



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA

**“AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE
ERISODINA A PARTIR DE SEMILLAS
DE *Erythrina herbacea* L.”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

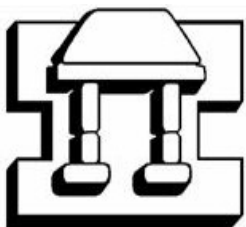
BIÓLOGO

P R E S E N T A :

MAGALI GARCÍA LINOS

DIRECTORA DE TESIS:

M. EN C. MARÍA EUGENIA GARÍN AGUILAR



IZTACALA

LOS REYES IZTACALA, EDO. DE MÉXICO 2005



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE	DR. JOSÉ GUILLERMO ÁVILA ACEVEDO
VOCAL	M. en C. MARÍA EUGENIA GARÍN AGUILAR
SECRETARIO	M. en C. LEONOR ANA MARÍA ABUNDIZ
	BONILLA
SUPLENTE	DR. GUSTAVO VALENCIA DEL TORO
SUPLENTE	M. en C. DAVID SEGURA COBOS

Este trabajo de investigación se realizó en el laboratorio L-514 de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala bajo la dirección de la Mtra. María Eugenia Garín Aguilar y con el apoyo otorgado por el Programa de Apoyo a Profesores de Carrera para la Formación de Grupos de Investigación (PAPCA-FES Iztacala, UNAM) y por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT-DGAPA, UNAM) IN216803, IN 247504.

DEDICATORIA

A mi hija:

A mi pequeña Daniela que con su llegada llenó mi vida de alegría y fue mi gran impulso para alcanzar esta meta.

A mis padres:

Por sus consejos, apoyo incondicional, comprensión, paciencia y por haberme enseñado que el amor que existe en una familia puede vencer todas las adversidades.

A mis hermanas:

Angélica y Dalia

Quienes siempre han estado a mi lado demostrándome su cariño.

A mis tíos, tías, abuelos y primos:

Quienes siempre me brindaron una palabra de aliento.

A mis grandes amigas:

Daisy, Elizabeth, Araceli, Gabriela, Angélica, gracias por su amistad, cariño y apoyo sincero.

AGRADECIMIENTOS

A Dios

Por que siempre estuvo conmigo permitiéndome cumplir esta meta.

A la M. en C. María Eugenia Garín Aguilar y al Dr. Gustavo Valencia del Toro:

Por su amistad, paciencia, confianza y por enseñarme que la vida nos coloca en el lugar y momento preciso.

Al Dr. José G. Ávila, a la M. en C. Leonor Abundiz, al M en C. David Segura:

Por las observaciones tan atinadas y sugerencias para mejorar este trabajo.

Al laboratorio L-514, Biblioteca y Servicios Documentales de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala.

A todas aquellas personas que de una u otra forma contribuyeron en la elaboración de esta tesis.

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS	viii
ÍNDICE DE CUADROS	ix
RESUMEN	x
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	3
EL GÉNERO <i>Erythrina</i>	3
Distribución Geográfica	3
Usos	4
Etnobotánica	6
Toxicidad de las especies del Género <i>Erythrina</i>	7
ESPECIE <i>Erythrina herbacea</i> (L.)	8
Ubicación Taxonómica, Descripción Botánica	8
Nombre Común	10
ALCALOIDES	10
Alcaloides del Género <i>Erythrina</i>	12
ACETILCOLINA Y SUS RECEPTORES	17
FUNCIÓN DE LOS RECEPTORES NICOTÍNICOS	19
IMPORTANCIA DE LOS ALCALOIDES DE <i>Erythrina</i> en estudios Psicofarmacológicos	19
JUSTIFICACIÓN	21
OBJETIVOS	22
MATERIALES Y MÉTODOS	23
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	29
Determinación Taxonómica, Extracción de las fracciones alcaloideas	29
Análisis de los alcaloides mediante HPLC/EM	33
Fracción hexánica, Fracción metanólica	33
Fracción hidrolizada	33

Análisis de Resonancia Magnética Nuclear	39
CONCLUSIONES	43
PERSPECTIVAS	44
BIBLIOGRAFÍA	45
APENDICES	50
Cromatografía de Líquidos/Espectrometría de Masas	50
Resonancia Magnética Nuclear	51

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución mundial del género <i>Erythrina</i>	3
Figura 2. Máscaras hechas de la madera de <i>Erythrina</i>	4
Figura 3. Harina obtenida de las semillas de <i>E. edulis</i> empleadas en repostería	5
Figura 4. Árboles de <i>Erythrina coralloides</i> decorando avenidas	5
Figura 5. <i>Erythrina herbacea</i> (L.)	8
Figura 6. Hojas de <i>Erythrina herbacea</i> (L.)	9
Figura 7. Semillas de <i>Erythrina herbacea</i> (L.)	9
Figura 8. Esqueleto eritrinano	13
Figura 9. Estructura de los alcaloides diénicos	14
Figura 10. Estructura de alcaloides alquénicos	15
Figura 11. Estructura de alcaloides lactónicos	15
Figura 12. Extracción de alcaloides a partir de semillas de <i>Erythrina</i> con un equipo Soxleth	24
Figura 13. Cromatografía en Columna y en Capa Fina	25
Figura 14. Equipo de Resonancia Magnética Nuclear	26
Figura 15. Diagrama de extracciones alcaloideas	27
Figura 16. Diagrama de separación e identificación de las fracciones alcaloideas	28
Figura 17. Espectro de HPLC/EM de la fracción hexánica	35
Figura 18. Espectro de HPLC/EM de la fracción metanólica	36
Figura 19. Espectro de HPLC/EM de la fracción hidrolizada	37
Figura 20. Estructuras químicas de los alcaloides identificados en semillas de <i>Erythrina herbacea</i>	38
Figura 21. Espectro de ¹ H RMN de erisodina	41

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Contenido en porcentaje de las fracciones de alcaloides crudos	32
Cuadro 2. Análisis cuantitativo de los alcaloides presentes en los extractos de <i>E. herbacea</i> .	38
Cuadro 3. Desplazamientos químicos en el ¹ HRMN de erisodina	41

RESUMEN

En los últimos tiempos se ha incrementado el interés por el estudio de las plantas que son utilizadas en la medicina tradicional, entre estas podemos mencionar las pertenecientes al género *Erythrina*, que en México se encuentra representado por un número considerable de especies. En el laboratorio, éste género es de interés debido a que en sus flores y semillas se ha detectado la presencia de alcaloides entre los que se encuentra la erisodina, sustancia que ha demostrado ser un potente antagonista competitivo de receptores acetilcolinérgicos nicotínicos de tipo neuronal (subtipo $\alpha 4\beta 2$). Por su alta afinidad, este compuesto será útil para discernir la participación de los receptores nicotínicos cerebrales en las funciones de aprendizaje y memoria. Por lo antes expuesto, fue evidente la necesidad de establecer en el laboratorio las condiciones fisicoquímicas adecuadas para la extracción y purificación de erisodina, para así poder emplearle en posteriores estudios conductuales. En este estudio se colectaron semillas de *Erythrina herbacea*. Durante la extracción se utilizó el método descrito por Soto-Hernández y Jackson (1994), obteniéndose un porcentaje de 0.0444% de alcaloides libres en hexano, 0.1791% de alcaloides libres en metanol y 0.245% de alcaloides hidrolizados. Una pequeña porción de las fracciones alcaloideas obtenidas fueron analizadas mediante cromatografía de líquidos-espectrometría de masas (HPLC/EM), encontrándose la presencia de seis alcaloides los cuales fueron: erisodina, erisopina, erisovina, erisotrina, eritralina y glucoerisopina. Las fracciones de alcaloides crudos también fueron separadas por cromatografía en columna. Los cristales puros de erisodina se lograron aislar a partir de la fracción metanólica y fueron identificados obteniendo su espectro de resonancia magnética ($^1\text{HRMN}$).

INTRODUCCIÓN

La etnobotánica estudia las interrelaciones que se establecen entre el hombre y las plantas, a través del tiempo y en diferentes ambientes. Desde tiempos remotos y sobre la base de un conocimiento empírico, el hombre ha buscado en el mundo vegetal su alimento y cura utilizando las plantas. Posteriormente, el estudio de las plantas se caracterizó por la identificación botánica de las especies consideradas medicinales. Según la Organización Mundial de la Salud de las Naciones Unidas (OMS), plantas medicinales son aquellas que, puestas en contacto con un organismo humano o animal, desarrollan en éste una terapia que podría denominarse “suave”. La terapia por medio de las plantas medicinales tiene orígenes muy remotos. Los primeros vestigios del empleo de las plantas como medicamentos se encuentran entre los pueblos Asiáticos, Egipcios, Hebreos y Fenicios; más tarde se difundieron entre los Griegos, y después en el mundo occidental antiguo. Con los primeros herbolarios, surgen los estudios de botánica y las primeras descripciones de plantas medicinales, debidos a la labor de Hipócrates, Teofrasto y Galeno (Estrada, 1992).

La (OMS) define a la medicina tradicional como “la suma de todos los conocimientos y prácticas, explicables o no, usados en el diagnóstico, prevención y eliminación del desequilibrio físico, mental o social con base en la observación y experiencia práctica transmitidos de generación en generación oral o por escrito” (Lozoya, 1989).

En la actualidad las plantas medicinales son utilizadas para la preparación de tinturas y extractos, o particularmente como materia prima para obtener principios activos puros. El logro alcanzado con el aislamiento y caracterización de los principios activos puros, definidos y dosificables, asegura y garantiza el uso terapéutico de los productos obtenidos de las plantas medicinales (Estrada, 1992).

La investigación de las plantas medicinales debe realizarse de manera interdisciplinaria basada principalmente en la etnobotánica, la farmacología y la fitoquímica. Por lo que, una vez que se ha seleccionado la planta de uso medicinal (según la etnobotánica), y se ha demostrado un efecto biológico positivo (según la farmacología), entonces se procederá a su fraccionamiento químico con base al seguimiento de la actividad biológica, utilizando las técnicas de separación y métodos de identificación (Reyes, 1988).

Con base en lo anterior en éste estudio se aisló erisodina a partir de semillas de *E. herbacea* con la finalidad de obtener éste alcaloide y poderlo utilizar en estudios psicofarmacológicos posteriores; ya que esta sustancia ha demostrado ser, un potente antagonista de receptores acetilcolinérgicos nicotínicos del subtipo $\alpha 4\beta 2$ implicados en los procesos de memoria y aprendizaje.

ANTECEDENTES

EL GÉNERO *Erythrina*

DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

El Género *Erythrina* pertenece a la subfamilia Papilionidae de la familia de las Leguminosas (Fabaceae) y consta de 113 especies de árboles, arbustos y hierbas, con inflorescencias y semillas rojas, distribuidas en regiones tropicales y semitropicales del planeta. De ellas, 31 especies corresponden a África, 12 a Asia y Oceanía y aproximadamente 70 se encuentran en el continente Americano; de estas últimas se han identificado 27 para México, aunque existe la probabilidad de que se encuentren especies sin identificar (Fig. 1). En nuestro país el género *Erythrina* se encuentra distribuido en varios estados entre los que destacan Puebla, Morelos, Guerrero, Chiapas, Tabasco, Oaxaca, San Luis Potosí, Veracruz, Estado de México y el Distrito Federal (Fig. 2) (Musálem, 1992).

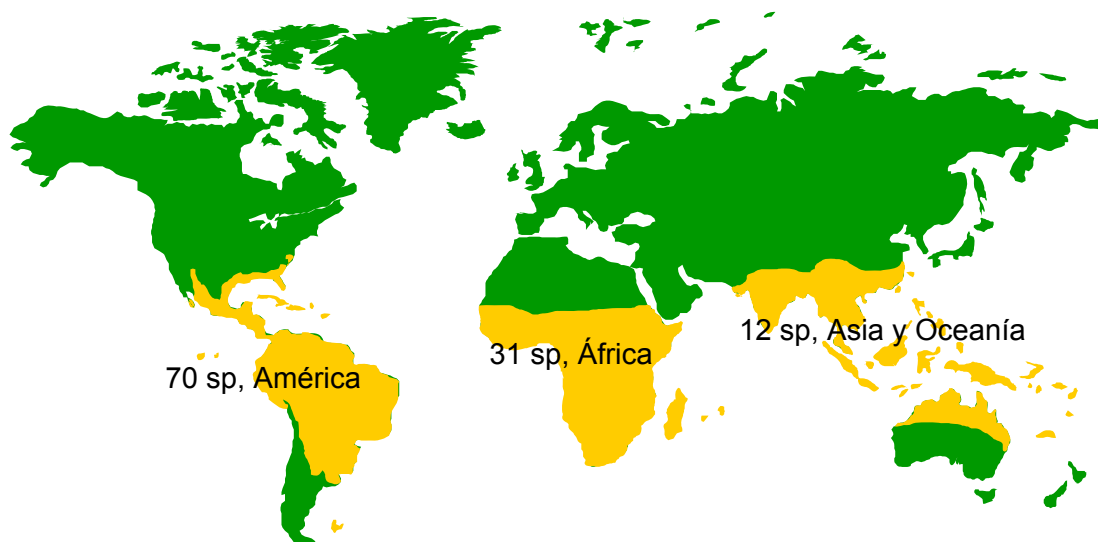


Fig. 1. Distribución mundial del género *Erythrina* (Tomado de Musálem, 1992).

USOS

Cercos vivos, forraje y sombra: En nuestro país y en varios de América Central es muy común el uso de estas especies como cercos vivos para delimitar potreros, cafetales y otros campos cultivados y subdividir propiedades rurales. En el caso de *Erythrina berterona* y *Erythrina costaricensis*, sirven como forraje para ganado vacuno y caprino; *Erythrina fusca*, es común usarla para dar sombra al café y al cacao (Budowski, 2004).

Artesanal: Con el tallo se manufacturan máscaras para el carnaval (Fig. 3), y para la danza del tecuán en Olinalá (estado de Guerrero), las semillas se emplean para la elaboración de artesanías como collares y pulseras; la corteza del árbol se utiliza como sustituta del corcho.



Fig. 2. Máscaras hechas de la madera de los árboles de *Erythrina*, en el estado de Guerrero (FOTO: Anaya-Rodríguez, 2002).

Comestible: Las flores de *E. coralloides* y *E. americana* se consumen fritas o hervidas y como relleno en la preparación de tamales en los estados de San Luis Potosí e Hidalgo. En Colombia, la harina obtenida de las semillas de *E. edulis*, se emplea en repostería dado que en esta especie las semillas no son venenosas y tienen un alto contenido de proteínas.



Fig. 3. En Colombia la harina obtenida de las semillas de *Erythrina edulis* se emplea en repostería (FOTO: Soto-Hernández, 1993).

Ornamental: Debido al colorido de sus inflorescencias, el árbol de *Erythrina* es común encontrarlo adornando jardines, banquetas y avenidas.



Fig. 4. Árboles de *Erythrina coralloides* en Avenidas (FOTO: Garín-Aguilar, 2000).

ETNOBOTÁNICA

En Veracruz, las hojas de *E. americana* son aplicadas para úlceras y abscesos, son tomadas internamente para curar las picaduras causadas por diversos insectos; las semillas molidas son aplicados en inflamaciones de brazo, piernas, cabeza y ojos (Amo, 1979 en Hastings, 1990). En la región Huasteca del noroeste de México, la corteza es hervida y tomada como anticonceptivo; en esta región, la infusión de las flores inmaduras es usada contra el insomnio (Alcorn, 1984); en Guerrero la planta es usada contra la malaria. En Durango, las semillas de *E. flabelliformes* son utilizadas como un remedio contra el dolor de muelas y la infusión de las hojas es usada por los Indios Seri de Sonora para curar la diarrea; *E. standleyana* es empleada por ésta etnia para detener las hemorragias nasales y contra el dolor de muelas (Hastings, 1990).

Los tallos de *E. berteriana*, son utilizadas en Guatemala como agentes hipnóticos; la infusión de las flores se usa como sedante y resulta un remedio eficaz para los nervios, hemorragias y contra la disentería; en la región de Bayano cuna de Panamá, la planta es usada para la debilidad de las mujeres; las ramas machacadas han sido utilizadas como veneno para los peces (Hastings, 1990).

Las semillas de *E. folkersii* son empleadas en Colombia como agente diurético en humanos y animales; las raíces tienen efecto sudorífico, las flores son empleadas en las afecciones del tórax y causan somnolencia cuando se consumen. Una cocción de toda la planta alivia la apendicitis (Hastings, 1990).

La corteza de *E. crista-galli* es utilizada en Paraguay como un agente astringente y contra el dolor de huesos, además de inducir el sueño (Hastings, 1990).

TOXICIDAD DE LAS ESPECIES DEL GÉNERO *Erythrina*

Bajo la denominación de “colorín”, se designan en México varias especies de *Erythrina* (*E. americana*, *E. corallodendron* y *E. mexicana*). Entre ellas la más conocida por su acción tóxica es *Erythrina americana*, aunque la gran mayoría de las especies detectadas para el territorio mexicano poseen efectos tóxicos (Aguilar y Zolla, 1982). Estudios fotoquímicos han permitido aislar de este género diversos alcaloides con acción tóxica entre los que se encuentran: erisotiovina, α y β eritroidina, eritrocoraloidina, hipaforina, eritratina, eritralina, eritramina, erisotiopina, coraloidina etc. Estos principios se concentran principalmente en las semillas y, en menor cantidad, en la corteza y en las hojas. Se ha comprobado experimentalmente que los alcaloides erisotiovina, α y β eritroidina tienen un efecto semejante al producido por el curare, es decir, producen una parálisis de los músculos esqueléticos e inhiben en la transmisión de los impulsos nerviosos. También se ha detectado en el género la presencia de una saponina no caracterizada que actúa dilatando la pupila y provocando trastornos visuales. En las hojas, el tallo, la raíz y los frutos se han detectado concentraciones bajas de ácido cianhídrico. Otros síntomas que se presentan en las intoxicaciones con *E. americana* son: hipotensión arterial y parálisis respiratoria, tanto en el hombre como en los animales afectados (Aguilar y Zolla, 1982).

ESPECIE *Erythrina herbacea* (L.)

UBICACIÓN TAXONÓMICA (Niembro, 1990).

REINO: Plantae
DIVISIÓN: Magnoliophyta
SUBDIVISIÓN: Angiosperma
CLASE: Dicotyledoneae
ORDEN: Rosales
FAMILIA: Fabaceae
GÉNERO: *Erythrina*
ESPECIE: *E. herbacea* L.

DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

Arbusto con o sin espinas, por lo común alcanza hasta 1.5 metros de altura con una extensión de 1.2 metros. Ramas espinosas de 75 centímetros en promedio tienen un periodo de floración generalmente de marzo a mayo. Las flores son en forma de tubo o espada de color rosa intenso (Fig. 5) (Toledo, 1974).

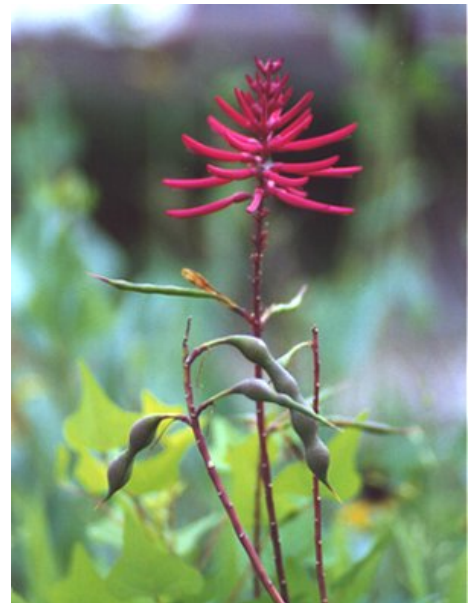


Fig. 5. *Erythrina herbacea* (L.)

Presenta hojas pinnadas trifoliadas (Fig. 6), el foliolo terminal es rómbico-ovalado y más grande que los dos foliolos laterales (Martínez y Matuda, 1979).



Fig. 6. Hojas de *Erythrina herbacea* (L.).

El fruto es una legumbre de color y tamaño variable; las semillas comúnmente son rojas (Fig. 7), aunque a veces de color café o negras (Boyás, 1992). En algunas especies las semillas permanecen unidas a lo largo de la vaina abierta y son fácilmente dispersadas por los pájaros que se alimentan de bayas. En otras especies, las semillas no permanecen en las vainas abiertas y son dispersadas por corrientes de agua y en especies con vainas aladas las semillas son dispersadas por el viento (Neill, 1993).



Fig. 7. Semillas de *Erythrina herbacea* (FOTO: www.floridata.com).

NOMBRE COMÚN

Colorín Patol (Tamaulipas), Pichoco cimarron (región del Tajín Veracruz), Pomachita (lengua totonaca en la región del Tajín Veracruz), Pemoche y Pejmoch (Sureste de San Luis Potosí), Cococho (Michoacán) (Martínez, 1987).

ALCALOIDES.

Los alcaloides son compuestos sólidos, cristalinos, incoloros, de reacción básica; contienen uno o más átomos de nitrógeno que forman parte de un anillo y que poseen actividad farmacológica. Una propiedad que todos los alcaloides presentan en su acción farmacológica, es que con una dosis mínima de ellos se obtiene una máxima acción, y así muchos son venenosos, la mayoría son específicos y actúan sobre un órgano o sistema (Valencia, 1995). Poseen estructuras moleculares complejas, con uno o varios anillos heterocíclicos como un pirrol, piridina, pirrolidina, quinolina o isoquinolina, pero ocasionalmente se encuentran del lado de una cadena alifática. Los alcaloides pueden presentarse como aminas derivadas teóricamente de amonio, la mayoría como aminas terciarias, ocasionalmente como aminas secundarias y, con menor frecuencia como compuestos cuaternarios (Maldoni, 1991).

Los alcaloides pocas veces se encuentran en las plantas en el estado de bases libres, es más común encontrarlos en forma de sales tanto solubles como insolubles. Por lo general los alcaloides pueden estar en todas las partes de la

planta, pero son más frecuentes en los órganos que están en una etapa de intenso desarrollo, como las yemas o los brotes de las ramas, las hojas y las raíces, y a veces en cortezas, tallos, semillas, etcétera. Las cantidades de alcaloides que se encuentran en las diferentes partes de una planta pueden variar, es común encontrar cantidades distintas en una misma especie; esto se debe a las condiciones que hay en el medio en el que crecen dichas especies, ya que intervienen el clima, la altitud, la composición del suelo, la estación del año, la etapa de crecimiento de la planta, etcétera (Valencia, 1995).

Para el hombre, los alcaloides desempeñan un papel destacado en las industrias química y farmacéutica. Se les han dado varios usos: potenciadores analgésicos (cocaína), antiamebianos (emetina), anticolinérgicos (atropina, hiosciamina, escopolamina), antidepresivos (reserpina, rescinamina, deserpina, protoveratina A), antimalárico (quinina), antitumorales (vinblastina, vincristina), estimulante nervioso (cafeína), anestésico local (cocaína) (Pelletier, 1983).

Se ha descrito mucho acerca de la función que desempeñan los alcaloides en las plantas, se dice que sirven como repelentes o atrayentes de los insectos; son reguladores del crecimiento de las plantas; es la forma en que la planta almacena nitrógeno y sustancias de reserva capaces de suministrar nitrógeno u otros elementos necesarios para la economía de la planta; son agentes venenosos que sirven de protección contra los animales herbívoros ya que debido a su sabor amargo los animales no se atreven a comer de la planta (Valencia, 1995).

ALCALOIDES DEL GÉNERO *Erythrina*

Desde 1930 se ha mostrado la presencia de alcaloides en diferentes especies de *Erythrina*, en estudios realizados con diferentes especies de este género se ha encontrado que las semillas son estructuras vegetales en donde más se acumula el contenido de alcaloides, cerca de 1%, aunque también estos se han logrado aislar de hojas, tallo, tronco, corteza, vainas, raíces y flores (García-Mateos y Soto-Hernández; 1998).

En 1877, el Dr. Francisco Río de la Loza comprobó que las semillas de *Erythrina coralloides* son venenosas ya que experimentó en perros, él mismo las analizó y encontró la presencia de agua, grasa sólida y líquida, resinas, alcaloide, albúmina vegetal, goma, azúcar, ácido orgánico, fécula y materias inorgánicas (Martínez, 1996).

En 1888 el Dr. Fernando Altamirano, extrajo un alcaloide de *Erythrina coralloides* llamándolo coraloidina, este alcaloide tiene la propiedad de paralizar los nervios motores cuando se administra por vía intravenosa, y reduce su actividad por vía oral notando que produce un efecto semejante al del curare (Martínez, 1996; Lozoya y Lozoya, 1982), proponiéndolo como un sustituto de éste, e incluso como un tratamiento para las convulsiones (Lehman, 1937).

El profesor José Ma. Prieto en 1890, analizando la corteza de *Erythrina* sp. encontró dos materiales colorantes, una roja y otra amarilla, una resina neutra y un alcaloide con propiedades narcóticas (Martínez, 1996).

Folkers y Major en 1937 aislaron un principio activo a partir de un extracto de *Erythrina americana* al que llamaron eritroidina con acción paralizante, determinando que se trataba de dos alcaloides isómeros a los cuales llamaron α y β -eritroidina (Craig, 1981).

Folkers y Koniuszy (1940) aislaron y caracterizaron erisodina y erisovina de *Erythrina glauca* y *E. sandwicensis*; erisopina y erisocina de *Erythrina sandwicensis*; erisocina y erisodina de *E. poeppigiana* y *E. americana*; de *E. poeppigiana* y *E. berteroana* erisovina; erisodina y erisopina de *E. abyssinica* y *E. herbacea*.

Los alcaloides de *Erythrina* poseen un esqueleto base el cual se ha denominado eritranano (Fig.8), estructuralmente se trata de una espiroamina tetracíclica.

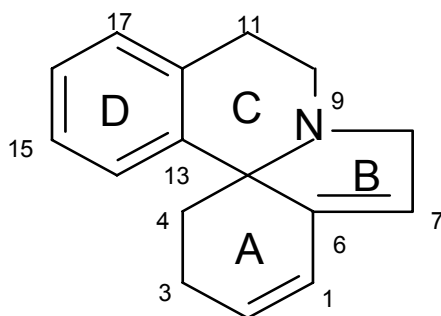


Fig. 8. Esqueleto eritranano.

Hargreaves, *et al.* (1974) publicaron una lista de 34 alcaloides conocidos de 22 especies americanas de *Erythrina*. En el mismo año, Games, Jackson, Kahn y Millington, realizaron un estudio similar con 18 especies africanas, asiáticas, polinesias y australianas del género *Erythrina*, encontrando más de 50 alcaloides que se clasificaron con base al trabajo de Hargreaves y colaboradores (1974) en tres tipos según su estructura: 1) diénicos: poseen un doble enlace de carbonos en los anillos A y B (Fig. 9), 2) alquénicos: poseen un doble enlace entre carbonos del anillo A (Fig. 10) y 3) lactónicos: poseen una lactona en lugar de un anillo aromático D (Fig. 11).

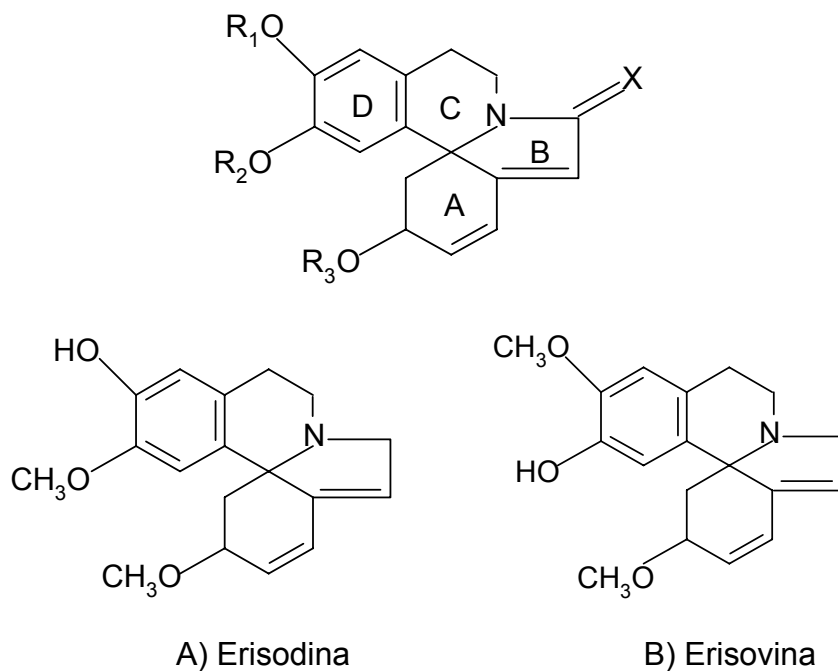
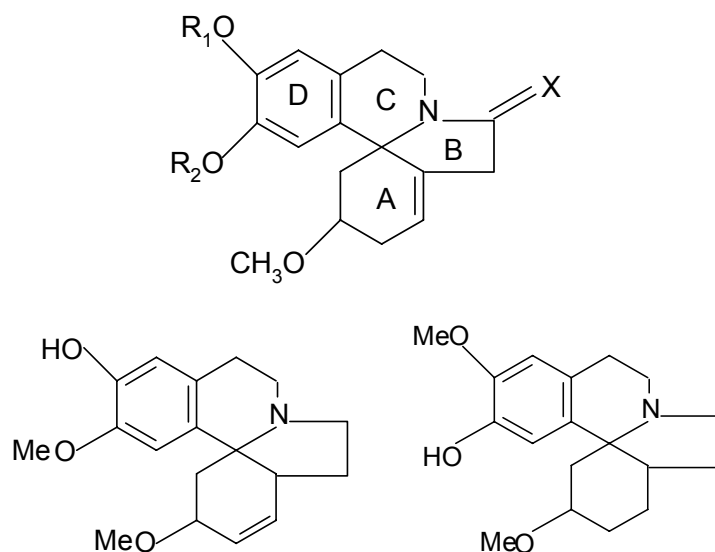


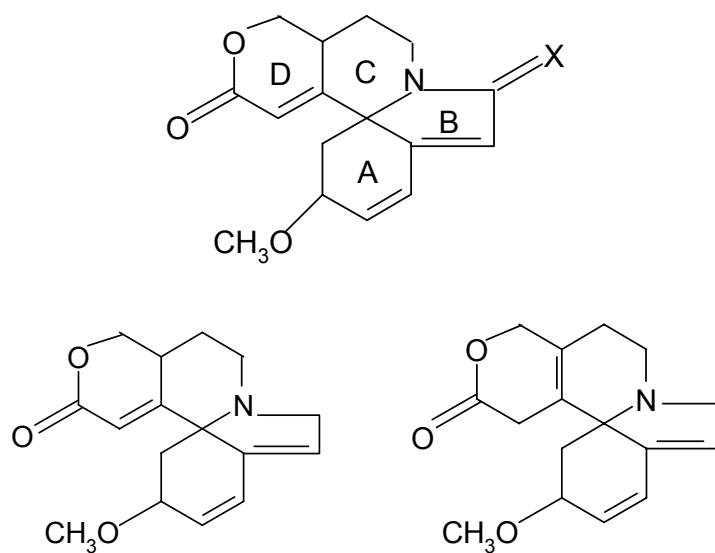
Fig. 9. Estructura y ejemplos de los alcaloides diénicos.



A) Dihydroerisodina

B) Dihydroerisovina

Fig. 10. Estructura y ejemplos de alcaloides alquénicos.



A) α-eritroidina

B) β-eritroidina.

Fig. 11. Estructura y ejemplos de alcaloides lactónicos.

Lehman (1937) observó que los extractos alcohólicos obtenidos de semillas de *Erythrina americana*, tienen efectos paralizantes semejantes a los del curare. Subsecuentemente, diferentes alcaloides extraídos de plantas del género *Erythrina* han sido identificados con estas propiedades, tal es el caso de dihydro- β -erythroidina el cual se encuentra entre los alcaloides más potentes. Además de los efectos semejantes al curare, dihydro- β -eritroidina es un antagonista competitivo neuronal de los receptores nicotínicos de acetilcolina (Williams y Robinson, 1984).

El curare es un término genérico para designar diversos venenos que los indígenas sudamericanos aplicaban en sus flechas, para la cacería de animales salvajes; la muerte sobreviene por parálisis del músculo estriado (Goodman y Guilman, 2004).

El curare y los medicamentos sintéticos relacionados actúan como antagonistas competitivos de la acetilcolina y participan de las propiedades de los agentes bloqueadores ganglionares (Goth, 1984).

Cuando se da un impulso nervioso se genera un cambio eléctrico conocido como potencial de acción que se propaga por toda la terminación nerviosa, este impulso nervioso va a provocar que las vesículas sinápticas lleguen a la terminación nerviosa y pueda ser liberada la acetilcolina. La acetilcolina se va a pegar al receptor nicotínico que se encuentra en la membrana postsináptica, la unión del neurotransmisor con el receptor va a activar a la proteína G esta a su vez activa a la fosfolipasa C y la fosfolipasa C va a activar a dos mensajeros, el

diacil glicerol y el trifosfato de inositol; el trifosfato de inositol va a abrir canales de calcio en el retículo sarcoplásmico, el calcio que sale del retículo sarcoplásmico se une a la calmodulina y van a formar a la cinasa de cadena ligera de la miosina, la miosina fosforilada junto con la actina van a dar lugar a la despolarización lo que se conoce como contracción muscular. Cuando la acetilcolina es liberada en presencia de un agente bloqueador, no tiene lugar la despolarización de la membrana postsináptica (Meyers, 1998).

Las semillas de los árboles y matorrales del género *Erythrina* que abundan en las regiones tropicales y subtropicales, contienen alcaloides que actúan como antagonistas competitivos de la acetilcolina y participan de las propiedades de los agentes bloqueadores ganglionares (Godman y Guilman, 2004).

ACETILCOLINA Y SUS RECEPTORES

La Acetilcolina ACh es una molécula secretada en las terminaciones nerviosas simpáticas y parasimpáticas, que activa a dos tipos de receptores, que difieren en su estructura química y en sus propiedades fisiológicas. Unos son denominados receptores nicotínicos (R-nic) y los otros muscarínicos, debido a que la nicotina y la muscarina funcionan como agonistas específicos de unos y otros respectivamente (López, 2003).

Los receptores muscarínicos están ampliamente distribuidos a través del cuerpo y favorecen numerosas funciones vitales en el cerebro y sistema nervioso

autónomo periférico. En el sistema periférico, la activación de los receptores muscarínicos produce una disminución en la frecuencia cardiaca, una constricción de las líneas aéreas del pulmón, un incremento en la motilidad del tracto gastrointestinal, un incremento en la secreción de las glándulas exocrinas. Con excepción de la respuesta cardiaca, la cual es mediada por los receptores m_2 , virtualmente todos los otros efectos son mediados por los receptores m_3 localizados sobre las células efectoras. En contraste, el cerebro contiene principalmente receptores muscarínicos m_1 m_4 (Yasuda, Cielsa, Flores, Weinstein, Spagnola and Wolfe, 1992). Puede verse que los receptores muscarínicos m_1 m_4 son los más abundantes en varias regiones del cerebro anterior (Ehlert, Roeske and Yamamura, 1994).

Los receptores para acetilcolina de tipo nicotínico (R-nic) son canales catiónicos que se abren por la unión del neurotransmisor acetilcolina. A la fecha se han identificado 17 genes diferentes que codifican para subunidades de R-nic. En el músculo esquelético fetal los R-nic están formados por las subunidades α_1 , β_2 , γ y δ , mientras que la subunidad γ se cambia por la ϵ en el músculo adulto. En el sistema nervioso se han identificado las subunidades de los R-nic α_2 - α_{10} y las β_2 - β_4 , y son α_4 y β_2 las subunidades predominantes en el cerebro (López, 2003).

FUNCIONES DE LOS RECEPTORES NICOTÍNICOS

Se conoce que los receptores nicotínicos están implicados en varias funciones cognitivas complejas, tales como la atención, el aprendizaje y la consolidación de la memoria, la percepción sensorial y el control de la actividad locomotora, percepción del dolor, regulación de la temperatura corporal. El uso de la nicotina y de los agonistas de R-nic tienen efectos benéficos en los pacientes enfermos de Alzheimer y Parkinson. Se ha sugerido que la activación de los R-nic formados por $\alpha_4\beta_2$, que son predominantes en el SNC, intervienen en los procesos de aprendizaje y memoria. Se ha demostrado que el uso de la nicotina y de otros agonistas tienen efectos benéficos en enfermos de Alzheimer y Parkinson (López, 2003).

IMPORTANCIA DE LOS ALCALOIDES DE *Erythrina* EN ESTUDIOS PSICOFARMACOLÓGICOS.

Dentro del hipocampo se ha encontrado que las subunidades α_7 y $\alpha_4\beta_2$ de los receptores acetilcolinérgicos nicotínicos están implicadas en el funcionamiento de la memoria. En el hipocampo ventral la infusión de dosis altas de dihydro- β -erythroidina (DH β E) antagonista de las subunidades $\alpha_4\beta_2$ y metilcaconitina (MLA) antagonista de la subunidad α_7 , deterioran la memoria en la ejecución de una tarea en el laberinto radial de 8 brazos (Felix y Levin, 1997). En otro estudio Levin, et al. (2001) donde usaron el laberinto radial de 16 brazos y administraron dosis

mas bajas de DH β E y MLA que las reportadas por Felix y Levin (1997), demostraron también que estas drogas causan un deterioro en la memoria.

Se ha señalado en varias ocasiones, que la administración de nicotina en ratas facilita el funcionamiento de la memoria en el laberinto radial. Brancroft y Levin (2000) mostraron que las infusiones de DH β E, dentro del hipocampo ventral, disminuyeron significativamente el funcionamiento de la memoria y con la administración de la nicotina esta deficiencia fue eliminada.

Barros, *et al.* (2004) indicaron que los receptores nicotínicos presentes en la región CA1 del hipocampo dorsal, participan en la adquisición y consolidación de la memoria a corto y a largo plazo en una tarea de evitación inhibitoria; esto fue observado con la administración de DH β E, Mecamilamina y el agonista nicotina.

Cheeta, *et al.* (2001) confirman que dentro del núcleo del rafe dorsal (NRD), las bajas dosis de nicotina ocasionan un aumento en una prueba de interacción social en ratas. El efecto ansiolítico de la nicotina fue completamente antagonizado por DH β E, las dosis de este alcaloide no modificaron la interacción social de los sujetos cuando esta sustancia se administra en el NRD.

A partir del trabajo químico y farmacológico realizado en el laboratorio con especies del género *Erythrina* se observó que la administración de fracciones alcaloideas o del alcaloide β -erythroidina, obtenido de semillas de *E americana*, y

su derivado dihidro- β -erythroidina, disminuyeron la conducta agresiva de ratas (Garín-Aguilar *et al.*, 2000; García-Mateos *et al.*, 2000); y recientemente se señaló la presencia de erisodina y erisovina como los alcaloides más abundantes en las semillas de *E. herbacea* (Garín-Aguilar *et al.*, 2001).

En 1995, estudios realizados por Decker y colaboradores, mostraron que la erisodina tiene mucho más afinidad a receptores acetilcolinérgicos nicotínicos de tipo neuronal que la dihidro- β -erythroidina, indicando que la erisodina tuvo siete veces más afinidad para el sitio de enlace nicotínico de alta afinidad marcado por [3 H](-)-citisina que la dihidro- β -erythroidina. Este sitio parece corresponder al subtipo $\alpha_4\beta_2$ del receptor acetilcolinérgico nicotínico, el principal sitio de enlace (-)-nicotina de alta afinidad en el cerebro de roedores.

JUSTIFICACIÓN

Estudios han demostrado que erisodina es un potente antagonista competitivo de receptores acetilcolinérgicos nicotínicos de tipo neuronal subtipo $\alpha_4\beta_2$, esto hacen de este alcaloide una herramienta importante para la caracterización funcional de estos receptores nicotínicos en el cerebro. El presente estudio se planteó con la finalidad de aislar y caracterizar los alcaloides presentes en las semillas de *E. herbacea* específicamente erisodina, para en otro momento utilizar esta sustancia y conocer la participación de estos receptores $\alpha_4\beta_2$ en los procesos de memoria y aprendizaje. Por lo que en este estudio se planteó el siguiente objetivo.

OBJETIVO GENERAL

- Establecer en el laboratorio, las condiciones fisicoquímicas adecuadas para la obtención de erisodina a partir de semillas de *E. herbacea* (L.).

OBJETIVOS PARTICULARES

- Obtener las fracciones alcaloideas hexánica, metanólica e hidrolizada a partir de semillas de *Erythrina herbacea* (L.).

- Detectar la presencia de alcaloides en las fracciones crudas y sub-fracciones alcaloideas obtenidas con la cromatografía en columna.

- Realizar la caracterización de alcaloides obtenidos mediante cromatografía de líquidos-espectrometría de masas.

- Aislar y confirmar la autenticidad de erisodina por un análisis de resonancia magnética nuclear.

MATERIALES Y MÉTODOS

A) Colecta.- Se realizó una colecta manual de semilla de *Erythrina herbacea* en el Poblado de San Pedro de las Anonas en el Municipio de Aquismón San Luis Potosí. La planta fue identificada por el Dr. Mario Sousa Sánchez del Instituto de Biología, y ésta se encuentra depositada en el Herbario Nacional "MEXU" del mismo instituto.

B) Extracción.- La extracción de los alcaloides crudos se llevo a cabo con el método propuesto por Soto-Hernández y Jackson (1994).

i) Extracción de alcaloides solubles en hexano.- Las semillas se pasaron por un molino y ya trituradas se colocaron en cartuchos de tela para su extracción con hexano en un equipo Soxhlet por 48 horas (Fig. 12), para después concentrar a presión reducida, acidificar y extraer con diclorometano. Posteriormente se alcalinizó y los alcaloides libres solubles en hexano se extrajeron con cloruro de metileno.

ii) Extracción de alcaloides solubles en metanol.- La semilla desengrasada fue sometida a reflujo por 48 horas con metanol. Después de la extracción se procedió a concentrar a presión reducida, acidificar y extraer con diclorometano. Después de alcalinizar, los alcaloides libres solubles en metanol se extrajeron con diclorometano.

iii) Extracción de alcaloides liberados.- La fase acuosa de la extracción anterior, se acidificó y se sometió a reflujo por 3 horas. El hidrolizado se alcalinizó y extrajo con cloruro de metileno para obtener la fracción de alcaloides liberados.



Fig. 12. Extracción de alcaloides a partir de semillas de *E. herbacea* con un equipo Soxhlet (FOTO: Garín-Aguilar, 2004)

C) Separación e identificación.- Las fracciones de alcaloides crudos se separaron mediante cromatografía en columna (CC) (gel de sílice G60 Merk 70-230 mallas), la elusión se efectuó con diclorometano:metanol con proporciones de 99:1 hasta 90:10. Se obtuvieron fracciones de 10 ml cada una, que se analizaron por cromatografía en capa fina (CCF), utilizando cromatofolios de vidrio con sílica gel de 20 x 20, empleándose como eluyente una mezcla de diclorometano:metanol (90:10), posteriormente las placas fueron visualizadas con luz ultravioleta para

después revelarlas con reactivo de Dragendorff (Fig. 13). Las fracciones obtenidas durante la cromatografía en columna y que presentaron el mismo valor de Rf en la cromatografía de capa fina se combinaron, se eliminó el disolvente y el residuo se pesó. El material que cristalizó se purificó y se les tomó el punto de fusión con un aparato Electrothermal sin corrección de temperatura.



Fig. 13. Cromatografía en Columna y en Capa Fina (FOTO: Garín-Aguilar, 2004).

Análisis por Cromatografía de Líquidos/Espectrómetro de Masas HPLC/EM.- Esta técnica fue realizada para analizar los alcaloides que estuvieron presentes en cada fracción de alcaloides crudos. Para el análisis por combinación de HPLC/EM se utilizó una columna C18 reversa y como fase móvil: gradiente de acetato de amonio al 0.1%/metanol/acetonitrilo en proporción 70:20:0.5, 1 minuto, luego 10 minutos a 50:45:50 y finalmente 5 minutos en condiciones isocráticas; se detectó a 230nm. El detector de masa fue versión de electrospray.

Resonancia Magnética Nuclear ($^1\text{HRMN}$).- Los cristales puros de erisodina se obtuvieron a partir de la fracción metanólica; y fueron identificados por su espectro de resonancia magnética con un espectrómetro Mercury-3000BB de 300 MHz usando como disolvente cloroformo deuterado (CDCl_3) y como referencia interna tetrametil silano al 1% y contrastado con erisodina pura.



Fig. 14. Espectrómetro de $^1\text{HRMN}$ Mercury-3000BB.

OBTENCIÓN DE LAS FRACCIONES ALCALOIDEAS

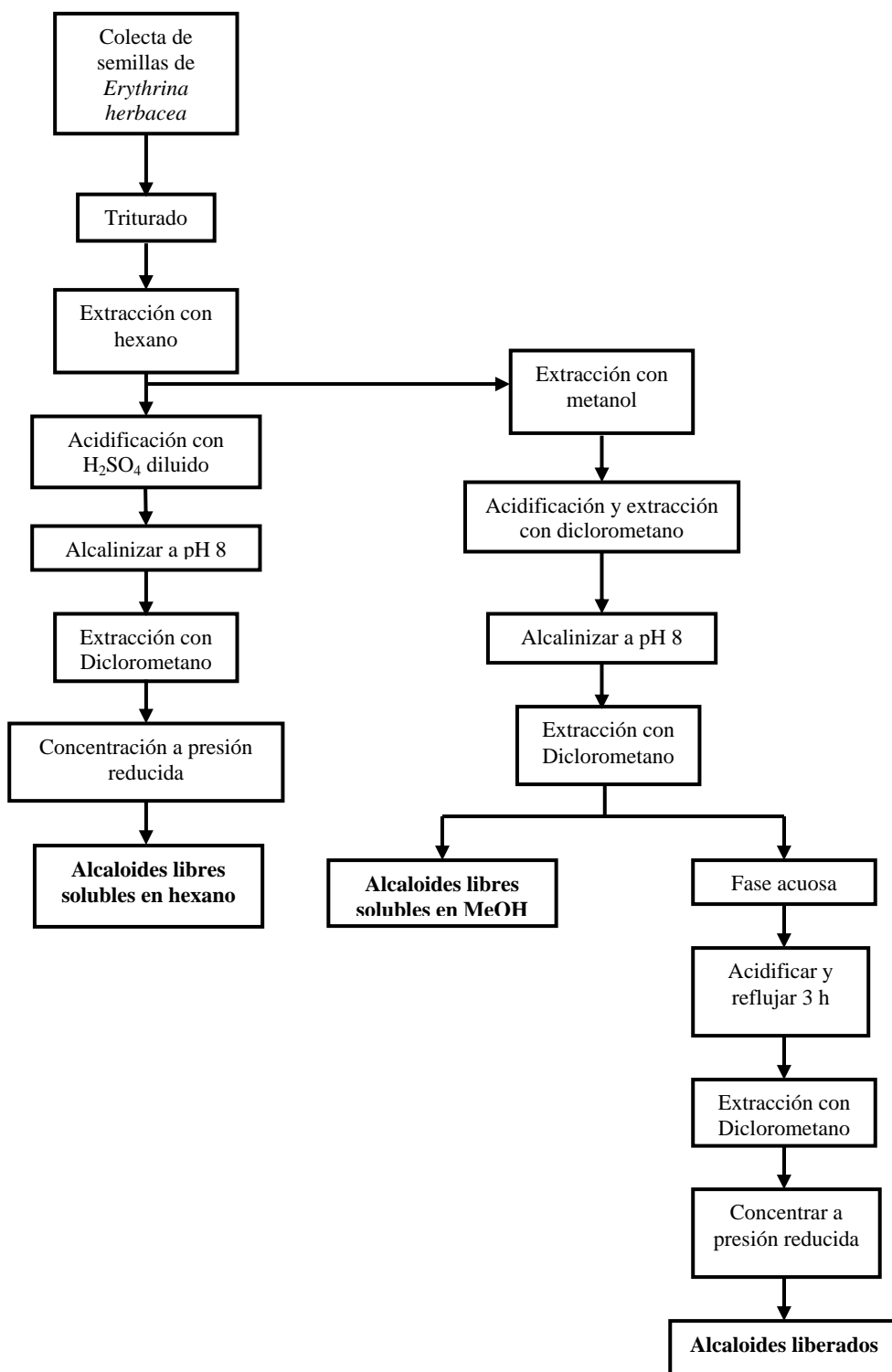


Fig 15. Diagrama para la extracción de fracciones alcaloideas.

OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ERISODINA

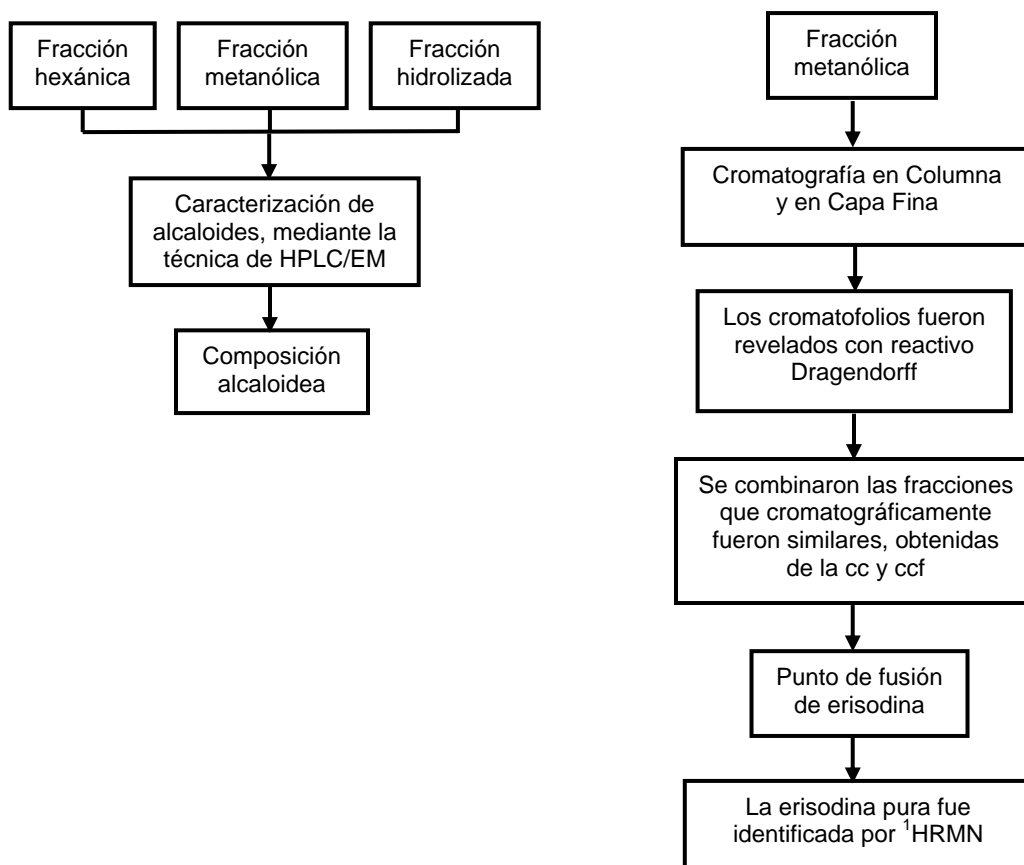


Fig. 16. Diagrama de Separación e Identificación de las fracciones alcaloideas obtenidas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

DETERMINACIÓN TAXONÓMICA

La determinación taxonómica fue realizada por el Dr. Mario Sousa del Instituto de Biología y se encuentra depositada en el Herbario Nacional "MEXU" del mismo instituto con números de registro: 599010, 654912 y 654920. Se pudo establecer que la planta, conocida por la comunidad Tének como "Pemoche silvestre", es *Erythrina herbacea* L.

EXTRACCIÓN DE LAS FRACCIONES ALCALOIDEAS

En el cuadro 1 se presenta el contenido (%) de la fracción alcaloidea obtenido por otros autores para algunas especies del género, y los obtenidos en el presente trabajo con *E. herbacea*. El contenido de los extractos crudos de alcaloides obtenidos en *E. herbacea* con respecto al peso seco de las semillas fue: fracción hexánica: 0.0444%, fracción metanólica: 0.1791% y fracción hidrolizada: 0.245%.

Hargreaves y colaboradores (1974) indican que los alcaloides libres de la fracción hexánica se han reportado junto con los alcaloides solubles en metanol; por lo que sumando estos dos porcentajes en *E. herbacea* obtenemos un valor de 0.2235% para la fracción de alcaloides crudos, el cual se encuentra por encima del reportado para *E. americana* que es de 0.11% (Folkers y Koniuszy, 1940), para *E. brucei* de 0.19% (Chawla *et al.*, 1985), para *E. variegata* de 0.11%, para *E.*

leptorhiza de 0.18% (Soto-Hernández y Jackson, 1994), y finalmente en la misma especie *E. herbacea* de 0.1882% (Plaza, 2003). Sin embargo, nuestro porcentaje se encuentra por debajo del reportado para *E. tholloniana* que es de 0.67% (Chawla *et al.*, 1985), *E. americana* de 0.40% (Sotelo, Soto-Hernández, Lucas y Giral, 1993) y *E. americana* de 0.347% (Garín-Aguilar *et al.*, 2000).

La fracción de alcaloides hidrolizados obtenido en *E. herbacea* presentó un porcentaje de 0.245% valor que se encuentra por debajo del reportado para *E. abyssinica* de 2.65% (Folkers y Koniuszy, 1940), *E. americana* de 0.31% (Folkers y Koniuszy, 1940), *E. brucei* de 0.78% (Chawla *et al.*, 1985), *E. leptorhiza* de 0.35% (Soto-Hernández y Jackson, 1994), *E. variegata* de 0.33% (Soto-Hernández y Jackson, 1994), *E. herbacea* de 1.41% (Folkers y Koniuszy, 1940), pero también se encuentra por encima del reportado para *E. americana* 0.13% (Sotelo, Soto-Hernández, Lucas y Giral, 1993), *E. tholloniana* de 0.21% (Chawla *et al.*, 1985) y *E. americana* de 0.224% (Garín-Aguilar *et al.*, 2000).

Las variaciones observadas en los porcentajes pueden deberse a la especie y variedad que se trabajó (Hargreaves, *et al.*, 1974), así como al grado de madurez de la planta, ya que al ser metabolitos secundarios, los alcaloides se concentran en diferente cantidad conforme esta va madurando, así como el método de extracción empleado (Folkers y Koniuszy, 1940). Las cantidades de alcaloides que se encuentran en las diferentes partes de una planta pueden variar, dentro de una misma especie; esto se debe a las condiciones que hay en el medio en el que crecen dichas especies, ya que intervienen el clima, la altitud, la

composición del suelo, la estación del año y la etapa de crecimiento de la planta (Valencia, 1995).

Con base en nuestros datos y en virtud de lo anterior, se considera que el método de extracción que se usó para la obtención de alcaloides, propuesto por Soto-Hernández y Jackson (1994), fue adecuado dado que los datos obtenidos en el estudio se encuentran dentro del intervalo de valores reportados por otros autores para diferentes especies del género *Erythrina*.

Especie	% de fracción alcaloidea	Reportado por:
<i>E. abyssinica</i>	2.65 hidrolizados	Folkers y Koniuszy, 1940
<i>E. americana</i>	0.31 hidrolizados 0.11 libres*	Folkers y Koniuszy, 1940
<i>E. herbacea</i>	1.41 hidrolizados	Folkers v Koniuszv. 1940
<i>E. brucei</i>	0.78 hidrolizados 0.19 libres	Chawla. <i>et al.</i> . 1985
<i>E. tholloniana</i>	0.21 hidrolizados 0.67 libres	Chawla. <i>etal.</i> . 1985
<i>E. americana</i>	0.13 hidrolizados 0.40 libres	Sotelo, Soto-Hernández, Lucas y Giral, 1993
<i>E. leptorhiza</i>	0.35 hidrolizados 0.18 libres	Soto-Hernández y Jackson. 1994
<i>E. melanacantha</i>	0.24 hidrolizados 0.19 libres	Soto-Hernández y Jackson. 1994
<i>E. variegata</i>	0.33 hidrolizados 0.11 libres	Soto-Hernández y Jackson. 1994
<i>E. americana</i>	0.224 hidrolizados 0.068 hexánica 0.279 metanólica	Garín-Aguilar, <i>et al.</i> , 2000
<i>E. herbacea</i>	0.245 hidrolizados 0.0411 hexánica 0.1471 metanólica	Plaza Reséndiz, 2003
<i>E. herbacea</i>	0.0444 hexánica 0.1791 metanólica 0.245 hidrolizados	PRESENTE TRABAJO

Cuadro 1. Contenido en porcentaje de las fracciones alcaloideas de semillas del género *Erythrina*. * No considera la fracción hexánica (Modificado de Garín-Aguilar, *et al.*, 2000).

ANÁLISIS DE LOS ALCALOIDES MEDIANTE HPLC/EM

FRACCIÓN HEXÁNICA

En la figura 17 se presenta el cromatograma de HPLC/EM de la fracción de alcaloides solubles en hexano. Los tiempos de retención 14:73 y 15:07 minutos, corresponden a los isómeros erisovina y erisodina (PM=299 g/mol) respectivamente, el pico con tiempo de retención de 17:81 minutos corresponde a erisotrina (PM=313 g/mol) y eritralina (PM=294 g/mol) tiene un tiempo de retención de 20.55 minutos.

FRACCIÓN METANÓLICA

En el espectro de la fracción metanólica (Fig. 18), los alcaloides isoméricos erisodina y erisovina (PM=299 g/mol) aparecen con un tiempo de retención de 15:20 y 15:68 minutos respectivamente; el pico con tiempo de retención de 18.13 minutos corresponde al de la erisotrina (PM=313 g/mol); eritralina (PM=294 g/mol) tiene un tiempo de retención de 20.71 minutos y la presencia de la glucoerisopina (PM=463 g/mol) se pone de manifiesto al tiempo de retención de 12.22 minutos.

FRACCIÓN HIDROLIZADA

En el espectro que se obtuvo al inyectar la fracción de alcaloides liberados (Fig. 19), los tiempos de retención correspondientes a 11:0 y 11:40 minutos, indican la presencia de erisovina y erisodina (PM=299 g/mol) respectivamente, de la misma forma, se registra el pico característico de la erisopina (PM=287 g/mol), con tiempo de retención de 7:07 minutos.

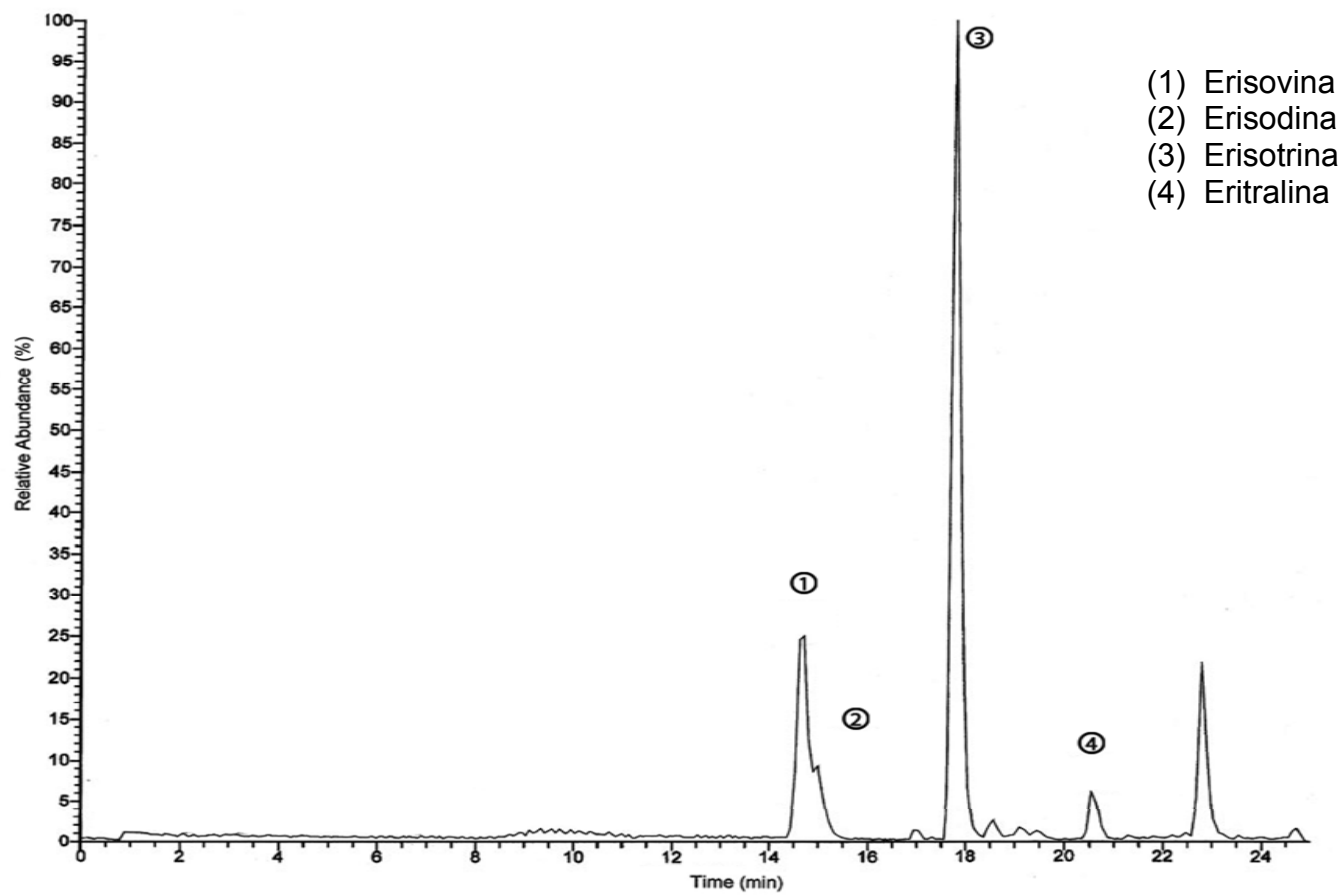


Fig. 17. Espectro de HPLC/EM de fracción hexánica de semillas de *E. herbacea*.

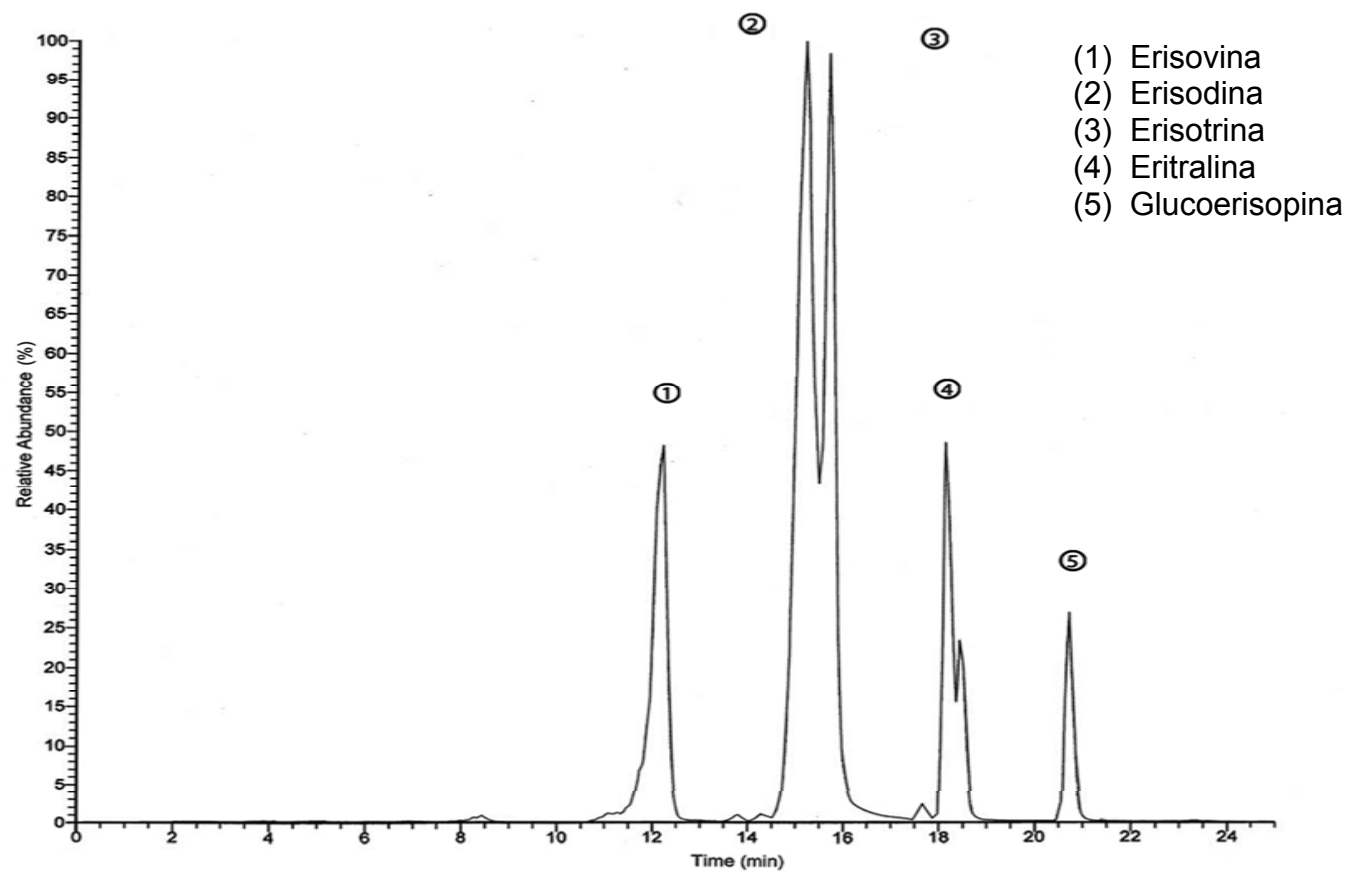


Fig. 18. Espectro de HPLC/EM de la fracción metanólica de semillas de *E. herbacea*.

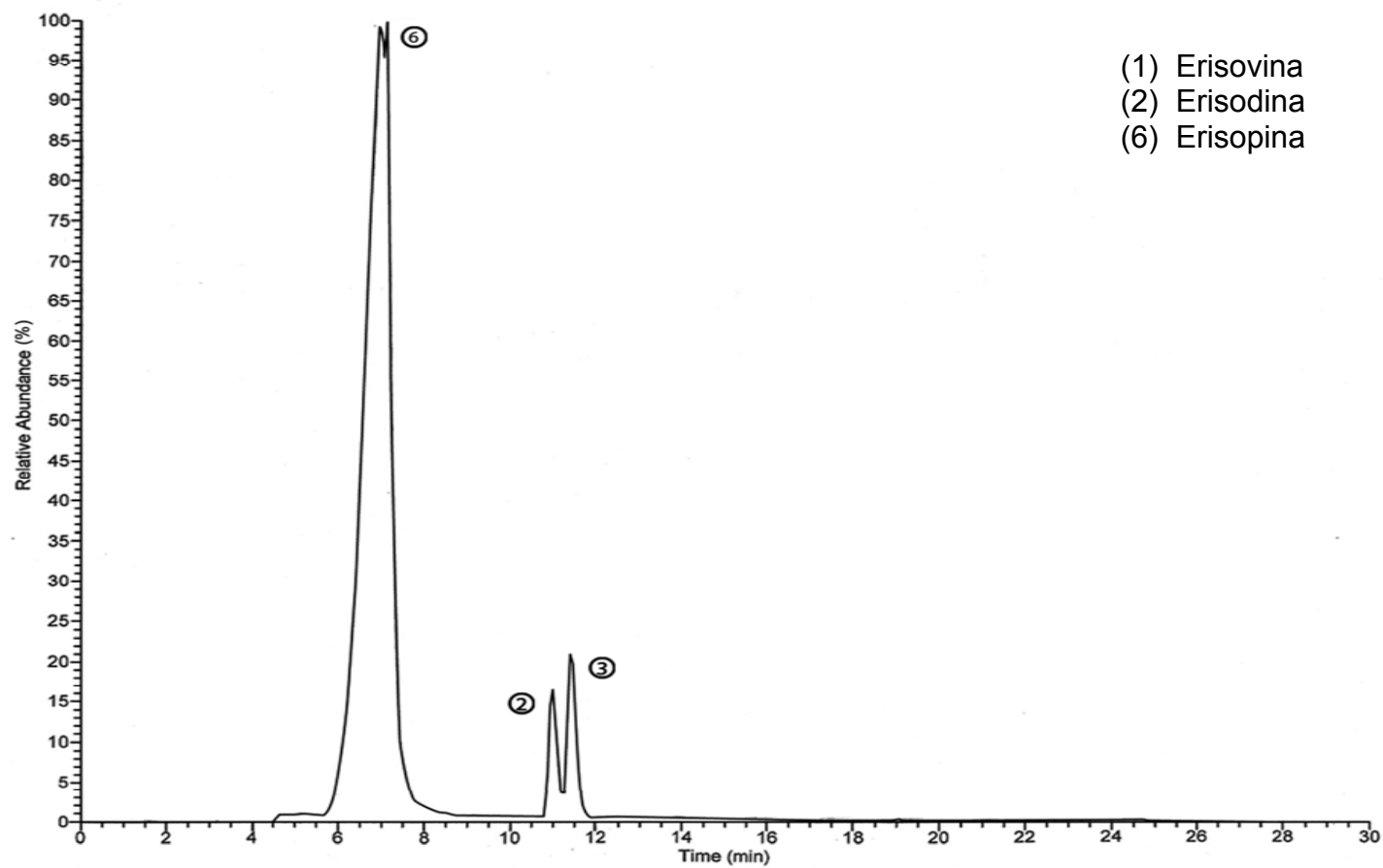


Fig. 19. Espectro de HPLC/EM de la fracción hidrolizada de semillas de *E. herbacea*.

alcaloides: erisovina, erisodina, erisotrina, eritralina, glucoerisopina y erisopina, de los cuales los mas abundantes son: erisotrina y erisopina.

Cuadro 2. Análisis cuantitativo de los alcaloides presentes en los extractos de *E. herbacea*.

ALCALOIDE	FRACCIÓN HEXÁNICA	FRACCIÓN METANÓLICA (alcaloides libres)	FRACCIÓN METANÓLICA (alcaloides liberados)
(1) Erisovina	9.02	36.08	3.43
(2) Erisodina	5.46	29.64	5.84
(3) Erisotrina	82.24	5.82	np
(4) Eritralina	3.28	5.42	np
(5) Glucoerisopina	np	23.04	np
(6) Erisopina	np	np	90.73

Las proporciones relativas de los alcaloides fueron calculadas a partir de las áreas bajo la curva en los picos del espectro de HPLC/EM (np indica que en esa fracción no se presentó el alcaloide).

En el estudio realizado por García-Mateos y colaboradores (1998), donde analizaron con cromatografía de gases/espectroscopia de masas (CG/EM) seis especies de *Erythrina*, *E. americana*, *E. coralloides*, *E. leptoriza*, *E. mexicana*, *E. oaxacana* y *E. sousa*; reportan la presencia de erisodina, erisovina, eritrinina, eritralina, cristamidina, 8-oxo-eritralina, 8-oxo-eritroidina, α -eritroidina y β -eritroidina. De los nueve alcaloides reportados por García-Mateos *et al.* (1998) sólo erisodina, erisovina y eritralina estuvieron también presentes en *E. herbacea*.

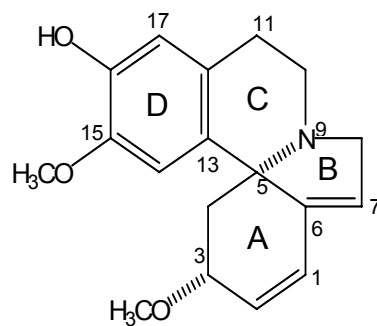
Sánchez (2000) mediante la técnica de cromatografía de líquidos (HPLC/EM) reporta la presencia de erisodina, erisovina, erisopina, eritrinina, eritralina, cristamidina, 8-oxo-eritralina, α -eritroidina y β -eritroidina en flores y semillas de *E. americana* y *E. coralloides*. Comparando estos resultados con los obtenidos en nuestro estudio, se observa que sólo la erisodina, erisovina, erisopina y eritralina estuvieron presentes en la especie *herbacea*, asimismo es importante indicar que erisotrina y glucoerisopina no se encontraron en las especies que trabajaron estos autores.

En nuestro estudio, el análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas de las fracciones de alcaloides crudos de *Erythrina herbacea* permitió identificar cinco alcaloides diénicos: erisodina, erisopina, erisovina, erisotrina y eritralina, los tres primeros se encuentran distribuidos ampliamente en el género y previamente fueron reportados para la especie *E. herbacea* por Folkers y Koniuszy (1940). Los demás alcaloides, que se encontraron en pequeñas cantidades, no se habían reportado para la especie *herbacea* y la erisotrina sólo se había encontrado en sus hojas.

ANÁLISIS DE RESONANCIA MAGNÉTICA PARA ERISODINA

El análisis de $^1\text{HRMN}$ me permitió confirmar, previa comparación con el software correspondiente la estructura química de erisodina. En dicho espectro, se pueden distinguir los protones de los carbonos C-14 y C-17 de los anillos aromáticos (ver cuadro 2). Dos dobletes ubicados en la zona de

frecuencia alta del espectro y que corresponden a los protones 1H y 2H, en una δ de 6.04 y 6.59 respectivamente. El 7H olefínico se observa como un singlete con δ de 5.73. Los tres protones anteriores (1H, 2H y 7H) muestran el típico patrón de señales (llamado sistema ABX) en las regiones de frecuencia alta del espectro, característica de los alcaloides diénicos como lo es la erisodina. La señal de 3-OCH₃ se localiza en la región de una δ =3.32 mientras que la de los protones del metoxilo aromático 15-OCH₃ se encuentran desplegados en una zona de frecuencia baja.



PROTONES	DESPLAZAMIENTOS QUÍMICOS (δ)
1H	6.04
2H	6.59
3Ha	4.01
4Ha	1.6
4He	2.6
7H	5.73
8H	3.48
8H	3.68
10Ha	2.93
10He	3.55
11Ha	2.89
11H	2.63
14H	6.79
17H	6.69
15-OCH ₃	3.77
3-OCH ₃	3.32

Cuadro 3. Desplazamientos químicos del alcaloide erisodina.

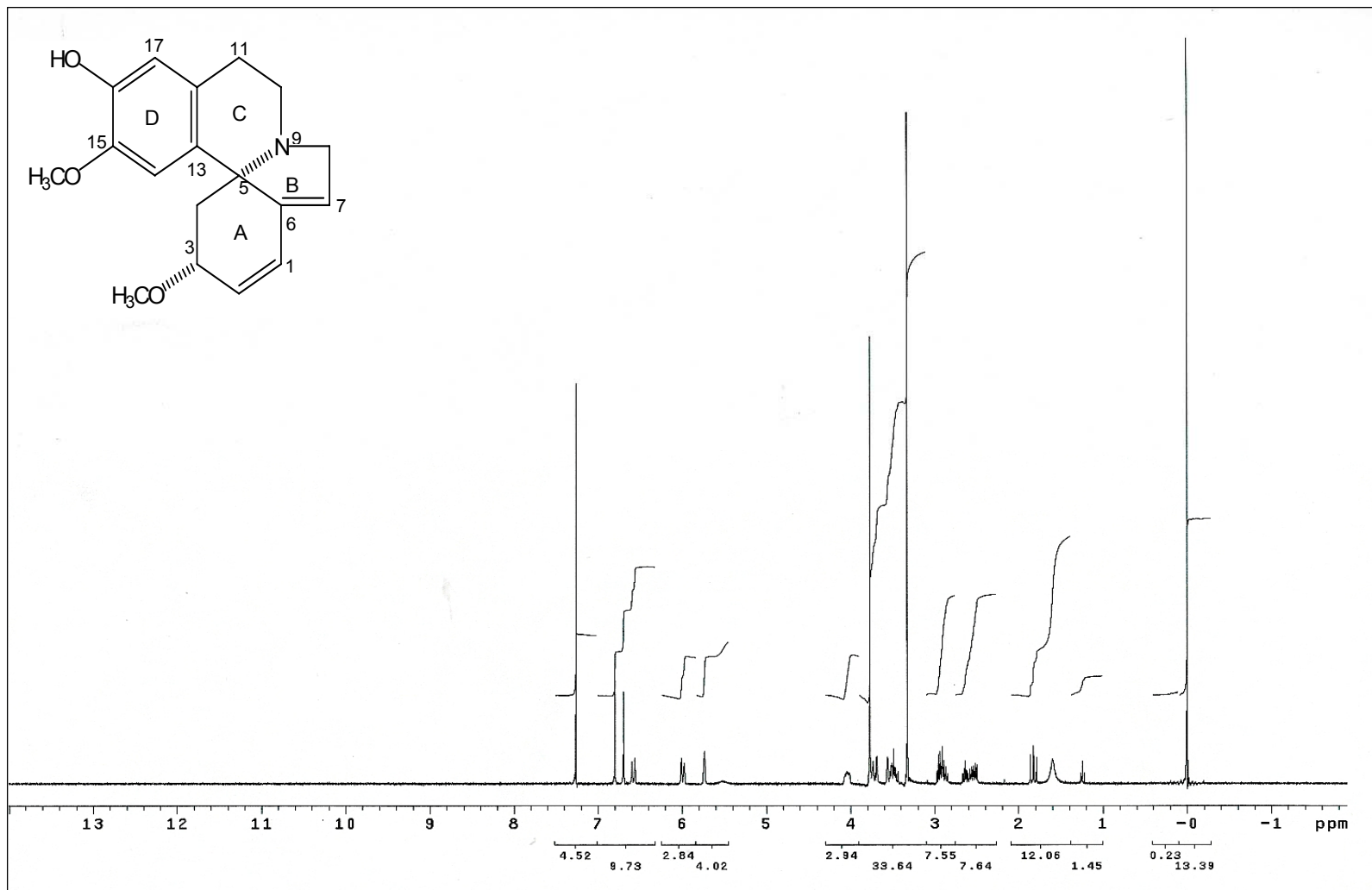


Fig. 21. Espectro de ¹HMNR para erisodina.

CONCLUSIONES

- ❖ El contenido de alcaloides crudos en las semillas de *Erythrina herbacea* fue de 0.0444% para la fracción hexánica, de 0.1791% para la fracción metanólica, y de 0.245% para la fracción hidrolizados.
- ❖ Nuestros resultados muestran que fue posible replicar en el laboratorio el método propuesto por Soto-Hernández y Jackson (1994), y los rendimientos para la fracción de alcaloides crudos que obtuvimos con las semillas de *Erythrina herbacea* se encuentran entre el intervalo reportado por otros autores.
- ❖ En este estudio con el análisis de las fracciones alcaloideas por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas se identificaron cinco alcaloides diénicos: erisodina, erisopina, erisovina, erisotrina y eritralina.
- ❖ Los tres primeros se encuentran distribuidos ampliamente en el género y previamente fueron reportados para la especie *E. herbacea* por Folkers y Koniuszy 1940. Los demás alcaloides que se encontraron en pequeñas cantidades no se habían reportado para la especie *herbacea* y la erisotrina sólo había encontrado en hojas..
- ❖ El espectro de resonancia magnética nuclear de hidrógeno permitió confirmar, previa comparación con el software correspondiente y trabajos anteriores con sustancias puras, la estructura química de erisodina.

PERSPECTIVAS

- ❖ Contar con este antagonista competitivo, selectivo de receptores nicotínicos neuronales, permitirá implementar pruebas farmacológicas con modelos animales, para evaluar la participación de los receptores nicotínicos neuronales (subtipos $\alpha_4\beta_2$) en los procesos mnemónicos, cuando este alcaloide se administre por vía sistémica o en núcleos cerebrales específicos como el hipocampo.

- ❖ Es necesario aislar otros alcaloides y evaluar su antagonismo y afinidad a receptores nicotínicos específicos, con el objeto de conocer las bases neurobiológicas de los procesos fisiológicos en los que participan dichos receptores.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar CA y Zolla C (1982) Plantas tóxicas de México. Instituto Mexicano del seguro Social. México. 97-99.
- Alcorn JB (1984) Huastec Mayan Ethnobotany. Univ. Texas Press, Austin.
- Amo SD (1979) Plantas Medicinales del Estado de Veracruz. Instituto Nacional de Investigaciones sobre Recursos Bióticos, Xalapa, Veracruz.
- Anaya RM (2002) México Desconocido Número 307, Ed. Instituto Verificador de Medios.
- Barros DM, Ramírez MR, Reis EA e Izquierdo I (2004) Participation of hippocampal nicotinic receptors in acquisition, consolidation and retrieval of memory for one trial inhibitory avoidance in rats. *Neuroscience*, **126**: 651-656.
- Boyás JC (1992) El género *Erythrina* en México. Centro de Investigaciones de la Región Central, Instituto de Investigaciones Forestales y Agropecuarias. Campo Experimental Zacatepec. Zacatepec, Morelos. México 16.
- Braithwaite A y Smith FJ (1996) Chromatographics Methods. 5^{ta} ed. Ed Chapman & Hall, London.
- Brancroft A, Levin ED (2000) Ventral hippocampal $\alpha_4\beta_2$ nicotinic receptors and chronic nicotine effects on memory. *Neuropharmacology*, **39**: 2770-2778.
- Budowski G (2004) Paper and Speeches. Importancia, características de cercas vivas. <http://www.ecouncil.ac.cr/about/speech/secretar/cercas.htm>
- Chawla AS, Redha FMJ y Jackson AH (1985) Alkaloids in seeds of four *Erythrina* species. *Phytochemistry*, **24**(8): 1821-1823.
- Cheeta S, Tucci S, File SE (2001) Antagonism of the anxiolytic effect of nicotine in the dorsal raphe nucleus by di-hydro- β erythroidine. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, **70**: 491-496.
- Craing LE (1981) Curare- like effects. En: R. H. F. Manske y H. L. Colmes, (Ed.), The Alkaloids; Chemistry and Physiology. Academic Press. New York, U.S.A. 265-293.
- Decker WM, Anderson JD, Brioni DJ, Donnelly-Roberts L.D, Kang HC, O'Neill BA, Piattoni-Kaplan M, Swason S y Sullivan PJ (1995) Erysodine, a competitive

- antagonist at neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *European Journal of Pharmacology*, 280: 79-89.
- Ehlert FJ, Roeske WR y Yamamura HI (1994) Muscarinic receptors and novel strategies for the treatment of age-related brain disorders. *Life Sciences*, **55**: 2135-2145.
- Estrada LE (1992) Plantas Medicinales de México. Introducción a su estudio. Universidad Autónoma de Chapingo.
- Felix R, Leven ED (1997) Nicotinic antagonist administration into the ventral hippocampus and spatial working memory in rats. *Neuroscience*, **81**: 1009-1017.
- Folkers K y Major RT (1937) Isolation of erythroidine, an alkaloid of curare action, from *Erythrina americana* Mill. *Journal of the American Chemical Society*, **59**: 1580-1581.
- Folkers K y Koniuszy F (1940) *Erythrina* alkaloids. VII Isolation and characterization of the new alkaloids, erythraline and erythratine. *Journal of the A Chemical Society*, **62**:436-441.
- Games DE, Jackson AH, Khan NA y Millington DS (1974) Alkaloids of some African, Asian, Polynesian and Australian species of *Erythrina*. *Lloydia*, **37** (4): 581-588.
- Ganong MD (2003) Fisiología Médica. 18ª ed. Ed Manual Moderno. 108-120.
- García-Mateos R, Soto-Hernández M y Kelly D (1998) Alkaloids from six *Erythrina* species endemic to México. *Biochemical Systematics and Ecology*, **26**:545-551.
- García-Mateos R, Garín-Aguilar ME, Soto-Hernández M, Martínez-Vazquez M (2000) Effect of β -erythroidine From *Erythrina americana* on rats aggressive behavior. *Pharmaceutical and Pharmacological letters*, **10**(1):34-37.
- Garín-Aguilar ME, Ramírez LJE, Soto-Hernández M, Valencia del Toro G y Martínez VM (2000) Effect of crude extracts of *Erythrina americana* Mill. On aggressive behavior in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, **69**: 189-196.

- Garín-Aguilar ME, Valencia del Toro G, Sánchez Herrera SG, Soto-Hernández M y García AJ (2001) Alcaloides de *Erythrina herbacea*. *Productos Naturales*, Vol. **5**: Perspectivas biotecnológicas UAM-Iztapalapa ISBN 970-654-928-5.
- Goodman y Gilman (2004) Las bases Farmacológicas de la Terapéutica. Ed. Mc. Graw-Hill Interamericana. 190-195 p.p.
- Goth A (2002) Farmacología médica. 13^{va} ed. Ed. Interamericana. 217-221 p.p.
- Hargreaves RT, Johnson RD, Millington DS, Mondal MH, Beavers W, Becker L, Young C y Rinehart KL (1974) Alkaloids of American species of *Erythrina*. *Lloydia*, **37** (4): 569-580.
- Hastings RB (1990) Medicinal legumes of Mexico, Fabacea Papilionidea. Part. One. *Economic Botany*, **44**: 336-348.
- Krukoff B, Barneby R (1974) Conceptus of species of the genus *Erythrina*. *Lloydia*, **37**(3): 332-459.
- Levin ED, Bradley A, Addy N and Sigurani N (2001) Hoppocampal α_7 and $\alpha_4\beta_2$ nicotinic receptors and working memory. *Neuroscience*, **109**: 757-765.
- Lozoya LX y Lozoya M (1982) Flora Medicinal de México, primera parte. Instituto Mexicano del Seguro Social 174-192.
- Lozoya LX (1989) La Medicina Tradicional en la realidad Político-Social de México. *Ciencias*, **14**: 27-33.
- Lehman AJ (1937) Actions of *Erythrina americana*, a possible curare substitute. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **60**(1): 69-81.
- López VH, García CJ (2003) La participación de los receptores de acetilcolina nicotínicos en trastornos del sistema nervioso central. *Salud Mental*, **3**(26): 66-72.
- Maldoni B (1991) Alkaloids: Isolation and Purification. *Journal of Chemical Education*, **68**(8): 700-703.
- Martínez M (1987) Catálogo de Nombres Vulgares y Científicos de Plantas Mexicanas. Ed. Fondo de Cultura Económica, 112.
- Martínez M y Matuda E (1979) Flora del Estado de México. Tomo II. Biblioteca Enciclopédica del Estado de México. México. 543.

- Martínez M (1996) Las plantas medicinales de México. 6ª ed. Ediciones Botas. México 77-79.
- Meyers H F (1998) Manual de Farmacología Clínica. Ed. El Manual Moderno. 121-125.
- Musalem MA (1922) *Erythrina* in México: Occurrence, Use and Research. International Conference on Erythrina in the New World. Octubre 19-23. CATIE. Turrialba, Costa Rica.
- Neill DA (1993) *The genus Erythrina: taxonomy, distribution and ecological differentiation*. En: Westly, S. B. & Powell, M. H. *Erythrina* in the old and new worlds. Hawaii, U. S. A. Eds. Nitrogen Fixing Tree Association NFTA.
- Niembro DA (1990) Árboles y arbustos útiles de México naturales e inducidos. Ed. Limusa México. 98 pp.
- Pelletier W (1983) Alkaloids (Vol. 1). The nature and definition of an alkaloid. John Wiley y Sons. 1-31.
- Plaza RIP (2003) Caracterización química preliminar y DL₅₀ de fracciones de alcaloides obtenidos de las semillas de *Erythrina herbacea* L. Tesis para obtener el Título de Biólogo. UNAM.
- Reyes TB (1988) Aislamiento y elucidación estructural de los metabolitos secundarios (con actividad farmacológica potencial) de *Plechea simphytifolia* y *Senecio andrieundi* (Compositae). Tesis de Maestría. Universidad autónoma del Edo. De Morelos. Facultad de Ciencias Químicas e Industriales. División de Estudios de Postgrados 156.
- Robinson A (1974) Principios de Análisis Instrumental. Ed. Fragoza España. 58-84.
- Sánchez HSG (2000) Estudio Químico-Biológico de los alcaloides de *Erythrina americana* Miller y *Erythrina coralloides* A.D.C. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias. Colegio de Postgraduados.
- Sotelo A, Soto-Hernández M, Lucas B y Giral F (1993) Comparative studies of the alkaloidal composition of two mexican *Erythrina* species and nutritive value of the toxified seeds. *Journal Agriculture Food Chemistry*, **41**:2340-2343.

- Soto-Hernández M y Jackson AH (1994) *Erythrina* alkaloids: Isolation and Characterization of alkaloids from seven *Erythrina* species. *Planta Medica*, **60**: 175-177.
- Toledo VM (1974) Observations on the relationship between hummingbirds and *Erythrina* species. *Lloydia*, **37**(3): 482-487.
- Valencia OC (1995) Fundamentos de fitoquímica. México. Ed. Trillas. pp. 147-170.
- Yasuda RP, Cielsa W, Flores LR, Wall SJ, Li M, Satkus JA, Weinstein JS, Spagnola BV and Wolfe BB (1992) Development of antisera selective for m₄ and m₅ muscarinic cholinergic receptors: Distribution of m₄ and m₅ receptors in rat brain. *Molecular Pharmacology*, **43**:149-157.
- Williams M and Robinson JL (1984) Binding of the nicotinic cholinergic antagonist dihydro- β -erythroidine in rat brain tissue *Journal Neuroscience*, **4**: 2906.

APENDICE A

CONDICIONES DE OPERACIÓN DE LA CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS/ESPECTROMETRÍA DE MASAS (HPLC/EM).

La cromatografía de líquidos es una técnica utilizada para realizar separaciones físicas de mezclas de compuestos orgánicos. Los compuestos son identificados mediante los tiempos de retención que presentan los picos de la muestra; la cuantificación se realiza con curvas de calibración (Braithwaite y Smith, 1996). Para analizar los componentes de las fracciones de alcaloides separados en la columna cromatográfica, los extractos crudos obtenidos fueron analizados usando un equipo de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) (Waters 600 series pumps) interconectado a un espectrómetro de masas (EM) (Finnigan LCG) mediante una fuente de ionización química atmosférica (APCI). Los alcaloides fueron separados usando una columna Supelco Discovery C-18 (5 μ m) de 250 mm x 4.6 mm (i.d.) usando una fase móvil linear de 1 ml/min y un gradiente programado de tres disolventes: A (0.1% de acetato de amonio, pH 7.4), B (metanol) y C (acetonitrilo), de la siguiente manera: t = 0 min, 75% A, 20% B, 5% C; t = 10min, 50%A, 45% B, 5% C; t = 15 min, 50% A, 45% B, 5% C. La vaporización de la fuente APCI fue de 450°C y la presión del gas nitrógeno de 80 y 20 psi, respectivamente, la temperatura capilar fue de 150°C.

APÉNDICE B

RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

La Resonancia Magnética Nuclear ($^1\text{HRMN}$) es una técnica de caracterización en el cual una muestra se coloca en un campo magnético y es bombardeada con ondas de radio, estas ondas de radio animan a los núcleos de la molécula a dar una señal que solo puede ser recibida en un receptor especial, posteriormente esta señal es analizada para determinar la estructura de la molécula. Todos los núcleos tienen carga positiva y se encuentran girando como un trompo. Sabemos por la física, que una carga en movimiento genera un campo magnético. En RMN, el bombardeo del núcleo con radiación de radiofrecuencia, causa que tanto el núcleo como su campo magnético cambien de posición. En el espectrómetro de RMN hay una bobina de alambre que rodea la muestra. También sabemos por física que un imán moviéndose en una bobina de alambre hace que fluya una carga a través del alambre. De modo que cuando el campo magnético del núcleo cambia de posición, genera una corriente en el alambre capaz de ser detectada por la computadora.

Desplazamiento químico es el nombre científico que se le da a la posición de un pico en el espectro. En la práctica los desplazamientos no se miden en valor absoluto sino con relación a una sustancia estándar, en este caso se utilizó cloroformo deuterado (CDCl_3). No solamente hay unos picos, sino más bien hay picos simples, otros dobles e incluso grupo de picos más grandes. La razón por la que exista un grupo de picos en lugar de uno solo, es que los hidrógenos de un carbono se encuentran acoplados a los campos magnéticos de los hidrógenos adyacentes (Robinson, 1974).