

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA
UNAN-MANAGUA
RECINTO UNIVERSITARIO RUBÉN DARÍO
FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

MONOGRAFÍA PARA OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIADO EN QUÍMICA



**Estimación cuantitativa de los alcaloides tropánicos
atropina y escopolamina, presentes en las flores y hojas
de la planta *Brugmansia suaveolens*.**

Autores:

Br. Josseth Mhartyn Díaz Domínguez

Br. Joel Antonio Flores López

Tutor: M.Sc. Sergio Salazar Vanegas

Asesor técnico: M.Sc. Jorge Cuadra

Managua, Mayo 2010



ÍNDICE DE CONTENIDO

I.	ASPECTOS GENERALES	1
1.1	Introducción	2
1.2	Antecedentes.....	3
1.3	Justificación.....	5
1.4	Objetivos.....	7
II.	MARCO TEÓRICO.....	8
2.1	Descripción botánica de la planta <i>Brugmansia suaveolens</i>	9
2.1.1	Descripción botánica de la Solanaceae.....	9
2.1.2	Origen.....	10
2.1.3	Especie.....	11
2.1.4	Cultivo.....	12
2.1.5	Forma de reproducción.....	12
2.1.6	Características botánicas de la <i>Brugmansia</i>	12
2.1.6.1	Características botánicas de la <i>Brugmansia suaveolens</i>	13
2.2	Alcaloides presentes en las flores y hojas de la <i>Brugmansia suaveolens</i>	14
2.3	Toxicología de los alcaloides tropánicos atropina y escopolamina presentes en las flores y hojas de la planta <i>Brugmansia suaveolens</i>	15
2.3.1	Efectos adversos de los principios activos atropina y escopolamina presentes en las flores y hojas de la planta <i>Brugmansia suaveolens</i>	16
2.3.1.1	Atropina.....	18
2.3.1.2	Escopolamina.....	19
2.3.2	Causa de la toxicidad de la atropina y escopolamina	20
2.3.3	Metabolismo y excreción de la atropina y escopolamina.....	21
2.4	Uso farmacológico de las flores y hojas de la <i>Brugmansia</i>	22
2.5	Técnicas de extracción e identificación de los principios activos en las flores de la <i>Brugmansia</i>	24
2.8	Propiedades fisicoquímicas de los alcaloides.....	25
2.6.1	Extracción de alcaloides en medio básico.....	28
2.6.2	Extracción de alcaloides en medio ácido.....	30
2.6.3	Extracción de alcaloides asistida por ultrasonido.....	32



2.6.4	Reactivos para la identificación de los alcaloides totales presentes en la planta <i>Brugmansia suaveolens</i>	33
2.6.5	Técnica de separación por cromatografía gaseosa.....	34
2.6.6	Espectrometría de masas	35
III.	HIPÓTESIS	37
IV.	DISEÑO METODOLÓGICO	38
4.1	Ubicación del área de estudio.....	39
4.2	Tipo de estudio.....	39
4.3	Universo y muestra	40
4.4	Criterio de selección de muestra	41
4.5	Descripción de las variables.....	42
4.6	Localización del punto de muestreo	43
4.7	Materiales utilizados en el procesamiento de datos	44
4.7.1	Materiales para recolectar información.....	44
4.7.2	Reactivos utilizados en el proceso analítico.....	45
4.7.3	Materiales y equipos de laboratorio.....	45
4.8	Valoración de las muestras en el laboratorio	46
4.8.1	Principio del método	46
4.8.2	Secado de muestras en el laboratorio y determinación del porcentaje de humedad.....	46
4.8.3	Maceración de las muestras secas	48
4.8.4	Principios de las pruebas para la identificación de los alcaloides.....	48
4.8.5	Proceso de extracción	49
4.8.5.1	Tamizado de las muestras.....	49
4.8.5.2	Desengrasado.....	50
4.8.5.3	Extracción de los alcaloides.....	50
4.8.6	Inyección de muestra en el cromatógrafo de gases.....	52
4.9	Cuantificación de la atropina y escopolamina.....	53
4.10	Estándares y soluciones de trabajo.....	56
4.10.1	Preparación de los reactivos	57
4.10.2	Preparación de los estándares	58
4.11	Herramientas estadísticas para la determinación de la incertidumbre en los resultados.....	60
4.11.1	Contraste de correlación significativa	61



4.11.2	Intervalo de confianza de la curva de regresión lineal para la cuantificación de atropina y escopolamina.....	62
4.11.3	Límite de detección y límite de cuantificación de las curvas de regresión lineal.....	63
4.11.4	Determinación del error aleatorio de la concentración.....	64
4.11.5	Límite de confianza en la concentración de las muestras.....	64
4.11.6	Comparación de medias	65
V.	RESULTADOS	66
5.1	Determinación del porcentaje de humedad.....	67
5.2	Prueba para la identificación de alcaloides totales	67
5.3	Análisis del extracto de las hojas y flores de la <i>Brugmansia suaveolens</i>	68
5.4	Concentración de Atropina y Escopolamina presente en las muestras de flores y hojas.....	69
5.5	Comparación entre la concentración de atropina y escopolamina presente en las muestras de flores y hojas	72
5.5.1	Comparación de la concentración de atropina presente en muestra de flores y hojas	72
5.5.2	Comparación de la concentración de escopolamina presente en muestras de flores y hojas	73
5.6	Análisis de correlación significativa de la curva de regresión de la atropina y la escopolamina.....	74
5.6.1	Atropina.....	74
5.6.2	Escopolamina.....	74
5.7	Límites de confianza de la curva de regresión lineal de la atropina.....	75
5.8	Límite de detección y de cuantificación de la atropina	77
5.9	Límites de confianza de la curva de regresión lineal de la escopolamina.....	77
5.10	Límite de detección y de cuantificación de la escopolamina	79
VI.	DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS.....	80
VII.	CONCLUSIONES.....	82
VIII.	RECOMENDACIONES	84
IX.	BIBLIOGRAFÍA	86
X.	ANEXOS	89
XI.	GLOSARIO	110



Índice de Gráficos

Fig. 2.1	Distribución geográfica de la <i>Brugmansia</i> en Sur América	10
Fig. 2.2	Planta <i>Brugmansia suaveolens</i>	11
Fig. 2.3	Flores y hojas de la <i>Brugmansia suaveolens</i>	13
Fig. 2.4	Estructura química de la atropina.....	14
Fig. 2.5	Estructura química de la escopolamina	14
Fig. 2.6	Estructura del núcleo tropánico.....	26
Fig. 2.7	Estructura del Tropanol y Pseudotropanol	27
Fig. 5.1	Porcentaje de humedad de las hojas y flores de la <i>Brugmansia suaveolens</i>	67
Fig. 5.2	Cromatograma de mezcla atropina-escopolamina a $50 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$	68
Fig. 5.3	Concentración comparada de atropina y escopolamina presente en hojas y flores de la <i>Brugmansia suaveolens</i>	73
Fig. 5.4	Límite de confianza, límite de cuantificación y de detección de la curva de regresión lineal de la atropina.....	76
Fig. 5.5	Límite de confianza, límite de cuantificación y de detección de la curva de regresión lineal de la escopolamina.....	78



Índice de Tablas

Tabla 2.1	Aplicación Comparada de La atropina y la escopolamina.....	23
Tabla 4.1	Reactivos utilizados en el proceso analítico	45
Tabla 4.2	Preparación del NH_4OH	58
Tabla 4.3	Preparación de la curva de calibración de la atropina.	59
Tabla 4.4	Preparación de la curva de calibración de la escopolamina.....	60
Tabla 5.1	Concentración de atropina encontrada en muestras de flores y hojas de la <i>Brugmansia suaveolens</i>	70
Tabla 5.2	Porcentaje de recuperación de la atropina.....	70
Tabla 5.3	Concentración de escopolamina encontrada en muestras de flores y hojas de la <i>Brugmansia suaveolens</i>	71
Tabla 5.4	Porcentaje de recuperación de la escopolamina.....	71
Tabla 5.5	Áreas de los patrones de calibración de la atropina.....	75
Tabla 5.6	Límites de confianza para la curva de regresión lineal de la atropina	76
Tabla 5.7	Área de los patrones de calibración de la escopolamina	77
Tabla 5.8	Límites de confianza para la curva de regresión lineal de la escopolamina	78



Índice de Anexos

Anexo 10.1	Imágenes	90
Anexo 10.2	Limpieza de equipos y cristalería	96
Anexo 10.3	Materiales y equipos de laboratorio	98
Anexo 10.4	Tabla de distribución t.	99
Anexo 10.5	Porcentaje de humedad en flores	100
Anexo 10.6	Porcentaje de humedad en hojas.....	101
Anexo 10.7	Cálculos	102



Dedicatoria

A Dios

Porque siempre me ha ayudado a seguir adelante, me ha permitido llegar hasta este punto y me brinda salud para lograr mis objetivos.

A mi padre Martín Ramón Díaz Torrentes

Que ha sido siempre un hombre admirable, que me ha brindado cuidados, quien con sus sabios consejos orientó mis pasos por el camino recto de la vida.

A mi madre Eva Domínguez Álvarez

Por apoyarme en los momentos más difíciles. Por respetar mi persona y abrir paso a mis decisiones. Por confiar en mi sentido común y ayudarme a educarlo.

Josseth Mhartyn Díaz Domínguez



Dedicatoria

Dedicado en primer lugar a Dios por haberme dado la dicha de terminar mis estudios universitarios.

A mis padres por haberme apoyado en esta ardua y larga labor
Aura del Socorro López Arias y Eladio Antonio Flores Gutiérrez.

In memoria de mi tío Benigno Flores Gutiérrez y mi abuelo José Humberto Gutiérrez Ruiz, ya que ambos me brindaron apoyo incondicional.

A mi tío Emir Humberto Flores Gutiérrez por haberme apoyado económicamente mis estudios universitarios.

A mis compañeros de estudio por haberme apoyado en el proceso de la elaboración de esta tesis

Joseth Mhartin Díaz Domínguez

Xaviera de Jesús Méndez Doña

Silvia Onelia Mongalo Lanuza

Joel Antonio Flores López



Agradecimientos

En primer lugar quisiéramos dar las gracias al tutor de la tesis Msc. Sergio Salazar Vanegas quien ha contribuido de forma fundamental a hacer realidad este trabajo, quien aun estando continuamente ocupado siempre encontraba tiempo para ayudarnos.

Al M.Sc. Salvador Montenegro Guillén director del Centro de Investigaciones de Recursos Acuáticos (CIRA-UNAN) por facilitarnos las condiciones y equipos para la realización de nuestro trabajo.

Al Dr. Zacarías Duarte director del Instituto de Medicina Legal de Nicaragua por autorizarnos el uso de materiales, equipos y reactivos, del laboratorio de toxicología forense de dicha institución.

Al Msc. Jorge Cuadra Leal Director del departamento de micropoluentes sección de cromatografía de gases CIRA-UNAN y a todo el personal que labora en este laboratorio por brindarnos su apoyo y herramientas necesarias en la realización de nuestra investigación.

Al PhD. Jorge Pitty Tercero por orientarnos y guiarnos en el inicio de nuestra investigación.

A la profesora Elvis María Jiménez Directora del departamento de química de la UNAN-Managua, por habernos brindado su apoyo y facilitarnos parte de herramientas que dieron inicio a nuestro trabajo.



Resumen

Palabras clave: *Brugmansia suaveolens*; Atropina; Escopolamina; Alcaloides tropánicos; Espectrómetro de masas.

La planta *Brugmansia suaveolens* conocida en Nicaragua como “floripón” posee propiedades toxicológicas ya que posee altas concentraciones de atropina y escopolamina, estos son alcaloides del tipo tropánico y actúan directamente sobre el sistema nervioso central.

En este trabajo se determinaron las concentraciones de estos alcaloides presentes en las hojas y flores de la planta utilizando un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas, mediante la aplicación de ésta técnica se logró encontrar que las flores contienen una concentración de $643.50 \pm 65.00 \mu\text{g.g}^{-1}$ de atropina y $1582.80 \pm 77.80 \mu\text{g.g}^{-1}$ de escopolamina, mientras que las hojas presentan una menor concentración $428.00 \pm 12.90 \mu\text{g.g}^{-1}$ de atropina y $611.6 \pm 24.50 \mu\text{g.g}^{-1}$ de escopolamina.



I. ASPECTOS GENERALES



1.1 Introducción

Los productos naturales de origen vegetal son recursos renovables de múltiple uso para el hombre. La información obtenida de la investigación de compuestos de origen vegetal ayuda a comprender la fisiología y bioquímica de los organismos que los producen y lograr su aprovechamiento con fines científicos y económicos. (Domínguez, 1979, p.11) Históricamente la producción de medicamentos y el tratamiento farmacológico de las enfermedades inició con la utilización de las plantas.

La planta *Brugmansia suaveolens* comúnmente llamada floripón, es poco utilizada para aliviar algunas enfermedades, a pesar que contiene propiedades farmacológicas cuando se consume en bajas concentraciones. El principio activo de la planta está compuesto en mayor proporción por atropina y escopolamina, estos inhiben la acción de la acetilcolina, produciendo efectos adversos en el organismo tales como: desorientación, excitación, alucinación, delirio, agresividad, dilatación pupilar, visión borrosa, aumento de la tensión intraocular y aumento en la frecuencia cardíaca.

El principio activo contenido en los órganos de las plantas es los que determina la utilización de la misma; así mismo cada planta perteneciente a un género y especie determinada, posee su propio principio activo, el cual se diferencian por sus propiedades físicas, químicas y biológicas.

En el presente estudio se determinó la concentración de atropina y escopolamina presentes en las flores y hojas de la planta *Brugmansia suaveolens*, utilizando la técnica de cromatografía gaseosa acoplada a un espectrómetro de masas (CG/MS).



1.2 Antecedentes

La familia Solanaceae consta de 95 géneros y 2300 especies distribuidas en todos los continentes, pero especialmente en América tropical; 22 géneros y 117 especies se encuentran en Nicaragua. Los géneros *Brugmansia*, *Brunfelsia*, *Datura*, *Lycopersicon*, *Nicandra* y *Nicotiana* están representados solo por especies introducidas, y *Acnitus* y *Capsicun* tal vez hayan sido introducidos naturalmente de otros sitios. (Steven, 2001)

“Dentro de la familia Solanaceae está presente la *Brugmansia*, la cual incluye cinco especies nativas de Sudamérica, dos de las cuales se encuentran en Nicaragua...las especies son ampliamente cultivadas como plantas ornamentales” (Steven, 2001). Estas especies son *Brugmansia candida*, la cual es un híbrido y *Brugmansia Suaveolens* de forma natural.

Todos los órganos de la planta *Brugmansia* son altamente tóxicos, ya que la planta contiene alcaloides como la escopolamina y atropina. La atropina es un alcaloide tropánico, sintetizada por Mein en 1831 a partir de la planta *Atropa belladonna*. La escopolamina a partir de 1902 se administraba junto a la morfina como analgésico en los partos, y se vio implicada como factor causal en tasa excesivamente alta de mortalidad infantil.

Actualmente, la planta se usa en pequeñas cantidades para prevenir y tratar el mareo, las náuseas y el vómito, por la acción que ejerce sobre el sistema nervioso central se usa como antiparkinsoniano, antiespasmódico y como analgésico local.

En algunos países de América del sur se han hecho estudios acerca de la composición química de la *Brugmansia*. En el año 2000 la Universidad Tecnológica de Pereira en Colombia, hizo estudios para la cuantificación de



los alcaloides tropánicos presentes en la planta a través de cromatografía líquida de alta precisión (HPLC) (Gallego, 2000). Y en el 2003, la Universidad de Santa Rosa de Cabal (UNISARC) de Colombia hizo pruebas acerca de las características biocidas de la planta (Mejía, 2003).



1.3 Justificación

Los alucinógenos son sustancias químicas que perturban el sistema nervioso central. Los alucinógenos afectan el funcionamiento neuroquímico del cerebro, produciendo trastornos del pensamiento y alteraciones de la percepción sensorial con alucinaciones.

Entre las principales sustancias alucinógenas se encuentran los alcaloides. “Son sustancias orgánicas de origen vegetal nitrogenado con carácter básico, de estructura generalmente compleja y que presentan actividades farmacológicas muy diversas, no exentas de toxicidad” (Vanaclocha, 2003)

En Nicaragua, el consumo de la *Brugmansia suaveolens* (floripón), que contiene como principios activos alcaloides tropánicos, es poco frecuente a pesar que ésta planta posee propiedades medicinales. Unas de las características de estas plantas es que al ser ingerida a concentraciones muy alta “afecta la estimulación nerviosa parasimpática” (Remington, 1990) trayendo como consecuencia estados alucinatorios, excitatorios, sin embargo en la medicina tradicional se le atribuyen propiedades tales como calmar o suprimir el asma.

Por otro lado, en algunas partes del país la juventud hace uso de las hojas y flores de estas plantas, para provocar estados alucinógenos, no obstante cabe señalar que según la Policía Nacional y el Ministerio de Salud (MINSA) no existen datos que indiquen que esta planta este siendo utilizada con fines ilícitos en el país.



El tema de la investigación nace con el deseo de determinar y cuantificar los alcaloides tropánicos atropina y escopolamina contenido en la planta *Brugmansia suaveolens*, ya que en Nicaragua no existe ningún estudio químico referente a este tema, y que dicho trabajo sirva de base para futuros estudios, relacionados con estas plantas.

Por otra parte, con esta investigación se podrá aportar conocimiento científico, en cuanto a un método para la cuantificación y determinación de alcaloides y de esta manera se le estará dando realce tanto al departamento de química como a la misma universidad en lo que se refiere a la investigación aplicada de la química de plantas medicinales en el país.



1.4 Objetivos

Objetivo General

- Identificar y determinar la concentración de los alcaloides tropánicos, atropina y escopolamina, presente en las flores y hojas de la planta *Brugmansia suaveolens*, utilizando la cromatografía de gas acoplada a espectrometría de masa.

Objetivos Específicos

- Comprobar la presencia de los alcaloides tropánicos, atropina y escopolamina, presentes en las flores y hojas de la planta *Brugmansia suaveolens* mediante la aplicación de la cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa.
- Comparar la concentración de alcaloides tropánicos, atropina y escopolamina, presentes en las flores y hojas de las plantas *Brugmansia suaveolens*.
- Aplicar pruebas estadísticas para determinar los errores sistemáticos y aleatorios, generados en todo el proceso analítico, en la cuantificación de los alcaloides tropánicos, atropina y *escopolamina*.



II. MARCO TEÓRICO



2.1 Descripción botánica de la planta *Brugmansia suaveolens*

2.1.1 Descripción botánica de la Solanaceae

Hierba, arbusto, trepadoras o arboles, a veces epifitos, glabros o con varios tipos de pubescencia, a veces armados; plantas generalmente hermafroditas (en Nicaragua) o a veces andromonoicas en algunas especies de *solanun*. Hojas alternas a veces en pares (geminadas), simples, lobadas o compuestas, enteras, dentadas; pecíolos generalmente presentes, estipulas ausentes. Inflorescencia cimosas, variadamente agrupadas, a veces reducidas a una sola flor, terminales pero mayormente apareciendo axiales o laterales en los tallos, brácteas o bractéolas a veces presentes, flores actinomorfas o zigomorfas, mayormente 5-meras; cáliz cupuliforme, tubular o campanulado, lobado o dividido, frecuentemente acrescente en el fruto; corola simpétala, valvadada, imbricada o quincuncial en la yema, rotácea, campanulada, tubular, infundibuliforme o hipocateliforme, mayormente lobada; estambres insertos en el tubo de la corola, alternando con lobos de la corola, a veces parcialmente fusionados, a veces 1 o más reducidos a estaminodios, anteras con dehiscencia longitudinal o por poros terminales; pistilos 1, ovarios a veces con un disco nectarífero basal, carpelos mayormente 2, lóculos 1 a varios con septos falsos, la placentación principalmente axial, óvulos ,1-muchos en cada lóculo, estilo solitario. Fruto baya o cápsula, mayormente con muchas semillas, o a veces un aquenio; semillas mayormente con el embrión ya sea doblado alrededor de la periferia de la testa o casi recto y central, endosperma presente. (Steven, 2001)



Familia consta de 95 géneros y 2300 especies distribuidas en todos los continentes, pero especialmente en América tropical; 22 géneros y 117 especies se encuentran en Nicaragua. Los géneros *Brugmansia*, *Brunfelsia*, *Datura*, *Lycopersicon*, *Nicandra* y *Nicotiana* están representados solo por especie introducidas, y *Acnitus* y *Capsicun* tal vez hayan sido introducidos naturalmente desde otros sitios, especies de esta familia son importantes como alimento (“Chiles”, “Papas”, “Tomates”), droga (“Tabaco”, “Atropina”), ornamento (“Floripondio”) y algunas son malezas nocivas. Aunque muchas especies están relacionadas a actividades humanas, como plantas de cultivo o malezas, muchas otras se encuentran en áreas de vegetación no alterada. La familia tiende a ser algo calcícola. (Steven, 2001)

2.1.2 Origen

La “*Brugmansia*” incluye cinco especies nativas de las regiones de Sudamérica” (Steven, 2001), a lo largo de los Andes de Colombia hasta el norte de Chile e incluso el sudeste de Brasil.

Figura 2. 1 Distribución geográfica de la *Brugmansia* en Sur América.





2.1.3 Especie

Considerando el alto grado de variabilidad, existen 5 especies naturales y varios híbridos del genero *Brugmansia* perteneciente a la familia solanácea. Entre las especies naturales se destacan las siguientes: *Brugmansia arbórea*, *Brugmansia aurea*, *Brugmansia sanguínea*, *Brugmansia suaveolens*, *Brugmansia versicolor* (Sánchez, 2003).

Figura 2. 2 Planta *Brugmansia suaveolens*





2.1.4 Cultivo.

La *Brugmansia* crece fácilmente en suelos húmedos y fértiles, en pleno sol y sombra, o en ambientes fríos. “En Nicaragua la floración de la *Brugmansia suaveolens* se da en los meses de enero, febrero, mayo-junio, octubre” (Steven, 2001). Las especies de regiones elevadas (*Brugmansia sanguínea*, *Brugmansia vulcanicola*), prefieren temperaturas moderadas y noches frías, y pueden no florecer si las temperaturas son elevadas.

2.1.5 Forma de reproducción

La reproducción de la *Brugmansia* se logra fácilmente por semilla y por gemación, al cortar pedazos de 10 a 20 cm tomados del final de una rama y sembrándolos durante el verano o invierno. También se han desarrollado diversos híbridos para fines ornamentales. En vista que en Nicaragua la *Brugmansia* no produce frutos la única forma de reproducción es por gemación.

2.1.6 Características botánicas de la *Brugmansia*

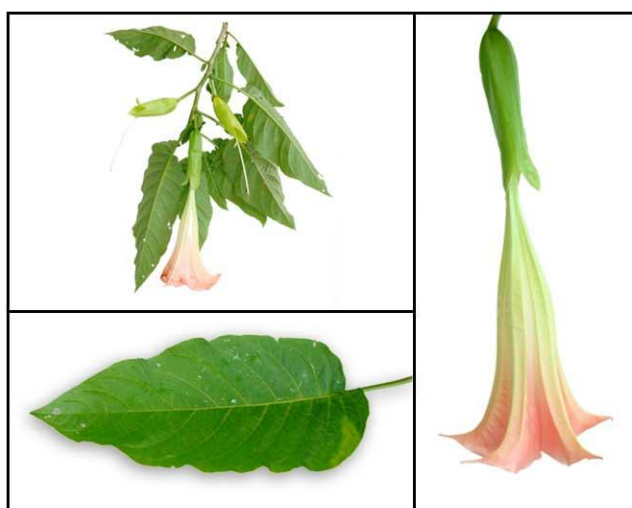
Éstos son arbustos o árboles, inertes, pubescencia de tricomas simple. Hojas simples subenteras; pecioladas. Flores solitarias, muy grandes, en los nudos de las hojas cerca de los extremos de las ramas, actinomorfas, 5-meras; cáliz tubular; corola hipocateriforme, mayormente con 5 dientes puntiagudos; estambres insertos cerca de la parte media del tubo, a veces geniculados, filamentos a veces pubescentes, anteras lineales con dehiscencia longitudinal; ovario cónico, 4-locular, estigma menudamente lobado, situado con las anteras (Steven, 2001).



2.1.6.1 Características botánicas de la *Brugmansia suaveolens*

Cáliz hinchado, 5-dentado o hendido, pubescente por fuera, el tubo de la corola menos de la $\frac{1}{2}$ del ancho de la boca del cáliz; anteras de 25-35 mm de largo. Arbusto o árboles, hasta cinco metros de largo. Hojas ovadas, de 15-30 cm de largo y 8-15 cm de ancho, ápice agudo o acuminado, base redondeada u obtusa, subenteras, frecuentemente dimideadas, pubescentes en ambas superficies; peciolo de 2-8 cm de largo. Flores péndulas, pedicelos de 2-5 cm de largo; cáliz hinchado en la yema y en la flor, cayendo junto con la flor, de 9-12 cm y 3-4 de ancho en la parte más ancha con cinco lobos sub iguales, agudos u obtusos, la boca más de dos veces el ancho del tubo de la corola; corola de 25-30 cm de largo, puberulenta por fuera, blanca rosada o amarillenta, el limbo sinuado-lobado con 5 dientes angostamente lanceolados; estambres insertados inmediatamente por debajo de la parte media del tubo, a veces geniculados, filamentos pilosos cerca del punto de inserción, anteras 25-35 mm de largo (Steven, 2001).

Figura 2. 3 Flores y hojas de la *Brugmansia suaveolens*.





2.2 Alcaloides presentes en las flores y hojas de la *Brugmansia suaveolens*

Al estudiar los principios activos de las plantas, se puede establecer una relación directa causa-efecto que puede ser útil para explicar los mecanismos de acción de las plantas y el desarrollo de estudios farmacocinéticos (Vanaclochal, 2003).

En las plantas del género *Brugmansia*, la concentración y el tipo de alcaloide varía según el órgano y género de la planta. Los principales alcaloides presentes en el género *Brugmansia* son: atropina (fig. 2.4) y escopolamina (fig. 2.5.), por otro lado las investigaciones reportan que las hojas de estas plantas también contienen Norhioscina, apohioscina, oscina, meteloidina, (-)-3 α -tigloiloxi-6 β -acetoxitropano y (-)-3-(2-hidroxi-3-fenilpropioniloxi) tropano (Littorina); mientras que en las raíces además de escopolamina e hiosciamina se encuentran (-)-3 α ,6 β -ditigloiloxitropano, 3 α ,6 β -ditigloiloxitropan-7 β -ol, meteloidina, oscina, y littorina. (Reyna, 2004,)

Fig. 2.4 Estructura química de la atropina.

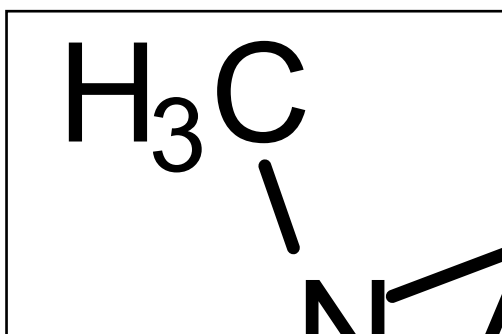


Fig. 2.5 Estructura química de la escopolamina.





2.3 Toxicología de los alcaloides tropánicos atropina y escopolamina presentes en las flores y hojas de la planta *Brugmansia suaveolens*

Toda sustancia tóxica es sometida a diferentes procesos a través de su paso por el organismo humano, estos describen qué sucede con un toxico desde el momento que es administrado hasta su total eliminación del cuerpo. Durante los procesos de absorción, distribución, biotransformación, y eliminación, una droga, independientemente de la vía de administración, debe atravesar unas pocas o muchas membranas biológicas (Remington, 1990).

Se puede decir que todas las sustancias químicas sufren un proceso farmacocinético, el cual está conformado por las siguientes etapas:

Liberación: es el conjunto de modificaciones de estado y de otro tipo que experimenta el tóxico para facilitar su absorción.

Absorción: es el paso del tóxico desde el lugar de administración en el medio externo a la sangre.

Distribución: es el proceso mediante el cual el tóxico pasa de la sangre a los tejidos.

Biotransformación: es el metabolito en el cual se transforma el tóxico para causar su efecto.

Eliminación: es la disminución neta del tóxico en el organismo.



Así mismo la toxicidad de un compuesto está en dependencia de la concentración, dosis administrada y del órgano diana en el cual el metabolito actúa.

Los alcaloides presentan notables propiedades fisiológicas y toxicológicas, que se ejercen fundamentalmente sobre el sistema nervioso central con predominio en alguno de sus niveles. Por estas razones pueden ser usados como fármacos. En el caso de los alcaloides tropánicos, atropina y escopolamina “presentan antagonismo por la acetilcolina, por tanto bloquean más de un tipo de receptor colinérgico” (Remington, 1987). El uso prolongado de alguno de estos compuestos produce adicción, que constituyen verdaderas toxicomanías, con dependencia física y psíquica y un aumento de la tolerancia.

2.3.1 Efectos adversos de los principios activos atropina y escopolamina presentes en las flores y hojas de la planta *Brugmansia suaveolens*

Por la actividad biológica que presentan los alcaloides sobre el sistema nervioso central, son considerados como droga, si bien unos afectan el sistema parasimpático como es el caso de la atropina y escopolamina, otros pueden afectar el sistema simpático, esto depende de la concentración, estructura y del tipo de alcaloide.



Los efectos de las drogas antimuscarínicas en conjunto son fácilmente predecibles considerando las consecuencias de la interrupción de la estimulación nerviosa parasimpática (y colinérgica simpática). Así, los efectos son disminución de la motilidad gastrointestinal, reducción de la secreción gástrica, sequedad de la boca, sequedad de la membrana mucosa en general, midriasis, pérdida de acomodación (y una tendencia a aumentar la presión intraocular), retención urinaria, disminución de la sudoración y enrojecimiento cutáneo compensador, dilatación bronquial y biliar, taquicardia, (aunque el bloqueo efectivo de los nervios inhibitorios cardíacos es difícil de alcanzar), etc. Algunos antimuscarínicos tienen acción importante sobre el sistema nervioso central (Remington, 1990).

La atropina y la escopolamina son alcaloides que se encuentran en todos las plantas del género *Brugmansia*, encontrándose en mayor concentración en las flores, siendo esta la razón principal por la cual las flores son utilizadas en la medicina tradicional.

La farmacología de los alcaloides tropánicos es muy conocida; la escopolamina tiene efecto depresivo sobre el sistema nervioso central, en tanto que la atropina produce alucinaciones, fenómeno tóxico que puede durar más de 48 horas (Gupta, 1995).



2.3.1.1 Atropina

En conjunto se emplea más la atropina que la escopolamina ya que, a las dosis utilizadas clínicamente apenas tiene efectos centrales (Flores et al, 2004).

La intoxicación atropínica es una causa frecuente de intoxicaciones clínicas, especialmente en niños pequeños, por consumo de té que contiene este alcaloide. Los casos fatales son raros, pero a veces son ocurridos en niños en los cuales 10 mg o menos pueden resultar letales. Su diagnóstico puede confirmarse con la administración de 1 mg de Fisostigmina, de no aparecer las reacciones características de sialorrea, sudoración e hiperactividad intestinal (Gemosén, 1998)

La atropina como droga anticolinérgica, es más potente en el miocardio, músculos intestinales y bronquiales, ésta no deprime el sistema nervioso central, con dosis terapéuticas. Estimula bulbo y centros superiores. Aumenta la frecuencia de la respiración y en ocasiones la profundidad de la respiración. También se pueden presentar síntomas de taquicardia, dificultad para respirar, confusión, mareos, dolor de ojos, convulsiones, somnolencia, sequedad de boca, nariz o garganta, fiebre, alucinaciones, excitación, nerviosismo, irritabilidad, visión doble. (Instituto de Salud Pública de Chile, 2007)



2.3.1.2 Escopolamina

La escopolamina tiene un mayor efecto depresor que la atropina y su acción antiemética se atribuye al bloqueo de los receptores colinérgicos muscarínicos en el área postrema o en el núcleo asociado del complejo vagal dorsal. La escopolamina también es un potente inhibidor de los movimientos gastrointestinales, relajando el tacto gastrointestinal y estos efectos pueden constituir una aportación modesta a la acción antiemética (Curtis et al, 1998)

Por otro lado, la escopolamina bloquea las funciones colinérgicas en el sistema límbico y corteza asociada, relacionados con aprendizaje y memorización. Los efectos colaterales (aún en dosis terapéuticas), de la escopolamina incluyen euforia, trastornos de la elocución, de la locomoción y de la sensibilidad, con depresión del sistema nervioso central, caracterizado por somnolencia, amnesia, fatiga, sueño sin actividad onírica, con reducción de la REM; pero en ocasiones produce excitación, inquietud, alucinaciones, y delirio; estos síntomas excitatorios solo aparecen con dosis tóxicas de escopolamina, que pueden ser seguidos (en este último caso), por un cuadro de depresión que conduce al colapso circulatorio e insuficiencia respiratoria, parálisis y coma (Gemosen, 1998).

La escopolamina se diferencia de otras drogas antimuscarínicas en que en dosis terapéuticas es un sedante y tranquilizante depresor del sistema nervioso central. En sus acciones periféricas la escopolamina difiere de la atropina en que es un agente bloqueante más fuerte del iris, cuerpo ciliar y glándulas salivales, bronquiales y sudoríparas, pero es más débil en su acción sobre el corazón (sobre el cual no ejerce ninguna acción con las dosis toleradas), el tracto gastrointestinal y la mucosa bronquial (Remington, 1990).



Con excepción de la somnolencia, los efectos colaterales de la escopolamina son los correspondientes a las drogas antimuscarínicas con estructura de aminas terciarias (Remington, 1990).

2.3.2 Causa de la toxicidad de la atropina y escopolamina

Se denomina toxicidad a la actividad tóxica concreta y específica, vinculada a la estructura química de una sustancia exógena al organismo (Gutiérrez, 2001). La toxicidad puede ser afectada por muchos factores diferentes, como la vía de administración, el tiempo de exposición, el número de exposiciones la forma física de la sustancia, y la salud del individuo.

Los alcaloides tropánicos son drogas anticolinérgicas, que se combinan con los receptores muscarínicos, (acetilcolinesterasa), compitiendo con la acetilcolina, combinándose en mayor proporción con los receptores y creando inestabilidad en el cuerpo (Remington, 1990).

Las drogas antimuscarínicas con estructura de aminas terciarias, como es el caso de la atropina y escopolamina, “en sus formas no ionizadas, pueden penetrar las membranas celulares, por lo tanto, atravesar la barrera hematoencefálica. En el cerebro pueden ejercer tanto acciones terapéuticas como tóxicas” (Remington, 1990).

El efecto producido por los alcaloides presentes en la *Brugmansia suaveolens*, se deben principalmente a que estos bloquean las funciones colinérgicas en el sistema límbico y corteza asociada, relacionados con aprendizaje y memorización. Estos alcaloides inhiben la acción de la acetilcolina, es decir el organismo no responde a las acciones locomotoras.



2.3.3 Metabolismo y excreción de la atropina y escopolamina

Toda sustancia cuando entra al organismo sufre un proceso metabólico (anabolismo y catabolismo). El proceso catabólico (descomposición en sustancias más sencillas) que presentan los alcaloides está dado por la hidrólisis que sufren al entrar al organismo.

El máximo efecto de los alcaloides tropánicos se alcanza durante 1 a 2 horas de su absorción, la atropina y escopolamina se absorben bien en el tubo digestivo (t_{\max} 1 hora), difunden a todos los tejidos, atraviesan las barreras hematoencefálica y placentaria, y aparecen en la leche materna. Penetran también a través de las mucosas, por ejemplo, la conjuntival. Aunque la absorción por la piel es menor, se emplea actualmente la pomada de escopolamina para conseguir una absorción lenta y mantenida en la prevención de náuseas y vómitos. Los derivados con nitrógeno cuaternario se absorben mucho menos y penetran con dificultad la barrera hematoencefálica. La atropina se fija a proteínas en un 50%, presenta una semivida de 2,5 horas y se elimina, en su mayor parte, por la orina durante las primeras 12 horas. En cuanto la escopolamina en forma de pomada, la absorción es lenta y constante, asemejándose a una administración IV lenta. (Flores, 2004)

La atropina por acción tópica penetra fácilmente en el ojo... la vida media en el ojo es prolongada y sus efectos pueden persistir durante 7 a 12 días, pero la inflamación intraocular acorta este período (Remington, 1990)



2.4 Uso farmacológico de las flores y hojas de la *Brugmansia*

Las hojas, las flores y especialmente las semillas de estas especies de plantas contienen alcaloides tropánicos, muy conocidos desde el punto de vista de la farmacología médica; entre los que se destacan la escopolamina, utilizada en forma de bromohidrato como sedante e hipnótico de las zonas sensitivas motoras; se emplea para tratar excitaciones maniáticas agudas, en los síndromes del parkinsonismo postensenfálico, para aumentar el efecto hipnótico de la morfina antes de la anestesia general, en el tratamiento de alcohólicos y morfinómanos, para combatir mareos, asma bronquial y reumatismo articular. Midriático en oftalmología (Restrepo, 2005).

Las hojas y flores en pequeñas cantidades se utilizan para calmar cólicos. Las flores ligeramente soasadas se emplean para evitar infecciones e inducir la cicatrización de heridas. Su uso indiscriminado es altamente riesgoso, por sus compuestos narcóticos y venenosos (Restrepo, 2005).

Por otra parte la medicina popular en Nicaragua consigna el empleo de las flores de la *Brugmansia* para el tratamiento del asma bronquial, mediante administración por vía inhalatoria en forma de cigarrillos fabricados con el material vegetal seco, y también como analgésico, en aplicación tópica sobre heridas y úlceras.

Además las flores de la *Brugmansia* se puede utilizar en otras partes de la medicina para tratar enfermedades tales como: disminuir la bradicardia, en la odontología se utiliza para disminuir la secreción salival, para tratar la cinetosis (mareo por movimiento), por sus efectos en el sistema nervioso central (SNC) se utiliza para disminuir los síntomas del mal de párkinson, disminuye tono, motilidad, cólicos renales y cólicos biliares.



Actualmente la atropina se comercializa con el nombre de sulfato de atropina, Este medicamento es utilizado en el tratamiento sintomático de los espasmos intestinales, del cólico renal, cólico biliar y dismenorrea. Tratamiento sintomático de la sudoración y salivación excesivas.

La escopolamina es comercializada como antiespasmódico en forma de bromhidrato y se utiliza para el tratamiento de espasmos de origen intestinal, biliar, renal y del aparato genital femenino, y en otras condiciones determinadas por su médico.

Tabla 2. 1 Aplicación comparada de la atropina y la escopolamina

Aplicación	Dosis (mg)	
	Atropina	Escopolamina
Antiespasmódica en hipermotilidad gastrointestinal	0.3-1.2	-
Antiparkinsoniano	0.3	0.3-1.0
Antisialagogo	0.2-0.6	-
Sedante	-	0.6
Pre anestésico	1.5-2	0.2-0.6
Envenenamiento por anticolinesterasa	1-2	-
Cinetosis	-	0.2-0.8
Antiemética ó amnésica	-	0.3-0.65

Fuente: Remington, 1990, p.1251



2.5 Técnicas de extracción e identificación de los principios activos en las flores de la *Brugmansia*

La propiedad química más característica de los alcaloides es su basicidad, por lo que los métodos para aislarlos, purificarlos e identificarlos por lo general aprovechan su basicidad aunque muchos alcaloides pueden extraerse con disolventes neutros, como alcoholes y cloroformo, es frecuente extraerlos con soluciones de ácido en agua, con lo cual se separan los alcaloides de sus sales (Domínguez, 1979).

La mayoría de los alcaloides se hallan en los vegetales como sales de ácidos orgánicos... otros se hallan en forma de ésteres de ácidos orgánicos de complejidad variable por ejemplo los del grupo tropano, del senecio y de la yohimbina. Aunque con frecuencia se agrupan los alcaloides de acuerdo con su procedencia botánica (Domínguez, 1979). La basicidad en los alcaloides se debe a los compuestos nitrogenados (grupos amino) presentes en su estructura. Los alcaloides de origen vegetal se encuentran en forma de sales solubles en soluciones acuosas o hidroalcohólicas. Debido a las características antes mencionadas se les puede agregar una base a las sales de los alcaloides, los cuales son liberados y se extraen con un solvente orgánico polar.



2.8 Propiedades fisicoquímicas de los alcaloides

Los alcaloides tienen masas moleculares que varían entre 100 y 900 (coniína $C_8H_{17}N=127$, vincristina $C_{46}H_{56}N_4O_{10}=824$); son casi siempre incoloros a excepción de aquellos altamente conjugados como berberina (amarillo), sanguinarina (rojo), urabaina (verde) y oxoaporfina que van de amarillo a rojo; son normalmente sólidos a temperatura ambiente, algunas bases no oxigenadas como la coniína, la nicotina y la esparteína que son líquidas; con algunas excepciones como la arecolina que es oxigenada y líquida; los alcaloides base son poco solubles en agua (Arango, 2008). La mayoría de los alcaloides se biosintetizan a partir de aminoácidos. Sin embargo, hay algunos que no lo hacen de esta forma, como es el caso de los esteroides y los diterpénicos.

La presencia de oxígeno en la estructura determina que la sustancia sea un sólido blanco, de sabor amargo y cristizable. La ausencia de oxígeno en la estructura del alcaloide hace que éste sea aceitoso y volátil.

Los alcaloides tropánicos derivados del tropanol, son esterificados con ácidos orgánicos. El principal de estos ácidos es el ácido trópico el cual posee un carbono asimétrico y se forma por un reagrupamiento tipo "Mannich" de la fenilamina luego de una transaminación y posterior reducción (Arango, 2008).



En la *Brugmansia suaveolens* los alcaloides que se encuentran en mayor proporción son los derivados del núcleo tropánico (Figura 2.6) “alcaloides tropánicos”, principalmente atropina ($289,369 \text{ g.mol}^{-1}$, $\text{C}_{17}\text{H}_{23}\text{NO}_3$, punto de fusión de $118 \text{ }^\circ\text{C}$) y escopolamina ($303,353 \text{ g.mol}^{-1}$, $\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{NO}_4$, punto de fusión $197\text{-}194^\circ\text{C}$). “Son ésteres que se hidrolizan a 60°C con hidróxido de bario; la atropina da ácido trópico y tropina, la escopolamina forma ácido trópico y oscina” (Mastandrea, 2008).

Fig. 2.6 Estructura del núcleo tropánico

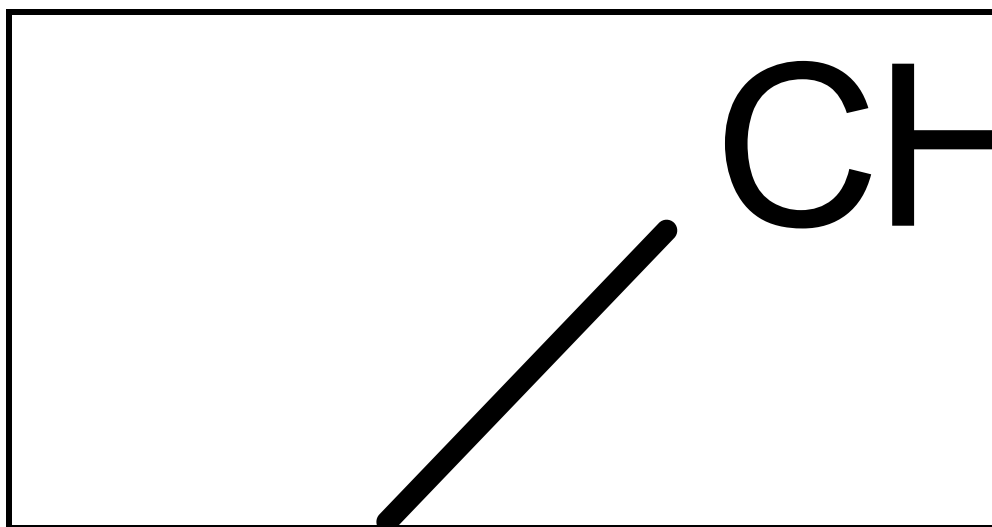


La atropina y escopolamina son alcaloides naturales, ésteres del ácido trópico y de una base nitrogenada terciaria: la tropina en el caso de la atropina o *dl*-hiosciamina, y la escopina en el caso de la escopolamina o *l*-hioscina (Flores, 2004)



Estos dos alcaloides tropánicos poseen una estructura bicíclica hidroxilada, esterificada con ácidos orgánicos, que se origina por la condensación de un anillo pirrolidínico y otro piperidínico, compartiendo dos átomos de carbono. El anillo piperidínico presenta una conformación en forma de silla. La disposición espacial del grupo alcoholístico situado sobre el C₃, determina la existencia de dos tipos de estructuras tropánicas: 3- α -hidroxitropano o tropanol (hiosciamina, atropina, escopolamina) y 3- β -hidroxitropano o pseudotropanol (cocaína, tropococaína) (Mastandrea, 2008).

Fig. 2.7 Estructura del Tropanol y Pseudotropanol



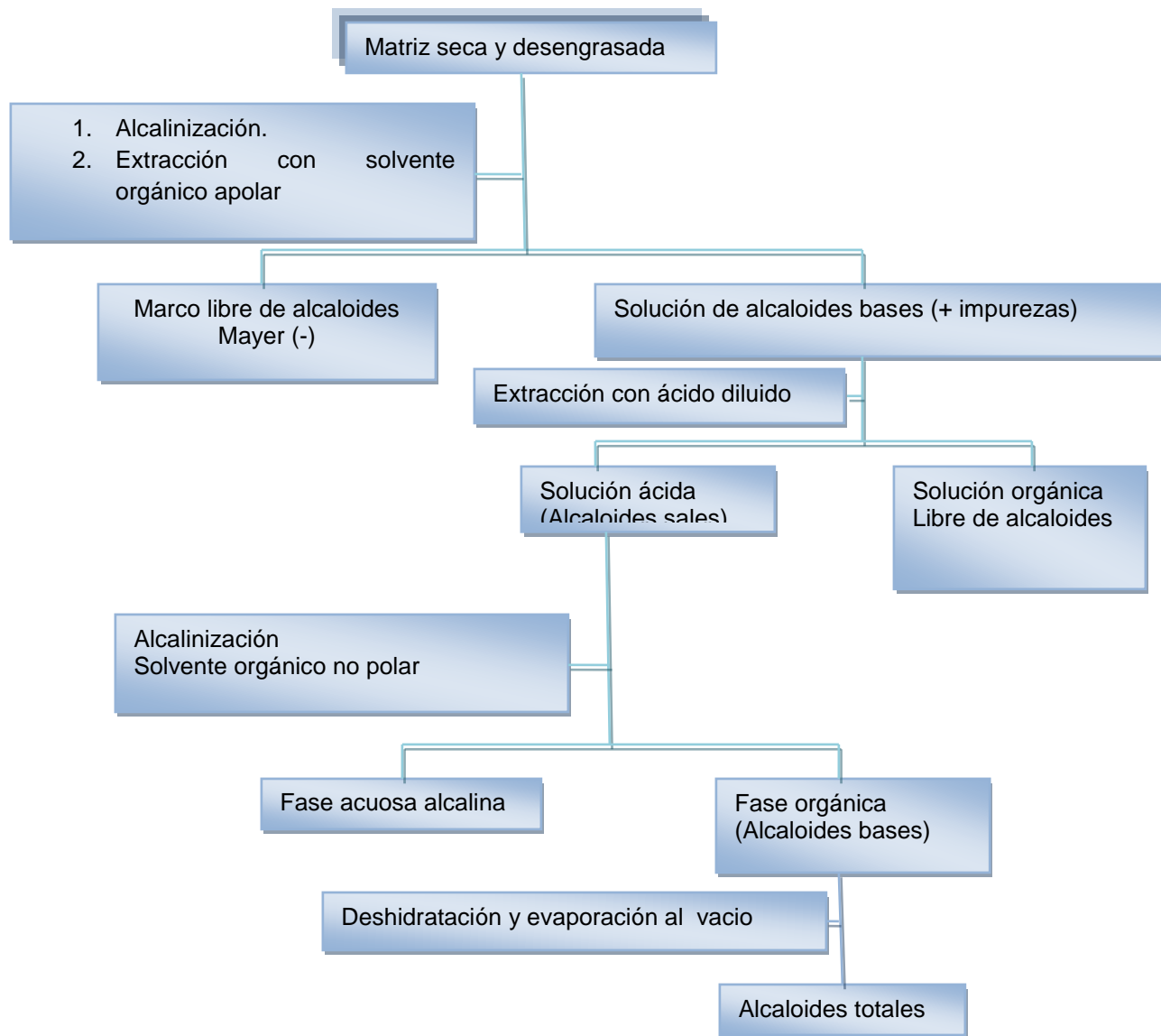


2.6.1 Extracción de alcaloides en medio básico

- a) La matriz pulverizada y desengrasada se mezcla con una solución alcalina que desplaza los alcaloides de sus combinaciones salinas; las bases liberadas son enseguida solubilizadas en un solvente orgánico medianamente polar (Arango, 2008).
- b) El solvente orgánico conteniendo los alcaloides bases, es separado y concentrado a presión reducida, luego se agita con una solución acuosa ácida, donde los alcaloides se solubilizan en su forma de sales, mientras que otras sustancias que se encuentren en el extracto como pigmentos, esteroides y otras impurezas restan en la fase orgánica (Arango, 2008).
- c) Las soluciones acuosas de las sales de alcaloide son alcalinizadas y extraídas con un solvente orgánico no miscible en agua; el solvente orgánico es deshidratado sobre una sal anhidra, filtrado y concentrado a presión reducida, el residuo que queda son los alcaloides totales (AT). (Arango, 2008)



Flujograma 2.1. Proceso de extracción de alcaloides en medio básico.



Fuente: Gabriel Jaime Arango Acosta, Facultad de Química Farmacéutica. (UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA, Colombia)



2.6.2 Extracción de alcaloides en medio ácido

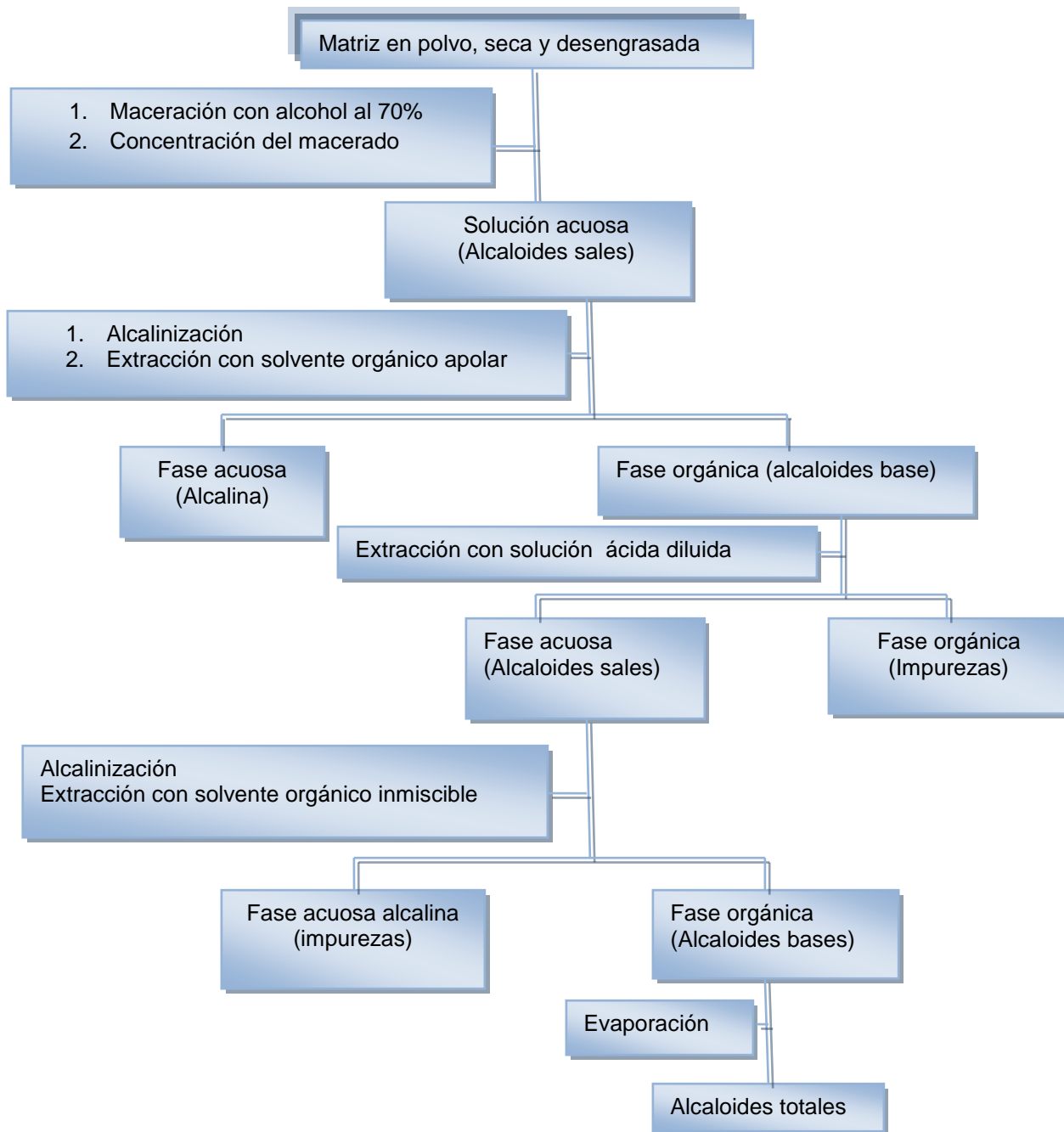
Los alcaloides en estado natural se encuentran en forma de sales solubles en soluciones acuosas o hidroalcohólicas (Arango, 2008)

Si la matriz seca, pulverizada y desengrasada es extraída con agua acidulada o con alcohol o solución hidroalcohólica acidulada, tendremos extractos de alcaloides en forma de sales. En estos casos los extractos pueden ser tratados de diferentes formas:

- a) alcalinización y extracción de los alcaloides base, con un solvente orgánico no miscible.
- b) fijación de los alcaloides sobre resinas intercambiadoras de iones para luego separarlas por elución con ácidos fuertes.
- c) precipitación de los alcaloides en forma de yodomercuriatos con el reactivo de Mayer concentrado; el complejo formado es recuperado por filtración o centrifugación, luego se redisuelve en una mezcla de agua-alcohol-acetona y se separan los alcaloides haciéndolos pasar sobre resinas intercambiadoras de iones (esta técnica es particularmente útil para alcaloides de amonio cuaternarios).



Flujograma 2.2. Proceso de extracción de alcaloides en medio ácido.



**Fuente: Gabriel Jaime Arango Acosta, Facultad de Química Farmacéutica.
(UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA, Colombia)**



2.6.3 Extracción de alcaloides asistida por ultrasonido

Para obtener un extracto es importante identificar la hierba deseada y la parte que contiene los constituyentes útiles. Adicionalmente, la determinación de una técnica precisa de cosecha y métodos de preservación de la planta por utilizar es de crucial importancia. El mecanismo de extracción involucra dos fenómenos físicos: difusión a través de la pared celular y el lavado de los contenidos celulares, una vez que las paredes se han roto (Azuola et al, 2007).

La extracción asistida por ultrasonido utiliza sonidos de alta frecuencia, con el fin de desprender el compuesto buscado del material vegetal. Las partículas sólidas y líquidas vibran y se aceleran ante la acción ultrasónica, como resultado el soluto pasa rápidamente de la fase sólida al solvente (Azuola et al, 2007). Esta técnica es la más económica y tiene los requerimientos instrumentales más bajos entre las últimas técnicas de extracción desarrolladas.

Los fenómenos físicos que afectan la extracción de sustancias se ven afectados por la sonicación, ya sea que las sustancias de interés se encuentren en células internas o externas del tejido. Al reducir el tamaño de las partículas del material vegetal se aumenta el área de exposición al solvente y a la cavitación producida. El ultrasonido además facilita la rehidratación del tejido si se están utilizando materiales secos al abrir los poros, lo cual a su vez incrementa el transporte de masa de los constituyentes solubles por difusión y procesos osmóticos (Azuola, 2007)



2.6.4 Reactivos para la identificación de los alcaloides totales presentes en la planta *Brugmansia suaveolens*

Por la gran heterogeneidad de los alcaloides aparecen numerosas pruebas coloridas o de precipitación que solo son positivas con ciertos tipos de alcaloides, por lo que se han propuesto para clasificaciones parciales; aunque no son suficientes para una clasificación definitiva, reactivos generales de alcaloides. (Domínguez, 1979), entre los cuales se destacan: reactivo de Mayer, reactivo de Dragendorff, reactivo de Wagner, reactivo de ácido silicotúngstico, reactivo de Sonnenschein, reactivo de Scheibler, Reineckato de amonio, reactivo de Marquis y reactivo de Mandelin.

Las soluciones de varios ácidos de metales pesados, como el silicotúngstico, cloroplatinico, fosfomolibdico, forman precipitados con la mayoría de los alcaloides, igualmente el mercuriyoduro de potasio (reactivo de Mayer), el yoduro de bismuto (reactivo de Dragendorff) o el yodo-yoduro de potasio (reactivo de Wagner). Las anteriores soluciones, preparadas en condiciones específicas forman parte de los llamados reactivos de alcaloides (Domínguez, 1979). En este caso los reactivos de Dragendorff y Wagner no son tan específicos para identificar alcaloides ya que pueden formar precipitados con algunas bases nitrogenadas como purina y algunos compuestos complejos que poseen nitrógeno en su estructura, por ejemplo proteínas y algunos polifenoles.



2.6.5 Técnica de separación por cromatografía gaseosa

La cromatografía es la ciencia y el arte de separar entre sí los componentes de una sustancia (Rubinson, 2001). La cromatografía de gases usa, como su nombre lo indica un gas de arrastre como fase móvil, junto con una fase estacionaria en el interior de una columna empacada o tubular abierta (capilar)... La separación se hace por partición de muestras gaseosas entre un gas de arrastre y la fase estacionaria. La muestra debe estar ya en la fase gaseosa (o ser transformada a la fase gaseosa por calentamiento), así que se puede pasar a la corriente del gas de arrastre para recorrer la columna. Se usa un gas de arrastre de gran pureza, químicamente inerte, como nitrógeno, dióxido de carbono, helio o argón, aunque la elección suele estar determinada por la clase de detector que se usa (Higson, 2007).

Los tipos de detectores utilizados en cromatografía gaseosa son los siguientes:

Detector de ionización de llama (FID), detector de captura de electrones (ECD), detector de fotoionización (PID), detector de ionización de helio de descarga pulsada (PHID) detector fotométrico de llama (FPD), detector Hall de conductividad electrolítica (ELCD), detector de nitrógeno-fosforo (NPD).



2.6.6 Espectrometría de masas

La espectrometría de masas es una poderosa técnica microanalítica que se usa para identificar compuestos desconocidos, para cuantificar compuestos conocidos, para elucidar la estructura y propiedades químicas de moléculas ó para determinar el contenido isotópico de diferentes elementos en un mismo compuesto (Melgar, 2009). Un espectro de masas es el registro gráfico de los daños que sufren las moléculas cuando se las bombardea en fase gaseosa por un haz de electrones...Las moléculas de partida se destruyen y se rompen en pedazos. Con los datos obtenidos es posible normalmente identificar estas piezas y después deducir la estructura de la molécula original. (López, 1984)

La espectrometría de masas tiene amplios usos en conjunto con otras técnicas analíticas, como es el caso del uso del espectrómetro de masas como detector en la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y la cromatografía de gases (CG).



III. HIPÓTESIS



III. HIPÓTESIS

En las flores y hojas de la planta *Brugmansia suaveolens* existe diferencia de la concentración de alcaloides tropánicos, atropina y escopolamina.



IV. DISEÑO METODOLÓGICO



4.1 Ubicación del área de estudio

El secado de las muestras se hizo en el laboratorio 107 del “Departamento de Química de la UNAN-Managua Recinto Universitario Rubén Darío”. La extracción de las muestras se realizó en el Centro de Investigación de Recursos Acuáticos de la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua (CIRA-UNAN), laboratorio de contaminantes orgánicos, sección de cromatografía gaseosa, y la inyección de las muestras se efectuó en el Instituto de medicina legal, laboratorio de toxicología forense, área analítica.

4.2 Tipo de estudio

En esta investigación se determinó la concentración de atropina y escopolamina en la *Brugmansia suaveolens*, el estudio se realizó en una sola época del año(verano), por esta razón se dice que la investigación es del tipo descriptivo de corte transversal.



4.3 Universo y muestra

El universo en estudio está constituido por las 5 especies naturales pertenecientes al género *Brugmansia*. En la investigación se estudio una muestra perteneciente a un género, *Brugmansia suaveolens*, de las cuales se tomaron las hojas y flores.

El estudio estuvo constituido por cuatro fases principales:

1. Recolección de muestras (Marzo, 2009)
2. Valoración de muestras en el laboratorio
 - Secado
 - Pulverización de la muestras
 - 2.1 Extracción
 - Tamizado
 - Sonicación
 - Extracción en medio ácido
 - 2.2 Inyección de muestras en el equipo
3. Análisis de datos



4.4 Criterio de selección de muestra

La investigación estuvo enfocada en las hojas y flores de la planta *Brugmansia suaveolens*, debido a que se encuentra distribuida en mayor cantidad en el país, sobre todo en el pacífico, ya que ésta especie se ha adaptado al tipo de suelo y a las condiciones climáticas presentes en nuestra región. Cabe señalar que la planta del género *Brugmansia* que contiene mayor concentración de alcaloides tropánicos es la *Brugmansia sanguínea*, pero ésta no se tomó en el estudio debido a que no se encuentra presente en Nicaragua.

Se decidió tomar los órganos, hoja y flor de la planta *Brugmansia suaveolens*, ya que según estudios realizados anteriormente en Colombia, se determinó que la mayor concentración de alcaloides está presente en estos órganos (Reyna, 2004). En toda la planta se encuentran distribuidos ocho alcaloides del tipo tropánico, pero los que están presentes en mayor concentración en las hojas y flores son atropina y escopolamina, por lo que se decidió determinar y comparar la concentración de éstos.



4.5 Descripción de las variables

Variable	Definición	Categorías	Indicador
Especie	Conjunto de cosas semejantes entre sí por tener uno o varios caracteres comunes.	<i>B. suaveolens.</i>	Genero de la planta
Concentración	Magnitud que expresa la cantidad de una sustancia por unidad de masa	Atropina.	Cantidad de alcaloides, atropina y escopolamina expresada en $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$
		Escopolamina.	
Órgano de la planta	Unidad anatómica formada de varios tejidos, y que desarrolla una función específica en la planta	Hoja	Objeto de estudio
		Flor	



4.6 Localización del punto de muestreo

La recolección de las muestras vegetales, se hizo en el Departamento de Masaya, Municipio Masaya, Barrio la Villa. El punto de muestreo está ubicado en las siguientes coordenadas geográficas; Latitud $11^{\circ}58'40.94''$ Norte, Longitud $86^{\circ}4'43.17''$ Oeste ver figura 10.1 anexo 10.1.

La toma de muestras de las flores y hojas se realizó de la siguiente manera:

- a) Se preparó un termo plástico para depositar las muestras, colocando hielo dentro de un termo grande. Este procedimiento se hizo para disminuir la deshidratación de las flores y hojas
- b) Se forró la parte interna del termo con papel aluminio; para evitar que las flores y hojas tuvieran contacto directo con el agua.
- c) Luego se cortaron las flores y hojas desde la estípula, para no dañar la muestra, y se depositaron en el termo para ser llevadas al laboratorio, donde luego se sometieron al proceso de secado.



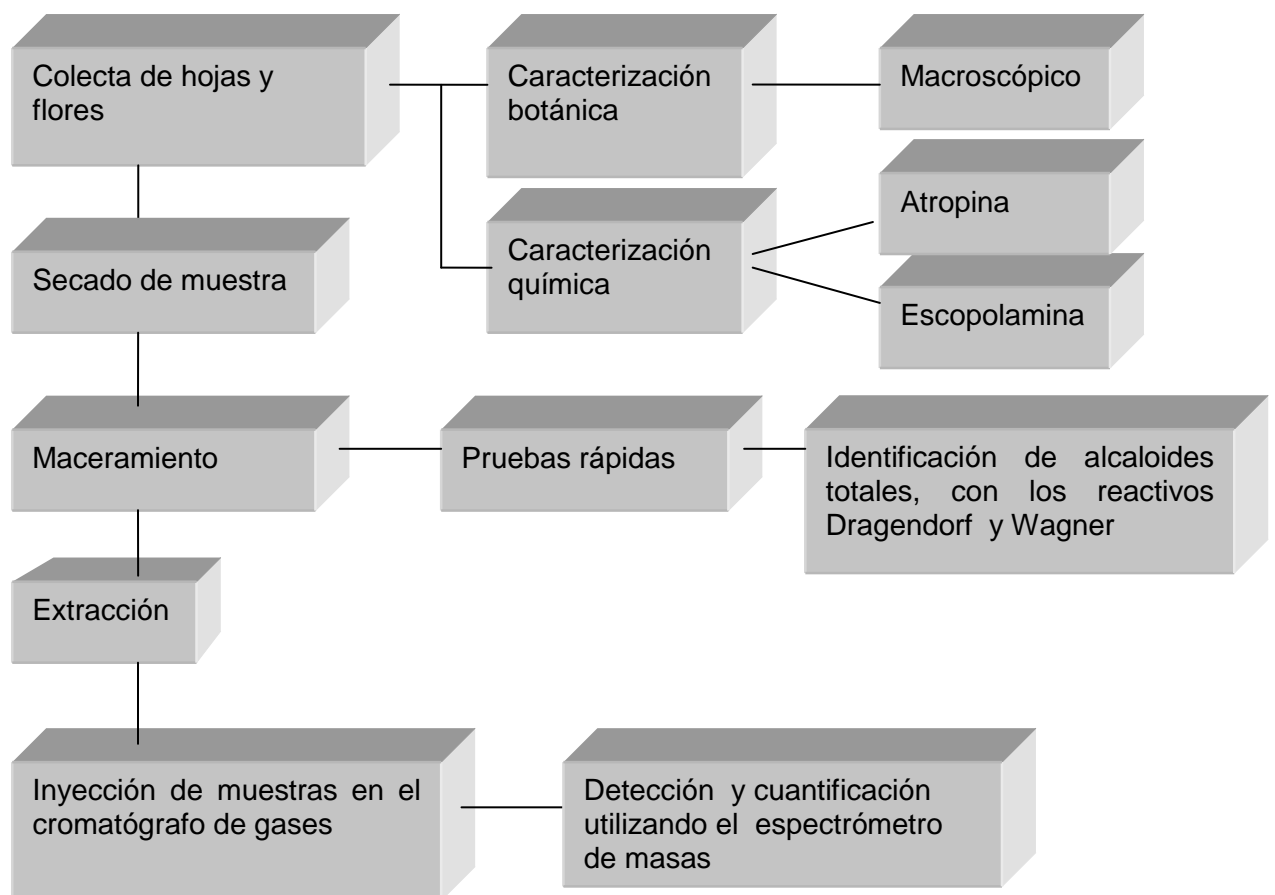
4.7 Materiales utilizados en el procesamiento de datos

4.7.1 Materiales para recolectar información.

Con base en la recolección de información y conocimientos adquiridos por los investigadores, se implementaron instrumentos tales como:

- Documentación bibliográfica: citas textuales, revistas científicas, diagrama de proceso como el que se muestra a continuación.

Diagrama para la caracterización botánica y química de la *Brugmansia suaveolens*.





4.7.2 Reactivos utilizados en el proceso analítico

Los reactivos utilizados en todo el proceso analítico eran de un alto grado de pureza y se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 4.1 Reactivos utilizados en el proceso analítico

Reactivo	Fórmula	Numero de parte	Marca	Pureza
Acido sulfúrico	H ₂ SO ₄	AC12464-0010	Acros Organics	Reactivo
Agua destilada	H ₂ O	---	---	---
Cloroformo	HCCl ₃	C607-4	J & T Baker	HPLC
Cloruro de mercurio (II)	HgCl ₂	1044190050	Merck	Reactivo
Estándar de atropina	C ₁₇ H ₂₃ NO ₃	18936	Fisher	meets USP testing specifications
Estándar de escopolamina	C ₁₇ H ₂₁ NO ₄	S0929-1G	Fisher	meets USP testing specifications
Hexano	C ₆ H ₁₄	H302-4	Fisher	Plaguicida
Hidróxido de amonio	NH ₄ OH	105422	Merck	Reactivo
Metanol	CH ₃ OH	A450-4	Fisher	Plaguicida
Sulfato de sodio	Na ₂ SO ₄	S421-1	Merck	Pro análisis
Yoduro de potasio	KI	7681-11-0	Merck	Pro análisis

4.7.3 Materiales y equipos de laboratorio

La cristalería utilizada en todo el procedimiento analítico fue clase A, el proceso de limpieza de estos materiales se describe en el anexo 10.2 pagina 95. Los materiales y equipo de laboratorio utilizados se describen en la tabla 10.1 del anexo 10.3 pagina 97.



4.8 Valoración de las muestras en el laboratorio

4.8.1 Principio del método

El primer paso en la aplicación de este método consiste en la extracción de alcaloides totales presentes en las flores y hojas de la planta *Brugmansia suaveolens*, esto se hizo con la ayuda de un baño ultrasónico, luego se realizó una extracción líquido-líquido con cloroformo (CHCl_3).

Posteriormente las muestras extraídas y libres de impureza se inyectaron en el cromatógrafo de gases y así poder identificar los alcaloides atropina y escopolamina presentes en la planta. Finalmente lograr calcular la concentración de estos mediante el uso de estándares de atropina y escopolamina certificados.

También se determinó la concentración real presente en blancos de matrices y blancos reactivos, estos blancos fueron contaminados con una concentración conocida de atropina y escopolamina. Esto se hizo con el objetivo de determinar la eficiencia del proceso de extracción al que se sometieron las muestras.

4.8.2 Secado de muestras en el laboratorio y determinación del porcentaje de humedad

El secado de las muestras se hizo en el laboratorio 107 del Departamento de Química de la UNAN-Managua, para esto se utilizó un horno Lab line, Modelo imperial.



En lo que fue la preparación de las muestras, primero a las flores se les cortó el pedúnculo, mientras que a las hojas se les cortó el pecíolo. Luego utilizando una balanza semianalítica, se pesaron cada una de las muestra de flores y hojas que fueron recolectadas, el proceso de pesado se realizó por duplicado

Posteriormente se procedió al secado de las muestras de hojas y flores. Se colocaron las flores en el horno, de manera ordenada como aparece en la figura 10.3 de los anexos 10.1 página 90 y se calentó durante 26 horas a una temperatura de $40 \pm 5^\circ\text{C}$, luego se colocaron las hojas durante 46 horas en el horno, a la misma temperatura.

Cuando las hojas y flores, estuvieron completamente secas se pesaron nuevamente, este proceso se repite 2 veces hasta obtener un peso constante.

Al obtener el peso de las muestras húmedas y secas se determinó el promedio de las pesadas de las muestras, luego se procedió a calcular el porcentaje de humedad utilizando la ecuación 4.1

$$\% \text{ Humedad} = \frac{\bar{M}mtra \text{ húmeda} - Mmtra \text{ seca}}{\bar{M}mtra \text{ húmeda}} * 100\% \quad (4.1)$$

Donde:

$\% \text{ Humedad}$: Porcentaje de humedad

$\bar{M}mtra \text{ seca}$: Masa promedio de muestra seca (g)

$\bar{M}mtra \text{ húmeda}$: Masa promedio de muestra húmeda (g)

100%: Valor de referencia



4.8.3 Maceración de las muestras secas

En la pulverización de las muestras se utilizó un mortero con su pilón de porcelana. Se colocaron dos flores secas dentro del mortero, luego se maceraron utilizando movimientos circulares, evitando demasiada fricción, para evitar el calentamiento de las partículas de muestra y que no se degraden los alcaloides presentes en esta.

4.8.4 Principios de las pruebas para la identificación de los alcaloides

En general las pruebas para la identificación de alcaloides, consisten en agregar un reactivo de precipitación o de coloración, tal precipitado indica la presencia de una sal soluble del alcaloide.

Un precipitado es un sólido formado a partir de una solución. La mayoría de los precipitados que se encuentran en análisis cualitativos son sales ligeramente solubles formadas por la combinación de iones de una solución saturada la cual temporalmente se sobresatura por la adición de un agente precipitante (*Brumbla. 1983*).



Para la identificación de alcaloides en forma total se aplicó el método rápido de Weeb para alcaloides, que consistió en lo siguiente:

- a) Se tomaron 5 g de muestra, de hojas y flores (pulverizadas) y se depositaron en un erlenmeyer de 50mL, se le agregó suficiente HCl al 1% para formar una suspensión.
- b) Luego se calientó el erlenmeyer en el baño María durante 4 horas, se agitó periódicamente y se dejó enfriar la muestra.
- c) Se filtró la suspensión, y se ensayaron por separado alícuotas 0,2 mL de la suspensión con volúmenes de 0.1 mL del reactivo de Wagner y Mayer.

4.8.5 Proceso de extracción

4.8.5.1 Tamizado de las muestras

Las muestras pulverizadas se pasaron por tamiz con un haz de maya menor de 630 μm (micrómetros), para eliminar las partículas con un diámetro mayor de 630 μm , seguidamente la muestra se homogeniza utilizando el método del cuarteo.



4.8.5.2 Desengrasado.

El polvo de las partes de la plantas (flores y hojas) por separado, se sometieron a extracciones con n-hexano (C_6H_{14}) para eliminar todas las sustancias grasas. El proceso consistió en lo siguiente: se tomaron 150 g la muestra (hojas o flores) y se dejó macerar durante 24 horas en un beaker de 1000 mL que contenía 400 mL de n-hexano calidad cromatografía, luego se decantó el extracto orgánico que contenía las grasas y se conservó el material extractado para su posterior análisis.

4.8.5.3 Extracción de los alcaloides

La extracción del material vegetal se realizó utilizando el método de Kamada con algunas modificaciones donde la muestra se extrae por sonicación y agregando una mezcla, Cloroformo: Metanol: Hidróxido de amonio (15:5:1); El proceso consistió en lo siguiente:

1. Se pesaron 100 mg de muestra, de la siguiente manera; se colocó un beaker de 40 ml en la balanza analítica, se taró la balanza en cero y se depositó la muestra en el beaker hasta completar los 100 mg de muestra.
2. Luego se agregó a la muestra 10 ml de la mezcla $CHCl_3$ (cloroformo): CH_3-OH (Metanol): NH_4OH (hidróxido de amonio), en una proporción de 15mL:5mL:1mL respectivamente, se sonicó durante 10 minutos, y se dejó reposar a temperatura ambiente durante una hora.



3. Se filtró la muestra utilizando un filtro cónico, el filtrado se depositó en un balón fondo plano de 250 mL y se enjuagó el papel filtro con 5 mL de CHCl_3 , y de mismo modo se depositó el lavado en el balón.
4. La muestra se evaporó a sequedad en un rotaevaporador, a una presión de 500 mmHg, y la temperatura del baño se programó a 50 °C.
5. Se enjuagó el balón con 5 ml de cloroformo (CHCl_3), se trasvasó a un embudo de separación de 150 mL, en donde se agregaron 2 mL de ácido sulfúrico H_2SO_4 0.5M y se agitó vigorosamente, durante un minuto. Luego se descartó la fracción orgánica y se ajustó el pH de la fracción ácida entre 10 y 11 al agregar 0.5 mL de NH_4OH al 28%.
6. Se extrajeron los alcaloides con cloroformo (CHCl_3), una vez con 10 mL y dos veces con 5 mL, Las fracciones orgánicas fueron filtradas utilizando sulfato de sodio anhídrido (Na_2SO_4). Se colocó lana de vidrio en un embudo, seguidamente se depositaron aproximadamente 2 g de sulfato de sodio anhídrido (Na_2SO_4) sobre la lana de vidrio, se humedeció el sulfato de sodio anhídrido (Na_2SO_4) con 2 mL de cloroformo (CHCl_3), finalmente se filtraron las fracciones orgánicas y se enjuagó nuevamente el sulfato de sodio (Na_2SO_4) con 5 mL de cloroformo (CHCl_3).
7. Los filtrados se depositaron en un balón fondo plano de 250 mL, y se evaporaron nuevamente a una presión de 450 mmHg y a una temperatura de 40°C hasta obtener aproximadamente 5 mL del extracto, luego se agregaron 20 mL de CH_3OH (metanol) en el balón para hacer cambio de solvente, se evaporó nuevamente la muestra a una presión de 500 mmHg hasta obtener aproximadamente 0.5 ml de filtrado, y se enjuagó el balón con 7 mL de CH_3OH .



8. Seguidamente la muestra se trasladó a un tubo de ensayo donde se reconcentró con nitrógeno, y luego se pasó la muestra a un balón de volumétrico de 2 mL, en donde se aforó con CH₃OH hasta la marca de enrase, finalmente la muestra se trasladó a un vial de 1,5 mL para luego ser inyectada en el cromatógrafo de gases, y de esta forma obtener la lectura correspondiente del analito.

4.8.6 Inyección de muestra en el cromatógrafo de gases

Los extractos se analizaron en un cromatógrafo de gases “Hewlett Packard” 6890 equipado con un sistema de inyección automática y acoplado a un detector de espectrometría de masas “Hewlett- Packard” (GC-MSD), utilizando como gas portador helio (He). Se inyectó un volumen de muestra de 3 µL. El equipo se programó a las siguientes condiciones:

El inyector se programó en modo sin división, a una temperatura de 250 °C

Se utilizó una columna DB5 de 30 m de longitud, 0,25 mm de diámetro y 0,25 µm de grosor de película. La temperatura de la columna se programó a las siguientes condiciones:

- Temperatura inicial 180 °C durante 1 min
- Gradiente de temperatura 4°C/min hasta al alcanzar 250 °C y se mantuvo esa temperatura durante 2 min.
- Tiempo final 20,5 min.

El detector utilizado fue un detector de espectrometría de masas, con un filtro de masas cuadrupolar, temperatura de fuente iónica de 250° C y filamento de la fuente iónica de 70 eV.



El equipo se programó en modo SIM (monitoreo de iones seleccionados), esto permitió detectar específicamente los iones de fragmentación de interés en la muestra. Para lograr esto se buscó en la biblioteca de espectros del equipo los iones principales de fragmentación de la atropina y escopolamina, logrando encontrar que para la atropina los iones de fragmentación aparecieron a 82, 94, 124, 289 (M/z) y para la escopolamina a 42, 94, 108, 138, 154, 303 (M/z).

4.9 Cuantificación de la atropina y escopolamina

Para determinar la concentración de atropina y escopolamina se prepararon una serie de patrones de calibración, las concentraciones a las cuales se prepararon los patrones de calibración se muestran en las tablas 4.3 y 4.4 de la sección 4.10.2. Los patrones se inyectaron en el equipo bajo las condiciones establecidas en la sección 4.8.6. Una vez inyectados los patrones de calibración se graficó la respuesta del instrumento (área) vs la concentración a la que se preparó el patrón, de esta manera se obtuvo una recta correspondiente a la siguiente ecuación:

$$y_0 = a + bx_{(i)} \quad (4.2)$$

Donde:

y_0 : Área corregida del patrón.

b : Pendiente de la recta.

a : Ordenada en el origen.

$x_{(i)}$: Concentración a la que se preparó el patrón ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$).

Una vez construida la curva de calibración se calculó la concentración en $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de atropina y escopolamina presente en las muestras de flores y hojas. Esto se realizó utilizando la ecuación 4.3



$$C = \frac{y-a}{b} \quad (4.3)$$

Donde:

C : Concentración de alcaloide encontrada en la muestra ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$).

Y : Área de la muestra.

b : Pendiente de la recta

a : Ordenada en el origen

Debido a que la matriz en el trabajo es sólida, la concentración de atropina y escopolamina se expresó como microgramo (μg) de alcaloide por gramo (g) de muestra, para lograr esto se multiplicó la concentración encontrada al utilizar la ecuación 4.3, por el volumen de aforo de la muestra entre la masa de muestra por la densidad, asumiendo que esta tiene un valor de 1 g/mL, como lo indica la ecuación 4.4

$$C_{\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}} = \frac{C \times V_a}{M_m (g)} (d) \quad (4.4)$$

Al multiplicar la ecuación 4.4 por el factor de recuperación (100 / % Recuperación) podemos encontrar la concentración real (ecuación 4.5) presente en las flores y hojas.



$$C_{MR} = \frac{C_c \times V_a \times d \times 100\%}{M_m \times \% \bar{R}} \quad (4.5)$$

Donde:

C_{MR} : Concentración real de alcaloide presente en la muestra, determinada en $\mu\text{g/g}$ de atropina o $\mu\text{g/g}$ escopolamina

C_c : Concentración de alcaloide encontrada en la muestra ($\mu\text{g.g}^{-1}$)

V_a : Volumen de aforo final de la muestra (ml)

M_m : Masa de muestra seca (g)

$\% \bar{R}$: Media del porcentaje de recuperación entre: muestra de hoja más agregado y blanco de matriz más agregado

100%: Valor de referencia

d: densidad igual a 1 g/mL

El porcentaje de recuperación (%R) viene dado por la ecuación:

$$\%R = \frac{(C_f - C_U)}{C_A} * 100\% \quad (4.6)$$

Donde:

%R: Porcentaje de recuperación de la muestra.

CF: Concentración del analito medida en la muestra fortificada.

CU: Concentración del analito medida en la muestra sin fortificar.

CA: Concentración del analito adicionada.



4.10 Estándares y soluciones de trabajo

En todo el proceso analítico se utilizaron reactivos de laboratorio calidad reactivo y calidad cromatografica, según fuese el caso, y así lograr obtener resultados confiables. También con el propósito de obtener un buen resultado en los análisis, se utilizaron estándares certificados de atropina y escopolamina trazables. Para la preparación de los estándares y soluciones trabajo se utilizo la ecuación de la dilución (ecuación 4.7).

$$V_i * C_i = V_f * C_f \quad (4.7)$$

Donde:

V_i : Volumen a agregar del soluto.

C_i : concentración del soluto.

V_f : Volumen de solución que se desea preparar.

C_f : concentración final de la solución.

Los cálculos para la preparación de los estándares y las soluciones trabajo se muestran en los anexos 10.6.



4.10.1 Preparación de los reactivos

Para la identificación de los alcaloides totales presentes en las flores y hojas de planta se utilizó el reactivo de Wagner y el reactivo de Mayer, que son reactivos generales para la identificación de alcaloides.

En el proceso de extracción se utilizó una mezcla Cloroformo: Metanol: Hidróxido de Amonio 25 % (10:5:1), también se utilizaron soluciones de H_2SO_4 0,5 M e Hidróxido de Amonio al 28 %, la preparación de estas soluciones se describe a continuación:

- Preparación del reactivo de Mayer.

Se disolvieron 1,36 g de (cloruro de mercurio II) HgCl_2 en 60 mL de agua destilada, luego se disolvieron 5 g de yoduro de potasio (KI) en 10 mL de agua destilada, se juntaron las dos soluciones y se aforaron a 100 mL con agua destilada.

- Preparación del reactivo de Wagner

Se disolvieron 1,27 g de yodo (I_2) y 2 g de KI en 20 mL de agua, seguidamente la solución se aforó a 100 mL con agua destilada.

- Preparación del H_2SO_4 0,5 M

Se prepararon 25 mL de H_2SO_4 0,5 M a partir de H_2SO_4 concentrado de la siguiente manera: se tomó un balón de 25 mL y se agregó una cama de agua destilada de aproximadamente 5 mL, luego se agregaron 0,7 mL de H_2SO_4 concentrado, y se aforó hasta la marca de enrase.



- Preparación NH₄OH 25 y 28 %

Los volúmenes utilizados para la preparación de las soluciones de NH₄OH se presentan en la siguiente tabla:

Tabla 4.2 Preparación del NH₄OH

C. NH ₄ OH (%)	V. NH ₄ OH (mL)	V. final (mL)	Disolvente
25	43.1	50	Agua
28	9.66	10	

C. NH₄OH: Concentración a la que se preparó el NH₄OH

V. NH₄OH: Volumen agregado de NH₄OH (concentrado)

V. Final: Volumen de aforo final

4.10.2 Preparación de los estándares

La preparación de los estándares de atropina y escopolamina se realizó a partir de una solución madre de 1000 mg.L⁻¹, a partir de esta se preparó una mezcla atropina-escopolamina a una concentración de 200 mg.L⁻¹, para luego preparar los estándares que se utilizaron en la elaboración de la curva de calibración para la cuantificación de atropina y escopolamina.

Preparación de la solución madre de Atropina y Escopolamina 1000 mg.l⁻¹

Se pesaron de manera individual, utilizando una balanza analítica 10 mg de los estándares sulfato de atropina (C₃₄H₄₈N₂O₁₀S) y clorhidrato de escopolamina. Luego cada uno se aforó a un volumen de 10 mL utilizando metanol como solvente.



Preparación de la mezcla Atropina-Escopolamina 200 mg.L⁻¹

Se tomó 1 ml de la solución madre de atropina y 1 mL de la solución madre de escopolamina, se agregaron a un balón de 5 mL y luego se aforó el balón hasta la marca de enrase.

Tabla 4.3. Preparación de la curva de calibración de la atropina.

C_{std}. Atropina (mgL⁻¹)	V. añadido (µL)	Volumen de aforo (mL)	Solvente
5	50	2	Metanol
10	100	2	
20	200	2	
30	300	2	
40	400	2	
50	500	2	

V. Tomado: Volumen añadido de la mezcla Atropina-Escopolamina 200mg.l⁻¹

C_{std}. Atropina: Concentración del estándar de atropina (mg.l⁻¹)



Tabla 4.4. Preparación de la curva de calibración de la escopolamina

C _{std.} Escopolamina (mg.L ⁻¹)	V. Tomado (μL)	Volumen de aforo (mL)	Solvente
5	50	2	Metanol
10	100	2	
20	200	2	
30	300	2	
40	400	2	
50	500	2	

V. Tomado: Volumen en microlitros (μL) tomado de la mezcla

Atropina-Escopolamina 200mg.L⁻¹

C_{std.} Atropina: Concentración del estándar de escopolamina (mg.L⁻¹)

4.11 Herramientas estadísticas para la determinación de la incertidumbre en los resultados

Para determinar los errores tanto sistemáticos como aleatorios presentes en algunas de las etapas del método analítico utilizado en esta investigación, y poder determinar el intervalo de confianza de las concentraciones de atropina y escopolamina encontrada en las muestras de hojas y flores, se decidió aplicar algunas herramientas estadísticas que facilitan la estimación de estos errores inevitables.



4.11.1 Contraste de correlación significativa

Al aplicar esta prueba logramos determinar si el coeficiente de correlación calculado a partir de la respuesta de medición de los patrones de calibración es verdaderamente significativo, es decir determinar si la curva de regresión obtenida es lineal, esto se evalúa al hacer un contraste t como lo demuestra la siguiente ecuación:

$$t = \frac{|r|\sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r^2}} \quad (4.8)$$

El valor de t calculado se comparó con un valor t crítico el cual se determinó a partir de la tabla presente en el anexo 10.4 a (n-2) grados de libertad. También tomamos como hipótesis nula (H_0) lo siguiente: no existe correlación significativa entre los datos ($H_0 = \text{correlación } 0$).

Si se determina que el t calculado < t crítico se acepta la hipótesis nula, de lo contrario se rechaza.



4.11.2 Intervalo de confianza de la curva de regresión lineal para la cuantificación de atropina y escopolamina

Para poder determinar el intervalo de confianza de las curvas de regresión lineal se determinó el error típico XY (S_y), la varianza residual de x (S_{xx}) y la varianza residual de y (S_{yy}) para cada una de las curvas.

$$S_{yy} = \sum Y^2 - \left[\frac{(\sum Y)^2}{n} \right] \quad (4.9)$$

$$S_{xx} = \sum X^2 - \left[\frac{(\sum X)^2}{n} \right] \quad (4.10)$$

$$S_y = \sqrt{(S_{yy} - b^2 S_{xx}) / (n - 2)} \quad (4.11)$$

Luego de haber obtenido los valores de S_{yy} , S_{xx} , S_y se determinó intervalo de confianza de las curvas de regresión lineal, para esto se utilizó el método de Meier y Zünd, por tanto se aplicaron las siguientes ecuaciones:

$$Y_0(i) = \pm LC \ 95\% \quad (4.12)$$

$$LC \ 95\% = S_y \cdot t. \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{[X(i) - \bar{X}]^2}{S_{xx}}} \quad (4.13)$$

$$Y_0(i) = \pm S_y \cdot t. \sqrt{\frac{1}{n} + [X(i) - \bar{X}]^2 / S_{xx}} \quad (4.14)$$



El valor Y_0 (i) es el valor corregido de Y (área corregida), se calculó utilizando la ecuación de la regresión lineal ecuación (4.2), LC 95% es el límite de confianza de la curva con 95% de confiabilidad.

4.11.3 Límite de detección y límite de cuantificación de las curvas de regresión lineal

Para determinar el límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ) se aplicó el método de Miller y Miller (ecuación 4.15 y 4.16), con este método se logró determinar el área mínima detectable y cuantificable por el equipo.

$$LOD = a + 3S_y \quad (4.15)$$

$$LOQ = a + 10S_y \quad (4.16)$$

Luego las áreas obtenidas se sustituyeron en la ecuación 4.17 y 4.18 respectivamente, de esta manera se pudo determinar la concentración mínima detectable (X_{LOD}) y la concentración mínima cuantificable (X_{LOQ}).

$$X_{LOD} = \frac{LOD - a}{b} \quad (4.17)$$

$$X_{LOQ} = \frac{LOQ - a}{b} \quad (4.18)$$



4.11.4 Determinación del error aleatorio de la concentración

Cuando se utilizan las curvas de regresión lineal para la determinación de concentración de algún compuesto es necesario estimar el error asociado a la concentración. En este caso la incertidumbre se determinó en función de los errores residuales de la curva.

En esta investigación la incertidumbre de los resultados se determinó mediante la aplicación de la ecuación de Meier y Zund para determinar el error en la concentración de cada una de las muestras mediante la estimación del error global asociado a la curva de calibración (ecuación 4.19).

$$S_{x0} = \frac{S_y}{b} \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{(y_0 - \bar{y})^2}{b^2 \sum_i (x_i - \bar{x})^2}} \quad (4.19)$$

4.11.5 Límite de confianza en la concentración de las muestras

Para establecer de manera razonable el intervalo en el cual se encuentra el valor verdadero de concentración, se procedió a determinar el límite de confianza de la media. Al aplicar el test Miller y Miller (ecuación 4.20) se establecieron los límites de confianza de media con un 95% de confiabilidad.

$$\bar{X} \pm t_{n-1} \frac{s}{\sqrt{n}} \quad (4.20)$$



4.11.6 Comparación de medias

Para determinar si realmente existe diferencia significativa entre la concentración de atropina y escopolamina presente en las flores y hojas de la *Brugmansia suaveolens* se aplicó la prueba t para comparación de medias con desviaciones estándar diferentes, según Miller y Miller (ecuación 4.21). Los grados de libertad se pueden calcular utilizando la ecuación (4.22). En esta investigación los cálculos se hicieron utilizando el software estadístico MINITAB 15.

$$t = \frac{(\bar{X}_1 - \bar{X}_2)}{\sqrt{\frac{S_1^2}{n_1} + \frac{S_2^2}{n_2}}} \quad (4.21)$$

$$\text{Grados de libertad} = \frac{\left(\frac{S_1^2}{n_1} + \frac{S_2^2}{n_2}\right)^2}{\left(\frac{S_1^4}{n_1^2(n_1 - 1)} + \frac{S_2^4}{n_2^2(n_2 - 1)}\right)} \quad (4.22)$$

Tomando como hipótesis nula:

H₀:

La concentración de atropina y escopolamina presente en muestras de flores es igual a la concentración de atropina y escopolamina presente en muestras de hojas (H₀: μ_{flores} = μ_{hojas}).



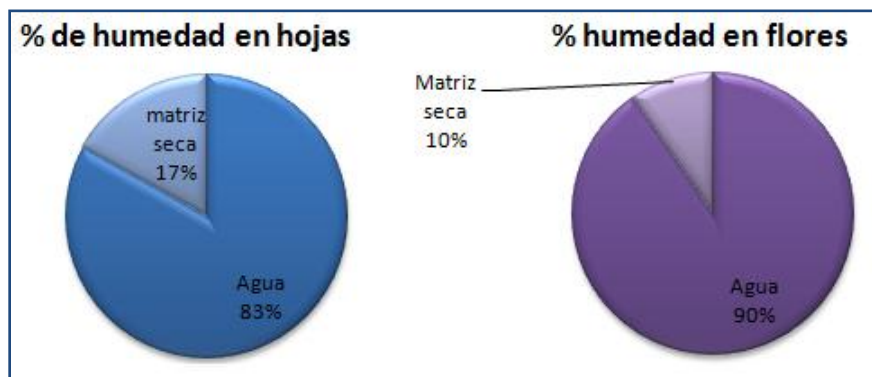
V. RESULTADOS



5.1 Determinación del porcentaje de humedad

El cálculo del porcentaje de humedad se realizó para determinar la concentración de atropina y escopolamina presente en muestras húmedas. Para esto fue necesario conocer el peso húmedo de la muestra y el peso seco de la misma. El porcentaje de humedad promedio encontrado en hojas fue de $83,07 \pm 0,96 \%$ y $90,43 \pm 1,56 \%$ en flores.

Fig. 5.1 Porcentaje de humedad de las flores y hojas de la *Brugmansia suaveolens*



5.2 Prueba para la identificación de alcaloides totales

Para verificar la presencia de alcaloides en muestras de flores y hojas de la *Brugmansia suaveolens* se utilizó el método rápido de Weeb para alcaloides, y al realizar el ensayo con el reactivo de Mayer se logró observar la formación de un precipitado color blanquecino (anexo 10.1 figura 10.5), y la formación de un precipitado marrón al agregar el reactivo de Wagner. Ambas pruebas reflejaron resultados positivos, esto indicó efectivamente la presencia de alcaloides en las flores y hojas de la planta.

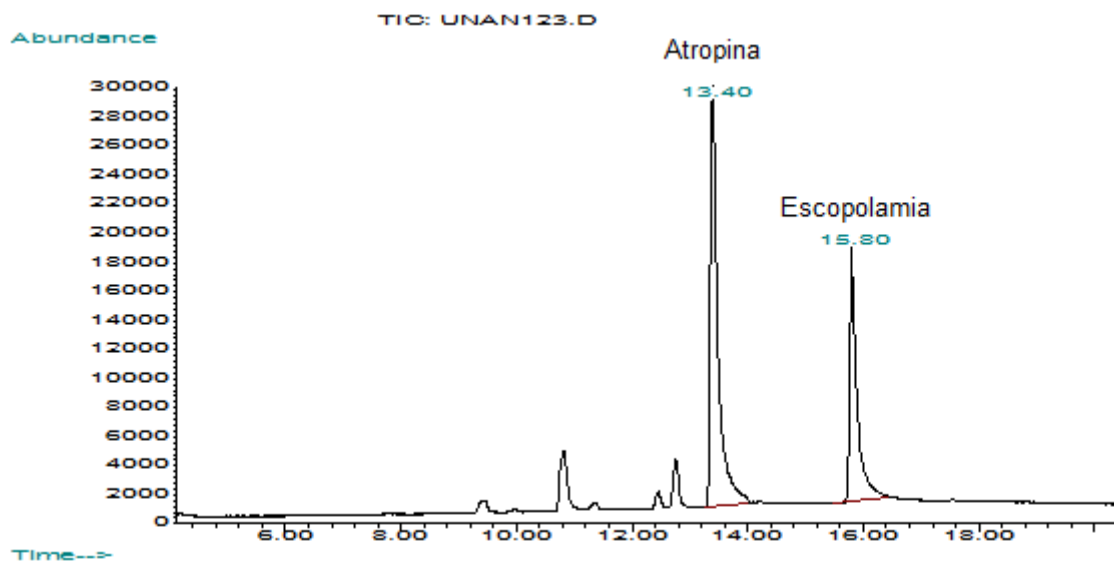


5.3 Análisis del extracto de las hojas y flores de la *Brugmansia suaveolens*

Los extractos de las muestras de hojas y flores de la *Brugmansia suaveolens* fueron analizados utilizando un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas para la identificación estructural de los alcaloides, comparando los patrones de fragmentación con la base de datos del equipo.

Al inyectar los patrones de referencia de atropina y escopolamina estos presentaron tiempos de retención de 13,40 minutos y 15,82 minutos respectivamente, con una ventana de $\pm 0,05$ minutos Figura 5,2.

Figura 5.2 Cromatograma de mezcla atropina-escopolamina a $50 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$





Según los resultados reflejados por el equipo, se comprobó la presencia de atropina y escopolamina en las muestras de hojas y flores de la *Brugmansia suaveolens*, al observar que los iones principales de fragmentación aparecen a 82, 94, 124, 289 (M/z) para atropina y 42, 94, 108, 138, 154, 303 (M/z), para escopolamina, como se muestra en el anexo 10.1 figura 10.10 y 10.11 respectivamente. De acuerdo a la biblioteca de espectros del equipo, esos son los iones de fragmentación correspondientes para la atropina y escopolamina.

Al comparar los tiempos de retención de los picos de la atropina y escopolamina en las muestras con los tiempos de retención de los picos de atropina y escopolamina de los estándares se observó que los tiempos de retención de las muestras corresponden con los estándares. De esta manera confirma la presencia de atropina y escopolamina en las muestras

5.4 Concentración de Atropina y Escopolamina presente en las muestras de flores y hojas

Utilizando la ecuación 4.5 se logró determinar la concentración real de atropina y escopolamina presente en las muestras de flores y hojas de la *Brugmansia suaveolens*. Las concentraciones promedio que se obtuvieron en las muestras fueron las siguientes:

Atropina en muestras de flor $643,50 \pm 54,98 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$; Atropina en muestras de hoja seca $428,02 \pm 12,89 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$; Escopolamina en muestras de flor seca $1582,77 \pm 77,82 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$; Escopolamina en muestras de hoja $611,61 \pm 24,50 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. Los resultados de cada una de las muestras se presentan la tabla 5.1 y 5.3.



Tabla 5.1 Concentración de atropina encontrada en muestras de flores y hojas de la *Brugmansia suaveolens*.

ATROPINA						
Matriz	Código de la muestra	Área de la muestra	Volumen de aforo final (mL)	Masa de la muestra seca (g)	Concentración ($\mu\text{g/mL} \pm s_{x_0} \cdot t_{(n-2)}$)	Concentración real ($\mu\text{g/g}$)
Flor	F1	1732514	4	0,10	$16,41 \pm 2,66$	661,16
	F2	3118524	2	0,10	$28,37 \pm 2,60$	571,51
	F3	1838176	4	0,10	$17,32 \pm 2,65$	697,82
Promedio						643,50
Desviación estándar						65,00
Hoja	H1	1104481	4	0,10	$10,99 \pm 2,75$	44,79
	H2	1044930	4	0,10	$10,48 \pm 2,76$	422,24
	H3	1036555	4	0,10	$10,40 \pm 2,77$	419,02
Promedio						428,00
Desviación estándar						12,90

Tabla 5.2 Porcentaje de recuperación de la atropina

Agregado	Área	Concentración ($\mu\text{g/g}$)	% de recuperación
Blanco de matriz + $12 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ de atropina	1144876	11,34	94,50
Muestra de Hoja + $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ de atropina	1664445	15,82	104,06
Promedio			99,28

- Límite de confianza de la concentración de atropina en flores

$$643,5 \pm 161,37 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$$

- Límite de confianza de la concentración atropina en hojas

$$428 \pm 32,03 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$$



Tabla 5.3 Concentración de escopolamina encontrada en muestras de flores y hojas de la *Brugmansia suaveolens*.

ESCOPOLAMINA						
Matriz	Código de la muestra	Área de la muestra	Volumen de aforo final (mL)	Masa de la muestra (g)	Concentración ($\mu\text{g/ml}$) $\pm s_{x_0}, t_{(n-2)}$	Concentración real ($\mu\text{g/g}$)
Flor	F1	2336701	4	0.10	35.88 ± 2.91	1563.74
	F2	4798404	2	0.10	69.58 ± 4.07	1516.23
	F3	2511858	4	0.10	38.28 ± 2.95	1668.34
Promedio						1582.80
Desviación estándar						77.80
Hoja	H1	703627	4	0.10	13.53 ± 2.95	589.67
	H2	732901	4	0.10	13.93 ± 2.94	607.10
	H3	784999	4	0.10	14.64 ± 2.93	638.05
Promedio						611.60
Desviación estándar						24.50

Tabla 5.4 porcentaje de recuperación de la escopolamina

Agregado	Área	Concentración ($\mu\text{g/g}$)	% de recuperación
Muestra de hoja + $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de escopolamina	1372998	22.69	86.61
Blanco de matriz + $28 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de escopolamina	1698675	27.15	96.96
Promedio			91.79

- Límite de confianza de la concentración escopolamina en hojas
 $611.60 \pm 60.82 \mu\text{g.g}^{-1}$
- Límite de confianza de la concentración escopolamina en flores
 $1582.80 \pm 193.15 \mu\text{g.g}^{-1}$



5.5 Comparación entre la concentración de atropina y escopolamina presente en las muestras de flores y hojas

Al aplicar la prueba t para la comparación de dos medias experimentales se logró evidenciar que las concentraciones de atropina y escopolamina presentes en hojas y flores difieren con un 95 % de confianza, de tal manera que se puede decir que las flores contienen mayor concentración de atropina y escopolamina. También se determinó que la escopolamina se encuentra en mayor concentración en ambos órganos. Los resultados de la prueba t para comparación de dos medias experimentales con desviaciones estándar diferentes se obtuvieron mediante la aplicación del software MINITAB 15.

5.5.1 Comparación de la concentración de atropina presente en muestra de flores y hojas

Los resultados reflejados por MINITAB al aplicar la prueba t para comparación de medias con varianzas diferentes se obtuvo un valor para t calculado de 5,63, mientras que el t crítico a 2 grados de libertad al 95 % de confianza fue igual a 4,30. Por tanto:

$$5,63 > 4,30$$

De esta manera encontramos que t calculado $>$ t crítico, por esta razón se rechazó la hipótesis nula, por tanto la concentración de atropina en hojas y flores difiere significativamente.

La hoja de cálculo obtenida por Minitab se muestra en los anexos 10.6.12



5.5.2 Comparación de la concentración de escopolamina presente en muestras de flores y hojas

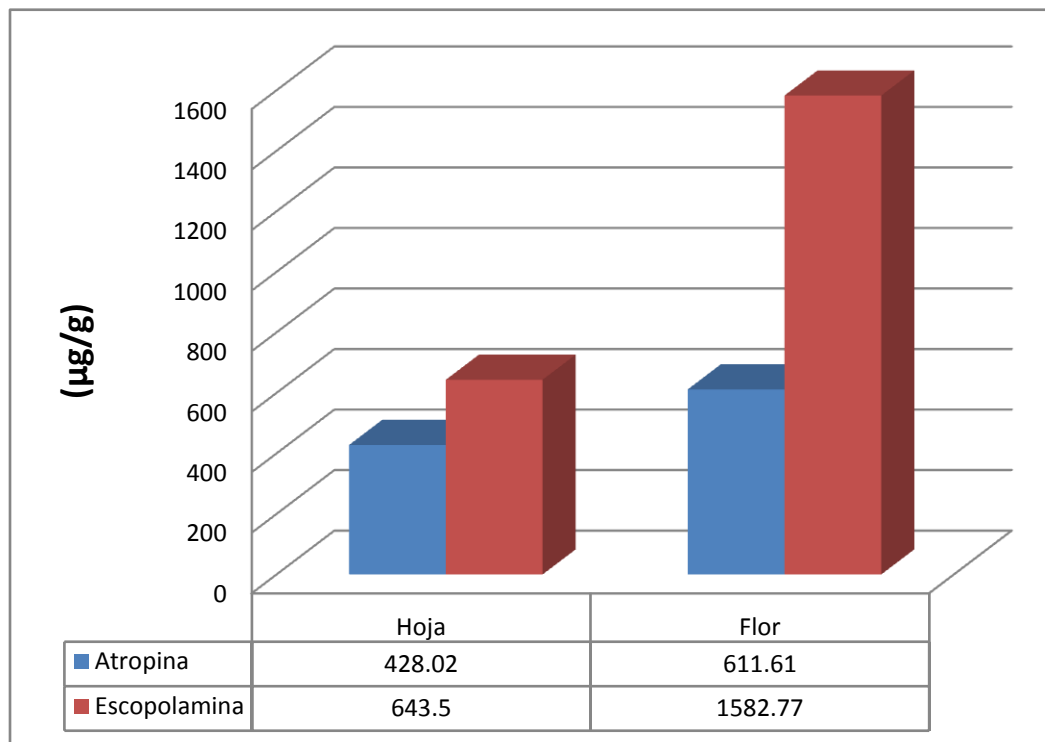
De igual manera se encontró que t calculado $>$ t crítico, por tanto también se rechaza la hipótesis nula, por tanto existe diferencia entre la concentración de escopolamina presente en las muestras de flores y hojas.

t crítico a 2 grados de libertad al 95 % de confianza = 4,30

t calculado: 29,65

La hoja de cálculo obtenida por Minitab se muestra en los anexos 10.6.12

Figura 5.3 Concentración comparada de atropina y escopolamina presente en hojas y flores de la *Brugmansia suaveolens*





5.6 Análisis de correlación significativa de la curva de regresión de la atropina y la escopolamina

Se realizó un análisis de correlación significativa para la curva de calibración de la atropina y escopolamina, para esto se utilizó la ecuación (4.8), de esta manera se obtuvo lo siguiente:

5.6.1 Atropina

$$t_{\text{calculado}} = 50,46$$

Hipótesis nula (H_0): no existe correlación significativa

Seguidamente, se tabuló en la tabla t de anexo 10.4, el valor de t crítico a 4 grados de libertad obteniendo así un valor de 2,78.

$$50,46 > 2,78$$

Al contrastar los valores de t crítico y t calculado encontramos que $t_{\text{calculado}} > t_{\text{crítico}}$; por tanto se rechazó la hipótesis nula y se puede decir que existe una correlación significativa entre las áreas y las concentraciones de los patrones de calibración de la atropina.

5.6.2 Escopolamina

El contraste de correlación significativa se realizó de igual manera que para la atropina, logrando obtener un valor de t calculado de 35,92 y un t crítico a un 95% de confianza de 2,78, por tanto $t_{\text{calculado}} > t_{\text{crítico}} (95\%)$, de tal manera que se rechazó H_0 y podemos decir con un 95 % de confianza que existe correlación entre las áreas y las concentraciones de los patrones de calibración de la escopolamina.



5.7 Límites de confianza de la curva de regresión lineal de la atropina

Para la determinación de los límites de confianza (LC) de la curva de regresión lineal de la atropina se calculó S_{yy} (ecuación 4.9), S_{xx} (ecuación 4.10), y S_y (ecuación 4.11) para la atropina.

Tabla 5.5 Áreas de los patrones de calibración de la atropina

	$X_i (\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1})$	Y_i (Área)	$(X_i)^2$	Y_i^2	$(X_i - \bar{X})^2$	Área corregida (Y_0)
	5	491132	25	2.412E+11	433.89	410168.46
	10	1004061	100	1.008E+12	250.59	989623.26
	20	2065490	400	4.266E+12	33.99	2148532.86
	30	3270454	900	1.070E+13	17.39	3307442.46
	40	4367371	1600	1.907E+13	200.79	4466352.06
	50	5748873	2500	3.305E+13	584.19	5625261.66
Sumatoria (Σ)	155	16947381	5525	6.833E+13	1520.83	16947380.76
Promedio \bar{X}	25,83	2824563	920,83	1.139E+13	253.47	2824563
*S_{xx}	1520.83	a	-169286			
*S_y	100131	b	115891			
S_{yy}	2.0466E+13	r^2	0.998			

* El cálculo se muestra en los anexos 10.6

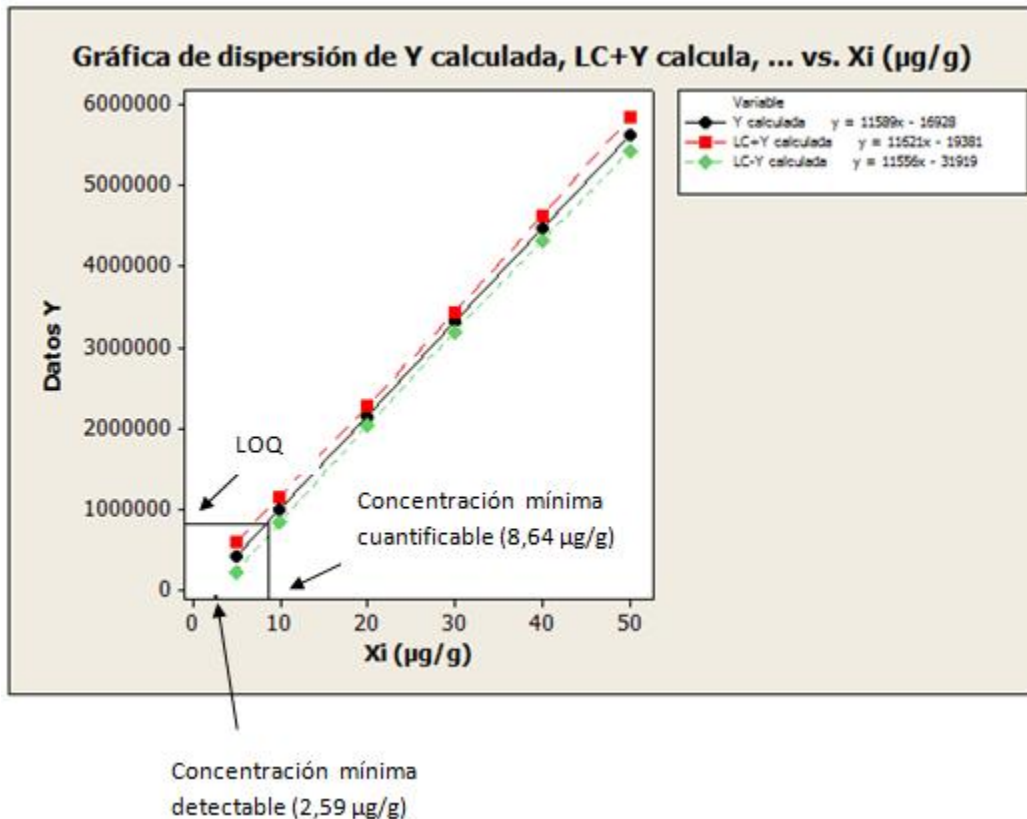
Los límites de confianza (LC) de la curva se calcularon utilizando la ecuación 4.13 y los cálculos se muestran en los anexos 10.6.16 Los límites de confianza obtenidos se muestran en la tabla 5.6



Tabla 5.6 Límites de confianza para la curva de regresión lineal de la atropina

Concentración del patrón X_i ($\mu\text{g/g}$)	Área corregida Y_0	Límite de confianza (LC)	Intervalo superior ($LC+Y_0$)	Intervalo inferior ($LC-Y_0$)
5	410168	187828	597997	222340
10	989623	161060	1150683	828563
20	2148532	122084	2270617	2026449
30	3307442	118569	3426012	3188873
40	4466352	152980	4619332	4313372
50	5625262	207213	5832475	5418049

Figura 5.4 Límite de confianza, límite de cuantificación y de detección de la curva de regresión lineal de la atropina





5.8 Limite de detección y de cuantificación de la atropina

El límite de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) para la cuantificación de atropina se calculó utilizando la ecuación 4.15 y 4.16 respectivamente, luego se sustituyeron los valores obtenidos en las ecuaciones 4.17 y 4.18, para encontrar la concentración mínima detectable y cuantificable.

$$X_{LOD} = 2.59 \mu g \cdot g^{-1}$$

$$X_{LOQ} = 8.64 \mu g \cdot g^{-1}$$

5.9 Límites de confianza de la curva de regresión lineal de la escopolamina

De igual manera que la atropina, para determinar los límites de confianza para la curva de regresión lineal de la escopolamina, se calcularon los valores S_{yy} ecuación (4.7), S_{xx} (ecuación 4.8) y S_y (ecuación 4.9) para la escopolamina.

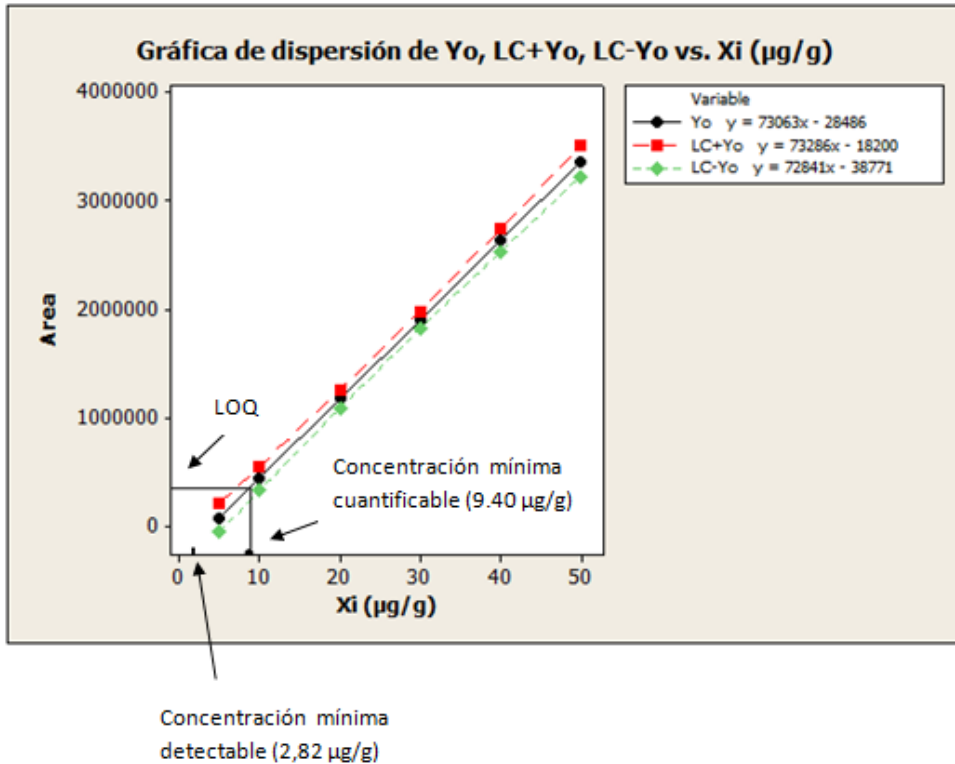
Tabla 5.7 Área de los patrones de calibración de la escopolamina

	Concentración del patrón X_i ($\mu g \cdot mg^{-1}$)	Área del patrón (Y_i)	$(X_i)^2$	Y_i^2	$(X_i - \bar{X})^2$	Área corregida (Y_o)
	5	80074	25	6411845476	433.89	80454.63
	10	424885	100	1.8053E+11	250.59	445771.43
	20	1194149	400	1.426E+12	33.99	1176405.03
	30	1868122	900	3.4899E+12	17.39	1907038.63
	40	2747531	1600	7.5489E+12	200.79	2637672.23
	50	3300886	2500	1.0896E+13	584.19	3368305.83
Sumatoria (Σ)	155	9615647	5525	1.2652E+13	1520.83	9615647.78
Promedio \bar{X}	25.83	1602608	920.83	3.9246E+12	253.47	1602608
*S_{xx}	1520.83	a	-284862.17			
*S_y	68702.48	b	73063.36			
S_{yy}	8.13747E+12	r^2	0.998			

Estimación cuantitativa de los alcaloides tropánicos atropina y escopolamina, presente en las flores y hojas de la planta *Brugmansia suaveolens*



Figura 5.5 Límite de confianza, límite de cuantificación y de detección de la curva de regresión lineal de la escopolamina.



Los límites de confianza (LC) de la curva de regresión lineal para la cuantificación de escopolamina se calcularon utilizando la ecuación 4.13. Los resultados se muestran en la tabla 5.8.

Tabla 5.8 Límites de confianza para la curva de regresión lineal de la escopolamina

Concentración del patrón X_i ($\mu\text{g/g}$)	Área corregida Y_o	Límite de confianza (LC)	Límite superior ($LC+Y_o$)	Límite inferior ($LC-Y_o$)
5	80455	128874	209328	-48419
10	445771	110507	556279	335264
20	1176405	83765	1260170	1092640
30	1907039	81354	1988392	1825685
40	2637672	104964	2742636	2532708
50	3368306	142174	3510480	3226131



5.10 Límite de detección y de cuantificación de la escopolamina

Luego se determinó el límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ) (Figura 5.5) de la escopolamina, el cálculo que realizó fue el mismo que se utilizó para la determinación del LOD y LOQ de la atropina.

Luego de haber encontrado el LOD Y LOQ de la escopolamina se determinaron sus valores de concentración mínima detectable (X_{LOD}) y concentración mínima cuantificable (X_{LOQ}), obteniéndose los siguientes resultados

$$X_{LOD} = 2.82 \mu g \cdot g^{-1}$$

$$X_{LOQ} = 9.40 \mu g \cdot g^{-1}$$



VI. DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS



6. Discusión y análisis de los resultados

En esta investigación se analizaron muestras secas de flores y hojas secas de la *Brugmansia suaveolens*, por lo tanto para poder calcular la concentración de atropina y escopolamina en muestras de hojas y flores húmedas fue necesario determinar el porcentaje de humedad de las flores y hojas.

Los porcentajes de humedad encontrados en ambos órganos fueron relativamente alto (hojas $83,07 \pm 0,9 \%$, flor $90,43 \pm 1,56 \%$), esto indica que la relación, muestra seca / muestra húmeda, es aproximadamente 1/5 para hoja y 1/10 para flor. Esto quiere decir que para obtener 1 g de muestra de hoja seca se necesitan 5 g de muestra de hoja húmeda y para obtener 1 g de muestra de flor seca se necesitan 10 g de muestra de flor húmeda.

Los resultados encontrados al determinar la concentración de atropina y escopolamina presente en hojas y flores de la *Brugmansia suaveolens* reflejan que la escopolamina es el alcaloide que se encuentra en mayor concentración en ambos órganos, alcanzando una concentración mayor a los $1500 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ en las flores de la planta, por esta razón se dice que las flores de la *Brugmansia suaveolens* ejercen un efecto tóxico mayor que el producido por las hojas.



VII. CONCLUSIONES



7. Conclusiones

Mediante el análisis por espectrometría de masas se logró comprobar la presencia de atropina y escopolamina en muestras de flores y hojas de la planta *Brugmansia suaveolens*.

Se determinó que las flores de la *Brugmansia suaveolens* tienen una mayor concentración de atropina y escopolamina, en comparación con la concentración que está presente en las hojas de la misma planta.

La escopolamina es el alcaloide que se encuentra en mayor concentración en las flores y hojas de la *Brugmansia suaveolens*, siendo esta una de las razones por la cual la planta posee un alto grado de toxicidad.

Según las pruebas estadísticas aplicadas a los resultados de los análisis, se evidenció que con un 95% de confianza los errores aleatorios y sistemáticos en los resultados no son significativos, por esta razón se puede decir que los resultados obtenidos fueron exactos y precisos, en lo que fue la cuantificación de atropina y escopolamina.



VIII. RECOMENDACIONES



8. Recomendaciones

Realizar un análisis completo de los principios activos atropina y escopolamina contenidos en todos los órganos de la planta *Brugmansia suaveolens*, para obtener un mayor conocimiento acerca de la composición de alcaloides tropánicos en esta planta.

Determinar si existe variación en la concentración de atropina y escopolamina entre plantas cultivadas en diferentes regiones del país, ya que la concentración de alcaloides presente en la planta puede variar según el tipo de suelo y las condiciones climáticas de la zona.

Utilizar un detector Nitrógeno-Fósforo (NPD). Esto permitiría comparar resultados, ya que este tipo de detector es específico para la detección y cuantificación de compuestos nitrogenados, y disminuiría los costos en lo que es detección y cuantificación de alcaloides.

Implementar la liofilización en el proceso de secado de las muestras, este proceso evita que la muestra pierda sus propiedades organolépticas debido a que la deshidratación se realiza al vacío y a temperaturas bajas, de tal manera que el agua se separa de la muestra por sublimación.



IX. BIBLIOGRAFÍA



9. Bibliografía

Arango, J, G. Alcaloides y compuestos nitrogenados. 2008 UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA. Medellín Colombia.

Arteaga de García Lucia; Reguero, M. Revista colombiana de ciencias químico-farmacéuticas. Brugmansia una especie promisoría para la producción de alcaloides del tropano.

Azuola, R; Vargas, P. 2007. Extracción de sustancias asistida por ultrasonido (EUA). Tecnología en Marcha. Volumen 20. P.30-40.

Bello, Gutiérrez, J; López, A. Fundamentos de ciencia toxicológica. 2001. Editorial Díaz de santos

Bernat, V; Salvador C. 2003. Fitoterapia. 4ª edición. Editorial: Masson.

Brumblay, Ray. Análisis Cualitativo. 1983. Editorial Continental

Clarita Milena Gallego Gil. Cuantificación de escopolamina por HPLC en raíces cultivadas in-vitro de Brugmansia cándida. 2000.

Curtis, M, J; Page, C, P; Sutter, M. Farmacología Integrada. 1998. Editorial Harcourt. Primera edición

Domínguez, X, A. Métodos de investigación fitoquímica. 2003. Editorial Limusa. Primera edición.

Dreisbach, R, H; Robertson, W, O. Manual De Toxicología Clínica 12ª Edición.

Hernández Melgar Alan Gerardo. FISICA II. 2009. ESPECTROMETRO DE MASAS

Flores, J. Farmacología humana. 2004. Editorial África Mediavilla

López, E, R; Allinger, N, L. Química orgánica. 1984. Segunda edición. Editorial Reverte

Mastandrea, C, R. Investigaciones de Alcaloides Tropánicos en especies del género Brugmansia. 2008. Cobisfe



Mejía, G., M. Agriculturas para la vida. Corporacio universitaria santa rosa de cabal Unisarc, Risoralda, Colombia. 2003.

Melida Restrepo de Fraume et al. El milagro de las plantas: Aplicaciones medicinales y orofaríngeas. Editorial San Pablo, 2005

Microsoft ® Encarta ® 2009. © 1993-2008 Microsoft Corporation.

Miller y Miller. Estadística y quimiometría para química analítica. 2002. Editorial Pearson educación S.A. Madrid.

Remington, G, A. Farmacia. 1987. Tomo I. 17° edición. Editorial panamericana.

Rubinson, K, A; Rubinson, J. Análisis instrumental. 2001. Primera edición. Editorial Prentice Hall.

Séamus, p; Higson, J. Química analítica. 2007. Editorial Mc Graw Hill. Primera edición.

Steven, W, D. Flora de Nicaragua Angiosperma. 2001. Tomo 2. Editor Hollowell, G, C.



X. ANEXOS



10.1 Imágenes

Figura 10.1 Punto de recolección de las muestras



Figura 10.2 Recolección de las muestras



Estimación cuantitativa de los alcaloides tropánicos atropina y escopolamina, presente en las flores y hojas de la planta *Brugmansia suaveolens*



Figura 10.3 Secado de las muestras de flores



Figura 10.4 Muestras de flores secas.





Figura 10.5 Precipitado obtenido al hacer la prueba de Dragendorf y Wagner

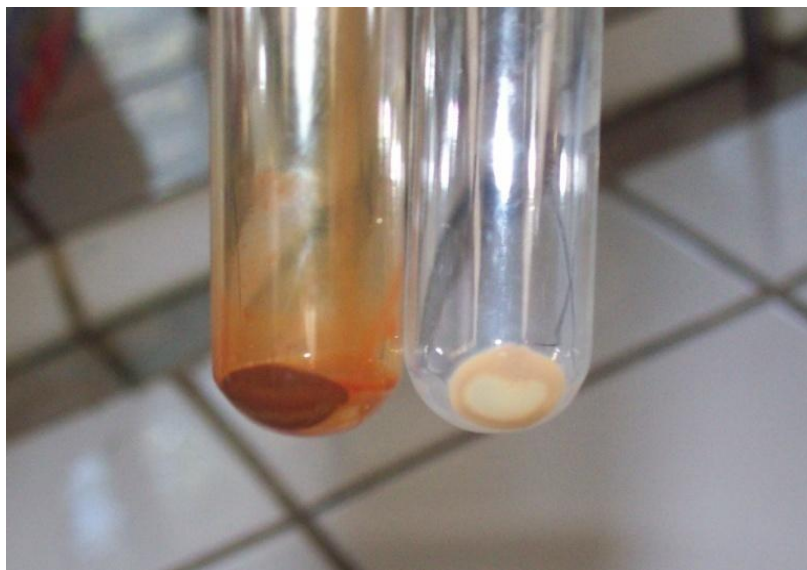


Figura 10.5 Baño ultrasónico.





Figura 10.6 Muestras sonicadas.



Figura 10.7 Evaporación de las muestras



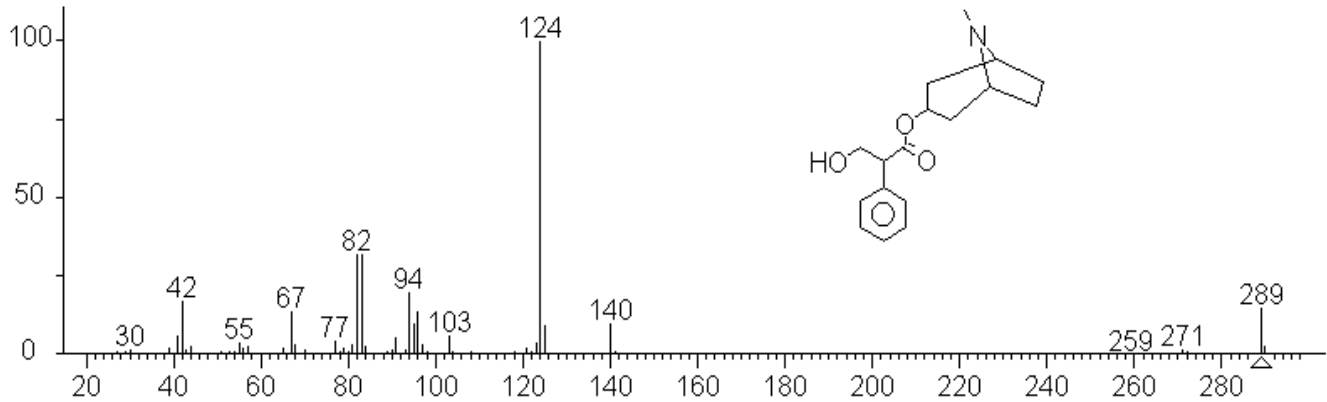
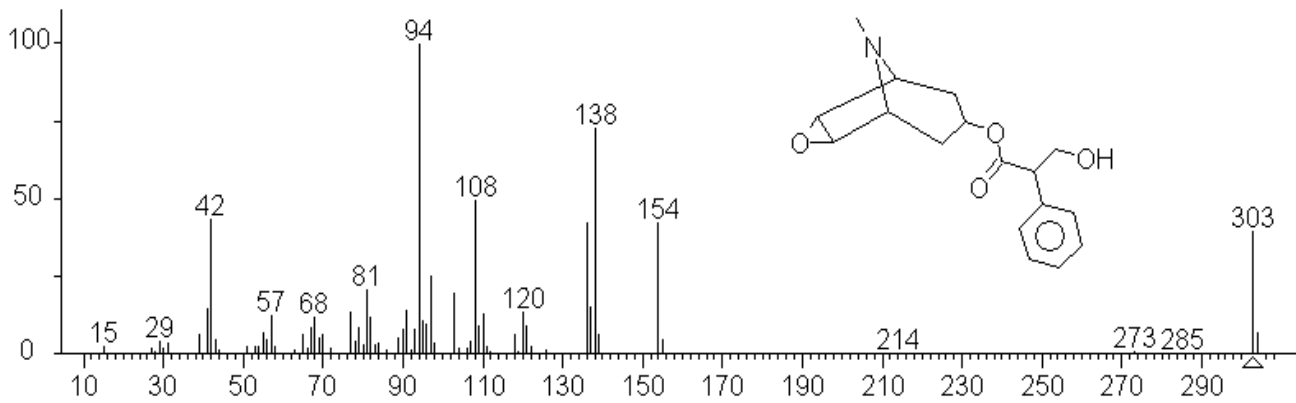


Figura 10.8 Muestras extractadas



Figura 10.9 Inyección de muestras



**Figura 10.10 Espectro de masa de la atropina****Figura 10.11 Espectro de masa de la escopolamina**



10.2 Limpieza de equipos y cristalería

Para evitar contaminación de las muestras antes de utilizar el horno, se lavó con detergente para eliminar los contaminantes orgánicos, posteriormente se dejó encendido durante 24 horas, calentando a una temperatura de 150 °C para eliminar impurezas orgánicas, luego se forraron las parrillas del horno con papel aluminio, para evitar el contacto directo con las muestras. Las mesas donde se colocaron las flores y hojas se limpiaron y cubrieron con papel, para que no hubiera un contacto directo de las muestras con la superficie de la mesa.

Se activó sílica gel a una temperatura de 105 °C durante 24 horas, luego fue colocada dentro de los desecadores en donde se colocaron las muestras secas, de esta forma se evita que la humedad interfiriera con los resultados de las muestras.

Los morteros y pilones que se utilizaron en el macerado de las muestras se lavaron con detergente y con $\text{HCl}_{(\text{ac})}$ al 10%, luego se enjuagaron con suficiente agua de la llave y destilada y se dejaron en el horno durante 24 horas a una temperatura de 105 °C de esta manera se logra eliminar algunos contaminantes orgánicos e inorgánicos, que puedan estar presentes en dichos materiales y que puedan afectar los resultados de la investigación.



Para la limpieza de la cristalería se preparó una solución de Extran-Agua en una proporción 1:25. La cristalería se depositó en una bandeja metálica la cual contenía la solución, luego se dejó hervir y se enjuagó cuatro veces con agua destilada.

Luego se depositó la cristalería en una solución de ácido clorhídrico (HCl_{ac})-Agua destilada, en una proporción 1:4 y se dejó durante 24 horas.

Después se dejó secar la cristalería en el horno, a una temperatura de 95 °C durante 5 horas.

Finalmente se dejó enfriar la cristalería a temperatura ambiente, se enjuagó 4 veces con hexano y se tapó la cristalería con sus respectivos tapones o se cubrieron con papel aluminio.



10.3 Materiales y equipos de laboratorio.

Balanza semianalítica. Marca Adventure, modelo OHAUS	Lana de vidrio
Balanza analítica	Inyector Hewlett Packard 7683
Balones fondo plano de 250 mL	Micropipeta
Balones volumétricos 2 mL, 10 mL, 25 mL, 50 mL, 100 mL	Mortero con su pilón
Baño María. HAAKE	Papel aluminio
Baño ultrasónico Branson 8510	Papel filtro watman # 41
Beaker de 10 mL	Pera de succión
Bisturí	Pinza 3 dedos
Campana extractora	Pipeta graduada de 20 mL,
Cinta pH. Merck	Pipetas Pasteur
Columna DB5 de 30 m * 0,25 mm de diámetro J&W	Porta embudo.
Cromatógrafo de gases Hewlett Packard 6890 series	Probeta de 5mL, 50 mL y 100 mL
Desecadores	Rotaevaporador BÜCHI 461 RE 121
Detector de masa selectivo Hewlett Packard 5973	Septas
Embudo	Soporte universal
Embudos de separación 100 mL	Tamiz haz de maya de 630µm
Erlenmeyer de 50 y 250 mL	Termo grande
Espátula	Tubos de ensayo de 12 mL
Frascos mostaceros	Varilla de vidrio.
Gotero	Viales de 1.5 mL
Guantes de látex	
Horno Lab line. Modelo imperial.	



10.4 Tabla de distribución t

<i>Valor de t para un intervalo de confianza de Valor crítico de t para valores de P de número de grados de libertad</i>	<i>90%</i>	<i>95%</i>	<i>98%</i>	<i>99%</i>
	<i>0.10</i>	<i>0.05</i>	<i>0.02</i>	<i>0.01</i>
1	6.31	12.71	31.82	63.66
2	2.92	4.30	6.96	9.92
3	2.35	3.18	4.54	5.84
4	2.13	2.78	3.75	4.60
5	2.02	2.57	3.36	4.03
6	1.94	2.45	3.14	3.71
7	1.89	2.36	3.00	3.50
8	1.86	2.31	2.90	3.36
9	1.83	2.26	2.82	3.25
10	1.81	2.23	2.76	3.17
12	1.78	2.18	2.68	3.05
14	1.76	2.14	2.62	2.98
16	1.75	2.12	2.58	2.92
18	1.73	2.10	2.55	2.88
20	1.72	2.09	2.53	2.85
30	1.70	2.04	2.46	2.75
50	1.68	2.01	2.40	2.68
∞	1.64	1.96	2.33	2.58

Miller y Miller, Estadística para química analítica, 2002



10.5 porcentaje de humedad en flores

Muestra	Flor húmeda			Flor seca			Porcentaje de humedad en flor (%)
	peso 1 (g)	peso 2 (g)	Media (g)	peso 1 (g)	peso 2 (g)	Media (g)	
M1	11.68	11.72	11.70	1.26	1.21	1.24	89.44
M2	11.38	11.38	11.38	1.03	1.18	1.11	90.29
M3	9.57	9.63	9.60	0.97	0.90	0.94	90.26
M4	12.23	12.15	12.19	1.22	---	1.22	89.99
M5	10.68	10.7	10.69	1.09	1.11	1.10	89.71
M6	10.25	10.25	10.25	0.83	1.14	0.99	90.39
M7	11.01	11.09	11.05	1.01	0.94	0.98	91.18
M8	11.04	11.06	11.05	1.02	1.00	1.01	90.86
M9	10.23	10.29	10.26	1.00	0.97	0.99	90.40
M10	9.05	9.05	9.05	0.80	1.14	0.97	89.28
M11	12.05	12.06	12.06	1.27	1.51	1.39	88.47
M12	10.84	10.87	10.86	0.79	0.93	0.86	92.08
M13	11.33	11.33	11.33	0.80	1.10	0.95	91.62
M14	11.06	11.09	11.08	0.88	0.95	0.92	91.74
M15	9.30	9.36	9.33	0.93	1.05	0.99	89.39
M16	8.75	8.78	8.77	0.81	1.00	0.91	89.67
M17	11.01	11.02	11.02	1.21	1.21	1.21	89.01
M18	11.90	11.91	11.91	0.93	1.00	0.97	91.89
M19	11.37	11.33	11.35	1.25	1.40	1.33	88.33
M20	12.26	12.27	12.27	0.29	0.60	0.45	96.37
M21	11.53	11.52	11.53	1.24	1.25	1.25	89.20
M22	13.74	13.74	13.74	1.37	1.36	1.37	90.07
M23	11.22	11.23	11.23	1.07	0.86	0.97	91.40
M24	8.87	8.83	8.85	0.64	0.92	0.78	91.19
M25	14.41	14.45	14.43	1.51	1.50	1.51	89.57
M26	12.72	12.75	12.74	1.39	1.18	1.29	89.91
M27	8.64	8.76	8.70	0.90	0.87	0.89	89.83
Promedio							90.43
Desviación estándar							1.56



10.6 Porcentaje de humedad en Hojas

Muestra	Hoja húmeda			Hoja seca				Porcentaje de humedad en hojas (%)
	Primera pesada (g)	Segunda pesada (g)	Media (g)	Primera pesada (g)	Segunda pesada (g)	Tercera pesada (g)	Media (g)	
M1	22.15	22.21	22.18	4.33	4.34	4.33	4.33	80.46
M2	31.26	31.25	31.26	5.11	5.11	5.11	5.11	83.65
M3	26.98	26.66	26.82	4.62	4.61	4.62	4.62	82.79
M4	34.28	34.26	34.27	5.7	5.71	5.73	5.71	83.33
M5	38.00	37.83	37.92	6.15	6.23	6.16	6.18	83.70
M6	38.74	38.75	38.75	6.18	6.09	6.2	6.16	84.11
M7	35.79	35.66	35.73	5.64	5.78	5.71	5.71	84.02
M8	24.98	24.99	24.99	4.3	4.42	4.37	4.36	82.54
M9	28.07	28.1	28.09	4.94	5.05	4.83	4.94	82.41
M10	28.21	28.21	28.21	4.7	4.67	4.7	4.69	83.37
M11	29.35	29.19	29.27	4.78	4.96	4.93	4.89	83.29
M12	23.46	23.39	23.43	4.08	4.04	4.16	4.09	82.53
M13	36.40	36.38	36.39	5.74	5.9	5.87	5.84	83.96
M14	---	35.43	35.43	5.64	5.7	5.62	5.65	84.04
M15	32.17	32.15	32.16	5.15	5.17	5.19	5.17	83.92
M16	25.96	25.98	25.97	4.58	4.73	4.71	4.67	82.00
M17	30.32	30.33	30.33	5.00	5.05	5.06	5.04	83.39
M18	35.19	35.19	35.19	5.89	6.03	6.12	6.01	82.91
M19	23.25	23.17	23.21	3.98	3.93	4.02	3.98	82.87
M20	36.99	36.96	36.98	6.02	6.15	6.01	6.06	83.61
M21	33.43	33.49	33.46	5.26	5.42	5.37	5.35	84.01
M22	28.77	28.66	28.72	4.88	4.89	5.03	4.93	82.82
M23	21.24	21.2	21.22	3.99	4.08	4.06	4.04	80.95
Promedio								83.07
Desviación estándar								0.96



10.7 Cálculos

10.7.1 Preparación del H₂SO₄ 0,5 M

$$V_i * C_i = V_f * C_f$$

$$V_i * 18M = 25mL * 0,5M$$

$$V_i = \frac{25mL * 0,5M}{18 M}$$

$$V_i = 0,7 mL$$

10.7.2 Preparación del NH₄OH 25%

$$V_i * C_i = V_f * C_f$$

$$V_i * 29\% = 50mL * 25\%$$

$$V_i = \frac{50 mL * 25 \%}{29 \%}$$

$$V_i = 43 mL$$

10.7.3 Preparación del NH₄OH 28%

$$V_i * C_i = V_f * C_f$$

$$V_i * 29\% = 10mL * 28\%$$

$$V_i = 9.66 mL$$

10.7.4 Preparación de la solución madre de Atropina 1000 mg.L⁻¹

Para determinar la masa de atropina (X_{mg}) necesaria para preparar 10 ml de una solución de 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ se realizó el siguiente cálculo:

$$X_{mg} = \frac{1000 \text{ mg de atropina}}{1 \text{ L de solución}} * 10 \text{ mL} * \frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ mL}}$$

$$X_{mg} = 10 \text{ mg}$$



10.7.5 Preparación de la mezcla Atropina-Escopolamina 200 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$

La mezcla atropina-escopolamina 200 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ se preparó a partir de la solución madre de atropina y escopolamina 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ y mediante el siguiente cálculo nos damos cuenta del volumen necesario de atropina y escopolamina para preparar la solución.

$$V_i * C_i = V_f * C_f$$

$$V_i * 1000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} = 5 \text{ mL} * 200 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$$

$$V_i = \frac{5 \text{ ml} * 200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}}{1000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}}$$

$$V_i = 1 \text{ mL}$$

Por tanto el volumen necesario para preparar 5 mL de la mezcla Atropina-Escopolamina 200 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 1mL de la solución madre de atropina 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ y 1 ml de la solución madre de escopolamina 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$

10.7.6 Preparación de la curva de calibración de la atropina

$$V_i * C_i = V_f * C_f$$

$$V_i * 200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} = 2000 \mu\text{L} * 5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$$

$$V_i = 50 \mu\text{L}$$



10.7.7 Porcentaje de humedad

El porcentaje de humedad se determinó a partir de los datos presentados en el anexo 10.5. Estos datos se sustituyeron en la ecuación 4.1, como se muestra a continuación:

$$\% \text{ Humedad flor} = \frac{11,70 \text{ g} - 1,24 \text{ g}}{11,70 \text{ g}} * 100\%$$

$$\% \text{ Humedad flor} = 89,40$$

Luego se calculó el promedio del porcentaje de humedad $\pm 1 S$, para esto se utilizó el software estadístico Excel 2007.

10.7.8 Concentración real

Para el cálculo de la concentración real de atropina presente en las muestras, primero se determinó la concentración en $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de la muestra inyectada utilizando la ecuación (4.3).

$$C = \frac{1732514 - (-169286.34)}{115890.96}$$

$$C = 16.41 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$$

Luego ese valor se sustituyó en la ecuación (4.5) para obtener la concentración real de la muestra.

$$C_{MR} = \frac{16.41 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1} \times 4 \text{ ml} \times 100\%}{0.1 \text{ g} \times 99.28 \%}$$

$$C_{MR} = 661.16 \mu\text{g/g}$$



10.7.9 Porcentaje de recuperación

El cálculo del porcentaje de recuperación se determinó utilizando la ecuación 4.6 como se muestra a continuación:

$$\%R = \frac{(15.82 \mu g \cdot g^{-1} - 10.62 \mu g \cdot g^{-1})}{5 \mu g \cdot g^{-1}} * 100\%$$

$$\%R = 104.6 \%$$

10.7.10 Límite de confianza de la concentración

Para determinar el límite de confianza de la concentración se utilizó la ecuación 4.20, de esta manera se determinó el límite de confianza de la media de la concentraciones con un 95% de confiabilidad.

- Límite de confianza para atropina en hojas

$$428 \pm 4.30 * \frac{12.9}{\sqrt{3}}$$

$$428 \pm 32.03 \mu g \cdot g^{-1}$$



10.7.11 Determinación del error aleatorio de la concentración

Para realizar el cálculo del error aleatorio en la concentración se utilizó la ecuación 4.19

$$S_{x0 (F1)} = \frac{100130.94}{115890.96} \sqrt{1 + \frac{1}{6} + \frac{(1732514 - 2824563.50)^2}{(115890.96)^2 * (1520.83)}}$$

$$S_{x0 (F1)} = 0.96$$

$$S_{x0} \cdot t_{(n-2)} = 0.96 * 2.78$$

$$S_{x0} \cdot t_{(n-2)} = 2.66$$

10.7.12 Comparación de la concentración de atropina presente en muestra de flores y hojas

T de dos muestras para Atropina en flores vs. Atropina en Hojas

	N	Media	Desv.Est.	Media del Error estándar
Atropina en flores	3	643.5	65.0	38
Atropina en Hojas	3	428.0	12.9	7.4

Estimado de la diferencia: 215.5

Valor T = 5.63 Valor P = 0.030 **GL = 2**



10.7.13 Análisis de correlación significativa

Esto se calculó utilizando la ecuación 4.8

$$t_{\text{calculado}} = \frac{|0.999|\sqrt{6-2}}{\sqrt{1-0.999^2}}$$

$$t_{\text{calculado}} = 45,14$$

10.7.14 Cálculo de S_{xx} , S_{yy} y S_y para la atropina

$$S_{yy} = \sum Y^2 - \left[\frac{(\sum Y)^2}{n} \right]$$

$$S_{yy} = 6.833E + 13 - \frac{(16947381)^2}{6}$$

$$S_{yy} = \mathbf{2.04E + 13}$$

$$S_{xx} = \sum X^2 - \left[\frac{(\sum X)^2}{n} \right]$$

$$S_{xx} = 5525 - \frac{(155)^2}{6}$$

$$S_{xx} = \mathbf{1520,83}$$

$$S_y = \sqrt{(S_{yy} - b^2 S_{xx}) / (n - 2)}$$

$$S_y = \sqrt{(2.04E + 13 - (115890.96)^2 * 1520.83) / (6 - 2)}$$

$$S_y = \mathbf{100130,94}$$



10.7.15 Cálculo del área corregida de la atropina

$$Y_o(5) = (b * X) + a$$

$$Y_o(5) = (115891 * 5) - 169286$$

$$Y_o(5) = 410168$$

10.7.16 Límite de confianza de la curva de regresión lineal de la atropina

Para determinar el límite de confianza de la curva de regresión se aplicó la ecuación 4.13

$$LC(5) = S_{Y.t.} \sqrt{\frac{1}{n} + [X(i) - \bar{X}]^2 / S_{xx}}$$

$$LC(5) = 100131 * 2.78 \sqrt{\frac{1}{6} + [5 - 25.83]^2 / 1520.83}$$

$$LC(5) = 187828$$

$$\text{Límite superior} = 410168.46 + 187828.16$$

$$\text{Límite superior} = 597997$$

$$\text{Límite inferior} = 410168.46 - 187828.16$$

$$\text{Límite inferior} = 222340$$

**10.6.17 Límite de detección y límite de cuantificación de la atropina.**

$$LOD = -169286.34 + (3 * 100131)$$

$$LOD = 131106.48$$

$$X_{LOD} = \frac{131106.48 - (-169286)}{115890.96}$$

$$X_{LOD} = 2,59 \mu g \cdot g^{-1}$$

$$LOQ = -169286 + (10 * 100131)$$

$$LOQ = 832023$$

$$X_{LOQ} = \frac{832023 - (-169286)}{115891}$$

$$X_{LOQ} = 8,64 \mu g \cdot g^{-1}$$



Glosario

Acetilcolina	Es un acetyl éster de la colina que se encuentra en el organismo de los animales vertebrados. Funciona como un neurotransmisor conduciendo los impulsos eléctricos entre las células nerviosas a través de las sinapsis y desde las células nerviosas hasta los músculos causando su contracción.
Actinomorfa	Flores actinomorfas, que forman capítulos, espigas o racimos, corola con prefloración valvar y con frecuencia gamopétala. Estambres 4-8, sobrepasando la corola; filamentos libres. Polen frecuentemente en políadas. Semillas con línea fisural.
Alcaloides	Grupo de compuestos débilmente alcalinos que contienen nitrógeno, y son en su mayoría de origen vegetal; poseen una complejidad molecular moderada que produce varios efectos fisiológicos en el cuerpo.
Anabolismo	Conjunto de las reacciones de síntesis necesarias para el crecimiento de nuevas células y el mantenimiento de todos los tejidos. Las reacciones anabólicas incluyen la biosíntesis enzimática de los ácidos nucleicos, los lípidos, los polisacáridos y las proteínas.
Antagonismo	Fármacos que administrados a un mismo organismo tienen efectos farmacológicos contrapuestos.
Anticolinérgicos	Un agente anticolinérgico es un compuesto farmacéutico que sirve para reducir o anular los efectos producidos por la acetilcolina en el Sistema nervioso.
Antiespasmódico	Es un fármaco que disminuye el tono de la musculatura estriada, por tanto elimina o disminuye espasmos.
Antimuscarínicos	Son anticolinérgicos actúan sobre los receptores muscarínicos.
Antiparkinsoniano	Medicamento que posee las propiedades de disminuir la rigidez o el temblor producido por la enfermedad de Parkinson.



Atropina	Es una droga anticolinérgica natural compuesta por ácido trópico y tropina, una base orgánica compleja con un enlace éster.
Barrera hematoencefálica	Es una barrera entre los vasos sanguíneos y el encéfalo. La barrera impide que muchas sustancias tóxicas la atraviesen, al tiempo que permite el pasaje de nutrientes y oxígeno.
Biocida	Son sustancias químicas sintéticas, naturales o de origen biológico o físico y están destinados a destruir, contrarrestar, neutralizar, impedir la acción o ejercer un control de otro tipo sobre cualquier microorganismo considerado nocivo para el hombre.
Bradycardia	Es el descenso de la frecuencia cardíaca
Calcícola	Plantas y asociación de vegetales que se desarrollan mejor en suelos ricos en cal.
Catabolismo	Es un proceso continuo centrado en la producción de la energía necesaria para la realización de todas las actividades físicas externas e internas.
Cimosas	En forma de cima.
Cupuliforme	Que tiene forma de cúpula o de copa pequeña.
Dehiscencia	Apertura espontánea de un órgano vegetal una vez llegada a su madurez, vertiendo al exterior su contenido.
Epifitos	Planta o vegetal que no arraiga en el suelo, sino que se fija a un árbol u otro objeto elevado en el que tenga asegurada la luz y la humedad.
Escopolamina	Es un alcaloide tropánico que se encuentra como metabolito secundario de plantas en la familia de las solanáceas.
Fitoterapia	Tratamiento de las enfermedades mediante plantas o sustancias vegetales.



Gemación	Modo de reproducción asexual, propia de muchas plantas y de muchos animales invertebrados, que se caracteriza por separarse del organismo una pequeña porción del mismo, llamada yema, la cual se desarrolla hasta formar un individuo semejante al reproductor.
Geniculados	Dícese del tallo que primero está tendido y luego levantado verticalmente.
Glabros	Desprovisto absolutamente de pelos.
Hermafroditas	Dicho de un vegetal cuyas flores reúnen en sí ambos sexos.
Hipocateliforme	Corolas de tubo largo y estrecho que rematan en un limbo patente.
Imbricada	Hojas y órganos foliáceos que estando muy próximos llegan a cubrirse por los bordes.
Infundibuliforme	Flor con forma de embudo.
Liofilización	Proceso utilizado para la eliminación del agua mediante desecación al vacío y a muy bajas temperaturas.
Lobado	Dividido en gajos o lobos, en porciones no demasiado profundas y más o menos redondeadas.
Macerar	Es un proceso de extracción sólido-líquido. El producto sólido (materia prima) posee una serie de compuestos solubles en el líquido extractante que son los que se pretende extraer.
Motilidad gastrointestinal	Es la acción fisiológica del tubo digestivo encargada de desplazar el contenido de la boca hacia el ano.
Órgano diana	Son las partes del organismo a los que siempre afectan determinados productos químicos.
pedúnculo	Flor que nace solitaria o de una inflorescencia.
Principio activo	Es la sustancia medicinal propiamente dicha que compone esencialmente un medicamento.
Puberulenta	Ligeramente pubescente, o con pelillos finos y cortos en poca cantidad.



Pubescente	Cualquier órgano vegetal cubierto de pelo fino y suave.
Quincuncial	Disposición semejante a la figura de un cinco de dados, con cuatro puntos que forman rectángulo o cuadrado y otro punto en el centro.
Receptores colinérgicos	Proteínas de la superficie celular que se unen con alta afinidad a la acetilcolina y que generan cambios intracelulares que influyen en el comportamiento de las células.
Rotácea	Con forma de rueda. Se aplica a las corolas gamopétalas actinomorfas con tubo muy corto y limbo patente que recuerdan la forma de una rueda.
Septos	Tabique paralelo a las valvas, perforado y que divide a un órgano.
Sonicación	Consiste en la aplicación de ultrasonidos a una suspensión celular.
Sistema nervioso parasimpático	Es el que controla las funciones y actos involuntarios.
Trazables	Capacidad para seguir el origen de los materiales y las partes, la historia del procesamiento, la distribución y localización del producto después de su entrega.
Tricomas	Son tricomas los pelos, papilas, escamas. El tricoma está formado por células epidérmicas.
Valvada	Pétalos o sépalos cuando se tocan borde con borde en toda su longitud, pero sin solaparse o imbricarse unos con otros.