



UNIVERSIDAD DEL VALLE DE MÉXICO.

CAMPUS CHAPULTEPEC.

Escuela De Químico Farmacéutico Biólogo.
Con Estudios Incorporados a la UNAM

DETERMINACIÓN DE HIOSCIAMINA EN LA
PLANTA DEL TOLOACHE (*Datura stramonium*)
DE VARIEDADES DE ORIGEN MEXICANO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
P R E S E N T A
JESÚS ENRÍQUE RODRÍGUEZ GARCÍA.

Dir. de Tesis: **Q.F.B. MARTHA LUNA ONTIVEROS**

Mexico D.F.

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos.

Antes de emitir cualquier agradecimiento quisiera decir que el trabajo que aquí se expone no fue un trabajo que encontrara sus bases hace algunos meses, sino que a mi parecer es un trabajo que se gestó desde el inicio mismo de mi formación profesional y que se nutrió de una formación moral y social previa, logrando que al final este trabajo simplemente se convirtiera en un reflejo de todo lo que me han dado las personas cercanas a mi.

Es por tanto que los agradecimientos que continuación se ofrecen son para las personas que moral o profesionalmente he han llevado hasta este punto y más aun, me acompañaran de una u otra forma durante el desarrollo que aun me falta.

A mi Madre, Maria Eugenia.

Por el esfuerzo y perseverancia que a mostrado hacia mí y hacia todos los miembros de mi familia, pues de ella nunca dejé de recibir apoyo.

De ella he aprendido la disciplina y madurez para ser un hombre de bien.

A mi Padre, Jorge Enrique.

Le agradezco el respaldo que siempre nos ha proporcionado y sobre todo le agradezco ser la mayor fuente de inspiración y creatividad pues de él he aprendido como funciona el mundo.

A mi Hermana, Verónica.

Ella me ha mostrado que la tenacidad es una virtud que se gana solo con el esfuerzo propio y por tanto le quiero decir que siempre ha sido un motivo de orgullo y una razón para que yo mismo busque ser mejor.

A mi Novia y Amiga, Ximena.

Quien día a día me ha guiado por un mejor camino, me ha ayudado y apoyado en cada momento difícil que he tenido desde que la conozco y con quien quiero pasar mi vida. Ella también es un gran motivo de orgullo.

Finalmente quiero agradecer a toda mi familia, mis abuelitas, tías, tíos, primas, primos... todos aquellos que de una u otra forma me han apoyado y respaldado, a todos ellos les quiero decir.

Gracias.

Durante mi desarrollo profesional he conocido a gente que de una u otra forma ha influido en mi y que ha estado dispuesta siempre a compartir sus conocimientos. Sé los agradezco profundamente pues la disposición de transmitir su experiencia siempre ha hecho querer saber más.

A la Maestra Martha L. Ontiveros.

Le agradezco el respaldo que siempre ha mostrado y sobre todo el apoyo para la realización de esta tesis.

Al Profesor Isidro Hinojosa.

Sin su asesoría y apoyo, esta tesis no hubiera sido posible.

Al Profesor Agustín Palma.

Por el apoyo para la realización de esta tesis.

A la Maestra Patricia Melchor.

Por el apoyo para la realización de esta tesis.

Al Profesor Javier Carballo.

Por el apoyo para la realización de esta tesis.

También quisiera dar un especial agradecimiento al equipo de laboratoristas de la Universidad del Valle de México por brindarme la ayuda y el apoyo para el desarrollo de la parte practica de esta tesis.

ÍNDICE GENERAL

| | |
|-----------------------------------------------|----|
| Portada | 1 |
| Agradecimientos. | 2 |
| ÍNDICE AUXILIARES. | |
| a.ÍNDICE DE TABLAS. | 4 |
| b.ÍNDICE DE FIGURAS. | |
| 1. JUSTIFICACIÓN. | 6 |
| 2. RESUMEN. | 7 |
| 3. INTRODUCCIÓN. | |
| 3.1 Los Alcaloides. | |
| 3.1.1 Historia. | 8 |
| 3.1.2 Biogénesis y Estructura. | 8 |
| 3.1.3 Propiedades. | 11 |
| 3.1.4 Fuentes. | 12 |
| 3.1.6 Reacciones Generales de los Alcaloides. | 13 |
| 3.1.7 Determinación Cuantitativa. | 14 |
| 3.2 El Toloache. | |
| 3.2.1 Etimología | 15 |
| 3.2.2 Sinónimos. | 15 |
| 3.2.3 Filogenia. | 15 |
| 3.2.4 Localización y Distribución. | 16 |
| 3.2.5 Recolecta. | 17 |
| 3.2.6 Comercialización. | 17 |
| 3.2.7 Características Morfológicas. | 17 |
| 3.2.8 Principales Componentes. | 20 |
| 3.2.9 Producción. | 21 |
| 3.2.10 Adulterantes. | 22 |
| 3.2.11 Toxicología | 23 |
| 3.2.12 Usos del Toloache. | 24 |
| 3.2.13 Cultivo y Requerimientos. | 25 |
| 3.3 Alcaloides en el Toloache. | |
| 3.3.1 Tropina y Alcaloides Similares. | 26 |
| 3.3.2. Farmacología y Usos. | 30 |
| 3.3.3 Biosíntesis. | 31 |
| 3.4 Métodos de Análisis. | 34 |
| 3.4.1 Métodos de CLAE. | 34 |
| 3.4.2 Métodos de CG. | 46 |
| 4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA. | 49 |
| 5. HIPÓTESIS | 49 |
| 6. METODOLOGÍA. | |
| 6.1 Obtención de la Muestra. | 49 |
| 6.2 Preparación de la Muestra. | 49 |
| 6.3 Extracción y purificación. | 50 |
| 6.4 Método de análisis. | 50 |
| 6.5 Observaciones del proceso. | 51 |
| 7. RESULTADOS. | 51 |
| 8. ANÁLISIS DE RESULTADOS. | 68 |
| 9. CONCLUSIÓN. | 70 |
| 10. DISCUSIÓN | 71 |
| 11. BIBLIOGRAFÍAS. | 73 |

ÍNDICE DE TABLAS.

| No. de Tabla | Descripción | Pag. | Ref. |
|--------------|--------------------------------------------|------|------|
| Tabla 1 | Nomenclatura del nombre de los alcaloides. | 7 | 1 |
| Tabla 2 | Sustituyentes de calisteginas Grupo A | 16 | 8 |
| Tabla 3 | Sustituyentes de calisteginas Grupo B | 16 | 8 |
| Tabla 4 | Sustituyentes de calisteginas Grupo C | 16 | 8 |
| Tabla 5 | Índice de Recuperamiento | 21 | 10 |
| Tabla 6 | Reproducibilidad de fase sólida | 21 | 10 |
| Tabla 7 | | | |

ÍNDICE DE FIGURAS.

| No. de Figura | Descripción | Pag. | Ref. |
|---------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|-----------|
| Figura 1 | Síntesis primordial de alcaloides con sustancias simples como 1, 4 butadinal, metilamina, propanona para la obtención de anillos tropánicos. | 6 | 1 |
| Figura 2 | Síntesis de gramina a partir de triptofano con seguimiento de C ¹⁴ | 6 | 2 |
| Figura 3 | Reacciones básicas para síntesis de alcaloides propuestas por Robinsón. | 6 | 2 |
| Figura 4-5 | Fotografías de plantas silvestres del Toloache en diferentes habitades. | 11 | 15 |
| Figura 6-8 | Fotografías acercamientos de hojas de Toloache en vivo, en la Figura 8 se observa una hoja seca. | 11 | 16, 15 |
| Figura 9-11 | Fotografías acercamiento de flores violetas y blancas en diferentes estados de floración. | 11 | 16 |
| Figura 12-14 | Fotografías acercamiento de frutos de Toloache en diferentes fases de maduración. | 12 | 16,15 |
| Figura 15-17 | Fotografías detalle de semillas de Toloache en fruto y cosechadas. | 12 | 16, 17 |
| Figura 18-24 | Estructuras de los diferentes alcaloides tropánicos contenidos en los tejidos de Toloache. | 13 | 1 |
| Figura 25 | Ilustración del sistema utilizado para la obtención de alcaloides a nivel industrial. | 14 | 1 |
| Figura 26 | Diagrama de flujo del sistema de obtención de alcaloides a nivel industrial. | 14 | 1 |
| Figura 27-31 | Fotografías acercamiento de las plantas utilizadas para adulterar la materia vegetal de Toloache. | 14 | 17 |
| Figura 32-36 | Estructuras de metabolitos tropánicos monocíclicos y los homologas de anillo agrandado del tropáno que aparecen en el metabolismo de los alcaloides superiores. | 15 | 8 |
| Figura 37-39 | Estructuras de anatoxinas como con un anillo bicíclico con propiedades toxicológicas. | 15 | 8 |
| Figura 40-44 | Estructuras de calisteginas según su grupo y sustituyentes. | 16 | 8 |
| Figura 45 | Imagen del sistema de biosíntesis de alcaloides tropanicos, propuesto mediante marcaje con deuterio. | 18 | 8 |

1. JUSTIFICACIÓN.

El Toloache (*Datura stramonium*) es una planta ampliamente distribuida en el orbe, pudiendo ser encontrada junto con miembros del mismo género en América, Asia, Europa y en ciertas regiones de África, por tal distribución se han hecho amplios trabajos sobre su fisonomía, contenido de alcaloides, cultivo y aprovechamiento, sin embargo es de notar que siendo una planta existente en México y ya conocida desde la época prehispánica, existan en nuestro país tan pocos estudios.

El siguiente trabajo ha sido realizado con el fin de proponer una base bibliográfica firme, sustentada en información publicada en fuentes bibliográficas, hemerográficas y electrónicas confiables. Se prestó especial atención a aquellas fuentes que hacían referencia a la especie que sobrevive en México; así también se hizo énfasis en el contenido de alcaloides tropánicos, sobre todo lo concerniente a dos alcaloides de importancia terapéutica y económica, la hiosciamina y la hioscina, siendo este último ampliamente descrito en esta tesis debido a su mayor importancia en la industria farmacéutica actual.

Para tal efecto la revisión bibliográfica abarca desde el conocimiento básico concerniente a la planta hasta varias metodologías propuestas para su análisis, incluyendo también una revisión de los alcaloides en general. Los métodos que se mencionan en este documento aplican para aislamiento, purificación y cuantificación de los alcaloides contenidos en uno o varios tejidos del Toloache y son métodos encontrados en publicaciones de reciente edición, siendo en algunos casos ajustados de otros métodos para cumplir las necesidades del experimento.

El fin último de este trabajo es proporcionar un punto de referencia para futuros trabajos de investigación abocados a temas afines, es por lo tanto que se pretende incluir un máximo de información que sirva de respaldo para cubrir todas las posibles áreas de interés.

2. RESUMEN.

El Toloache es una especie conocida desde la edad media en Europa y Asia, mientras que en América se conoce desde tiempos prehispánicos, siendo común el uso de esta planta por sus propiedades soporíficas, sedativas, antisépticas y antiparasitarias; bajo muchas circunstancias era y sigue siendo el principal ingrediente en la preparación de brebajes y pociones con fines medicinales, esotéricos y de culto, sin olvidar mencionar fines malévolos. El Toloache, así como ocho especies reconocidas en México, pertenecen al género de Daturae, miembro de la familia de las Solanaceae, cuentan con aproximadamente 200 subespecies siendo la principal característica de esta familia los variables contenidos de alcaloides contenidos en sus tejidos.

Los principales alcaloides encontrados en el género Solonaceae son los alcaloides tropánicos, siendo los de mayor importancia farmacológica la hiosciamina y la hioscina o escopolamina. Debido a su naturaleza alcalina, es muy común encontrar estos compuestos formando sales solubles en agua, es por tanto que el conocimiento de sus características físico-químicas es trascendental a fin de proponer métodos de extracción y purificación adecuados.

Gracias a los avances en la ciencia y en la tecnología, hoy contamos con sistemas de separación como CLAE (Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia) y CG (Cromatografía de Gases), a los cuales se les pueden acoplar sistemas de detección muy variados según las necesidades y alcance del proyecto. Sin embargo, todo el equipo disponible no representaría un avance significativo si no fuera por el uso del método adecuado, por lo que se reportan métodos para ambos sistemas de separación, los cuales ya han sido probados y utilizados ampliamente. Dichos métodos provienen de la literatura científica más reciente atendiendo a la necesidad de utilizar los métodos de vanguardia. Se ha intentado en lo posible brindar una traducción fiel del método, a fin de no producir desviaciones del mismo al momento de implementarlo.

3. INTRODUCCIÓN

3.1 Los Alcaloides

3.1.1 *Historia*

En 1817, el boticario alemán Friederich Wilhelm Sertürner, publicó los resultados de una investigación realizada en una sustancia cristalina obtenida del opio, dicho estudio reportó el éxito en el aislamiento de una sustancia de características alcalinas, la cual denominó *morphium* o *morfina*, como la conocemos actualmente.¹

Desde este primer aislamiento otros compuestos han sido aislados y debido a que se realizó en por medio de reacción alcalina, han sido llamados *alcaloides*. Sería en estudios posteriores en donde se demostraría que dicha alcalinidad es debida a la presencia de un nitrógeno en la molécula, quedando así definidas, como sustancias orgánicas obtenidas de una reacción alcalina.^{1,2}

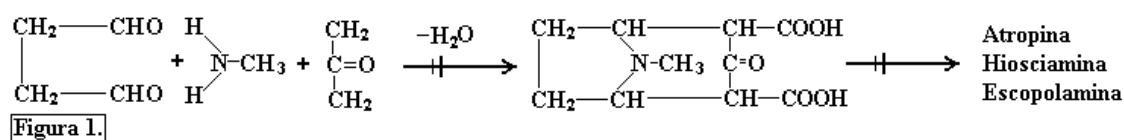
Sin embargo esta simple definición, no era suficientemente restrictiva por el hecho de que otras aminas fisiológicas producidas por plantas y animales (histamina, epinefrina, serotonina) pueden ser incluidas. Cuando se obtuvo un mejor conocimiento de la estructura de los alcaloides, fue posible reducir la definición a “bases heterocíclicas con al menos un nitrógeno en el anillo”. Algunos estudiosos en un intento de hacer un grupo aun más restringido, solo han incluido aquellas bases que tiene una actividad fisiológica en el sistema nervioso central.¹

3.1.2 *BIOGÉNESIS Y ESTRUCTURA.*

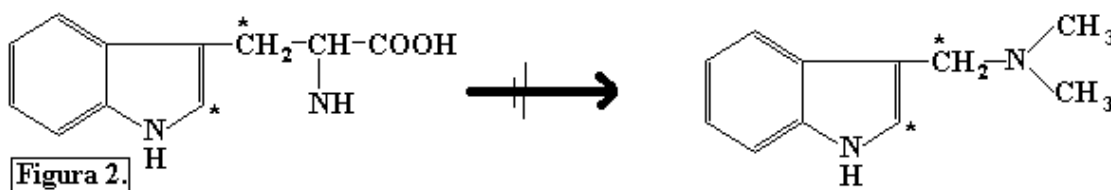
Las primeras consideraciones del origen de los alcaloides, fueron principalmente para correlacionar las ya de por sí extrañas estructuras con las bases de la química contemporánea. La opinión más común era que los alcaloides eran producidos solo en plantas aisladas con ciclos metabólicos inusuales¹, sin embargo con el avance en la investigación y las técnicas analíticas, se demostró que una variedad enorme de plantas presentan alcaloides en sus tejidos, siendo obvio hoy en día que se les puede localizar en plantas superiores (Fanerógamas) tanto en monocotiledóneas, como dicotiledóneas, así también en los géneros inferiores de las

criptógamas²; Esto dio lugar a la suposición de que los alcaloides y las proteínas tenían ciclos metabólicos asociados, siendo el argumento de esto que ambos contenían nitrógeno¹, por tal motivo se llegó a pensar que los alcaloides, eran productos para la desintoxicación o intermediarios en la formación de proteínas.²

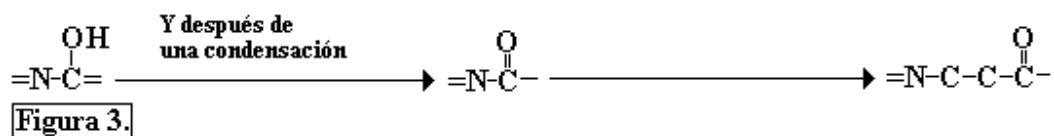
Robinson propuso una teoría para la biosíntesis del tropano y sus derivados, la cual proponía que la mayoría de los núcleos heterocíclicos simplemente no existían como tal, pero que bajo ciertas condiciones, podían ser sintetizados a partir de sustancias más simples existentes en la biosfera.¹



Sin embargo muchos de los precursores necesarios para tal síntesis no son encontrados en las células. Por tal motivo el punto de vista general cambio y se consideró a los aminoácidos, que son metabolitos estructuralmente análogos a los alcaloides, como posibles precursores; tal es el caso en la síntesis de la gramina a partir de triptofano, el cual ha sido marcado para su seguimiento con C¹⁴.²



En su investigación concerniente a la biogénesis de los alcaloides, Robinson propuso la posibilidad de dos posibles reacciones de importancia, las cuales son posibles bajo condiciones fisiológicas normales; Es el caso de la condensación aldólica y la condensación de aldehídos y cetonas con amoníaco o aminas² para formar primero (figura 3)



Este tipo de reacciones junto con reacciones de N-metilación, oxidación, descarboxilación, reducción, deshidrogenación, síntesis de dienos, alargamiento de anillo y posiblemente hidratación y deshidratación, aplicadas a una serie de aminoácidos funcionando como materia prima, son consideradas como precursoras de la mayoría de los alcaloides.²

Excepto por el caso de la gramina, la búsqueda de un compuesto en común con los alcaloides resultaba en exceso difícil. Los que mantenían la teoría de que los aminoácidos eran precursores de los alcaloides, creían que la formación de los alcaloides era debido a una disfunción enzimática en un eslabón de la cadena metabólica. Resulta concebible que el primer paso para la síntesis de alcaloides, sea debido a la acción de una enzima descarboxiladora no específica sobre un aminoácido, la cual podría producir aminas primarias.¹ Como resultado de la presencia de una enzima imperfecta o no específica, una sustancia accidental o anormal, es producida y la cual no tiene caminos metabólicos de eliminación. De hecho, el nuevo producto creado, puede ser tóxico o incluso letal para la planta a menos que el metabolito sea eliminado por enzimas adaptativas o por reacción espontánea con otro metabolito celular; evidentemente aminas, principalmente primarias o secundarias son relativamente tóxicas para las plantas.¹

A pesar de las constantes investigaciones, no se puede hacer una afirmación completa de donde y como se lleva a cabo la síntesis de los alcaloides, ya que en la mayoría de los casos, se sabe poco o nada del papel que juegan los alcaloides en el metabolismo de las plantas,^{1,2} es por lo tanto que ninguna regla puede ser establecida a pesar del conocimiento de la distribución de los alcaloides en las plantas.²

Nótese que debido a la complejidad estructural de los alcaloides, los nombres químicos son demasiado complejos para el uso común, por lo que generalmente se hace referencia al origen botánico, por ejemplo, la atropina de la *Atropa belladonna*; ocasionalmente se hace referencia a sus propiedades, por ejemplo, la morfina por hacer referencia a sus propiedades soporíficas^{1,2}. Por lo general, el nombre de los alcaloides, lleva como sufijo denominativo *-ina-*, así también cuando muchos alcaloides son obtenidos de la misma fuente, a los nombres se les agrega un sufijo extra *-ina-*, *-en-*, *-id-*, *-is-*, *-at-*, etc., al nombre base, por ejemplo, ergotamína, ergotaminína.^{1,2}

3.1.3 PROPIEDADES.

Los alcaloides son aminas secundarias, terciarias y cuaternarias, por lo que se observan propiedades alcalinas, teniendo basicidad desde fuerte hasta muy débil. La presencia de grupos hidroxifenólicos o ácidos carboxílicos reducen la alcalinidad.¹⁻³

Bioenergéticamente, los alcaloides están relacionados con los aminoácidos, sin embargo se encuentran en un estado más alto de oxidación.¹ Consecuentemente, la mayoría de los alcaloides contienen oxígeno en su estructura molecular, con algunas excepciones.¹

Debido a su naturaleza alcalina, los alcaloides reaccionan con ácidos para formar sales las cuales se disocian fuertemente en soluciones acuosas. Por lo general las sales son cristalinas y solubles en agua y en alcohol. La mayoría de las sales son incoloras, sin embargo se conocen bastantes excepciones (por ejemplo berberina). Las soluciones alcalinas, tierras alcalinas, hidróxidos, carbonatos alcalinos y el amoníaco, liberan las bases de sus respectivas sales.¹

Muy a menudo las bases libres son sólidos cristalinos incoloros prácticamente insolubles en agua pero solubles en la mayoría de los solventes orgánicos.^{1,2} Normalmente las bases libres son solubles en la mayoría de los solventes orgánicos y pueden ser separados de las soluciones acuosas simplemente por extracción de

estas con un solvente orgánico inmiscible. El conocimiento del pKa de los alcaloides es importante para la selección del método de aislamiento de la materia vegetal, así como para la selección del método adecuado para su cuantificación e identificación.¹

Muchos de los alcaloides contienen uno o varios carbonos asimétricos, por lo que presentan una actividad óptica. El grado de rotación óptica de un alcaloide es característico de cada tipo. La actividad óptica, de los alcaloides puede ser utilizada para la identificación y cuantificación de compuestos así como su pureza.¹

Las formas *l*- y *d*- de los alcaloides, generalmente tienen efectos fisiológicos diferentes, como en el caso de la hiosciamina, en donde la fracción *l*- tiene el doble de actividad que la mezcla racémica y de 12 a 20 veces más potente que la fracción *d*-.¹

3.1.4 FUENTES

Los alcaloides no están limitados a uno o a un pequeño grupo de familias de plantas sino que aparecen dentro de todo el reino vegetal y en algunos casos en el reino monera. Algunas familias de plantas contienen relativamente muchas especies que contienen alcaloides, y algunas plantas producen cantidades relativamente mayores de alcaloides comparadas con otras especies¹. Más de 800 especies de 77 familias de plantas son conocidas por producir alcaloides, la cantidad varía desde un alto porcentaje (e.g. 15% en peso en la corteza de la cinchona¹) hasta fracciones menores al 1% (0.1% en peso en el ergot). Químicamente los alcaloides provenientes de varios miembros de una familia están cercanamente relacionados, es así que inspecciones químicas de alcaloides de diferentes familias muestran que los alcaloides no solo tienen estructuras similares, sino que desde el punto de vista bioenergético, sabemos que su formación sigue caminos similares.¹ Se sabe que las familias Solanaceae y Erithroxylaceae producen alcaloides tropánicos y algunas clases de nicotinas, higrinas y solaninas.²

Los alcaloides aparecen en plantas en forma de sales y raramente en forma de bases libres. Los ácidos con lo que mas comúnmente están combinados son los ácidos málico, tartárico, ácido cítrico y en algunos casos, mecónico, quelidónico y sulfúrico.¹

Así también los alcaloides, se pueden presentar en varias partes de la planta o en secciones específicas.^{12,16} En plantas vivas se les encuentra disueltas en el citosol. Las plantas jóvenes contienen mas alcaloides, particularmente en tejidos de rápido crecimiento,^{12,16} en órganos más viejos los alcaloides se encuentran en mayor proporción en las partes periféricas como la corteza y cáscara, mientras que se encuentran en menor proporción en las áreas centrales.¹

Los alcaloides tienden a acumularse año con año en los órganos perennes, sin embargo no es bien sabido exactamente en que parte se forman los alcaloides y aunque en algunas especies se sabe que se producen en las raíces para luego ser distribuidos al resto de la planta, una regla confiable no puede ser establecida acerca de que órgano contienen mas alcaloides.^{1,11}

3.1.6 REACCIONES GENERALES DE LOS ALCALOIDES

Los alcaloides muestran varias reacciones en común, sin embargo estas reacciones, también son positivas para otras aminas y proteínas, por lo que los alcaloides deben primero ser separados de los constituyentes de la mezcla para luego ser analizados.

Como prueba inicial para corroborar la presencia de alcaloides, se utiliza un precipitador de alcaloides como ácido fosfo-tungsténico, yodo en yoduro de potasio, ioduro de bismuto potásico, tánina, etc. La presencia de un precipitado indica la presencia de alcaloides.¹

En estado natural la mayoría de los alcaloides aparecen en forma *l*-, la cual es generalmente la forma activa del alcaloide, la *racemización* en las formas *dl*- ocurre en las solonaceas a temperatura ambiente y se incrementa al elevar la temperatura.¹

3.1.7 DETERMINACION CUANTITATIVA.

Se consideran tres pasos básicos para una determinación cuantitativa exitosa: (1) aislamiento, (2) purificación, (3) determinación.¹

El primer paso, el aislamiento, es logrado por la extracción del alcaloide con solventes orgánicos como etiléter o cloroformo después de haber alcalinizado el medio.¹⁻¹⁹ La purificación consiste en transferir el alcaloide en forma de sal a una solución acuosa ácida por la agitación de esta en la fase orgánica; después de la separación se alcaliniza la solución acuosa y es agitada en presencia de un solvente orgánico inmiscible en la fase acuosa; se evapora el solvente orgánico y el residuo sólido es disuelto en etanol. En la determinación se toma la solución alcohólica y se titula por acidimetría, iodimetría, polarimetría, polarografía o colorimetría.¹

3.2 El Toloache.

3.2.1 ETIMOLOGÍA.

La palabra *Toloache* viene de *tolozin* que en lengua náhuatl significa "*cabeza inclinada*". Este nombre hace referencia a sus flores, las cuales se aprecian inclinadas o caídas.^{6,7,22} La referencia de manzana espinosa o hierva hedionda se debe a las características espinas que tiene el fruto y al mal olor que desprende la hierva en general.

3.2.2 SINÓNIMOS

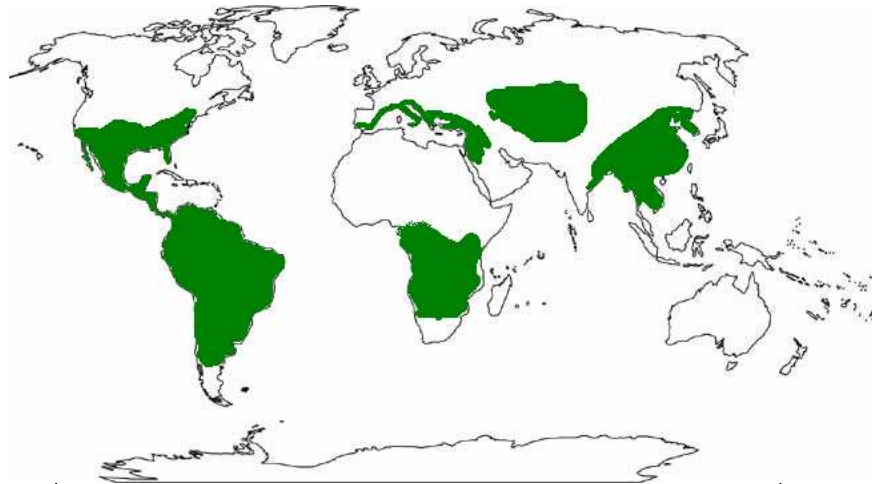
En México se le conoce como tiene una gran variedad de nombres, siendo los más conocidos: Toloache, toluache, tápate, tlápatl, toloatzin, nacazcul, hierba del diablo, trompetilla, burladora, santas noches, cornescopia; además de las voces mayas tohku y mehenxtoku, sin embargo alrededor del mundo también se le conoce como Hierba hedionda, higuera loca, manzana espinosa (Thornapple), chamisco, belladona de pobre, peo de fraile (Puerto Rico); chamico, clarín (Cuba); chamico, gigantón, peo de fraile, tapete (Costa Rica); floripondio blanco (Panamá); ñongué (Colombia); ñongué morado (Venezuela); chamico, cojón del diablo (Perú).^{2-6,22}

3.2.3 FILOGENIA.

El Toloache es una especie conocida en América, Europa, Asia y África, desde tiempos antiguos, siendo común el uso de esta planta.⁴ El Toloache, así como ocho especies reconocidas en México, pertenecen al género de *Daturae*, miembro de la familia de las *Solanaceae*, cuentan con aproximadamente 200 subespecies siendo la principal característica de esta familia los variables contenidos de alcaloides contenidos en sus tejidos.^{1,5,22}

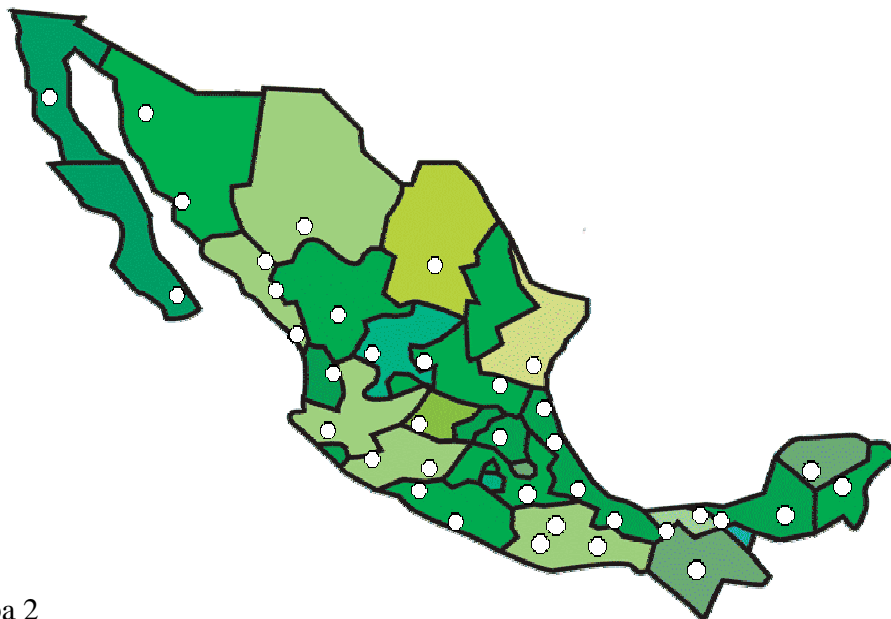
En México sobreviven la *Datura stramonium*, *Datura ceratocaula*, *Daturainoxia*, *Datura meteloides*, *Datura inoxi*, *Datura discolor*, *Datura proinosa*, *Datura quericfolia*, *Datura villosa*.²² Mientras que alrededor del mundo podemos encontrar especies como *Datura arborea*, *Datura feroz*, *Datura fastuosa*, *Datura tatula*.^{4,22}

3.2.4 LOCALIZACIÓN Y DISTRIBUCIÓN.



Mapa 1.
Muestra la distribución del Toloache a nivel mundial.

El estramonio es una planta que puede ser encontrada habitualmente en forma salvaje África, América, Asia y Europa (mapa 1).¹ En México (mapa 2) se le ha encontrado tanto en áreas húmedas como en zonas áridas de las regiones de la Planicie Costera, Intermedia del Noroeste, Altiplano del Suroeste y en laderas de la Sierra Madre Oriental, en lotes baldíos, áreas de cultivo y en angostaderos



Mapa 2
Se muestra la distribución del Toloache en la Republica.

sobrepastoreados. Crece en bosque de encino, pino, pino-encino y otras coníferas, a una altitud de 1900 a 2500 m, ruderal, arvense.^{6,7} Requiere de suelos con calcio siendo la falta de este la causa de bajas producciones de alcaloides.¹¹

3.2.5 RECOLECTA.

El aprovechamiento es doméstico⁶. A pesar de esto su aprovechamiento a gran escala ha sido prohibido por la Secretaria de Salud por considerar que puede tener efectos tóxicos (Acuerdo del 15 de Diciembre de 1999, Diario Oficial).⁶ Sin embargo, se suelen recolectar una gran cantidad de plantas en estado silvestre, usando principalmente plantas jóvenes (plantas que han sobrepasado 30 cm de alto y menos de 1 m de alto).¹²

3.2.6 COMERCIALIZACIÓN.

Se autoconsume y se vende por encargo. En México es muy común encontrar el Toloache en mercados y tiendas de herbolaria.⁶ Como experiencia personal menciono que el material vegetal fue encontrado aun fresco y ya seco en el mercado de Sonora, localizado en el DF, pero también pude ser localizado en algunos otros mercados dentro de la ciudad o en mercados con hierveros especializados. En algunos caso fue posible encontrarlo ya en preparaciones y con instrucciones precisas para su uso.

3.2.7 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS.

Hierba anual, con tallo erecto de hasta 1 m de altura, ramificado sólo en la parte distal (inflorescencia) (Fig 4-5). Hojas alternas, grandes y anchas (hasta 20 x 15 cm), pecioladas, con limbo de contorno ovado y margen con anchos dientes triangulares, casi glabras (existen pelos muy dispersos). Inflorescencia en forma de dicasio compuesto (Fig. 6-8).^{6,7}



Figura 4.



Figura 5.



Figura 6.



Figura 7.



Figura 8.

Flores grandes, pentámeras. Cáliz tubular, verde, de 3-5 cm de longitud. Corola tubular abierta en forma de embudo, azul pálido o blanca, a veces con tonalidades rosadas, de 5-10 cm de longitud. 5 estambres fusionados a la corola. Ovario súpero, bicarpelar, que fructifica en una cápsula erizada de aguijones rectos y cónicos (1-2 mm en su base), dehiscente por 4 valvas. Durante la fructificación el cáliz se fragmenta por una línea transversal cerca de su base. La parte basal del cáliz permanece en el fruto y es acrecente (crece durante la maduración del fruto), mientras el resto se desprende junto con la corola. Florece en verano (Fig.9-11)^{6,7}.



Figura 9.



Figura 10.



Figura 11.

El fruto del Toloache es una cápsula ovoide y espinosa, de aproximadamente 3 a 3.5 cm. de largo. Tiene cuatro celdas en su parte basal pero en la parte superior solo dos correspondientes a los carpelos. El tejido interno del fruto se conforma para estructurar cuatro secciones las cuales tienen una abundante cantidad de semillas.^{6,7}



Figura 12.



Figura 13.



Figura 14.



Figura 15.



Figura 16.



Figura 17.

Por otra parte las semillas son aplanadas y con una silueta arriñonada, de aproximadamente 3 a 3.7 mm de largo, 2.5 a 3 mm de ancho y de 1 a 1.6 mm de grueso. Poseen una cáscara de color negrusco o café oscuro y con una superficie repleta de depresiones de cerca de 0.3 mm de ancho (Fig. 15-17).^{6,7}

El híleon, se presenta en el borde interior de la semilla, el interior de la semilla esta rellena con un endosperma oleoso, el cual tiene en su interior un embrión de aproximadamente 0.6 mm de diámetro. Las semillas trituradas, tiene un olor desagradable y un sabor picante y oleoso.^{3,6} Los alcaloides se encuentran acumulados en las células colapsadas de la capa nutriente de la cáscara, justo por

encima de la epidermis. Ningún alcaloide ha sido detectado en endosperma o embrión (Clautriau, 1894).

3.2.8 PRINCIPALES COMPONENTES

Los principales alcaloides esterres del tropano en los tejidos del Toloache son la hiosciamina, atropina (mezcla racémica de la hiosciamina R,S), apoatropina, escopolamina (hioscina), homatropina, litorina, anisodamina, anisodina (fig. 18-24) así también en menor cantidad ácido carisatrófico.^{8,17} Siendo la hiosciamina el éster tropánico que se presenta en mayor cantidad, mientras que la atropina, apoatropina y la belladonita parecen formarse en el proceso de extracción de la hiosciamina.⁵

En preparaciones en donde se utilizan hojas secas, ramas con flores y frutos se puede encontrar hasta un 0.7% de alcaloides hiosciamina, atropina, apoatropina, belladonita y escopolamina (hioscina). Así también se obtiene *daturina* que es la mezcla de hiosciamina y atropina.⁵

Es importante mencionar que la literatura reporta que las semillas de Toloache contienen porcentajes variables de alcaloides totales por lo que un porcentaje exacto no puede ser establecido.¹⁶

El contenido total de alcaloides consiste en una mezcla que contiene principalmente de *l*-hiosciamina con trazas de hioscina y posiblemente atropina. Además podemos encontrar una mezcla de aceites compuesta principalmente por glicéridos daturicos así como también otros ácidos menos comunes, tal mezcla conforma del 15% al 30% del peso total.³

El contenido de alcaloides en plantas jóvenes es variable pudiéndose encontrar alcaloides prácticamente en toda la planta siendo estos más abundantes en las hojas medianas (5 a 9 cm) y tallos que en hojas viejas y jóvenes (9 a 11 cm y 1 a 5 cm respectivamente) o en flores y frutos.¹⁶ En plantas viejas el contenido de alcaloides se reduce pero mantiene la misma proporción.¹⁶

3.2.9 PRODUCCIÓN.

El Toloache es una planta anual, por lo que su sembrado se realiza generalmente a principios de mayo,¹² en terrenos calcáreos^{11,19} a una distancia aproximada de entre un metro entre una semilla y otra. Se cultiva para la producción de alcaloides en el sureste de Inglaterra, así como también en Alemania, Francia y Hungría.³ Alrededor de 15,000 kg de alcaloides son producidos anualmente en US¹, los métodos de producción son muy variados y dependen de la naturaleza del alcaloide.

Debido a que el material vegetal utilizado contiene varios ácidos, los cuales podrían causar la hidrólisis de los alcaloides, se utilizan agentes neutralizadores como carbonato de calcio, el cual es agregado al líquido de extracción durante el proceso.^{1,19}

Es también de importancia mencionar que el cultivo del *estramonio*, conlleva el análisis de los requerimientos nutrimentales así como las cualidades del suelo donde se siembra, ya que en fechas recientes se ha demostrado que factores como la presencia de calcio y nitrógeno fijado aumenta notablemente la producción de alcaloides en la planta, mientras que la ausencia causa una severa reducción del producto.¹¹

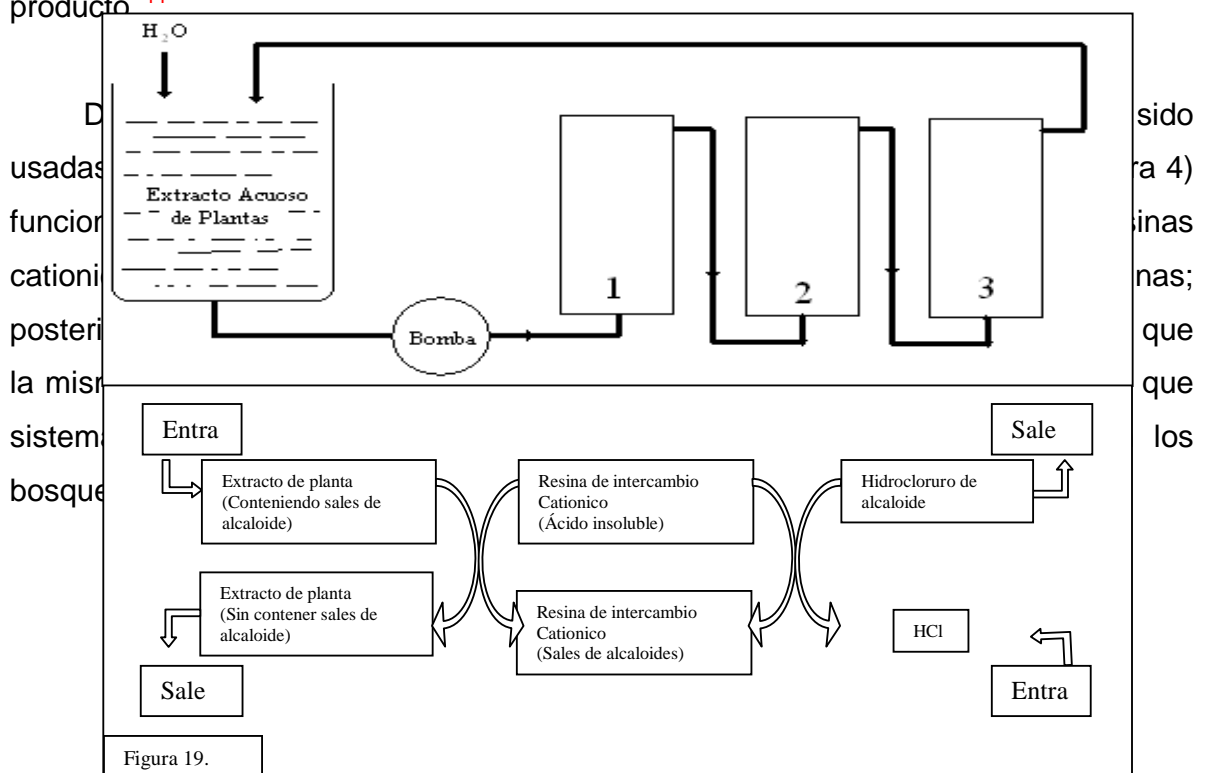


Figura 19.

Por lo general se utilizan hojas secas, ramas con flores y frutos, sin embargo se especifica que no debe contener mas de un 3% de tallos gruesos de mas de 8 mm de diámetro, así también no debe contener mas de 4% de cenizas insolubles en ácidos. En cuanto al contenido de los alcaloides, no debe contener menos de 0.25% de alcaloides de *estramonio*.⁵

3.2.10 ADULTERANTES

Para cumplir con los requerimientos de materia vegetal, es muy común encontrar adulterantes en las preparaciones de estramonio, en las cuales en común encontrar hojas y frutos de *Xanthium italicum*(Fig. 20-21), y otras especies de este genero; *Carthamus helenoides* (Fig. 22) y *Chenopodium hybridum* (Fig 23-24), representan adulterantes comunes, todo desde el hecho de que la fisonomía de sus hojas es muy similar a la del estramonio.⁵



Figura 20.



Figura 21.



Figura 22.



Figura 23.



Figura 24.

En mi experiencia personal, también encontré una variedad de plantas con características muy similares al Toloache, sin embargo tenían aplicaciones totalmente distintas como el tratamiento de la diabetes o dolores musculares, fue por tanto importante mantener un conocimiento claro de las características del Toloache.

3.2.11 TOXICOLOGIA.

Al ser una planta de fácil crecimiento es común encontrar el Toloache cerca de poblaciones o en áreas de pastoreo^{6,7} por lo que son muy comunes los casos de intoxicación de ganado y personas, teniendo mayor relevancia la intoxicación de niños, a los cuales se les hacen especialmente atractivos los frutos de esta planta.¹³ Se reporta que para adultos se requiere la ingestión de 20 a 30 frutos, sin embargo para niños solo se requiere medio fruto o una dosis de 10 mg para ser letal.¹³ Entre los principales síntomas que podemos encontrar por el consumo del Toloache se encuentran los denominados síndromes anticolinérgicos¹⁸: sequedad de boca, taquicardia, midriasis acentuada, náuseas, agitación, delirio, pérdida de la consciencia y muerte por depresión de los centros respiratorios, pupilas dilatadas, taquicardia piel reseca, contracción intestinal, retención urinaria, depresión del sistema nervioso central, agitación severa, alucinaciones, confusión, taquicardia supraventricular entre otros.^{13,18} Por sus propiedades también se han reportado casos de suicidios exitosos al mascar, fumar o ingerir en exceso partes o la planta completa.²³

En la mayoría de los casos de intoxicación es necesario un lavado estomacal para remover la materia vegetal y la aplicación de medicamentos con propiedades como la de la acetilcolinesterasa.^{13,18} Entre los tratamientos mas socorridos se encuentra el uso de benzodiazepinas seguido de un lavado nasogástrico a fin de reducir la agitación y eliminar la materia vegetal en el organismo^{13,18} este sistema tiene la ventaja de reducir el estrés por el que pasa el paciente además de aumentar sus posibilidades de supervivencia.^{13,18}

Desde tiempos remotos se le han atribuido diferentes propiedades al Toloache, siendo las principales sus propiedades saporíficas, sin embargo también sabemos que tiene propiedades toxicas debido no solo a su contenido de alcaloides y metabolitos relacionados, sino también a otras sustancias que se producen dentro del metabolismo en general. Así podemos encontrar referencias de propiedad antihelmínticas y antiparasitarias¹⁵, en donde la planta es consumida sola o junto con otras yerbas o como repelente de insectos y arácnidos como moscos, moscas, chinches pulgas y piojos.¹⁵ De igual manera en tiempos recientes se ha dado su uso como alucinógeno en lugares como Europa y EUA.¹⁶ El uso de esta planta para el suicidio u homicidio ha sido común desde hace mucho tiempo gracias a sus propiedades sobre el SNC, siendo necesario el consumo de partes o toda la planta completa para conseguir tal fin.²³

3.2.12 USOS DEL TOLOACHE.

En cuanto a sus propiedades antimicrobianas se han hecho estudios comparativos donde extractos de plantas de la familia *Datura* son comparados con ampicilina (Tabla 1). Los resultados muestran que el extracto de *D. stramonium* tubo una actividad antibacteriana leve contra bacterias Gram (+) a 2.5 mg/ml y a concentraciones menores no fue efectiva.²⁴ *D. innoxia* presenta actividad antibacterial contra bacilos de la variedad *subtilis*, *Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus aureus*.²⁴ La actividad fue dependiente de la dosis presentando un máximo a was highest a 2.5 mg/ml. Ambos extractos tuvieron poco a nulo efecto contra *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*.²⁴ Cuando los resultados se comparan con la actividad antibacterial de la ampicilina, los extractos de planta tubieron igual o mayor actividad antibacterial.²⁴

| Actividad antibacterial de extractos de <i>D. stramonium</i> y <i>D. innoxia</i> . | | | | | | | |
|------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|------|------|-----------------------------------|------|------|-------------------------|
| Microorganismos | Zona de inhibicion | | | | | | |
| | <i>D. innoxia</i> ^b | | | <i>D. stramonium</i> ^b | | | Ampicilina ^c |
| | 2.5 | 1.25 | 0.75 | 2.5 | 1.25 | 0.75 | |
| <i>Bacillus subtilis</i> PTCC 1024 (ATCC 465) | 18 | 14 | 10 | 11 | 8 | 7 | 14 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 | 12 | | 0 | 10 | 7 | 0 | 13 |

| | | | | | | | |
|-----------------------------------|----|----|---|---|---|---|----|
| Escherichia coli ATCC 25922 | 9 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Enterococcus faecalis ATCC 29212 | 13 | 10 | 7 | 9 | 0 | 0 | 11 |
| Pseudomonas aeruginosa ATCC 85327 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

PTCC, Persian Type Culture Collection; ATCC, American Type Culture Collection.

a Incluye el diametro del disco (6 mm).

b Concentracion probada, mg/ml.

c 10 Ag/disk.

El Toloache y varios ejemplares en la misma familia han sido recientemente estudiados y propuestos como mecanismos metabolizadores de pesticidas comunes (paration, metil-paration, fluorodifeno y nitrofeneno).³² Dado que componentes fenolitos naturales y no naturales forman parte del metabolismo y funciones biológicas de la planta, están regulados por metabolismo y compartimentización.³²

3.2.13 CULTIVO Y REQUERIMIENTOS.

En la actualidad existe un gran numero de sistemas propuestos para el cultivo de esta planta dado que la recolecta de especies salvajes para aprovechamiento industrial no es suficiente. Es por tanto que se recomienda mantener ciertas condiciones mínimas para obtener un adecuado desarrollo²⁵ de las plantas y más importante aun aumentar el rendimiento de alcaloides contenidos, las recomendaciones son:

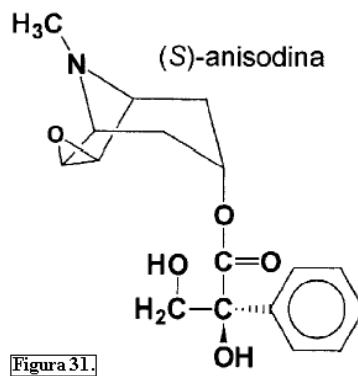
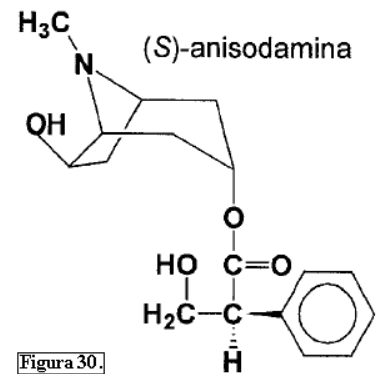
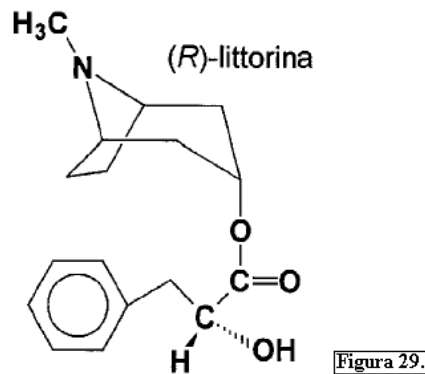
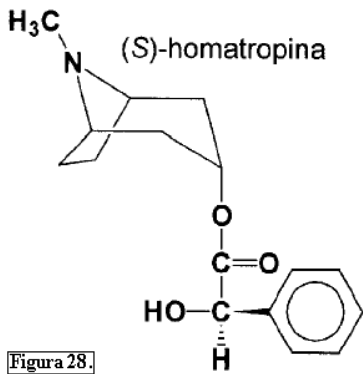
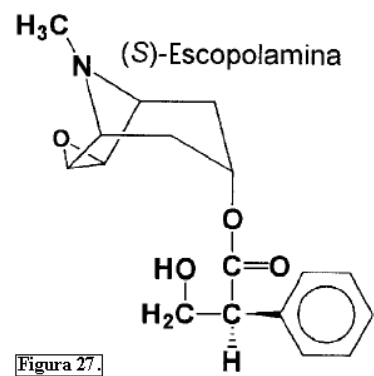
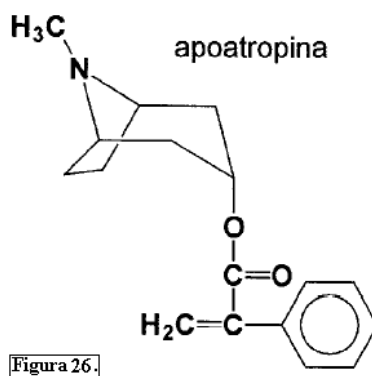
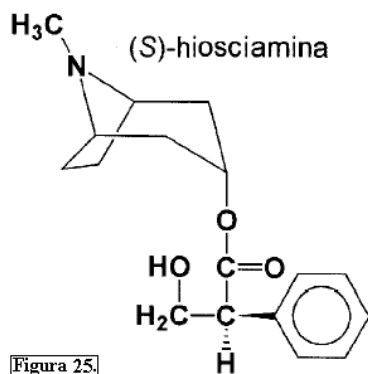
- Luz: La planta en todas sus fases de desarrollo puede aprovechar sin problema la luz directa del sol, sin embargo para el desarrollo de las semillas es recomendable una luz roja o en infrarrojo lejano para inducir la germinación, así también un almacenamiento previo en la tierra a cultivar asegura una mayor cantidad de semillas germinadas.²⁵
- Suelo: La planta no requiere un tipo de suelo en especial, pero para un buen rendimiento de alcaloides, se recomienda que el suelo sea calcáreo^{1,11,17} y con un buen insumo de nitrógeno en forma de nitratos, siendo aceptado el amonio o el carbonato de amonio. Así también la presencia de bacterias nitrificantes tales como *Agrobacterium rhizogenes* significa una elevación del nitrógeno fijado lo que se traduce como un mayor insumo para la planta.^{11,17,26}

- Plaguicidas: El uso de herbicidas no es muy recomendable dado el hecho que el uso de *Clorosulfuron* y *Glifosatos*, inhibe el pleno desarrollo de la raíz de la planta, por otra parte herbicidas como el *Metilato de jasmonato* incrementan el desarrollo de la raíz de la planta. La proporción de alcaloides también se ve afectada ya que al usar *Clorosulfuron* y *Glifosatos*, la cantidad total de alcaloides disminuye mientras que con el uso de *Metilato de jasmonato* aumenta notablemente.³³
- En cuestión de plagas, el Toloache es especialmente sensible al ataque por hongos saprofitos entre el que destaca *Alternaria crassa* por lo que un control correcto de humedad y temperatura (si se usa invernadero) es muy recomendable.³⁴

3.3 Alcaloides en el Toloache

3.3.1 TROPINA Y ALCALOIDES SIMILARES

Los ester de la tropina o escobina unidos a ácidos específicos (trópico, atropico, tiglico) son alcaloides tipo tropano. Existen al rededor de 200 tipos de alcaloides, los cuales comprenden mono, di y triesteres, carboxilatos y benzolatos del tropano^{8,12} y se han logrado aislar de muchos tipos diferentes de familias tal como Solanaceae, Erythroxylaceae, Convolvulaceae, Proteaceae, Rhizophoraceae, Brassicaceae, Euphorbiaceae, sin embargo no se describen concentraciones.⁸



Los alcaloides aislados más importantes en terapia son la escopolamina y la *l*-hiosciamina junto con su forma racemiza, la atropina. La mayoría de los alcaloides tropanicos, son quirales.⁸ La atropina no esta presente como tal en la planta, sin embargo la *l*-hiosciamina racemiza durante el proceso de secado y particularmente en los procesos con alta temperatura y medios muy alcalinos.^{1,8} Este es un efecto contraproducente dado el hecho de que la atropina es solo la mitad de efectiva que la *l*-hiosciamina, mientras que la toxicidad no disminuye.¹

Existen además metabolitos tropanicos monociclitos como la higrina y los homologas de anillo agrandado del tropano como la pseudopeletierina y la peletierina monocíclica aparecen en el metabolismo de los alcaloides ya que se forman por pasos biosintéticos similares (Fig. 32-36).⁸

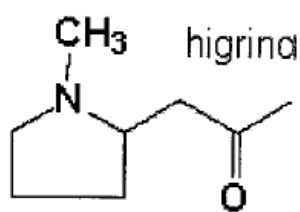


Figura 32.

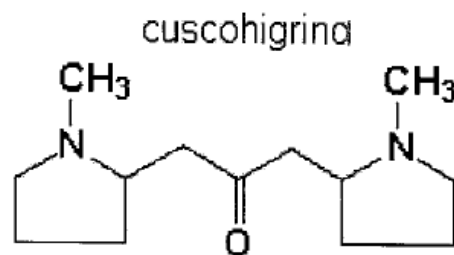


Figura 33.

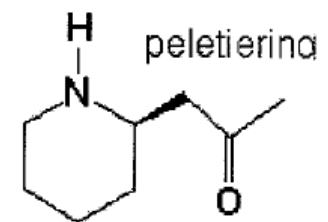


Figura 34.

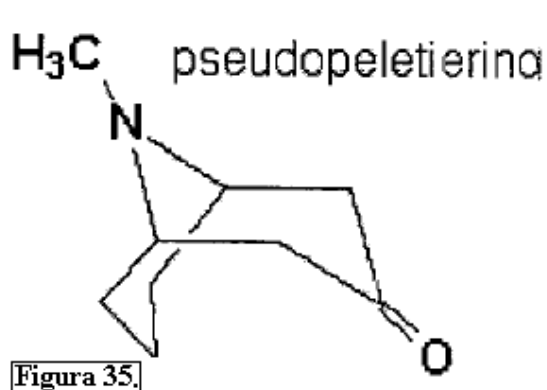


Figura 35.

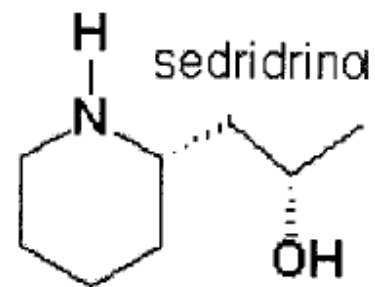


Figura 36.

Anatoxinas como homotropanos con un anillo bicíclico agrandado tienen propiedades toxicológicas.⁸

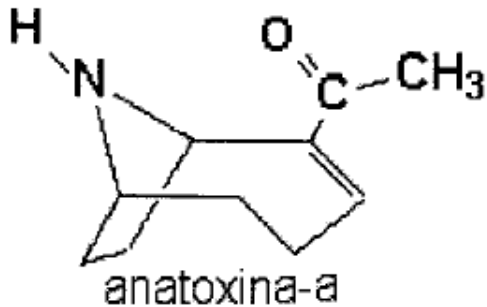


Figura 37.

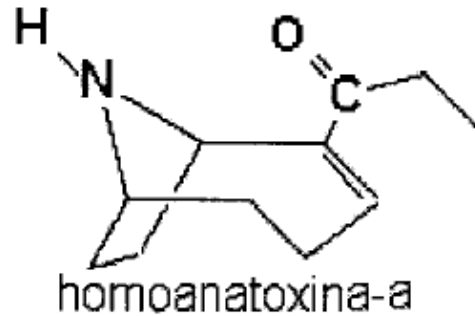


Figura 38.

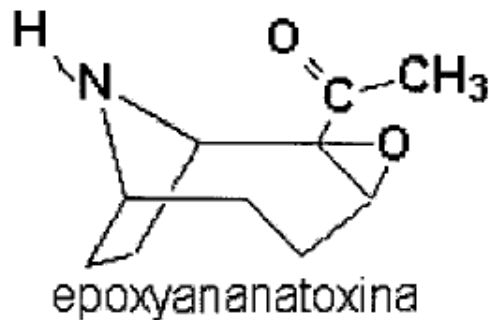


Figura 39.

Las Calisteginas (Fig. 40-44) son un grupo de alcaloides no eterificado del tropano hidroxilado, los cuales llevan 3, 4 o 5 grupos hidroxilo, lo que los hace altamente solubles en agua y de difícil separación a cualquier pH con solventes orgánicos, por lo que es común encontrarlos en las aguas madres de los alcaloides tropanicos.⁸

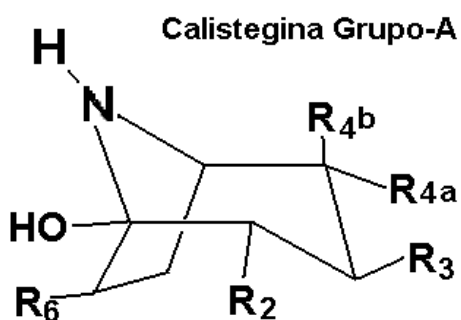


Figura 40.

| | R ₂ | R ₃ | R _{4a} | R _{4b} | R ₆ |
|----------------------------|----------------|----------------|-----------------|-----------------|----------------|
| Calistegina A ₃ | OH | OH | H | H | H |
| Calistegina A ₅ | H | OH | OH | H | H |
| Calistegina A ₆ | OH | H | H | H | OH |
| Calistegina A ₇ | OH | H | H | OH | H |

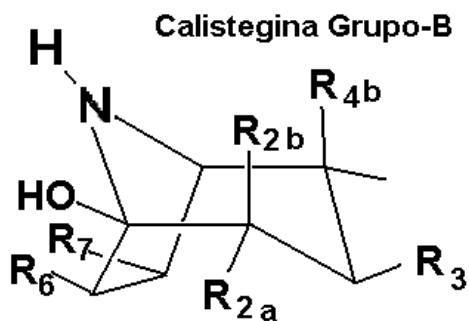


Figura 41.

| | R _{2a} | R _{2b} | R ₃ | R _{4a} | R _{4b} | R ₆ | R ₇ |
|----------------------------|-----------------|-----------------|----------------|-----------------|-----------------|----------------|----------------|
| Calistegina B ₁ | OH | H | OH | H | H | H | OH |
| Calistegina B ₂ | OH | H | OH | OH | H | H | H |
| Calistegina B ₃ | H | OH | OH | OH | H | H | H |
| Calistegina B ₄ | OH | H | OH | H | OH | H | H |
| Calistegina B ₅ | H | OH | H | H | OH | OH | H |

| | R _{2a} | R _{2b} |
|----------------------------|-----------------|-----------------|
| Calistegina C ₁ | OH | OH |
| Calistegina C ₂ | H | OH |

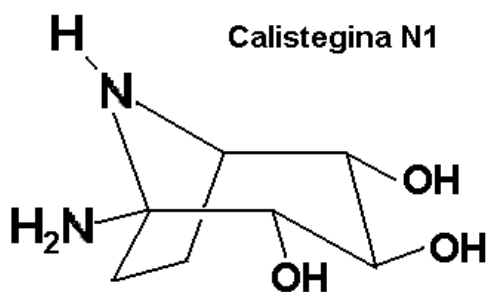


Figura 43.

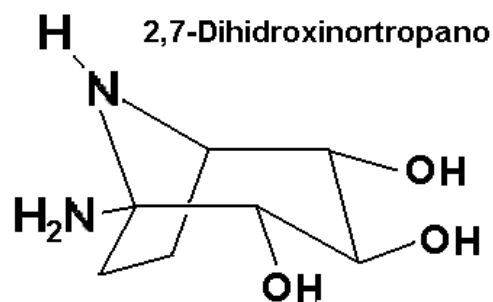


Figura 44.

3.3.2 FARMACOLOGÍA Y USOS

Las drogas anticolinérgicas como la *l*-hiosciamina, actúan como antagonistas competitivos en los receptores colinérgicos muscarínicos, previniendo el acceso de la acetilcolina. Los efectos de las drogas anticolinérgicas pueden ser superados por el aumento de la concentración local de acetilcolina en el receptor muscarínico. Hay diferencias entre la potencia de las drogas anticolinérgicas (atropina, escopolamina, y glicopirrolato), que pueden ser explicadas por las subclases de receptores muscarínicos colinérgicos (M-1, M-2, M-3) y por la variación en la sensibilidad de los

diferentes receptores colinérgicos. Por ejemplo los efectos de la atropina en el corazón, músculos lisos bronquiales y tracto gastrointestinal son mayores que con la escopolamina. Es por tanto que los alcaloides del Toloache son utilizados para aliviar espasmos bronquiales en asma, constipación debido a espasmos intestinales y como midriático.¹ Así también, debido a que el sistema parasimpático provoca el incremento en la secreción glandular, los alcaloides de la tropina se usan para la reducción de las secreciones bronquiales, estomacales, biliares y pancreáticas.^{1,25}

La *hiosciamina* es usada en patologías motrices; el uso de la escopolamina actúa de forma similar, sin embargo la escopolamina, tiene un efecto sedativo mucho mayor en el Sistema Nervioso Central (SNC), por tales motivos, varios siglos atrás, las drogas tropanicas eran utilizadas como sedantes, particularmente en el dolor de muelas.^{1,25}

Los alcaloides tropanicos, ejercen una estimulación en el SNC en pequeñas y medianas dosis, mientras que largas dosis causan intoxicación con alucinaciones, frenesí, luego somnolencia, y finalmente parálisis del sistema respiratorio.^{1,25} Es por tal motivo que en la antigüedad las drogas de esta familia eran utilizadas como agentes intoxicantes (pociones de amor, ungüentos en brujería, inductores de locura temporal).^{1,25}

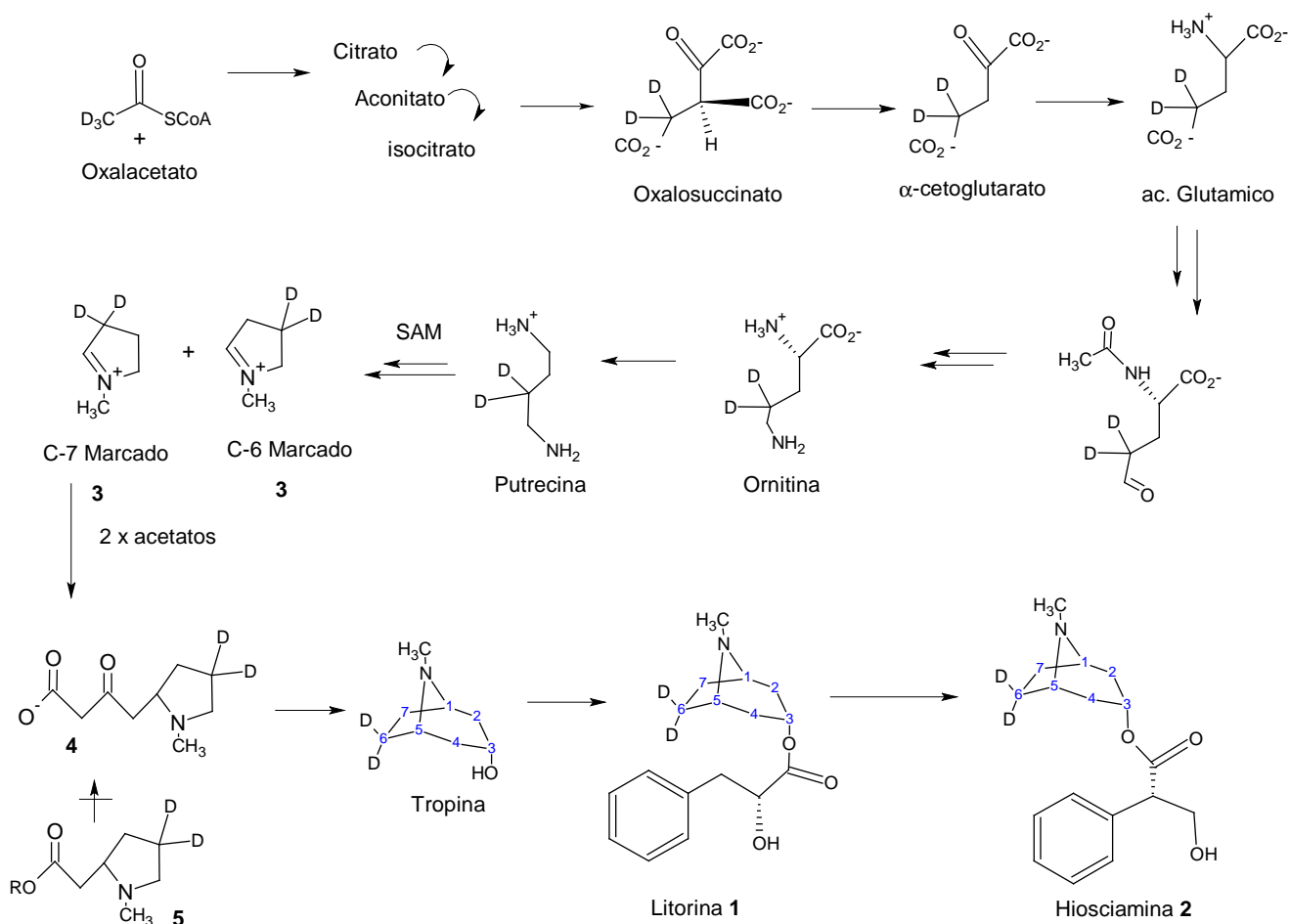
La atropina, como la escopolamina, es una amina terciaria lípido soluble capaz de atravesar la barrera hematoencefálica y ejercer algunos efectos sobre el SNC. La vida media de eliminación de la atropina es de 2.3 horas, con solo el 18% de la atropina excretada sin cambios. La atropina parece que experimenta hidrólisis en plasma con la formación de metabolitos inactivos de ácido tropico y tropina. La duración de acción es de 45 minutos a 1 hora cuando es dada por vía intramuscular o SC, y menos cuando es dada por vía IV.^{1,2,4,25}

3.3.3 BIOSÍNTESIS.

La biosíntesis de los alcaloides con anillos tropanicos como Litorina **1** y hiosciamina **2** ha atraído mucho la atención durante varios años.^{9,14,25,27} El origen del esqueleto de los anillos de tropano es reconocido hoy en día por surgir de aminoácidos como ornitina y metionina, y compuestos más sencillos como acetatos.^{9,14}

El proceso inicia cuando la ornitina es convertida en putresina y esta a su vez en *N*-metil-putresina por la acción de la *N*-metiltransferasa³³, los cuatro átomos de carbonos C (1), C (5), C (6) y C (7) y el átomo de nitrógeno derivan del Ion *N*-metil- α^1 -pirrolato **3**; el grupo *N*-metilo deriva del grupo metilo de la metionina vía *S*-adenosilmetionina (SAM), los tres átomos restantes C (2), C (3) y C (4) son integrados por los acetatos.^{9,11,27,33} (Esquema 1) Sin embargo los detalles su incorporación aun no son claros. A la fecha el único precursor incorporado exitosamente al esqueleto del anillo tropanico es **4**.^{9,14} Claramente **4** podría surgir como la condensación de acetoacetato con **3**, o alternativamente por dos condensaciones secuenciales de acetato/malonato con **3**.⁹ Finalmente la Litorina **1** es transformada en hiosciamina **2** por una isomerización de su ester (R)-fenilactato. Este tipo de rearrreglo de la cadena de carbono encuentra su precedencia en la isomerización mediada por la coenzima B₁₂ en donde es bien sabido que las isomerizaciones son acompañadas de un proceso de intercambio vicinal, donde el átomo de hidrógeno y el grupo funcional que migra, intercambian lugares en los átomos de carbono adyacentes.¹⁷ Sin embargo estudios recientes hacen alusión a que el proceso de intercambio vicinal solo ocurre en proporción mínima mientras que un sistema aun no especificado de oxidación *in vivo* es el verdadero responsable del paso de Litorina **1** a Hiosciamina **2**.¹⁷

Por otra parte la incorporación fallida de **5** (en situaciones en que **4** se logro incorporar), muestra que la incorporación de los acetatos no es secuencial,⁹ por lo que podemos suponer que lo que se une a **3** es acetoacetato y no dos acetatos.



Una cuestión de importancia es el establecimiento de la regulación biosintética de los alcaloides debido a que en las fases tempranas del proceso, la putresina es compartida en el metabolismo de poliamidas y la síntesis de alcaloides.^{11,27,29} SAM *N*-metiltransferasa es la enzima involucrada en la remoción de los precursores de la putresina del medio, consecuentemente provocar el desvío del proceso hacia la producción de alcaloides.^{11, 27,29}

De igual manera, el proceso se ve afectado por la acción de dos enzimas que actúan en la conversión de tropinona a tropina y pseudotropina; La TR I y la TR II actúan reduciendo la tropinona en tropina y pseudotropina respectivamente, sin embargo existen serias diferencias en cuanto a su funcionamiento, siendo más notorio en esto en la TR I, la cual es notoriamente dependiente del pH del medio y

presentando un máximo de acción en un reducido rango alrededor de pH 6.4; por otra parte la TR II presenta un 90% de acción en un rango que va de 5.2 a 8.2 teniendo un máximo a 6.4. La relación de acción de las dos enzimas parece ser de 10:1 y en algunos casos de 20:1, por lo que el metabolismo tiende a la formación de tropina y subsecuentemente compuestos como hiosciamina y escopolamina, mientras que un porcentaje que tiende a pseudotropina termina en la producción de calisteginas.^{30,31}

A pesar de que la encima Putrecina SAM *N*-metiltransferasa manifiesta altos niveles de actividad, aun mas que la descarboxilación de arginina y ornitina, produciendo en algunos casos agotamiento de sustrato, presenta un factor regulador, debido a que es extremadamente sensible a la presencia o ausencia de calcio proveniente del sustrato de crecimiento.¹¹ Siendo así el caso de que la producción de alcaloides totales en la planta es reducida y casi anulada en suelos pobres o con ausencia de calcio.^{11,29}

En la sección 3.1.2, se menciona que las aminas primarias suelen ser venenosas para las plantas¹, es por tal motivo que la planta posee sistemas de desintoxicación lo cuales consisten principalmente en enzimas con capacidad oxidante, lo que produce una ruptura del enlace éster de las estructuras tropánicas.¹¹

3.4 Métodos de Análisis

En la actualidad existen una variedad de métodos analíticos para la detección de alcaloides derivados del tropano, dichos métodos incluyen acoplamiento de sistemas de separación con sistemas de detección, tal es el caso de la Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (CLAE), la Cromatografía de Gases (CG) y en algunos casos la Cromatografía en Capa Fina (CCF)^{8,19}, acoplados a sistemas como Detección Fósforo Nitrógeno (DFN), Detector de Ionización de Flama (DIF), Detector de Arreglo de Diodos o Fotodiodos (DAD), Ultravioleta (UV), Infrarrojo (IR), Resonancia Magnética Nuclear (NMR) etc.^{8,10,19,27}

Dada la gran cantidad de analitos presentes el metabolismo de las Solanaceae es necesario una revisión de los actuales y más recientes sistemas para la detección de alcaloides tropánicos. Es por tanto que se hará referencia a métodos publicados y cuyo valor se aprecie para fines prácticos de nuestra temática.

3.4 Métodos de Análisis

En la actualidad existen una variedad de métodos analíticos para la detección de alcaloides derivados del tropano, dichos métodos incluyen acoplamiento de sistemas de separación con sistemas de detección, tal es el caso de la Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (CLAE), la Cromatografía de Gases (CG) y en algunos casos la Cromatografía en Capa Fina (CCF)^{8,19}, acoplados a sistemas como Detección Fósforo Nitrógeno (DFN), Detector de Ionización de Flama (DIF), Detector de Arreglo de Diodos o Fotodiodos (DAD), Ultravioleta (UV), Infrarrojo (IR), Resonancia Magnética Nuclear (NMR) etc.^{8,10,19,27}

Dada la gran cantidad de analitos presentes el metabolismo de las Solanaceae es necesario una revisión de los actuales y más recientes sistemas para la detección de alcaloides tropanicos. Es por tanto que se hará referencia a métodos publicados y cuyo valor se aprecie para fines prácticos de nuestra temática.

3.4.1 CLAE: Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia

También conocida como HPLC (High Performance Liquid Chromatography), es uno de los métodos de separación más utilizados hoy en día. Entre los métodos documentados para la determinación cuantitativa y cualitativa de alcaloides tropanicos encontramos los siguientes.

Metodo I

1. Se propone un método para el análisis simultáneo de hiosciamina, escopolamina, 6β-hidroxihiosciamina y apoatropina por CLAE de fase inversa.¹⁰

a. Reactivos:

l-hiosciamina, escopolamina HBr•3H₂O y apoatropina, fueron obtenidos de Merck Alemania, hidroxihiosciamina fue obtenida de Hangzhou Drug Inc. China, Acetonitrilo y metanol grado CLAE fueron obtenidos de Carlo Erba, Italia, agua purificada a través de una membrana Millipore Milli-QTM 5 obtenida de USA.

b. Extracción de los Alcaloides:

Un liofilizado y pulverizado de material vegetal (200-500 mg) fue extraído inicialmente con 25 mL y tres lavados mas de 20 mL con una solución de cloroformo-metanol-hidróxido de amonio concentrado (15:5:1, v/v/v) en sonificador a $27\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ por lapsos de 10 minutos cada uno. Cada fracción fue filtrada en vacío con papel filtro. Se reunieron las fracciones y el total fue secado sobre Na_2SO_4 (1.0 g) y evaporada a hasta sequedad por presión reducida a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$.

c. Preparación para Extracción en Fase Sólida:

Se Usaron columnas superlimpias LC-18 (500 mg, 3 mL) distribuidas por Supelco Inc. USA. Las muestras fueron disueltas en 1.25 mL de metanol, disuelto con 3.75 mL de solución amortiguadora de fosfatos 8.0 (0.053 x 30 mM/0.947 x 30 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$, y homogenizadas por sonicación. Después de una centrifugación a 6000 rpm por 10 minutos, el sobrenadante fue cargado en una microcolumna con fase estacionaria de octadecilo, activada previamente con metanol (5 mL), seguido de agua bidestilada (5 mL) y solución amortiguadora de fosfatos 30 mM pH 8.0 (5 mL). El soporte es entonces, lavado con 2.5 mL de la solución metanol- 3 mM sol. Amortiguadora de fosfatos pH 8.0 (25:75, v/v) y 2.5 mL de agua para remover la matriz. Cuando la solución haya pasado a través de la columna, se seca la columna con vacío aplicado en la salida de la columna. Los alcaloides tropanicos son eludíos con 1 mL de TFA al 2%, seguido de 7.5 mL de metanol 0.2% en TFA-agua (98:2, v/v), con un flujo de 0.5 mL/min. Las muestras fueron llevadas a un volumen final de 10 mL con metanol

d. Exámenes de Recuperación.

d.1 Solución Estándar.

Se preparó una solución estándar conteniendo hiosciamina, escopolamina, 6β -hidroxihiosciamina y apoatropina (400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de cada uno) en metanol. La solución fue disuelta cuatro veces en solución amortiguadora de fosfatos (30 mM; pH 8.0); alícuotas de 5.0 mL fueron sometidas al proceso (c.). Para la solución estándar, la recuperación fue calculada como el porcentaje de la cantidad aplicada inicialmente en la fase estacionaria.

d.2 Muestras Fortificadas.

Seis muestras idénticas de extracto seco de raíz fueron preparadas correspondientes cada una a 250 mg de material vegetal. 3 muestras fueron disueltas en 1.25 mL de metanol y 3 mas fueron disueltas en 1.25 mL de la solución estándar, ambos grupos fueron disueltos en 3.73 mL de solución amortiguadora de fosfatos (30 mM; pH 8.0). Después de una homogenización se someten a ambos grupos de muestras al procedimiento (c.). El índice de recuperación (R) fue calculado de la siguiente forma:

$$R = 100(C_{\text{encontrado}} - C_{\text{inicial}}) / C_{\text{agregado}}$$

e. Eficiencia de la extracción.

El acompletamiento de la extracción fue determinado seis extracciones sucesivas de raíz de *D. innoxia* (500 mg). Las cuatro primeras extracciones fueron obtenidas siguiendo el protocolo descrito en el inciso (c.). Las dos extracciones sucesivas fueron realizadas usando 20 mL de solvente por 10 minutos. Solo pequeñas cantidades de alcaloides fueron detectadas en el quinto extracto: 2.4% ($\pm 0.5\%$, $n=3$) 6 β -hidroxihiosciamina, 0.5% ($\pm 0.2\%$, $n=3$) de escopolamina y 1.2% ($\pm 0.2\%$, $n=3$) de hiosciamina. Apoptropina no detectada. Los resultados fueron expresados como porcentajes del contenido de alcaloides medidos en la mezcla de las cuatro primeras extracciones. No se detecto ningún analito en el sexto extracto.

f. Condiciones del aparato.

Los análisis de CLAE fueron realizados en un sistema Surveyor (Termo Finnigan USA) consistente en una bomba cuaternaria con degasificador de vacío integrado. Un detector de Arreglo de Foto-Diodos (AFD) y un muestreador. La separación se desarrollo en una columna Phenomenex Luna C₁₈ de fase inversa de 5 μm (250 cm x 4.6 cm de D.I.), acoplada a una columna de seguridad C₁₈ (8 mm x 3 mm de D.I.). La temperatura de la columna fue de 30 $^{\circ}\text{C}$. El volumen de la inyección, fue de 5 μL . la fase móvil consistía de acetonitrilo-metanol-solución amortiguadora de fosfatos 30 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-K}_2\text{HPO}_4$ (815:185, g/g) pH 6.0 (12:7.9:80.1, v/v/v). La velocidad de flujo fue de 1.0 mL/min. Los picos fueron identificados por adición estándar y detección por arreglo de diodos.

g. solución estándar.

Se preparó una solución estandar conteniendo 20.0 mg de hiosciamina, escopolamina y 6 β -hidroxihiosciamina, además de 10 mg de apoatropina en metanol, todo en un matraz volumétrico. De esta solución, se realizaron series de diluciones a fin de lograr las concentraciones de 16, 40, 80, 120, 200 μ g/mL de hiosciamina, escopolamina y 6 β -hidroxihiosciamina y de 4, 8, 20, 40, 60, 100 μ g/mL de apoatropina. En todas las diluciones, se utilizó Acido Trifluoroacetico (TFA) 0.1% en metanol, almacenadas a 4 $^{\circ}$ C y llevadas a temperatura ambiente antes de su uso.

h. Material vegetal.

Se utilizaron cultivos *in vitro* de *D. Innoxia*. Como medio de soporte se utilizo medio sólido libre de antibióticos MS; sepas de los cultivos para futuras investigaciones en tropanos, fueron conservados en 40 mL de medio MS y cultivadas en un matraz erlen meyer de 100 mL a 24 \pm 1 $^{\circ}$ C.

2.Resultados y discusión

a. Extracción en Fase Sólida:

Fuertes interferencias debido a la matriz de la muestra serian esperadas a longitudes UV bajas (205-210 nm), por lo que el uso de una extracción de fase sólida se vuelve imprescindible, mas aun cuando la extracción con fase sólida retiene y protege a nuestra columna de los denominados mata-columna (column killer). Sin embargo, el uso de una precolumna, produce un aumento notable en la presión y por tanto el ruido en la grafica. En este caso se logró la disminución del ruido utilizando una microcolumna LC-18 y utilizando como solvente para las muestras metanol- 30 mM solución amortiguadora de fosfatos (25:75, v/v; pH 8.0). Mediante el uso de diferentes pH, se aseguro la completa elusión de los alcaloides, reflejándose eso en buenos recuperamientos y reproducibilidad en la fase sólida. (Tabla 2 y 3).

Tabla 2

Monto de recuperación de hiosciamina, escopolamina y 6 β -hidroxihiosciamina y apoatropina, obtenidas en columnas de octadecil usando estándar puros. (500 μ g)

| Compuesto | Encontrado ^a \pm SD (μ g) | % de recuperación. |
|-------------------------------|---------------------------------------------|--------------------|
| Apoatropina | 501 \pm 6.6 | 100.2 |
| 6 β -hidroxihiosciamina | 486 \pm 6.1 | 97.2 |
| Escopolamina | 488 \pm 5.7 | 97.6 |
| Hiosciamina | 484 \pm 4.7 | 96.8 |

Condiciones de la extracción en fase solida, sección 1c.

^a datos de seis análisis

Tabla 3

Monto de recuperación de hiosciamina, escopolamina y 6 β -hidroxihiosciamina y apoatropina, obtenidas en columnas de octadecil usando muestras fortificadas de D. innoxia

| Compuesto | Cantidad iniciala \pm SD (μ g) | Agregado μ g | Encontrado ^a \pm SD (μ g) | % de recuperación. |
|-------------------------------|---------------------------------------|------------------|---------------------------------------------|--------------------|
| Apoatropina | 36 \pm 0.6 | 500 | 504 \pm 7.0 | 93.6 |
| 6 β -hidroxihiosciamina | 784 \pm 20.5 | 500 | 1272 \pm 17.3 | 97.6 |
| Escopolamina | 549 \pm 8.2 | 500 | 1024 \pm 14.2 | 95.0 |
| Hiosciamina | 1494 \pm 13.9 | 500 | 1982 \pm 18.9 | 97.6 |

Condiciones de la extracción en fase solida, sección 1c.

^a datos de seis análisis

2. Optimización del Proceso.

La separación de alcaloides se llevo acabo en una columna Phenomenex Luna new-generation (C₁₈), sin embargo la optimización del sistema se logro modificando varios factores que se enlistan a continuación.

a. Fase móvil.

i. Selectividad del tipo de solvente: Se investigo en columnas C₈ usando como eluyente mezclas de solventes orgánicos y 0.1% TFA en agua. El acetronitrilo brindo buena resolución en los picos, sin embargo, el tiempo de separación para los cuatro picos era relativamente largo (23 min). Por otra parte el metanol produce mala elusión en los picos de escopolamina y apoatropina. Es así que una separación completa de picos se logró utilizando una mezcla de acetronitrilo, metanol y solución amortiguadora de fosfatos 30 mM, pH 8.0 (10.5:7:8.25 v/v/v). El metanol agregado a la fase móvil, ayudo a refinar la posición del pico de la escopolamina y disminuir el tiempo de separación (18.22 min).

ii.pH: La separación de picos se logro además con la adición de solución amortiguadora de acetato de amonio (50 mM) logrando un pH de 6.0. Esto provoco cambio dramático en el tiempo de retención de la escopolamina, pero no afecto notablemente el tiempo de los otros alcaloides debido a sus diferentes pK_a (escopolamina 7.6, 6 β -hidroxihiosciamina ~8.9, hiosciamina 9.7 y apoatropina ~10.0)

b. Selectividad del tipo de columna.

Cambiando el tipo de columna se demostró que la apoatropina y la 6 β -hidroxihiosciamina eran mejor separadas en al columna C₁₈ que en la C₈, por tanto la columna utilizada para posteriores análisis fue la columna C₁₈. Se realizo un ajuste en la fase móvil mencionada en el inciso anterior (12:7.9:80.1 v/v/v, acetonitrilo, metanol y solución amortiguadora de fosfatos pH 6.0) y se realizaron de nuevo las pruebas en columnas C₁₈ y en C₈. Los resultados obtenidos en la C₈, muestran picos muy poco definidos en el caso de la apoatropina y la hiosciamina; por otra parte los picos obtenidos con la misma fase móvil en la columna C₁₈ fueron mucho mas definidos y se mejoro el tiempo de retención de cada alcaloide (apoatropina 9.15 min, 6 β -hidroxihiosciamina 10.6 min, escopolamina 15.07 min y hiosciamina 18.56 min)

c. Aplicaciones.

En el caso de este proceso, una determinación externa a 210 nm de los extractos conteniendo hiosciamina, escopolamina, 6 β -hidroxihiosciamina y apoatropina se realizo para comparar contra los resultados obtenidos en este estudio, obteniéndose resultados positivos.

Los limites absolutos de detección (LAD), fueron fijados en 0.3 ng para la tropina, 0.6 ng 6 β -hidroxihiosciamina y hiosciamina, y 0.8 ng para la escopolamina

3. Conclusiones del analista.

Un nuevo método de CLAE, usando fase móvil libre de agentes iónicos y trietanolamina es descrito para la determinación simultánea de hiosciamina, escopolamina, 6 β -hidroxihiosciamina y apoatropina. Este método es simple y sensitivo. Condiciones de operación simplificadas y una selectividad probada en

particular sobre la escopolamina y 6 α -hidroxihiosciamina, hacen de este método más eficiente para el análisis de alcaloides tropanicos.

Método II

1. Se propone un método para la identificación de atropina y escopolamina por CLAE acoplada a un sistema de detección de arreglo de diodos y espectrometría de masas.²³

a. Reactivos:

(\pm) Atropina (99%), clorhidrato de (-) escopolamina, cloruro de potasio, cloruro de sodio, fosfato monobásico, fosfato dibásico de sodio (>99.5%) fueron obtenidos de Sigma Chemical Company USA. Acetato de amonio (98%) fue obtenido de BDH Laboratory Supplies RU. Ácido clorhídrico (96%) e hidróxido de sodio (25%) fueron obtenidos de Merck Alemania. Acetonitrilo y metanol grado CLAE obtenidos de Romil RU. Agua grado CLAE obtenida por sistema Mili-Q/osmosis inversa de Milipore EUA.

b. Equipo y condiciones:

Un sistema de CALE Waters 2690 equipado con un detector de arreglo de diodos 996. De las columna evaluadas para este proceso (RP-C18, MS-C18 y Fenil) la columna para CLAE Waters Xterra Phenil (150 mm x 2.1 mm, 5 μ m) fue la seleccionada para el proceso. Para asegurar la máxima retención de alcaloides las condiciones cromatográficas iniciales fueron de: acetonitrilo 10% y 90 % de agua conteniendo 10 mM de acetato de amonio, el pH se ajusto a 10.5 con amonio (25%). Después de la inyección inicial las condiciones cromatográficas son gradualmente cambiadas a través de un gradiente lineal hasta obtener un 80% de acetonitrilo y 20 % de la fase acuosa original en un lapso de 20 minutos, el flujo inicial se realiza hasta que la columna se estabilice. El rango del flujo se mantiene en 0.2 mL/min.

c. Límites de detección y limite de cuantificación:

El límite de detección (LDD) y el límite de cuantificación (LDC) son mostrados en la tabla siguiente.

| | | |
|------------------|------------------|-------------------|
| Detector | PDA (200–600 nm) | ZMD (100–400 amu) |
| LOD scopolamine. | 1 mg/ml | 100 pg/ml |

| | | |
|------------------|----------|-----------|
| LOD atropine. | 1 mg/ml | 10 pg/ml |
| LOQ scopolamine. | 10 mg/ml | 1 ng/ml |
| LOQ atropine. | 10 mg/ml | 100 ng/ml |

El LDD fue determinado experimentalmente y fue tomado como la concentración que podía producir una señal del detector que pudiera ser distinguida de la línea basal cuando menos tres veces. El LDC fue tomado como la concentración necesaria para producir una señal del detector 10 veces mayor a la producida por el LDD. Los pobres valores de de LDD y LDC presentados por el detector de arreglo de diodos pueden ser adjudicados a las pobres propiedades cromatográficas de la atropina y la escopolamina. Una curva de calibración fue preparada con un rango de concentración de 100 a 10000 ng/mL. El coeficiente de determinación fue 0.9987 y fue obtenido usando un una curva de algoritmo de segundo orden ($r=0.9987$; $r^2=0.9982$).

Un liofilizado y pulverizado de material vegetal (200-500 mg) fue extraído inicialmente con 25 mL y tres lavados mas de 20 mL con una solución de cloroformo-metanol-hidróxido de amonio concentrado (15:5:1, v/v/v) en sonificador a $27\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ por lapsos de 10 minutos cada uno. Cada fracción fue filtrada en vacío con papel filtro. Se reunieron las fracciones y el total fue secado sobre Na_2SO_4 (1.0 g) y evaporada a hasta sequedad por presión reducida a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$.

d. Preparación para extracción en fase sólida:

Se Usaron columnas superlimpias LC-18 (500 mg, 3 mL) distribuidas por Supelco Inc. USA. Las muestras fueron disueltas en 1.25 mL de metanol, disuelto con 3.75 mL de solución amortiguadora de fosfatos 8.0 (0.053 x 30 mM/0.947 x 30 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$, y homogenizadas por sonificación. Después de una centrifugación a 6000 rpm por 10 minutos, el sobrenadante fue cargado en una microcolumna con fase estacionaria de octadecilo, activada previamente con metanol (5 mL), seguido de agua bidestilada (5 mL) y solución amortiguadora de fosfatos 30 mM pH 8.0 (5 mL). El soporte es entonces, lavado con 2.5 mL de la solución metanol- 3 mM sol. Amortiguadora de fosfatos pH 8.0 (25:75, v/v) y 2.5

mL de agua para remover la matriz. Cuando la solución haya pasado a través de la columna, se seca la columna con vacío aplicado en la salida de la columna. Los alcaloides tropanicos son eludidos con 1 mL de TFA al 2%, seguido de 7.5 mL de metanol 0.2% en TFA-agua (98:2, v/v), con un flujo de 0.5 mL/min. Las muestras fueron llevadas a un volumen final de 10 mL con metanol

e. Exámenes de Recuperación.

d.1 solución Estándar.

Se preparó una solución estándar conteniendo hiosciamina, escopolamina, 6β-hidroxihiosciamina y apoatropina (400 µg/mL de cada uno) en metanol. La solución fue disuelta cuatro veces en solución amortiguadora de fosfatos (30 mM; pH 8.0); alícuotas de 5.0 mL fueron sometidas al proceso (c.). Para la solución estándar, la recuperación fue calculada como el porcentaje de la cantidad aplicada inicialmente en la fase estacionaria.

d.2 Muestras Fortificadas.

Seis muestras idénticas de extracto seco de raíz fueron preparadas correspondientes cada una a 250 mg de material vegetal. 3 muestras fueron disueltas en 1.25 mL de metanol y 3 mas fueron disueltas en 1.25 mL de la solución estándar, ambos grupos fueron disueltos en 3.73 mL de solución amortiguadora de fosfatos (30 mM; pH 8.0). Después de una homogenización se someten a ambos grupos de muestras al procedimiento (c.). El índice de recuperación (R) fue calculado de la siguiente forma:

$$R = 100(C_{\text{encontrado}} - C_{\text{inicial}}) / C_{\text{agregado}}$$

f. Eficiencia de la extracción.

El acompletamiento de la extracción fue determinado seis extracciones sucesivas de raíz de *D. innoxia* (500 mg). Las cuatro primeras extracciones fueron obtenidas siguiendo el protocolo descrito en el inciso (c.). Las dos extracciones sucesivas fueron realizadas usando 20 mL de solvente por 10 minutos. Solo pequeñas cantidades de alcaloides fueron detectadas en el quinto extracto: 2.4% ($\pm 0.5\%$, $n=3$) 6β-hidroxihiosciamina, 0.5% ($\pm 0.2\%$, $n=3$) de escopolamina y 1.2% ($\pm 0.2\%$, $n=3$) de hiosciamina. Apoatropina no detectada. Los resultados fueron expresados como porcentajes del contenido de alcaloides medidos en la mezcla

de las cuatro primeras extracciones. No se detecto ningún analito en el sexto extracto.

g. Condiciones del aparato.

Los análisis de CLAE fueron realizados en un sistema Surveyor (Termo Finnigan USA) consistente en una bomba cuaternaria con degasificador de vacío integrado. Un detector de arreglo de Foto-Diodos (AFD) y un muestreador. La separación se desarrollo en una columna Phenomenex Luna C₁₈ de fase inversa de 5 μm (250 cm x 4.6 cm de D.I.), acoplada a una columna de seguridad C₁₈ (8 mm x 3 mm de D.I.). La temperatura de la columna fue de 30 °C. El volumen de la inyección, fue de 5 μL. la fase móvil consistía de acetonitrilo-metanol-solución amortiguadora de fosfatos 30 mM KH₂PO₄-K₂HPO₄ (815:185, g/g) pH 6.0 (12:7.9:80.1, v/v/v). La velocidad de flujo fue de 1.0 mL/min. Los picos fueron identificados por adición estándar y detección por arreglo de diodos.

h. solución estándar.

Se preparó una solución desandar conteniendo 20.0 mg de hiosciamina, escopolamina y 6β-hidroxihiosciamina, además de 10 mg de apoatropina en metanol, todo en un matraz volumétrico. De esta solución, se realizaron series de diluciones a fin de lograr las concentraciones de 16, 40, 80, 120, 200 μg/mL de hiosciamina, escopolamina y 6β-hidroxihiosciamina y de 4, 8, 20, 40, 60, 100μg/mL de apoatropina. En todas las diluciones, se utilizó Acido Trifluoroacetico (TFA) 0.1% en metanol, almacenadas a 4 °C y llevada s a temperatura ambiente antes de su uso.

i. Material vegetal.

Se utilizaron cultivos *in vitro* de D. Innoxia. Como medio de soporte se utilizo medio sólido libre de antibióticos MS; sepas de los cultivos para futuras investigaciones en tropanos, fueron conservados en 40 mL de medio MS y cultivadas en un matraz erlen meyer de 100 mL a 24 ± 1 °C.

2. Resultados y discusión

j. Extracción en Fase Sólida:

Fuertes interferencias debido a la matriz de la muestra serian esperadas a longitudes UV bajas (205-210 nm), por lo que el uso de una extracción de fase

sólida se vuelve imprescindible, mas aun cuando la extracción con fase sólida retiene y protege a nuestra columna de los denominados mata-columna (column killer). Sin embargo, el uso de una precolumna, produce un aumento notable en la presión y por tanto el ruido en la grafica. En este caso se logró la disminución del ruido utilizando una microcolumna LC-18 y utilizando como solvente para las muestras metanol- 30 mM solución amortiguadora de fosfatos (25:75, v/v; pH 8.0). Mediante el uso de diferentes pH, se aseguro la completa elusión de los alcaloides, reflejándose eso en buenos recuperamientos y reproducibilidad en la fase sólida. (Tabla 4 y 5).

Tabla 4

| Monto de recuperación de hiosciamina, escopolamina y 6β-hidroxi-hiosciamina y apoatropina, obtenidas en columnas de octadecil usando estándar puros. (500 µg) | | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|--------------------|
| Compuesto | Encontrado ^a ± SD (µg) | % de recuperación. |
| Apoatropina | 501 ± 6.6 | 100.2 |
| 6β-hidroxi-hiosciamina | 486 ± 6.1 | 97.2 |
| Escopolamina | 488 ± 5.7 | 97.6 |
| Hiosciamina | 484 ± 4.7 | 96.8 |

Condiciones de la extracción en fase solida, sección 1c.

^a datos de seis análisis

Tabla 75

| Monto de recuperación de hiosciamina, escopolamina y 6β-hidroxi-hiosciamina y apoatropina, obtenidas en columnas de octadecil usando muestras fortificadas de D. innoxia | | | | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|----------------|--------------------------------------|-----------------------|
| Compuesto | Cantidad iniciala ± SD (µg) | Agregado µg | Encontrado ^a ± SD (µg) | % de recuperación. |
| Apoatropina | 36 ± 0.6 | 500 | 504 ± 7.0 | 93.6 |
| 6β-hidroxi-hiosciamina | 784 ± 20.5 | 500 | 1272 ± 17.3 | 97.6 |
| Escopolamina | 549 ± 8.2 | 500 | 1024 ± 14.2 | 95.0 |
| Hiosciamina | 1494 ± 13.9 | 500 | 1982 ± 18.9 | 97.6 |

Condiciones de la extracción en fase solida, sección 1c.

^a datos de seis análisis

4. Optimización del Proceso.

La separación de alcaloides se llevo acabo en una columna Phenmenex Luna new-generation (C_{18}), sin embargo la optimización del sistema se logro modificando varios factores que se enlistan a continuación.

a. Fase móvil.

i. Selectividad del tipo de solvente: Se investigo en columnas C_8 usando como eluyente mezclas de solventes orgánicos y 0.1% TFA en agua. El acetronitrilo brindo buena resolución en los picos, sin embargo, el tiempo de separación para los cuatro picos era relativamente largo (23 min). Por otra parte el metanol produce mala elusión en los picos de escopolamina y apoatropina. Es así que una separación completa de picos se logró utilizando una mezcla de acetonitrilo, metanol y solución amortiguadora de fosfatos 30 mM, pH 8.0 (10.5:7:8.25 v/v/v). El metanol agregado a la fase móvil, ayudo a refinar la posición del pico de la escopolamina y disminuir el tiempo de separación (18.22 min).

ii. pH: La separación de picos se logro además con la adición de solución amortiguadora de acetato de amonio (50 mM) logrando un pH de 6.0. Esto provoco cambio dramático en el tiempo de retención de la escopolamina, pero no afecto notablemente el tiempo de los otros alcaloides debido a sus diferentes pK_a (escopolamina 7.6, 6β -hidroxihiosciamina ~8.9, hiosciamina 9.7 y apoatropina ~10.0)

b. Selectividad del tipo de columna.

Cambiando el tipo de columna se demostró que la apoatropina y la 6β -hidroxihiosciamina eran mejor separadas en al columna C_{18} que en la C_8 , por tanto la columna utilizada para posteriores análisis fue la columna C_{18} . Se realizo un ajuste en la fase móvil mencionada en el inciso anterior (12:7.9:80.1 v/v/v, acetonitrilo, metanol y solución amortiguadora de fosfatos pH 6.0) y se realizaron de nuevo las pruebas en columnas C_{18} y en C_8 . Los resultados obtenidos en la C_8 , muestran picos muy poco definidos en el caso de la apoatropina y la hiosciamina; por otra parte los picos obtenidos con la misma fase móvil en la columna C_{18} fueron mucho mas definidos y se mejoro el tiempo de retención de cada alcaloide (apoatropina 9.15 min, 6β -hidroxihiosciamina 10.6 min, escopolamina 15.07 min y hiosciamina 18.56 min)

c. Aplicaciones.

En el caso de este proceso, una determinación externa a 210 nm de los extractos conteniendo hiosciamina, escopolamina, 6 β -hidroxihiosciamina y apoatropina se realizo para comparar contra los resultados obtenidos en este estudio, obteniéndose resultados positivos.

Los limites absolutos de detección (LAD), fueron fijados en 0.3 ng para la tropina, 0.6 ng 6 β -hidroxihiosciamina y hiosciamina, y 0.8 ng para la escopolamina

5. Conclusiones del analista.

Un nuevo método de CLAE, usando fase móvil libre de agentes iónicos y trietanolamina es descrito para la determinación simultánea de hiosciamina, escopolamina, 6 β -hidroxihiosciamina y apoatropina. Este método es simple y sensible. Condiciones de operación simplificadas y una selectividad probada en particular sobre la escopolamina y 6 β -hidroxihiosciamina, hacen de este método más eficiente para el análisis de alcaloides tropanicos.

3.4.2 CG: *Cromatografía de Gases*.

La CG es otra de las técnicas utilizadas para la separación y análisis de los alcaloides, sin embargo, presenta varias limitantes como el hecho de que a altas temperaturas los alcaloides se descomponen en los inyectores y migran hacia sus bases libres. Este es un fenómeno altamente indeseable ya que los alcaloides tropanicos no son muy volátiles y tienden a la descomposición y deshidratación a altas temperaturas. En casos como la atropina, en donde tiende a deshidratarse a apoatropina en función de la cantidad de fibra de vidrio y la temperatura del inyector, los métodos de CG tienen que ser ajustados para evitar la degradación del analito.⁸

1. Se propone un método para el análisis los alcaloides existentes en material vegetal o en plasma sanguíneo.⁸

a. Extracción de los Alcaloides.

Un extracto ácido acuoso se alcaliniza con carbonato de sodio o amonio a un pH de 10 a 12, para transferir los alcaloides a su forma de bases libres para una extracción con solventes orgánicos e insolubles en agua.

Como alternativa para la extracción líquido-líquido (ELL), se puede usar la extracción en fase sólida (EFS), en este procedimiento un cartucho relleno con una matriz retiene los compuestos lipofílicos mientras que los alcaloides son eluidos con metanol acidulado. A pesar de que la ELL es frecuentemente utilizada, es tediosa comparada con la EFS, ya que en la primera hay una gran posibilidad de pérdida debido a hidrólisis de los alcaloides o una insuficiente extracción debido a la solubilidad en agua. Otro problema son las saponinas existentes en el material vegetal las cuales son difíciles de separar aun con agitaciones fuertes.

En el caso de utilizar una ELL, asegurarse de realizar el procedimiento de modo rápido a fin de evitar la hidrólisis de los alcaloides.

b. Condiciones del Aparato.

Debido a las diferentes situaciones de análisis que se pueden presentar, se presentan cuatro secuencias de procedimiento posibles para el análisis de los alcaloides.

I. Columna 100% dimetil polisiloxano (ej. DB1), este tipo de columna es la más frecuentemente utilizada ya que la mayoría de los compuestos son retenidos en función de su masa molecular.

II. Columna 5% fenil polisiloxano, 95% metil polisiloxano (ej. DB5).

III. Columna 14% cianopropil fenil polisiloxano, 86% dimetil polisiloxano (ej. DB1701).

IV. 50% fenil polisiloxano, 50% dimetil polisiloxano (ej. DB17), esta columna es particularmente útil en la separación de Littorina e hiosciamina, que de otra forma necesitarían una derivatización.

Largo de la columna: 15-20 m, recomendado 25-30 m.

Diámetro interno: 0.32 o 0.25 mm.

Tamaño de poro: 0.1-0.5 μm , recomendado 0.25 μm .

c. Inyección y separación.

I. Inyección fraccionada y con un ratio 1:10-1:50.

II. Para muestras muy diluidas; Inyección sin fraccionar por 10-30 seg, entonces un ratio grande (1:50:1-70) por algunos minutos para prevenir un ensanchamiento de la señal del solvente.

III. Para compuestos que tienden a la descomposición o a ser retenidos en el inyector, ajustar el vaporizador de temperatura programada.

Volumen de inyección: $0.5 \pm 2 \mu\text{m}$, independientemente del tipo de inyección.

Gas acarreador: nitrógeno (no si se usa NPD) o helio.

d. Detector. Limites de detección.

I. Si se utiliza Detección de Ionización de Flama (DIF), $1 \mu\text{m/mL}$ para hiosciamina, $100 \mu\text{m/mL}$ para higrina.

II. Si se utiliza Detección Fósforo Nitrógeno (DFN), $0.2 \mu\text{m/mL}$ para tropinona, $5 \mu\text{m/mL}$ para tropina.

III. Usando CG-MS, 50 pg/mL para escopolamina.

IV. Si se usa DIF $3 \mu\text{m/mL}$ de hiosciamina; con DFN $3 \mu\text{m/mL}$, $1 \mu\text{m/mL}$ de tropinona, $10 \mu\text{m/mL}$ de tropina; CG-MS 200 pg/mL para escopolamina.

Tiempo de análisis: 15 min.

e. Conclusiones del Realizador.

Los métodos mencionados son los sistemas de elección para los estudios de los alcaloides tropanicos y sus metabolitos, ya que tienen como característica principal la baja absorción UV.

Las ventajas del uso de la CG-MS es la alta sensibilidad para casi todos los alcaloides tropanicos. Más aun si existe una buena separación gracias al uso de columnas capilares de alta selectividad, lo que finalmente nos da certeza en los análisis en un tiempo relativamente corto.

7. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Identificar la presencia de los alcaloides de mayor importancia, hiosciamina e hioscina, en la planta del Toloache (*Datura stramonium*), usando una muestra de la planta, preparada bajo un método propuesto y analizada mediante uno de los sistemas mencionados en la literatura.

7. HIPÓTESIS.

Al darle el tratamiento adecuado a la muestra de Toloache, realizando una extracción y empleando técnicas confiables de identificación como el I.R. y GS/MS, se podrá determinar la presencia de los alcaloides hiosciamina y hioscina.

9. METODOLOGÍA.

9.1 Obtención de la Muestra.

Para el desarrollo de las pruebas se utilizó material vegetal fresco de *Datura stramonium* comprado en el mercado de Sonora (Av. Fray Servando Teresa De Mier, Colonia Merced Balbuena, C.P. 15810, Delegación Venustiano Carranza). A fin de obtener un método adecuado se probó con varios sistemas de preparación del material vegetal, por lo que a continuación se enlistan los dos sistemas utilizados para la determinación del contenido de alcaloides.

9.2 Preparación de la Muestra.

- a. Se separaron las hojas y los tallos se colocaron en periódico para absorber el exceso de humedad; después de una noche de reposo, se secaron en un horno convencional a una temperatura de 60 °C hasta la sequedad total. Es importante mencionar que las hojas se secaron en un lapso de aproximadamente 2 horas y media, mientras que los tallos tardaron más de 6 horas en secarse, por este motivo se optó por la utilización únicamente de hojas y de estas solamente las de tamaño mediano por su mayor contenido de alcaloides.¹⁶
- b. En el segundo método propuesto, se utilizó un extractor de jugos para extraer el líquido de los tallos jóvenes de la planta¹⁶, obteniéndose así un líquido verde opaco de olor característico.

9.3 Extracción Y Purificación.

- a. Después de moler las hojas secas hasta un polvo fino, se dejó este polvo remojado en una solución de H₂SO₄ al 0.5 N durante 24 h. Pasadas las mismas se procedió a la separación de la solución ácida y de la materia sólida por método de decantación. Se continuó con la alcalinización de la solución con NaOH al 0.5 N hasta alcanzar un pH 10. Con el uso de un embudo de separación se extrajo el alcaloide con 3 lavados de 20 mL cada uno de cloroformo. Se procedió a una filtración simple con papel filtro de poro grueso convencional para separar el exceso de grasa que es arrastrado con el cloroformo y obtener así un extracto clorofórmico claro y cristalino.

b. Se realizó una filtración simple al líquido obtenido. Se alcalinizó con una solución de NaOH al 0.5 N hasta alcanzar un pH 10. Con el uso de un embudo de separación se extrajo el alcaloide con 3 lavados de 20 mL cada uno de cloroformo. Se procedió a una filtración simple con papel filtro de poro grueso convencional para separar el exceso de grasa que es arrastrado con el cloroformo y obtener así un extracto clorofórmico claro y cristalino.

9.4 Método de análisis.

a. I.R.: Se utilizó un sistema de Infrarrojo de barrido estándar de 4000 a 450 nm. La muestra fue concentrada y aplicada por técnica de película en un portaobjetos de Yoduro de Cesio; se realizó una lectura en un rango de 4000 a 450 nanómetros. Posterior a esto se realizó la comparación del espectro con la biblioteca virtual del aparato.

b. GS/MS: Para este método se diseñó un programa de temperaturas:

| | | |
|----------------------------|-----------------------------------------|-----------------------|
| Temp. i: 100 °C | Velocidad de calentamiento: 20 °C/ min. | |
| Temp. f: 280°C | Tiempo i: 2 min. | Tiempo total: 18 min. |
| T ^{prom.} : 250°C | Tiempo f: 4 min. | |

9.5 Observaciones sobre el proceso.

a. Este sistema fue propuesto inicialmente para el tratamiento de hojas y tallos. Resultó efectivo para el secado de hojas, sin embargo tiene la seria desventaja de la pérdida de alcaloide debido a la degradación por calor. Como se mencionó anteriormente este sistema también nos impide el uso de tallos debido a su alto contenido de agua, siendo esto un gran impedimento ya que otra fuente importante de alcaloides son los tallos jóvenes. En ambos casos el intento de reducir la temperatura para aumentar el rendimiento nos enfrenta al problema de un tiempo de secado excesivo. La característica del alto contenido de agua en los tallos es aprovechada en el segundo sistema propuesto.

b. En este sistema, de los tallos jóvenes, se retira el líquido (el jugo) mediante el uso de un extractor de jugos convencional, siendo evidente la primera ventaja, ya que se puede eliminar la materia vegetal libre de líquidos de inmediato y conservar un líquido con que contiene casi la totalidad de los alcaloides. Como

segunda ventaja de este método es la posibilidad de realizar una extracción líquido líquido el mismo día en que se obtiene el jugo. Finalmente la ausencia de calor para la preparación de la muestra reduce notoriamente la merma de alcaloides.

7. RESULTADOS.

7.1 Extracto vegetal.

Como ya se había mencionado, el método de preparación de muestra "b" del apartado fue el utilizado. Los resultados de su uso fueron evidentemente superiores a los obtenidos del método "a", siendo los criterios de selección observados:

- Se obtuvo una muestra bastante translúcida y cristalina, sin partículas suspendidas, con poca o nada de grasa, y libre de impurezas observables.
- La velocidad de aplicación del método es claramente superior.
- Reducido consumo de recursos.

- Las muestras se encuentran con mucho mejor calidad y cantidad de sustancias buscadas debido a que su tratamiento no incluyó calor, ni sustancias de fuerte álcali o acidez y se redujo el número de extracciones.¹⁻
3,5,8

7.1 Lecturas en IR.

Mediante los métodos mencionados se obtuvieron los siguientes espectros Infrarrojos de la muestra (Espectro 1). Así como la comparación contra su estándar (Espectro 2). Ambos fueron aplicados como extracto cloroformico. En este caso se corrió la muestra contra un estándar de atropina observándose una concordancia entre ambos.

| Picos de IR.1 | | | | | | | | | |
|------------------------------|-------|---------|-------|---------|-------|---------|-------|---------|-------|
| 3369.84 | 44.57 | 3062.46 | 52.30 | 3030.12 | 50.09 | 2926.61 | 3.15 | 2854.94 | 15.93 |
| 1727.79 | 5.06 | 1649.86 | 76.50 | 1601.86 | 74.28 | 1583.87 | 79.67 | 1493.85 | 60.07 |
| 1455.13 | 33.71 | 1377.59 | 30.68 | 1269.73 | 22.37 | 1221.65 | 31.79 | 1194.92 | 30.90 |
| 1169.77 | 20.91 | 1139.07 | 39.64 | 1117.24 | 50.73 | 1065.65 | 24.95 | 1033.92 | 12.3 |
| 973.63 | 64.14 | 921.40 | 81.85 | 895.14 | 90.88 | 855.55 | 81.78 | 834.28 | 92.84 |
| 810.19 | 79.84 | 767.14 | 64.99 | 733.23 | 53.34 | 699.89 | 39.83 | 664.37 | 81.88 |
| 58.53 | 89.62 | 535.32 | 80.01 | | | | | | |
| Picos de IR.2 (Std vs. Mtra) | | | | | | | | | |
| 3404 | 3074 | 3054 | 3030 | 2990 | 2960 | 2920 | 2884 | 2860 | 2843 |

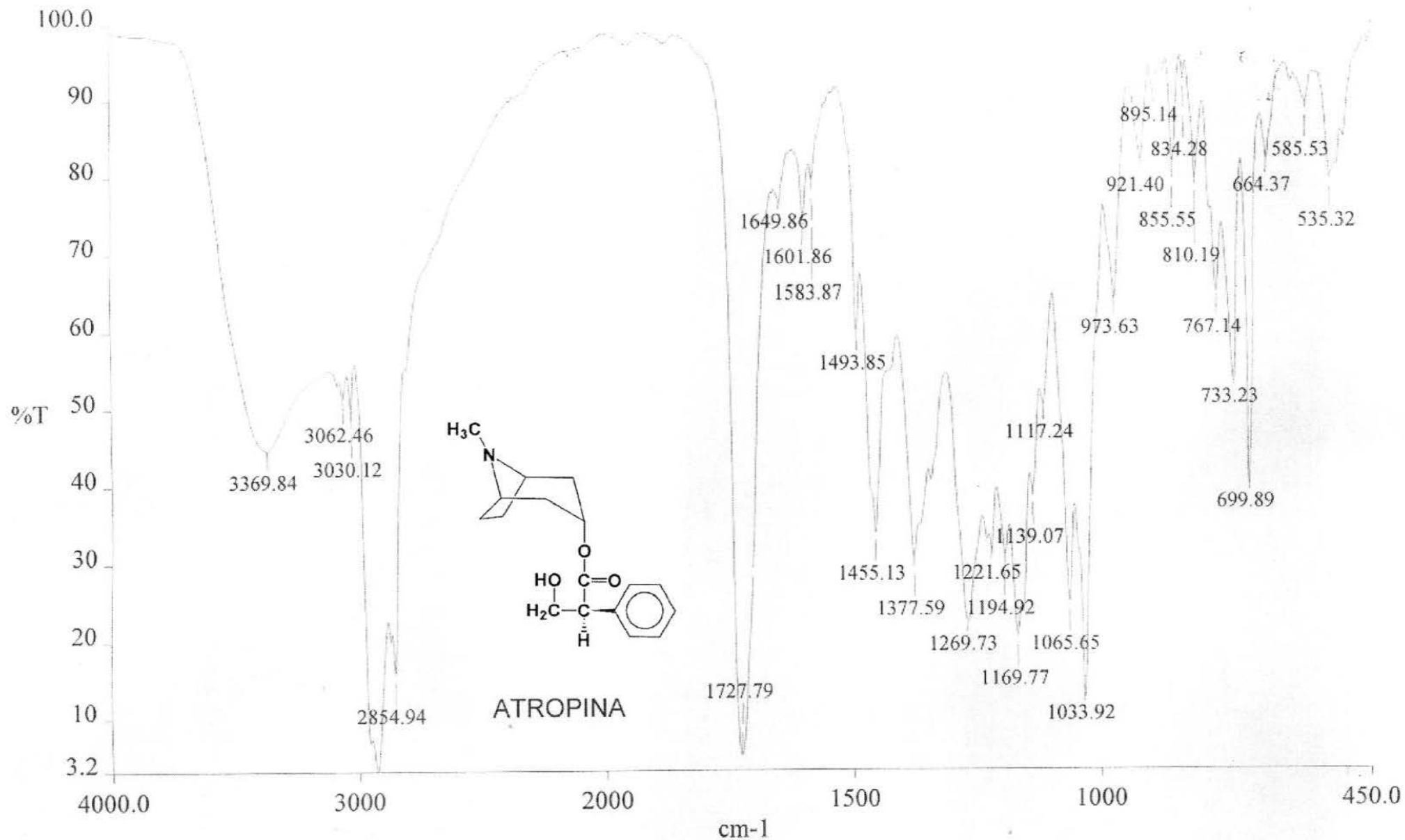
| | | | | | | | | | |
|--------------------------------------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 2800 | 2750 | 2704 | 2664 | 2620 | 2590 | 2554 | 2504 | 2460 | 1735 |
| 1600 | 1495 | 1475 | 1455 | 1430 | 1395 | 1380 | 1365 | 1350 | 1335 |
| 1025 | 1015 | 970 | 945 | 920 | 850 | 815 | 775 | 730 | 700 |
| 675 | 665 | 590 | 535 | 520 | 505 | 425 | | | |
| Tabla en donde se muestran los resultados obtenidos con I.R. | | | | | | | | | |

7.1 Lecturas en Masas.

Mediante el sistema de separación y detección CG-MS obtuvieron los siguientes espectros. En los espectros 3 y 4 se observan los primeros intentos de lectura de la muestra, observándose en ambos un empalme de los picos principales por lo que después de un par de ajustes en la velocidad de flujo de la muestra se logra una separación de los picos. Ya en el caso del espectro 5 se pueden observar bien definidos los picos de tres sustancias de bastante abundancia en la muestra. Los espectros 6 y 9 nos muestran el desglose del primer pico, con tiempos de retención de 7.904 y 7.944 min. Respectivamente, y a través de la espectroscopia de Masas, se muestra en comparación con su el estándar designado por el sistema, pudiéndose determinar que se trata de anhidroatropina o también conocida como apopatropina. Los espectros 7 y 10 muestran el segundo pico con tiempo de retención de 8.896 y 8.984 min. Respectivamente los cuales al ser comparados con la base de datos muestra ser atropina. En el caso de los espectros 8 y 11, con tiempo de retención de 9.521 y 9.505 min, al ser comprados con la base de datos muestran ser escopolamina.

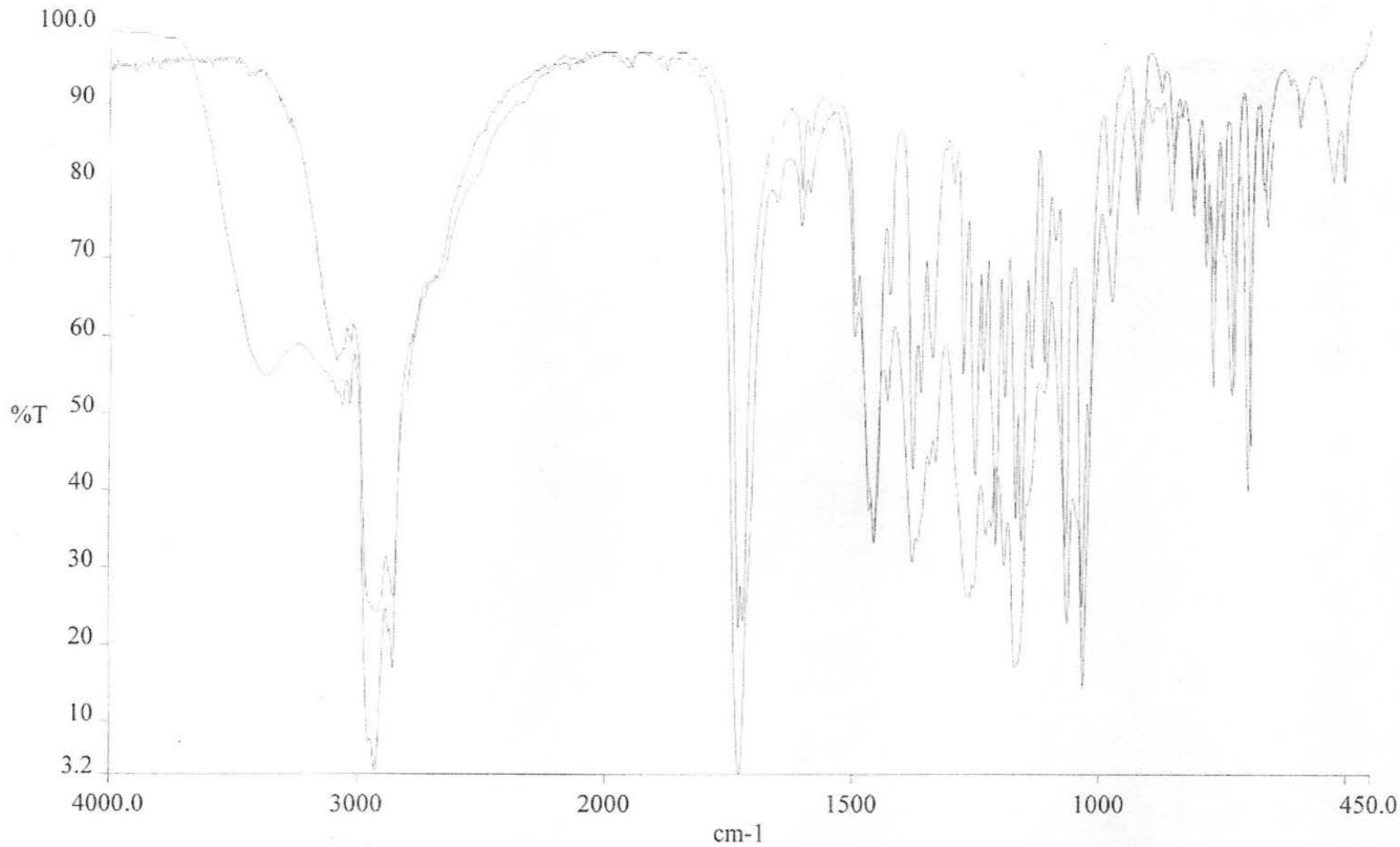
En esté punto es de importancia mencionar que ningún espectro fue modificado de alguna forma y que se obtuvieron digitalizando documentos originales, que debido a su naturaleza confidencial, se les retiraron logos de la institución.

Finalmente solo analizamos los espectros ya obtenidos y agregamos nombres a los picos ya determinados, obteniendo así el espectro 12. En el caso de los Espectros 3 y 4 la espectroscopia de masas ha determinado y asignado el resultado del análisis obteniendo así los Espectros 13 y 14, aunque nuevamente se aprecia que se mantienen los tiempos de retención para los tres compuestos principales.



EXTRACTO CLOROFORMICO.pk

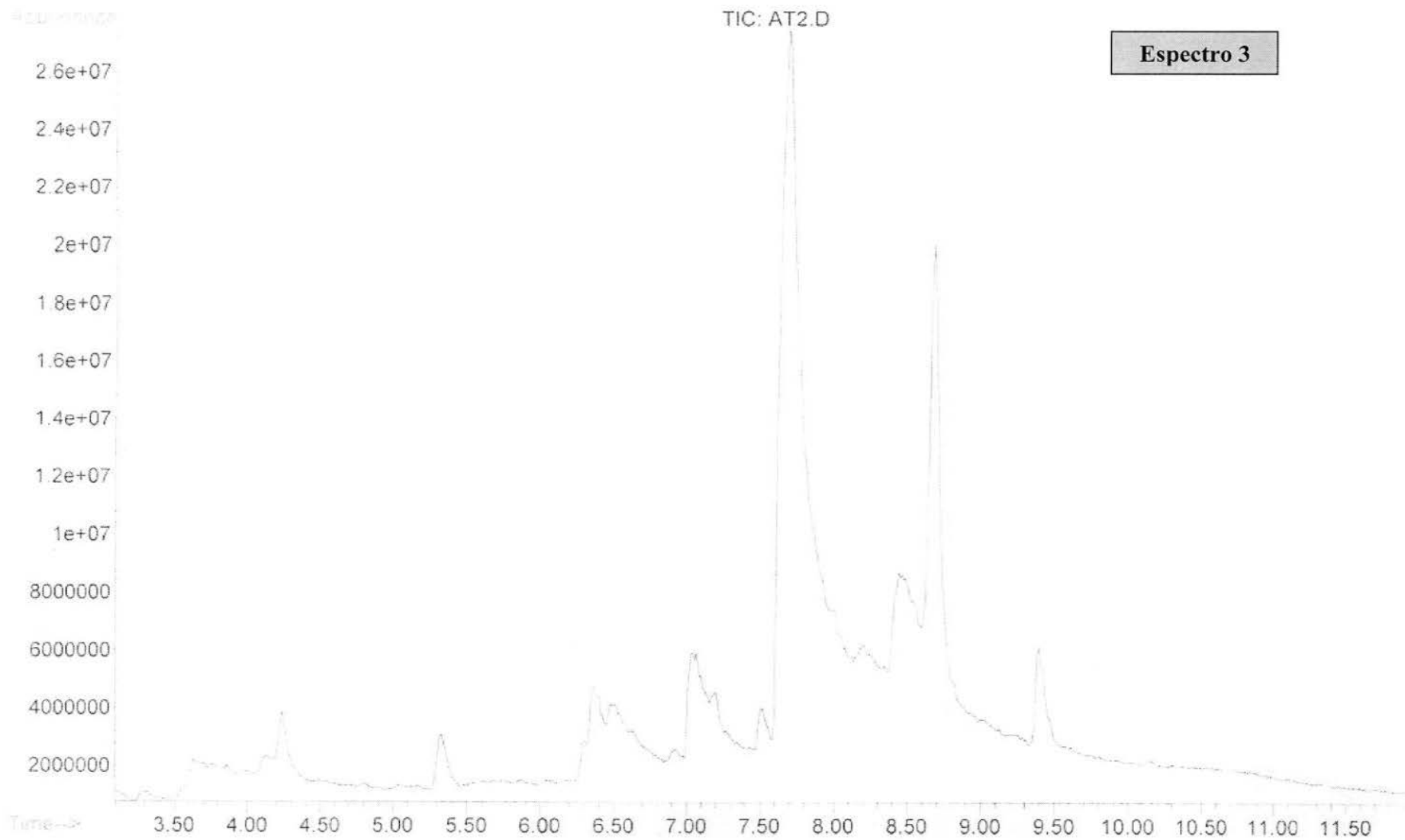
EXTRAC~3.SP 3551 4000.00 450.00 3.16 100.00 4.00 %T 1 1.50

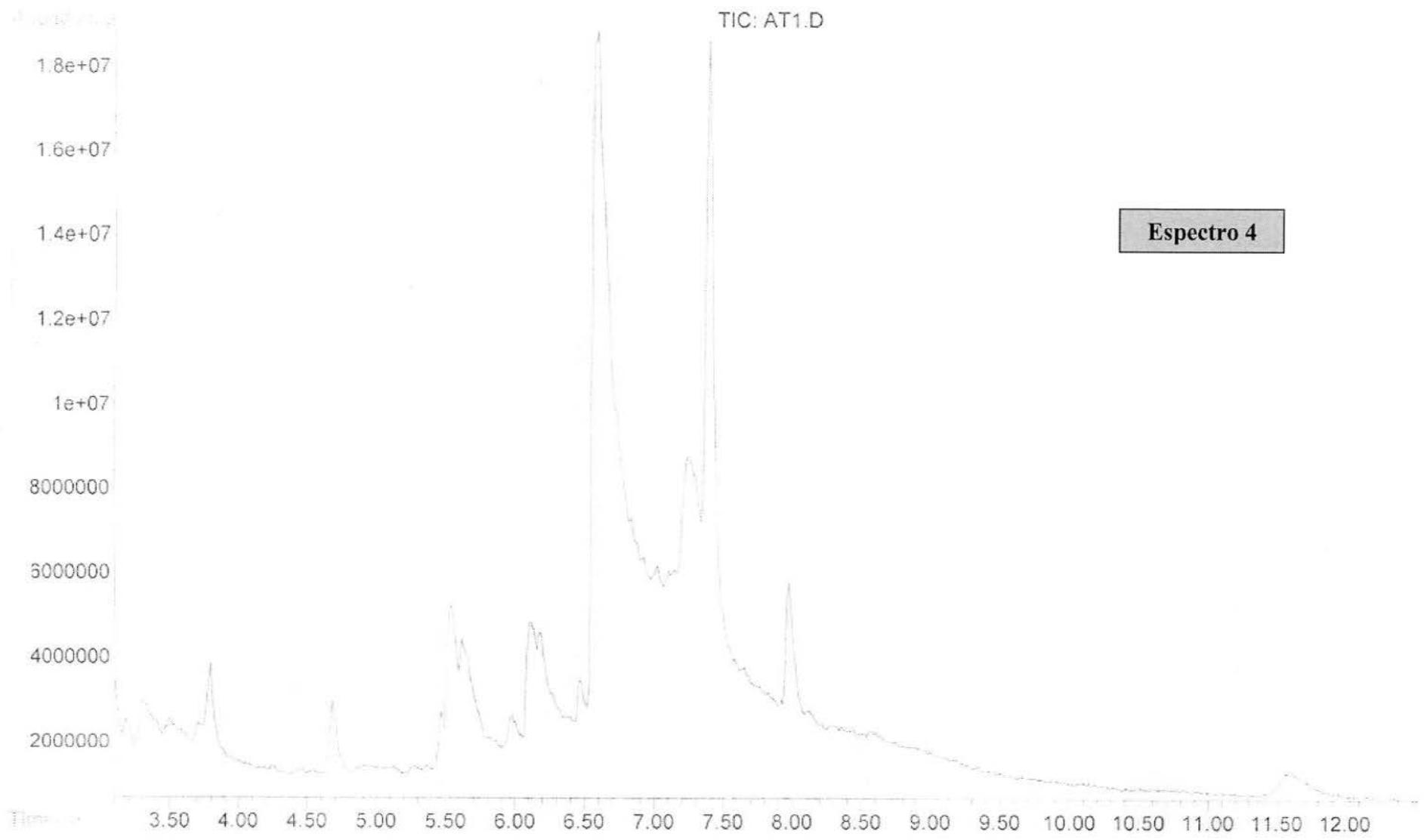


EXTRACTO CLOROFORMICO.pk

EXTRAC~3.SP 3551 4000.00 450.00 3.16 100.00 4.00 %T 1 1.50

Espectro 2

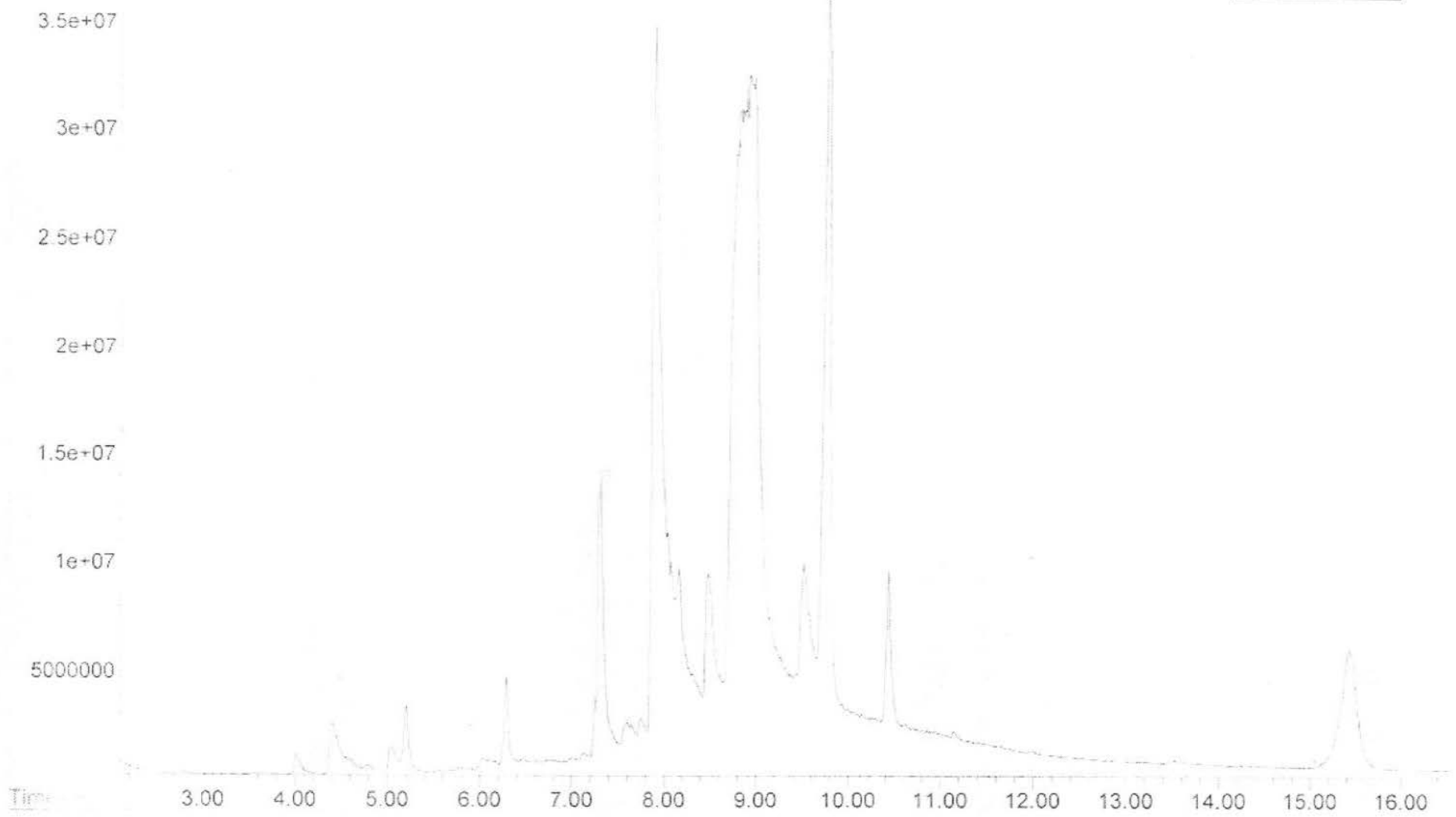




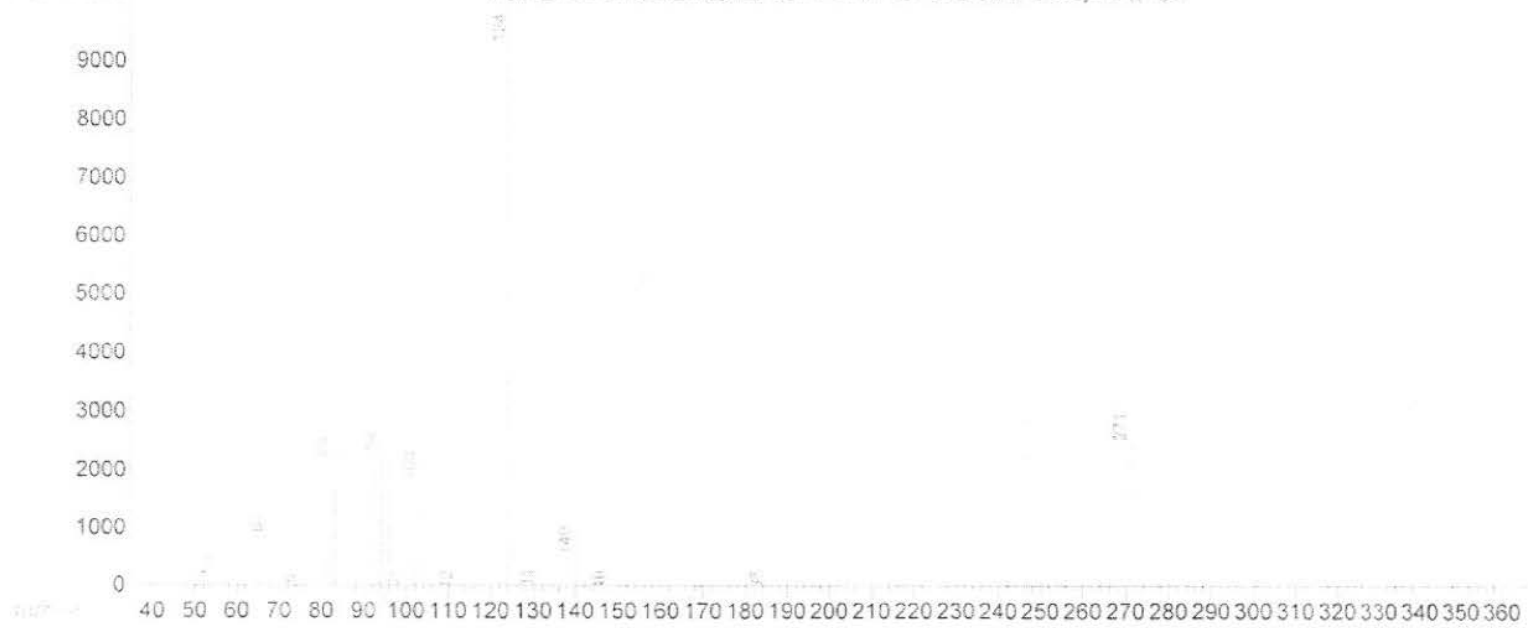
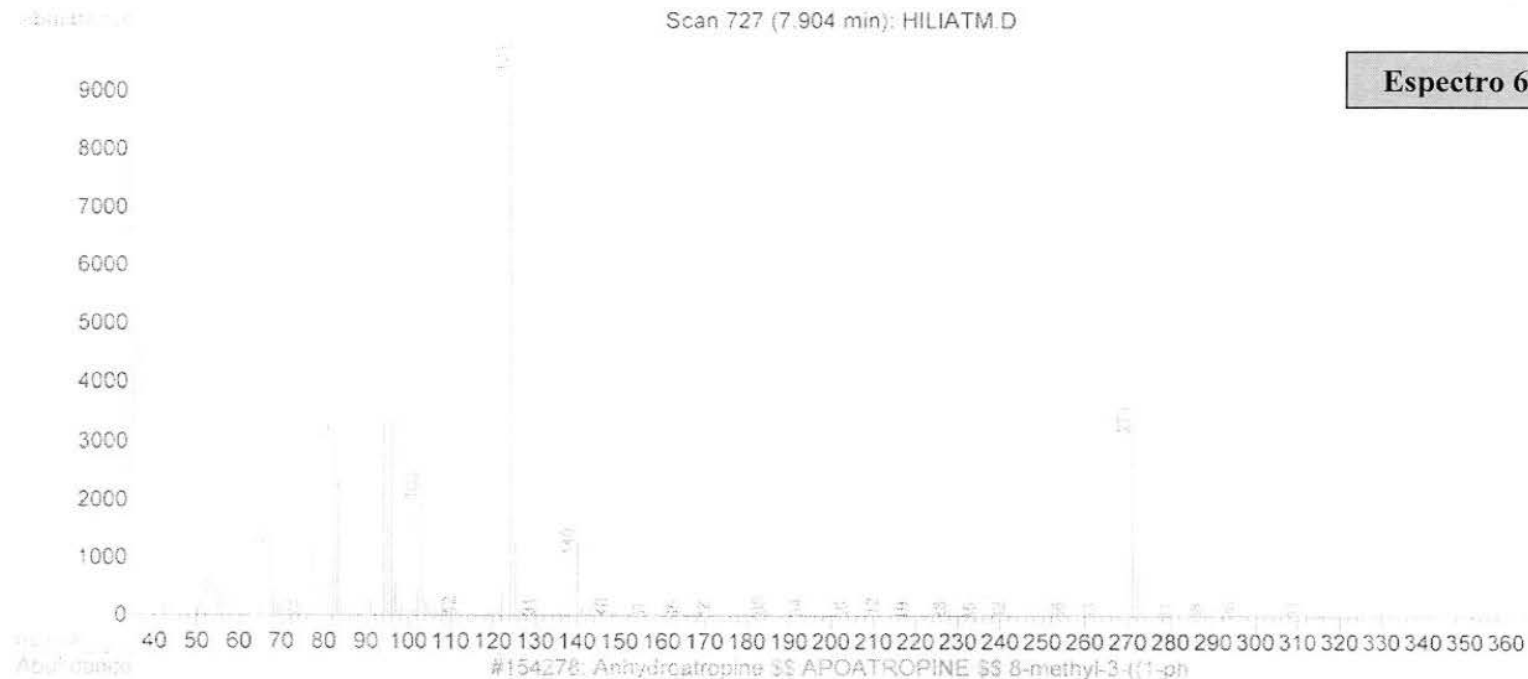
ADP: HON

TIC: HILIATM.D

Espectro 5

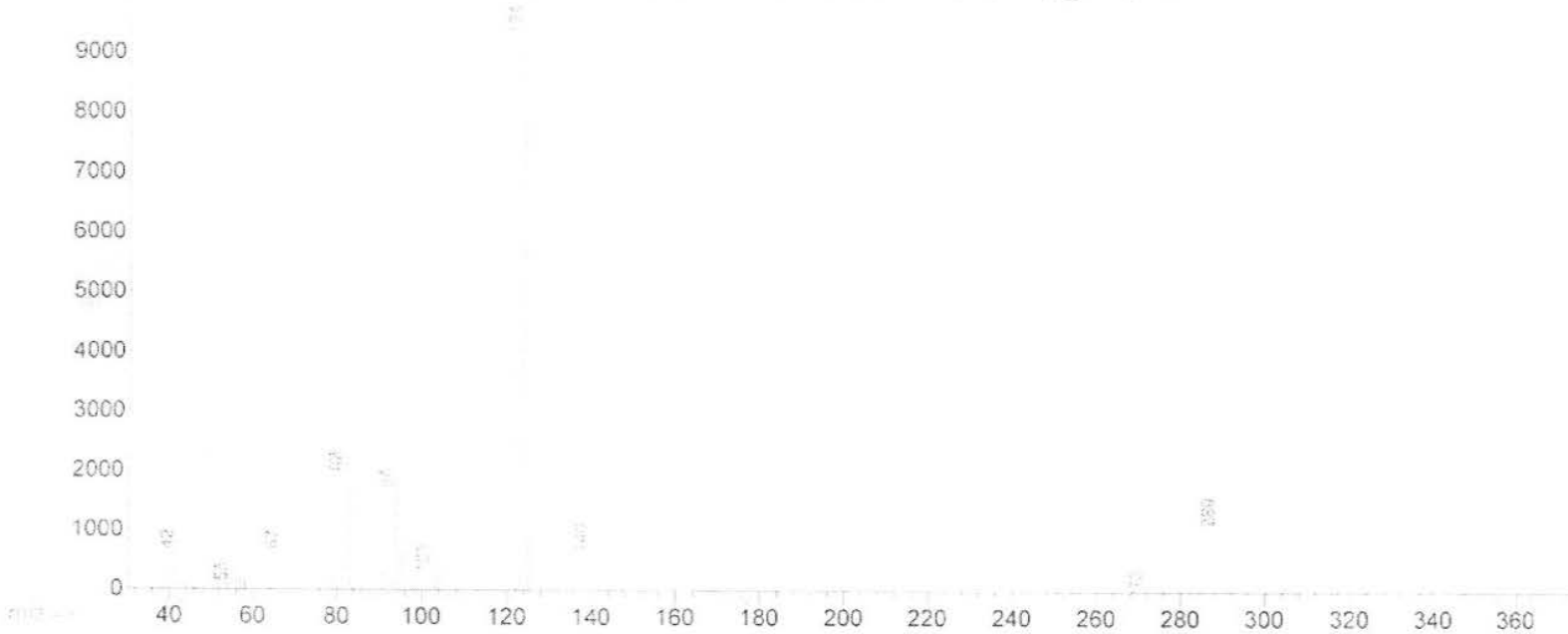
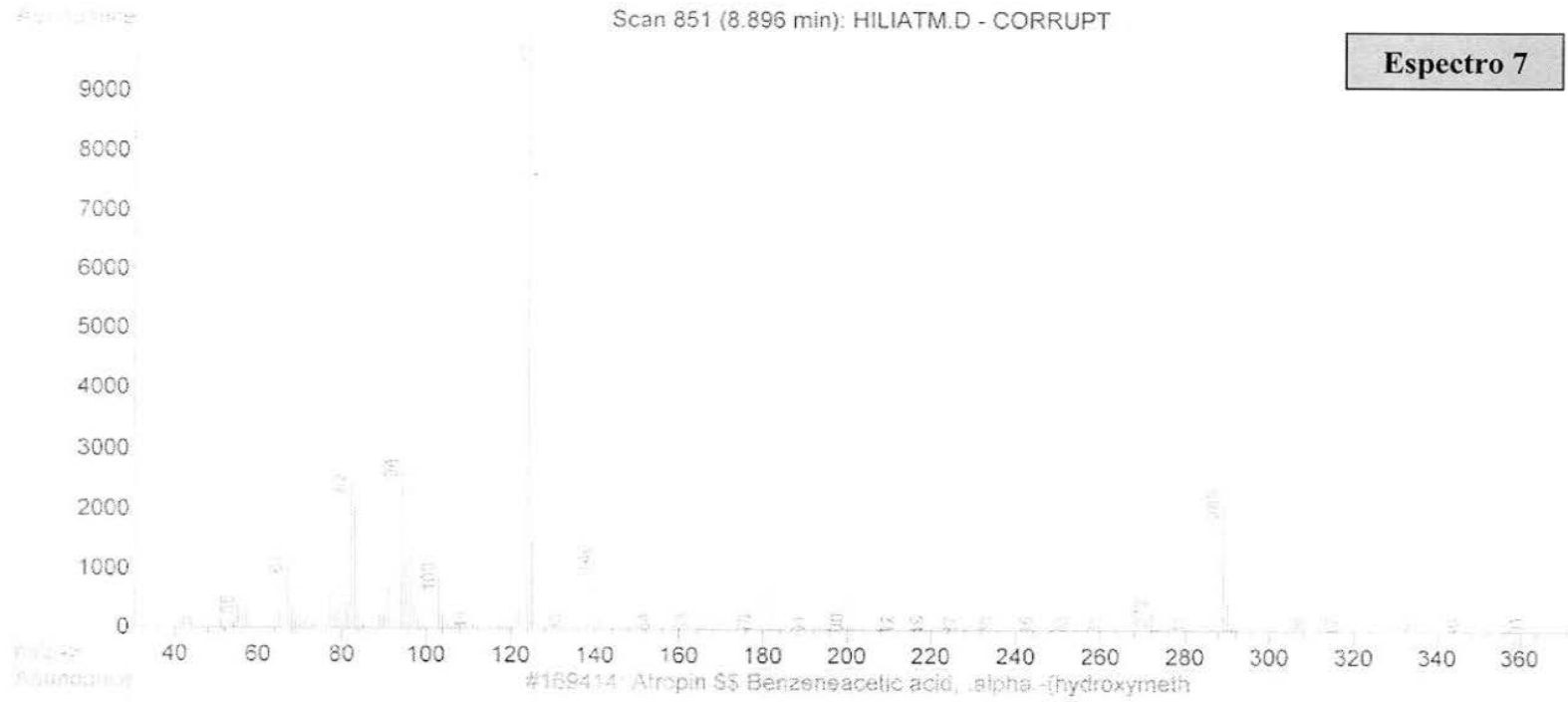


Espectro 6



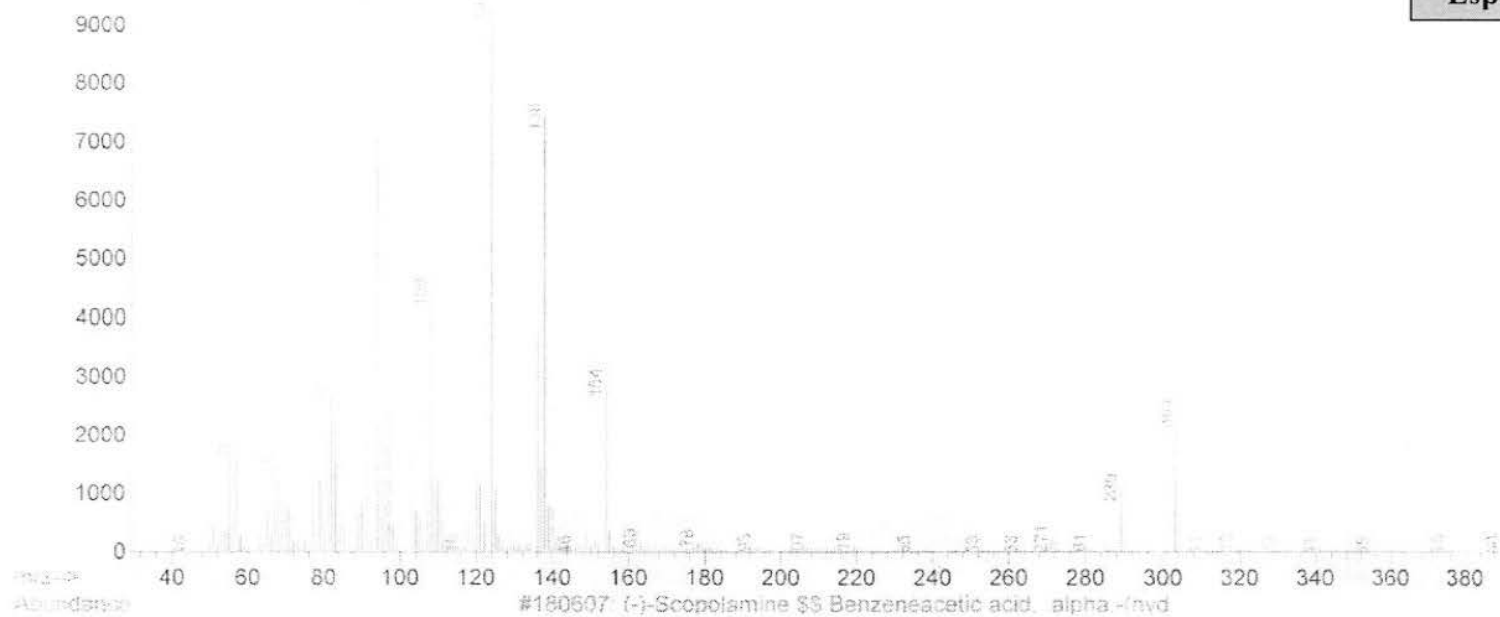
Scan 851 (8.896 min): HILIATM.D - CORRUPT

Espectro 7

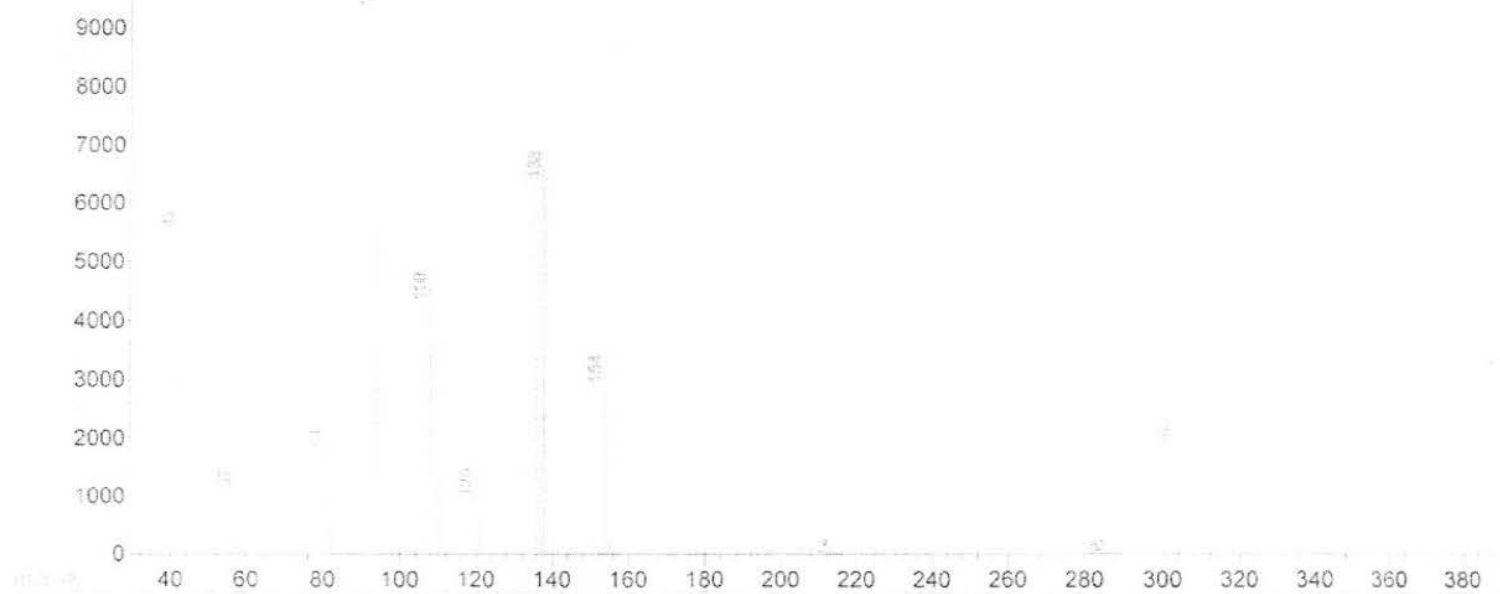


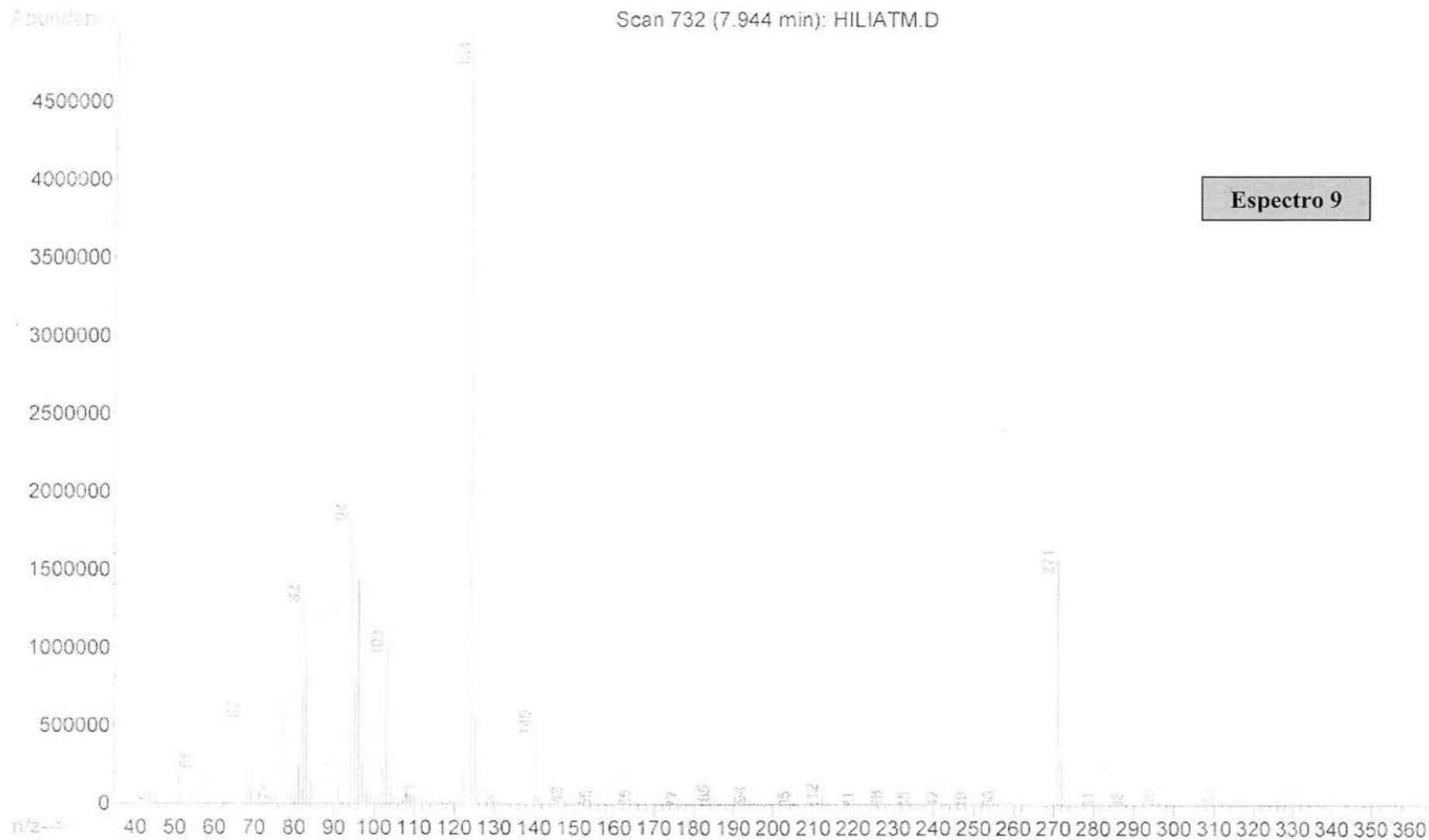
Scan 929 (9.521 min): HILIATM.D

Espectro 8



#180607 (-)-Scopolamine \$\$ Benzeneacetic acid, alpha-(hyd

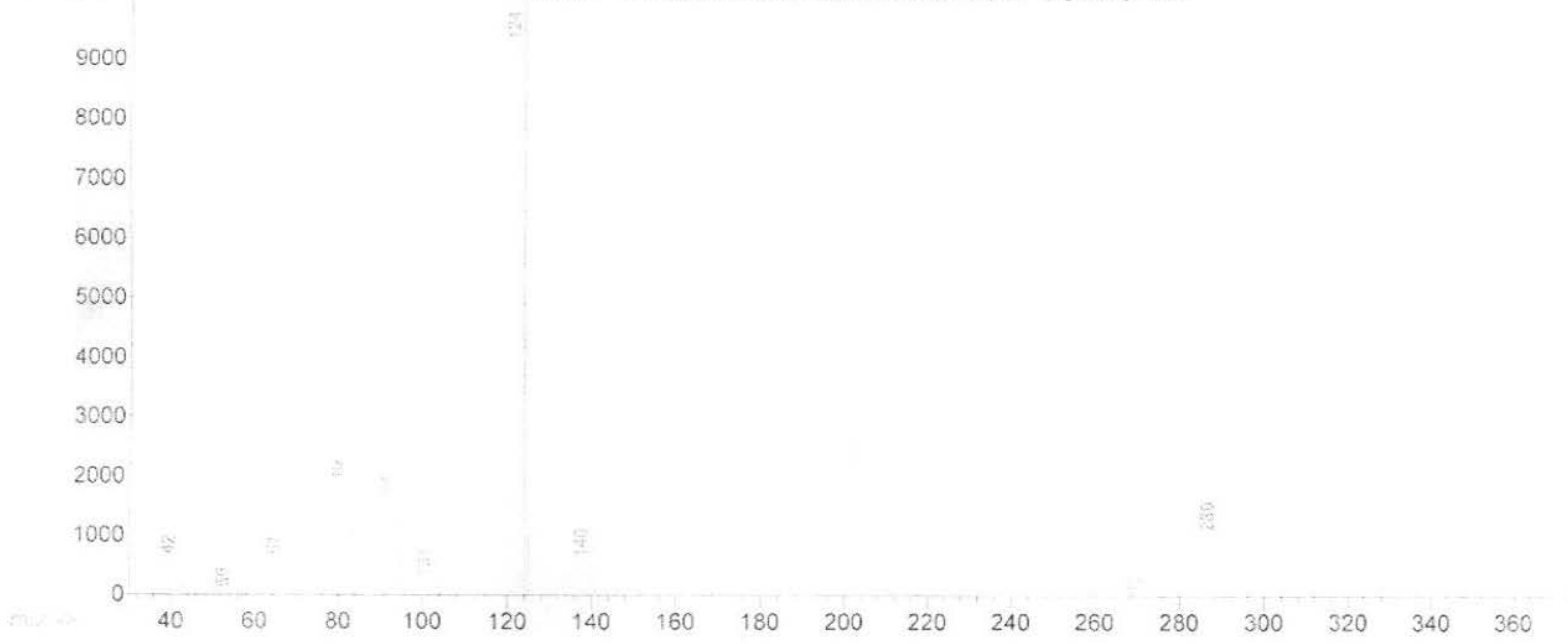
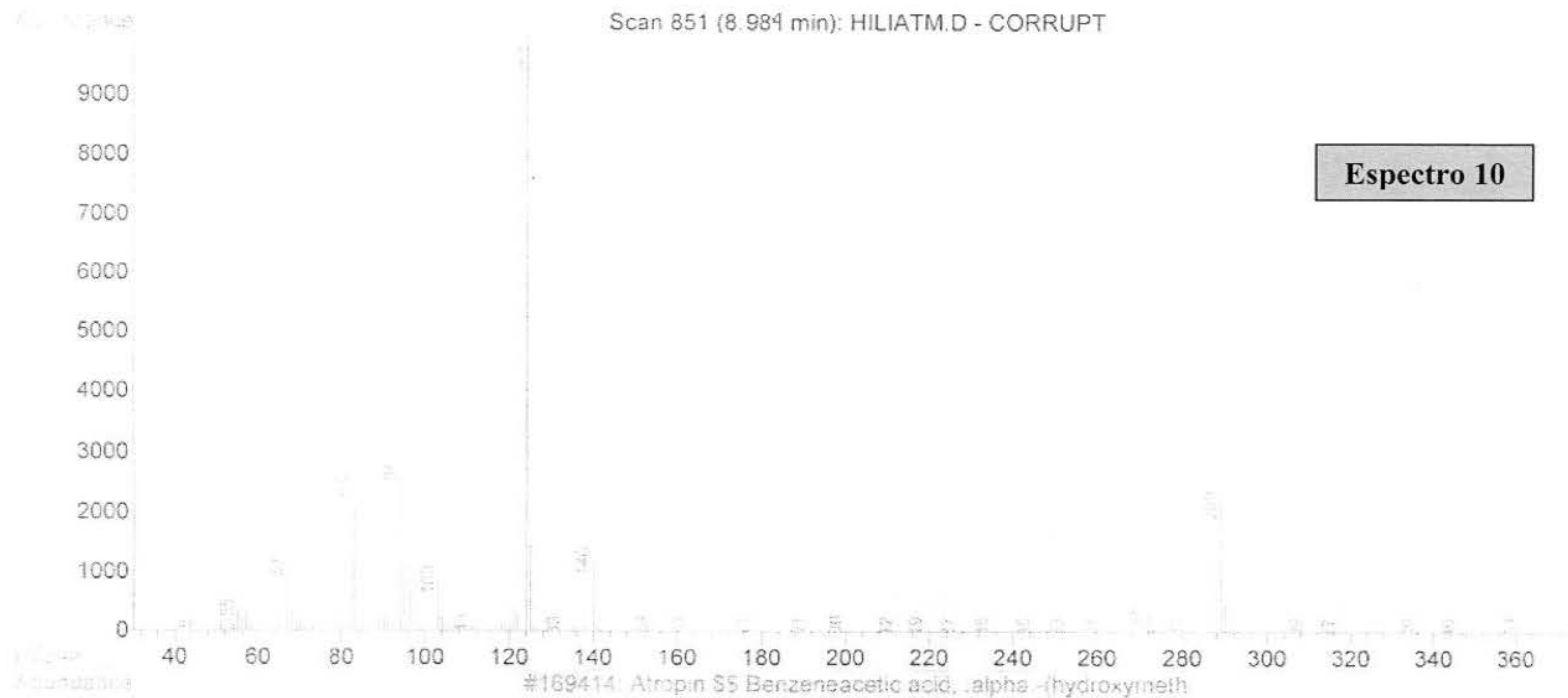




Espectro 9

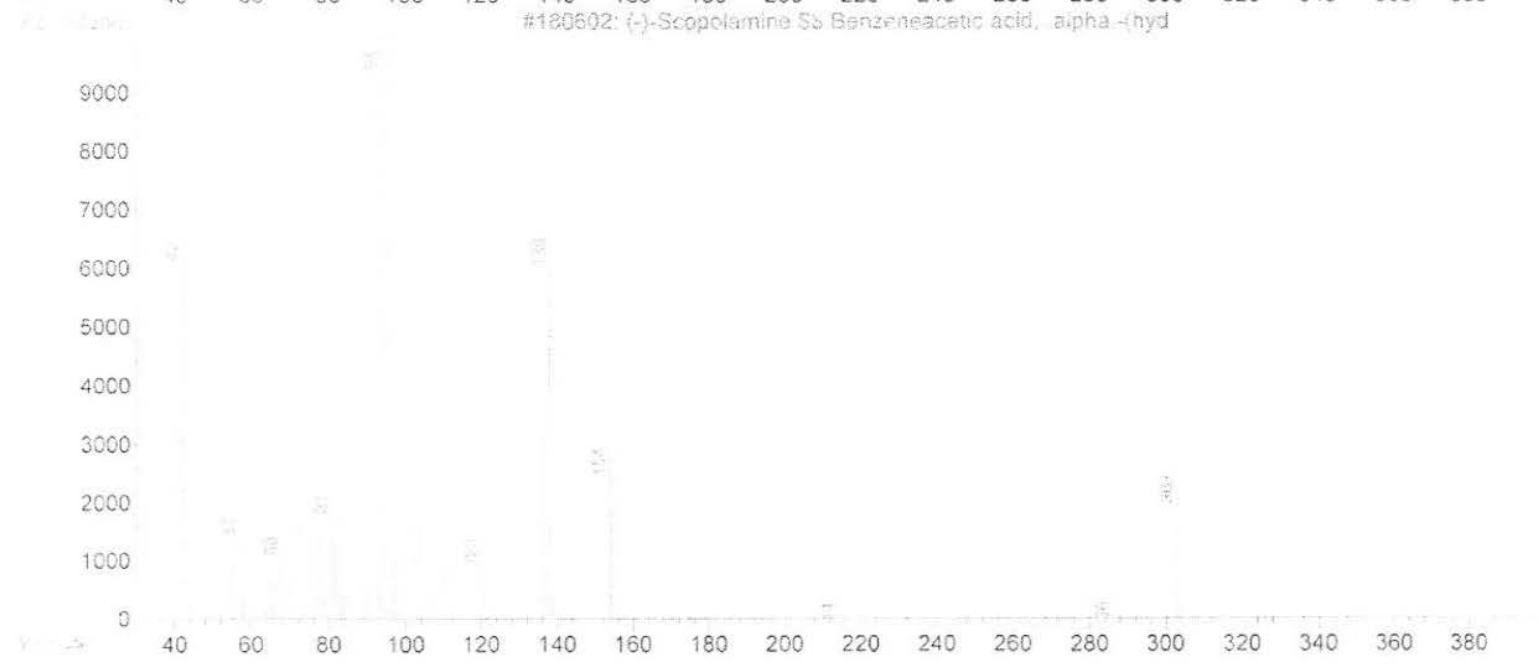
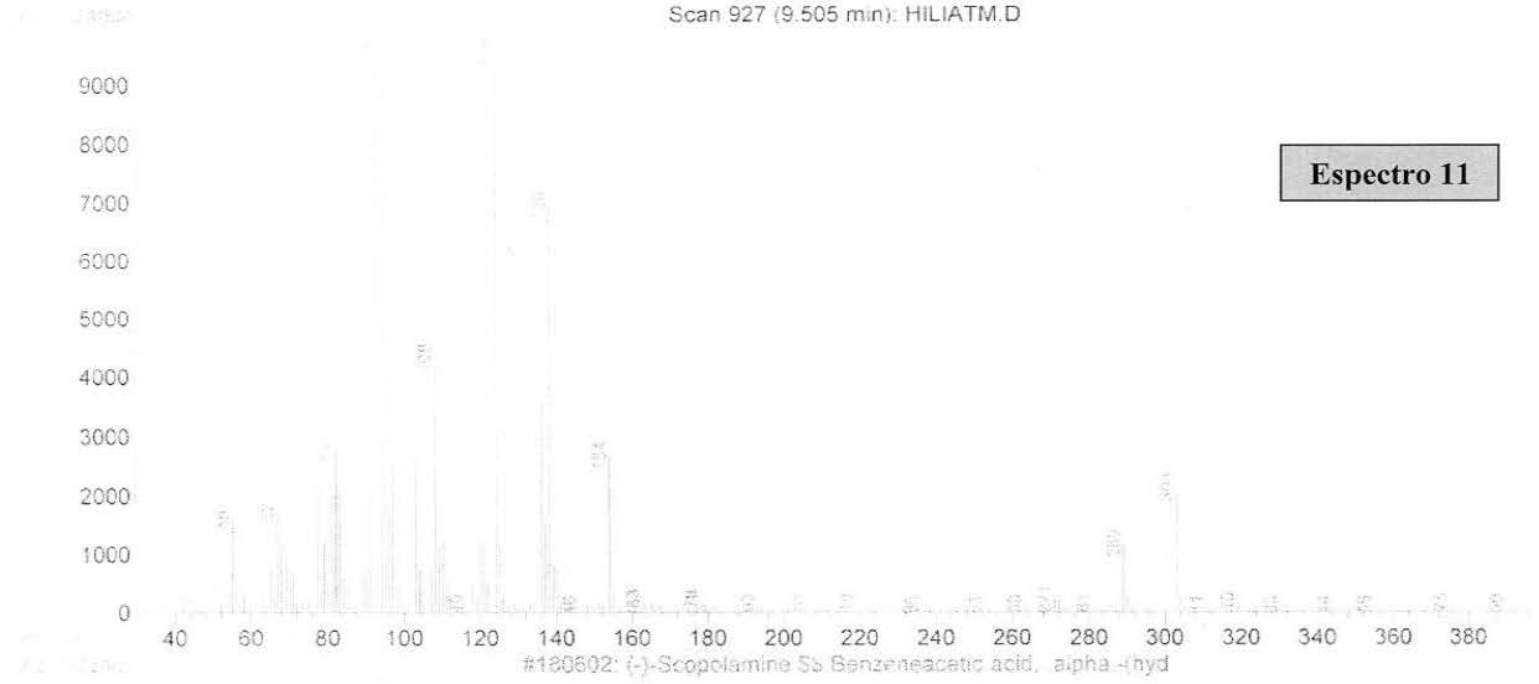
Scan 851 (8.984 min): HILIATM.D - CORRUPT

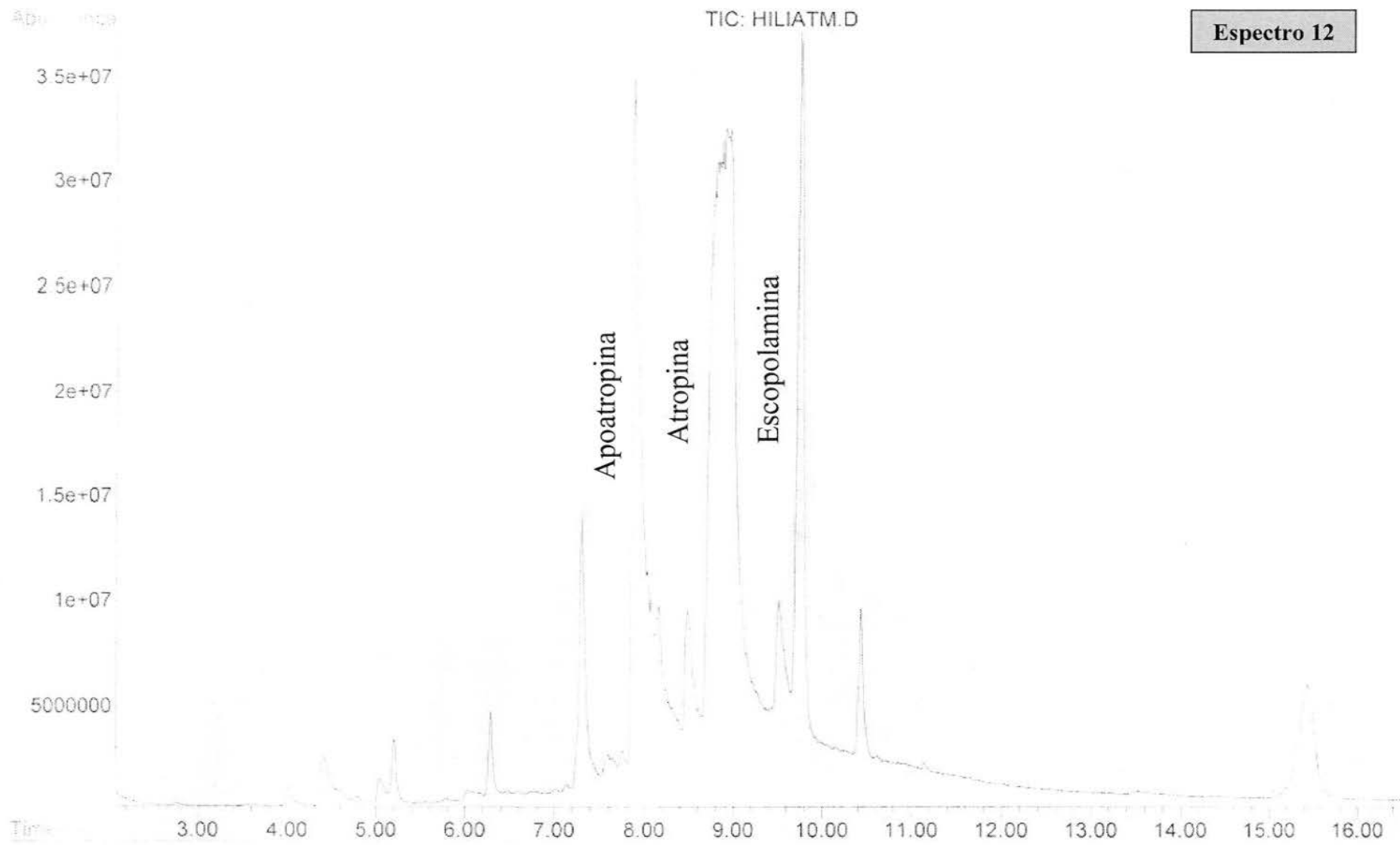
Espectro 10

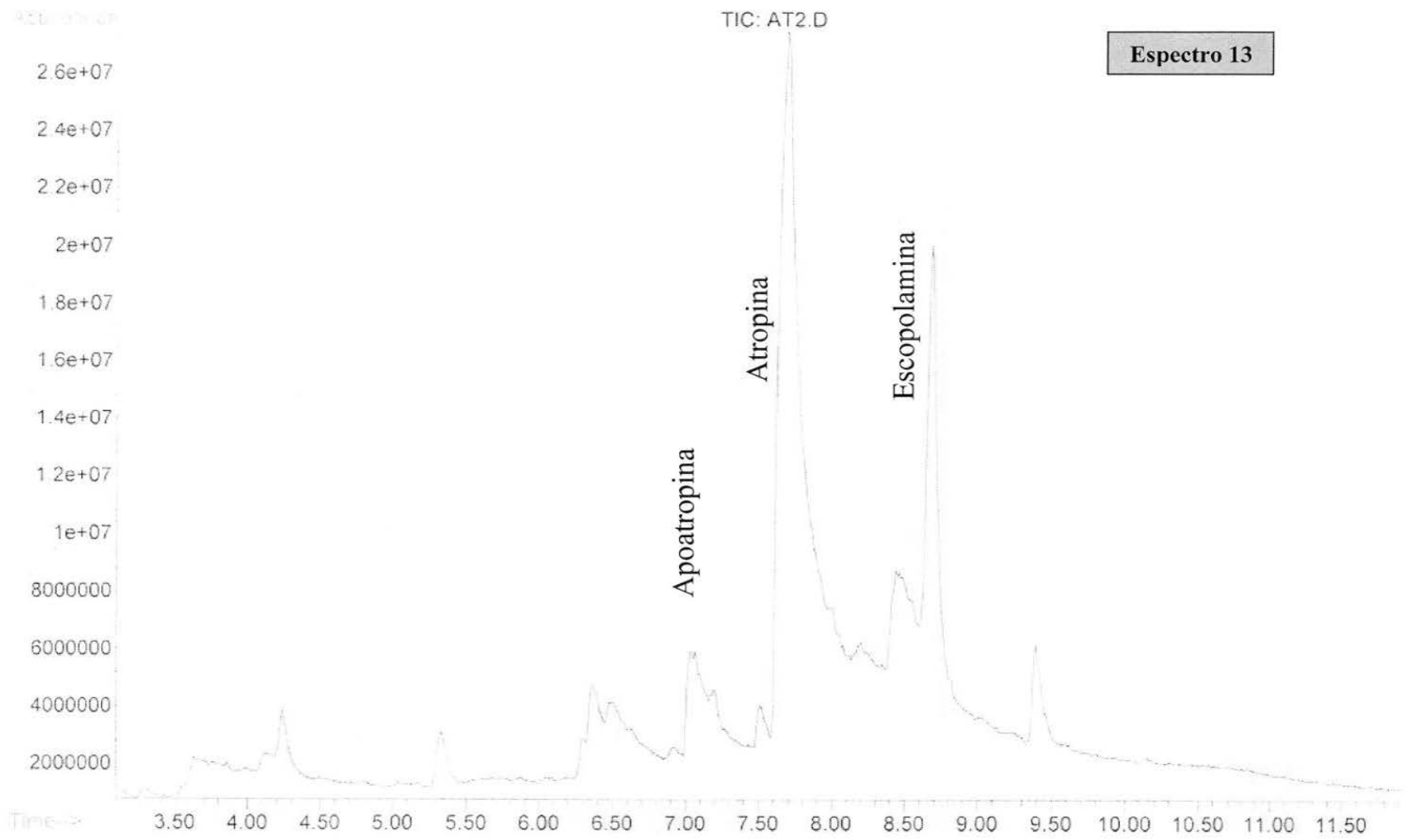


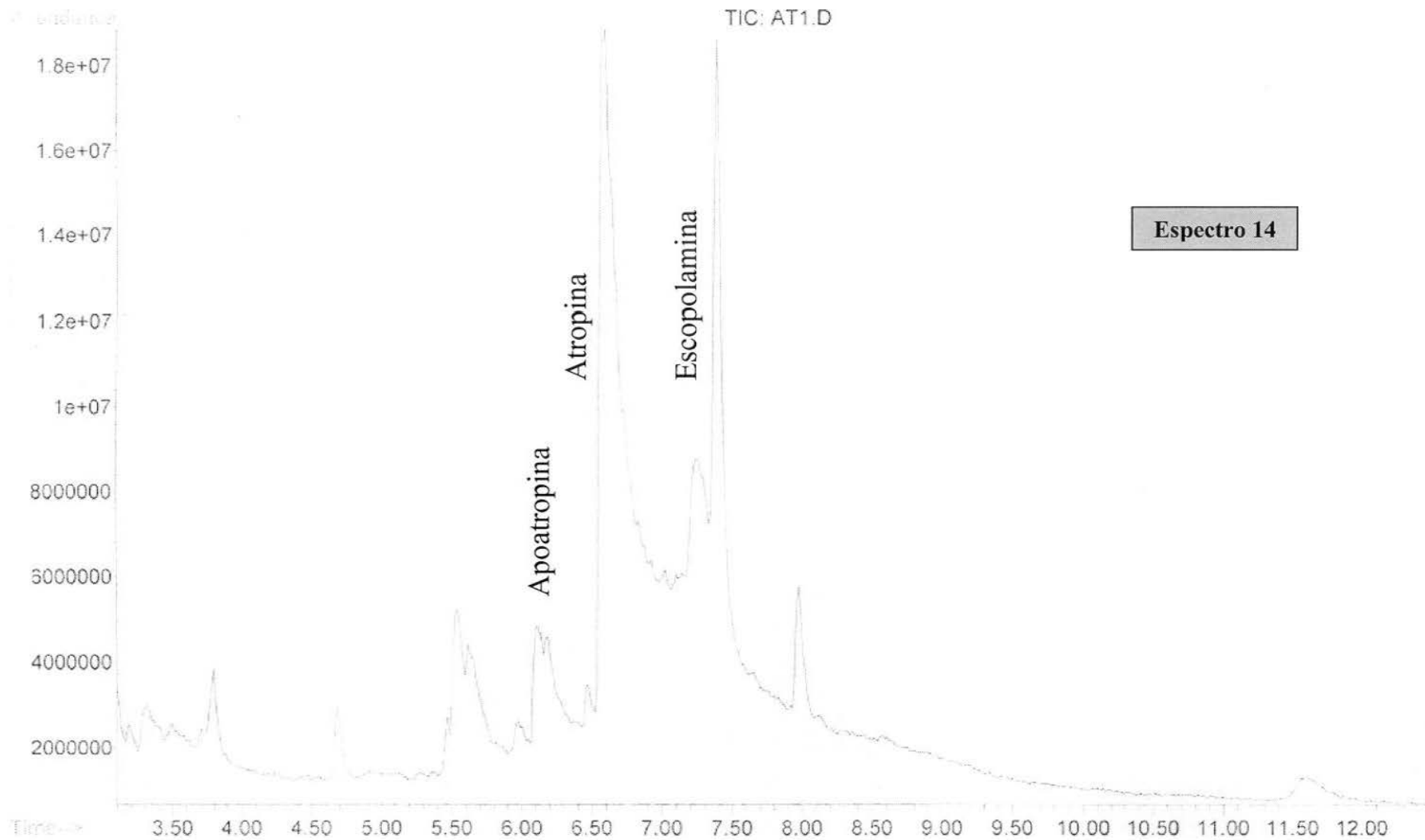
Scan 927 (9.505 min): HILIATM.D

Espectro 11









8. ANÁLISIS DE RESULTADOS.

Como se esperaba los resultados en cuanto al tipo de alcaloides tropanicos existentes en la planta, concuerdan con los referidos por la literatura consultada, siendo la atropina, escopolamina y apoatropina los más abundantes tomando como referencia la altitud de los picos en la cromatografía de gases. El resto de los picos en el cromatograma son impurezas extraídas de la planta que no son del interés de este estudio.

Es de importancia mencionar que los ajustes tanto al sistema de extracción (liquido-liquido) como a los sistemas de separación e identificación (I.R. y CG-MS) fueron fundamentales; esto se ve reflejado en los resultados de los primeros intentos, donde no hay una resolución alta de los picos y por tanto los resultados no son aptos para una buena identificación adecuada. El uso de un aparato de CG-MS, el cual contara con una base de datos interna nos facilitó ampliamente la identificación de cada pico ya que es obvio que una muestra no indica o concluye nada si no hay un estándar contra que compararla.

La técnica de Infrarrojo fue útil para la identificación de la atropina mediante el empleo de la técnica de película, la cual consiste en depositar o agregar sobre una ventana de bromuro de cesio, una pequeña cantidad del extracto cloroformico, y exponerlo al haz de luz del infrarrojo, para obtener la lectura correspondiente y realizar la interpretación del espectro obtenido. Espectros 3 y 4. En este caso en particular se realizo la identificación de la atropina mediante un análisis comparativo con los espectros contenidos en la biblioteca del equipo, obteniéndose una correspondencia en perfil e intensidad de señal a la Atropina, también el espectro obtenido se realizo un comparativo con las referencias bibliograficas especializadas y la interpretación del espectro mismo, por lo cual hay plena certeza de que se trata de la Atropina.

La Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de masas, que es un sistema acoplado, nos permitió primero del extracto cloroformico obtenido, la

separación de la mezcla en sus componentes, entre los cuales por medio de la espectrometría de masas pudimos identificar de forma confiable la identificación de los picos con tiempo de retención 7.904 a la apotropina, RT= 8.896 a la hiosciamina y RT= 9.521 la escopolamina. Debido a que dicha técnica nos presentó mediante gráficos, perfiles de fragmentación específicos (que son como la huella digital de la sustancia) de cada de las sustancias identificadas.

9. CONCLUSIÓN.

La técnica de extracción líquido-líquido que se implementó presentó claras ventajas sobre el método reportado en la literatura, por lo que es factible para su aplicación en futuras pruebas, siendo sus principales características la rapidez, facilidad y menor pérdida de alcaloides.

A pesar de lo fácil que parecería extraer un compuesto con características tan definidas y estudiadas, los procesos de extracción realizados en esta tesis no fueron logrados en el primer intento ni de una forma fácil, sino que fueron el resultado de un proceso de prueba y error.

Sin embargo estoy convencido que el sistema de extracción propuesto, dada la calidad del extracto cloroformico obtenido, es factible para su aplicación como primer paso para un proceso industrial, teniendo como obvias características la eliminación de pasos y por tanto de reactivos, tiempo y dinero, siendo estos los mayores atractivos. Este sistema cumple ha sido pensado bajo el argumento de la Química Verde pues presenta un número reducido de pasos y el uso de reactivos de fácil eliminación y de poca toxicidad.

Aunque el sistema de extracción que al final se obtuvo fue el más adecuado, no está libre de mejoras u observaciones.

Por otra parte el uso de un sistema de separación tan eficiente como la CG y de sistemas de análisis tan sensibles y selectivos como MS e I.R., garantizan que los resultados obtenidos son confiables.

Finalmente solo quiero decir que considero que se han cumplido los objetivos de esta tesis no solo corroborando lo descrito en la literatura, sino convirtiéndose la misma en una base bibliográfica y experimental para futuros trabajos en el tema.

10. DISCUSIÓN.

La planta del Toloache o *Datura stramonium* es una planta que se conoce en México desde tiempos prehispánicos debido a sus características soporíferas, antisépticas y analgésicas y a pesar de que se uso fue milenario, la conquista redujo ampliamente su uso, mientras que la entrada de la medicina moderna provocó su total olvido debido a características negativas como alta toxicidad y una clara dificultad en la dosificación debido a la variación de alcaloides. Por lo cual también se sugiere realizar una mediación de la eficiencia de la extracción líquido-líquido empleada.

Sin embargo en la farmacéutica moderna su uso aun tiene lugar, ya que como se mencionó anteriormente en países industrializados siguen cultivando la planta para obtener de manera económica y factible los principales alcaloides de la planta.

Mas aun su uso no se limita a la explotación farmacéutica, sino que dadas sus características metabólicas es factible para la recuperación de suelos sobre explotados o muy calcáreos para la agricultura.

Considero que México reúne todas las características necesarias para el cultivo y aprovechamiento rentable de esta planta, siendo nuestro clima y tipo de suelo mucho más adecuados que los países anteriormente mencionados. Esta situación se hace aun más obvia si consideramos que las variedades mexicana contienen igual o más alcaloides que las variedades mundiales.

Es por tanto necesario la realización de un escrutinio a nivel país para poder obtener las sepas más resistentes al clima, que requieran menos cuidado (considerando que esta planta por si sola se las arregla) y mejor productoras de alcaloides.

De manera personal considero mejorar este sistema en un futuro lo siguiente:

- Uso de plantas de edad conocida: como se menciona en la bibliografía las plantas viejas tienen un bajo contenido de alcaloides, mientras que las muy jóvenes aún no lo producen en una cantidad suficiente.
- Control de suelo de cultivo: los suelos calcáreos o con alto contenido de carbonatos mejoran en gran medida la producción de alcaloides.
- Uso de plantas de una sepa conocida.

11. BIBLIOGRAFÍAS.

11.1 Bibliografía usada.

1. Egil Ramstad. Modern Pharmacology. Blakiston Division LTD, Mc Graw Hill Book Company. USA. 1954. pag 323-340 , 416 y 422
2. Frank E. Hamerslag D. The Technology an Chemistry of Alkaloids. Van Nostrand Company Ltd. USA. 1950. p. 1-25, 264-286.
3. T. E. Wallis; Textbook of pharmacognosy; J & A. Churchill Ltd; Londres; 1962; pag. 220-222, 324-327.
4. Hadkins ES, Bye R; Typification of Linnaean *Datura* names (Solanaceae); Botanical Journal of the Linnaean Society; 1997; 125: 295-308.
5. Tratado de Farmacognosia. Heber W. Youngken; Traducción Francisco Giral. Editorial Atlante. México. 1951. 981-982, 992-999.
6. Especies con Usos No Maderables en Bosques de Encino, Pino y Pino-Encino en los Estados de Chihuahua, Durango, Jalisco, Michoacán, Guerrero y Oaxaca; SEMARNAP; 2005.
7. INIFAB. 2005
8. Birgit Dräger. Análisis of tropane and related alkaloids. Journal of Chromatography A, 1978 (2002) 1-35.
9. Duran-Patron R, O'Hagan D, Hamilton TG, Wong WC; Biosynthetic studies on the tropane ring system of the tropane alkaloids from *Datura stramonium*; Phytochemistry, 2000 777-784.
10. Kursinski L, Hank H, László I, Svöke É. Simultaneous analysis of hyoscyamine, scopolamine, 6 β -hydroxyhyoscyamine and apoatropine in solaneceous hair roots by reversed-phase high-performance liquid chromatography. Journal of Chromatography A, 1091 (2005) 32-39.
11. Piñol M T, Palazón J, Rosa M; Influence of calcium ion-concentration in the medium on tropane alkaloid accumulation in *Datura stramonium* hairy roots; Plant Science 141 (1999) 41-49.
12. Berkov S, Doncheva T, Philipov S, Alexandrov K; Ontogenetic variation of the tropane alkaloids in *Datura stramonium*. Biochemical Systematics and Ecology 33 (2005) 1017-1029.

13. Marques E P, Monsato P, Proça P; Acute Intoxication in Children by Solanaceous Plants; Toxicology Letters, Volumen 88, Octubre 1996, Page 86.
14. Zabetakis I, Edwards R, O'Hagan D; Elicitation of tropane alkaloid biosynthesis in transformed root culture of *Datura stramonium*; Phytochemistry 50 (1999) 53-56.
15. Guarrera P M; Traditional antihelmintic, antiparasitic and repellent uses of plants in Central Italy; Journal of Ethnopharmacology 68 (1999) 183–192.
16. Miraldi E, Masti A, Ferri S, Comparini I B; Distribution of hyoscyamine and scopolamine in *Datura stramonium*; Fitoterapia 72(2001) 644-648.
17. Patterson S, O'Hagan D; Biosynthetic studies on the tropane alkaloid hyoscyamine in *Datura stramonium*; hyoscyamine is stable to in vivo oxidation and is not derived from littorine via a vicinal interchange process; Phytochemistry 61 (2002) 323–329.
18. Salen P, Shih R, Sierzenski P, Reed J; Effect of Physostigmine and Gastric Lavage in a *Datura Stramonium*-Induced anticholinergic Poisoning Epidemic; The American Journal of Emergency Medicine, Volume 21, Issue 4, July 2003, Pages 316-317
19. T. Ceyhan, M. Kartal, M.L. Altun, F. Tülemis, S. Cevheroglu; LC determination of atropine sulfate and scopolamine hydrobromide in pharmaceuticals: Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis; Turquia; 2001; 25, 399–406.
20. Boswell H. D, Birgit Dräger, Russell M; Specificities of the enzymes of *N*-alkyltropane biosynthesis in *Brugmansia* and *Datura*; Phytochemistry; Germany; 1999.
21. Tesis UNAM
22. Steenkamp P A, Harding N M, van Heerden F R; Fatal *Datura* poisoning: identification of atropine and scopolamine by high performance liquid chromatography/photodiode array/mass spectrometry; Forensic Science International 145, 31-39; 2004.
23. Eftekhar F., Yousefzadi M., Tafakori V.; Antimicrobial activity of *Datura inoxia* and *Datura stramonium*; Fitoterapia; 76 118– 120; 2005.

24. Center for Food and Nutrition Policy (CFNP); USA; August 2002.
25. Benvenuti S; Macchia B; Light environment, phytochrome and germination of *Datura stramonium* L. seeds; Environmental and Experimental Botany; Italy; 38 (1997) 61-71 2002.
26. Fliniaux O, Mesnard F, Raynaud S, Baltora S; Use of heteronuclear multiple bond coherence NMR spectroscopy to monitor nitrogen metabolism in a transformed root culture of *Datura stramonium*; France; Chemistry 4 (2001) 775–778.
27. Schmidt B, Breuer J, Thiede B, Schuphan I; Metabolism of the Pesticide Metabolite 4-[U-14C]Nitrophenol in *Datura stramonium* (L.) Cell Suspension Culture—A Model for Processing of Xenobiotic Carbohydrate Conjugates and Formation of Nonextractable Residues; PESTICIDE BIOCHEMISTRY AND PHYSIOLOGY; Germany; 57, 109–118 (1997).
28. Ford YY, Ratcliffe RG, Robins RJ; *In Vivo* NMR Analysis of Tropane Alkaloid Metabolism In Transformed Root And De-differentiated Cultures of *Datura stramonium*; Phytochemistry Vol. 43, No. 1, pp. 115-120, 1996.
29. Portsteffen A, Dräger B, Nahstedt A; The Reduction Of Tropinona In *Datura Stramonium* Root Cultures By Two Specific Reductases; Phytochemistry Vol. 37, No. 2, pp. 391-400, 1994.
30. Dräger B; Tropinone Reductases, Enzymes At The Branch Point Of Tropane Alkaloid Metabolism; Phytochemistry 67, 1–11, 2006.
31. Fliniaux M, Manceau F, Jacquin-Dubreuil A; Simultaneous analysis of l-hyoscyamine, Z-scopolamine and tropic acid in plant material by reversed-phase high-performance liquid chromatography; Journal of Chromatography, 644, 193-197 (1993).
32. Deng F; Effects of glyphosato, chlorsulfuron, and methyl jasmonate on growth and alkaloid biosynthesis of jimsonweed ; Pesticide Biochemistry and Physiology, 82 16-26, 2005.
33. Douglas B, Turfitt LB; Factors Influencing Biocontrol Of Jimsonweed (*Datura Stramonium* L.) With The Leaf-Spotting Fungus *Alternaria Crassa*; Plant Science, 56 (1988) 261-264.

34. Berkov S, Zayed R, Doncheva T; Alkaloid patterns in some varieties of *Datura stramonium*; *Fitoterapia* 77 (2006) 179–182.
35. Abbas HK, Gerdelbrom WCA, Cawood ME; Biological Activities Of Fumonisins, Mycotoxins From *Fusarium Moniliforme*, In *Jimsonweed (Datura Stramonium L.) And Mammalian Cell Cultures*; *Toxicon* Vol 31, No. 3, pp. 345-353, 1993.

11.2 Bibliografia revisada.

36. Friedman M; Analysis of biologically active compounds in potatoes and jimson weed (*Datura stramonium*) seeds: *Journal of Chromatography A*, 1054 (2004) 143–155.
37. Ricng J, Gualtierib F, Tucek S; Constitutive inhibitory action of muscarinic receptors on adenylate cyclase in cardiac membranes: effects of atropine, S-(-)-hyoscyamine, and R-(+)-hyoscyamine; *Xth International Symposium on Cholinergic Mechanisms*.
38. Hashimoto T, Yun DJ, Yamada Y; Production Of Tropane Alkaloids In Genetically Engineered Root Cultures; *Phytochemistry*, Vol. 32, No. 3, Pp. 713-718, 1993.
39. Ford Yy, Fox Gg, Ratcliff Erg; In Vzvo “Nnmr Studies Of Secondary Metabolism In Transformed Root Cultures Of *Datura Stramonium* *Nicotiana Tabacum*”; *Phytochemntry*. Vol 36. No 2, pp 333 339. 1994.
40. Dugan GM, Gumbmann MR, Friedman M; Toxicological Evaluation Of Jimson Weed (*Datura Stramonium*) Seed; *Fd Chem. Toxic.* Vol. 27, No. 8, Pp, 501-510, 1989.
41. Portsteffen A, Draeger B, Nahrstedt A; Two Tropinone Reducing Enzymes From *Datura stramonium* in transformed Root Cultures; *Phytochemistry*, Vol. 31, No. 4, pp. 1135-1138, 1992
42. Mroczek T, Głowniak K, Kowalska J; Solid–liquid extraction and cation-exchange solid-phase extraction using a mixed-mode polymeric sorbent of *Datura* and related alkaloids; *Journal of Chromatography A*, 1107 (2006) 9–18.

43. http://www.kuleuven-kortrijk.be/facult/wet/biologie/pb/kulakbiocampus/images/buiten-kulak/lage_planten/Datura%20stramonium%20-%20Doornappel/
44. <http://www.hoseito.com/FLORES%20SILVESTRES/Datura%20stramonium.htm>
45. http://www.tienda.asrockindependiente.com/terapias/anatomia/nervioso_archivos/image022.jpg