



Detección de alcaloides en semillas de plantas herbáceas nativas

Alkaloid detection in seeds from native herbaceous plants

JUAN MANUEL RÍOS

Instituto Argentino de Nivología, Glaciología y Ciencias Ambientales (IANIGLA),
CCT-CONICET Mendoza, C.C. 330 (5500) Mendoza, Argentina.
<jrios@mendoza-conicet.gob.ar>

RESUMEN

Se realizaron comparaciones entre ensayos cualitativos de rutina para establecer cuál resulta más sensible para detectar la presencia de alcaloides en muestras pequeñas de semillas de plantas herbáceas nativas. Se comparó entre los análisis de detección convencionales de precipitación y de cromatografía en capa delgada (CCD) utilizando reactivo de Dragendorff y reactivo de Iodoplatinato. A su vez se estimó un umbral mínimo de sensibilidad para la detección de alcaloides con reactivo de Dragendorff cuando es utilizado en reacciones de precipitación. Para ello se evaluó su capacidad de detección frente a extractos de semillas comerciales ricas en alcaloides de *Capsicum* spp. obtenidos a partir de muestras de diferente masa. Se pudo corroborar la presencia de alcaloides en semillas de algunas especies de plantas dicotiledóneas herbáceas nativas. Los resultados sugieren que los ensayos convencionales en CCD resultan más sensibles para detectar alcaloides en semillas que los ensayos de precipitación.

SUMMARY

*Routine qualitative assays were compared to establish which is more sensitive to detect alkaloids in seeds from native herbaceous plants. Conventional analysis for alkaloid detection such as precipitation reactions and thin-layer chromatography (TLC) were compared using Dragendorff reagent and Iodoplatinate reagent. In addition, it was assessed a minimum threshold of sensitivity for alkaloid detection with Dragendorff reagent when used in precipitation reactions. In this way, detection capability was assessed on extracts from commercial alkaloid-rich seeds of *Capsicum* spp. obtained from different mass samples. Several native forbs seeds were positive for alkaloids. Results suggest that usual TLC assays are more sensitive to detect alkaloids in seeds than precipitation reactions.*

Palabras clave: Alcaloides, Dragendorff, semillas nativas

Key words: Alkaloids, Dragendorff, native seeds

INTRODUCCIÓN

Los análisis farmacognósticos de rutina permiten explorar la presencia de productos naturales con potencial interés fitomédico tales como los alcaloides. Los ensayos cualitativos usualmente utilizados para la detección de alcaloides pueden clasificarse en reacciones de precipitación coloreadas (Farmacopea Nacional Argentina, 2010; Kuklinski, 2003) y detección por cromatografía de capa delegada (CCD) (Harborne, 1998). La detección se basa en la combinación de los alcaloides con los metales constituyentes del reactivo cromogénico, formándose de esta manera un complejo de color que indica que una muestra es positiva. Sin embargo, los reactivos usados en reacciones de precipitación se activan dependiendo tanto de la cantidad de muestra evaluada como de la concentración de alcaloides presentes en la muestra, arrojando con frecuencia resultados falsos (Gunatilaka *et al.*, 1980). El reactivo de Dragendorff es ampliamente utilizado en reacciones de precipitación (Kuklinski, 2003). El reactivo de Iodoplatinato y el reactivo de Dragendorff son también utilizados como reveladores en spray durante los procedimientos convencionales de cromatografía en capa delgada (CCD) debido a la alta sensibilidad que presentan frente a alcaloides (Gunatilaka *et al.*, 1980; Harborne, 1998; Rezai-Basiri *et al.*, 2010). En estos ensayos en CCD cuando una muestra es positiva en alcaloides, el reactivo de Iodoplatinato forma una o varias bandas color azul-grisáceo sobre la placa de CCD (Rezai-Basiri *et al.*, 2010). En cambio, el reactivo de Dragendorff forma una o más bandas color anaranjado intenso sobre la placa de CCD (Vitale *et al.*, 1995).

El objetivo de esta nota fue comparar ensayos cualitativos de rutina para establecer cuál resulta más sensible en detectar la presencia de alcaloides a partir de muestras pequeñas de semillas de plantas herbáceas nativas.

MATERIAL Y MÉTODO

Se exploró la presencia de alcaloides en las semillas de plantas herbáceas del desierto del Monte central; gramíneas: *Neobouteloua lophostachya* Gris., *Sporobolus cryptandrus* (Torr.) A. Gray, *Pappophorum* spp., *Trichloris crinita* (Lag.) Parodi, *Eragrostis pilosa* (L.) Beauv., *Jarava ichu* (R. Et. P.), *Setaria leucopila* (Scrib. Et Merr.) K. Schum., *Digitaria californica* (Benth.) Henrard, *Aristida mendocina* Phil., y dicotiledóneas herbáceas: *Chenopodium papulosum* Moq., *Lappula redowskii* (Hornem.) Greene, *Parthenium hysterophorus* L., *Glandularia mendocina* (Phil.) Covas et Schnack, *Sphaeralcea miniata* (Cav.) Spach., *Phacelia artemisioides* Gris., *Plantago patagonica* Jacquin y *Datura ferox* L. Las semillas fueron identificadas por comparación con materiales del herbario Ruiz Leal (MERL) y bibliografía específica (Ruiz Leal, 1972). Se usaron como control positivo las semillas comerciales de *Capsicum annuum* y las semillas silvestres de *D. ferox* debido a que concentran niveles altos de alcaloides capsaicinoides (rango 0,1–0,28%; Tewksbury *et al.*, 2008) y alcaloides tropánicos (rango 0,02–0,52%; Vitale *et al.*, 1995) respectivamente.

Una vez secas, las semillas fueron molidas y analizadas de la siguiente manera: se maceró 0,5 g de cada especie de semilla en 10 ml de *n*-hexano durante 12 h, luego

se filtró con papel watman #4 y se recuperó la muestra de semilla. Una vez seca la muestra, se agregaron 10 ml de metanol (MeOH) y 40 µl de ácido clorhídrico concentrado (HCl) hasta pH ácido con papel tornasol. Se dejó macerar durante 24 h y se calentó por 10 minutos a 60°C en baño térmico agitando intermitentemente. Se enfrió y se filtró con papel watman #4, obteniendo los extractos metanólicos de cada muestra. A cada extracto metanólico, se agregaron una o dos gotas de NH₄OH hasta pH alcalino (azul con papel tornasol). Luego se agregaron 5 ml de H₂O_(d) más 5 ml de cloroformo (CHCl₃) y se colocó en una ampolla de decantación agitando hasta formar una emulsión. Una vez separada la emulsión en dos fases, una hidroalcohólica y otra orgánica, a la fase orgánica se la concentró en rotavapor obteniendo un extracto crudo para cada muestra. En el extracto crudo los alcaloides totales se encontraban como bases libres. Posteriormente, se evaluaron los extractos crudos de las semillas mediante CCD usando como reveladores el reactivo de Dragendorff y el reactivo de Iodoplatinato de la siguiente manera: cada extracto crudo se resuspendió con éter etílico y mediante capilares de vidrio fueron sembrados sobre una placa de CCD (Merck, Germany, #HX887500, TLC silicagel 60 F₂₅₄ UV indicator). La placa se corrió en una fase móvil de CHCl₃: MeOH (7:3) y posteriormente se reveló con reactivo de Dragendorff (Merck, Germany #2934 lot. OC548958). Luego, se repitió el procedimiento de siembra en una nueva placa de CCD pero esta vez se reveló con reactivo de Iodoplatinato (Merck, Germany). En todas las placas cromatográficas realizadas se utilizaron patrones de los alcaloides capsaicina (Sigma, Chemical Co.) y nicotina (Berna lab.) como testigos de revelado.

Para las reacciones de precipitación con reactivo de Dragendorff se procedió de la siguiente manera: se repitió la microextracción y a cada extracto metanólico se le agregó gota a gota el reactivo de Dragendorff hasta observar la formación de precipitados color anaranjado-marrón. Se evaluó el umbral de sensibilidad de detección del reactivo de Dragendorff usado en reacciones de precipitación sobre extractos que fueron obtenidos a partir de 0,5; 0,75; 1,0 y 1,5 g de semillas comerciales de *Capsicum annuum* L., *Capsicum pubescens* Ruiz et Pav. y *Capsicum baccatum* Buch.-Ham. ex Wall.

RESULTADOS Y CONCLUSIONES

Mediante el ensayo de precipitación con reactivo de Dragendorff, partiendo con poca cantidad de muestra de semilla (0,5 g), se observaron negativos para todas las semillas inclusive en las usadas como control positivo. Sin embargo, mediante el procedimiento en CCD y revelado con reactivo de Dragendorff se detectó la presencia de alcaloides en las semillas de *C. papulosum*, *P. hysterophorus*, *S. miniata*; así como también en las semillas usadas como control positivo: *D. ferox* y *C. annuum* (**Tabla 1**). Todos los positivos obtenidos con el reactivo de Dragendorff en CCD fueron constatados con el reactivo de Iodoplatinato (**Tabla 1**). Se obtuvieron negativos para alcaloides en las semillas de las gramíneas: *Neobouteloua lophostachya*, *Sporobolus cryptandrus*, *Pappophorum* spp., *Trichloris crinita*, *Eragrostis pilosa*, *Stipa ichu*, *Setaria leucopila*, *Digitaria californica*, *Aristida mendocina*; y dicotiledóneas herbáceas: *Lappula redowskii*, *Glandularia mendocina*, *Phacelia artemisioides*, *Plantago patagonica*.

Tabla 1. Detección de alcaloides totales en extractos de semillas silvestres obtenidos a partir de muestras pequeñas (0,5 g de cada especie de semilla). Se compara para el reactivo de Dragendorff en dos aplicaciones distintas: una como revelador en spray sobre CCD y otra como agregado para la formación de precipitado. Se constatan los positivos y negativos obtenidos con reactivo de Dragendorff sobre CCD mediante revelado con reactivo en spray de Iodoplatinato sobre CCD

Table 1. Alkaloids detection in wild seeds extracts obtained from small samples (0.5 g of each type of seed). Dragendorff reagent is compared in two distinct applications: as a spray on TLC, and as added to precipitate formation. It highlights the positive and negative Dragendorff reagent obtained on TLC by Iodoplatinato spray reagent on TLC

Semillas	Reacciones de precipitación		
	Dragendorff	Iodoplatinato	Dragendorff
<i>Capsicum annum</i> *	-	+	+
<i>Datura ferox</i>	-	+	+
<i>Sphaeralcea miniata</i>	-	+	+
<i>Parthenium hysterophorus</i>	-	+	+
<i>Chenopodium papulosum</i>	-	+	+

* semilla comercial

Los resultados del ensayo de sensibilidad de detección del reactivo de Dragendorff cuando es usado en reacciones de precipitación sugieren que, para las semillas ricas en alcaloides, la detección positiva se logra a partir de extractos obtenidos de muestras de gramaje $\geq 1,0$ g (*C. annum*) o bien $\geq 0,75$ g (*C. pubescens* y *C. baccatum*) (**Tabla 2**). Por lo tanto, los extractos realizados con menos de 0,75 g de muestra se encontrarían debajo del límite de sensibilidad de detección del reactivo de Dragendorff cuando es usado en reacciones de precipitación.

Los extractos de semillas obtenidos a partir de 0,5 g de muestra estarían debajo del límite mínimo de sensibilidad del reactivo de Dragendorff cuando es usado en reacciones de precipitación, arrojando así falsos negativos. En cambio, el reactivo de Dragendorff y el reactivo de Iodoplatinato usados en forma de spray sobre CCD resultaron muy sensibles en detectar alcaloides tanto en las semillas de herbáceas nativas y como en aquellas usadas como control positivo. En conjunto, los resultados sugieren que la utilización de CCD y revelado con los reactivos en spray —ya sea de Dragendorff o de Iodoplatinato— resulta más apropiado para detectar alcaloides que la utilización de ensayos de precipitación.

Tabla 2. Umbral de sensibilidad del reactivo de Dragendorff para la detección de alcaloides usado en reacciones de precipitación sobre extractos obtenidos a partir de cantidades crecientes de semillas ricas en alcaloides: *C. annum*, *C. pubescens* y *C. baccatum*.

Table 2. Sensitivity threshold of Dragendorff reagent for alkaloids detection used in precipitation reactions on extracts derived from growing amounts of alkaloid-rich seeds: *C. annum*, *C. baccatum* and *C. pubescens*.

Semillas	Reacciones de precipitación con reactivo de Dragendorff			
	extracto 0,5 (g . 10 ml ⁻¹)	extracto 0,75 (g . 10 ml ⁻¹)	extracto 1,0 (g . 10 ml ⁻¹)	extracto 1,5 (g . 10 ml ⁻¹)
<i>Capsicum annum</i>	-	-	+	+
<i>Capsicum pubescens</i> *	-	+	++	+++
<i>Capsicum baccatum</i> *	-	+	+	++

* procedencia: Santa Cruz, Bolivia

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Lidio López por facilitar parte del material botánico desde Bolivia y a JG Ríos por colaborar en el acondicionamiento de las semillas.

BIBLIOGRAFÍA

- FARMACOPEA NACIONAL ARGENTINA. VIII edición. 2010.
- GUNATILAKA, A.L., M.U. SULTANBAVA & S. BALASUBRAMANIAM, 1980. Chemical investigation of Sri Lankan plants, Part 42: a survey of plants of Sri Lanka for alkaloids. *Journal of National Science Council of Sri Lanka* 8: 187-207.
- HARBORNE, J.B., 1998. Phytochemical methods: A guide to modern techniques of plant analysis. 3rd edition. Chapman & Hall, London.
- KUKLINSKI, C., 2003. Farmacognosia: estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. Omega (2da. ed.) Barcelona, España.
- REZAI-BASIRI, M., M. GHAZI-KHANSARI, A. FAGHIH, M. SADEGHI, N. LOTFALIZADEH, M. EGHBAL, A. MOHAJELL-NAYEBI, H. REZAZADEH & M. ARSHAD ZADEH, 2010. Screening of morphine and codeine in urine of opioid abusers by rapid TLC Analysis. *European Journal of General Medicine* 7: 192-196.
- RUIZ LEAL, A., 1972. Flora Popular Mendocina. *Deserta* 3: 7-296. Mendoza.
- TEWKSBUURY, J.J., K.M. REAGAN, N.J. MACHNICKI, T.A. CARLO, D.C. HAAK, A.L. CALDERON-PEÑALOZA & D.J. LEVEY, 2008. The evolutionary ecology of pungency in wild chilies. *Proceedings of the National Academic of Sciences* 105: 11808-11811.
- VITALE, A.A., A. ACHER, A.B. POMILIO, 1995. Alkaloids of *Datura ferox* from Argentina. *Journal of Ethnopharmacology* 49: 81-89.

Recibido: 03/2013

Aceptado: 12/2013