (300 MHz).
- ii Laboratorio: Laboratorio de Resonancia Magnética Nuclear, Institut de Chimie des Substances Naturelles - ICSN, Gif sur Yvette, Francia.
- iii Operador: Billy Cabanillas.
- iv Fecha: 13.Set.06.
- v Solvente: CDCl<sub>3</sub>.
- vi Muestra: Alcaloide A (CPP1/fl7-23, pág. 74).

#### b) Características del espectro

$\delta$  (ppm): 1,34 (1H, d); 1,58 (1H, d); 2,03 (1H, ddd); 2,12 (1H, ddd) 2,45 (3H, s); 2,67 (1H, d); 2,76 (1H, s) 2,98 (1H, dd); 3,12 (1H, dd); 3,38 (1H, d); 3,75 (1H, dd); 3,81 (1H, dd); 4,16 (1H, dd), 5,02 (1H, t); 7,22(1H-*p*, m); 7,31(2H-*o*, m); 7,44 (2H-*m*, m).

#### c) Análisis del espectro

La correspondencia entre los valores de desplazamientos químicos y cada uno de los protones, así como los valores de las constantes de acoplamiento\*, pertenecientes a la estructura de la escopolamina se indican en la estructura de la molécula (Figura 12) y en la Tabla 10.

#### d) Conclusión

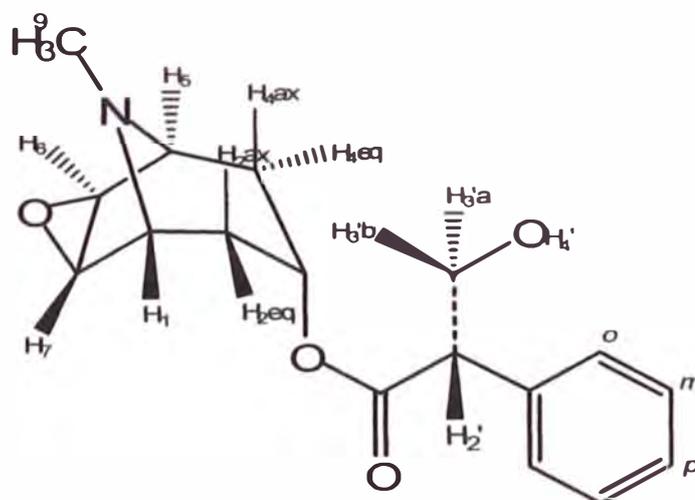
El espectro RMN<sup>1</sup>H obtenido corresponde a lo esperado para la estructura de la escopolamina.

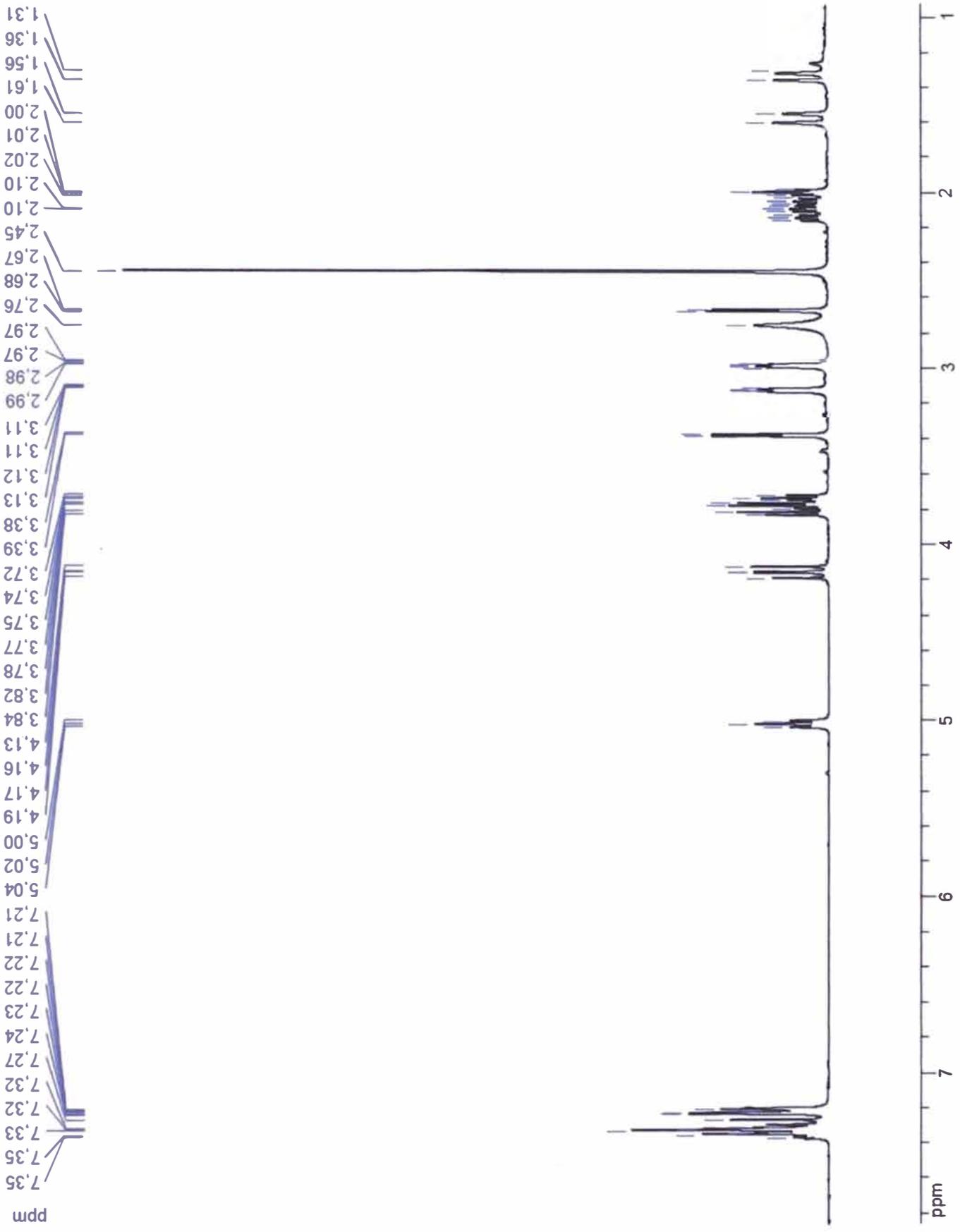
---

\* Para ver la determinación de la constantes de acoplamiento ver el Anexo 1. Los valores de desplazamientos químicos y de las constantes de acoplamiento han sido calculados con la ayuda del programa NMRnotebook en base a los archivos obtenidos del equipo Bruker AC-300.

**Tabla 10.** Datos del espectro RMN<sup>1</sup>H de la escopolamina (300 MHz) en CDCl<sub>3</sub>

$\delta$ (ppm)	Nº de átomo Hidrógeno	Tipo de Señal	Constantes de acoplamiento (Hz)	Integración
1,34	H-2eq	d	15,3	1H
1,58	H-4eq	d	15	1H
2,03	H-2ax	ddd	15,3/5,4/ 4,0	1H
2,12	H-4eq	ddd	15/ 5,4/ 4,0	1H
2,45	H-9	s	-	3H
2,67	H-7	d	3,0	1H
2,76	H-4'	s	-	1H
2,98	H-1	dd	4,0/2,0	1H
3,12	H-5	dd	4,0/2,0	1H
3,38	H-6	d	3,0	1H
3,75	H-2'	dd	8,6/5,3	1H
3,81	H-3'b	dd	10,6/5,3	1H
4,16	H-3'a	dd	10,6/8,6	1H
5,02	H-3	t	5,4	1H
7,22	H- <i>p</i>	dd	7,8/1,8	1H
7,31	H- <i>o</i>	d	1,8	2H
7,34	H- <i>m</i>	dd	7,3/1,8	2H

**Figura 12.** Asignaciones de los átomos de hidrógeno en la escopolamina.



**Espectro 3.** Espectro de RMN<sup>1</sup>H (300 MHz) de la escopolamina obtenida de las hojas de *D. cardida*.

#### 4. Espectros de RMN<sup>13</sup>C (Espectros 4, 5 y 6)

##### a) Condiciones de trabajo

- I Equipo: Bruker AC-300, (300 MHz).
- II Laboratorio: Laboratorio de Resonancia Magnética Nuclear, Institut de Chimie des Substances Naturelles, Gif-sur-Ivette, Francia.
- III Operador: Billy Cabanillas.
- IV Fecha: 13.Set.06.
- V Solvente: CDCl<sub>3</sub>.
- VI Muestra: Alcaloide A (CPP1/f17-23, pág. 74).

##### b) Características del espectro DEPT-90 (Espectro 4)

Este espectro muestra únicamente los carbonos terciarios.

$\delta$  (ppm): 54,3; 55,9; 56,4; 57,7; 57,8; 66,7; 128; 128,1; 129.

##### c) Características del espectro DEPT-135 (Espectro 5)

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

- I Señales de la parte superior:

$\delta$  (ppm): 42,1; 54,3; 55,9; 56,4; 57,7; 57,8; 66,9; 128; 128,1; 129.

- II Señales de la parte inferior:

$\delta$  (ppm): 30,7; 30,9; 64.

##### d) Características del espectro de desacoplamiento de protón de banda ancha (Espectro 6)

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

$\delta$  (ppm): 30,7; 30,9; 42,1; 54,3; 55,9; 56,4; 57,7; 57,8; 64; 66,9; 128; 128,1; 129; 135,6; 171,9.

e) **Análisis de espectros DEPT-90 y DEPT-135**

1 **Carbonos terciarios (CH)**

Las nueve señales presentes en el espectro 4 (DEPT-90) corresponden a **carbonos terciarios (CH)**:

$\delta$  (ppm): 54,3 (C-2); 55,9 (C-7); 56,4 (C-6); 57,7 (C-1); 57,8 (C-5); 66,9 (C-3); 128 (C-*p*); 128,1 (C-*o*); 128,7 (C-*m*).

11 **Carbonos primarios (CH<sub>3</sub>)**

En el espectro 5 (DEPT-135) las 10 señales de la parte superior corresponden a los carbonos primarios (CH<sub>3</sub>) y terciarios (CH); luego la señal del único carbón primario presente en la molécula se obtiene restando las señales de los carbonos terciarios, por lo que la señal del **carbono primario** será:

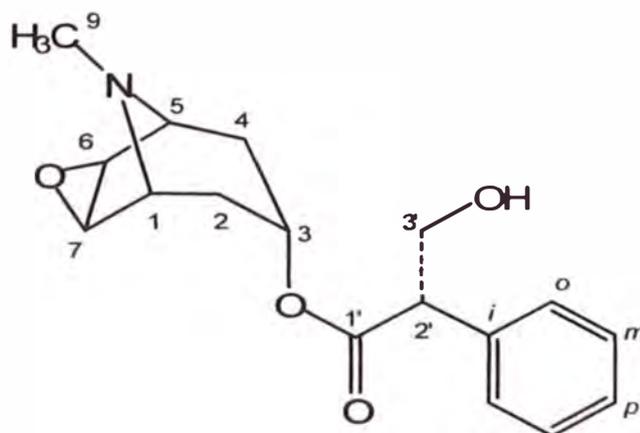
$\delta$  (ppm): 42,1 (C-9).

111 **Carbonos secundarios (CH<sub>2</sub>)**

Las tres señales de la parte inferior del espectro DEPT-135 corresponden a los **carbonos secundarios (CH<sub>2</sub>)**.

$\delta$  (ppm): 30,7 (C-2); 30,9 (C-4); 64 (C-3').

Por lo tanto, la identificación (asignación) de cada átomo de carbono en la estructura de la escopolamina se ilustra en la Figura 13 siguiente:



**Figura 13.** Asignación de los átomos de carbono en la escopolamina

### f) Análisis del espectro de Desacoplamiento de protón de banda ancha

Adicionalmente a las señales registradas en los espectros DEPT-90 y DEPT-135, este espectro muestra dos señales a  $\delta = 135,6$  y  $171,9$  ppm, que corresponden a los dos átomos de carbonos cuaternarios C-1' y C-*i* de la molécula de escopolamina.

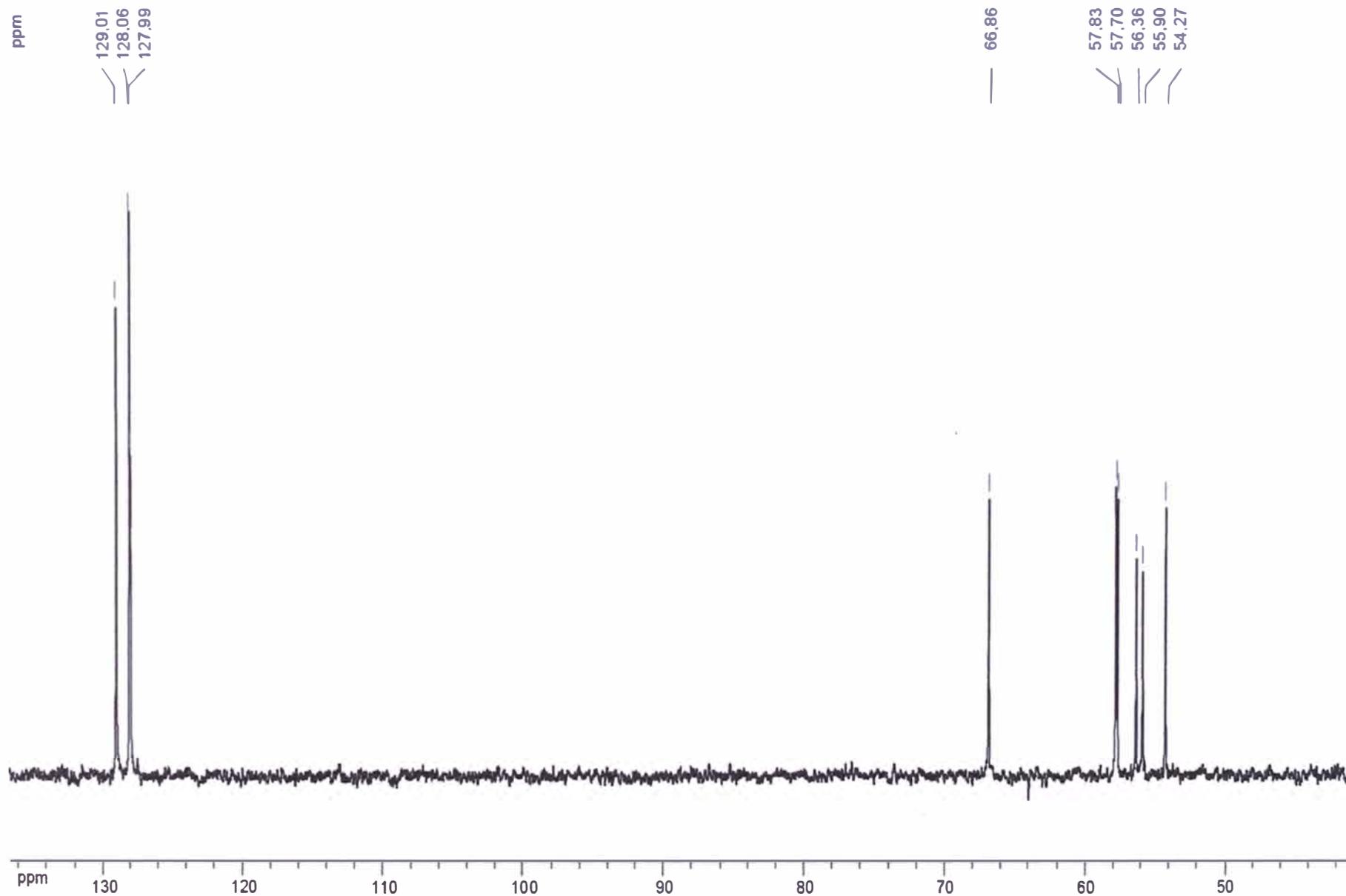
En resumen, los átomos de carbono de la molécula de escopolamina tendrían los valores de desplazamiento químico ( $\delta$ ) indicados en la Tabla 11.

**Tabla 11.** Desplazamientos químicos  $\delta$  (ppm), de los átomos de carbono de la escopolamina en  $\text{CDCl}_3$

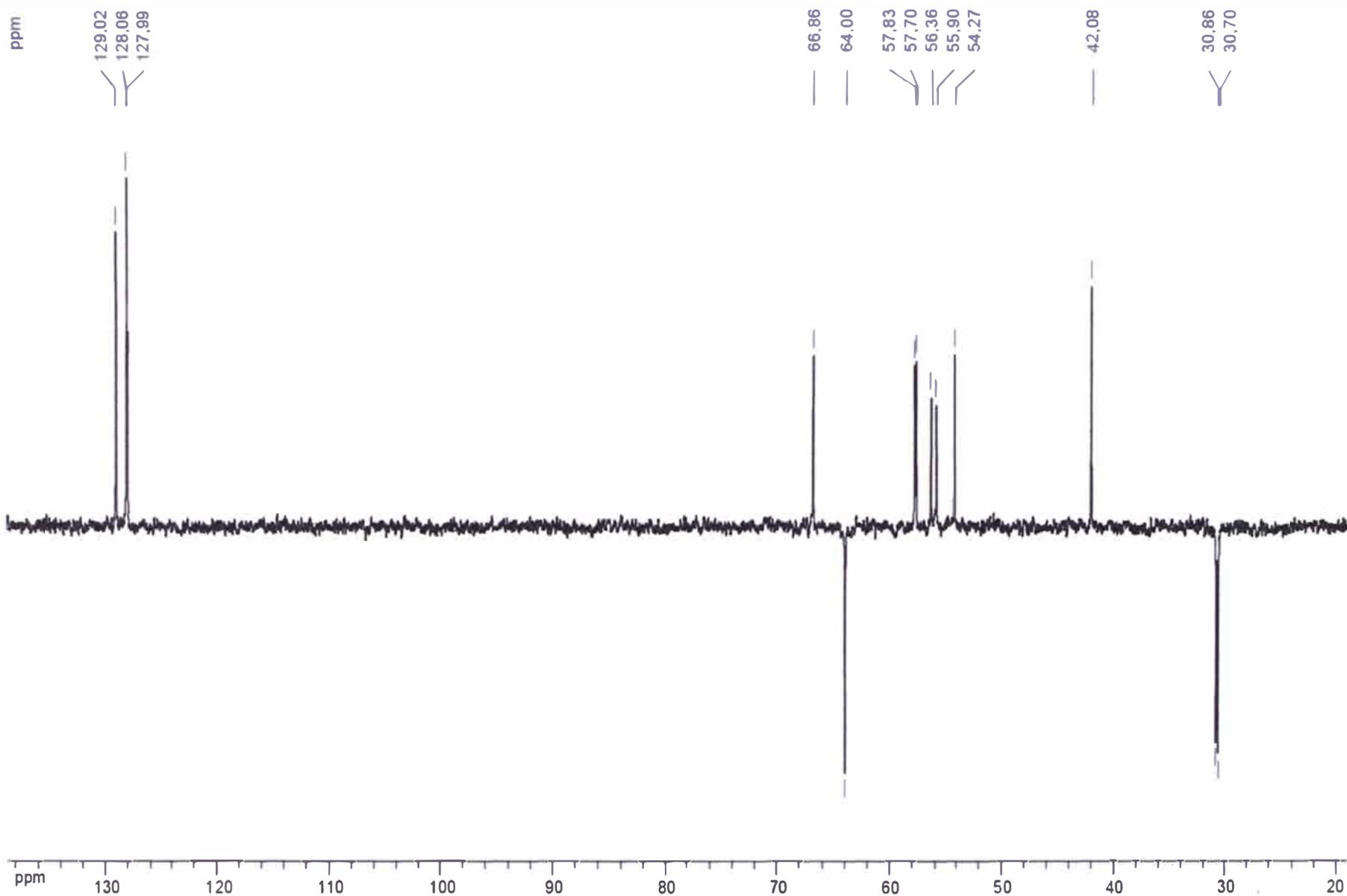
$\delta$ (ppm)	Nº de átomo de carbono	Tipo de carbono
30,7	C-2	CH <sub>2</sub> (secundario)
30,9	C-4	CH <sub>2</sub> (secundario)
42,1	C-9	CH <sub>3</sub> (primario)
54,3	C-2'	CH <sub>2</sub> (secundario)
55,9	C-7	CH (terciario)
56,4	C-6	CH (terciario)
57,7	C-1	CH (terciario)
57,8	C-5	CH (terciario)
64,0	C-3'	CH <sub>2</sub> (secundario)
66,9	C-3	CH (terciario)
128,0	C- <i>p</i>	CH (aromático)
128,1	C- <i>o</i>	C (aromático)
129,0	C- <i>m</i>	CH (aromático)
135,6	C- <i>i</i>	CH (aromático)
171,9	C-1'	C (C=O)

### d) Conclusión

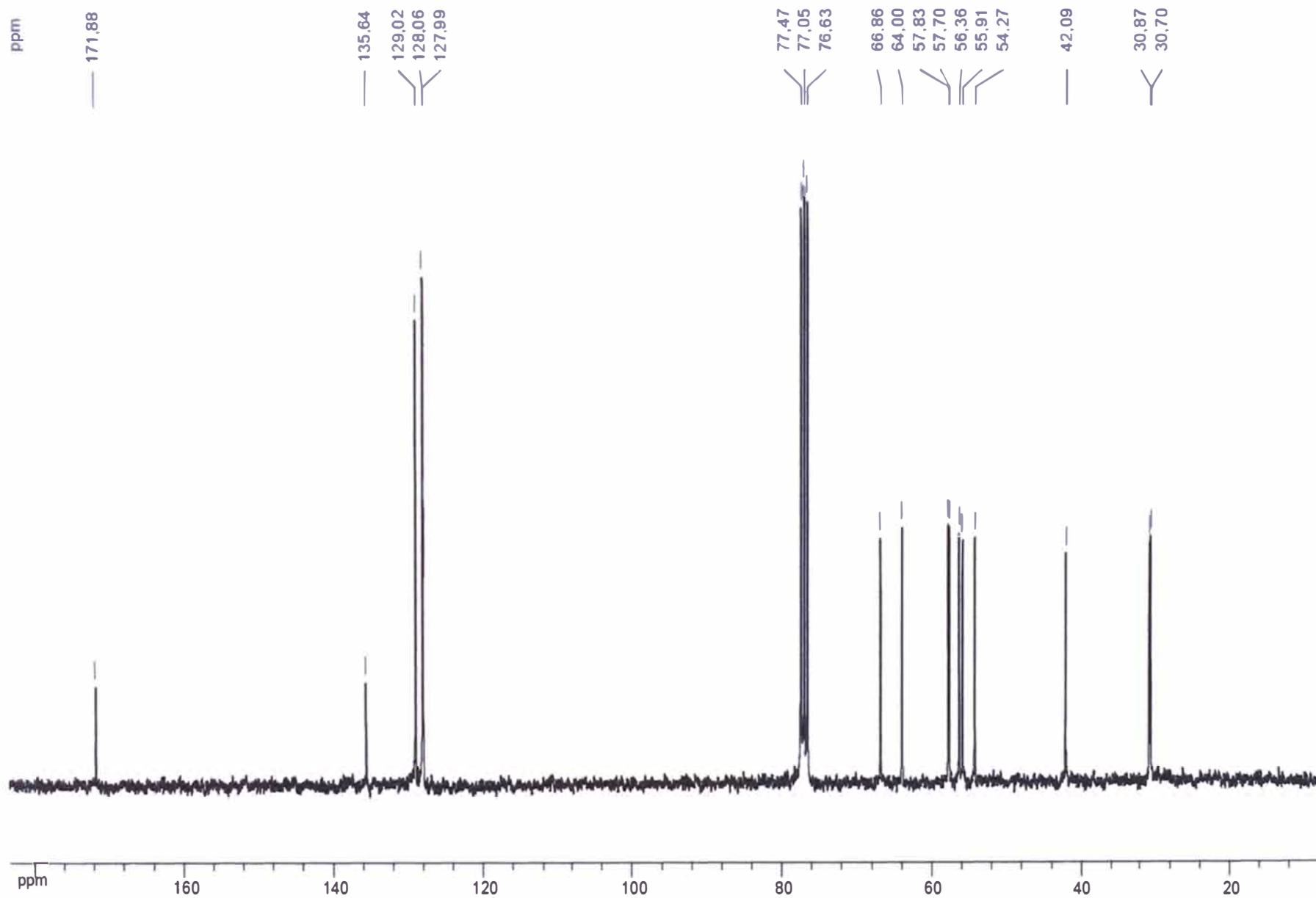
Los espectros DEPT-90, DEPT-135 y Desacoplamiento de protón de banda ancha presentados corresponden a lo esperado para la estructura de la escopolamina.



**Espectro 4.** Espectro DEPT-90 (75,4 MHz) de la escopolamina obtenida de las hojas de *D. candida*.



**Espectro 5.** Espectro DEPT-135 (75,4 MHz) de la escopolamina obtenida de las hojas de *D. candida*.



**Espectro 6.** Espectro RMN <sup>13</sup>C (75,4 MHz) de la escopolamina obtenida de las hojas de *D. candida*.

## 5. Espectro $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ COSY (Espectro 7)

### a) Condiciones de trabajo

- i Equipo: Bruker AC-300, (300 MHz).
- ii Laboratorio: Laboratorio de Resonancia Magnética Nuclear, Institut de Chimie des Substances Naturelles, Gif sur Yvette, Francia.
- iii Operador: Billy Cabanillas.
- iv Fecha: 13.Set.06.
- v Solvente:  $\text{CDCl}_3$ .
- vi Muestra: Alcaloide A (CPP1/f17-23, pág. 74).

### b) Características del espectro

La cantidad de marcas simétricas, a lo largo de un lado de la diagonal del espectro, indica el número de acoplamientos. Luego, existen en total once acoplamientos entre los diferentes protones de la molécula (ver Espectro 7).

### b) Análisis del espectro

La primera ampliación de un segmento del espectro (0 - 3,5 ppm) muestra, con la ayuda de líneas, los acoplamientos existentes entre todos los protones correspondientes al ciclo tropánico, los cuales se indican a continuación (Figura 14.a):

- i H2-eq se acopla con H2-ax y H-1, línea negra y continua.
- ii H4-eq se acopla con H4-ax y H-5, línea celeste y segmentada (- - - -).
- iii H2-ax se acopla con H-1, línea roja y segmentada (- • - • -).
- iv H4-ax se acopla con H-5, línea rosada y con puntos (...).
- v H-7 se acopla con H-6, línea verde y segmentada(- - • • - - • • - -).

La ampliación de un segundo segmento (2 - 5,5 ppm) muestra los acoplamientos de dos protones de ciclo tropánico y los que se encuentran exteriores a este (Figura 14.b).

- I H-2ax y H-4ax se acoplan con H-3, líneas rojas y continuas.
- II H-2' y H-3'b se acoplan con H-3'a, líneas azules y segmentadas (- - -).

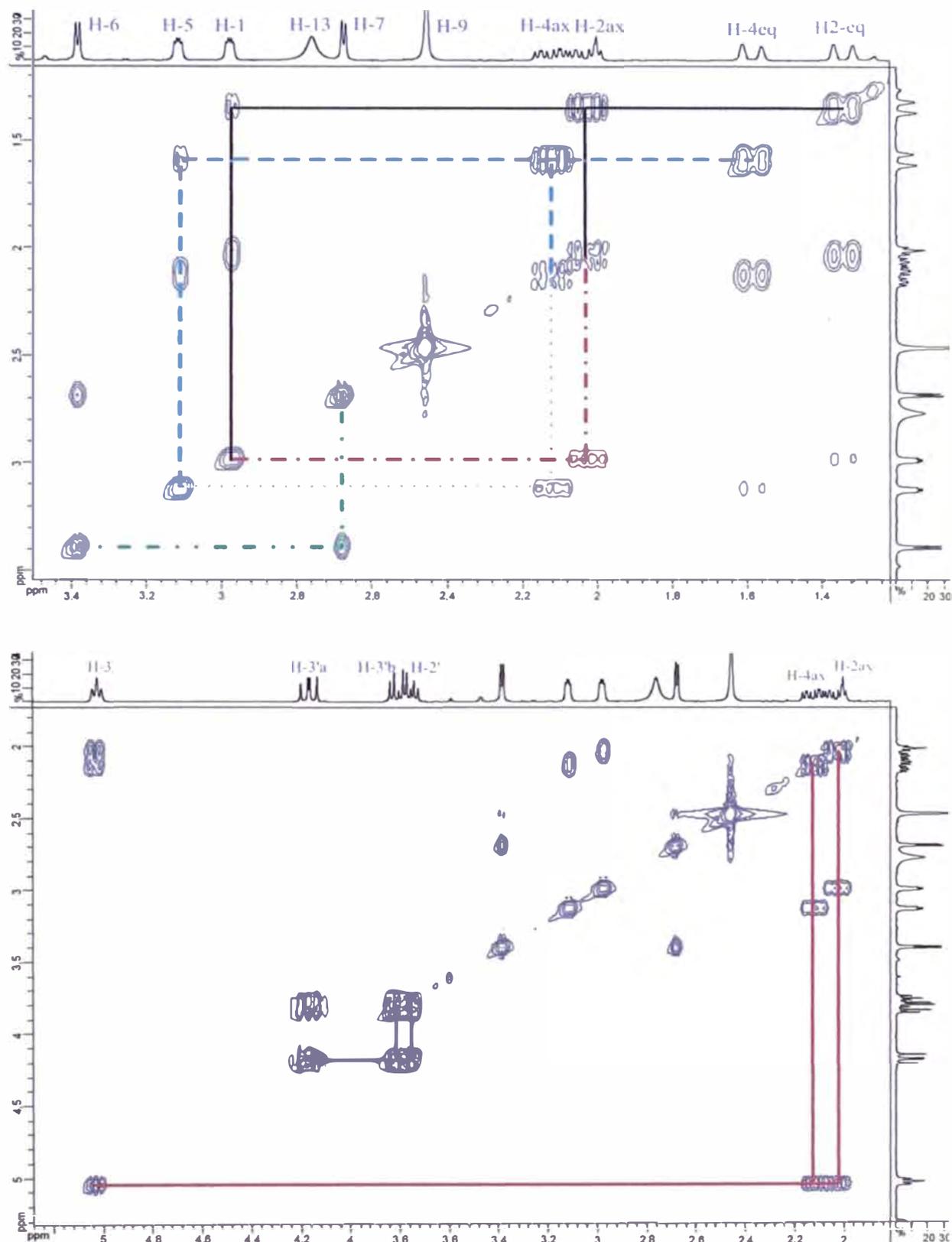


Figura 14. Espectro COSY (300 MHz) de la escopolamina en CDCl<sub>3</sub>: a) Sección de 0-3,5 ppm y b) Sección de 2-5,5 ppm.

Por tanto, podemos resumir todos los resultados en la Tabla 12.

**Tabla 12.** Correlaciones COSY y constantes de acoplamiento  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  de la escopolamina.

<b>Nº de átomo de hidrógeno</b>	<b><math>\delta</math> (ppm)</b>	<b>Correlaciones <math>^1\text{H}</math>-<math>^1\text{H}</math> y constantes de acoplamiento (Hz)</b>
H-2eq	1,34	H-2ax (15,3); H-1 (2,0)
H-4eq	1,58	H-4ax (15,0); H-5 (2,0)
H-2ax	2,03	H-2eq (15,3); H-3 (5,4); H-1 (4,0)
H-4ax	2,12	H-4eq (15,0); H-3 (5,4); H-5 (4,0)
H-7	2,67	H-6 (3,0)
H-1	2,98	H-2ax (4,0); H-2eq (2,0)
H-5	3,12	H-4ax (4,0); H-4ax (2,0)
H-6	3,38	H-7 (3,0)
H-2'	3,75	H-3'a (8,6); H-3'b (5,3)
H-3'b	3,81	H-3'a (10,6); H-2' (5,3)
H-3'a	4,16	H-2' (10,6); H-3'b (8,3)
H-3	5,02	H-2ax (5,4); H-4ax (5,4)

#### **d) Conclusión**

Existe correspondencia entre el espectro COSY obtenido para nuestro compuesto y aquel publicado en la bibliografía.

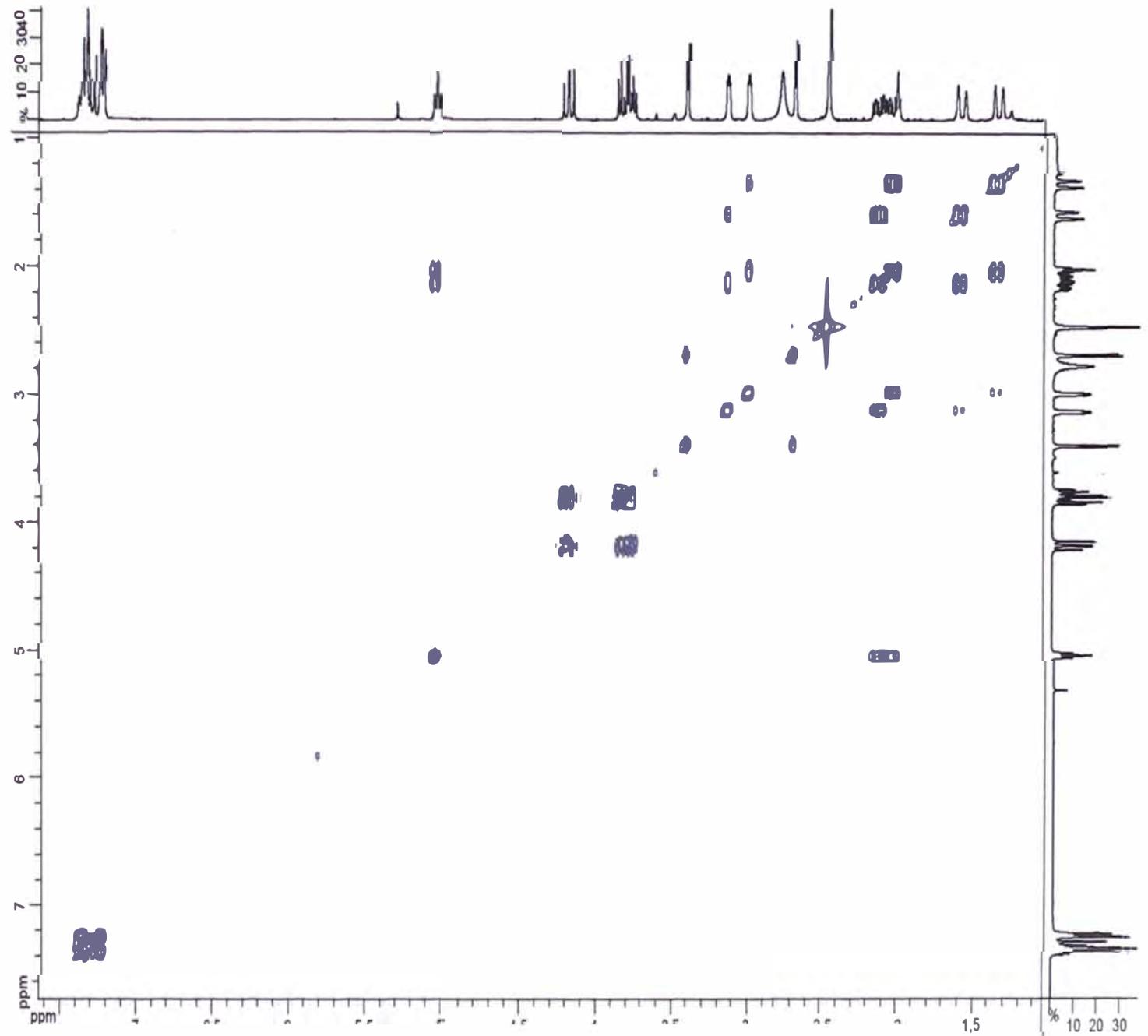
Parameters  
bc-bc02pp (escopolamina) cosy (COSY 1H/1H)

F1 :  
- Size : 512 points real  
- Spectral Width : 2408.4778 Hz  
- Carrier Frequency : 300.17123 MHz  
- Nucleus : 1H

F2 :  
- Size : 2048 points real  
- Spectral Width : 2408.4778 Hz  
- Carrier Frequency : 300.17123 MHz  
- Nucleus : 1H

Type : COSY  
Spectro : BRUKER 300 MHz  
Probe : 5 mm QNP 1H/13C/31P/19F Z-GRD Z

Temperature : 299.8 K  
Solvent : CDCl3



**Espectro 7.** Espectro COSY (300 MHz) de la escopolamina obtenida de las hojas de *D. candida*.

## 6. Espectro $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ HMQC (Espectro 8)

### a) Condiciones de trabajo

- I Equipo: Bruker AC-300, (300 MHz).
- II Laboratorio: Laboratorio de Resonancia Magnética Nuclear, Institut de Chimie des Substances Naturelles, Gif sur Yvette, Francia.
- III Operador: Billy Cabanillas.
- IV Fecha: 13.Set.06.
- V Solvente:  $\text{CDCl}_3$ .
- VI Muestra: Alcaloide A (CPP1/f17-23, pág. 74).

### b) Características del espectro

En este espectro se presentan 14 marcas correspondientes a las correlaciones C-H a través de un solo enlace (ver Espectro 8).

### c) Análisis del espectro

Las correlaciones HMQC entre los átomos de carbono e hidrógeno de la molécula muestran concordancia con la conectividad C-H indicada en los espectros de  $\text{RMN}^1\text{H}$  y  $\text{RMN}^{13}\text{C}$ .

Luego, podemos resumir los resultados en la Tabla 13.

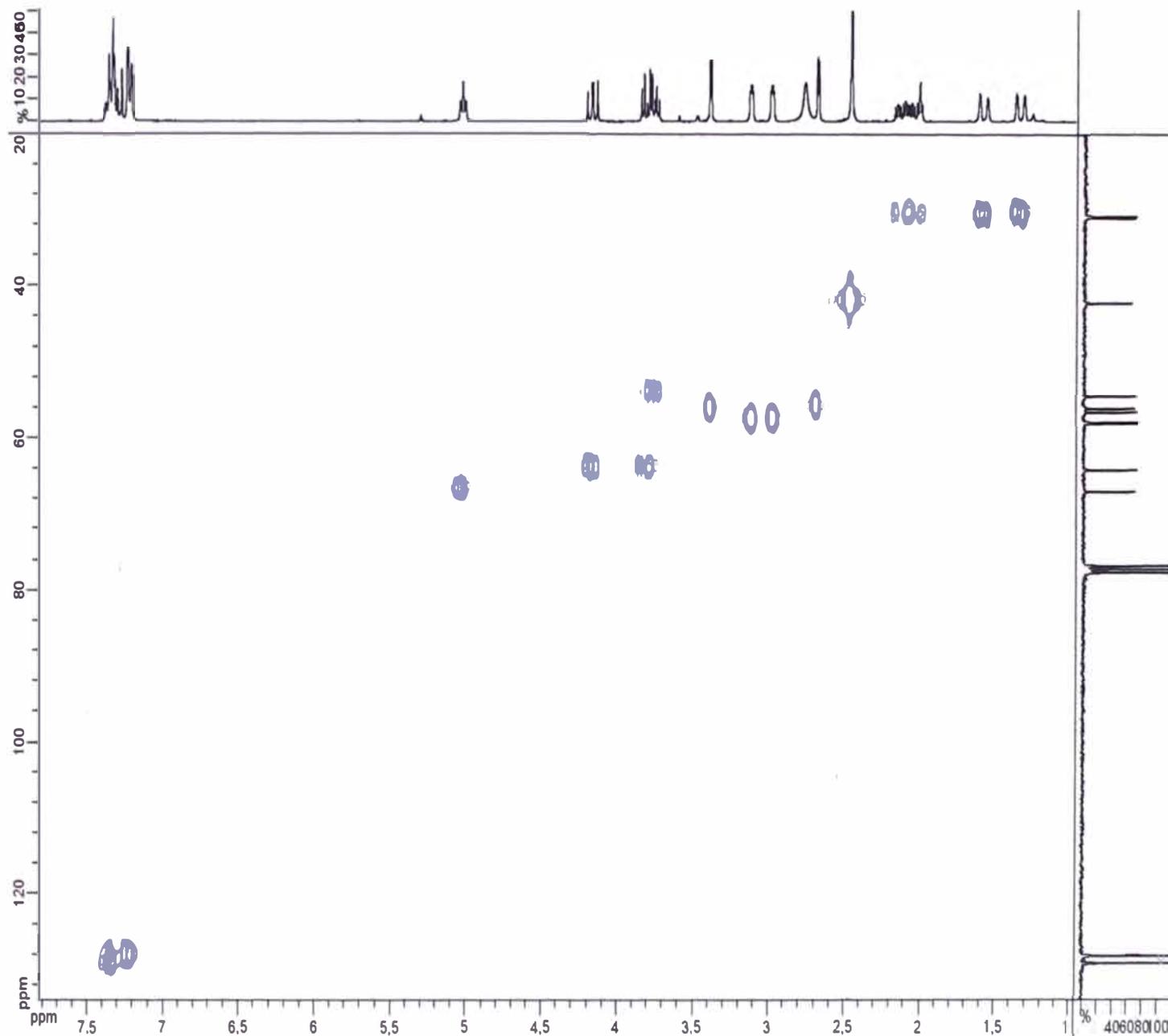
### e) Conclusión

Existe correspondencia entre la conectividad C-H, a través de un solo enlace, esperada para la escopolamina.

**Tabla 13.** Correlaciones  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  del espectro HMQC de la escopolamina en  $\text{CDCl}_3$  (300 MHz).

<b>Nº de átomo de carbono</b>	<b><math>\delta</math> (ppm)</b>	<b>Hidrógenos correlacionados</b>
C-2	30,2	H-2eq , H-2ax
C-4	30,9	H-4eq , H-4ax
C-9	42,1	H-9
C-13	54,3	H-11
C-7	55,9	H-7
C-6	56,4	H-6
C-1	57,7	H-1
C-5	57,8	H-5
C-14	64,0	H-12a, H-12b
C-3	66,9	H-3

Parameters  
 bc-bc02pp (escopolamina) HMQC (HMBC 1H/  
 F1 :  
 - Size : 256 points real  
 - Spectral Width : 12500.0 Hz  
 - Carrier Frequency : 75.48347 MHz  
 - Nucleus : 13C  
 F2 :  
 - Size : 1024 points real  
 - Spectral Width : 2408.4778 Hz  
 - Carrier Frequency : 300.17123 MHz  
 - Nucleus : 1H  
 Type : HMBC  
 Spectro : BRUKER 300 MHz  
 Probe : 5 mm ONP 1H/13C/1P/19F Z-GRD Z  
 Temperature : 299.9 K  
 Solvent : CDCl3



**Espectro 8.** Espectro HMQC (300 MHz) de la escopolamina obtenida de las hojas de *D. candida*

## 6. Espectro $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ HMBC (Espectro 9)

### a) Condiciones de trabajo

- i Equipo: Bruker AC-300, (300 MHz).
- ii Laboratorio: Laboratorio de Resonancia Magnética Nuclear, Institut de Chimie des Substances Naturelles, Gif sur Ivette, Francia.
- iii Operador: Billy Cabanillas.
- iv Fecha: 13.Set.06.
- v Solvente:  $\text{CDCl}_3$ .
- vi Muestra: Alcaloide A (CPP1/f17-23, pág. 74).

### b) Características del espectro

En este espectro se presentan las marcas correspondientes a las correlaciones C-H a través de uno, dos o tres enlaces (ver Espectro 9).

### c) Análisis del espectro

Las correlaciones HMBC entre los átomos de carbono e hidrógeno de la molécula muestran concordancia con la conectividad C-H indicada en los espectros de  $\text{RMN}^1\text{H}$  y  $\text{RMN}^{13}\text{C}$ .

Luego, podemos resumir los resultados en la Tabla 14.

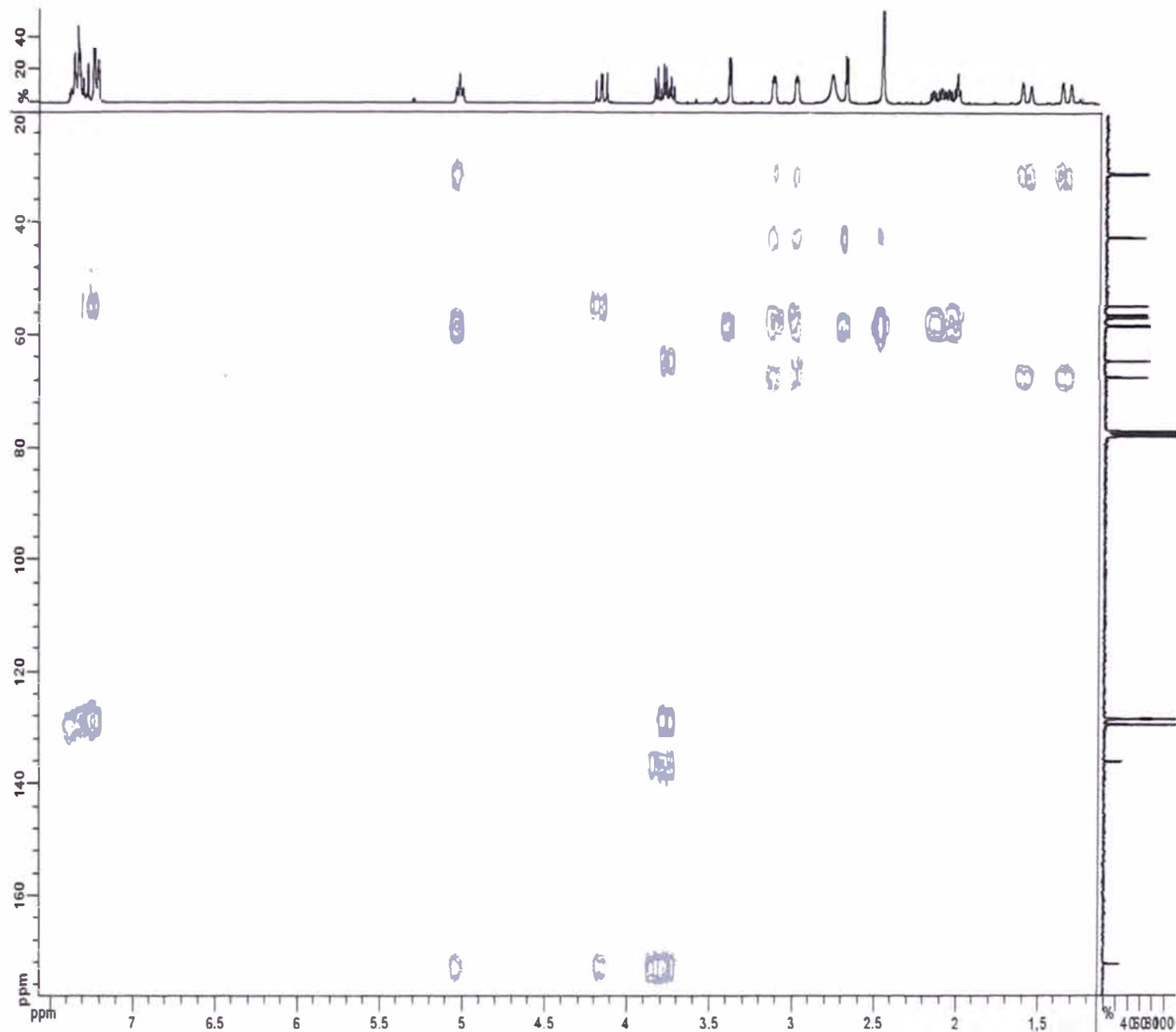
### d) Conclusión

Existe correspondencia entre la conectividad C-H a través de uno, dos y tres enlaces, esperada para la escopolamina.

**Tabla 14.** Correlaciones  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  del espectro HMBC de la escopolamina en  $\text{CDCl}_3$ .

<b>Nº de átomo de carbono</b>	<b><math>\delta</math> (ppm)</b>	<b>Hidrógenos correlacionados</b>
C-2	30,7	H-1, H-4eq
C-4	30,9	H-2eq, H-3, H-5
C-9	42,1	H-1, H-5,
C-2'	54,3	H-3'a, H-3'b
C-7	55,9	H-1
C-6	56,4	H-1, H-5
C-1	57,7	H-2ax, H-3, H-6
C-5	57,8	H-3, H-6, H-7, H-9
C-3'	64,0	H-2'
C-3	66,9	H-2ax, H-2eq, H-4ax, H-4eq
C- <i>p</i>	128,0	H- <i>o</i>
C- <i>o</i>	128,1	H-2'
C- <i>m</i>	129,0	H- <i>m</i>
C- <i>i</i>	135,6	H-2', H- <i>m</i>
C-1'	171,9	H-3, H-2', H-3'a, H-3'b

Parameters  
 bc-bc02pp (escopolamina) HMBC (HMBC 1H/  
 F1 :  
 - Size : 256 points real  
 - Spectral Width : 16722.408 Hz  
 - Carrier Frequency : 75.48531 MHz  
 - Nucleus : 13C  
 F2 :  
 - Size : 2048 points real  
 - Spectral Width : 2408.4778 Hz  
 - Carrier Frequency : 300.17123 MHz  
 - Nucleus : 1H  
 Type : HMBC  
 Spectro : BRUKER 300 MHz  
 Probe : 5 mm QNP 1H/13C/31P/19F Z-GRD Z  
 Temperature : 299.9 K  
 Solvent : CDCl3



**Espectro 9.** Espectro HMBC (300 MHz) de la escopolamina obtenida de las hojas de *D. candida*

## H. Identificación Espectroscópica de la norescopolamina\*

La determinación estructural de la norescopolamina obtenida de las hojas de la “Misha rastrera” (*D. candida*) se realizó de la misma manera que para la escopolamina mediante el análisis de sus espectros de Masas (HRMS e IE), RMN<sup>1</sup>H, RMN<sup>13</sup>C, <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY, <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HMQC, <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HMBC e IR.

### 1. Espectro de masas – HRMS (Espectro 10)

#### a) Condiciones de trabajo

- i Equipo: Espectrómetro de masas Waters – Micromass. Tipo: ESI-TOF. Modo de Ionización: ESI/Alta resolución.
- ii Laboratorio: Laboratorio de Espectrometría de Masas, Institut de Chimie des Substances Naturelles - ICSN, Gif-sur-Ivette, Francia.
- iii Operador: Personal especializado del laboratorio – ICSN.
- iv Fecha: 15.Set.06.
- v Muestra: Alcaloide B (CPP1/fl 7-23, pág. 74).

#### b) Características del espectro

**m/z:** 290,1 (100%, [M + H]<sup>+</sup>); 291,2 (10,3%, [M + 2H]<sup>+</sup>); 312,1 (4,3%, [M + Na]<sup>+</sup>).

#### c) Análisis del espectro

El pico a 290,1 y 291,2 m/z corresponde a los iones formados por la molécula con uno y dos átomos de hidrógeno respectivamente. El pico a 312,1 representa al ion formado por la molécula con un átomo de sodio.

Luego, la masa del compuesto aislado será 289,1. El valor de masa exacta dado por el equipo es 289,6722.

\* Debe tenerse presente que la diferencia entre la escopolamina y la norescopolamina es la ausencia del grupo metil enlazado al átomo de nitrógeno y su reemplazo por un átomo de hidrógeno.

**d) Conclusión**

El valor de masa obtenido corresponde a la masa molecular de la norescopolamina.

**2. Espectro de masas – EI (70eV) (Espectro 11)****a) Condiciones de trabajo**

- i Equipo: Espectrómetro de masas Thermo-Finnigan. Tipo: GC/MS Quadripole. Modo de Ionización: IE.
- ii Laboratorio: Laboratorio de Espectrometría de Masas. Institut de Chimie des Substances Naturelles - ICSN, Gif-sur-Ivette, Francia.
- iii Operador: Personal especializado del laboratorio – ICSN.
- iv Fecha: 15.Set.06.
- v Muestra: Alcaloide B (CPP1/f17-23, pág. 74).

**b) Características del espectro**

$m/z$ : 289 (ion molecular, 3,75%), 140 (6,89%), 122 (pico base, 100%), 94 (55,63%), 80 (56,25), 43 (19,38%).

**c) Análisis del espectro**

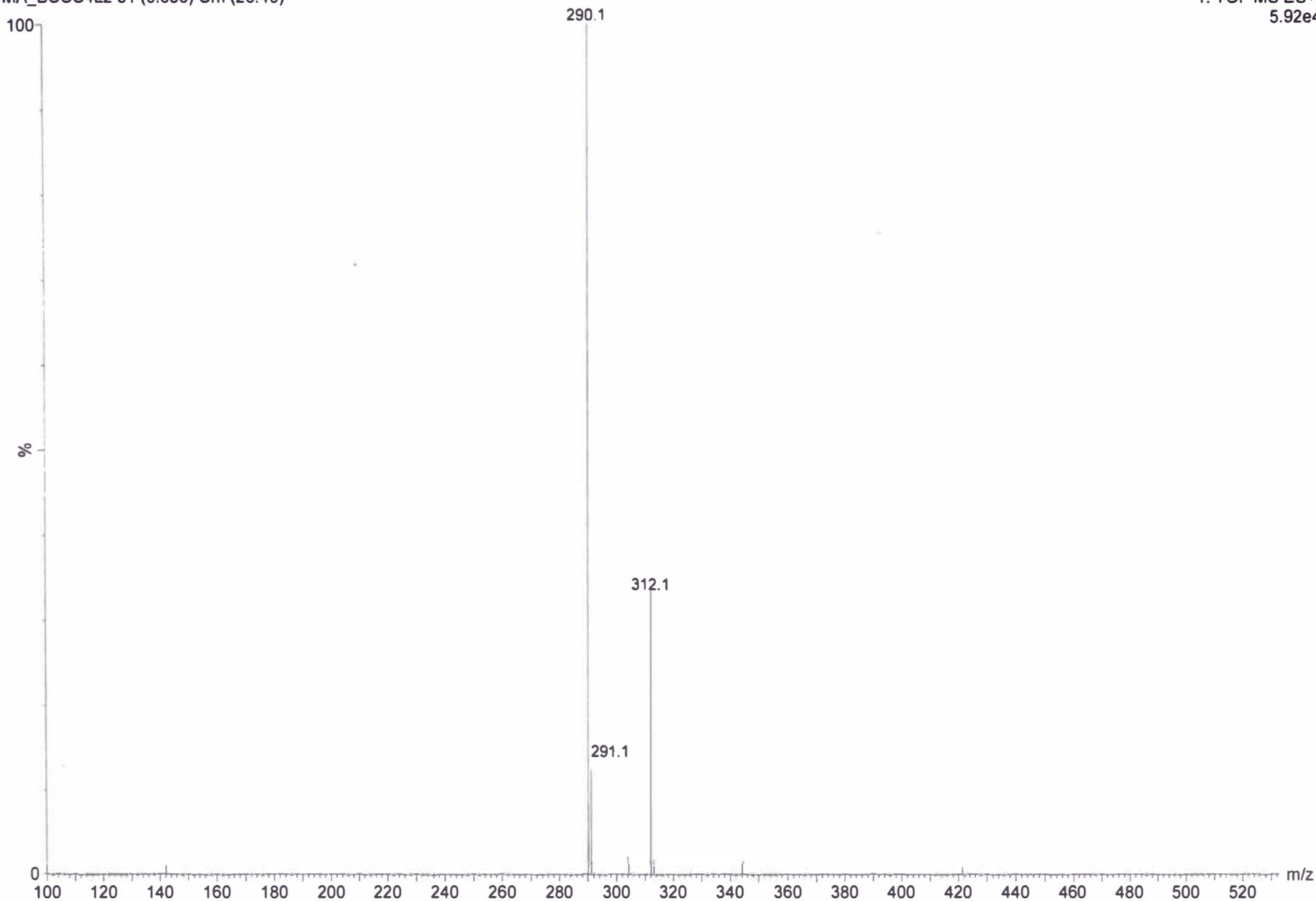
La identificación de los cinco fragmentos iónicos correspondientes a los picos  $m/z$  289, 140, 122, 94, 80 y 43 se realizó tomando como base el análisis similar hecho para la escopolamina (ver Sec. I.A.4, pág. 15).

**d) Conclusión**

El espectro obtenido corresponde a lo esperado para la norescopolamina.

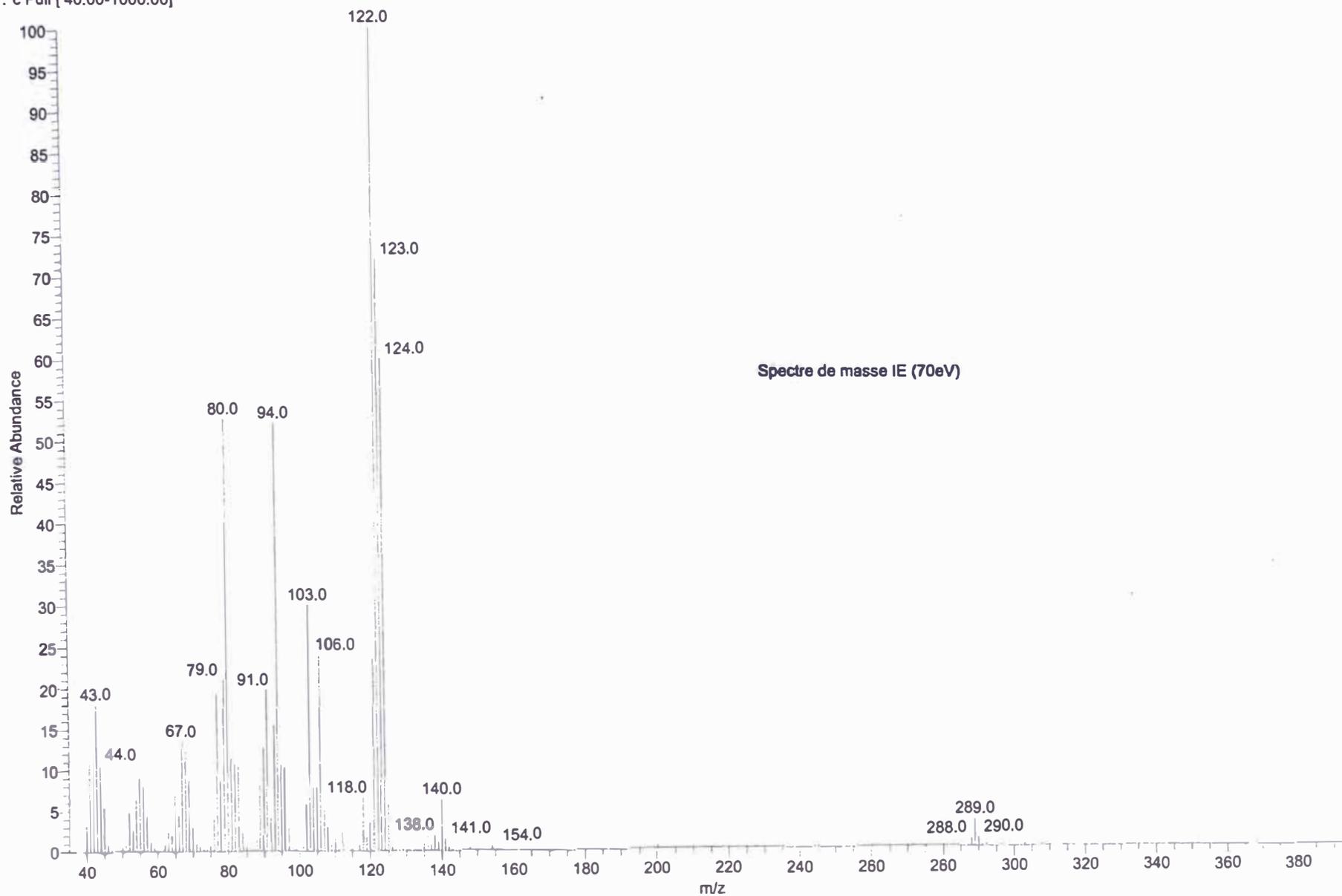
Z0511 / CABANILLAS / BC CC4L2 / MeOH+CH2Cl2  
MA\_BCCC4L2 31 (0.636) Cm (26:40)

1: TOF MS ES+  
5.92e4



**Espectro 10.** Espectro de masas de alta resolución (HRMS) de la norescopolamina obtenida de las hojas de *D. candida*.

#10-29 RT: 0.18-0.43 AV: 20 SB: 25 0.06, 1.39-1.69 NL: 8.20E6  
T: c Full [40.00-1000.00]



**Espectro 11.** Espectro de masas (IE) de la norescopolamina obtenida de las hojas de *D. candida*.

### 3. Espectro de RMN<sup>1</sup>H (Espectro 12)

#### a) Condiciones de trabajo

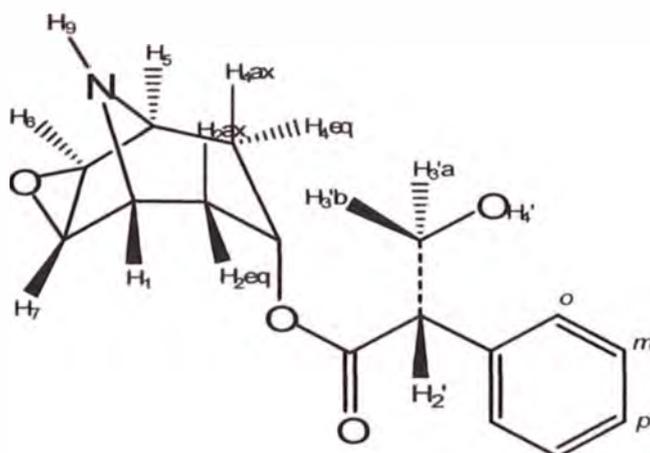
- i Equipo: Bruker AC-300 (300 MHz).
- ii Laboratorio: Laboratorio de Resonancia Magnética Nuclear, Institut de Chimie des Substances Naturelles - ICSN, Gif sur Yvette, Francia.
- iii Operador: Billy Cabanillas.
- iv Fecha: 15.Set.06.
- v Solvente: CDCl<sub>3</sub>.
- vi Muestra: Alcaloide B (CPP1/f17-23, pág. 74).

#### b) Características del espectro

$\delta$  (ppm) : 1,35 (1H, d); 1,58 (1H, d); 1,95 (1H, ddd); 2,05 (1H, ddd) 2,44 (1H, d); 2,86 (1H, s) 2,98 (1H, dd); 3,13 (1H, dd); 3,19 (1H, d); 3,68 (1H, dd); 3,74 (1H, dd); 4,09 (1H, dd); 4,95 (1H, t); 7,15-7,32 (5H,m).

#### c) Análisis del espectro

La correspondencia entre los valores de desplazamientos químicos y cada uno de los protones, así como los valores de las constantes de acoplamiento, pertenecientes a la estructura de la norescopolamina se indican en la estructura de la molécula (Figura 15) y en la Tabla 15.



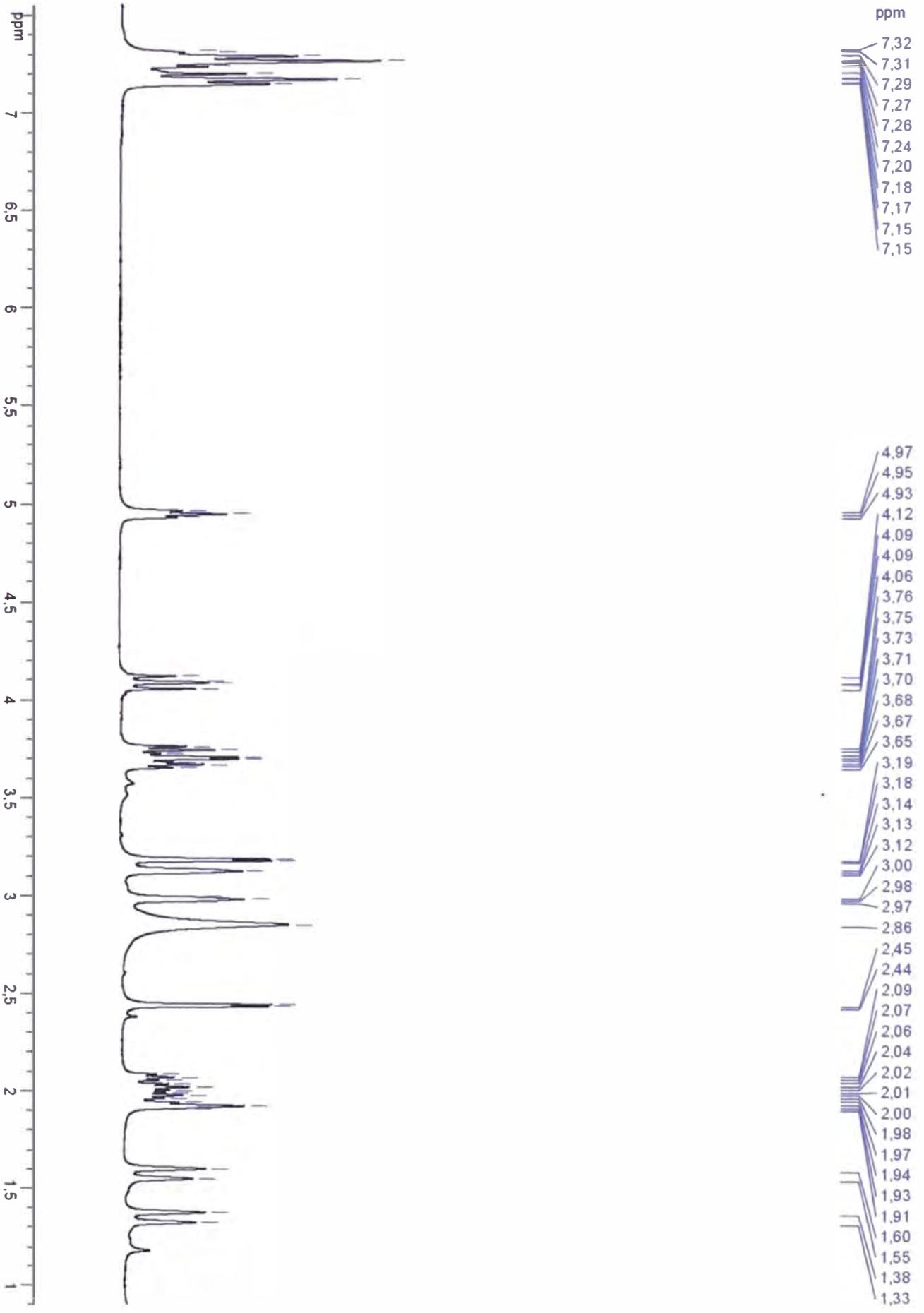
**Figura 15.** Asignaciones de los átomos de hidrógeno en la norescopolamina.

**Tabla 15.** Datos del espectro RMN<sup>1</sup>H de la norescopolamina (300 MHz) en CDCl<sub>3</sub>

$\delta$ (ppm)	Nº de átomo Hidrógeno	Tipo de Señal	Constante de acoplamiento (Hz)	Integración
1,35	H-2eq	d	15,5	1H
1,58	H-4eq	d	15,1	1H
1,95	H-2ax	ddd	15,5/5,1/4	1H
2,05	H-4eq	ddd	15,1/ 5,1/4	1H
2,44	H-7	d	2,9	1H
2,86	H-9, H4'	s	-	2H
2,98	H-1	dd	4/3,5	1H
3,13	H-5	dd	4/3,5	1H
3,19	H-6	d	2,9	1H
3,68	H-11	dd	8,5/5,1	1H
3,74	H-12b	dd	10,7/5,1	1H
4,09	H-12a	dd	10,7/8,5	1H
4,95	H-3	t	5,1	1H

**d) Conclusión**

El espectro RMN<sup>1</sup>H obtenido corresponde a lo esperado para la estructura de la norescopolamina.



**Espectro 12.** Espectro de RMN<sup>1</sup>H (300 MHz) de la norescopolamina obtenida de las hojas de *D. candida*.

#### 4. Espectro de RMN<sup>13</sup>C (Espectros 13, 14 y 15)

##### a) Condiciones de trabajo

- I Equipo: Bruker AC-300, (300 MHz).
- II Laboratorio: Laboratorio de Resonancia Magnética Nuclear, Institut de Chimie des Substances Naturelles, Gif-sur-Ivette, Francia.
- III Operador: Billy Cabanillas.
- IV Fecha: 15.Set.06.
- V Solvente: CDCl<sub>3</sub>.
- VI Muestra: Alcaloide B (CPP1/f17-23, pág. 74).

##### b) Características del espectro DEPT-90 (Espectro 13)

Este espectro muestra únicamente los carbonos terciarios.

$\delta$  (ppm): 51,7; 51,8; 53,4; 53,9; 54,3; 66,9; 128; 128,1; 129.

##### c) Características del espectro DEPT-135 (Espectro 14)

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

- I Señales de la parte superior:

$\delta$  (ppm): 51,7; 51,8; 53,4; 53,9; 54,3; 66,9; 128; 128,1; 129.

- II Señales de la parte inferior:

$\delta$  (ppm): 31; 31,2; 63,9.

##### d) Características del espectro de desacoplamiento de protón de banda ncha (Espectro 15)

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

$\delta$  (ppm): 31; 31,2; 51,7; 51,8; 53,4; 53,9; 54,3; 63,9; 66,9; 128; 128,1; 129; 135,7; 171,8.

### e) Análisis de los espectros DEPT-90 y DEPT-135

#### 1 Carbonos terciarios (CH)

Las nueve señales presentes en el espectro 12 (DEPT-90) corresponden a **carbonos terciarios (CH)**:

$\delta$  (ppm): 51,7 (C-2'); 51,8 (C-7); 53,4 (C-6); 53,9 (C-1); 54,3 (C-5) 66,9 (C-3); 128 (C-*p*); 128,1 (C-*o*); 129 (C-*m*).

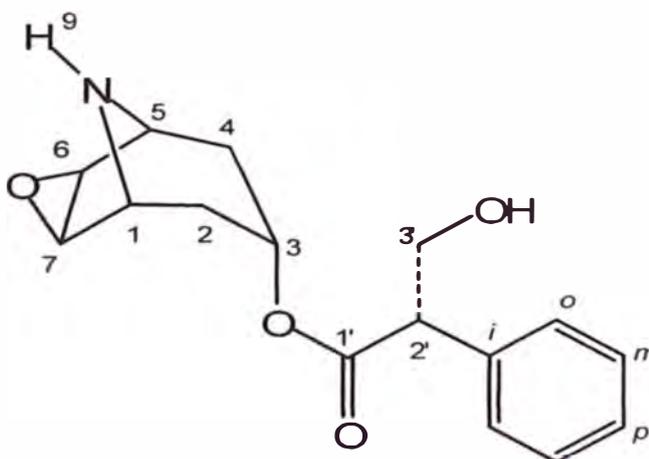
#### 11 Carbonos primarios (CH<sub>3</sub>)

En la norescopolamina la parte superior el espectro 13 (DEPT-135) es idéntica al espectro DEPT-90, debido a la **ausencia de carbonos primarios (CH<sub>3</sub>)**.

#### 11 Carbonos secundarios (CH<sub>2</sub>)

Las tres señales de la parte inferior del espectro DEPT-135 corresponden a los **carbonos secundarios (CH<sub>2</sub>)**:

11  $\delta$  (ppm): 31 (C-2); 31,2 (C-4); 63,9 (C-2').



**Figura 16.** Asignación de los átomos de carbono en la norescopolamina.

### f) Análisis del espectro de Desacoplamiento de protón de banda ancha

Adicionalmente a las señales registradas en los espectros DEPT-90 y DEPT-135, este espectro muestra dos señales a  $\delta = 135,7$  y  $171,8$  ppm, que

corresponden a los dos átomos de carbonos cuaternarios C-*i* y C-1' de la molécula de norescopolamina.

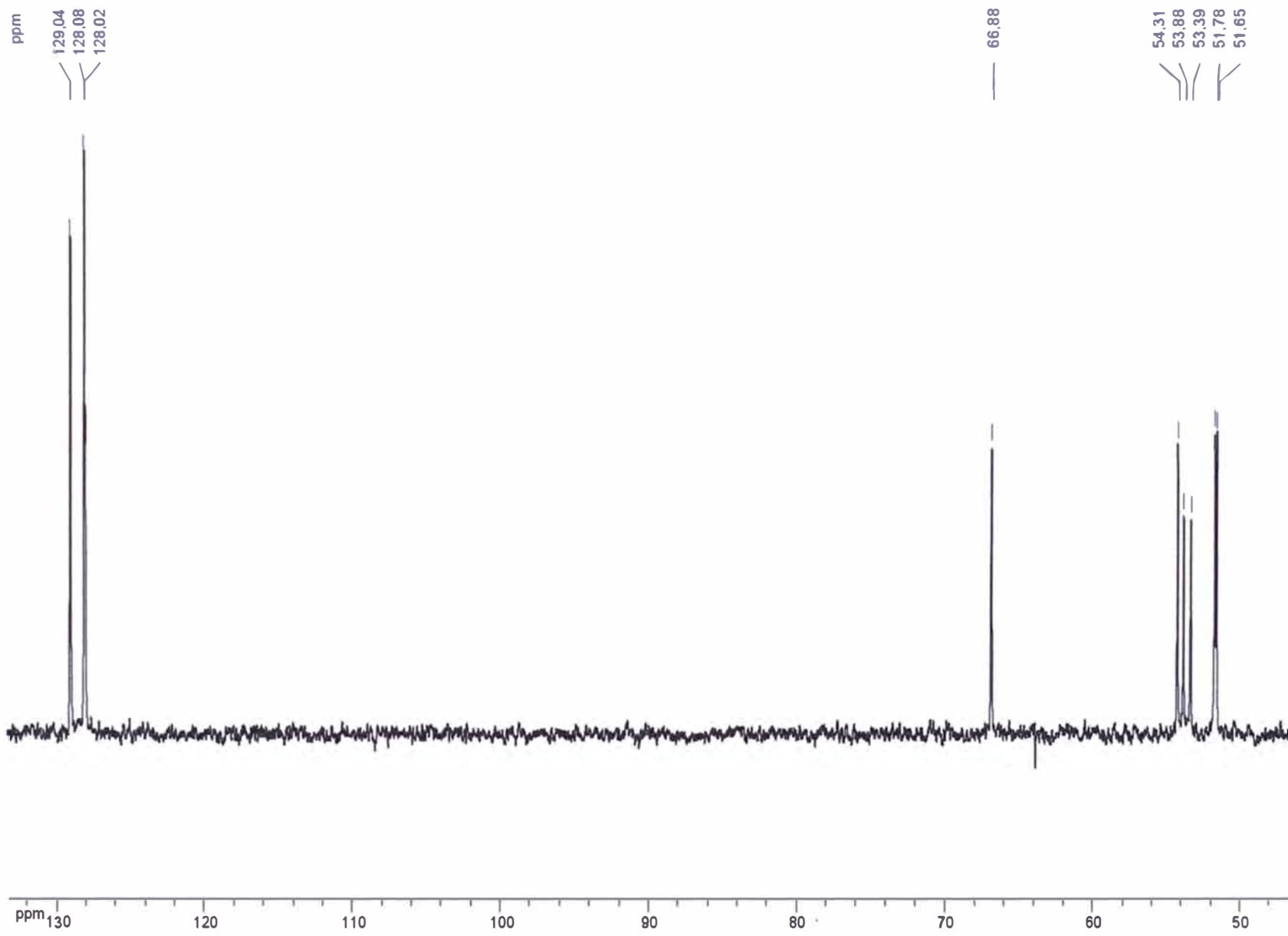
En resumen, los átomos de carbono de la molécula de norescopolamina tendrían los valores de desplazamiento químico ( $\delta$ ) indicados en la Tabla 16.

**Tabla 16.** Desplazamientos químicos,  $\delta$  (ppm), de los átomos de carbono de la norescopolamina en CDCl<sub>3</sub>.

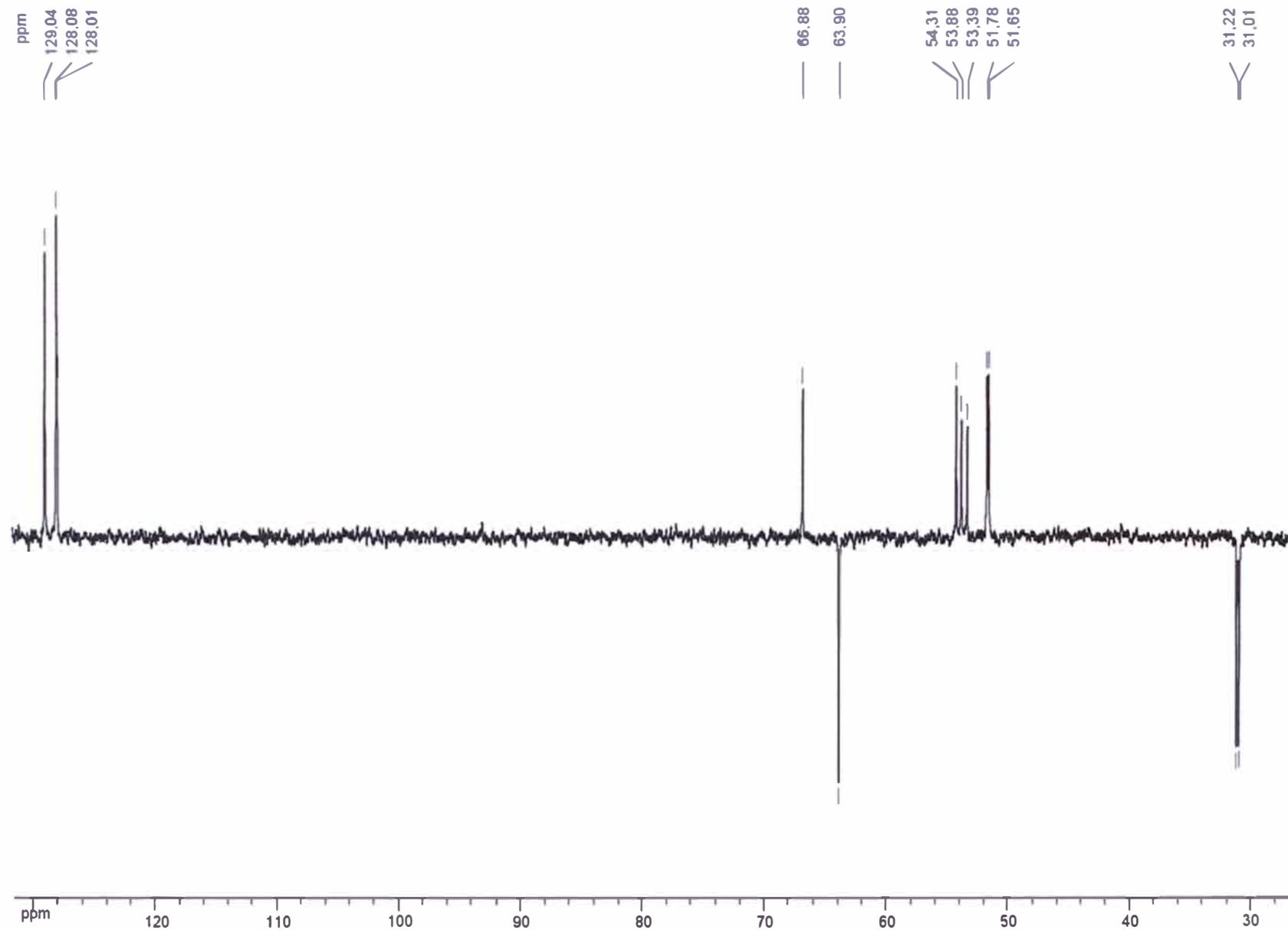
$\delta$ (ppm)	Nº de átomo de carbono	Tipo de carbono
31,0	C-2	CH <sub>2</sub> (secundario)
31,2	C-4	CH <sub>2</sub> (secundario)
51,7	C-2'	CH <sub>2</sub> (secundario)
51,8	C-7	CH (terciario)
53,4	C-6	CH (terciario)
53,9	C-1	CH (terciario)
54,3	C-5	CH (terciario)
63,9	C-3'	CH <sub>2</sub> (secundario)
66,9	C-3	CH (terciario)
128,0	C- <i>p</i>	CH (aromático)
128,1	C- <i>o</i>	C (aromático)
129,0	C- <i>m</i>	CH (aromático)
135,7	C- <i>i</i>	CH (aromático)
171,8	C-1'	C (C=O)

#### d) Conclusión

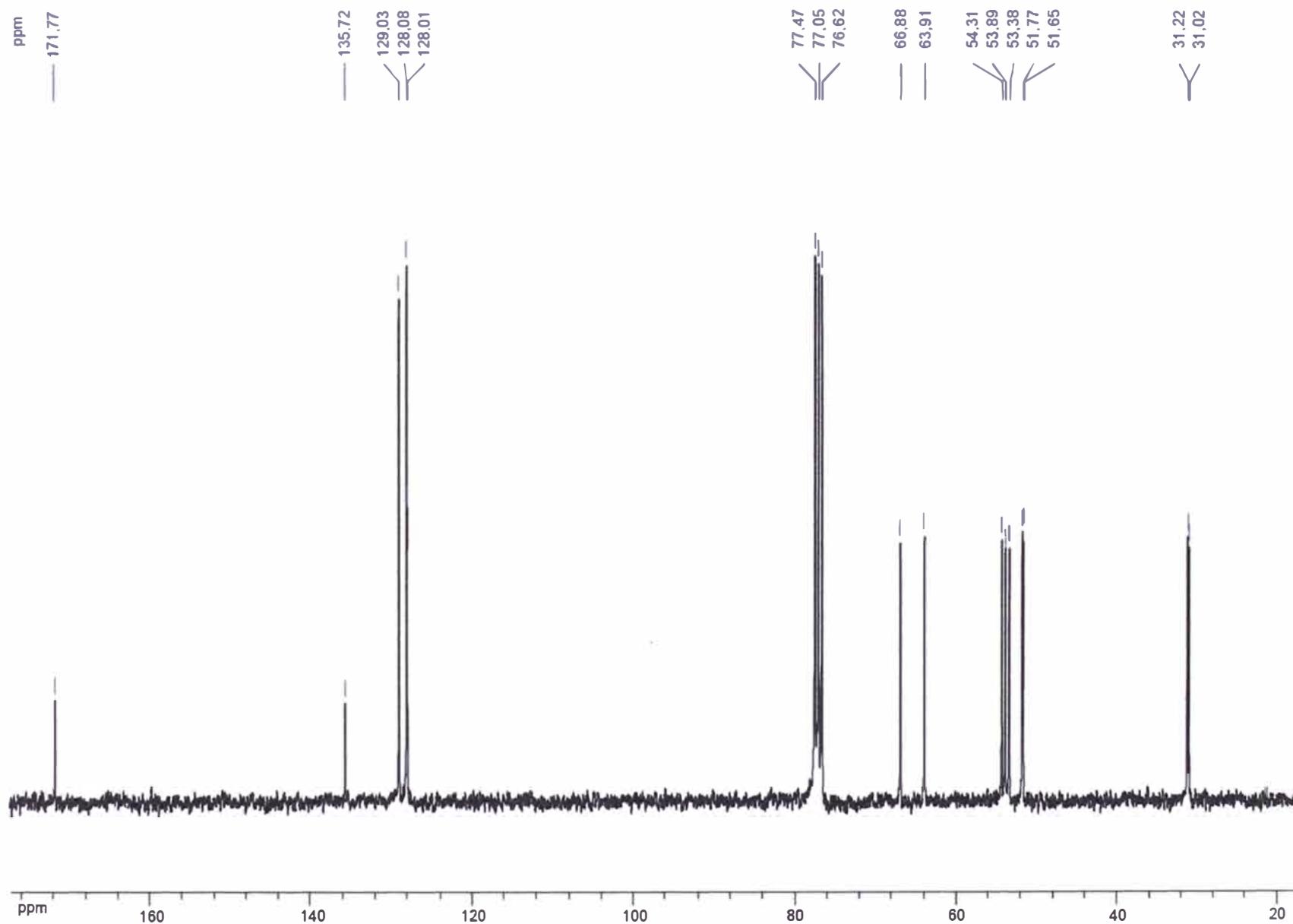
Los espectros DEPT-90, DEPT-135 y Desacoplamiento de protón de banda ancha presentados corresponden a lo esperado para la estructura de la norescopolamina.



**Espectro 13.** Espectro DEPT-90 (75,4 MHz) de la norescopolamina obtenida de las hojas de *D. candida*.



**Espectro 14.** Espectro DEPT-135 (75,4 MHz) de la norescopolamina obtenida de las hojas de *D. candida*.



**Espectro 15.** Espectro RMN <sup>13</sup>C (75,4 MHz) de la escopolamina obtenida de las hojas de *D. candida*.

## 5. Espectro $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ COSY (Espectro 16)

### a) Condiciones de trabajo

- i Equipo: Bruker AC-300, (300 MHz).
- ii Laboratorio: Laboratorio de Resonancia Magnética Nuclear, Institut de Chimie des Substances Naturelles, Gif sur Yvette, Francia.
- iii Operador: Billy Cabanillas.
- iv Fecha: 15.Set.06.
- v Solvente:  $\text{CDCl}_3$ .
- vi Muestra: Alcaloide B (CPP1/f17-23, pág. 74).

### b) Características del espectro

La cantidad de marcas simétricas, a lo largo de un lado de la diagonal del espectro, indica el número de acoplamientos\*. Luego, existen en total once acoplamientos entre los diferentes protones de la molécula (ver Espectro 16).

### c) Análisis del espectro

Como se ha mostrado la estructura de la norescopolamina es casi idéntica a la de la escopolamina. La ausencia del metilo  $\text{N-CH}_3$  en la norescopolamina no influye en el número de correlaciones en el espectro COSY. Así, el espectro COSY de la norescopolamina es muy similar al de la escopolamina. Por lo tanto, el análisis realizado para el espectro de la norescopolamina es similar a aquel de la escopolamina (pág. 90) y los resultados obtenidos se ilustran en la Tabla 17.

### d) Conclusión

Este espectro corresponde a lo esperado para la norescopolamina.

---

\* Los valores de las constantes de acoplamiento pueden ser calculados a partir del espectro de  $\text{RMN}^1\text{H}$ .

**Tabla 17.** Correlaciones COSY y constantes de acoplamiento  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  de la norescopolamina

<b>Nº de átomo de hidrógeno</b>	<b><math>\delta</math> (ppm)</b>	<b>Hidrógenos acoplados y constantes de acoplamiento (Hz)</b>
H-2eq	1,35	H-2ax (15,5); H-1 (3,2)
H-4eq	1,58	H-4ax (15,1); H-5 (3,2)
H-2ax	1,95	H-2eq (15,5); H-3 (4,5); H-1 (4,5)
H-4ax	2,05	H-4eq (15,1); H-3 (4,5); H-5 (4,5)
H-7	2,44	H-6 (2,8)
H-1	2,86	H-2ax (3,5); H-2eq (3,5)
H-5	2,98	H-4ax (3,5); H-4ax (3,5)
H-6	3,13	H-7 (2,8)
H-2'	3,19	H-3'a (8,5); H-3'b (5,1)
H-3'b	3,68	H-3'a (10,7); H-2' (5,1)
H-3'a	3,74	H-2' (10,6); H-3'b (8,5)
H-3	4,09	H-2ax (5,1); H-4ax (5,1)

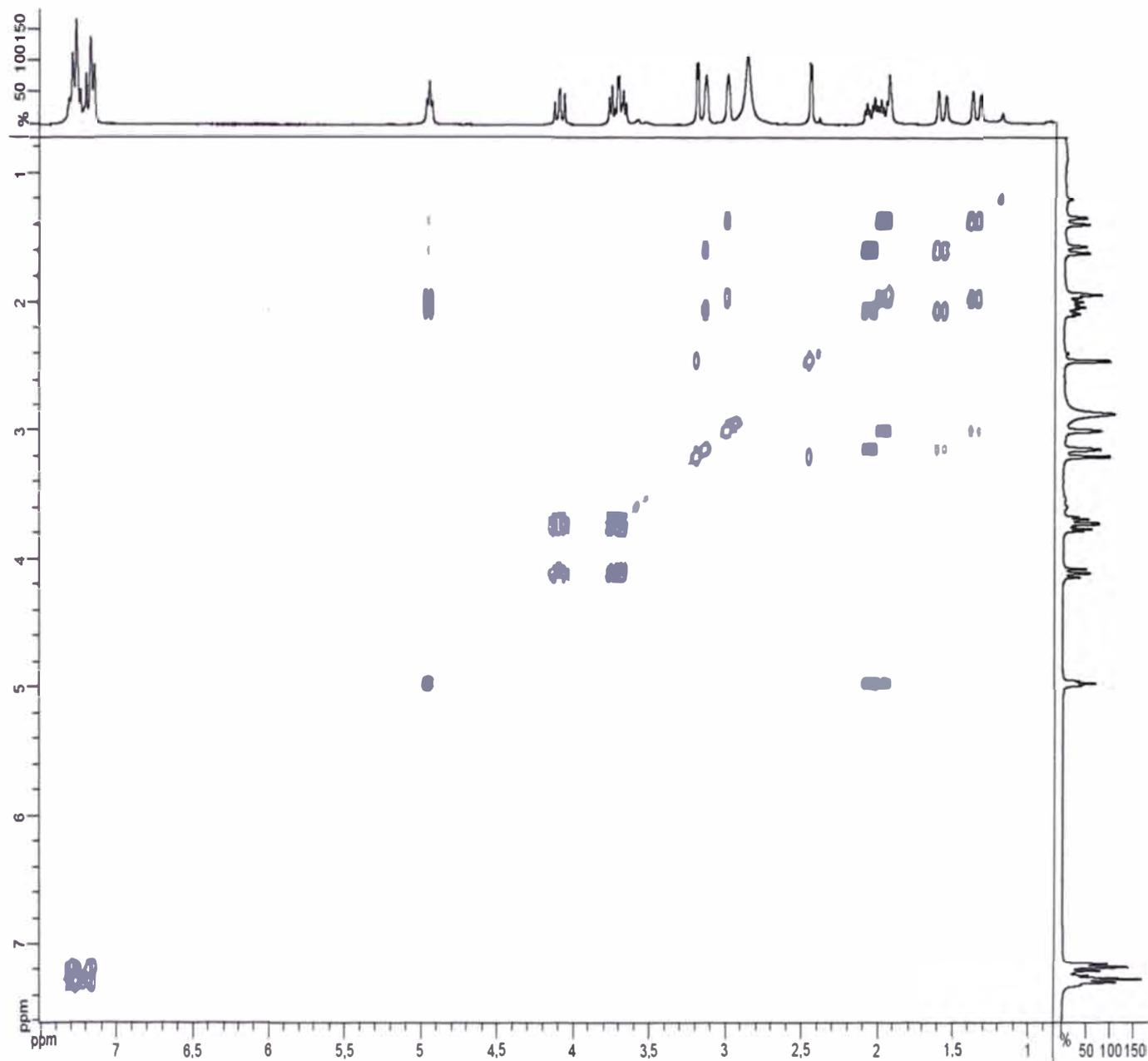
Parameters  
 bc-bc.cc4f1723.L2 (norescopolamina) cosy (C)

F1:  
 - Size : 512 points real  
 - Spectral Width : 2422.4807 Hz  
 - Carrier Frequency : 300.17126 MHz  
 - Nucleus : 1H

F2:  
 - Size : 2048 points real  
 - Spectral Width : 2422.4807 Hz  
 - Carrier Frequency : 300.17126 MHz  
 - Nucleus : 1H

Type : COSY  
 Spectro : BRUKER 300 MHz  
 Probe : 5 mm QNP 1H/13C/31P/19F Z-GRD Z

Temperature : 299.4 K  
 Solvent : CDCl3



**Espectro 16.** Espectro COSY (300 MHz) de la norescopolamina obtenida de las hojas de *D. candida*.

## 6. Espectro $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ HMQC (Espectro 17)

### a) Condiciones de trabajo

- i Equipo: Bruker AC-300, (300 MHz).
- ii Laboratorio: Laboratorio de Resonancia Magnética Nuclear, Institut de Chimie des Substances Naturelles, Gif sur Yvette, Francia.
- iii Operador: Billy Cabanillas.
- iv Fecha: 15.Set.06.
- v Solvente:  $\text{CDCl}_3$ .
- vi Muestra: Alcaloide B (CPP1/f17-23, pág. 74).

### b) Características del espectro

En este espectro se presentan 13 marcas correspondientes a las correlaciones C-H a través de un solo enlace, uno menos que en el caso de la escopolamina debido a la ausencia de un metilo ( $\text{N-CH}_3$ ) (ver Espectro 17).

### c) Análisis del espectro

Las correlaciones HMQC entre los átomos de carbono e hidrógeno de la molécula muestran concordancia con la conectividad C-H indicada en los espectros de  $\text{RMN}^1\text{H}$  y  $\text{RMN}^{13}\text{C}$ .

Luego, podemos resumir los resultados en la Tabla 18.

### d) Conclusión

El espectro HMQC obtenido para nuestro compuesto corresponde al esperado para la norescopolamina.

**Tabla 18.** Correlaciones  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  del espectro HMQC de la norescopolamina en  $\text{CDCl}_3$ .

<b>Nº de átomo de carbono</b>	<b><math>\delta</math> (ppm)</b>	<b>Hidrógenos correlacionados</b>
C-2	31,0	H-2eq , H-2ax
C-4	31,2	H-4eq , H-4ax
C-13	51,7	H-11
C-7	51,8	H-7
C-6	53,4	H-6
C-1	53,9	H-1
C-5	54,3	H-5
C-14	63,9	H-12a, H-12b
C-3	66,9	H-3

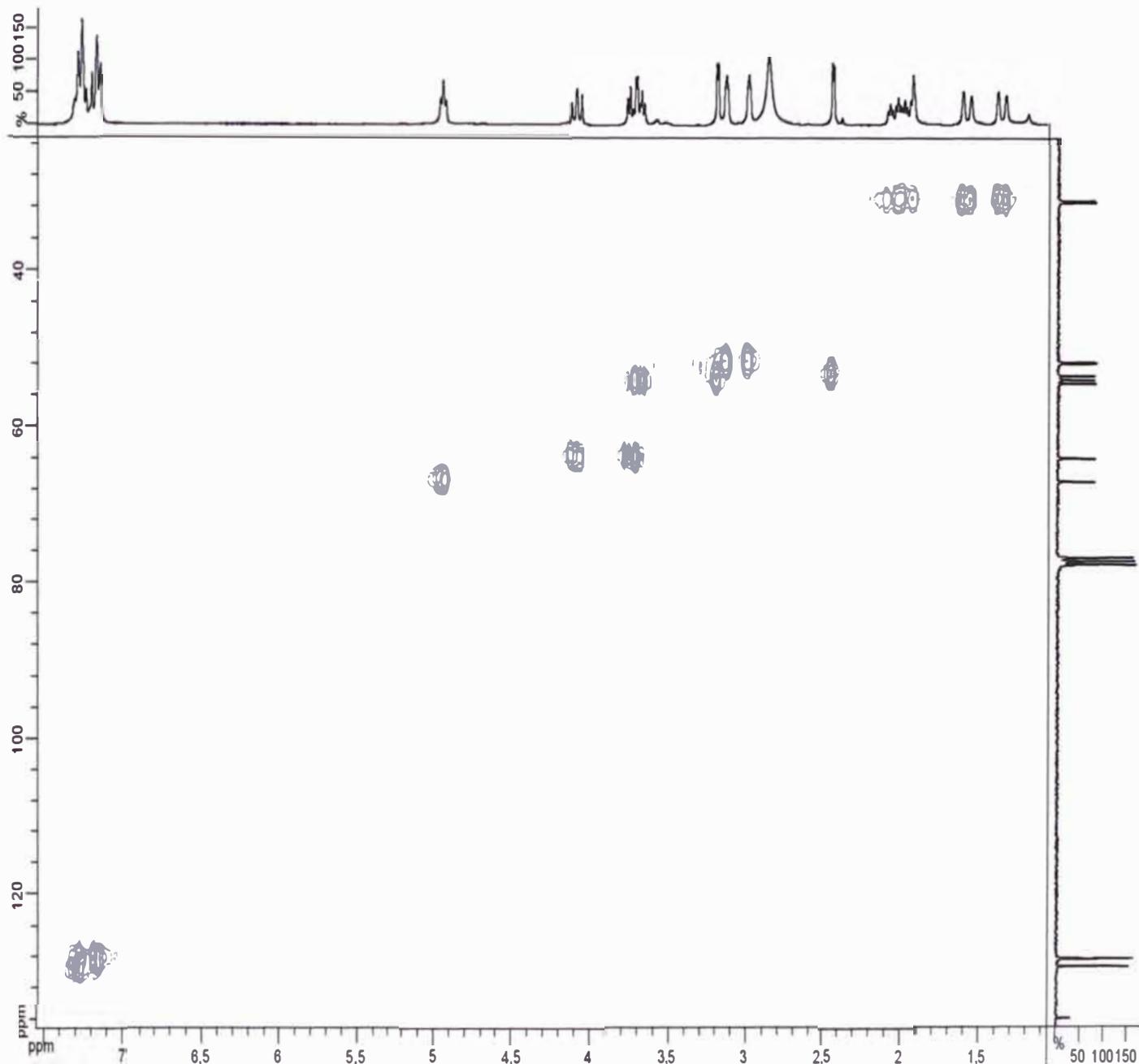
Parameters  
bc-bc.cc4f1723.L2 (norescopolamina) hmqc (f

F1 :  
- Size : 256 points real  
- Spectral Width : 12500.0 Hz  
- Carrier Frequency : 75.48347 MHz  
- Nucleus : 13C

F2 :  
- Size : 1024 points real  
- Spectral Width : 2422.4807 Hz  
- Carrier Frequency : 300.17126 MHz  
- Nucleus : 1H

Type : HMBC  
Spectro : BRUKER 300 MHz  
Probe : 5 mm QNP 1H/13C/31P/19F Z-GRD Z

Temperature : 299.6 K  
Solvent : CDCl3



**Espectro 17.** Espectro HMQC (300 MHz) de la norescopolamina obtenida de las hojas de *D. candida*.

## 7. Espectro $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ HMBC (Espectro 18)

### a) Condiciones de trabajo

- i Equipo: Bruker AC-300, (300 MHz).
- ii Laboratorio: Laboratorio de Resonancia Magnética Nuclear. Institut de Chimie des Substances Naturelles, Gif sur Yvette, Francia.
- iii Operador: Billy Cabanillas.
- iv Fecha: 15.Set.06.
- v Solvente:  $\text{CDCl}_3$ .
- vi Muestra: Alcaloide B (CPP1/f1 7-23, pág. 74).

### b) Características del espectro

En este espectro se presentan las marcas correspondientes a las correlaciones C-H a través de uno, dos o tres enlaces (ver Espectro 18).

### c) Análisis del espectro

Las correlaciones HMBC entre los átomos de carbono e hidrógeno de la molécula muestran concordancia con la conectividad C-H indicada en los espectros de  $\text{RMN}^1\text{H}$  y  $\text{RMN}^{13}\text{C}$ .

Luego, podemos resumir los resultados en la Tabla 19.

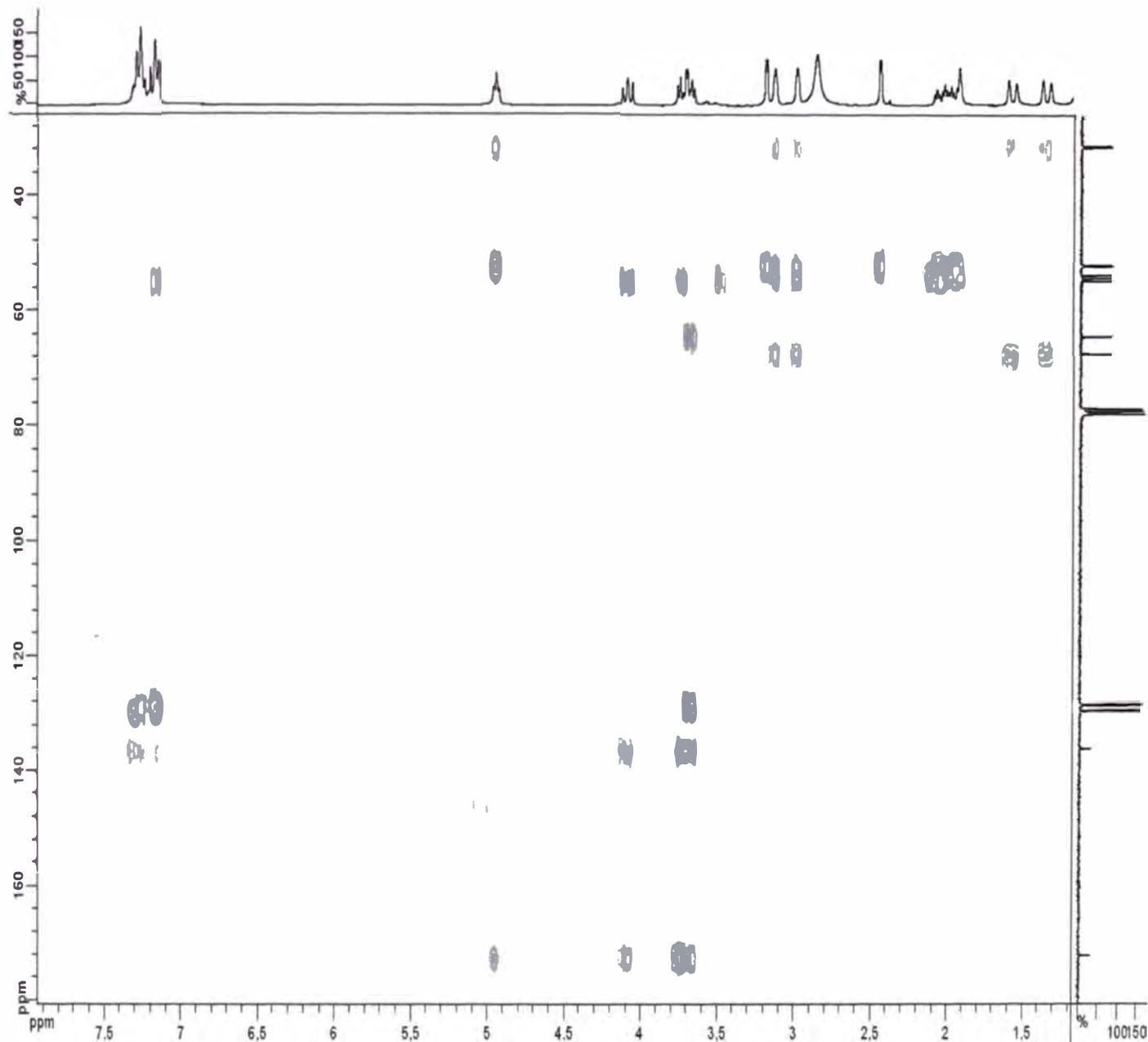
### d) Conclusión

Existe correspondencia entre la conectividad C-H a través de uno, dos y tres enlaces, esperada para la norescopolamina.

**Tabla 19.** Correlaciones  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  del espectro HMBC de la norescopolamina en  $\text{CDCl}_3$ .

<b>Nº de átomo de carbono</b>	<b><math>\delta</math> (ppm)</b>	<b>Hidrógenos correlacionados</b>
C-2	31,0	H-1, H-4eq
C-4	31,2	H-2eq, H-3, H-5
C-2'	51,7	H-3'a, H-3'b
C-7	51,8	H-1
C-6	53,4	H-1, H-5
C-1	53,9	H-2ax, H-3, H-6
C-5	54,3	H-3, H-6, H-7, H-9
C-3'	63,9	H-2'
C-3	66,9	H-2ax, H-2eq, H-4ax, H-4eq
C- <i>p</i>	128,0	H- <i>o</i>
C- <i>o</i>	128,1	H-2'
C- <i>m</i>	129,0	H- <i>m</i>
C- <i>i</i>	135,7	H-2', H-3'a, H-3'b, H- <i>m</i>
C-1'	171,8	H-3, H-2', H-3'a, H-3'b

Parameters  
 bc-bc.cc4f1723.L2 (norescopolamina) hmbc (f-  
 F1 :  
 - Size : 256 points real  
 - Spectral Width : 16722.408 Hz  
 - Carrier Frequency : 75.48531 MHz  
 - Nucleus : <sup>13</sup>C  
 F2 :  
 - Size : 2048 points real  
 - Spectral Width : 2422.4807 Hz  
 - Carrier Frequency : 300.17126 MHz  
 - Nucleus : <sup>1</sup>H  
 Type : HMBC  
 Spectro : BRUKER 300 MHz  
 Probe : 5 mm QNP 1H/13C/31P/19F Z-GRD Z  
 Temperature : 299.6 K  
 Solvent : CDCl<sub>3</sub>



**Espectro 18.** Espectro HMBC (300 MHz) de la norescopolamina obtenida de las hojas de *D. candida*

***RESULTADOS Y***

***CONCLUSIONES***

## RESULTADOS

1. A partir de 600 g de hojas de la Misha rastrea (*Datura candida*), seca y molida se obtuvo mediante extracción por solventes y partición líquido-líquido el Extracto Bruto de Alcaloides (1964 mg). Una parte de este extracto se purificó mediante cromatografía en columna, seguido de cromatografía en placa preparativa, obteniéndose así 65 mg de escopolamina y 18 mg de norescopolamina; ambos productos se presentaron como un líquido resinoso de color pardo.

La caracterización de los dos compuestos se realizó mediante sus espectros de Masas, RMN<sup>1</sup>H, RMN<sup>13</sup>C, COSY, HMQC y HMBC correspondiendo todos ellos a los valores y características referidas en la bibliografía.

2. El análisis cualitativo de los metabolitos secundarios (marcha fitoquímica) presentes en las hojas de la Misha rastrea (*D. candida*), según el procedimiento de Rondina y Coussio (1969), indica que contiene: Aminogrupos primarios y/o secundarios (+), grupos fenólicos libres (++), triterpenos y esteroides (++), alcaloides (+++), catequinas (++), taninos (+) y saponinas (+).
3. El análisis cuantitativo del total de alcaloides contenidos en las hojas de la Misha rastrea (*D. candida*), mediante el procedimiento de Pelt *et al.* (1967) proporciona 0,45%. Este valor es superior al publicado por Evans, Bristol & Lampard (1969) e inferior a aquel publicado por Griffin (1966).

## CONCLUSIONES

1. A partir de las hojas del toe (*D. candida*) se aisló la escopolamina y la norescopolamina, las cual ha sido identificadas mediante sus espectros de Masas, RMN<sup>1</sup>H, RMN<sup>13</sup>C, COSY, HMQC y HMBC.
2. Se realizó el análisis cualitativo de los metabolitos secundarios (marcha fitoquímica) presentes en las hojas de la Misha rastrera (*D. candida*), según el procedimiento de Rondina y Coussio (1969), logrando verificar la presencia de: Aminogrupos primarios y/o secundarios (+), grupos fenólicos libres (++) , triterpenos y esteroides (++) , alcaloides (+++), catequinas (++) , taninos (+) y saponinas (+).
3. Se realizó el análisis cuantitativo del total de alcaloides de las hojas de la Misha rastrera (*D. candida*), según el procedimiento de Pelt *et al.* (1967), habiendo obtenido 0,45%.

# ***BIBLIOGRAFÍA***

## BIBLIOGRAFÍA

1. Backvall, J.E.; Schink, H.E.; Pettersson, H. *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 8, 1243-1253. "Stereocontrolled Epoxidations of Cycloheptene Derivatives in the Palladium-Catalyzed Route to Tropane Alkaloids. Total Syntheses of Scopolamine and Pseudoscopolamine".
2. Bussmann, R.W.; Sharon, D. *J. Ethnobot. Ethnomed.* **2006**, *2*, 47-54 y información suplementaria pág.71. "Traditional medicinal plant use in Northern Peru: tracking two thousand years of healing culture".
3. Breitmaier, M., *Structure Elucidation by NMR in Organic Chemistry: A Practical Guide*, John Wiley & Sons Ltd., England, 2002. Págs. 30-40.
4. Bristol, M.; Evans, W.; Lampard, J. *Lloydia* **1969**, *32*, 123-130. "The Alkaloids of the Genus *Datura*, Section *Brugmansia*. Part VI. Tree *Datura* Drugs (*Datura candida* cvs.) of the Colombian Sibundoy".
5. Cabieses, F., *Apuntes de Medicina Tradicional*, CONCYTEC, Lima, 1993, págs. 192-193.
6. Chazin, W.; Colebrook, L. *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 1243-1253. "Use of Proton Spin-Lattice Relaxation and Nuclear Overhauser Effect Data in Structure Analysis of Alkaloids".
7. Córdor, E., *Estudio Químico de la semillas del "Toe" (Brugmansia sanguinea (R. & P.) D. Don)*. Tesis de Licenciatura en Ciencias-Mención Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Ingeniería, Lima, 2000, 115 págs.
8. Dobó, G.; Fodor, G.; Janzso, I.; Koczor, J.; Tóth, J.; Vincze, I. *J. Chem. Soc.* **1959**, *11*, 3461-3463. "The Stereochemistry of the Tropane Alkaloids. Part XII. The Total Synthesis of Scopolamine".
9. Lounasmaa M.; T. Tamminen, *The Tropane Alkaloids*, 1-113. En: Cordell, G. (Ed.), *The Alkaloids. Chemistry and Pharmacology*, Vol. 44, Academic Press, Inc., London, 1993.
10. De Feo, V. *J. Ethnopharm.* **2003**, *85*, 243-256. "Ethnomedical field study in northern Peruvian Andes with particular reference to divination practices".
11. Dewick, P.A., *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*, 2nd. ed., John Wiley & Sons Ltd., 2002, págs. 292-294.

12. El Imam, Y.M.A.; Evans, W.C. *Fitoterapia* **1990**, *16*, 2, 148-152. "Alkaloids of a *Datura candida* cultivar, *D. aurea* and various hybrids".
13. Evans, W.C.; Partridge, M.W. *J. Pharm. Pharmacol.* **1952**, *4*, 769-780. "The Partition Chromatography of Alkaloids. Part IV. The Assay of Solanaceous Drugs".
14. Evans, W.C.; Wellendorf, M. *J. Chem. Soc.*, **1959**, 1406-1409. "The alkaloids of the roots of *Datura*".
15. Evans, W.C.; Pe Than, M. *J. Pharm. Pharmacol.* **1961**, 147-154. "The Alkaloids of the Genus *Datura*, Section *Brugmansia*. Part I. *D. cornigera* Hook".
16. Evans, W.C.; Major, V.A.; Pe Than, M. *Planta Médica* **1965**, *13*, 353-358. "The Alkaloids of the Genus *Datura*, Section *Brugmansia*. Part III. *Datura sanguinea* R. & P.".
17. Evans, W.C.; Major, V.A. *J. Chem. Soc.* **1966**, 1621-1623. "The Alkaloids of the Genus *Datura*, Section *Brugmansia*. Part IV. New Alkaloids of *D. sanguinea* R. & P.".
18. Evans, W.C.; Major, V.A. *J. Chem. Soc.* **1968**, 2775-2778. "The Alkaloids of the Genus *Datura*, Section *Brugmansia*. Part V. Alkaloids of *D. sanguinea* R. & P. and Related Esters of Tropane-3 $\alpha$ ,6 $\beta$ ,7 $\beta$ -triol".
19. Glaser, R.; Peng, Q.; Perlin, A. S. *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 2172-2180. "Stereochemistry of the N-Methyl Group in Salts of Tropane Alkaloids".
20. Humprey, A.J.; O'Hagan, D. *Nat. Prod. Rep.* **2001**, *18*, 494-502. "Tropane Alkaloid Biosynthesis. A Century Old Problem Unresolved".
21. Griffin, W.J. *Planta Medica* **1966**, *14*, 468-474. "Alkaloids of a *Datura candida* cultivar".
22. Griffin, W.J. *Phytochemistry* **1992**, *31*, 1, 367-368. "Alkaloids in *Datura*. Section *Brugmansia*. The peach flowered form of *Datura candida* sens lat."
23. Hoet, P.; Ríos, M. *Bol. Soc. Quim. Perú* **1980**, *46*, 113-121. "Estudio Cuantitativo de los Alcaloides Totales en *Datura stramonium* del Perú. Metodología".

24. Kite, G.C.; Leon, C. *Phytochemistry* **1995**, *40*, 4, 1093-1095. "Volatile compounds emitted from flowers and leaves of *Brugmansia × candida* (Solanaceae)".
25. LaPrévôté, O., *Spectrométrie de Masse Organique et Bio-organique*, 2001, 31 páginas. Curso del Laboratorio de Spectrométrie de Masse, Institut de Chimie des Substances Naturelles, UPR CNRS 2301, avenue de la Terrasse, 91 198 Gif-sur-Yvette cedex.
26. Lock de Ugaz, O., *Investigación Fitoquímica*, Fondo Editorial, Pontificia Universidad Católica del Perú, Lima, 1994, págs. 4-7.
27. Malpass, J.R.; Justice, D.E. *Tetrahedron* **1996**, *52*, 36, 11977-11994. "Total Synthesis of Scopine, Pseudoscopine, and Nor- Derivatives".
28. Mils III, T.; Conrad, J.; Matchett, C.; Simon, M.; Burns, M.; Ollis, R. *Instrumental data for Drug analysis*, Taylor & Francis, US, Vol. 4: págs. 2810-2811 y Vol. 6: pág. 4253.
29. Miranda, M., *Farmacognosia y Productos Naturales*, Universidad de La Habana, Cuba, 2002, págs. 41-49.
30. Moffat, A.C.; Osselton, M.D.; Widdop, B. (Eds.), *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons*, Pharmaceutical Press, England, 2005. (Versión en CD-ROM).
31. Muhtadi, F.J.; Hassan, M. *Analytical profile of scopolamine hydrobromide* en Florey, K. (Ed.), *Analytical profiles of drugs substances*, Vol. 19, Academic Press. Inc., London, 1990, págs. 477-497.
32. Mulholland, K.; Jewett, D.M.; Toorongian, S.A. *Appt. Radiat. Isot.* **1988**, *39*, 5, 373-379. "Routine Synthesis of N-[<sup>13</sup>C-Methyl] Scopolamine by Phosphite Mediated Reductive Methylation with [<sup>13</sup>C] Formaldehyde".
33. Nee, M., *Solanaceae I. Flora de Veracruz*, Fascículo 44, Instituto Nacional de Investigaciones sobre Recursos Bióticos, México, 1986, págs. 12-16.
34. Padula, L.; Bandoni, L.; Rondina, R.; Coussio, J. *Planta Médica*, **1976**, *29*, 357-360. "Quantitative determination of total alkaloids and scopolamine in *Datura ferox* growing in Argentina".
35. Pelt, J.; Vigneron, Cl; Younos, Ch. *Bull. Soc. Pharm. Nancy* **1967**, *72*, 12-23. "Comparaison de Diverses Méthodes Officielle Utilisées Pour le Dosage des Alcaloides des Solanacées".

36. Reyna, V., *Apuntes del curso de Química Orgánica IV-CQ 442*, (Espectrometría de Masas, de RMN, UV, IR en separatas), Escuela Profesional de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Ingeniería, Lima, 1999-a.
37. Reyna, V., *Marcha Fitoquímica, Práctica de Laboratorio (Separata)*, Curso de Química de Productos Naturales-CQ 046, Escuela Profesional de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Ingeniería, Lima, 1999-b, 5 págs.
38. Robins, R.; Payne, J.; Hamill, J.; Rhodes, M. *Planta Médica*, **1987**, *53*, 474-478. "Production of Hyoscyamine by <Hairy Root> Cultures of *Datura stramonium*".
39. Robins, D.; Watson, A.; Freer, I.; Walton, N. *J. Nat. Prod.*, **1993**, *56*, 8, 1234-1238. "Stereochemistry of the enzymic processes involved in the biosynthesis of scopolamine from hyoscyamine".
40. Rondina, R.; Coussio, J. *Revista de Investigaciones Agropecuarias-INTA (Argentina)* **1969**, *6*, 33, 351-366. "Estudio Fitoquímico de Plantas Medicinales".
41. Sarazin, C.; Goethals, G.; Séquin, J.; Barbotin, J. *Magnetic Resonance in Chemistry* **1991**, *29*, 291-300. "Spectral Reassignment and Structure Elucidation of Scopolamine Free Base Through Two-Dimensional NMR Techniques".
42. Schultes, R.A., *Hallucinogenic plants. Golden guide*, Golden Press, New York, 1976, págs. 146-148.
43. Schultes, R.; Hofmann, A. *Plantas de los Dioses. Orígenes del uso de los alucinógenos*, Fondo de Cultura Económica, México, 1993 (c.1979), págs. 128-131 (*Brugmansia*. Floripondio).
44. Shimomura, K., K. Yoshimatsu, K. Ishimaru and M. Sauerwein, *Tropane Alkaloids in Root Cultures of Solanaceous Plant*, en Atta-ur-Rahman (Ed.), *Studies in Natural Products Chemistry*, Vol. 17, Structure and Chemistry (Part D), Elsevier, 1995, págs. 416-419.
45. Southon, I. Buckingham, J. *Dictionary of Alkaloids*, Chapman and Hall, London, 1989, págs. 952-953.
46. The Merck Index, 12° Ed., 1996, pág. 1444 (escopolamina).

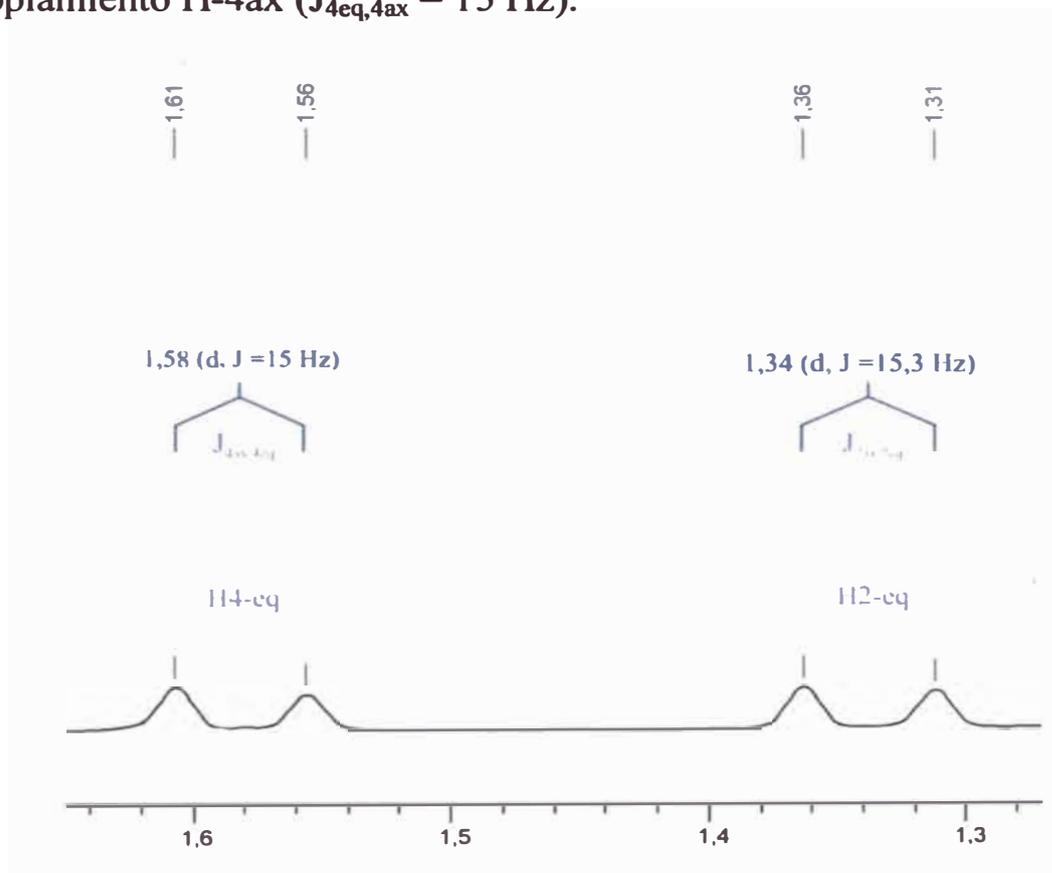
47. Torpoco, V., *Constituyentes Químicos (Alcaloides) de la "chacrana" (Psychotria viridis (Ruiz & Pavón))*. Tesis de Licenciatura en Ciencias-Mención Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Ingeniería, Lima, 1993, 115 págs.
48. United States Pharmacopoeia-USP, 20th Ed., 1980, pág. 913. "Alkaloidal Drug Assays; Proximate Assays".
47. Vitale, A.A.; Acher, A.B.; and Pomilio, A.B. *J. of Ethnopharmacology* 1995, 49, 81-89. "Alkaloids of *Datura ferox* from Argentina".
48. Vora, M.M.; Finn, R.D.; Boothe, T.E.; Liskowsky, D.R.; Potter, L.T. *J. Labeled Compd. Radiopharm.* 1983, 20, 1229-1236. "[N-methyl-<sup>11</sup>C]-scopolamine: Synthesis and distribution in rat brain".
49. Woolley, J.G.; Ansarin, M. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* 1995, 487-490. "The biosynthesis of tropic acid. Part 6. Enantioselective, intact incorporation of (R)-(+)-3-phenyllactic acid into the tropic acid ester alkaloids of *Datura*".

***ANEXOS***

## ANEXO 1

## Interpretación detallada del espectro de RMN<sup>1</sup>H de la escopolamina

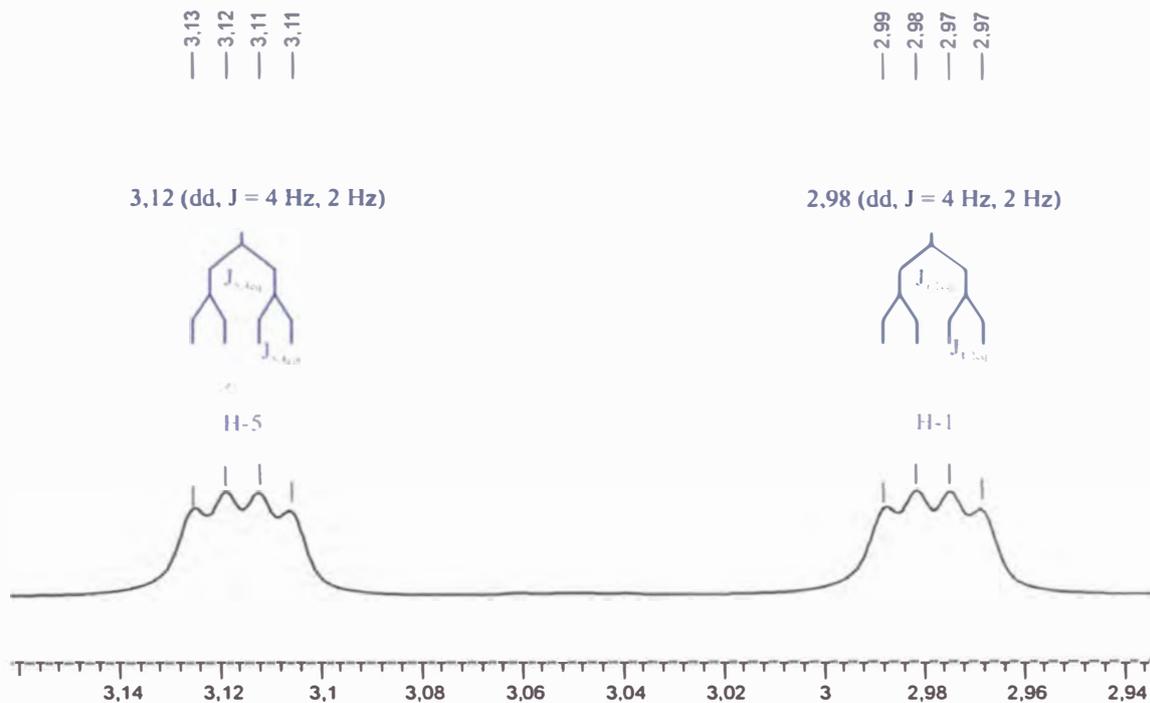
- La señal a  $\delta = 1,34$  ppm (doblete) corresponde a H-2eq y se forma por el acoplamiento de este protón con H2-ax ( $J_{2eq,2ax} = 15,3$  Hz). El otro doblete a  $\delta = 1,58$  ppm se atribuye a H-4eq, esta señal aparece como resultado del acoplamiento H-4ax ( $J_{4eq,4ax} = 15$  Hz).



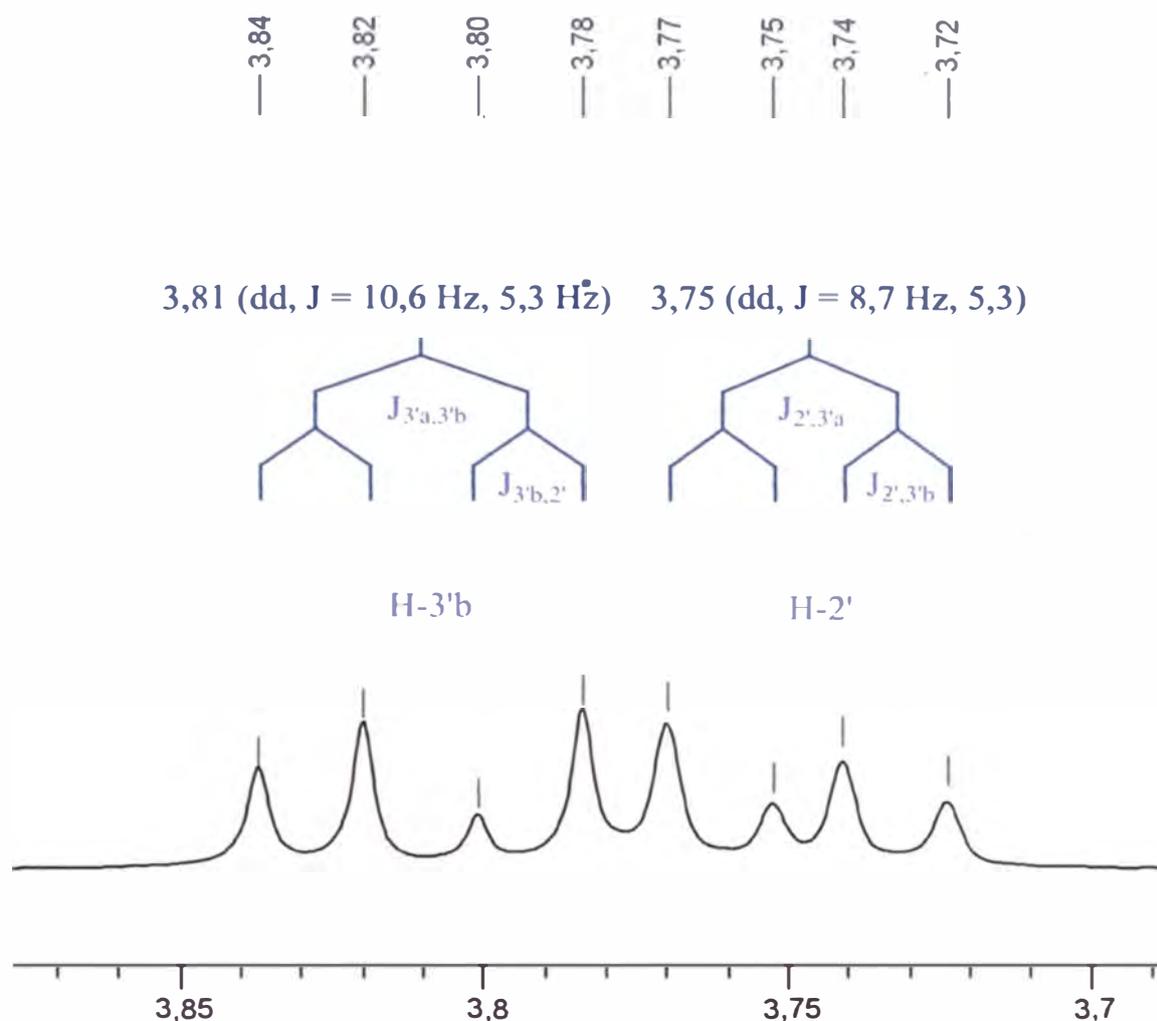
- Las señales a  $\delta = 2,03$  y  $2,12$  ppm, correspondientes a los protones H-2ax y H-4ax respectivamente, presentan una mayor complejidad. Así, H-2ax se acopla con H-1 ( $J_{2ax,1} = 4$  Hz) originando un doblete, este doblete se desdoblaría en otro doblete por el acoplamiento con H-3 ( $J_{2ax,3} = 5,4$  Hz), un ultimo acoplamiento con H-2eq ( $J_{2ax,2eq} = 15,3$  Hz) generaría un desdoblamiento dando como resultado la señal a  $2,03$  ppm. Por otro lado, H-4ax genera una señal similar a  $2,12$  ppm por sus acoplamientos con H-5



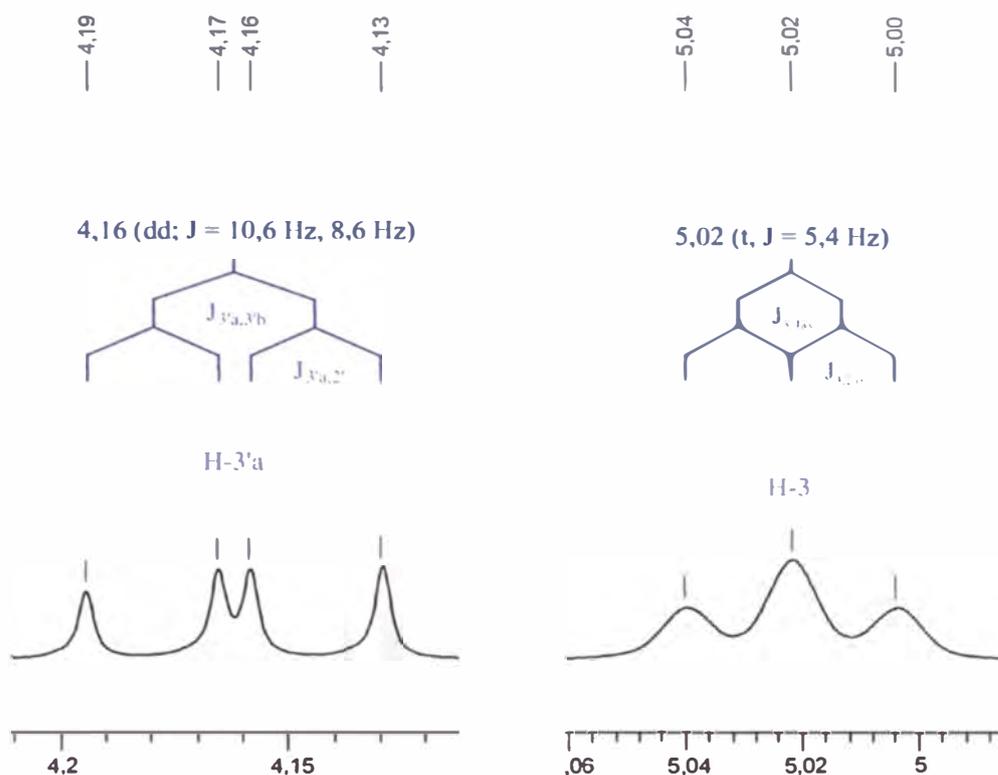
4. Las señales a  $\delta = 2,98$  ppm (H-1) y  $\delta = 3,12$  ppm (H-5) se presentan como dos dobletes de dobletes. La señal correspondiente a H-1 se forma por el acoplamiento de este con H-2eq ( $J_{1,2eq} = 2$  Hz) y H-2ax ( $J_{1,2ax} = 4$  Hz). La señal que se atribuye a H-5, aparece por el acoplamiento de este átomo con H-4eq ( $J_{5,4eq} = 2$  Hz) y H-4ax ( $J_{5,4ax} = 4$  Hz).



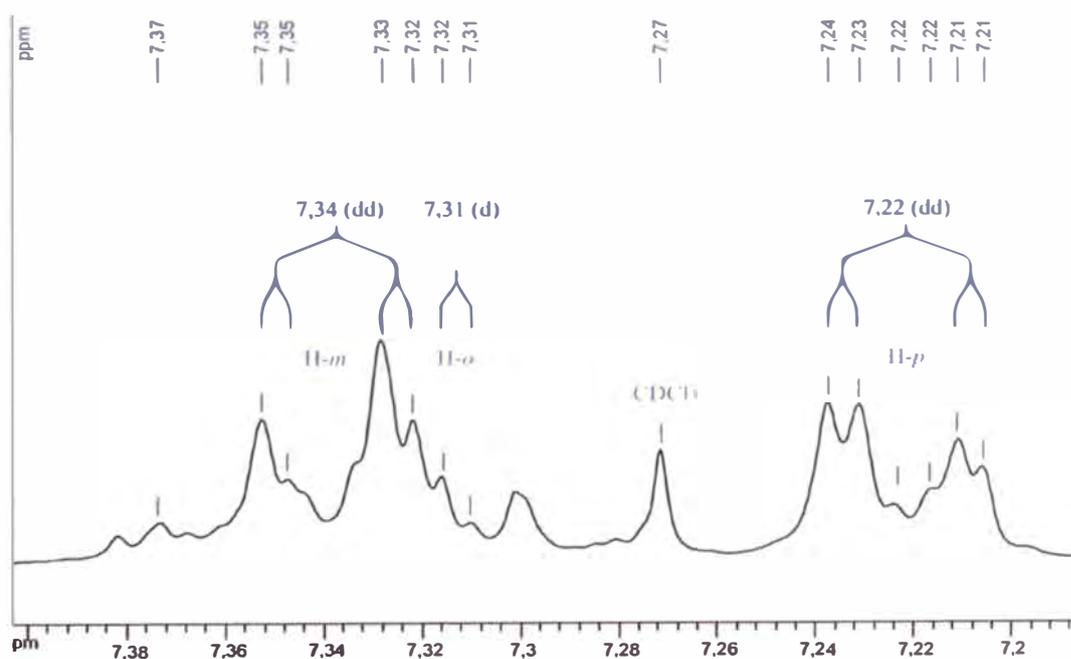
5. Las señales a  $\delta = 3,75$  ppm (H-2') y  $\delta = 3,81$  ppm (H-3'b) también se muestran como dos dobletes de dobletes muy próximos entre si (casi superpuestos). La primera señal se forma por el acoplamiento de H-2' con H-3'b ( $J_{2',3'b} = 5,3$  Hz) y H-3a ( $J_{2',3'a} = 8,6$  Hz). La segunda señal aparece por el acoplamiento de H-3b con H-2' ( $J_{3'b,2'} = 5,4$  Hz) y H-3'a ( $J_{3'b,3'a} = 10,5$  Hz).



6. Las señales a  $\delta = 4,16$  ppm y  $\delta = 5,02$  ppm se presentan como un doblete de doblete y un triplete respectivamente. El doblete de doblete correspondiente a H-3'a aparece por el acoplamiento del mismo con H-2' ( $J_{3'a,2'} = 8,6$  Hz) y H-3'b ( $J_{3'a,3'b} = 10,6$  Hz). Por su parte, el triplete, señal perteneciente a H-3, surge del acoplamiento de este átomo con H-2ax ( $J_{3,2ax} = 5,4$  Hz) y H-4ax ( $J_{3,4ax} = 5,4$  Hz), tal como lo muestran las siguientes figuras:



7. Las señales correspondientes a los protones aromáticos:  $\delta = 7,22 \text{ ppm}$  (H-*p*), 7,31 ppm (H-*o*) y 7,34 ppm (H-*m*), presentan una mayor complejidad. Los acoplamiento a larga distancia (protones *orto* y *para*) sumados a la disposición espacial del anillo hace que cada proton “equivalente” muestre un comportamiento ligeramente diferente.



## ANEXO 2

### **Marcha Fitoquímica Preliminar (Reyna, 1999-b)**

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

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

#### **A. OBTENCIÓN DE LAS FRACCIONES**

##### **1. Fracción (a)**

- 1 En un balón de 100 mL se coloca en maceración **5g de muestra seca** y pulverizada con 50 mL de metanol, durante 20 horas a temperatura ambiente.
- 11 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.
- 111 Se separan 5 mL del extracto, lo que constituye la fracción (a). Se descarta el residuo sólido.

##### **2. Fracción (b)**

- 1 El resto (45 mL) de la solución anterior se lleva a sequedad en el rotavapor.
- 11 El residuo obtenido se extrae con 10mL de ácido clorhídrico  $\text{HCl}_{(\text{ac})}$  al 1%, calentando ligeramente ( $50^{\circ}\text{C}$ ), y se filtra sobre papel de filtro lento. Esta operación se repite en las mismas condiciones con 5mL de ácido clorhídrico  $\text{HCl}_{(\text{ac})}$  al 1%, a  $50^{\circ}\text{C}$ . Las soluciones ácidas se reciben en un erlenmeyer de 50mL y se guarda para ser utilizados posteriormente (ver, Sec.3.i).

- 111 El residuo sólido se disuelve con 5mL de cloroformo, con ayuda de calor (50°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)

- 1 La solución ácida obtenida en 2.ii, se basifica con amoníaco  $\text{NH}_3(\text{ác})$  7,5N hasta pH 9-10.
- 11 Luego, se extrae con cloroformo (2x25 mL). La parte acuosa se guarda para tratamiento posterior (ver Sec. 4.i).
- 111 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).
- 1v La fase clorofórmica se seca con sulfato de sodio anhidro y se filtra (“rápido”). El filtrado constituye la fracción (c).

### 4. Fracción (d)

1. La fase acuosa básica obtenida en la Sección anterior (ii y iii) se semisatura con sulfato de sodio (0,1g de sal anhidra por mL de solución) y se filtra (“rápido”). Se extrae con cloroformo:etanol (3:2) (2x25mL). Guardar la fase acuosa (ver Sec.5).
- 11 La fase orgánica (50mL) se lava con una solución semisaturada de sulfato de sodio (1g de sal anhidra en 10mL de agua destilada). El lavado acuoso se guarda junto con la obtenida en la etapa anterior.
- 111 La fase orgánica se seca con sulfato de sodio anhidro y se filtra (“rápido”), obteniéndose la fracción (d).

### 5. Fracción (e)

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

## 6. Fracción (f)

- 1 En un tubo de ensayo limpio y seco (de 18x160mm), se coloca **1g de muestra seca** y pulverizada y 10 mL de agua destilada; se agita la mezcla y se calienta en baño de aceite durante 10-15 minutos.
- 11 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 IDENTIFICACION DE METABOLITOS SECUNDARIOS

### 1. Aminogrupos primarios o secundarios (Prueba de Ninhidrina)

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

- 1 Tomando cuidado de no tocar la parte central con los dedos, se preparan tres trozos de papel de filtro “lento” de 2x3cm 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.
- 11 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.
- 111 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 (Pruebas con reactivo Férrico)

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

- 1 El resto de la fracción (a) (aproximadamente 5 mL) se lleva a sequedad en el rotavapor en un balón de 200mL.

- 11 El residuo se disuelve en 0,5mL 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 (13x100mm).
- 111 Se coloca dos gotas de la “solución a” en una luna de reloj ( $\phi = 75\text{mm}$ ); luego, se adiciona 1 gota de la solución acuosa 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 ( $\phi = 75\text{mm}$ ); 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)

- 1 La fracción (d) se coloca en un balón de 100 mL y se lleva a sequedad.
- 11 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”, recibiendo el filtrado en un tubo de ensayo (13x100mm). Esto constituye la “solución d”.

- iii** En un tubo de ensayo (13x100mm) limpio y seco se colocan 3 gotas de la “solución d”, 2mL de agua destilada, 1mL de HCl<sub>(ac)</sub> 12N 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 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 adiciona 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 (7x60mm) 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 (13x100mm), se añade 5mL 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 y Mayer)

*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)

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

### b) Tratamiento de la “solución d”

- 1 Se dispone 5 gotas de la “solución d” en un tubo de ensayo (7x60mm) y se lleva a sequedad. El residuo se disuelve en 4 gotas de ácido clorhídrico HCl<sub>(ac)</sub> al 1%.
- 11 Se filtra a través de papel de filtro “lento”; se reparte el filtrado en dos lunas de reloj y se adiciona los reactivos de Dragendorff y Mayer, 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 (13x100mm) se colocan 3 gotas de la “solución d” y 2mL de agua destilada.
- ii Luego se adiciona 1mL de ácido clorhídrico concentrado  $\text{HCl}_{(ac)} 12\text{N}$ .
- 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 2mL 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 1ml de la fracción (f) en un tubo de ensayo (13x100mm) 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 5mm, nos indicará prueba positiva.

### ANEXO 3

## **Análisis cualitativo para la detección de alcaloides presentes en plantas (Reyna, 1992)**

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

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

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

### **A. TEST DE MAYER**

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

#### **1. Procedimiento**

- 1 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).
- 11 Se adiciona 10 mL de etanol y se coloca en un “baño maría” (baño de aceite a 90 °C), y se hace hervir por 5 minutos.

- iii Se filtra la solución etanólica, a través de papel filtro “rápido” y un embudo de vidrio pequeño, recibiendo los filtrados en un tubo de ensayo seco de 18x150mm.
- iv Se concentra la solución etanólica a sequedad. Para esto hay tres alternativas:
  - Utilizando el “baño maría”
  - Utilizando el rotavapor
  - Utilizando un “mechero de bolsillo”
- v Una vez seco, se deja enfriar y sobre el residuo se agrega de 2 a 5 gotas de una solución de ácido clorhídrico al 2%. Se agita el tubo de manera de disolver todas las partículas sólidas.
- vi Se filtra el líquido (debe tenerse un filtrado completamente limpio) a dos tubos de ensayo de 13x100 mm secos de modo que en cada uno haya volúmenes aproximadamente iguales.

Se coloca ambos tubos delante de un papel blanco.

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

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

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

## 2. Reactivo de Mayer

Se disuelven 1,36 g de cloruro de mercurio (II)  $\text{HgCl}_2$  en 60 mL de agua y 5 g de yoduro de potasio KI en 10 mL de agua. Se juntan las dos soluciones y se afora a 100 mL.

## **B. TEST DE DRAGENDORFF**

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

### **1. Procedimiento**

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

### **2. Reactivo de Dragendorff**

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

## ANEXO 4

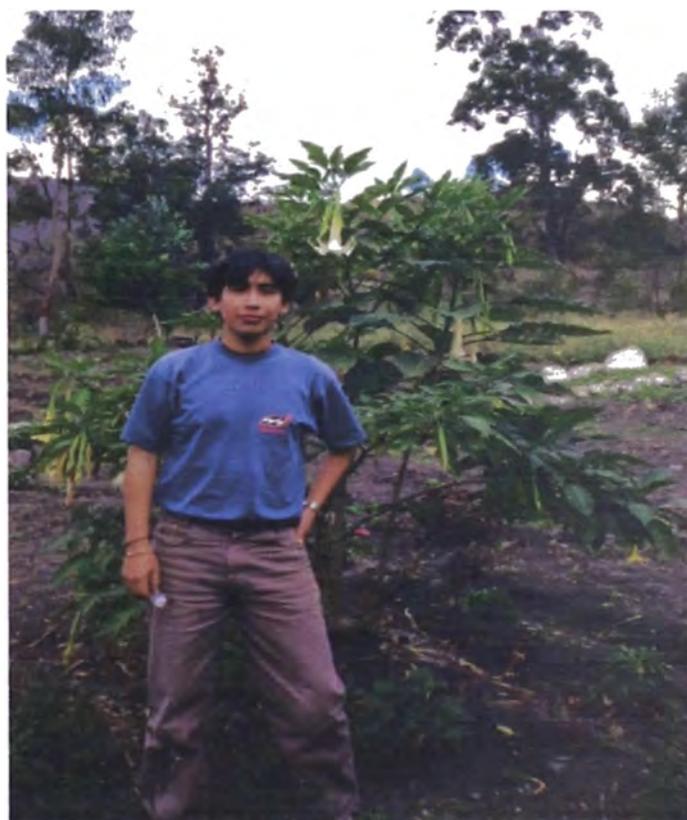
## Características Botánicas de *Datura candida* (Nee, 1986)

Arbustos o árboles pequeños, de 2-5 m de altura (Foto 2); ramas jóvenes diminutamente pilosas con pelos simples, rápidamente glabriúsculas.

Hojas ovas a elípticas, de 15-30 cm de largo, 5-12 cm de ancho (Foto 1, pág. 60), esparcidamente pubérulas en el haz, glabriúsculas, moderadamente pubérulas en el envés, enteras a escasamente remandas, acuminadas en el ápice, la base aguda a redonda, a menudo muy asimétrica; pecíolos de 3-6 cm.

Flores Grandes y vistosas, péndulas y fragantes (Foto 1, pág. 60); pedicelos de 2,5-5 cm de largo; cáliz ampliamente tubular, inflado en prefloración, espatáceo, de 10-14 cm de largo, 1,5-3 cm de ancho, hendido por un lado en un tercio del largo total, esparcida y diminutivamente piloso a casi glabro; corona blanca, de 25-30 cm de largo, esparcidamente pubérula por fuera, el tercio basal angostamente tubular y escondido dentro del cáliz, los lóbulos extendidos, de cerca de 3 cm de largo, caudados; filamentos insertos por debajo de la parte media de la corola, de 4-4,5 cm de largo, pilosos cerca de la base, glabros arriba, las antenas libres, de 2,2-2,5 cm de largo; estilo de 17-19 cm de largo, el estigma de 5-7 mm de largo.

Fruto fusiforme, de 20 cm de largo, 2 cm de diámetro en la parte media, inerme; semillas cuneiformes, de 6-10 mm de largo, con la testa gruesa, corchosas.



**Foto 2.** Arbusto de Misha rastreira (*D. candida*.)  
Jardín Botánico del INMETRA, Huancabamba,  
Dpto. Piura, Agosto 2001 (Foto B. Cabanillas).

## ANEXO 5



Universidad Nacional Mayor de San Marcos  
**MUSEO DE HISTORIA NATURAL**



## CONSTANCIA

**LA JEFA DEL HERBARIO SAN MARCOS DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL, DEJA CONSTANCIA QUE:**

La muestra vegetal recibida del Dr. Victor Reyna Pinedo procedente de la ciudad de Huancabamba, Piura, ha sido determinada según el sistema de Clasificación de Cronquist, Arthur, 1981 como sigue:

DIVISIÓN : Magnoliophyta  
 CLASE : Magnoliopsida  
 SUBCLASE : Asteridae  
 ORDEN : Solanales  
 FAMILIA : Solanaceae  
 GÉNERO : Datura  
 ESPECIE : *D. candida* (Pers.) Saff.  
 PROCEDENCIA: Huancabamba, Piura  
 NOMBRE VERNACULAR: "Misha rastreña"

Se expide la siguiente constancia a solicitud del interesado

Lima, 29 de noviembre de 2006

*Joaquina Adelaida Albán C...*

Mag. Joaquina Adelaida Albán C...  
 Jefe

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



## ANEXO 6

**Marcha fitoquímica preliminar de las hojas de la Misha  
rastrera (*Datura candida*)**

Clase de producto Natural	Pruebas de Coloración o precipitación	Fracción	Resultados (**)	Observaciones
Aminogrupos primarios o secundarios	Ninhidrina	a	+	Mancha de color lila
		f	+	Mancha de color violeta
Grupos fenólicos libres	Cloruro férrico	a	++	Precipitado verde en solución verde
Taninos	Gelatina	a	+	Precipitado verde
Flavonoides *	Reacción de Shinoda	d	-	Fase amílica y acuosa incoloras
		e	-	Fase amílica y acuosa de color amarillo
Triterpenos y/o esteroides	Reacción de Liebermann Burchard	b	+	Anillos marrón y naranja
		c	+	Anillos marrón y naranja
		d	+	Solución amarillo claro
Quinonas, antronas o antranoles	Reacción de Borntrager	b	-	Fase clorofórmica color marrón
Alcaloides	Reactivo de Dragendorff	c	+++	Precipitado naranja
		d	+	Turbiedad naranja
	Reactivo de Mayer	c	+++	Precipitado crema
		d	+	Turbiedad crema
	Reactivo de Wagner	c	++	Precipitado marrón
		d	-	Solución naranja
Leucoantocianidinas (rojo), Catequinas (marrón)	Reacción de Rosenheim	d	-	Fase amílica amarilla y fase acuosa incolora
		e	++	Fase amílica de color marrón claro y fase acuosa pardo
Saponinas	Prueba de espuma	f	+	Altura de la espuma: 5 mm

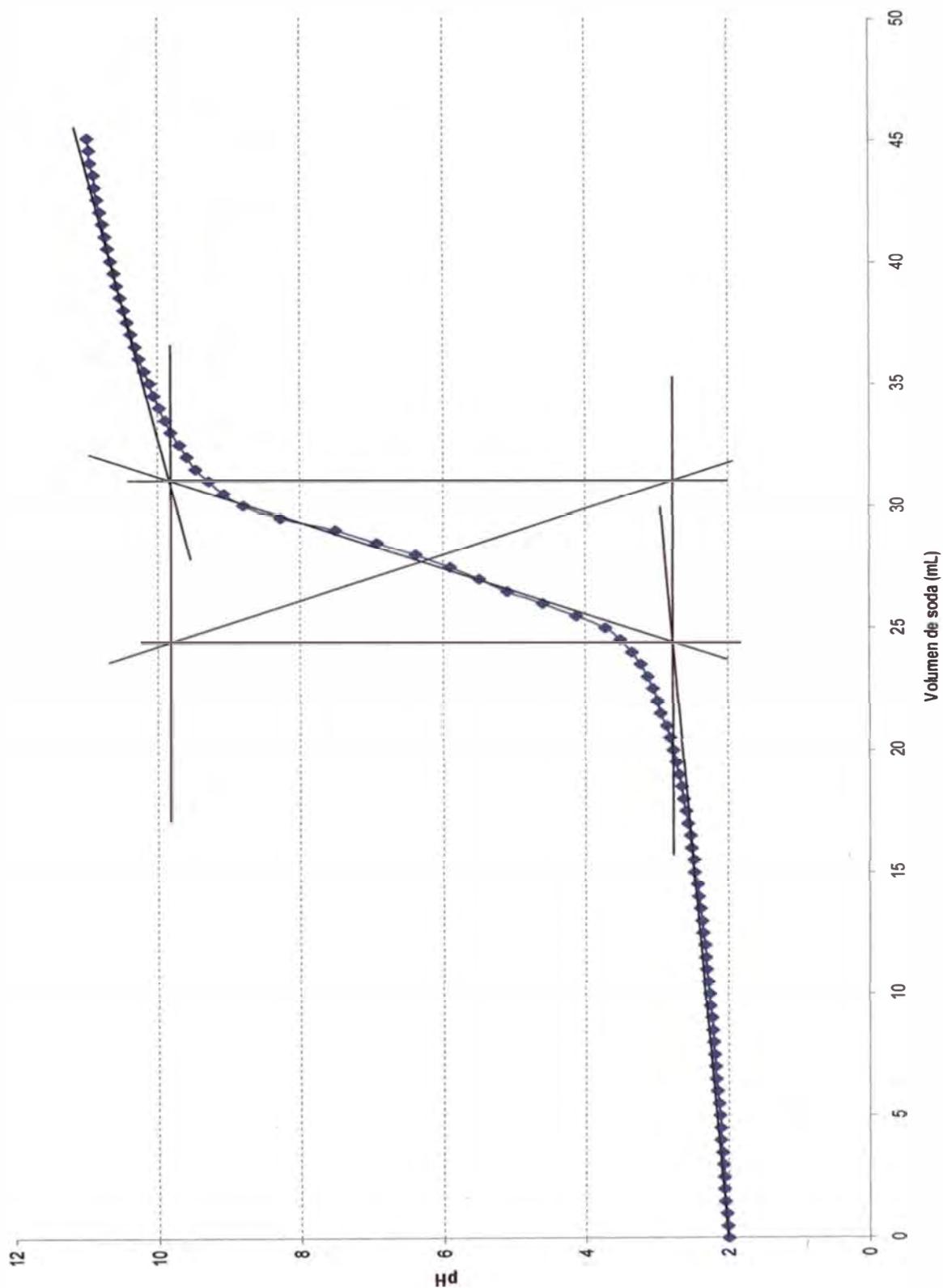
\*Excepto Chalconas, auronas, catequinas e isoflavonas  
Convención: (+++) abundante; (++) regular; (+) poco.

## ANEXO 7

**Curva de titulación potenciométrica de alcaloides**

(ver Sec. II.F.2.d Análisis cuantitativo de alcaloides pág. 65)

Curva de Titulación Potenciométrica Muestra Casa barrio chalaco (EBA.9)



**ANEXO 8****Dispositivo columna flash**

(ver Sec. II.G.5, pág. 72)

