

En reconocimiento al Dr. Juan M. Castagnino

Alcaloides diméricos del tropano: miorelajantes

Alicia B. Pomilio^{a*}, Elvira M. Falzoni^a y Arturo A. Vitale^b

En nuestros laboratorios hemos estudiado varias estructuras del tropano. Estos alcaloides se encuentran en el reino vegetal, en las familias: Solanaceae, Erythroxylaceae, Proteaceae, Euphorbiaceae, Rhizophoraceae, Convolvulaceae y Cruciferae [1].

Varias Solanáceas [2] que contienen estos alcaloides fueron usadas a través de la historia como venenos y en prácticas esotéricas, si bien muchos de estos compuestos tienen características farmacéuticas valiosas. Dentro de las llamadas plantas mágicas, muy usadas en brujería y magia, se encuentra el "trío del delirio" constituido por la beladona (*Atropa belladonna*), el beleño (*Hyoscyamus niger*) y la mandrágora (*Mandragora officinarum*). También se han usado y se usan especies de *Datura*, como *D. metel* ("floripondio"), *D. ferox* ("chamico"), *D. stramonium* ("estramonio"), relacionadas con el "toloache" mejicano (*D. innoxia*). Todas estas especies de *Datura* son biológicamente complejas, y

fueron usadas como alucinógenos desde la antigüedad, principalmente en los Andes y en la cuenca del Amazonas, donde se las denomina "toá" [3].

Estas especies contienen fundamentalmente atropina, escopolamina y hiosciamina como principios activos. A diferencia de otros alucinógenos, estos alcaloides del tropano no aumentan la percepción sensorial, aunque sus efectos ocurren a niveles muy diversos: sequedad de boca, taquicardia, aumento de la temperatura corporal, dilatación de la pupila, confusión mental, obnubilación de la conciencia y pérdida de la memoria reciente. Con dosis altas se observa somnolencia, delirio y coma [4].

Datura ferox ("chamico") es una planta muy tóxica para el hombre y otros mamíferos superiores. Hemos estudiado el envenenamiento de animales de campo en nuestro país debido a la ingestión accidental de semillas de chamico mezcladas con el pienso, y además hemos aislado los alcaloides del tropano responsables de la letalidad [5].

Escopolamina y tigloidina, 3-*beta*-tigloiloxitropano (Fig. 1), están presentes en la mayoría de las especies de *Physalis* y de *Nie-*

rembergia [6,7], en la familia Solanaceae.

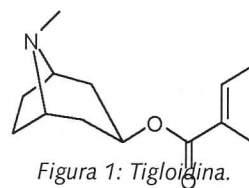


Figura 1: Tigloidina.

Todos estos alcaloides del tropano son los clásicos [8], si bien pueden presentarse estructuras novedosas según el tipo de sustituyentes, o bien los ácidos que esterifican el HO-3 o los hidroxilos de otras posiciones. Estas estructuras pueden no resultar tan simples en el momento de estudiar su estereoquímica, la posición y la configuración de los sustituyentes y la posición de la esterificación. Una estructura llamativa resulta ser la de la fisoperuvina, que es una sal de amonio cuaternario, clorhidrato de 5-hidroxitropano, obtenida de hojas y raíces de *Physalis peruviana*, en equilibrio con la estructura monocíclica no iónica que se indica en la Fig. 2.

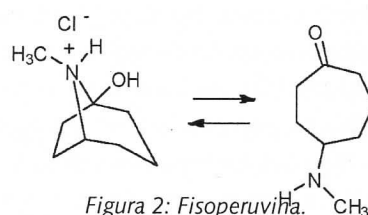


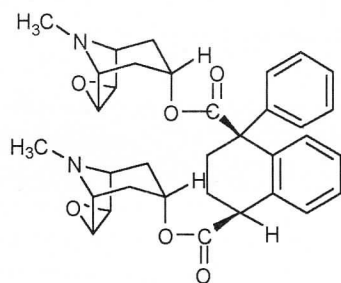
Figura 2: Fisoperuvina.

^aPRALIB (UBA-CONICET), Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Junín 956, C1113AAD Buenos Aires, Argentina

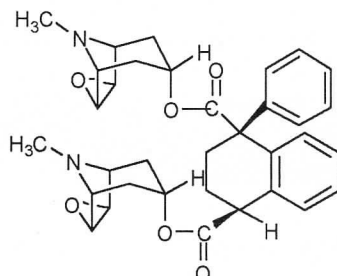
^bPROPLAME-PRHIDEB (UBA y CONICET), Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, C1428EHA Buenos Aires, Argentina

pomilio@ffy.uba.ar

Se conocen, además, los llamados **alcaloides diméricos del tropano** [9], que resultan de interés desde el punto de vista estructural y por su actividad biológica. Una mezcla de dos alcaloides diméricos *alfa-* y *beta-escopodoninas* (Fig. 3), conocidos anteriormente como sintéticos, fueron aislados e identificados por primera vez de *Datura innoxia*. La estructura espacial del



α -escopodonina



β -escopodonina

Figura 3: *alfa-* y *beta-Escopodoninas*

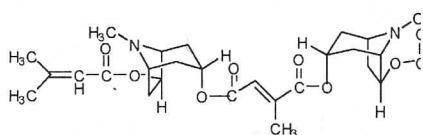
dimetioduro de *beta-escopodonina* se determinó mediante análisis por rayos X [10]. Más recientemente, se sintetizaron varios haluros de alquilo cuaternarios a partir de alcaloides del tropano diméricos de *alfa-* and *beta-escopodoninas*, que fueron preparados por dimerización de hioscina. Se estudió su actividad farmacológica, resultando ser miorelajantes [11].

Schizanthus es un género de Solanaceae rico en alcaloides diméricos del tropano, que son ditropinésteres llamados **esquizantinas**.

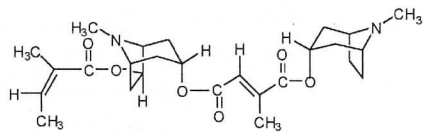
Este género posee doce especies, endémicas de Chile, excepto *Schizanthus hookeri* y *S. grahamii* que son hierbas nativas de Argentina que crecen respectivamente a 1000-1500 m y 1500-3000 m de altura [12]. De las partes aéreas y las raíces de *S. grahamii*, *S. hookei* y *S. pinnatus* se aislaron esquizantinas A a M. Se han detectado **grahamina**, esquizantinas C, D, y E, además de dímeros de un éster del ácido truxílico de *S. grahamii* [13], esquizantinas B y D [14] y **3alfa-(1'-metilmesaconi-tiloxi)-aconiniloxi-7beta-tigloiloxitropano** de *S. pinnatus*. También se aislaron **esquizantina Z**, tropanol

diéster del ácido mesacónico, similar a otros derivados del **3alfa,6beta**-diéster del tropano, previamente aislados en *S. grahamii* y **esquizantina Y**, un diéster del ácido tropanodiol itacónico, del extracto metanólico de las hojas de *Schizanthus porrigens*, además de los dos alcaloides simples del tropano (-)-**6beta**-angeloiloxitropan-**3alfa-ol** y (-)-**3alfa-senecioiloxitropan-6beta-ol** [15].

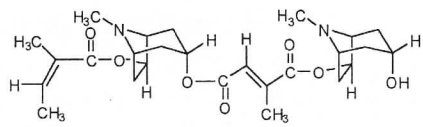
Por razones de espacio se muestran las esquizantinas B, C, D y E a modo de ejemplo (Fig. 4).



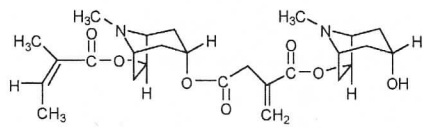
Esquizantina B



Esquizantina C



Esquizantina D



Esquizantina E

Figura 4: *Esquizantinas B, C, D y E.*

Los alcaloides diméricos del tropano se encuentran también en las especies de *Convolvulus* (Convolvuláceas) [16] y en las del género *Erythroxylum* (Erythroxylaceae) [17]. Así por ejemplo, de *Convolvulus subhirsutus* se obtuvieron dos alcaloides diméricos de la serie del tropano: **subhirsina** (Fig. 5) y **convolidina** (Fig. 6).

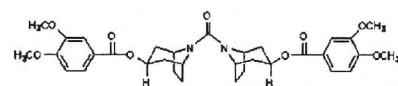


Figura 5: *Subhirsina.*

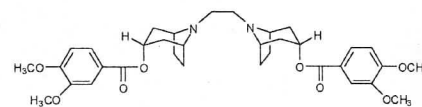


Figura 6: *Convolvidina.*

Peña y Muñoz [18] propusieron tres pasos evolutivos, con tres clados definidos, en las 12 especies bien diferenciadas del género *Schizanthus*. Indicaron además que la evolución química dentro del género correría en forma paralela, desde los alcaloides simples, derivados de la pirrolidina, presentes en *S. integrifolius* a los compuestos dímeros y trímeros de la serie tropanica, tales como los que se encuentran en *S. grahamii* (**grahamina**) o los diésteres del tropanol, dímeros de los ácidos mesacónico e itacónico, presentes en *S. hookeri* y en *S. litoralis*.

Se encontraron las condiciones óptimas de preparación de los dietocloruros de *alfa-* y *beta-belladoninas* por el método de intercambio iónico, que resultó más favorable económicamente y el más limpio desde el punto de vista ecológico. Así se preparó el nuevo miorelajante **belétonii** [19]. Recientemente se han propuesto nuevas bases para la producción biotecnológica de los productos naturales de valor farmacéutico [20].

MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN Y ANÁLISIS

Las estructuras de los alcaloides del tropano simples y diméricos se obtienen en base a la interpretación de los datos espectroscópicos: RMN protónico y de ^{13}C , mono y bidimensionales, EM de impacto electrónico o bien FAB-EM.

Se pueden utilizar diversos métodos analíticos para la separación y la purificación de estos alcaloides. Recientemente, también se ha usado exitosamente la electroforesis capilar de alta resolución [21,22].

Se han desarrollado técnicas que combinan la cromatografía líquida y la resonancia magnética nuclear, para ser usadas en el contexto de los productos naturales. Los métodos de HPLC-RMN tienen un impacto creciente y cada vez mayor en la investigación de los productos naturales permitiendo la determinación de las estructuras directamente en cantidades pequeñas de extractos, es decir, antes de la inversión en un muy largo y laborioso proceso de aislamiento en escala preparativa. Esto acelera la desreplificación del extracto y ayuda a evitar el re-aislamiento de los componentes ya conocidos presentes en ese extracto. Recientemente se han descrito las técnicas directas de hifenación de HPLC- RMN, definidas como métodos en los cuales se registran los espectros RMN usando el eluido del HPLC. El método indirecto recientemente desarrollado de HPLC- RMN emplea una interfase de extracción automática en fase sólida entre el HPLC y el RMN, que reemplaza al solvente cromatográfico por otro solvente para la adquisición de datos de RMN [23,24].

En la última década, la cromatografía líquida con resonancia magnética nuclear y espectrometría de masa - en línea-(CL-RMN-EM) ha emergido como herramienta de gran alcance para la detección y la identificación de compuestos conocidos y, lo que es más importante, para compuestos presentes en muestras clínicas, farmacéuticas complejas y extractos de productos naturales, debido a la información complementaria proporcionada

por los dos detectores para la elucidación inequívoca de cada estructura química. Recientemente, se ha publicado una revisión que discute las condiciones prácticas bajo las cuales CL-RMN-EM es conveniente como herramienta de rutina para el análisis de compuestos desconocidos, así como los conceptos fundamentales y sus aspectos ventajosos. Se presta particular atención a sus parámetros operativos que incluyen configuraciones instrumentales, modos de trabajo, mejora de la sonda de RMN y selección de la fase móvil de CL. Finalmente, se indican las recientes aplicaciones de CL-RMN-EM al análisis de metabolitos clínicos y productos naturales [25].

La búsqueda de condiciones analíticas adecuadas para el análisis de drogas de abuso y de métodos aplicables al campo de la medicina legal ha sido y es objeto de nuestras investigaciones [26]. El análisis de **truxilinas** isoméricas (Fig. 7) y otras impurezas de alto PM en la cocaína ilícita se basó también en el uso de electroforesis capilar [27].

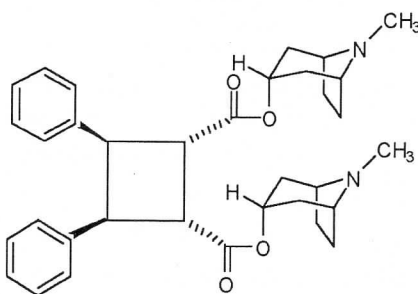
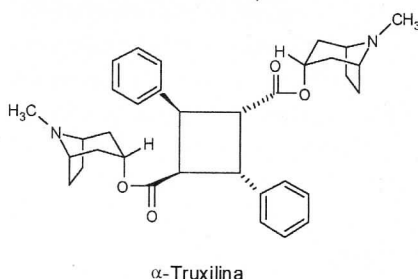


Figura 7: α - y β -Truxilinas

Varias técnicas de electroforesis capilar se utilizaron para el análisis de subproductos y de impurezas en la cocaína ilícita, incluyendo las truxilinas isoméricas, lo cual es importante para la derivación de la inteligencia estratégica y táctica. El uso del sulfobutil

éter IV de β -ciclodextrina aniónica como un aditivo al buffer de corrida a pH 8,6 dio una buena separación de las truxilinas y de impurezas similares de alto PM en menos de ocho minutos. Estas impurezas primero fueron aisladas de la matriz de cocaína usando extracción líquido-líquido y cromatografía líquida de alta resolución de exclusión.

Se obtuvo un desplazamiento al rojo en los espectros UV de las truxilinas usando detección UV de arreglo de fotodiodo (PDA) durante el análisis por CE. Este comportamiento anómalo se atribuye a la fotodegradación de las truxilinas durante el proceso de irradiación PDA-UV. La detección de fluorescencia inducida por láser usando un láser UV de criptón/fluoruro brindó mayor selectividad y sensibilidad frente a la detección UV para ciertas impurezas no caracterizadas, de PM elevado.

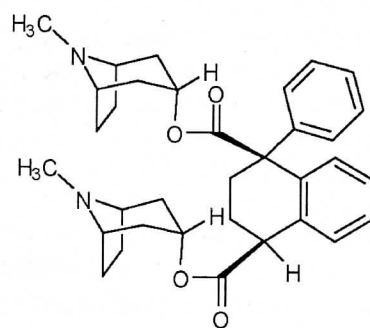
ACTIVIDAD FARMACOLÓGICA

La actividad farmacológica más destacada de los alcaloides diméricos del tropano es la de relajantes musculares. El uso clínico de los miorelajantes es muy importante en las intervenciones quirúrgicas, ya que los músculos del paciente tienen que estar bien relajados durante la cirugía. Aunque la anestesia general pone inconciente al paciente, raramente proporciona suficiente relajación del músculo esquelético. Se usan varios tipos de agentes relajantes musculares, también conocidos como agentes bloqueantes neuromusculares, para la relajación muscular durante la cirugía. Uno de los miorelajantes muy usados en el pasado era la succinilcolina, pero producía efectos secundarios serios, por lo que fue reemplazada por los llamados "miorelajantes no-despolarizantes", que poseen como característica estructural uno o dos átomos de nitrógeno cuaternario [28]. Son todos clínicamente aceptables porque prácticamente no poseen efectos secundarios. Sin embargo, su acción se inicia muy lentamente y la duración es demasiado larga. Por lo tanto, estos agentes, sin excepción, no cumplen con los requisitos de un miorelajante quirúrgico.

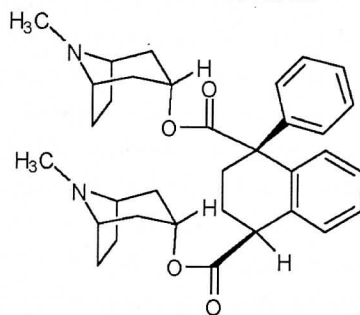
Desde mediados del siglo XX, se estudió la actividad miorelajante de una serie de compuestos sintéticos con un par de unidades de tropina unidos mediante una unión éster con un diácido alifático o aromático. Los más efectivos parecían ser aquellos con nitrógenos cuaternizados, en ambas tropinas, con alquilos o con grupos bencilos sin sustituir o monosustituídos.

Pero también los alcaloides diméricos del tropano naturales han brindado y brindan una variada actividad relajante neuromuscular, por cierto prometedora. Pero para que sea factible el uso clínico es necesario estudiar los efectos secundarios, el tiempo de inicio y la duración de la actividad miorelajante.

Los alcaloides naturales que consisten en ésteres de ácidos dicarboxílicos de azabicycloalcanoles, como las **belladoninas** (Fig. 8), que son *bis*-tropinésteres, y la **tesina**, que es un *bis*-oximetilpirrolizidinéster (otra familia de alcaloides) dieron resultados satisfacto-



α -Beladonina



β -Beladonina

Figura 8: alfa- y beta-Beladoninas.

rios. Pero, sólo el derivado cuaternario etílico de la belladonina y el derivado cuaternario metílico de la tesina se cumplen los requerimientos de los miorelajantes.

Se conocen también algunos otros agentes de bloqueo neuromuscular que incluyen pares de nitrógenos cuaternarios como parte de un sistema de anillo del tropano. En estos compuestos las unidades tropinilo están ensamblados mediante un puente sobre los dos nitrógenos cuaternarios.

En la búsqueda del miorelajante "ideal", se descubrió que una serie de derivados de amonio bis-cuaternario de aralquilo y de aralqueno, sustituidos con di- o poli-alcoxiolos o aciloxilos, de ésteres de aminoalcanol cíclico con ácidos dicarboxílicos presentaron menos efectos secundarios, tales como disminución de la presión arterial y aumento del ritmo cardíaco, y mayor potencia que otros agentes con alquilos, aralquilos sin sustituir, o aralquilos monosustituídos como grupos cuaternarios. Se estudiaron los métodos de preparación y de uso de estos miorelajantes, y las posibles composiciones farmacéuticas [29]. Actúan más rápidamente y en menos tiempo que cualquier compuesto miorelajante "no-despolarizante" conocido.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean agradecer a la Universidad de Buenos Aires y a CONICET por los subsidios recibidos. ABP y AAV son Miembros de la Carrera de Investigador Científico de CONICET (Argentina).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] W. J. Griffin, G. D. Lin, *Phytochemistry* **2000**, *53*, 623-637
- [2] A. B. Pomilio, E. M. Falzoni, A. A. Vitale (2007) *Nat. Prod. Comm.* **2007**, submitted.
- [3] R. E. Schultes, A. Hofmann, *Plantas de los Dioses: orígenes del uso de los alucinógenos*. FCE, México, 1993.
- [4] S. Brailowsky, *Las sustancias de los sueños: Neuropsicofarmacología*. FCE-CONACYT, México, 1995.

- [5] A. A. Vitale, A. Acher, A. B. Pomilio, *J. Ethnopharmacol.* **1995**, *49*, 81-89.
- [6] M. D. González, A. B. Pomilio, E. G. Gros, *An. Asoc. Quím. Argent.* **1981**, *69*, 297-299.
- [7] A. B. Pomilio, M. D. González, C. Campos Eceizabarrena, *Phytochemistry* **1996**, *41*, 1393-1398.
- [8] M. Lounasmaa, *The Tropane Alkaloids*. En: A. Brossi (Ed.), *The Alkaloids*, Vol. 33, Academic Press, San Diego, 1988, Cap. 1, 1-81.
- [9] S. F. Aripova, S. Y. Yunusov, *Chem. Nat. Compnd.* **1992**, *27*, 389-395.
- [10] S. F. Aripova, B. Tashkhodzhaev, *Chem. Nat. Compnd.* **1992**, *27*, 464-468.
- [11] N. A. Razzakov, A. Vakhobov, S. F. Aripova, *Chem. Nat. Compnd.* **2003**, *39*, 215-217.
- [12] A. A. Cocucci, *Kurtziana* **1989**, *20*, 113-132.
- [13] O. Muñoz, R. Hartmann, E. Breitmaier, *J. Nat. Prod.* **1991**, *54*, 1094-1096.
- [14] H. Ripperger, *Phytochemistry* **1979**, *18*, 171-173.
- [15] O. Muñoz, S. Cortés, *Pharm. Biol.* **1998**, *36*, 162-166.
- [16] S. F. Aripova, *Chem. Nat. Compnd.* **1996**, *32*, 677-679.
- [17] Atta-ur-Rahman, K. F. Khatkhat, F. Nighat, M. Shabbir, K. D. Hemalal, L. M. Tillekeratne, *Phytochemistry* **1998**, *48*, 377-383.
- [18] R. C. Peña, O. Muñoz, *Biochem. Syst. Ecol.* **2000**, *30*, 45-53.
- [19] D. V. Khakimova, T. Sadykov, S. F. Aripova, K. A. Aripov, *Chem. Nat. Compnd.* **1996**, *32*, 713-715.
- [20] K. M. Oksman-Caldentey, *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2007**, *8*, 203-210.
- [21] M. Humam, S. Bieri, L. Geiser, O. Muñoz, J. L. Veuthey, P. Christen, *Phytochem. Anal.* **2005**, *16*, 349-356.
- [22] L. Zhang, R. Wang, Y. Zhang, Y. Yu, *J. Sep. Sci.* **2007**, *30*, 1357-1363.
- [23] J. W. Jaroszewski, *Planta Med.* **2005**, *71*, 691-700.
- [24] S. Bieri, E. Varesio, J. L. Veuthey, O. Muñoz, L. H. Tseng, U. Braumann, M. Spraul, P. Christen, *Phytochem. Anal.* **2006**, *17*, 78-86.
- [25] Z. Yang, *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.* **2006**, *40*, 516-527.
- [26] A. B. Pomilio, A. A. Vitale, *Acta Bioquím. Clín. Latinoamer.* **2006**, *40*, 347-382.
- [27] I. S. Lurie, P. A. Hays, J. F. Casale, J. M. Moore, D. M. Castell, K. C. Chan, H. J. Issaq, *Electrophoresis* **1998**, *19*, 52-56.
- [28] E. G. Agavelian, A. K. Shaginian, S. K. Shabanova, *Anesteziol. Reanimatol.* **2007**, 27-29.
- [29] L. Gyermeck, C. Lee, Y.-M. Cho, *Appl. No. 426673* filed on 1999-10-25. *US Patent* issued on August 14, 2001.