

UNIVERSIDAD NACIONAL DE INGENIERIA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA PROFESIONAL DE QUIMICA



**“ESTUDIO QUIMICO DEL CACTUS “SAN
PEDRO” (*Echinopsis pachanoi* Britton y Rose)**

TESIS

PARA OPTAR EL TITULO PROFESIONAL DE

LICENCIATURA EN CIENCIAS

CON MENCIÓN EN QUIMICA

JOSÉ AUGUSTO FLORES GARCÉS

LIMA – PERU

2000

Estudio Químico del “San Pedro” (*Echinopsis pachanoi* Br. & R.)

CONTENIDO

Introducción

I. ASPECTOS GENERALES

- | | | |
|----|-----------------------|---|
| 1. | Presentación | 2 |
| 2. | Objetivos de la tesis | 4 |

II. ESTUDIO BIBLIOGRAFICO

- | | | |
|----|--|----|
| A. | ESTUDIOS QUÍMICOS PRECEDENTES RELATIVOS AL CACTUS “SAN PEDRO” (<i>E. pachanoi</i>) | 6 |
| 1. | Composición química del cactus “San Pedro” (<i>E. pachanoi</i>) | 6 |
| a) | Análisis fitoquímico | 6 |
| b) | Principales alcaloides presentes en el cactus “San Pedro” | 6 |
| c) | Determinación cuantitativa de alcaloides en el cactus “San Pedro” | 7 |
| 2. | Aislamiento de alcaloides del cactus “San Pedro” (<i>E. pachanoi</i>) | 8 |
| a) | Procedimiento de Poisson (1960) | 8 |
| b) | Procedimiento de Turner & Heyman (1960) | 9 |
| c) | Procedimiento de McLaughlin & Crosby (1973) | 10 |
| 3. | Identificación clásica de la mescalina y/o derivados | 12 |
| a) | Comportamiento cromatográfico | 12 |
| b) | Punto de fusión | 13 |
| 4. | Identificación espectrométrica de la mescalina y/o derivados | 13 |
| a) | Espectros de masas de la mescalina y compuestos análogos | 14 |
| b) | Espectro ultravioleta (UV) del sulfato de mescalina | 19 |
| 5. | Biosíntesis de la mescalina | 20 |
| 6. | Síntesis de la mescalina | 22 |
| B. | ESTUDIOS QUÍMICOS GENERALES | 26 |
| 1. | Análisis cualitativo – Marcha fitoquímica | 26 |

| | | |
|----|--|----|
| 2. | Test de alcaloides | 26 |
| 3. | Determinación cuantitativa de alcaloides | 27 |
| 4. | Aislamiento de alcaloides | 29 |
| 5. | Identificación espectrométrica de compuestos orgánicos | 33 |
| a) | Espectrometría de masas, EM | 33 |
| b) | Espectrometría de resonancia magnética nuclear del hidrógeno, RMN ¹ H | 34 |
| c) | Espectrometría de resonancia magnética nuclear del carbono – 13, RMN ¹³ C | 36 |
| d) | Espectrometría de infrarrojo, IR | 38 |
| e) | Espectrometría de ultravioleta, UV | 41 |

III. TRABAJO EXPERIMENTAL

| | | |
|----|--------------|----|
| 1. | Presentación | 44 |
|----|--------------|----|

TRABAJO PRELIMINAR

| | | |
|----|---|----|
| A. | COLECCIÓN DE LA PLANTA. CACTUS “SAN PEDRO”, (<i>E. pachanoi</i>) | 46 |
| B. | ESTUDIO ETNOBOTANICO Y ETNOMEDICINAL (Uso del Cactus “San Pedro” en Medicina Tradicional) | 48 |
| C. | DETERMINACION SISTEMATICA | 49 |
| D. | ESTUDIO BIBLIOGRAFICO | 49 |

TRABAJO EN EL LABORATORIO

| | | |
|----|--|----|
| E. | SECADO Y MOLIENDA DE LA PLANTA | 51 |
| F. | ANALISIS CUALITATIVO – MARCHA FITOQUIMICA | 52 |
| G. | DETERMINACION CUANTITATIVA DE ALCALOIDES | 53 |
| H. | AISLAMIENTO DE LA MESCALINA (SULFATO DE MESCALINA) | 58 |
| I. | IDENTIFICACION CLASICA DEL SULFATO DE MESCALINA | 63 |

| | |
|---|-----|
| 1. Características del producto | 63 |
| 2. Determinación del punto de fusión | 63 |
| 3. Comportamiento cromatográfico | 64 |
| 4. Análisis porcentual de carbono, nitrógeno e hidrógeno | 64 |
| J. IDENTIFICACION ESPECTROMETRICA (Determinación Estructural) | 65 |
| 1. Espectro de Masas | 66 |
| 2. Espectro de RMN ¹ H | 66 |
| 3. Espectro de RMN ¹³ C DEPT 90 | 68 |
| 4. Espectro de RMN ¹³ C de protones desacoplado | 69 |
| 5. Espectro de IR | 71 |
| 6. Espectro de UV | 72 |
| IV. RESUMEN DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES | |
| Resumen de Resultados | 80 |
| Conclusiones | 82 |
| V. BIBLIOGRAFIA | 83 |
| VI. ANEXOS | 88 |
| ANEXO N° 1 | 89 |
| ANEXO N° 2 | 91 |
| ANEXO N° 3 | 94 |
| ANEXO N° 4 | 100 |
| ANEXO N° 5 | 101 |
| ANEXO N° 6 | 102 |

I. ASPECTOS GENERALES

1. Presentación

Las cuatro líneas de especialización de la carrera de Química son: Química Inorgánica, Química Orgánica, Química Analítica y Fisicoquímica.

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

La presente Tesis, en la línea de Química Orgánica de Productos Naturales, comprende el estudio químico de los alcaloides presentes en el cactus “San Pedro” (*Echinopsis pachanoi*), y constituyó para mi el repaso de los cuatro cursos básicos semestrales de Química Orgánica, así como de los cursos Proyecto de Tesis I CQ 561 (Marcha Fitoquímica) y Proyecto de Tesis II CQ 562 (Determinación cuantitativa), y el curso electivo CQ 046, Química de Productos Naturales, habiéndome proporcionado una visión global de la aplicación de los conocimientos de Química Orgánica a la solución de un problema específico: Qué clase de compuestos están presentes, cuál es el alcaloide principal que contiene y cuál es la cantidad de alcaloides contenidos en el cactus “San Pedro”.

Este trabajo de tesis comprendió las siguientes actividades:

- i. Colecta del cactus “San Pedro” en dos localidades, Barranca (provincia al norte de Lima; 15.08.98) y Huancabamba (provincia del departamento de Piura a 2000 m.s.n.m.; 28.07.99).
- ii. 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 – UNI, que comprendió, el secado y molienda del cactus, la extracción por solventes (sólido – líquido y líquido – líquido), la purificación de la mescalina mediante precipitación como sulfato de mescalina y posterior

recristalización; y la caracterización preliminar mediante cromatografía en capa fina y su punto de fusión. Este trabajo demandó una dedicación de 7 meses (considerando el trabajo de 8 horas / día, durante 5 días / semana), y se realizó en el período de julio de 1998 a diciembre de 1999.

- iii. Identificación espectrométrica del sulfato de mescalina, mediante el análisis de los espectros de masas, RMN¹H y RMN¹³C, espectros obtenidos en los Laboratorios de Espectrometría de Masas y de Resonancia de la Universidade Estadual de Campinas – Unicamp (Brasil), en los meses de enero y febrero del 2000, gracias a la colaboración de la M.Sc. María Caramantín Soriano, ex – alumna de nuestra especialidad y actualmente estudiante de Doctorado de dicha Universidad.
- iv. Análisis de la información bibliográfica relativa a los estudios químicos del cactus “San Pedro” (*E. pachanoi*) y de la mescalina.

Durante la realización de este trabajo se contó con la subvención económica del Instituto de Investigación de la Facultad de Ciencias por la suma de aproximadamente tres mil dólares (Oficio II – FC N° 32 – 98 del 21.08.98); asignada al proyecto “Estudio Químico de Plantas con Constituyentes Psicoactivos I”, que permitió adquirir principalmente la bomba de vacío con trampa de agua Büchi (modelo B169) (costo dos mil dólares), material vegetal y solventes orgánicos.

2. OBJETIVOS DE LA TESIS

Los objetivos de la presente tesis son tres:

- i. El aislamiento e identificación (clásica y espectrométrica) de la mescalina, como sulfato de mescalina, obtenida a partir del cactus “San Pedro” (*Echinopsis pachanoi*);

- ii. el análisis cualitativo de los metabolitos secundarios (Marcha Fitoquímica) presentes en dicho cactus; y
- iii. la determinación cuantitativa del total de alcaloides contenido en dicho cactus.

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

El aislamiento comprende las etapas de extracción por solventes, separación y purificación. Así, describiremos los diversos métodos de extracción de alcaloides publicados en la bibliografía, las pruebas cualitativas de detección de alcaloides, la utilización de la cromatografía en capa fina como método preliminar de identificación, y la purificación mediante la formación de derivados cristalinos (sulfato de mescalina). Asimismo, se describe la aplicación de la espectrometría de masas y de resonancia magnética nuclear (de hidrógeno y de carbono) en la identificación de la estructura molecular.

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

II. ESTUDIO BIBLIOGRAFICO

A. ESTUDIOS QUIMICOS PRECEDENTES RELATIVOS AL CACTUS “SAN PEDRO” (*E. pachanoi*)

1. Composición química del cactus “San Pedro” (*E. pachanoi*)

a) Análisis fitoquímico

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

En la bibliografía sólo hemos encontrado un trabajo de análisis cualitativo del “San Pedro”, realizado en Lima por Inés González en 1960, quien no proporciona el procedimiento experimental de su trabajo, reportando las siguientes clases de compuestos: ácidos orgánicos volátiles, carotenoides, ácidos grasos**, ceras**, resinas**, grasas**, alcaloides, heterósidos**, taninos, saponinas, gomas**, mucílagos**, proteínas**, sales minerales, fitina, nucleoproteidos**, y hemicelulosas**.

Cabe mencionar que entre estos compuestos algunos son de ocurrencia general en las plantas y por lo tanto son considerados metabolitos primarios**.

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

El cactus *E. pachanoi* contiene alcaloides que tienen la estructura básica de la feniletilamina, siendo la mescalina (a) el alcaloide más importante (aproximadamente 87% del total de alcaloides, Agurell – 1969a). También se encuentran pequeñas cantidades de 3-metoxitiramina (b) y 3,4-dimetoxifeniletilamina (c), y trazas de otros cinco alcaloides: tiramina (d); 3,5-dimetoxi-4-hidroxifeniletilamina(e); 3,4-dimetoxi-5-hidroxifeniletilamina

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.

(f); anhalonidina (g) y hordenina (h), (ver Figura N° 1) (Agurel – 1969a, Agurell – 1969b, Agurel & Lundstrom – 1968, Trout – 1999).

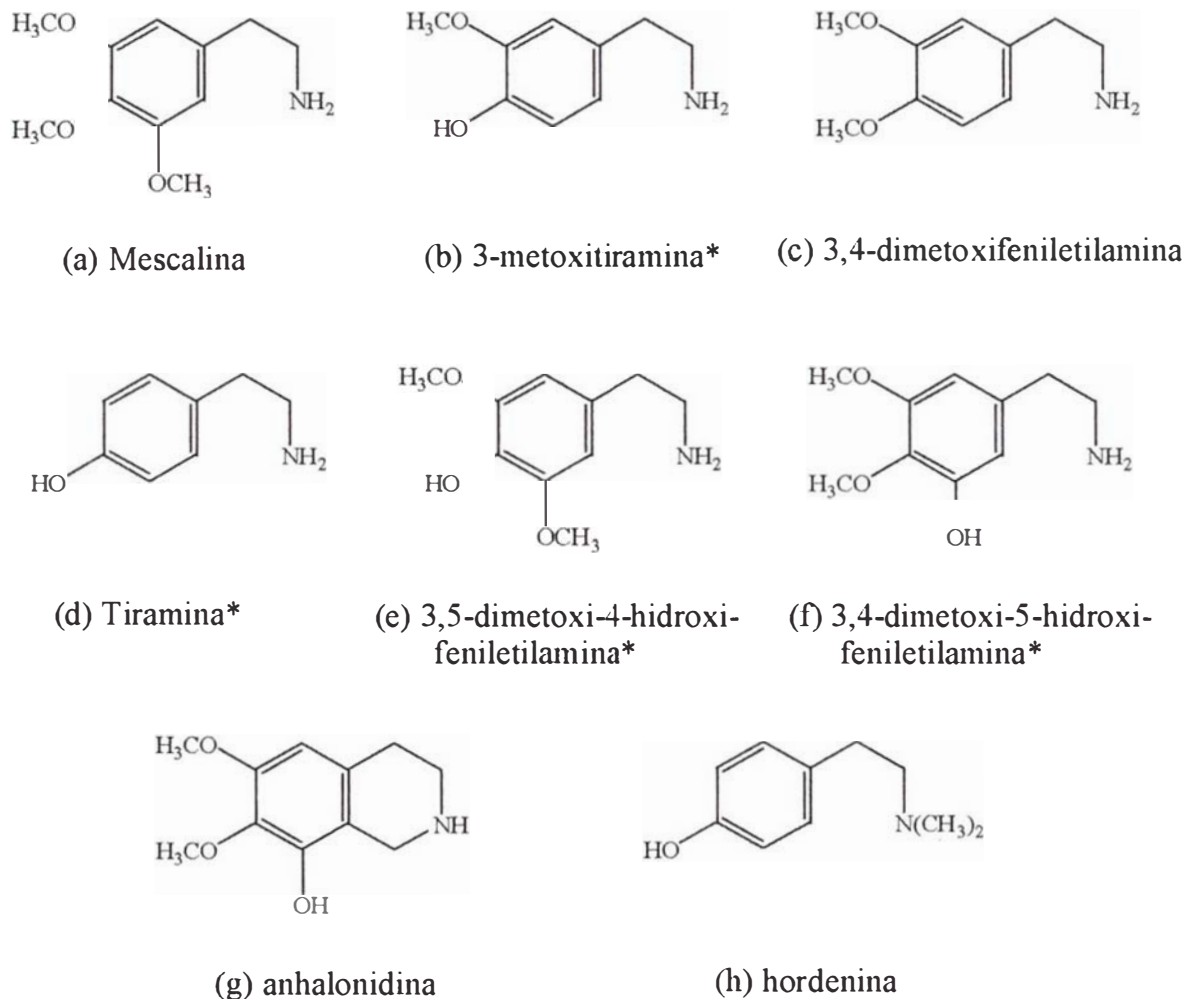


Figura N° 1.- Estructuras de los alcaloides presentes en el “San Pedro”* (*E. pachanoi*).

c) Determinación cuantitativa de alcaloides en el cactus “San Pedro”

La única determinación cuantitativa del contenido total de alcaloides presentes en el cactus “San Pedro” (*E. pachanoi*) es aquella publicada por Hemlim y Brenneisen (1992), quienes mediante HPLC**, realizaron el análisis de seis muestras del cactus (adquiridas en florerías, supermercados o

** Intermediarios en la biosíntesis o biogénesis de la mescalina (ver Sec. II.A.5, pág. 20)
HPLC: Cromatografía líquida de alta presión

de coleccionistas privados de Suiza), habiendo obtenido resultados que fluctúan entre 0,1 y 2,3% (1,09 a 23,75 μg /mg de cactus seco).

Es pertinente remarcar la gran variabilidad de estos resultados, donde se observa que una muestra contiene casi 23 veces más alcaloide que otra.

Adicionalmente, los reportes de aislamiento de mescalina o de sus derivados (clorhidrato, sulfato), a partir del cactus “San Pedro” colectados en Estados Unidos y en el Perú, reflejan esta misma variabilidad: 0,29%; 0,33% y 1,88%, respectivamente (ver Tabla N° 1).

| Autor | Procedencia de la muestra | Compuesto obtenido | % (respecto al cactus seco) |
|----------------------------|--|---------------------|-----------------------------|
| Poisson – 1960 | Huancabamba – Perú (colector: C. Friedberg) | Mescalina | 1,88% |
| Turner & Heyman – 1960 | Perú | Mescalina – sulfato | 0,29% |
| McLaughlin & Crosby – 1973 | Adquirida en USA | Mescalina·HCl | 0,33% |

Tabla N° 1.- Contenido de mescalina en diversas muestras del cactus “San Pedro”

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

En la bibliografía se reportan tres trabajos que tratan del aislamiento de la mescalina o de sus derivados a partir del cactus “San Pedro”: Poisson (1960), Turner & Heyman (1960) y McLaughlin & Crosby (1973).

Los subtítulos en que hemos dividido cada uno de estos procedimientos (tratamiento previo de la muestra, Obtención del extracto bruto orgánico

Los trabajos de Agurell (1969a,b) y Agurell & Lundstrom (1968) tratan de la separación por cromatografía de gases y la identificación mediante espectrometría de masas (CG – EM) de los alcaloides presentes en este cactus, información presentada en la sección I.A.1.b (pág. 6).

a) Procedimiento de Poisson (1960): “Presencia de Mescalina en una Cactácea Peruana”

- Tratamiento previo de la muestra
 - i. Muestra: Cactus “San Pedro” o “huachuma” (Huancabamba – Perú, Colector : C. Friedberg).
 - ii. Secado del cactus. 180g de cactus fresco, en estufa a 80° C (Pérdida de peso en un 93,5%); y pulverización de la muestra.
- Obtención del Extracto Bruto Orgánico
 - iii. Extracción en soxhlet con etanol y concentración al vacío.
- Obtención del Extracto Bruto de Alcaloides
 - iv. Disolución del extracto en éter (100 mL) y adición de una solución de ácido clorhídrico $\text{HCl}_{(\text{ac})}$ al 10% (10 mL). Extracción y separación de la solución ácida.
 - v. Alcalinización del extracto acuoso ácido con solución de amoníaco $\text{NH}_{3(\text{ac})}$ y extracción con cloroformo CHCl_3 varias veces.
Secado de la fase orgánica clorofórmica y concentración a sequedad: Se obtiene 0,42 g de Extracto Bruto de Alcaloides.
- Purificación y obtención del clorhidrato de mescalina
 - vi. Purificación: Destilación a presión reducida. $T^\circ = 80^\circ \text{C}$ a 0,01 mmHg: Se obtiene 0,22 g de un aceite incoloro (1,88% del peso seco).
 - vii. Formación de derivados: A partir de este aceite se prepara cuantitativamente el clorhidrato de mescalina (P.f. = 182 °C; análisis: C 53,20%; N 5,87%).

b) Procedimiento de Turner & Heyman (1960) “Presencia de Mescalina en *Opuntia cylindrica*”*

- Tratamiento previo de la muestra
 - i. Muestra: Planta seca de *Opuntia cylindrica** (no indican procedencia).
 - ii. Alcalinización de la muestra: 300 g de muestra seca se humedecieron con metanol – amoníaco acuoso $\text{NH}_{3(\text{ac})}$ (20:1).

- Obtención del Extracto Bruto Orgánico
 - iii. Extracción en soxhlet con cloroformo CHCl_3 (24h)
Concentración parcial del extracto a temperatura ambiente, con una corriente de aire.
 - Obtención del Extracto Bruto de Alcaloides
 - iv. Adición de un exceso de una solución de ácido acético $\text{CH}_3\text{COOH}_{(\text{ac})}$ al 5% al extracto orgánico concentrado, y extracción con agua.
 - v. Extracción de la fase acuosa (que contiene los alcaloides como sales) con benceno, para separar la mayor parte de lípidos.
 - vi. Alcalinización de la fase acuosa a pH 10 con una solución de hidróxido de sodio $\text{NaOH}_{(\text{ac})}$ y
 - vii. Extracción de la fase acuosa alcalina con benceno. Lavado de la fase orgánica con agua, y evaporación del solvente orgánico a sequedad: Se obtiene 2 g de Extracto Bruto de Alcaloides.
 - Purificación y obtención del sulfato de mescalina
 - viii. Disolución del extracto de alcaloides en 10 mL de etanol 95% y acidificación hasta pH 3 con 6,19 mL de ácido sulfúrico $\text{H}_2\text{SO}_{4(\text{ac})}$ 1N. Se lleva a sequedad y extrae con benceno. Se obtiene un residuo semicristalino de 1,31 g de sulfato de mescalina.
 - ix. Recristalización (3 veces) con Agua – Etanol; P.f. 184° C .
- c) Procedimiento de McLaughlin & Crosby (1973):** “Cristalización de mescalina·HCl y 3 – metoxitiramina·HCl a partir de *Trichocereus pachanoi*”*
- Tratamiento previo de la muestra
 - i. Muestra: *T. pachanoi* comprado en U.S.A.
 - ii. Tratamiento: La muestra se corta en rodajas, se liofiliza y se reduce a polvo

- Obtención del Extracto Bruto Orgánico
 - iii. Desengrase, alcalinización y extracción por percolación con cloroformo CHCl_3 de 255 g de muestra seca.

Se obtienen 4 L de percolado que se concentran a un jarabe viscoso.
- Obtención del Extracto Bruto de Alcaloides
 - iv. Disolución del jarabe viscoso con una solución de ácido clorhídrico $\text{HCl}_{(\text{ac})}$ 1N 4 x 350 mL.
 - v. Combinación y filtrado de los extractos acuosos. Extracción (2 veces) con volúmenes iguales de cloroformo CHCl_3 y éter etílico $\text{C}_2\text{H}_5\text{OC}_2\text{H}_5$, respectivamente.
 - vi. Ajuste del pH de la capa acuosa ácida a 8,5, 9,5 y 10,5 con una solución de hidróxido de sodio $\text{NaOH}_{(\text{ac})}$ 7,5N. A cada valor de pH, la fracción acuosa se extrae con volúmenes iguales de cloroformo CHCl_3 y éter etílico $\text{C}_2\text{H}_5\text{OC}_2\text{H}_5$.

Secado de los extractos orgánicos con sulfato de sodio anhidro $\text{Na}_2\text{SO}_{4(\text{s})}$, y concentración al vacío.
 - vii. Disolución de la fracción de alcaloides resultante en etanol (1 mL por cada 15 g de droga seca); si es necesario se filtra.

La disolución etanólica se adiciona a una columna de resina de intercambio iónico Amberlita IRA 401 en forma hidróxido (OH) (20 g en 100 g de planta seca). La columna se lava con etanol, continuándose hasta que las fracciones efluentes sean incoloras. Estos extractos etanólicos se evaporan a sequedad sobre un baño de vapor, obteniéndose el extracto de alcaloides no fenólicos (mescalina).
 - viii. La fracción no fenólica se disuelve con una solución de ácido clorhídrico $\text{HCl}_{(\text{ac})}$ 0,5N y se vuelve a tratar como se indica en las etapas iv a vi.

- Purificación y obtención del clorhidrato de mescalina
 - ix. Disolución del residuo de base libre en una pequeña cantidad de etanol absoluto.
 - x. Adición de una solución de ácido clorhídrico $\text{HCl}_{(\text{ac})}$ 5% en etanol absoluto y disminución del pH a 2.
 - xi. Adición de éter etílico $\text{C}_2\text{H}_5\text{OC}_2\text{H}_5$ para inducir la cristalización y luego de enfriar se obtiene 963 mg de clorhidrato de mescalina.

3. Identificación clásica de la mescalina y/o derivados

a) Comportamiento cromatográfico (Cromatografía en capa fina y de papel)

i. McLaughlin et al. (1977)

Adsorbente: Sílica Gel 60F – 254 (Merck)

Revelador: Fluorescamina y benzidina tetrazotizada – luz UV

Eluente F: éter etílico - MeOH - amoníaco acuoso 58% (17:2:1); $R_f = 0,58$

Eluente G: cloroformo - Me_2CO - amoníaco acuoso 58% (17:10:1); R_f no indicado

ii. McLaughlin et al. (1986)

Adsorbente: Sílica Gel – 254 (Merck)

Revelador: Fluorescamina y luz UV

Eluentes* : - Me_2CO – Et_2O – MeOH – $\text{NH}_3(\text{ac})$ (6:6:5:1)

- Et_2O – MeOH – $\text{NH}_3(\text{ac})$ (8:4:1)

- CHCl_3 – EtOH – $\text{NH}_3(\text{ac})$ (7:7:1)

Color: verde amarillento característico

R_f : No proporciona valores de R_f

iii. Turner & Heyman (1960)

Papel Whatman N° 1

Revelador: ninhidrina

Eluente: Butanol – ácido acético – agua (4:1:1); $R_f = 0,48$

b) Punto de fusión

- i. Mescalina: 35 – 36° C (Merck – 1996)
- ii. Sulfato de mescalina y sulfato ácido de mescalina

| | |
|--------------------------------|---|
| Sulfato ácido | 158° C (Merck –1996)(Hahn & Rumph-1930)* |
| Sulfato ácido | 183° C (Tsao – 1951)(Obtenida por síntesis) |
| Sulfato ácido·H ₂ O | 183 – 186° C (Patel – 1968) |
| Sulfato | 184° C (Turner & Heyman – 1960) |
| Sulfato | 185 – 186° C (Patel – 1968) |
| Sulfato·2H ₂ O | 183-186° C (Merck – 1996)(Späth-1919)* |
- iii. Clorhidrato de mescalina

| | |
|--------------|---|
| 181° C | (Merck – 1996). |
| 180 – 181° C | (Benington – 1951) (Obtenida por síntesis) |
| 181 – 182° C | (Reti & Castillon – 1951) |
| 182° C | (Poisson-1960). (recristalizado con CH ₃ OH-éter) |
| 184 – 185° C | (McLaughlin & Crosby – 1973). (recristalizado en etanol absoluto – éter absoluto) |
| 183 – 184° C | (McLaughlin et al. – 1977). (recristalizado en etanol absoluto – éter absoluto) |
- iv. Picrato de mescalina

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

4. Identificación espectrométrica de la mescalina y/o derivados

En la Sec. II.B.5 (Identificación espectrométrica de Compuestos Orgánicos, pág.33) se presentará los aspectos generales y la importancia en la determinación de la estructura molecular de las principales técnicas

espectrométricas, a saber la espectrometría de masas, la resonancia magnética nuclear del hidrógeno y del carbono, RMN¹H y RMN¹³C, respectivamente, así como la espectrometría de infrarrojo IR y de ultravioleta UV.

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

a) Espectros de masas de la mescalina y compuestos análogos

1. Ikan (1991)

Proporciona los iones característicos de la mescalina, así como los porcentajes de intensidad, sin indicación del tipo de espectrómetro de masas utilizado:

m/z: 211 (17%); 183 (7%); 182 (59%); 181 (34%); 167 (25%); 151 (6%); 44 (100%); 30 (70%).

| m/z | (Ikan – 1991) | Tesis |
|-----|---------------|---------|
| 211 | 28,81 % | 37,15 % |
| 183 | 11,86 % | 12,16 % |
| 182 | 100 % | 100 % |
| 181 | 57,62 % | 57,59 % |
| 167 | 42,37 % | 48,86 % |
| 151 | 10,17 % | 12,16 % |

Tabla N° 2.- Comparación de los porcentajes de los iones característicos para la mescalina, obtenidos por Ikan (1991) y en esta tesis

Luego, si consideramos en el espectro de masas de Ikan (1991) sólo los valores m/z mayores de 50, entonces el ion a m/z 182 sería el pico base, y en estas circunstancias los porcentajes de los iones característicos de dicho

espectro y aquel obtenido en nuestra tesis (ver Sec. III.J.1) serían análogos (ver Tabla N° 2).

ii. McLaughlin et al. (1986)

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

- Mescalina, m/z : 212 ($M+H$)⁺, 195 ($M+H - CH_3$)⁺, 180 ($M+H - NH_3-CH_3$)⁺, 168 ($M+H - \text{Cadena lateral}$)⁺, 165 ($M+H - NH_3 - CH_2O$)⁺.
- 3,4 - dimetoxi - β - feniletilamina, m/z : 182 ($M+H$)⁺, 165 ($M+H - CH_3$)⁺, 150 ($M+H - NH_3-CH_3$)⁺, 138 ($M+H - \text{Cadena lateral}$)⁺.
- 3,4 - dimetoxi - 4 - hidroxí - β - feniletilamina, m/z : 198 ($M+H$)⁺, 181 ($M+H - CH_3$)⁺, 166 ($M+H - NH_3-CH_3$)⁺, 153 ($M+H - \text{Cadena lateral}$)⁺, 121 ($M+H - NH_3 - CH_2O$)⁺.

iii. Agurell (1969a)

Proporciona los espectros de masas de estos dos últimos compuestos y, además, de la 3 - metoxitiramina, pero no de la mescalina, tal como se reproduce en la Figura N°2.

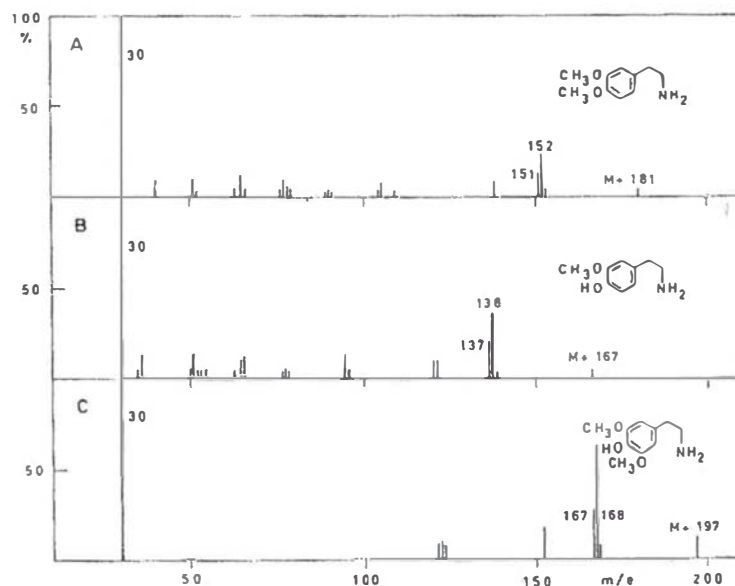


Figura N° 2.- Espectros de Masas de la 3,4-dimetoxifeniletilamina, A; 3-metoxi-4-hidroxí feniletilamina, B y 3,5-dimetoxi-4-hidroxifeniletilamina, C (Agurell-1969a)

En este caso el análisis se realizó con un equipo de Cromatografía de Gases – Espectrometría de Masas LKB 9000.

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

- 3,4-dimetoxi-β-feniletilamina, m/z: 182, 150 (McLaughlin – 1986)
181, 152, 151 (Agurell, 1969a)
- 3,5-dimetoxi-4-hidroxi-β-feniletilamina, m/z: 198, 166 (McLaughlin – 1986)
197, 167, 168 (Agurell, 1969a)

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

El grupo de Agurell (1969a) utiliza un equipo de ionización por Impacto Electrónico, el cual proporciona picos correspondientes a las masas de los fragmentos que se producen a partir del ion molecular, es decir, los valores verdaderos de tales masas.

En cambio, el grupo de McLaughlin et al. (1986), utiliza la técnica de Ionización Química, mediante la cual se obtienen los iones $M + 1$, de acuerdo al fenómeno descrito a continuación: la muestra se introduce casi a presión atmosférica, con un gran exceso de metano. El metano se ioniza (en la forma usual) para dar lugar a los iones primarios CH_4^+ , CH_3^+ , etc. Estos iones reaccionan con el exceso de metano para dar lugar a los iones secundarios CH_5^+ y C_2H_5^+ , de acuerdo a las ecuaciones:



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



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

iv. NIST. Mass Spectrometry Data Center.

A través de Internet se obtuvo el espectro de masas de la mescalina proporcionada por el NIST Chemistry WebBook (ver Fig. N° 3), en el cual se observan los iones característicos a 211, 182 y 166.

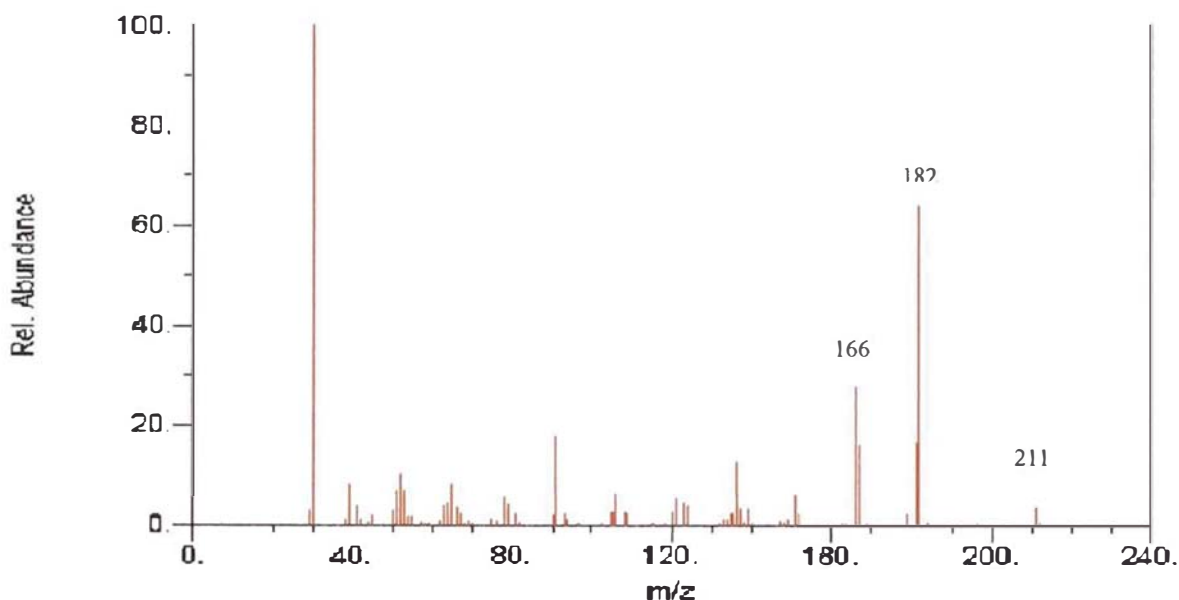
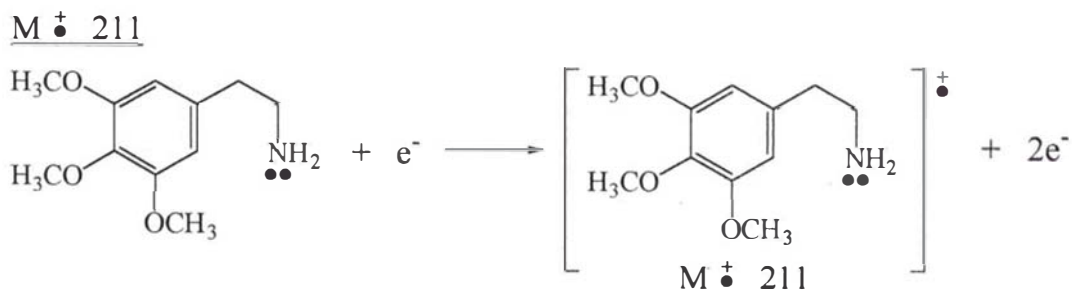


Figura N° 3.- Espectro de Masas de la mescalina (NIST Chemistry WebBook)

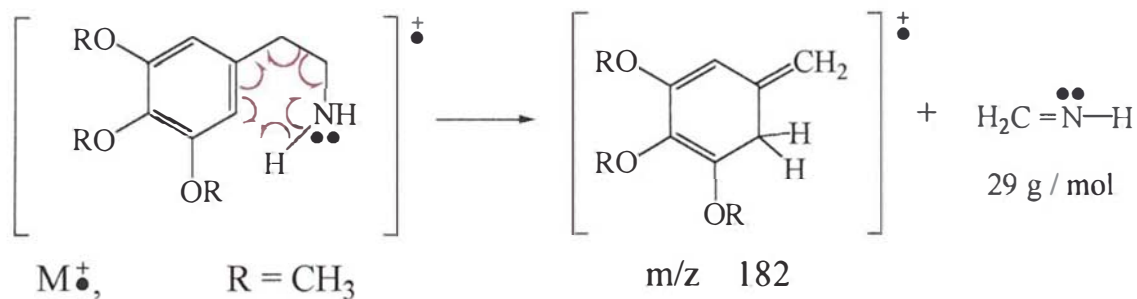
v. Ecuaciones de fragmentación

Espectro de masas de la mescalina (Ikan, 1991)

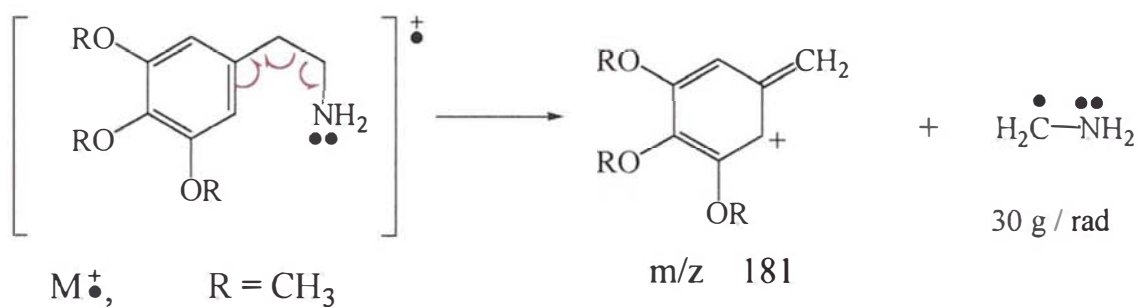
m/z: 211 (M^+ , 17%); 182 (59%); 181 (34%); 167 (25%); 151 (6%); 44 (100%, pico base) y 30 (70%).



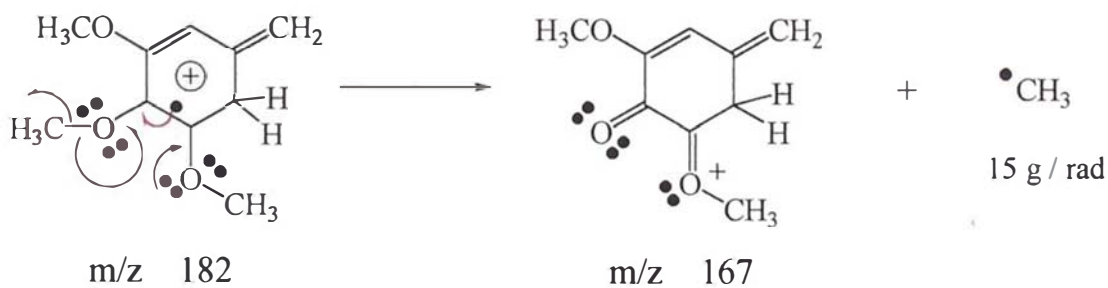
m/z 182: (M⁺ - CH₂NH) (Kapadia & Fayez, 1970)



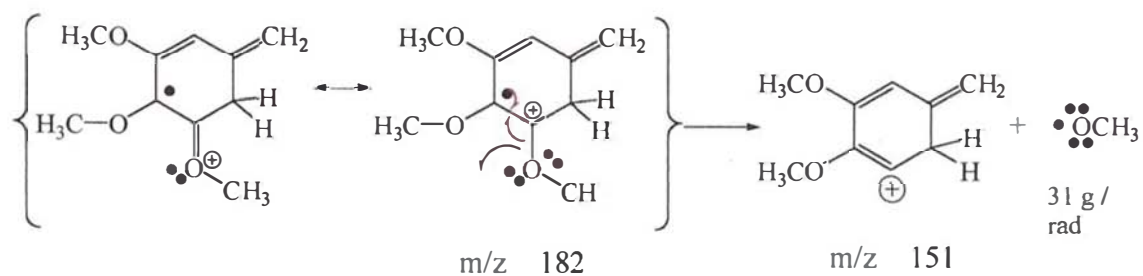
m/z 181: (M⁺ - CH₂NH₂)



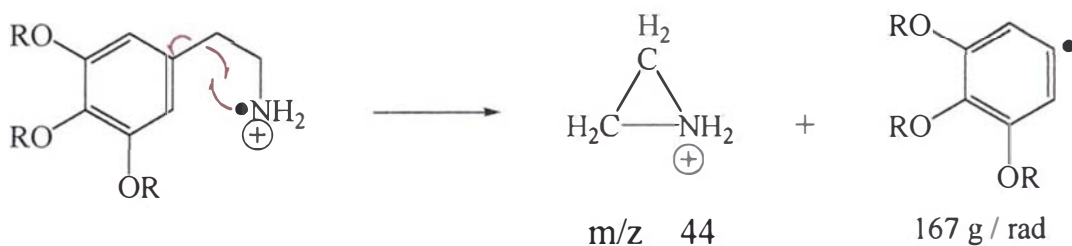
m/z 167: (m/z 182 - CH₃)



m/z 151: (m/z 182 - OCH₃)

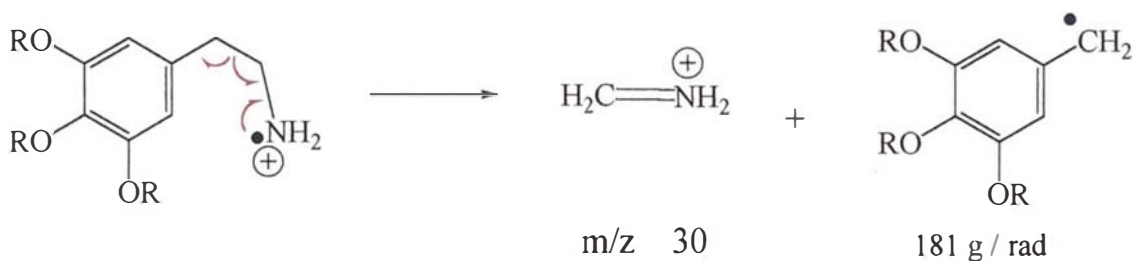


m/z 44:



M^+ , $R = \text{CH}_3$

m/z 30:



M^+ , $R = \text{CH}_3$

b) Espectro ultravioleta – UV

Salomón & Bina (1946) proporcionan el espectro UV del sulfato de mescalina (ver Fig. N° 4) obtenido utilizando un espectrofotómetro Beckman Quartz. A partir de este espectro se deduce que el máximo de absorción es: $\lambda_{\text{max}} = 270 \text{ nm}$.

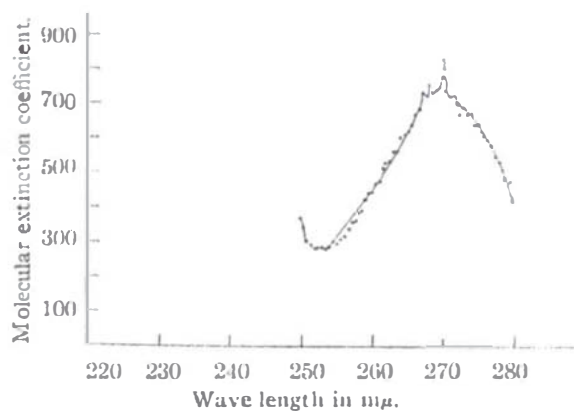


Figura N° 4.- Espectro UV del Sulfato de mescalina en etanol al 80% (Salomón & Bina-1946)

Ikan (1991) refiere que los máximos de absorción del sulfato de mescalina son $\lambda_{\text{max}} = 264, 266 \text{ y } 269 \text{ nm}$.

5. Biosíntesis* de la mescalina

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

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

La biosíntesis de la mescalina está directamente relacionada con el estudio de la biosíntesis de los alcaloides del peyote (*Lophophora williamsii*) y, así, dos de las principales revisiones sobre esta planta (Anderson - 1991 y Kapadia & Fayez - 1970) presentan el mismo esquema biosintético, el cual considera a la tirosina (ii) como el principal precursor de la mescalina, indicando que este precursor puede formarse a partir de la fenilalanina (i). (ver Fig. N° 5).

Asimismo, Agurell (1969b) presenta este mismo esquema, mientras que Agurell & Lundstrom (1968) son los únicos en incluir, además la presencia

Biosíntesis o biogénesis son términos sinónimos.

de la 3,4-dimetoxi-5-hidroxifeniletilamina (viii) en la ruta de biosíntesis de la mescalina. Este último alcaloide ha sido aislado del cactus “San Pedro” (ver Sec. II.A.1.b).

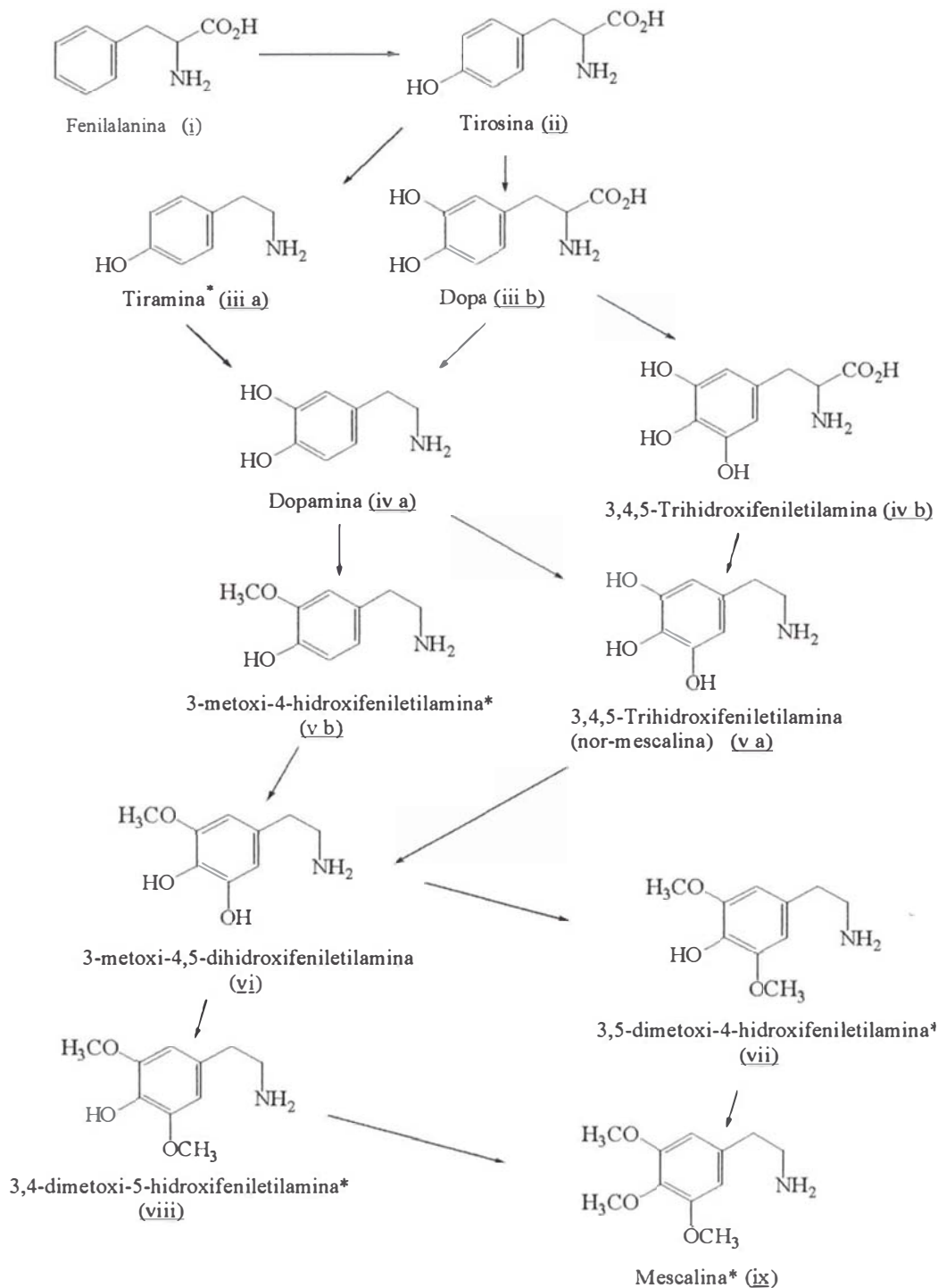


Figura N° 5.- Biosíntesis de la mescalina a partir de tirosina. Con un asterisco (*) se indica los alcaloides aislados del cactus “San Pedro”

Los trabajos con *Echinopsis pachanoi* revelaron la presencia de las especies (v.b) y (vii), productos que no han sido encontrados en el peyote. Los trabajos con precursores marcados demostraron que en este cactus, la mescalina se formaba por la misma secuencia biogenética que en el peyote y, además se pudo comprobar, debido a la mayor incorporación de los intermediarios (iii.a) y (v.a), que en este cactus es más probable que se de la siguiente secuencia: ii → iii.a → iv.a → v.a → vi (Kapadia & Favez – 1970).

6. Síntesis de mescalina

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

La primera síntesis de la mescalina fue realizada por Späth en 1919, y Downing (1962) refiere que desde entonces se han reportado al menos nueve procesos de síntesis de éste compuesto, siendo algunos de ellos variaciones del método original de Späth, y proporciona las referencias de base respectivas. Downing (1962) describe esquemáticamente tres de estos procesos, entre ellos la síntesis inicial de Späth y la síntesis de Tsao (1951).

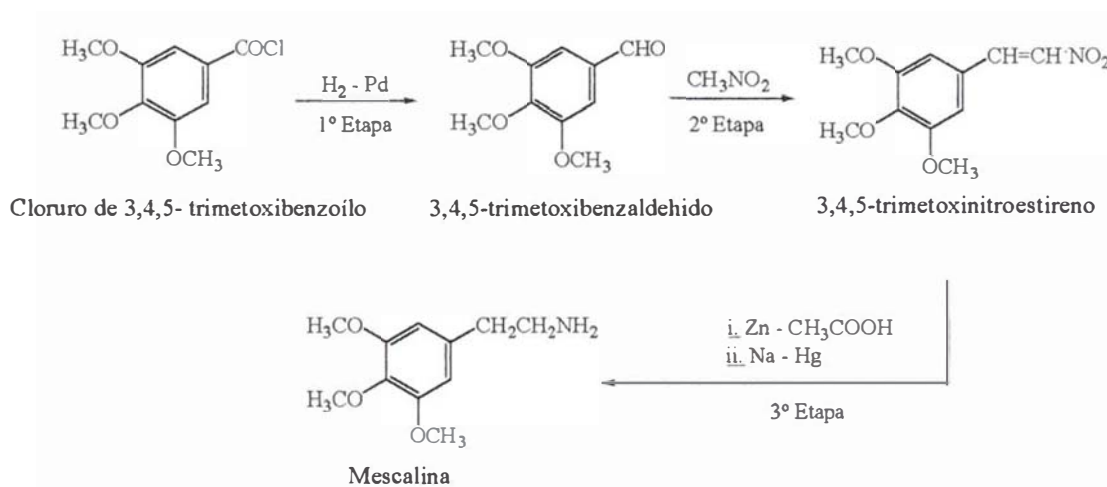
Asimismo, Ikan (1991), refiere seis procesos de síntesis de la mescalina proporcionando las referencias de base, y presenta el procedimiento experimental detallado de la síntesis realizada originalmente por Tsao (1951).

A continuación presentaremos dos métodos de síntesis de la mescalina, la síntesis inicial de Späth de 1919, tal como lo describe esquemáticamente

Downing (1962), y la síntesis propuesta por Tsao (1951), la cual es reproducida por Ikan (1991).

Síntesis N° 1.- Método de Späth, 1919 (Downing – 1962)

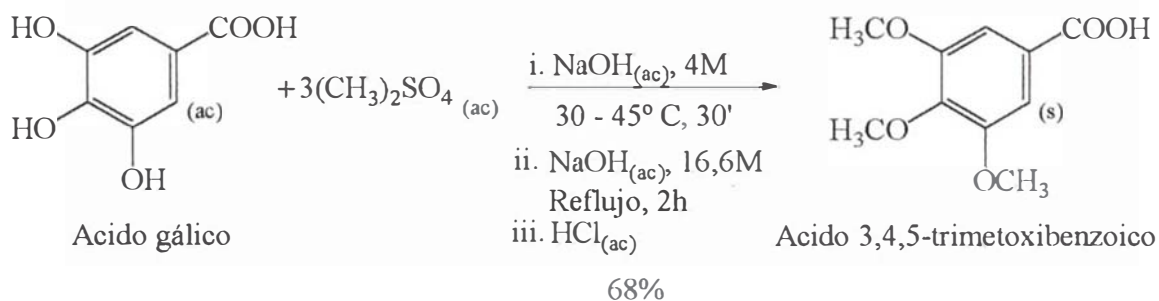
La síntesis realizada por Späth involucra tres etapas (reacciones químicas diferentes), las cuales son presentadas esquemáticamente por Downing (1962) como se muestra a continuación:



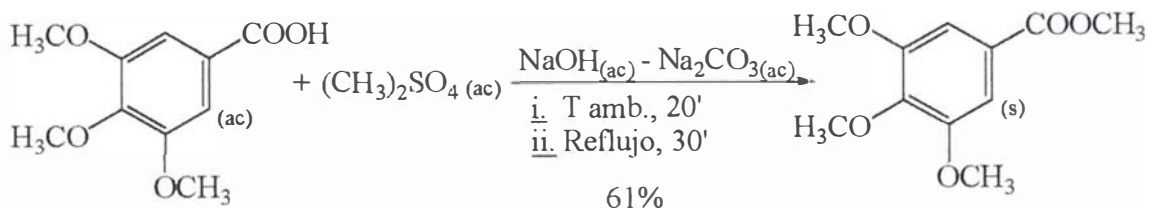
Síntesis N° 2.- Método de Tsao (1951)

Esta síntesis involucra seis etapas, con un rendimiento global de 1,83 %. Ikan (1991) reproduce esta síntesis, proporcionando las mismas condiciones de reacción y rendimientos para cada etapa, con el agregado que incluye el procedimiento experimental de la primera etapa, la cual no es presentada en la referencia de Tsao (1951).

1ª Etapa. Síntesis del ácido 3,4,5-trimetoxibenzoico.



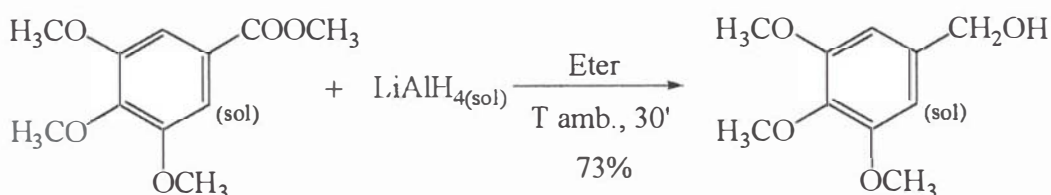
2ª Etapa. Síntesis del 3,4,5-trimetoxibenzoato de metilo



Acido 3,4,5-trimetoxibenzoico

3,4,5-trimetoxibenzoato de metilo

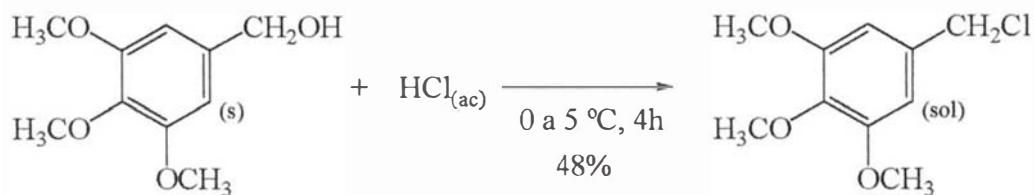
3ª Etapa. Síntesis del Alcohol 3,4,5-trimetoxibencílico



3,4,5-trimetoxibenzoato de metilo

Alcohol 3,4,5-trimetoxibencílico

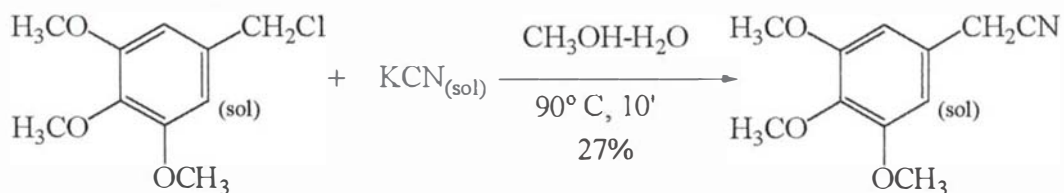
4ª Etapa. Síntesis del Cloruro de 3,4,5-trimetoxibencilo



Alcohol 3,4,5-trimetoxibencílico

Cloruro de 3,4,5-trimetoxibencilo

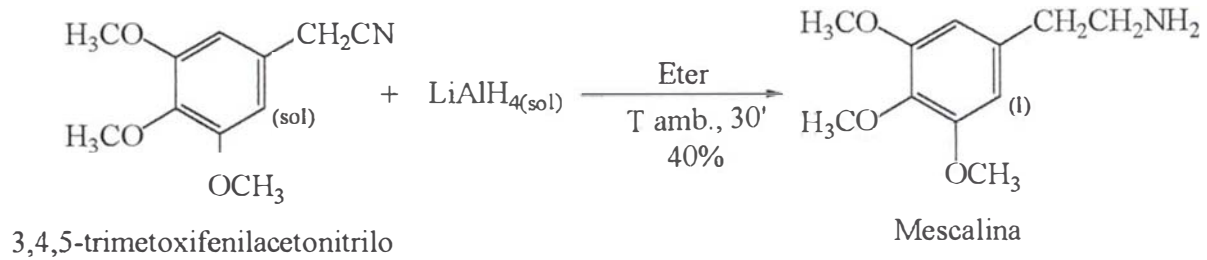
5ª Etapa. Síntesis del 3,4,5-trimetoxifenilacetnitrilo



Cloruro de 3,4,5-trimetoxibencilo

3,4,5-trimetoxifenilacetnitrilo

6ª Etapa. Síntesis de la Mescalina



B. ESTUDIOS QUIMICOS GENERALES

1. Análisis cualitativo – Marcha fitoquímica

Hemos revisado tres procedimientos citados en la bibliografía:

- i. Reyna (1999)
- ii. Lock (1994)
- iii. Miranda (1996)

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

Miranda (1996) sigue un procedimiento totalmente diferente, para llegar a los mismos resultados. Este procedimiento lo hemos experimentado durante nuestra práctica Pre Profesional en “La Molina Calidad Total Laboratorios”(abril – julio, 1998) y fue presentado como informe del curso CP 500 Taller de Prácticas Pre Profesionales (Per. Acad. 98 – 2). Tiene la desventaja de utilizar éter etílico, que es un solvente muy volátil y muy caro, y una cantidad mucho mayor de muestra y de solventes debido a que los extractos se obtienen por percolación*.

En esta tesis hemos seguido el procedimiento de Reyna (1999) (ver Procedimiento Experimental, Sec. III.F, pág. 52).

2. Test de alcaloides

De los diversos tests que pueden ser usados para reconocer la presencia de alcaloides en una muestra vegetal o en sus extractos hemos escogido tres de ellos: Mayer y Dragendorff por ser dos tests generales para alcaloides, y el test de Marquis por ser selectivo (para un grupo restringido de alcaloides entre los que se encuentra la mescalina).

En el Anexo N° 2 se describen los procedimientos seguidos para realizar los tests respectivos.

* 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. Determinación cuantitativa 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 20ª edición de la Farmacopea de los Estados Unidos (1980).

Procedimiento N° 1: Pelt et al. (1967)

• Obtención del Extracto Bruto Orgánico

- i. Alcalinización de la muestra seca y pulverizada con una solución de amoníaco concentrado $\text{NH}_3(\text{ac})$ 15N
- ii. Maceración con una mezcla de solventes: Etanol : Cloroformo (1 : 2), Etanol : Eter etílico (1 : 2) ó Eter etílico : Cloroformo (3 : 1).
- iii. Extracción de la muestra vegetal con Eter etílico usando un Soxhlet, verificando si la extracción es completa mediante el test de Mayer.
- iv. Evaporación de los solventes orgánicos: Extracto Bruto Orgánico (EBO)

• Obtención del Extracto Bruto de Alcaloides (EBA)

- v. Disolución del EBO con una mezcla de Eter etílico – Cloroformo y extracción de los alcaloides, como sales, mediante la adición de una solución acuosa de ácido sulfúrico $\text{H}_2\text{SO}_4(\text{ac})$ 0,5N.
- vi. Alcalinización de la solución ácida con una solución de amoníaco concentrado $\text{NH}_3(\text{ac})$ 15N, y extracción de los alcaloides como bases libres en una mezcla de Eter – Cloroformo.
- vii. Evaporación del solvente orgánico y obtención del Extracto Bruto de Alcaloides, EBA.

• Eliminación de las bases volátiles residuales

- viii. Disolución del EBA en cloroformo
- ix. Evaporación del solvente en baño maría
- x. Repetición de la operación, de las etapas viii y ix, respectivamente

- **Determinación de los alcaloides**

- xi. Disolución del extracto en cloroformo
 - xii. Adición de 50 mL de solución de ácido sulfúrico $H_2SO_{4(ac)}$ 0,2N
 - xiii. Evaporación del solvente orgánico en baño maría
 - xiv. Filtración y lavado del filtrado,
 - xv. Adición del indicador Rojo de Metilo
 - xvi. Titulación del exceso de ácido con una solución de hidróxido de sodio $NaOH_{(ac)}$ 0,2N

Procedimiento N° 2: U.S. Pharmacopaeia (1980)

- **Tratamiento previo de la muestra**

- i. Secado de la muestra a baja temperatura
 - ii. Molienda

- **Obtención del Extracto Bruto Orgánico (Se contemplan tres métodos):**

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

Se decanta el sólido y se separa del extracto.

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

Se deja reposar durante 5 minutos y se alcaliniza con una solución de amoníaco $NH_{3(ac)}$.

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

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

- iii.c Extracción continua.- Se coloca la muestra en el extractor Soxhlet.

Se humedece la muestra con el solvente 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.

- **Obtención del Extracto Bruto de Alcaloides**

iv. 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.

- **Determinación de los alcaloides.**

v. Se evapora la solución de alcaloides purificados con un baño de vapor o con corriente de aire.

vi. 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.

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

Procedimiento realizado en nuestra Tesis

En nuestra Tesis hemos tomado como referencia el método de Pelt et al. (1967), con ciertas modificaciones; y en la Tabla N° 3 se resumen ambos procedimientos.

4. Aislamiento de alcaloides

En este acápite presentamos dos procedimientos generales para el aislamiento de alcaloides.

Procedimiento N° 1: Reyna & Torpoco (1994)

- **Extracción sólido – líquido: Obtención del Extracto Bruto Orgánico**

i. Desengrase del material vegetal, seco y molido con éter de petróleo (50 – 90° C).

ii. Alcalinización con una solución acuosa de amoníaco NH₃ al 5%

iii. Extracción a reflujo con etanol.

iv. Eliminación del solvente por destilación simple: Extracto Bruto Orgánico (EBO)

| NATURALEZA DE LAS OPERACIONES | | PELT ET AL. (1967) | PROCEDIMIENTO UTILIZADO EN LA TESIS |
|--------------------------------------|--|--|--|
| EXTRACCION | PESO DE LA MUESTRA | 10 g | 50 g |
| | DESENGRASE | No se realiza | 600 mL n – hexano en Soxhlet |
| | ALCALINIZACION | Amoniaco concentrado (8mL) | Amoniaco concentrado (50 mL) |
| | SOLVENTE | Alcohol 95°:Cloroformo, 1:2 (30 mL) ó Etanol:Eter, 1:2 (30 mL) ó Eter:Cloroformo, 3:1 (150 mL) | Metanol:Cloroformo 1:1 (300 mL.) |
| | FORMA DE EXTRACCION | Maceración: 12 h, agitación, o una combinación de ambas | Maceración 3 días |
| | SEPARACION DE LA SOLUCIÓN EXTRACTORA | Extracción con Eter etílico utilizando un Soxhlet | Con mezcla Metanol : Cloroformo : Acetato de etilo 1:1:2 utilizando un Soxhlet |
| | VERIFICACION DE LA EXTRACCION | Reactivo de Mayer | Reactivo de Mayer |
| SEPARACION | PURIFICACION Y ELIMINACION DE PIGMENTOS Y OTRAS FRACCIONES SOLUBLES | <ul style="list-style-type: none"> • Evaporación del solvente • Reemplazo del solvente con la mezcla éter – cloroformo • Paso de los alcaloides a una solución de ácido sulfúrico 0,5N • Basificación de la solución ácida con amoniaco acuoso y retorno de los alcaloides libre a una mezcla de éter – cloroformo • Evaporación del solvente | <ul style="list-style-type: none"> • Evaporación del solvente • Disolución del sólido en ácido sulfúrico 0,5N • Lavado de la solución ácida con cloroformo • Basificación de la solución ácida con amoniaco acuoso y extracción de los alcaloides libre con cloroformo • Evaporación del solvente |
| | ELIMINACION DE LAS BASES VOLATILES | <ul style="list-style-type: none"> • 15 minutos en bañomaria hirviendo • Redisolución del residuo en cloroformo • Evaporación a sequedad • 15 minutos en bañomaria hirviendo | <ul style="list-style-type: none"> • Disolución del sólido en cloroformo • Evaporación en el rotavapor (40° C 400 – 50 mbar) • Repetición de la operación 4 veces |
| CUANTIFICACION | TITULACION ACIDO – BASE | <ul style="list-style-type: none"> • Redisolución del residuo en cloroformo • Adición de 20 mL de H2SO4 0,2N • Evaporación del cloroformo en bañomaria • Filtración y lavado del filtrado • Titulación del exceso de ácido con NaOH 0,2N | <ul style="list-style-type: none"> • Redisolución del residuo en cloroformo • Adición de 20 mL de H2SO4 0, 2N • Evaporación del cloroformo en bañomaria • Titulación del exceso de ácido con NaOH 0, 2N |
| | OBSERVACION DEL PUNTO FINAL | Rojo de metilo | Titulación Potenciométrica |

Tabla N° 3.- Comparación del método de determinación cuantitativa de alcaloides descrito por Pelt et al. (1967) y aquel utilizado en la Tesis.

- **Separación líquido – líquido: Obtención del Extracto Bruto de Alcaloides**
 - i. Disolución de la EBO con solución de ácido sulfúrico $\text{H}_2\text{SO}_{4(\text{ac})}$ 2N.
 - ii. Lavado con solvente orgánico (cloruro de metileno).
 - iii. Alcalinización del extracto acuoso con carbonato de sodio y extracción de los alcaloides libres con cloruro de metileno.
 - iv. Concentración por destilación simple: Extracto Bruto de Alcaloides.
- **Purificación**
 - i. Cromatografía en capa fina
 - ii. Cromatografía en placa preparativa y en columna
- **Conclusión.** Se obtuvo el alcaloide puro y se caracterizó por espectrometría de masas y resonancia magnética nuclear RMN^1H .

Procedimiento N° 2: McLaughlin et al. (1977)

- **Extracción sólido – líquido: Obtención del Extracto Bruto Orgánico**
 - i. Desengrase del material vegetal seco y molido, con éter de petróleo (30 – 60° C).
 - ii. Humedecimiento con la mezcla cloroformo-metanol-hidróxido de amonio al 58% 2:2:1 en un percolador.
 - iii. Maceración con la mezcla cloroformo-metanol-hidróxido de amonio al 58% 9:0,9:0,1.
 - iv. Extracción por percolación con cloroformo.
 - v. Obtención del Extracto Bruto Orgánico (EBO) concentrando el extracto por destilación al vacío.
- **Separación líquido – líquido: Obtención del Extracto Bruto de Alcaloides**
 - i. Disolución del Extracto Bruto Orgánico con solución de ácido clorhídrico $\text{HCl}_{(\text{ac})}$ 1N.
 - ii. Lavado con solventes orgánicos (cloroformo y éter etílico).

- iii. Alcalinización del extracto acuoso con hidróxido de sodio y extracción de los alcaloides libres con cloroformo y éter etílico (fracción A).
 - iv. Destilación del solvente orgánico en el rotavapor: Extracto Bruto de Alcaloides, EBA.
- **Purificación:**
 - i. Resolución del extracto en fracción fenólica y fracción no fenólica mediante resina de intercambio Amberlita IRA – 401S.
 - ii. Obtención del clorhidrato de mescalina por precipitación con una solución de cloruro de hidrógeno HCl al 5% en etanol absoluto, a partir de la fracción no fenólica.
 - iii. Cromatografía en placa preparativa de las aguas madres y posterior extracción de una segunda porción de mescalina.
 - **Conclusión.-** Se obtiene el alcaloide puro y se prepara el clorhidrato respectivo.

Comparación de Procedimientos

Los cinco procedimientos de aislamiento de alcaloides presentados, tres en la Sec. II.A.2 (págs. 8 – 12) y dos en esta sección, siguen dos grandes etapas para la obtención del Extracto bruto de Alcaloides, tal como se resume a continuación:

- i. Obtención del Extracto Bruto Orgánico, EBO
 - Desengrase con solventes orgánicos
 - Alcalinización con amoníaco $\text{NH}_3(\text{ac})$
 - Extracción con solventes (por maceración, percolación, reflujo o soxhlet)
 - Eliminación del solvente por destilación y obtención del EBO
- ii. Obtención del Extracto Bruto de Alcaloides, EBA
 - Disolución del EBO con $\text{H}_2\text{SO}_4(\text{ac})$ o $\text{HCl}(\text{ac})$.
 - Lavado con solvente orgánico (CH_2Cl_2 , CHCl_3 y/o éter etílico)

Alcalinización (con Na_2CO_3 , NaOH o $\text{NH}_3(\text{ac})$)

- Extracción con solventes orgánicos
- Eliminación del solvente por destilación y obtención del EBA

En nuestra tesis hemos seguido este mismo esquema general.

5. Identificación espectrométrica de compuestos orgánicos (Reyna, 1999)

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

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

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

a) Espectrometría de masas, EM

En un espectrómetro de masas, las moléculas 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 ion de carga positiva (con un número impar de electrones, un catión radical) al que se le denomina “ion molecular” y se lo representa por M^+ .

Además el haz de electrones imparte a los iones moleculares un excedente muy grande de energía, que es muy superior a lo que se requiere

para romper los enlaces covalentes (50 a 100 Kcal /mol) de las moléculas, y así poco después que se forman los iones moleculares la mayoría de ellos se “fragmentan” en diversas formas, que dependen de la naturaleza del ion molecular específico.

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

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

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

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

b) Espectrometría de resonancia magnética nuclear del hidrógeno, RMN¹H

Se conoce como Resonancia Magnética Nuclear RMN al proceso de absorción de energía que experimenta el núcleo de un elemento, en este caso el hidrógeno, cuando interactúa con un campo magnético fuerte, y simultáneamente se lo irradia con energía electromagnética.

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

Los instrumentos conocidos como espectrómetros de RMN permiten medir la absorción de energía en los núcleos de hidrógeno (de un compuesto orgánico). Estos instrumentos están diseñados de manera que irradian al compuesto con energía electromagnética de frecuencia constante (60, 80, 200, 500 ó 600 MHz) mientras se varía la fuerza del campo magnético. Cuando este campo magnético alcanza la fuerza correcta, los núcleos de hidrógeno absorben energía (y se produce la “resonancia”): esta absorción es registrada por el instrumento como una señal (un pico o una serie de picos) sobre una hoja de papel calibrado.

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

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

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

nos indica el número de hidrógenos vecinos que tiene el protón que origina la señal.

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

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

c) Espectrometría de resonancia magnética nuclear de carbono – 13, RMN¹³C

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

Igual que en el isótopo de hidrógeno ¹H, el núcleo del isótopo de carbono – 13, ¹³C, tiene valores de spin de +1/2 y –1/2, que permite utilizarlo en espectroscopia de RMN, y por ello, los principios físicos de la RMN¹³C son los mismos que los de la RMN¹H. Sin embargo, se presenta una diferencia. En la RMN¹H se estudia al isótopo natural más común del hidrógeno, ¹H, cuya abundancia es del 99,98% del total de hidrógenos. Por el contrario, en la RMN¹³C se estudia al isótopo de carbono menos abundante, al ¹³C, que constituye el 1,1% del total de carbonos. Esta deficiencia deviene en una ventaja, en razón de que no se observan

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

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

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

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

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

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

En el espectro de RMN ^{13}C desacoplado de los protones, el núcleo de ^{13}C no está acoplado con los de ^1H y, por lo tanto, no muestra acoplamiento spin – spin. El desacoplamiento se hace electrónicamente irradiando la muestra con una segunda radiofrecuencia. Dado que no hay desdoblamiento de picos, la señal de cada grupo de átomos de carbono magnéticamente

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 picos que aparecen en el espectro. El Espectro N° 4 (pág. 76) del sulfato de mescalina es un ejemplo de este tipo.

En el espectro de RMN¹³C acoplado a ¹H no se suprime el acoplamiento ¹³C – ¹H y, en este caso, la señal de cada carbono se desdobra por acción de los protones directamente enlazados a él, aplicándose también la regla n + 1 donde n es el número de átomos de hidrógeno enlazados al átomo de carbono que se analiza. Así, un carbono cuaternario (enlazado a cuatro grupos alquílicos y sin H enlazado a él) presenta una señal singulete; un carbono terciario (que sólo tiene 1 H enlazado) presenta un doblete; un carbono secundario (que tiene 2 H) presenta un triplete y un carbono primario (un grupo metilo, CH₃) presentará un cuadruplete.

Espectros con transferencia de polarización. Además de estas dos clases de espectros también pueden obtenerse los denominados espectros SPI*, INEPT* y DEPT* (de 45, 90 ó 135), mediante la denominada transferencia de polarización. Queda fuera de esta breve presentación la explicación de estas técnicas, y solo referiremos que mediante los espectros de RMN¹³C DEPT 90 se obtiene información sobre los distintos átomos de carbono primarios (CH₃), secundarios (CH₂) y terciarios (CH) que están presentes en una molécula, tal como se explica en la Sec. III.J.3, (pág. 68 – 69).

d) Espectrometría de Infrarrojo, IR

El espectro de infrarrojo de un compuesto es una representación gráfica de la longitud de onda λ ó del número de onda ν^{-1} , en el rango de radiación

SPI = Selective Poblacion Inverton

INEPT = Insensitive Nuclei Enhanced by Polarization Transfer

DEPT = Distortionless Enhanced by Polarization Transfer

infrarroja (4000 a 666 cm^{-1}), en relación a la transmitancia (%T) o absorbancia (A) que presenta la muestra.

En nuestro espectro IR del sulfato de mescalina (pág. 77) se registra el número de onda ν^{-1} con respecto a la transmitancia (%T).

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

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

La absorción de radiación por la muestra a una longitud de onda determinada origina un descenso en el %T, lo que se pone de manifiesto en el espectro en forma de un “pico” o más propiamente de una “banda de absorción”.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

e) Espectrometría de Ultravioleta, UV

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

La posición de la absorción UV se especifica como λ_{max} , es decir la longitud de onda del punto máximo de la curva de absorción, la cual corresponde a la longitud de onda de la radiación cuya energía es la requerida para que se produzca una transición electrónica.

La intensidad de la absorción UV (expresada como Absorbancia) cumple con la Ley de Lambert – Beer, la cual relaciona la absorbancia A , la transmitancia T y la absorptividad molar ϵ (coeficiente de extinción molar) según la ecuación:

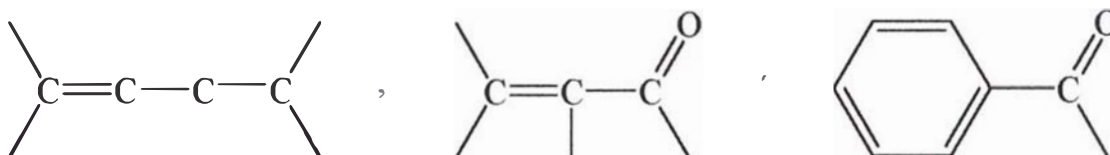
$$A = \text{Log}_{10}(1/T) = \epsilon cb \text{ y } \epsilon = A/cb$$

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

Cuando los valores de ϵ son muy grandes es común utilizar $\log \epsilon$ en los gráficos de UV. Las absorciones con $\epsilon_{\text{max}} > 10^4$ son absorciones de alta

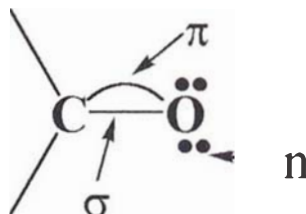
intensidad, mientras que las absorciones de baja intensidad corresponden a valores de $\epsilon_{\text{max}} < 10^3$. Estas últimas se consideran “transiciones prohibidas”.

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



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

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



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

III. TRABAJO EXPERIMENTAL

1. Presentación

Durante el viaje de estudio de la flora medicinal en la comunidad de Canchopilca (Prov. Huaral, departamento de Lima, a 2000 m.s.n.m..) en el mes de diciembre de 1987, el Dr. Víctor Reyna P. colectó el cactus “San Pedro Macho” (*Echinopsis peruvianus*), el cual se utilizó posteriormente como tema de los cursos CQ 561 Proyecto de Tesis I y CQ 562 Proyecto de Tesis II (Per. Acad. 92 – 2, 93 – 1, 94 – 2 y 95 – 1), e inscrito como tesis de Licenciatura de la ex – alumna María Caramantín S. el 06.02.96 (Nº de registro N 91 de la Facultad de Ciencias).

Las limitaciones de equipamiento en nuestro laboratorio, en particular la falta de equipo de destilación a presión reducida “rotavapor” (adquirido en agosto de 1995) y de la bomba de vacío con trampa de agua (adquirida en febrero de 1999) no permitieron obtener los resultados esperados, y la Bach. Caramantín partió a realizar estudios de Maestría en Brasil en marzo de 1997 sin concluir dicho trabajo de Tesis.

Durante este periodo ocurrió una equivocación. Al haberse agotado la muestra del cactus “San Pedro Macho” (*E. peruvianus*), con la ayuda de fotografías de dicho cactus consultamos en Lima con el Sr. F. Guerrero P., herbolario residente en la provincia de Huancabamba (Dpto. de Piura, a 2000 m.s.n.m.) sobre la existencia de tal cactus en dicha provincia, y al recibir respuesta afirmativa le solicitamos que lo colectara, recibiendo la muestra en octubre de 1995, continuando el trabajo con dicho cactus. En el mes de abril del año siguiente (1996), aprovechando un viaje a la ciudad de Piura, el Dr. V. Reyna se desplazó hasta la ciudad de Huancabamba para fotografiar “in situ” y coleccionar muestras de dicho cactus, para su identificación botánica, encontrando que la muestra era en realidad el cactus “San Pedro Hembra” (*Echinopsis pachanoi*)*

Identificado por el Dr. Carlos Ostolaza Nano, (ver Anexo N° 1)

A raíz de ello se realizó la revisión bibliografía respectiva y al verificar que dicho cactus (*E. pachanoi*) no había sido tema de tesis en química, ni se había publicado el aislamiento e identificación de sus alcaloides en nuestro país, decidimos continuar el estudio químico de esta especie y dejar de lado al “San Pedro Macho” (*E. peruvianus*).

En el Per. Acad. 98 – 1 (abril – julio 98) el autor de esta tesis José Flores G. se inscribió en el curso CQ561 Proyecto de Tesis I realizando el trabajo “Estudio Fitoquímico del ‘Sanpedro Hembra’ (*Echinopsis pachanoi*)”.

Continuando con el estudio de dicha planta en el siguiente semestre 98 – 2 (agosto – diciembre 98) con el curso CQ562 Proyecto de Tesis II realizando el trabajo “Estudio Químico (Alcaloides y Esteroides) del Sanpedro (*Echinopsis Pachanoi*)”, e inscribiendo en nuestra Facultad de Ciencias el plan de Tesis de Licenciatura “Estudio Químico del cactus San Pedro Hembra (*Echinopsis pachanoi*)” con fecha 16.07.99 (Nº de registro 142).

Consideramos importante indicar que todas las etapas experimentales de laboratorio químico, desde el secado de la planta hasta la obtención del sulfato de mescalina se realizaron en el Ambiente de Investigación de Química Orgánica de Productos Naturales (C3 – 175) del Laboratorio Nº 12 de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Ingeniería, en el período comprendido entre julio de 1998 y diciembre de 1999, demandando un tiempo aproximado de 7 meses de trabajo efectivo (5 días por semana, 8 horas por día).

Igualmente, la identificación del sulfato de mescalina mediante procedimientos clásicos (Punto de Fusión y Cromatografía en Capa Fina – CCF) se realizó en nuestro laboratorio en el mes de junio de 1999. En cambio, el análisis porcentual de elementos y los espectros de Masas y de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno y de Carbono, respectivamente

se realizaron en el Instituto de Química de la Universidade Estadual de Campinas – Unicamp (Brasil), en los meses de enero y febrero del presente año 2000, gracias a la colaboración de la M.Sc. María Caramantín S., bachiller egresada de nuestra especialidad.

Por otra parte, los espectros de infrarrojo IR y de ultravioleta UV fueron obtenidos en los laboratorios de nuestra Facultad.

Actualmente los métodos de purificación e identificación de alcaloides involucran el uso de equipos acoplados de separación cromatográfica e identificación espectrométrica, como la Cromatografía de Gases – Espectrometría de Masas CG – EM y la Cromatografía Líquida de Alta Presión – Espectrometría de Masas HPLC – EM.

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

TRABAJO PRELIMINAR

A. COLECCION DE LA PLANTA. CACTUS “SAN PEDRO” (*E. pachanoi*)

Todas las muestras del cactus *E. pachanoi* estudiadas, se han adquirido directamente a herbolarios y/o curanderos que utilizan dicho cactus para la preparación de la bebida del mismo nombre, la cual es ampliamente utilizada en medicina tradicional en toda la costa y sierra del norte peruano.

La muestra N° 1 (ver Tabla N° 4) fue colectada en el distrito de Sapalache (Prov. Huancabamba, departamento de Piura) en abril de 1998,

por el Sr. Patricio Bermeo, miembro de la Filial Piura del Instituto Nacional de Medicina Tradicional – INMETRA, gracias a una solicitud que le hicieramos a través del Dr. Germán Fernández Ñique, investigador del Inmetra.

La muestra N° 2 fue colectada en la provincia de Huancabamba (Dpto Piura) por el Sr. F. Guerrero P. en el mes de julio de 1998. La muestra N° 3 se colectó en la ciudad de Barranca (15.08.98) por el Sr. S. Santos F., curandero local y el autor de esta tesis.

Las muestras SP4 a SP6 fueron adquiridas al Sr. E. Cruz N., herbolario del Mercado Modelo de Chiclayo por el Dr. V. Reyna P. el 23.01.99.

En la Tabla N° 4 se resume esta información, se indican los cactus utilizados en este estudio, su procedencia y fecha de adquisición, su peso y el trabajo que se realizó con ellos.

| Muestra N°* | N° de costillas | Procedencia (colector) | Fecha de colección o adquisición | Peso fresco (g) | Peso seco (g) | Trabajo realizado** |
|-------------|-----------------|--|----------------------------------|-----------------|---------------|---------------------|
| SP1 | 6 | Sapalache (Piura) PB | Abril, 1998 | 1921 | 108,8 | MF |
| SP2 | 7 | Huancabamba (Piura) – FGP | Julio, 1998 | No se pesó | 88 | DC |
| SP3 | 5 / 6 | Barranca (Lima) JFG/SSF | 15.08.98 | 1733 | No se pesó | MF DC |
| SP4 | 6 | Mdo. Modelo de Chiclayo (Lambayeque) VRP | 23.01.99 | 4010 | 276,2 | MF – DC Aislamiento |
| SP5 | 7 | | | 7669 | 380,6 | MF Aislamiento |
| SP6 | 8 | | | 2079 | 83,8 | MF |

Tabla N° 4.- Muestras utilizadas del cactus “San Pedro” (*E. pachanoi*)

* SP1 a SP6 se refiere a las muestras de Cactus “San Pedro” (*E. pachanoi*)

**MF = marcha fitoquímica; DC = determinación cuantitativa; Aislamiento = aislamiento del sulfato de mescalina.

Adicionalmente, realizamos la colecta del cactus “San Pedro” (*E. pachanoi*) en la provincia de Huancabamba, a 2000 m.s.n.m., en el mes de julio de 1999, material que se utiliza en otros trabajos del grupo de investigación que dirige el Dr. V. Reyna, asesor de esta tesis.

B. ESTUDIO ETNOBOTANICO Y ETNOMEDICINAL. Uso del cactus “San Pedro” en medicina tradicional (Reyna – 1996)

En nuestro país existen y se utilizan varias plantas con constituyentes psicoactivos. Las más conocidas son la coca (*Erythroxylum spp.*); el binomio “ayahuasca” (*Banisteriopsis caapi*) y “chacrana” (*Psychotria viridis*), utilizadas en la preparación de la bebida “ayahuasca” en toda la amazonía; y el “San Pedro” (*Echinopsis pachanoi*).

El cactus “San Pedro” es la principal entre todas las plantas medicinales utilizadas por los curanderos del norte del Perú.

En toda la costa peruana los curanderos utilizan en sesiones nocturnas permanentemente y desde hace siglos, la bebida denominada “San Pedro”, la cual se prepara mediante la decocción del cactus del mismo nombre “San Pedro” (*E. pachanoi*).

El cactus recibe diversas denominaciones, llamándosele “San Pedro” y “La Paja” (en la costa norte del Perú), Huachuma (en la sierra norte y central del Perú), “Achuma” (en Bolivia – Cochabamba) y “Aguacolla” o “Gigantón” (en los andes ecuatorianos). También se le denomina “San Pedro Hembra” para diferenciarlo de la especie *Echinopsis peruvianus*, que es el “San Pedro Macho”. En esta tesis al referirnos a la especie *E. pachanoi* simplemente la denominaremos “San Pedro”.

En cambio la bebida preparada con dicho cactus (*E. pachanoi*) recibe simplemente el nombre de “San Pedro” o “el remedio”.

Para los curanderos las propiedades fundamentales de la bebida “San Pedro” son dos:

- i. Permite alcanzar al curandero “estados modificados de conciencia” en los cuales llega a conocer la afección del paciente y su origen, y el tratamiento a seguir para su curación.
- ii. La “purga” del organismo del paciente, que le ayuda a eliminar los agentes que afectan su salud.

La identificación del *E. pachanoi* o una especie vecina, en cerámicas y textiles, donde está asociado a jaguares y espíritus de la cultura Chavín, indica que tal cactus se utiliza en rituales desde hace al menos tres mil años (Shultes, R. & A. Hofmann – 1979).

Los cronistas Oliva y Cobo describieron como los nativos tomaban el jugo de un cactus no espinoso denominado <achuma> en rituales y aplicaciones medicinales: “Quienes tomaban ... se mostraban adormecidos y perdían la capacidad de razonar. En este estado también experimentaban sueños proféticos y visiones” (Cabieses, F. – 1993).

C. DETERMINACION SISTEMATICA

Las muestras de “San Pedro” (*E. pachanoi*) fueron identificadas por el Dr. Carlos Ostolaza Nano, reconocido especialista en cactáceas y suculentas del país, y Presidente de la Sociedad Peruana de Cactus y Suculentas SPECS (ver Anexo N° 1). Las fotos N° 1 y 2 muestran al cactus “San Pedro” y algunos tallos de dicho cactus.

D. ESTUDIO BIBLIOGRAFICO

Durante la estadía de investigación que realizó el Dr. Victor Reyna P. en Lyon – Francia, en el periodo octubre de 1990 – setiembre de 1991, se obtuvieron las principales referencias relativas al aislamiento de los



Foto N° 1.- Cactus “San Pedro” Huancabamba – Piura (2000 m.s.n.m.) (Foto V. Reyna)



Foto N° 2.- Tallos de cactus “San Pedro” Lab. N° 12 – UNI (Foto V. Reyna)

alcaloides del cactus “San Pedro”, por lo que desde el inicio de nuestro trabajo nos permitió contar con ellas: Poisson (1969), Turner & Heymann (1960), Mc Laughlin et al. (1973 y 1977), Agurell (1969).

Además, en el mes de febrero de 1996 se consultó el Banco de Datos del Chemical Abstracts relativo a los 10 últimos años (1985 – 1996), gracias a la colaboración del Dr. Andre Collet (Ecole Normale Superieure – ENS de Lyon – Francia), y en ese período sólo se refiere un artículo relativo al aislamiento de triterpenos del cactus “San Pedro”.

Igualmente, gracias a la colaboración de los Drs. Andre Collet y Joelle Vidal de la ENS de Lyon se obtuvieron las dos principales revisiones sobre mescalina que son citadas en el Merck Index (1996): Patel (1968) y Kapadia & Fayez (1970), de las cuales obtuvimos información relativa a las características fisicoquímicas de este alcaloide.

Por su parte, el Dr. Carlos Ostolaza N., nos proporcionó el libro de Anderson (1991) sobre el peyote.

Conviene referir que los primeros estudios químicos, farmacológicos y clínicos con el cactus “San Pedro” fueron realizados por dos médicos peruanos, C. Gutiérrez N. y G. Cruz S. (1947 – 1948). Sin embargo, no llegaron a obtener la mescalina purificada, ni sus derivados.

TRABAJO EN EL LABORATORIO

E. SECADO Y MOLIENDA DE LA PLANTA

Los tallos del cactus “San Pedro” se cortaron en rodajas de 2 a 3 cm de ancho sin separar la corteza de la pulpa, y se secaron lentamente en estufas*, en un rango de temperatura de 37° a 45° C, durante periodos variables de tiempo, entre 26 hasta 45 días (ver Tabla N° 5). No se observó la formación de hongos.

* Se utilizaron dos estufas Memmert: Código UM400 (Ambiente C3-195, Lab. Inv. Prod. Naturales) y s/código (Ambiente C3-191, Prácticas de laboratorio), del Laboratorio N° 12

La molienda del cactus seco se realizó en dos etapas, primero a grano grueso, manualmente con ayuda de un mortero de porcelana ($\phi = 20$ cm) y pilón de porcelana, y posteriormente a grano fino, en unos casos de la misma manera manual (muestras SP1 a SP3), y en otros casos con ayuda de un molino de pulverización* (muestras SP4 a SP6).

| Muestra | Procedencia (colector) | Fecha de colección | Peso fresco (g) | Secado | | Peso seco (grano fino) |
|---------|---|-----------------------|--------------------|----------|---------|---------------------------|
| | | | | Temp. °C | Tiempo | |
| SP1 | Sapalache (Piura), P. Bermeo | Abril, 1998 | 1921 | 37 | 33 días | 108,8 g |
| SP2 | Huancabamba (Piura), F. Guerrero | Julio, 1998 | No se pesó | 39 | - | 88 g |
| SP3 | Barranca (Lima), J. Flores - S. Santos | 15.08.98 | 1733 | 40 – 45 | 34 días | 69,4 g |
| SP4 | Mdo. Modelo de | 23.01.99 | 4010 | 40 – 45 | 41 días | 276 g |
| SP5 | Chiclayo (Lambayeque) | | 7669 | 40 – 45 | 41 días | 320 g |
| SP6 | V. Reyna | | 2079 | 40 – 45 | 34 días | 83,8 g |

Tabla N°5.- Secado y molienda del cactus “San Pedro”

F. ANALISIS CUALITATIVO – MARCHA FITOQUIMICA

1. Muestras: Cinco (05) secas y pulverizadas

i. SP1** Tema del curso CQ 561 Proyecto de Tesis I
(Per. Acad. 98 – 1, abril – julio 98)

ii – v SP3 a SP6

2. Cantidad de muestra por análisis: 5g

3. Procedimiento: Reyna (1999) de acuerdo a Rondina & Coussio (1969) (**ver Anexo N° 3**)

* Molino de pulverización Weber Bros. & White Metal Work Inc. (Lab. N° 14 Facultad de Ingeniería Química y Manufacturera – Universidad Nacional de Ingeniería)

** Para la identificación de las muestras ver la Tabla N° 4, pág. 47

4. Resultados (ver Anexo N° 4)

Las cinco muestras analizadas nos dieron idénticos resultados, los cuales se detallan en el Anexo N° 4 y se resumen a continuación:

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

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

- b) **No contiene:** Taninos, flavonoides, quinonas, leucoantocianidinas.

Estos resultados se confirmaron, para las muestras SP3 a SP6, mediante la realización de ensayos específicos para cada grupo funcional (Villacrez, 1995).

G. DETERMINACION CUANTITATIVA DE ALCALOIDES

1. **Muestras:** Tres (03) secas y pulverizadas
- i. SP2 Tema del curso CQ 562 Proyecto de Tesis II
(Per. Acad. 98 – 2, agosto – diciembre 98)
- ii – iii SP3 y SP4

2. **Cantidad de muestra por análisis** 50 g

3. Procedimiento

Observación.- Las etapas (a) y (b) , Extracción sólido – líquido y separación líquido – líquido, respectivamente, son similares a aquellas correspondientes a la Sec. H (Aislamiento de la mescalina ver págs. 58 –

Cincuenta gramos (50 g) de muestra SP4, se colocan en un cartucho de tocuyo y se tratan con 600 mL de n – hexano en un extractor Soxhlet* (balón de 1 L) durante 8 horas / día por 6 días.

- ii. Alcalinización con solución de amoníaco concentrado $\text{NH}_{3(\text{ac})}$ 15N.
La muestra desengrasada y seca (dentro del cartucho) se humedece con 50 mL de solución de amoníaco concentrado $\text{NH}_{3(\text{ac})}$ 15N, durante 2 horas.
- iii. Extracción por solventes (obtención del Extracto Bruto Orgánico):
 - La muestra alcalinizada (dentro del cartucho y colocada en el equipo Soxhlet) se coloca en maceración con 300 mL de una mezcla de metanol – cloroformo (1:1), a temperatura ambiente, durante 3 días.
 - Luego se adiciona a la mezcla anterior 300 mL de acetato de etilo y se extrae en Soxhlet durante 6 horas / día por 10 días.
 - La mezcla orgánica se concentra en el rotavapor** (40° C, 400 – 150 mbar) hasta donde es posible, y luego en baño María, sin llegar a sequedad, obteniéndose así el Extracto Bruto Orgánico (que no se pesó, debido a la continuación del proceso).

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

- i. Disolución del Extracto Bruto Orgánico con disolución ácida
El Extracto Bruto Orgánico se disuelve con 100 mL de solución de ácido sulfúrico $\text{H}_2\text{SO}_{4(\text{ac})}$ 0,5 N.
- ii. Lavado de la disolución ácida con solventes orgánicos
El extracto acuoso ácido se extrae con 100 mL de cloroformo, eliminándose los extractos orgánicos. Este lavado se realiza en total 4 veces.

* En la Sec.III.H (de aislamiento), el desengrase se realiza a temperatura ambiente en un frasco erlenmeyer y con agitación.

** Rotavapor Büchi R - 114 (Suiza)

- iii. Alcalinización del extracto acuoso con disolución de amoniaco
El extracto acuoso ácido se alcaliniza con 10 mL de una disolución de amoniaco $\text{NH}_3(\text{ac})$ 7,5 N. La disolución final tiene pH 9.
- iv. Extracción de los alcaloides con solventes orgánicos (Obtención del Extracto Bruto de Alcaloides)
 - El extracto acuoso alcalino se extrae con 60 mL de cloroformo, en un embudo de separación de 250 mL. Se realiza esta extracción un total de 10 veces (hasta que la solución acuosa dé test de Mayer negativo). Se descarta la fase acuosa libre de alcaloides.
 - Los extractos orgánicos se concentran en el rotavapor (40° C, 400 – 50 mbar) hasta sequedad.

c) Eliminación de las bases volátiles

- El sólido obtenido se disuelve en 50 mL de cloroformo y se lleva a concentrar al rotavapor, para eliminar el solvente. Se repite esta operación un total de 4 veces. Esto tiene por objeto la eliminación total de la base amoniaco $\text{NH}_3(\text{g})$.
- Finalmente, se lleva a sequedad en el rotavapor, obteniéndose 1,93 g de Extracto Bruto de Alcaloides (EBA).
Observación.- En el caso de la muestra SP3 se obtuvo 1,8 g de EBA.

d) Titulación. Determinación potenciométrica

- i. El extracto bruto de alcaloides (1,93 g) se disuelve con 30 mL de cloroformo y se agregan con una pipeta volumétrica 20 mL de solución estandarizada de ácido sulfúrico $\text{H}_2\text{SO}_4(\text{ac})$ 0,2009 N. El solvente orgánico se elimina en el rotavapor quedando una solución acuosa ácida que contiene alcaloides en forma de sales.

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

$$N^{\circ} \text{ meq}_{(\text{NaOH})} = 0,2137 \text{ N} \times 10,073 \text{ mL}$$

$$N^{\circ} \text{ meq}_{(\text{NaOH})} = 2,15 \text{ meq}$$

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

$$N^{\circ} \text{ de meq (H}_2\text{S}\bullet_4) \text{ sobrante} = \mathbf{2,15 \text{ meq}}$$

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

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

$$= 4,018 - 2,15$$

$$= \mathbf{1,86 \text{ meq}}$$

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

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

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

Luego:

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

$$W = 1,86 \times 211$$

$$\mathbf{W = 392,4 \text{ mg de mescalina (en 50 g de cactus seco)}}$$

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

$$\begin{array}{l} 50 \text{ g} \longrightarrow 100\% \\ 0,3924 \text{ g} \longrightarrow \% \text{ de alcaloides (como mescalina)} \end{array}$$

$$\% \text{ de alcaloides (como mescalina)} = \frac{0,3924 \times 100}{50} = \mathbf{0,78\%}$$

- ii. Utilizando un potenciómetro con electrodo de vidrio para determinar el punto de equivalencia, se titula la solución ácida con una solución estandarizada de hidróxido de sodio $\text{NaOH}_{(\text{ac})}$ 0,2137 N. El análisis de la curva de titulación (ver Anexo N° 5) muestra que el punto de equivalencia corresponde a la adición de 10,073 mL de base, $\text{NaOH}_{(\text{ac})}$.
Observación.- En el caso de la muestra SP3 se realizó la titulación usando como indicador Rojo de Metilo. (ver Anexo N° 6).

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

- i. Al agregar un exceso de solución de ácido sulfúrico $\text{H}_2\text{SO}_{4(\text{ac})}$ (20 mL, 0,2009N) al Extracto Bruto de Alcaloides, ocurre la reacción:



y se tiene que:

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

$$\text{donde } \text{N}^\circ \text{ meq ácido total} = \text{N} \times \text{V} = 0,2009 \times 20 = 4,018 \text{ meq} \quad (\gamma)$$

- ii. El ácido sulfúrico $\text{H}_2\text{SO}_{4(\text{ac})}$ sobrante, que queda sin reaccionar con el alcaloide, se titula con 10,073 mL de solución de hidróxido de sodio $\text{NaOH}_{(\text{ac})}$ 0,2137 N, según la ecuación:



Y en el punto de equivalencia se cumple que:

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

- iii. La cantidad de meq de hidróxido de sodio ($\text{N} = 0,2137$ y $\text{V} = 10,073$ mL) se determina por la relación: $\text{N}^\circ \text{ meq} = \text{N} \times \text{V}$ (mL)

Para el caso de la muestra SP3 (Anexo N° 5) se obtuvo 1,4 % de alcaloides, expresados como mescalina. Estos resultados se encuentran comprendidos en el rango de porcentaje de alcaloides reportados en la literatura (Sec. II.A.1.c, págs. 7 – 8).

H. AISLAMIENTO DE LA MESCALINA (SULFATO DE MESCALINA) (Abril – Diciembre 99)

- 1. Muestras:** Dos (02) muestras secas y pulverizadas, SP4 y SP5
- 2. Cantidad de muestra utilizada** 100 g
- 3. Procedimiento** (aplicado a la muestra SP4)
 - a) Extracción sólido-líquido: Obtención del Extracto Bruto Orgánico**
 - i. Desengrase con n – hexano

Observación.- 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 de alcaloide.

 - En un frasco Erlenmeyer de 500 mL se colocan 100 g de muestra seca y pulverizada y se adicionan 300 mL de n – hexano.
 - La mezcla se pone en agitación*, a temperatura ambiente, durante cuatro horas, y luego se deja en reposo hasta el día siguiente (20h).
 - Se separa el líquido sobrenadante, de color amarillo verdoso, con una pipeta. Al sólido restante se adiciona una nueva porción de 300 mL de n – hexano y se agita. Este procedimiento se realiza un total de 10 veces.
 - Finalmente el sólido húmedo se transfiere a un vaso de 600 mL, y se deja secar al aire a la temperatura ambiente.
 - ii. Alcalinización con solución de amoniaco concentrado.

La muestra seca y desengrasada se introduce en un cartucho de tocuyo, se cierra, y se coloca dentro de un frasco cilíndrico de 8 cm de diámetro y 20

* Se utilizó un agitador eléctrico de eje flexible con paleta de vidrio modelo MLW ER10 (ex RDA)

cm de altura. Luego se añade sobre el cartucho, con la ayuda de un gotero, 150 mL de solución de amoníaco concentrado $\text{NH}_3(\text{ac})$ 15N, humedeciendo completamente toda la muestra, y se deja en reposo durante dos horas.

iii. Extracción con solventes (obtención del Extracto Bruto Orgánico)

- 1ª Maceración con Metanol – Cloroformo (1:1)

Sobre la muestra alcalinizada, dentro del frasco, se adicionan 400 mL de una mezcla de metanol – cloroformo (1:1) y se deja macerar durante 72 h. La solución final adquiere un color verde oscuro (casi negro).

Se filtra el extracto a través de un embudo de vidrio de 10 cm de diámetro y papel de filtro “rápido”, lavando este último con aproximadamente 20 mL de la mezcla de solventes usada.

La muestra en el cartucho se deja dentro del frasco y se procede a la siguiente maceración.

- 2ª Maceración con mezcla de solventes

La muestra en el cartucho se deja en el frasco, y se le adiciona 600 mL de una mezcla de solventes constituida por metanol – cloroformo – acetato de etilo (1:1:4) y se deja en reposo, a temperatura ambiente, durante aproximadamente dos semanas*. Se filtra el extracto, y la muestra sólida en el cartucho se vuelve a tratar de la misma manera dos veces más.

- Eliminación del solvente

Se reúnen todos los extractos orgánicos y se concentran en dos etapas. Primero en el rotavapor (40° C, 400 – 150 mbar) y luego se transfiere el concentrado a una cápsula de porcelana de 9 cm de diámetro, se evapora sobre un baño maría (T = 90° C), hasta sequedad, obteniéndose el Extracto Bruto Orgánico, que no se pesó.

* Debido a la falta de equipo, que estaba siendo utilizado en otra tesis, y a otras ocupaciones.

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

iv. Disolución del extracto bruto orgánico con solución ácida

Observación.- Esta etapa tiene como objetivo extraer los alcaloides como sales.

- El extracto bruto orgánico se disuelve en 75 mL de solución de ácido sulfúrico $\text{H}_2\text{SO}_{4(\text{ac})}$ 0,5 N.
- La disolución acuosa ácida se filtra a través de papel de filtro “lento”.
- Al Extracto Bruto Orgánico sólido se le vuelve a agregar 30 mL de solución de ácido sulfúrico $\text{H}_2\text{SO}_{4(\text{ac})}$ 0,5 N; se filtra la solución ácida.
- Finalmente, al Extracto Bruto de Alcaloides se le agregan 15 mL de solución de ácido sulfúrico $\text{H}_2\text{SO}_{4(\text{ac})}$ 0,5 N y se filtra. El sólido remanente da prueba negativa de alcaloides (test de Mayer) y se descarta.
- Los extractos acuosos ácidos, de color anaranjado oscuro, se reúnen (volumen total = 120 mL) y se colocan en un embudo de separación de 500 mL.

v. Lavado de la disolución ácida con solventes orgánicos

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

- La disolución ácida, que contiene los alcaloides como sales, se lava 4 veces con porciones de 100 mL de cloroformo.
- Se separa la fase orgánica (que no contiene alcaloides, test de Mayer negativo), que es de color anaranjado, y se descarta.

vi. Alcalinización del extracto con solución de amoníaco $\text{NH}_{3(\text{ac})}$ 7,5 N

Observación.- Esta etapa tiene como objetivo regenerar a los alcaloides al estado de bases libres.

La disolución acuosa ácida, en el embudo de separación, se alcaliniza con 10 mL de $\text{NH}_{3(\text{ac})}$ 7,5 N hasta pH 9. Se observa el oscurecimiento de la disolución, que inicialmente es de color anaranjado.

vii. Extracción de alcaloides con solventes orgánicos (Obtención del Extracto Bruto de Alcaloides) (ver Foto N° 3)

- A la fase acuosa básica (en el embudo de separación) se agregan 100 mL de cloroformo y se agita. Se espera que se separen las dos fases y se toma la fase orgánica. En esta etapa podría formarse una emulsión, la cual puede persistir durante un día.
- Esta extracción se repite ocho veces, cada vez con 100 mL de cloroformo, hasta que la fase acuosa esté exenta de alcaloides (test de Mayer negativo).
- Los extractos clorofórmicos se colocan en un balón de 200 mL y se concentran en el rotavapor (40° C, 400 mbar) hasta sequedad.
- Sobre el residuo de alcaloides se agregan 100 mL de cloroformo y se vuelve a concentrar a sequedad en el rotavapor, (40° C, 400 – 50 mbar), repitiéndose esta operación un total de cuatro veces. Esto tiene por objeto eliminar las bases volátiles (amoníaco, $\text{NH}_{3(\text{g})}$) que estuvieran disueltas en el extracto.

Finalmente se obtiene 3,26 g de Extracto Bruto de Alcaloides.

c) Purificación. Preparación de sulfato de mescalina (jun.99)

viii. En un tubo de ensayo ($\phi = 2,5$ cm, $h = 12$ cm) se coloca el Extracto Bruto de Alcaloides (3,26 g) y se disuelve, a temperatura ambiente, con 3 mL de etanol.

ix. Se coloca el tubo en un baño de hielo y con la disolución orgánica a 5° C se agrega, gota a gota, 2 mL de solución de ácido sulfúrico $\text{H}_2\text{SO}_{4(\text{ac})}$ al 1%, observándose la inmediata precipitación del sulfato de mescalina, como

finas partículas blancas, y se deja en reposo, a dicha temperatura, durante 30 minutos. (ver Foto N° 4)

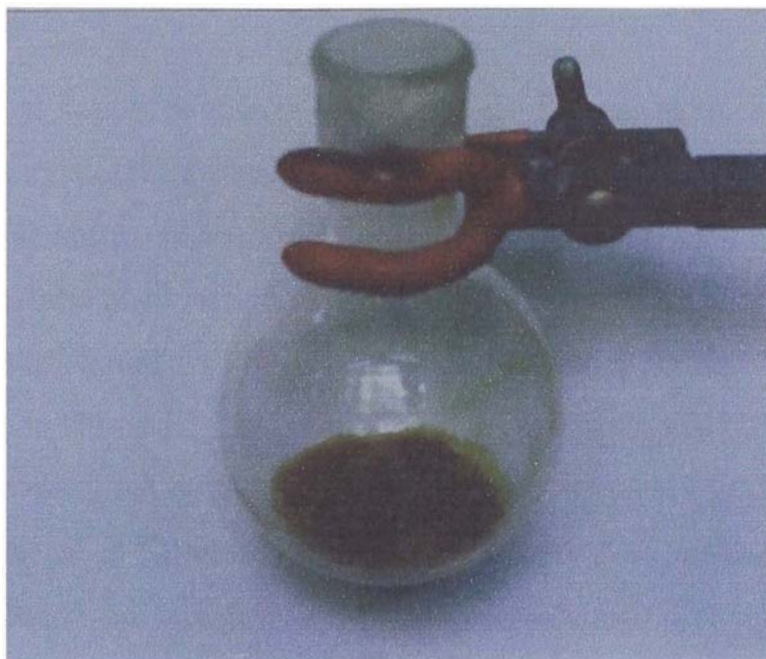


Foto N° 3.- Extracto Bruto de alcaloides (Foto V. Reyna)

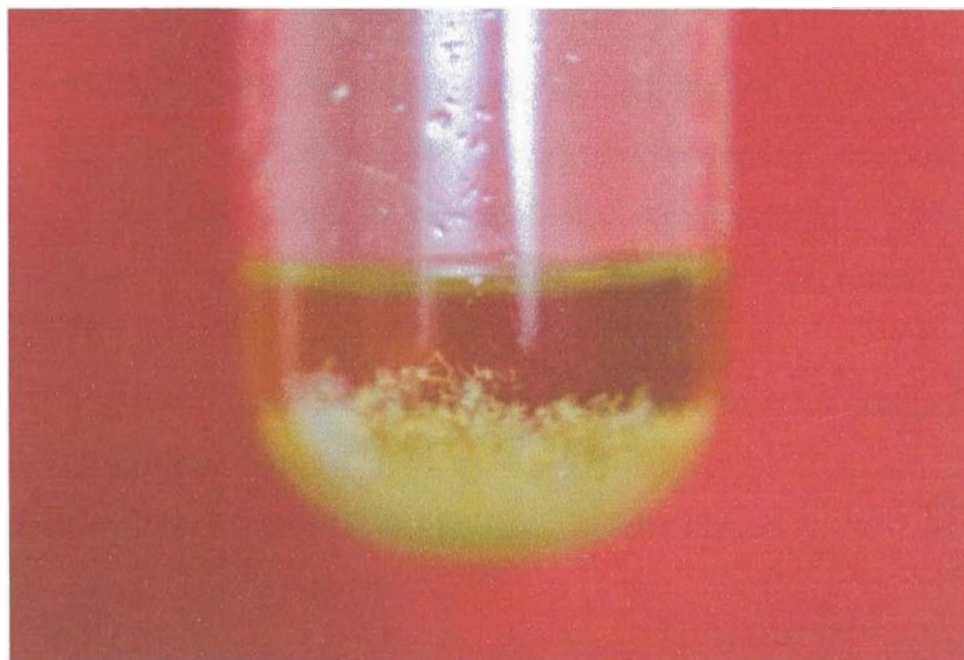


Foto N° 4.- Sulfato de mescalina obtenido a partir de la muestra SP4 (Foto V. Reyna)

- x. El líquido sobrenadante se separa con la ayuda de un gotero, y el sólido aún húmedo que queda en el tubo se recristaliza en etanol:
- Se agrega al sólido 5 mL de etanol y se lleva a ebullición en un Baño María.
 - Cuando el sólido se disuelve se retira el tubo del Baño María y se deja enfriar a temperatura ambiente.
 - Cuando se enfría, se observa la precipitación de cristales blancos. Luego se coloca el tubo en el refrigerador, a 8° C, hasta el día siguiente.
 - Se filtra el líquido sobrenadante, ligeramente amarillo, a través de un embudo de vidrio de 3,5 cm de diámetro y papel de filtro Whatman N° 40, y se lava el sulfato de mescalina con 1 a 2 mL de etanol helado.
 - Se deja secar el sulfato de mescalina a temperatura ambiente durante una hora y luego en la estufa a 38° C, obteniéndose 137 mg de un sólido cristalino blanco.

Observación.- Siguiendo este mismo procedimiento, a excepción de la etapa iii , a partir de 100 g de muestra SP5 se obtiene 256 mg de sulfato de mescalina.

I. IDENTIFICACION CLASICA DEL SULFATO DE MESCALINA

La identificación del sulfato de mescalina se realizó mediante métodos clásicos (punto de fusión, comportamiento cromatográfico – CCF, análisis porcentual) y métodos espectrométricos (espectros de masas, RMN¹H, RMN¹³C, UV, IR).

La muestra analizada fue el sólido cristalino de color blanco obtenido precedentemente. (Sec. III.H, págs. 58 – 63)

1. Características del producto.- Sólido cristalino blanco

2. Determinación del Punto de Fusión

a. Punto de Fusión: 183° C

Referencias: i. 183 – 186° C, Merck Index (1996);
Sulfato de mescalina dihidrato

- ii. 183 – 186° C, Anderson (1991); Sulfato de mescalina
- iii. 184° C, Turner & Heyman (1960);
Sulfato de mescalina
- b. Equipo: Fisher – Johns Melting Point Apparatus
- c. Laboratorio: Lab. N° 14 (Química Orgánica), FIQM - UNI.

3. Comportamiento cromatográfico (Cromatografía en capa fina).

- a. Placa: Silicagel 60 F 254
- b. Eluyente: Cloroformo:Acetona:Amoniaco 15N (10:17:1)
- c. Revelador: Ninhidrina al 2% en Etanol
- d. R_f : 0,82 (Referencia: ninguna)
- e. Observaciones: Mancha de color morado, luego de un tiempo se torna amarilla.
- f. Conclusión: Se observa la presencia de una única sustancia (mescalina).

4. Análisis porcentual de Carbono, Nitrógeno e Hidrógeno

- a. Condiciones de trabajo
 - i. Equipo: Analizador Elemental PE – 2400
 - ii. Laboratorio: Instituto de Química,
Universidade Estadual de Campinas – Unicamp.
Brasil. (Gestión de ex – alumna María Caramantín S.)
 - iii. Operador: Personal del Laboratorio
 - iv. Fecha: 20.06.00
 - v. Muestra: Sulfato de mescalina

b. Resultados

| | Carbono | Hidrógeno | Nitrógeno |
|---------------|---------------|--------------|--------------|
| Corrida N° 25 | 47,69% | 7,06% | 5,03% |
| Corrida N° 26 | <u>47,54%</u> | <u>7,29%</u> | <u>5,19%</u> |
| Promedio | 47,61% | 7,17% | 5,11% |

c. Análisis de resultados.

i. Se asume que se tiene 100 g de muestra

| Elemento | Exp. N° 1 | Exp. N° 2 | Promedi o | Peso | Peso atómico (g/mol) | N° moles (Peso/peso atómico) |
|----------|--------------|--------------|--------------|-------|----------------------------|------------------------------------|
| C | 47,69 % | 47,54 % | 47,61 % | 47,61 | 12,0000 | 3,96 |
| H | 7,06 % | 7,29 % | 7,17 % | 7,17 | 1,0079 | 7,17 |
| N | 5,03 % | 5,19 % | 5,11 % | 5,11 | 14,0067 | 0,365 |

ii. Relación del número de moles de átomos de los tres elementos considerados

$$C: 3,96 / 0,36 = 11; H: 7,17 / 0,36 = 20 \text{ y } N: 0,36 / 0,36 = 1$$

Luego, relación C/H/N : 11/20/1

iii. Relación del número de moles de los elementos citados en el sulfato de mescalina di-hidratado, $C_{22}H_{36}N_2O_{10}S \cdot 2H_2O$ ($C_{22}H_{40}N_2O_{11}S$)

$$\text{Relación de C / H / N : } 22 / 40 / 2 \text{ ó } 11 / 20 / 1$$

d. Conclusión.- El análisis porcentual de la muestra corresponde al sulfato de mescalina di-hidratado ($2H_2O$).

J. IDENTIFICACION ESPECTROMETRICA (Determinación Estructural)

La determinación estructural del sulfato de mescalina obtenido del cactus "San Pedro" (*E. Pachanoi*) se realizó mediante el análisis de sus espectros de masas, de RMN¹H y de RMN¹³C.

La muestra analizada fue el sólido cristalino de color blanco obtenido en la Sec. III.H., la cual se remitió en el mes de enero del 2000 a la M.Sc. María Caramantín Soriano (Universidad de Campinas, Brasil), para la obtención de tales espectros.

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

1. Espectro de Masas. Ver Espectro N° 1 (pág. 73)

a. Condiciones de trabajo

- i. Equipo: Espectrómetro MS 5870B (70 eV)
(Proceso de Ionización: Por impacto de electrones)
- ii. Laboratorio: Laboratorio de Espectrometría de Masas
Universidade Estadual de Campinas – Unicamp. Brasil
- iii. Operador: Personal del Laboratorio
- iv. Fecha: 20.01.00
- v. Peso de muestra: 2 – 3 mg

b. Características del espectro

m/z: 211 (ion molecular M^+ , 37,1%), 182 (pico base, 100%), 167 (48,9%), 151 (12,2%)

c. Análisis del espectro

La identificación de los cuatro fragmentos iónicos correspondientes a los picos m/z 211, 182, 167 y 151, y las ecuaciones de fragmentación respectivas, se han descrito precedentemente (Sec. II.A.4.a, págs. 17 – 19).

El espectro de masas del sulfato de mescalina obtenido a partir del cactus “San Pedro” (*E. pachanoi*) es similar al espectro registrado por Ikan (1991) para la mescalina (Sec. II.A.4.a., pág. 14).

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

2. Espectro de RMN¹H. Ver Espectro N° 2 (pág. 74)

a. Condiciones de trabajo

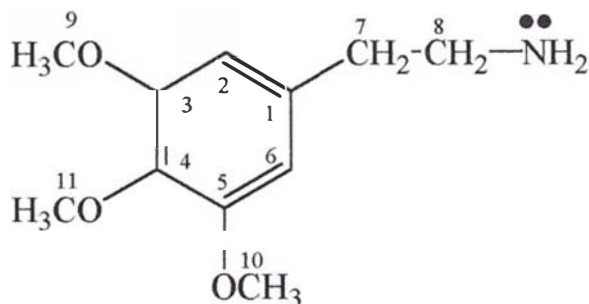
- i. Equipo: Espectrómetro RMN Varian – Inova 500 (500 MHz)

- ii. Laboratorio: Laboratorio de Resonancia
 Universidade Estadual de Campinas – Unicamp. Brasil
- iii. Operador: Personal del Laboratorio
- iv. Fecha: 01.02.00
- iv. Peso de muestra: 15 mg
- v. Solvente: Agua deuterada D₂O

b. Características del espectro

2,78 ppm (t, CH₂); 3,11 ppm (t, CH₂); 3,58 ppm (s, OCH₃); 3,69 ppm (s, dos grupos OCH₃); 4,65 ppm (s, NH); 6,50 ppm (dos H aromáticos).

c. Análisis del espectro (Desplazamientos químicos e integración)



| δ (ppm) | Tipo de señal | Integración | Tipo de hidrógeno | |
|---------------------|---------------|-------------|-------------------------------------|---|
| $\delta = 2,78$ ppm | triplete | 2H | - CH ₂ - Ar | } Sistema A ₂ M ₂ |
| $\delta = 3,11$ ppm | triplete | 2H | - CH ₂ - NH ₂ | |
| $\delta = 3,58$ ppm | singulete | 3H | - OCH ₃ | (posición 4) |
| $\delta = 3,69$ ppm | singulete | 6H | 2 (- OCH ₃) | (posición 3 y 5) |
| $\delta = 4,65$ ppm | singulete | | - NH ₂ | |
| $\delta = 6,50$ ppm | singulete | 2H | H - Ar | (posición 2 y 6) |

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

3. Espectro de RMN¹³C DEPT 90. Ver Espectro N° 3 (pág. 75)

a. Condiciones de trabajo

- i. Equipo: Espectrómetro RMN Varian – Inova 500 (125 MHz)
- ii. Laboratorio: Laboratorio de Resonancia
Universidade Estadual de Campinas – Unicamp. Brasil
- iii. Operador: Personal del Laboratorio
- iv. Fecha: 01.02.00
- v. Peso de muestra: 15 mg
- vi. Solvente: CDCl₃

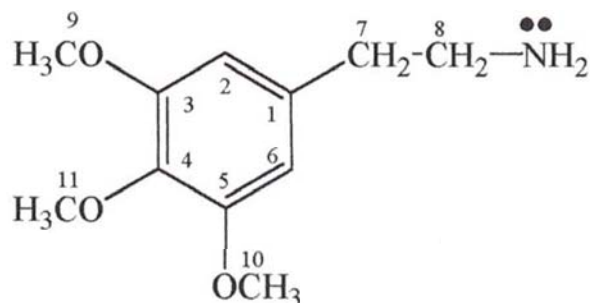
Nota.- Tener presente que el espectro no tienen la señal de la referencia interna TMS.

b. Características del espectro (Espectro N° 3)

- i. Señales hacia arriba (3): Carbonos primarios (CH₃) (9, 10): 56,15 ppm
(11): 61,00 ppm
Carbonos terciarios (CH) (2, 6): 106,39 ppm
- ii. Señales hacia abajo (2): Carbonos secundarios (CH₂) (7): 33,19 ppm
(8): 40,64 ppm

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

c. Análisis del espectro



- i. Señales hacia arriba.- Dos de estas señales (a 56,16 y 106,39 ppm) tienen el doble de intensidad que las otras tres, por lo que en esta clase de espectros se puede asumir que estas dos señales corresponden a dos átomos de carbono cada una (aunque no siempre es el caso).
Luego, teniendo en cuenta los valores de δ (ppm) concluimos que la molécula tiene 3 carbonos primarios (que corresponden a los tres grupos OCH_3) y 2 carbonos terciarios (que corresponden a los CH aromáticos), lo cual guarda relación directa con la molécula de mescalina.
- ii. Señales hacia abajo.- Corresponden a los dos átomos de carbono secundarios (CH_2) de la cadena lateral de la molécula de mescalina.
- d. Conclusión.- El espectro de RMN^{13}C DEPT 90 presentado corresponde a lo esperado para la estructura de la mescalina.

4. Espectro de RMN^{13}C de protones desacoplado. Ver Espectro N° 4 (pág. 76)

- a. Condiciones de trabajo
 - i. Equipo: Espectrómetro RMN Varian – Inova 500 (125 MHz)
 - ii. Laboratorio: Laboratorio de Resonancia
Universidade Estadual de Campinas – Unicamp. Brasil
 - iii. Operador: Personal del Laboratorio
 - iv. Fecha: 01.02.00
 - vii. Peso de muestra: 15 mg
 - viii. Solvente: D_2O

Nota.- Tener presente que el espectro no tienen la señal de la referencia interna TMS.

b. Características del espectro (Espectro N° 4)

33,19 ppm (CH₂); 40,64 ppm (N-CH₂); 56,16 ppm (2 grupos OCH₃); 61,00 ppm (OCH₃); 106,39 (2 grupos CH aromáticos); 133,69 ppm (C-aromático); 135,75 ppm (C-aromático); 152,76 ppm (2 C-aromáticos).

c. Análisis del espectro

En el espectro N° 4 observamos 8 señales de átomos de carbono diferentes, de las cuales 5 señales corresponden a siete átomos de carbono primarios, secundarios y terciarios de la molécula de mescalina (Espectro RMN¹³C DEPT 90).

Luego, las 3 señales restantes, registradas a 133,69; 135,75 y 152,76, respectivamente, corresponden a los cuatro átomos de carbono cuaternarios de la molécula de mescalina.

Asimismo, en este espectro tenemos que la señal a 152,76 ppm tiene una intensidad mucho mayor que las otras dos señales, por lo que podemos asumir que corresponde a dos átomos de carbono cuaternarios.

Los átomos de carbono de la molécula de mescalina tendrían los siguientes valores de δ (ppm) (ver Espectro N° 4):

| N° de átomos de carbono | Tipo de carbono | δ (ppm) | N° de átomos de carbono | Tipo de carbono | δ (ppm) |
|-------------------------|-----------------|----------------|-------------------------|-------------------------------------|----------------|
| 1 | C (cuaternario) | 133,69 | 7 | CH ₂ (cadena) | 33,19 |
| 2 | CH (aromático) | 106,39 | 8 | CH ₂ -N (cadena) | 40,64 |
| 3 | C (cuaternario) | 152,76 | 9 | CH ₃ (OCH ₃) | 56,16 |
| 4 | C (cuaternario) | 135,75 | 10 | CH ₃ (OCH ₃) | 61,00 |
| 5 | C (cuaternario) | 152,76 | 11 | CH ₃ (OCH ₃) | 56,16 |
| 6 | CH (aromático) | 106,39 | | | |

- d. Conclusión.- El espectro de RMN^{13}C de protones desacoplado presentado corresponde a lo esperado para la estructura de la mescalina.

5. Espectro de IR. Ver Espectro N° 5 (pág 77)

- a. Condiciones de trabajo
- i. Equipo: Espectrofotómetro infrarrojo Shimadzu FTIR 800 – DRS800 (reflectancia difusa)
 - ii. Laboratorio: Laboratorio de Películas Delgadas (Ambiente R2–111)
Facultad de Ciencias – UNI
 - iii. Operador: Bach. José Flores Garcés
 - iv. Fecha: 11.11.99
 - v. Peso de la muestra: 15 mg de sulfato de mescalina. Se preparó una pastilla ($\phi = 4 \text{ mm}$) que contiene 30% de la muestra en bromuro de potasio KBr(s) .
- b. Características del espectro
- $\nu^{-1} (\text{cm}^{-1})$: 3021 cm^{-1} ; 2998 cm^{-1} ; 2884 cm^{-1} ; 1603, 1592 cm^{-1} ; 1559, 1472 cm^{-1} ; 1522 cm^{-1} ; 1255 cm^{-1} ; 1001 cm^{-1} .
- c. Análisis del espectro (ver Espectro N° 5).

| Banda | $\nu^{-1} (\text{cm}^{-1})$ | |
|-------|-----------------------------|--|
| A | 3021 | Alargamiento C – H aromático |
| B | 2988 | Alargamiento C – H metílico |
| C | 2884 | Alargamiento simétrico N – H (NH_3^+) |
| D | 1603, 1592 | Flexión N – H (NH_3^+) asimétrica |
| E | 1559, 1472 | Alargamiento anular C – C |
| F | 1522 | Flexión N – H (NH_3^+) simétrica |
| G | 1255 | Alargamiento C – O – C asimétrico |
| H | 1001 | Alargamiento C – O – C simétrico |

- d. Conclusión.- Las bandas principales corresponden a los grupos funcionales presentes en la mescalina.

6. Espectro de UV. Ver Espectro N° 6 (pág 78)

a. Condiciones de trabajo

- i. Equipo: Espectrofotómetro UV Perkin Elmer – Lambda 10
- ii. Laboratorio: Laboratorio N° 33 (Instrumentación Química)
Facultad de Ciencias – UNI
- iii. Operador: Bach. José Flores Garcés
- iv. Fecha: 09.11.00
- v. Concentración de la muestra: 1mg/mL
- vi. Solvente: Etanol al 80% en agua

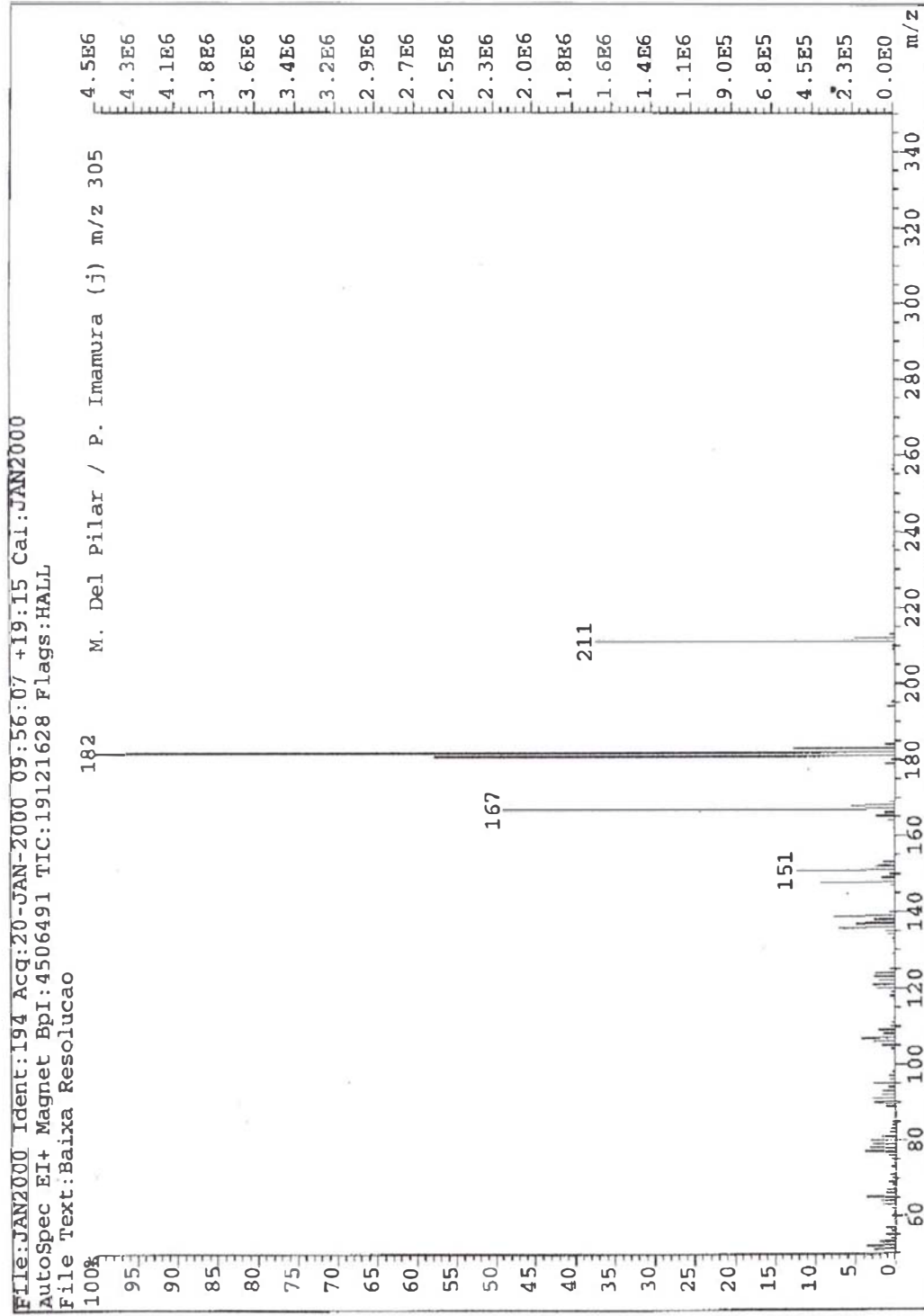
b. Características del espectro

Máximo de absorción, λ max: 268 nm

c. Análisis del Espectro

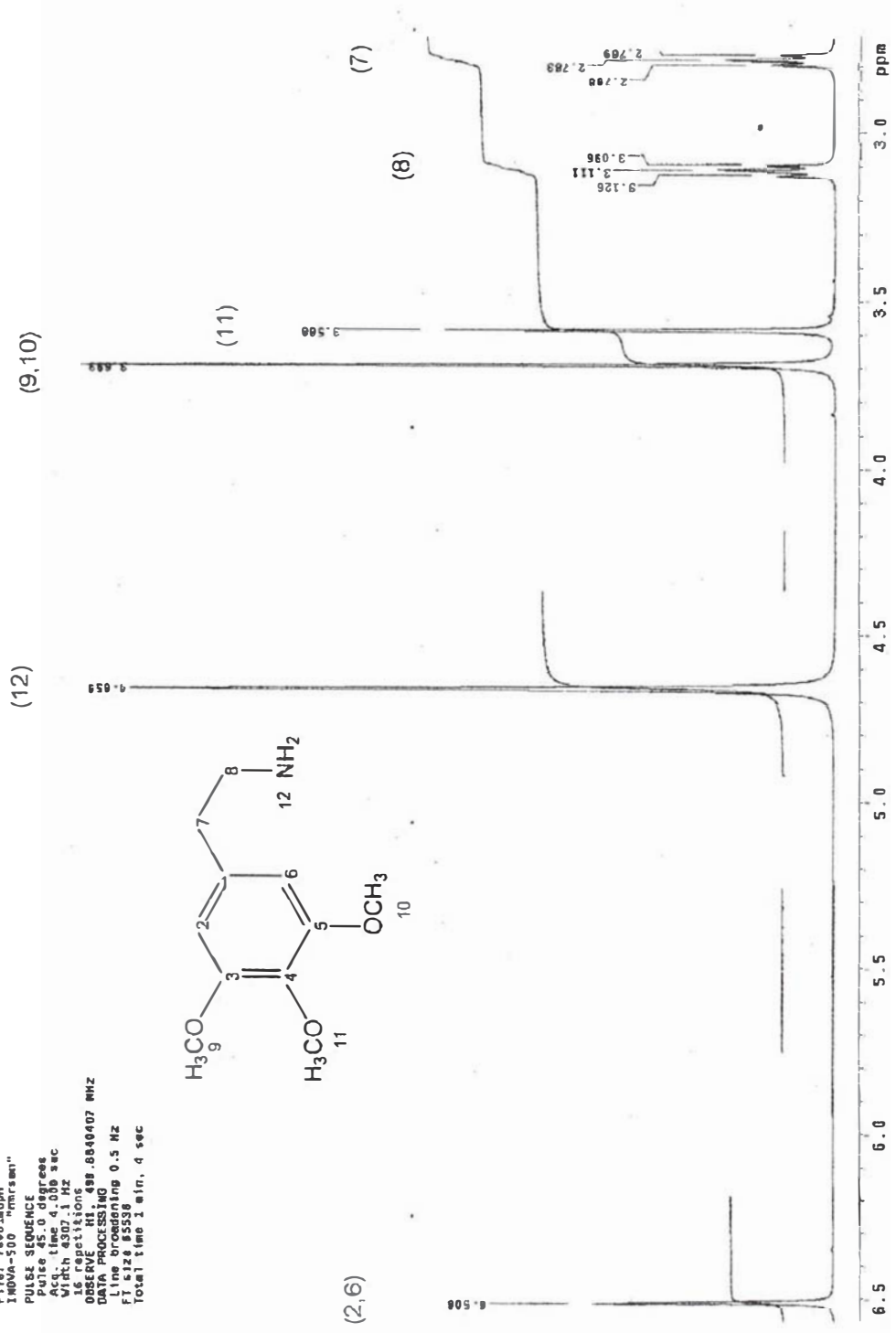
Estos valores son análogos a aquellos obtenidos por Salomón & Bina (1946) e Ikan (1991) para el sulfato de mescalina en el mismo solvente (ver Sec. II.A.4.b, págs. 19 – 20).

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

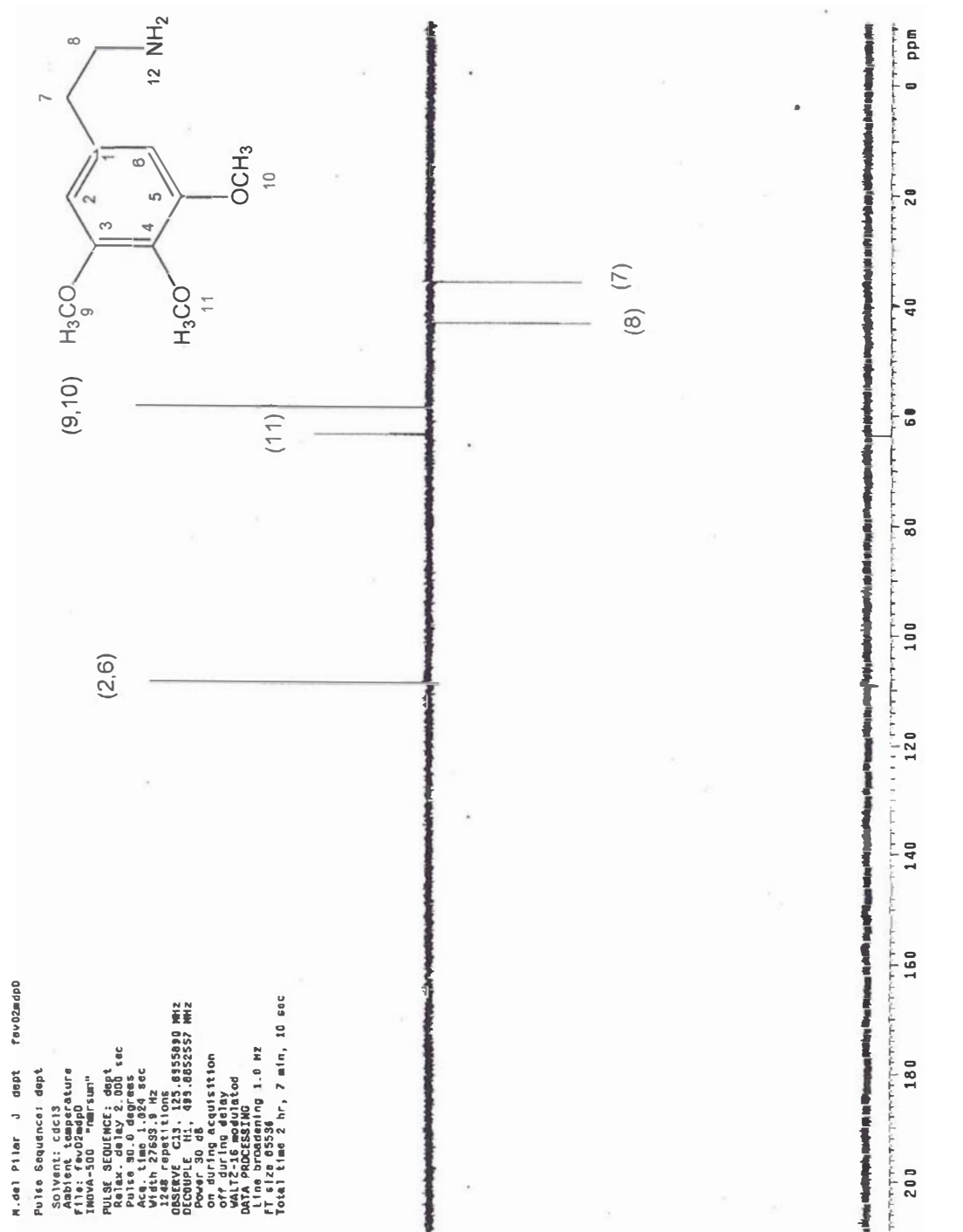


Espectro N° 1.- Espectro de masas del Sulfato de Mescalina obtenido a partir del cactus "San Pedro" (*E. pachanoi*)

M-del Pilar J 1h/d2o fevdjmadon
 Pulse Sequence: e2p01
 Solvent: D2O
 Acquisition Temperature
 File: fevdjmadon
 INOVA-500 "nmrsm1"
 PULSE SEQUENCE
 Pulse 45.0 degrees
 Acq. time 4.000 sec
 Width 4307.1 Hz
 Observations
 Date_ Time
 DATA PROCESSING
 Line broadening 0.5 Hz
 FT size 85538
 Total time 1 min, 4 sec



Espectro N° 2.- Espectro de RMN¹H del Sulfato de Mescalina obtenido a partir del cactus "San Pedro"
 (*E. pachanoi*)



Espectro N° 3.- Espectro de RMN¹³C DEPT 90 del Sulfato de Mesalina obtenido a partir del cactus "San Pedro" (*E. pachanoi*)

M. del Pilar J 13c/d2o fev01mdpC

Pulse Sequence: s2pul

Solvent: D2O

Ambient temperature

User: 1-14-87

File: fev01mdpC

INDVA-500 "mrseun"

PULSE SEQUENCE

Relax. delay 1.500 sec

Pulse 45.0 degree

Acq. time 1.024 sec

Width 32051.3 Hz

609 repetitions

OBSERVE C13, 125.6959121 MHz

DECOUPLE H1, 499.8865404 MHz

Power 30 dB

continuously on

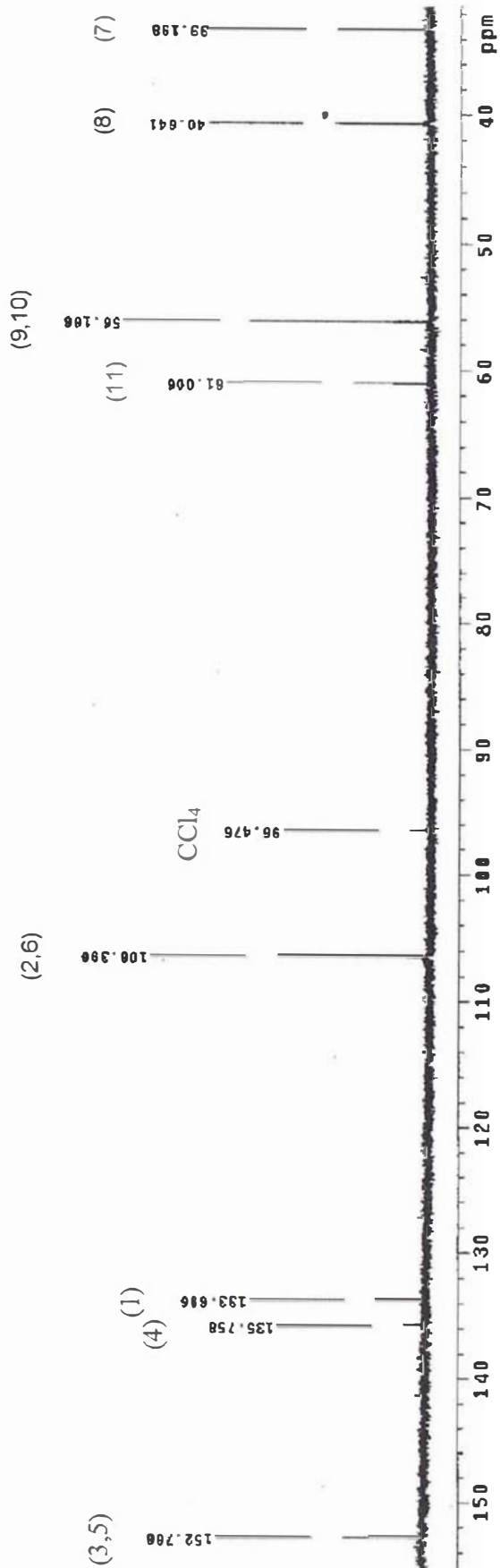
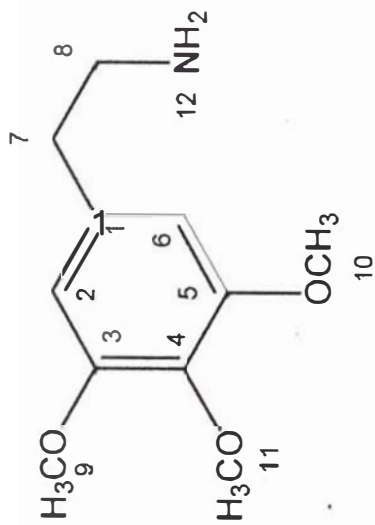
WALTZ-16 modulated

DATA PROCESSING

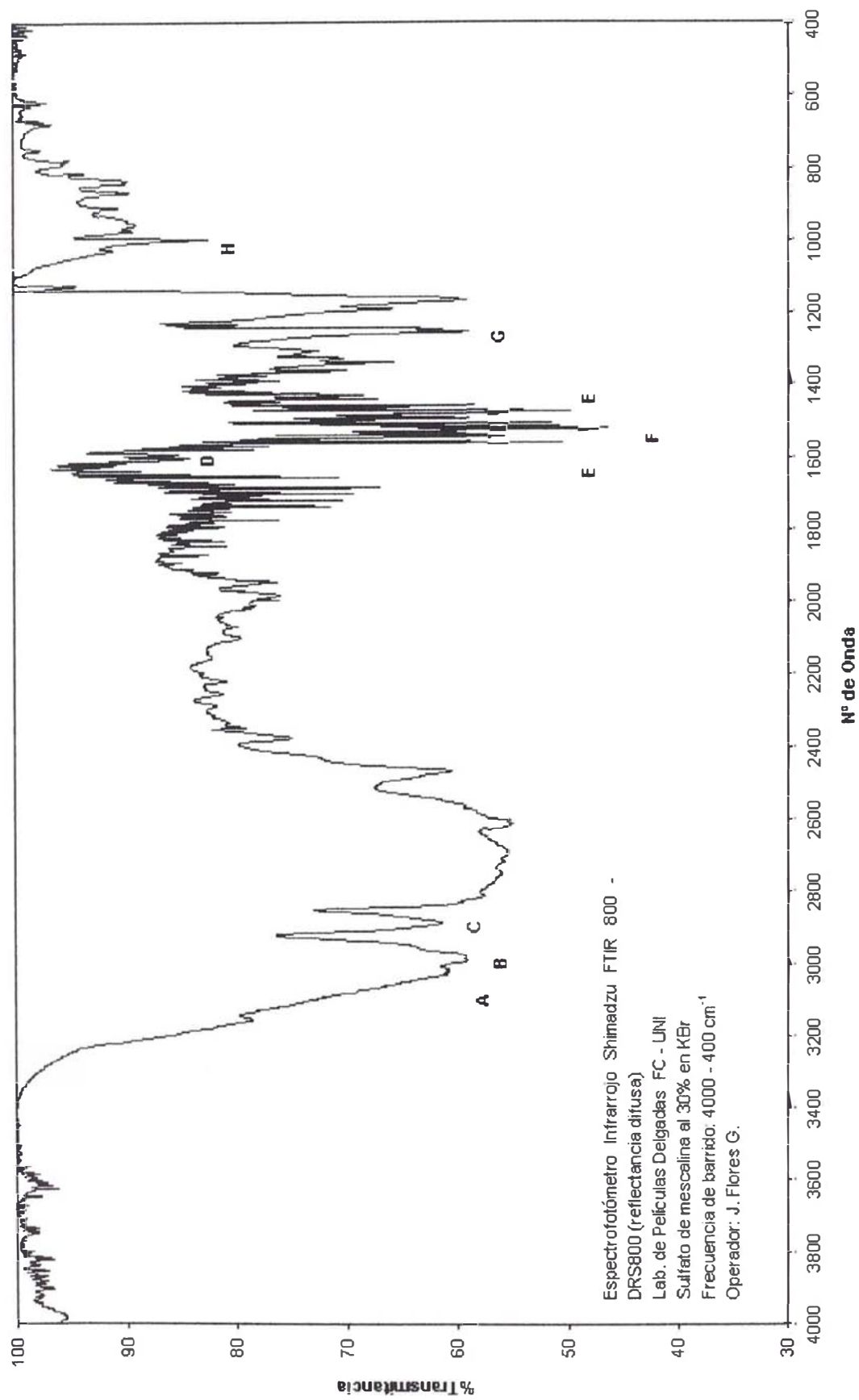
Line broadening 1.0 Hz

FT size 191072

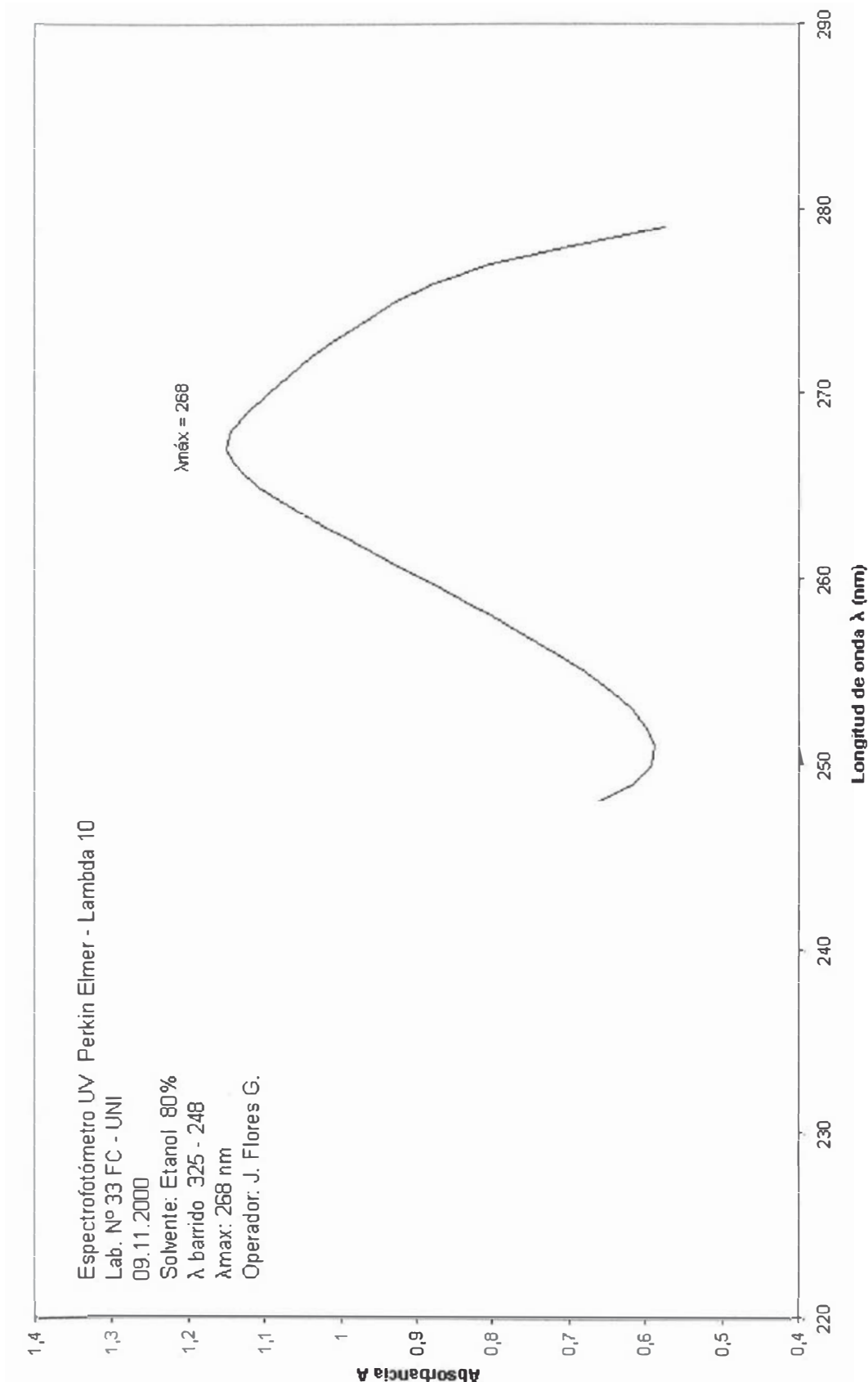
Total time 3 hr, 31 min, 6 sec



Espectro N° 4.- Espectro de RMN¹³C de protones desacoplado del Sulfato de Mescalina obtenido a partir del cactus "San Pedro" (*E. pachanoi*)



Espectro N° 5.- Espectro Infrarrojo FTIR del Sulfato de Mescalina obtenido a partir del cactus "San Pedro" (*E. pachanoi*)



Espectro N° 6.- Espectro UV del sulfato de mescalina en etanol al 80% en agua, obtenido a partir del cactus "San Pedro" (*E. pachanoi*)

IV. RESUMEN DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES

RESUMEN DE RESULTADOS

1. **Obtención del sulfato de mescalina a partir del cactus “San Pedro” (*E. pachanoi*)**
 - a. A partir de dos muestras de 100 g de cactus seco y molido (malla = 315 μm) se obtuvo 3,26 y 12,28 g de Extracto Bruto de Alcaloides. Su purificación mediante la formación de sulfato de mescalina proporcionó 137 y 256 mg respectivamente de un sólido cristalino de color blanco.
La caracterización de dicha sustancia se realizó mediante su punto de fusión, (p.f. 183° C), el análisis porcentual de elementos (C 47,61%; H 7,17%; N 5,11%), y sus espectros de masas, RMN¹H, RMN¹³C, IR y UV; correspondiendo todos ellos a los valores y características referidas en la bibliografía. Asimismo, dicho compuesto presenta por cromatografía de capa fina, una sola mancha ($R_f = 0,82$) de color morado con el revelador ninhidrina.
 - b. El análisis del espectro de masas corresponde a lo esperado para la mescalina (o el sulfato de mescalina), y es análogo al espectro de la mescalina publicado en la literatura.
 - c. Los espectros de RMN (de ¹H y de ¹³C) son consistentes con aquellos de la mescalina.
 - d. El espectro de UV del sulfato de mescalina es análogo a los espectros publicados en la bibliografía.
 - e. El espectro IR presenta las bandas de absorción características de los grupos funcionales presentes en el sulfato de mescalina.

2. El análisis cualitativo de los metabolitos secundarios (Marcha Fitoquímica) presentes en el cactus, siguiendo el procedimiento de Reyna (1999) (de acuerdo al procedimiento de Rondina y Coussio – 1969) y verificado con ensayos específicos para cada clase de compuesto (Villacrez, 1995), nos indica que contiene:
Aminogrupos primarios y/o secundarios (+++), grupos fenólicos (+), triterpenos (+++), esteroides(+++), alcaloides(+++), catequinas(+), saponinas(++) y mucílagos(++)*.
3. La determinación cuantitativa del total de alcaloides contenido en dos muestras de procedencia diferente, siguiendo el procedimiento clásico de titulación ácido – base , proporcionaron un 0,78% y 1,4% para muestras de cactus adquiridos en Chiclayo (enero, 1999) y Barranca (agosto, 1998) respectivamente. Estos valores están comprendidos en el rango de porcentaje de alcaloides para el San Pedro publicado en la bibliografía.
4. Se realizaron dos viajes de colecta del cactus, a la ciudad de Barranca, a 3 horas al norte de Lima, sobre el nivel del mar, en agosto de 1998, y a la provincia de Huancabamba (Departamento de Piura) a 2000 m.s.n.m. en julio de 1999.
5. Se realizó el análisis de la información bibliográfica relativa a los estudios químicos del cactus “San Pedro” (*E. pachanoi*) y de la mescalina.

CONCLUSIONES

1. A partir del cactus “San Pedro” (*E. pachanoi*) se ha obtenido el sulfato de mescalina, el cual se ha identificado mediante su punto de fusión, microanálisis, espectros de masas, RMN¹H, RMN¹³C, IR y UV, y la comparación de éstos con lo publicado en la bibliografía.
2. Se realizó el análisis cualitativo de los metabolitos secundarios (Marcha Fitoquímica) presentes en dicho cactus según el procedimiento de Rondina y Coussio (1969), habiéndose verificado la presencia de:
Aminogrupos primarios y/o secundarios (+++), grupos (+), triterpenos (+++), esteroides(+++), alcaloides(+++), catequinas(+), saponinas(++) y mucílagos(++).
Convención.- Abundante (+++), regular (++) , poco (+)
3. Se realizó la determinación cuantitativa del total de alcaloides contenido en dos muestras de dicho cactus, según el procedimiento de Pelt et al. (1967) habiéndose obtenido 0,78% (muestra adquirida en Chiclayo, enero 1999) y 1,4% (muestra colectada en Barranca, agosto, 1998), respectivamente.

* Convención.- Abundante (+++), regular (++) , poco (+)

V. BIBLIOGRAFIA

1. Agurell, S., *Lloydia*, 32, 40 - 45 (1969a).
"Identification of Alkaloid Intermediates by Gas Chromatography - Mass Spectrometry. I. Potential Mescaline Precursors in *Trichocereus* Species."
2. Agurell, S., *Lloydia*, 32, 206 - 216 (1969b).
"Cactaceae Alkaloids. I."
3. Agurell, S. and J. Lundstrom, *Chem. Commun.*, 1638 - 1639 (1968).
"Apparent Intermediates in the Biosynthesis of Mescaline and Related Tetrahydroisoquinolines".
4. Anderson, E., "Peyote. The Divine Cactus", The University of Arizona Press, 1991 (c. 1980), 243 págs.
5. Benington, F. and R. Morin, *J. Am. Chem. Soc.*, 73, 1353 (1951).
"An Improved Synthesis of Mescaline"
6. Cabieses, F., *Apuntes de Medicina Tradicional*, CONCYTEC, Lima, 1993, Pág. 396 - 401.
7. Cochin, J. and J. Daly, *Experientia*, 18, 294 - 295 (1962).
"Rapid Identification of Analgesic Drugs in Urine with Thin - Layer Chromatography."
8. Cruz, G., *Rev. Farm. y Med. Exp.*, 1, 143 - 165 (1948).
"Estudio Farmacológico de la *Opuntia cylindrica*."
9. Downing, D., *Quart. Rev.*, 16, 133 - 162 (1962).
"The Chemistry of the Psychotomimetic Substances."
10. Gonzalez, I., *Rev. Viernes Médico (Perú)*, 1, 133 - 137 (1960).
"Identificación de la mescalina contenida en el *Trichocereus pachanoi* (San Pedro)."

11. Hashimoto, Y., et al., "Cactus Alkaloids" In: The Alkaloids. Vol 32, A. Brossi (Ed.), Ac. Press, 1988, Págs. 36 - 40.
12. Helmlin, H. and R. Brenneisen, *J. Chromatogr.*, 593, 87 - 94 (1992).
"Determination of Psychotropic Phenylalkylamine Derivatives in Biological Matrices by High - Performance Liquid Chromatography With Photodiode - Array Detection."
13. Ikan, R., Natural Products. A Laboratory Guide, Academic Press, Inc., 2th Ed., 1991, Págs. 243 - 246 (Synthesis of mescaline).
14. Kapadia, G. and M. Fayez, *J. Pharm. Sci.*, 59, 1699 - 1727 (1970).
"Peyote Constituents: Chemistry, Biogenesis and Biological Effects."
15. Lock de Ugaz, Olga. "Investigación Fitoquímica", Fondo editorial, Pontificia Universidad Católica del Perú, Lima, 1994, Págs. 4 - 7.
16. McLaughlin, J. and A. Paul, *Lloydia*, 29, 315 - 327 (1966).
"The Cactus Alkaloids. I. Identification of N-Methylated Tyramine Derivatives in *Lopophora williamsii*."
17. McLaughlin, J. and L. West, *Lloydia*, 36, 346 - 348 (1973).
"Cactus Alkaloids. XVIII. Phenolic b-Phenethylamines from *Mammillaria elongata*."
18. McLaughlin, J. and D. Crosby, *Lloydia*, 36, 416 - 418 (1973).
"Cactus Alkaloids. XIX. Crystallization of Mescaline-HCL and 3-methoxytyramine HCL from *Trichocereus pachanoi*."
19. McLaughlin, J. and R. Ranieri, *J. of Chromatography*, 111, 234 - 237 (1975).
"Cactus Alkaloids XXVII. Use of Fluorescamine as a Thin - Layer Chromatographic visualization reagent for alkaloids."

20. McLaughlin, J., J. Parandani, R. Kondrat and R. Cooks, *Lloydia*, 40, 585 - 590 (1977).
"Cactus Alkaloids. XXXVI. Mescaline and Related Compounds from *Trichocereus peruvianus*."
21. McLaughlin, J., W. Ma, X. Jiang, R. Cooks, A. Gibson, F. Zeylemakev and C. Ostolaza, *J. Nat. Prod.*, 49, 735 - 737 (1986).
"Cactus Alkaloids, LXI. Identification of Mescaline and Related Compounds in Eight Additional Species Using TLC and MS/MS."
22. Miranda, M. "Métodos de Análisis de Drogas y Extractos", Ed. Universidad de La Habana, La Habana, 1996.
23. NIST Chemistry WebBook, <http://webbook.nist.gov/chemistry>, 1 Pág.
24. Patel, A. And Fortsch. *Arzneim.-Forsch.*, 11, 11 - 47 (1968).
"Mescaline and related compounds."
25. Pelt, J.-M. et al., *Bull. Soc. Pharm. Nancy*, 72, 12 - 23 (1967).
"Comparaison de diverses méthodes officielles utilisées pour le dosage des Alcaloïdes des Solanacées."
26. Poisson, M., *Ann. Pharm. Fr.*, 18, 764 - 765 (1960).
"Presence de Mescaline dans une Cactacée Péruvienne."
27. Reti, L. and J. Castrillon, *J. Am. Chem. Soc.*, 73, 1767 - 1769 (1951).
"Cactus Alkaloids I. *Trichocereus terscheckii* (Parmentier) Britton & Rose."
28. Reyna, V., Apuntes del curso Alcaloides Indólicos CQ044, Escuela Profesional de Química - UNI, Lima, set - dic, 1992.
29. Reyna, V. y V. Torpoco, *Bol. Soc. Quím. (Perú)*, 60, 21 - 24 (1994).
"Aislamiento del Alcaloide N,N-Dimetiltriptamina de la Chacrana (*Psychotria viridis* R. & P.)."

30. Reyna, V., Plantas con Constituyentes Psicoactivos Utilizados en Medicina Tradicional Peruana. El San Pedro (*Echinopsis pachanoi*), separata, Curso de Actualización en Medicina Tradicional, Instituto Nacional de Medicina Tradicional, Lima, Diciembre de 1997, 2 Págs.
31. Reyna P., Víctor, Apuntes del curso de Química Orgánica IV - CQ442, (Espectrometría de masas, de RMN, UV, IR en separatas), Escuela Profesional de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Ingeniería, Lima, 1999.
32. Reyna, V., Marcha Fitoquímica, Práctica de Laboratorio (Separata), curso Química de Productos Naturales - CQ046, Escuela Profesional de Química - Universidad Nacional de Ingeniería, 1999, 5 Págs.
33. Salomon, K. and A. Bina, *J. Am. Chem. Soc.*, 63, 2403 (1946).
"Ultraviolet Absorption Spectra of Mescaline Sulfate and β -Phenylethylamine Sulfate."
34. Schultes, R.E., A. Hofmann, Plantas de los Dioses. Orígenes del Uso de los Alucinógenos, Fondo de Cultura Económica, México, 1993, (c. 1979), Págs. 154 - 157 (*Trichocereus*. San Pedro).
35. The Merck Index, 11^o Ed., 1996, Pág. 1007 - 1008 (Mescaline).
36. Tsao, M., *J. Am. Chem. Soc.*, 73, 5495 (1951).
"A new Synthesis of Mescaline"
37. Trout, (*et al.*), Cactus Chemistry, 7 - 99. Appendix A, Sect. C, 56 Págs. "Distribution of the Alkaloids & Triterpenoids Related to the Family Cactaceae by species."
38. Turner, J. and J. Heyman, *J. Org. Chem.*, 25, 2250 - 2251 (1960).
"The Presence of Mescaline in *Opuntia cylindrica*."
39. United States Pharmacopoeia - USP, 20th Ed., 1980, Pág. 913 "Alkaloidal Drug Assays; Proximate Assays"
40. Villacrez, O., Víctor, "Bioactividad de Plantas Amazónicas", Ed. Abya - yala, Ecuador, 1995, Págs. 154 - 171.