

CONTRIBUCION AL ESTUDIO DE MIELES TOXICAS COLOMBIANAS

MARÍA CECILIA BARRAGÁN DE DOMÍNGUEZ, Q. F.
Profesora Asistente.

(Trabajo realizado en las instalaciones del Departamento de Farmacia,
Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia).

INTRODUCCION

Con ocasión de un Congreso de Apicultores, el doctor Jesús María Idrobo fue informado sobre algunas intoxicaciones ocasionadas por miel de abejas. Al doctor Idrobo le llamó la atención el estudio del producto y para la investigación de los tóxicos entregó una buena cantidad de material.

El propósito del presente estudio ha sido el de aislar, analizar e identificar los componentes tóxicos en la muestra de miel tóxica, tomando como punto de comparación una miel atóxica.

Consideramos de importancia adelantar este trabajo por el hecho de que se han presentado casos de intoxicación en humanos con miel de abejas y en especial con el producto cuya muestra nos fue entregada, proveniente de varios apiarios de Risaralda; la miel se consume en gran cantidad como tal, y además como materia prima en la manufactura de licores y de productos de dulcería; en el caso de bebidas alcohólicas se sabe positivamente que algunos tóxicos no se destruyen por la fermentación debido a que muchos de ellos son solubles en alcohol y no pierden su actividad por calentamiento. Creemos que los casos de intoxicación podrían llegar a ser mayores si no se investiga la causa y se establecen métodos de control apropiados.

GENERALIDADES

1. Muestras suministradas por el doctor Jesús María Idrobo, Profesor del Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional.

2. Procedencia: apiarios de propiedad del señor Nicanor Echeverri. (Productos Nec). Departamento de Risaralda. Colombia.

3. Aspecto. Miel tóxica: completamente solidificada, de consistencia cerosa, color amarillo pálido, olor bastante agradable (floral), sabor amargo. Miel atóxica: consistencia azucarada, cristalizada, color amarillo oscuro, olor y sabor característicos.

4. Características de los extractos alcohólicos: Miel tóxica: líquido de color amarillo subido, conserva el olor aromático de la muestra original. Miel atóxica: líquido de color amarillo pálido.

5. Aspectos farmacológicos. Síntomas de intoxicación (copia del informe suministrado por el señor Echeverri). Comienzan con sensación de hambre, debilidad muscular, alergia, después vómito, sudor frío, mareo fuerte y la persona no puede sostenerse levantada. Después se duerme y ve algunos espejismos como ciudades borrosas y montañas; cuando despierta e intenta levantarse vuelve a sentir mareo y se presenta de nuevo vómito. Si la persona es de organismo fuerte pasadas doce horas empieza a recuperarse.

El apiario donde se ha producido esta miel está ubicado en una región fría, en donde existe *Trifolium Sp.* (carretón) y bosques. Las abejas son de una actividad extraordinaria y siempre han elaborado una miel muy aromática y agradable reconocida como atóxica, pero en enero de 1970 elaboraron miel que presentaba cierta toxicidad y ya en febrero resultó con un poder tóxico muy elevado. No se ha notado que las abejas se hayan perjudicado al elaborar esta miel. Es tal la actividad de estas abejas que siendo 50 colmenas, de enero de 1970 a marzo del mismo año han producido 1.513 botellas de miel y entre ellas unas 600 de miel tóxica.

PARTE EXPERIMENTAL

I. — EXTRACCION DE LOS COMPONENTES DE LA MIEL

Marcha toxicológica moderna para extracción de compuestos orgánicos no volátiles. Cabe anotar que debido a la naturaleza de

La miel y a las características de la intoxicación se entró a sospechar que se trataría de compuestos orgánicos no volátiles (alcaloides, heterósidos, barbitúricos, insecticidas clorados o fosforados) y en este sentido se orientó la investigación.

Es necesario aclarar que se efectuaron pruebas para barbitúricos, debido a que también existía la posibilidad de una contaminación artificial del producto con este grupo de sustancias.

Se deben tener en cuenta algunos factores que influyen en la escogencia del método de extracción:

- a) Objeto analítico;
- b) El tipo de material;
- c) Las fuentes disponibles;
- d) La naturaleza de las sustancias a ser extraídas.

En general los procesos de aislamiento están divididos en dos etapas:

1. Preparación de un extracto acuoso concentrado.
2. División de este extracto en varias fracciones que son generalmente ácido fuerte, ácido débil, neutro, básico y sustancias anfóteras.

Métodos de extracción ensayados.

1. Método de precipitación de proteínas con sulfato de amonio. (1). Es una modificación al método de Nickolls (1956). Los extractos obtenidos por este método fueron utilizados para efectuar los ensayos cualitativos.

2. Método de digestión ácida (1). El método consiste en hacer una extracción con ácido clorhídrico concentrado, diluir con agua, filtrar y extraer con solventes orgánicos. Solo se hizo un ensayo con este método, pues se comprobó que los alcaloides se descomponen por el ácido fuerte, por tanto no es recomendable su uso.

3. Método de extracción directa con solventes (1). Las pruebas cualitativas pueden efectuarse sobre las fracciones etérea en medio ácido, etérea en medio alcalino y clorofórmica en medio alcalino; sobre todo si se va a usar después una separación cromatográfica, así como también esas fracciones pueden subdividirse en más fracciones.

Comentarios:

a) El método 1 presenta el inconveniente de que se forma un precipitado voluminoso de las proteínas que arrastra la mayor parte de las sustancias a estudiar.

b) Debido a la naturaleza del producto, el método 3 tampoco da muy buen resultado, ya que se presentan dificultades en la separación de los extractos; se forman emulsiones difíciles de romper.

Una vez hechos los ensayos cualitativos y al tener una orientación positiva sobre los posibles contaminantes, se entró a estudiar la necesidad de establecer sistemas de extracción para *alcaloides* y para compuestos *órgano-clorados* que permitieran efectuar una separación adecuada y práctica de los tóxicos y lograr la identificación, purificación y cristalización para posteriores ensayos.

Método de extracción para alcaloides contenidos en un producto azucarado. (Método de Kohn-Abrest).

El método comprende dos partes: Consiste primero en homogenizar el material en alcohol de 95°, alcalinizar con un carbonato alcalino anhidro (de sodio o de potasio), luego someter a agitación continua y enérgica por unas dos horas y dejar en maceración durante 24 horas.

El azúcar se precipita y se deposita en el fondo; el carbonato obra como deshidratante y al tiempo pone en libertad los alcaloides de sus combinaciones salinas, los cuales quedan en solución en el alcohol.

Luego del proceso de maceración, se lleva a sequedad el extracto alcohólico; se purifica el residuo disolviendo en más alcohol de 95°, (una buena parte queda sin disolverse) se filtra, se vuelve a evaporar el alcohol y finalmente el extracto blando se extrae con cloroformo. (Segunda parte de la extracción). Esta última parte fue modificada, debido a que se tomaron muestras de 200 a 300 g. con el fin de obtener una cantidad del tóxico suficiente para efectuar los ensayos posteriores; y de este modo en lugar de hacer pequeñas extracciones con cloroformo se sometió el residuo a una extracción continua en soxhlet. Luego se colocó el extracto clorofórmico dentro de hielo con el fin de congelar las sustancias grasas, principalmente cera. Se filtró y se procedió a purificar los alcaloides.

Se evapora el cloroformo casi hasta sequedad; cuando empieza a cristalizar se saca el líquido madre con un capilar estirado en forma de pipeta. (En este líquido se encuentran sustancias que son más solubles en cloroformo y que por enfriamiento no congelan). Se disuelven entonces los cristales en acetato de etilo o metanol y se agregan unas gotas de agua para ayudar a la cristalización. Se evapora este solvente con ayuda de aire.

Extracción de insecticidas por maceración con benceno.

Se tomaron 20 g. de miel, se trataron con 100 ml. de benceno, se acifizó con ácido tartárico; se calentó a reflujo hasta ebullición por una hora; luego se dejó en maceración por 8 días. Al cabo de este tiempo se filtró el extracto bencénico y con el filtrado se hicieron pruebas para compuestos órgano-clorados y fosforados y ensayos cromatográficos.

II. — PRUEBAS CUALITATIVAS PARA DETECTAR ALCALOIDES, HETEROSIDOS, BARBITURICOS, INSECTICIDAS (ORGANO-FOSFORADOS Y CLORADOS)

1. *Alcaloides.*

Una muestra de miel se homogenizó en una solución diluida de ácido tartárico, se filtró y sobre el filtrado se ensayaron los reactivos de precipitación para alcaloides:

- Hager: Precipitado amarillo (positivo).
- Bouchardat: Precipitado pardo-anaranjado (positivo).
- Dragendorff: Precipitado anaranjado (positivo).
- Marmé: Precipitado blanco-amarillento (positivo).
- Valser: Precipitado blanco (positivo).
- Bertrand: Precipitado amarillo oscuro (positivo).
- Wagner: Precipitado pardo que pasa a violeta (positivo).
- Mayer: Precipitado amarillo canario (positivo).
- Acido pícrico: Precipitado amarillo (positivo).
- Con reactivos de coloración:
- Erdman: Incoloro, con un exceso da amarillo pálido.
- Fröhde: Incoloro.
- Mandelin: Verde limón.

Marquis: Incoloro, con un exceso da rosado.

Acido sulfúrico conc.: Incoloro, luego amarillento.

Acido nítrico conc.: Incoloro.

Estas pruebas se hicieron con todos los extractos obtenidos y los resultados fueron positivos.

2. *Heterósidos.*

a) Reacción de Keller-Killiani: (14). Color amarillo oscuro (negativa). Con ácido sulfúrico al 85%: Incoloro; con un exceso: color pardo (negativa).

b) Prueba de Baljet: (15). Da un color amarillo (negativa).

c) Prueba de Bonino: Se adicionan 2 ml. de solución de orcinol en ácido clorhídrico, se calienta en baño maría y luego de dejar enfriar, se agrega 1 ml. de cloroformo y se agita. La capa clorofórmica permanece incolora (negativa).

d) Prueba de Sánchez: (15). Se presenta un color azul violeta (Prueba positiva para Estrofantina).

e) Reacción para heterósidos antraquinónicos: Tratamiento con ácido sulfúrico, extracción con benceno y adición de amoníaco: color amarillo (negativa).

f) Reacción de Borntraeger: (15). Se obtiene un color amarillo (negativa).

3. *Barbituratos.*

Sobre el extracto etéreo ácido.

Se filtra el extracto etéreo ácido por sulfato de sodio anhidro, se lleva a sequedad el filtrado y sobre el residuo se efectúan las pruebas.

a) Tratamiento con dos gotas de cloruro de cobalto o acetato de cobalto en metanol, luego se alcaliniza con solución de óxido de bario saturada. Presenta color anaranjado (negativa).

b) Prueba de fusión con carbonato de sodio: Se funde con carbonato de sodio anhidro, se disuelve el residuo en ácido nítrico y se diluye con agua; se adiciona luego una gota de una solución de nitrato de plata. Se produce un enturbiamiento (positiva). No es característica.

4. *Insecticidas.*

Fosforados:

a) Reacción de diazotación con nitrito de sodio y copulación **con naftil-etilendiamina**. (16). Se produce una coloración rosa-violeta (no es característica). Por tanto se debe efectuar la siguiente prueba:

b) Se trata una parte del extracto bencénico con unos mg. de **Salvato de cobre** y se adiciona solución de nitrato de plata al 10% ; **por medio de un embudo** se va agregando ácido sulfúrico con **cuidado**. **Se debe formar un precipitado negro**, (en este caso no se **formó precipitado**) se filtra, se lava el precipitado con agua, se **seca en la estufa**; luego se corta el papel de filtro que lo contiene **en pedazos** y se calcina con unos mg. de óxido de calcio; se oxida **después con ácido nítrico 2 N**, por último se mezclan las cenizas **con un poco de molibdato de amonio** y se colocan a la exposición **de vapores de amoniaco**. Si existe fósforo debe dar una coloración **rojo**. **En nuestro caso dio color amarillo oscuro**. La prueba es **negativa**.

c) Otra prueba similar a la anterior. Se obtiene una coloración **amarilla**. (Prueba negativa). (17).

Clorados:

a) Imparte a la llama no luminosa coloración verdosa (positiva).

b) Por mineralización de una cantidad de miel y posterior **tratamiento** con una solución de nitrato de plata, da un enturbiamiento de color blanco amarillento (positiva).

Las demás pruebas se hicieron para compuestos órgano-clorados, para cada uno específicamente:

Clordano: (2). Se produce un color rojizo. La prueba es positiva, pero por la intensidad de la coloración se concluye que existen trazas.

Otras pruebas: a) Por calentamiento con piridina, una solución de álcali y etilenglicol se obtiene un color rojizo. La técnica dice que debe dar un intenso color rojo. (12).

b) Por calentamiento con dietanol amina en potasa alcohólica el color rojizo se intensifica un poco. (12).

c) Por adición de naftaleno, da un color amarillo pálido (prueba negativa). (12).

DDD en presencia de Metoxicloro: (2). Se produce un color anaranjado parduzco, que por adición de unas gotas de ácido nítrico empieza a aclararse hasta amarillo pálido (prueba negativa).

DDT: (2). Se desarrolla un color amarillo (prueba negativa).

Heptacloro: (2).

a) Da un color amarillo oscuro (prueba negativa).

b) El extracto bencénico permanece incoloro (negativa).

Aldrin, Dieldrin, Endrin: (2). Al adicionar el ácido sulfúrico fumante, da inmediatamente un color rojo intenso (prueba positiva para Dieldrin).

Pruebas para diferenciar entre los tres anteriores: (2).

a) Se desarrolla un color anaranjado que pasa a amarillo por agitación prolongada (prueba positiva para Dieldrin). (2).

b) Al adicionar el ácido sulfúrico da un color rosado que desaparece (prueba positiva para Dieldrin). Después, al colocar el tubo en baño de agua hirviente la solución se torna parduzca y por adición de una mezcla de ácidos sulfúrico y nítrico, se observa una coloración amarillo-pálida (prueba para diferenciar el Aldrin y Dieldrin del Endrin). (2).

Comentarios sobre las pruebas cualitativas efectuadas:

a) En la muestra de miel tóxica analizada se encuentran alcaloides. Se piensa que son del grupo del Tropano, por la forma de los cristales con ácido pícrico y por la sintomatología de la intoxicación.

b) La muestra no contiene ni heterósidos, ni barbituratos, ni compuestos órgano-fosforados.

c) Se encuentra presente un compuesto órgano-clorado en pequeña cantidad, el cual se detecta luego por cromatografía en capa fina.

III. — IDENTIFICACION PRELIMINAR DE LOS TOXICOS POR CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA Y UTILIZANDO PATRONES.

1. *Cromatografía en capa fina para alcaloides del grupo del Tropano.* (3).

Se estableció primero el tipo de adsorbente y la mezcla de solventes más adecuada para su separación. Con este fin se corrieron

cromatogramas con la mayoría de adsorbentes y de solventes que da la bibliografía para este grupo de alcaloides. Una vez establecidas las condiciones de separación, se corrieron placas con extracto clorofórmico de miel tóxica, miel atóxica, algunos alcaloides del tropano: escopolamina, atropina y cocaína; además se colocaron muestras de otros alcaloides, como: esparteína, dihidroergotamina, efedrina, narcotina y papaverina. De los patrones se prepararon soluciones al 0,1% en cloroformo y de estas se colocaron 5 microlitros en la placa; de los extractos de miel (tóxica y atóxica) 10 microlitros procedentes de 10 ml. de extracto clorofórmico que a su vez procedía de 20 g. de miel.

El espesor de las placas en todos los casos fue de 250 micrones, y su activación a 120°C. por una hora. Tiempo de saturación de las cámaras: 2 horas.

Adsorbentes y mezclas de solventes ensayados:

a) Sílica gel G en agua; con este adsorbente se ensayaron tres mezclas de solventes:

1. Cloroformo-Acetona-Dietilamina (50:40:10).
2. Cloroformo-Dietilamina (90:10).
3. Ciclohexano-Cloroformo-Dietilamina (50:40:10).

Con los solventes 1 y 2 y al revelar con solución de yodo en cloroformo la miel tóxica presenta una mancha en el frente del solvente.

Con el solvente 3 y revelando de igual manera, la mancha aparece en el punto de partida, luego no hay arrastre del material.

b) Sílica gel G en solución de hidróxido de sodio 0,1N, se ensayaron tres mezclas de solventes:

1. Ciclohexano-Cloroformo (30:70) y Dietilamina 0.05%.

Con la miel tóxica se observa después de revelar, una mancha **alargada** que no se desplaza completamente del punto de partida.

2. Metanol. La miel tóxica da una mancha que se va hacia un **extremo** de la placa.

3. Metanol-Acetona-Trietanolamina (50:50:1,5). Esta mezcla fue la que dio un mejor resultado. Al revelar con yodo se obtiene con la miel tóxica una mancha con hRf de 71,3.

c) Sílica gel G en solución de hidróxido de potasio 0.5 N. Se ensayaron dos mezclas de solventes:

1. Dimetil formamida-Dietilamina-Etanol-Acetato de Etilo (5:5:30:60). Al revelar se observa con la miel tóxica una mancha **alargada** desde el punto de partida.

2. Etanol al 70%-Amoniaco al 25% (99:1). Al revelar, se observa con la miel tóxica una mancha en el frente del solvente.

Comentarios:

Los cromatogramas se observaron en una lámpara al ultravioleta (366 m μ) antes de revelar con reactivo para alcaloides. En todos los casos se observó una mancha fluorescente azul turquesa; al revisar la bibliografía se encontró que los alcaloides del Ergot y por tanto los compuestos del grupo del Indol producen manchas que presentan dicha fluorescencia al U. V. largo; se decidió entonces correr también unos cromatogramas con adsorbentes, solventes y reveladores específicos para estas sustancias.

Las condiciones más adecuadas para la separación de la mezcla de alcaloides del Tropano son: como adsorbente la sílica gel G en solución de hidróxido de sodio 0,1N y como sistema solvente: Metanol-Acetona-Trietanolamina (50:50:1,5).

Se obtuvieron los siguientes valores hRf (Rf x 100): Escopolamina: 65,4. Cocaína: 59. Atropina: 19,8. Miel tóxica: 71,3. Miel atóxica: no revela con el yodo.

2. *Cromatografía en capa fina para alcaloides del Ergot (4).*

Como adsorbente se usó sílica gel G en agua. Espesor de la capa 250 micrones. Activación por una hora a 120°C. Se usó como sistema solvente: Cloroformo-Etanol en tres mezclas diferentes: 95:5; 90:10 y 80:20. Tiempo de saturación de las cámaras: dos horas.

Se colocaron muestras de: miel tóxica, miel atóxica, dihidroergotamina, ergobasina y ergocristina.

Los tres patrones ensayados dan todos fluorescencia azul al ultravioleta (366 m μ), la miel tóxica solo presenta una ligera fluorescencia con el solvente: Cloroformo-etanol (80:20), pero al revelar con el reactivo de Van Urk, (p-dimetilaminobenzaldehído en ciclohexano y luego vapores de ácido clorhídrico) los patrones de los alcaloides del Ergot dan coloración azul, mientras las dos muestras de miel (tóxica y atóxica) permanecen incoloras.

Por otra parte se hicieron ensayos característicos para alcaloides del Ergot, entre ellos la preparación del fosfato que debe presentar un punto de fusión característico, y se investiga en el extracto etéreo alcalino (5). Al hacer el anterior ensayo con la miel tóxica, no se observa cristalización ninguna.

3. Cromatografía en capa fina para derivados del Indol (6).

Adsorbente: Sílica gel G en agua. Espesor 250 micrones. Activación a 120°C. por una hora.

Como solventes se ensayaron dos sistemas:

Alcalino: acetato de metilo-isopropanol-amoníaco al 25% (45:35:20).

Acido: Cloroformo-ácido acético al 96% (95:5).

Tiempo de saturación de las cámaras: dos horas.

Como solventes se ensayaron dos sistemas: Alcalino: Acetato de metilo-isopropanol-amoníaco al 25% (45:35:20).

Acido: Cloroformo-ácido acético al 96% (95:5).

Tiempo de saturación de las cámaras: dos horas.

Se colocaron muestras de miel tóxica y de miel atóxica. Se observó el cromatograma al U. V. (366 m μ), la miel tóxica da fluorescencia azul turquesa, se observa mejor con el solvente ácido. Al revelar con reactivo de formaldehído y observar al U. V. no presenta ninguna fluorescencia. Al revelar con p-dimetil aminobenzaldehído no se observa ningún color. Por tanto quedan descartados los compuestos derivados del Indol, incluyendo aquí los alcaloides del Ergot.

En vista de que no se había logrado identificar el compuesto que presentaba al U. V. la fluorescencia azul, se siguió revisando la bibliografía y se encontró que los derivados carboxílicos fenólicos presentan fluorescencia al U. V. después de revelarse con reactivos apropiados. De igual manera, los azúcares se detectan precisamente por fluorescencia amarilla o café al U. V. corto (254 m μ). Con el fin de saber exactamente a qué compuestos se debía la fluorescencia, se decidió efectuar cromatografías propias para compuestos fenólicos.

4. Cromatografía en capa fina para derivados carboxílicos fenólicos (7).

Se usó como adsorbente: Sílica gel G en agua; espesor de la capa: 500 micrones. Tiempo de activación: 2 horas a 120°C. Como sistemas solventes se ensayaron dos:

1) Benceno-dioxano-ácido acético glacial (90:25:4).

2) Benceno-metanol-ácido acético glacial (90:16:8).

Tiempo de saturación de las cámaras: dos horas.

Los dos sistemas de solventes dieron muy buenos resultados. Se ensayaron los extractos clorofórmico y bencénico tanto de la miel tóxica como de la no tóxica.

Con el solvente 1) se observó la placa al U. V. corto (254 m μ) y con el extracto clorofórmico de miel tóxica se detectan cuatro manchas fluorescentes de color azul turquesa. La miel atóxica solo presenta una mancha tenue fluorescente azul. Se reveló luego con un reactivo específico para derivados fenólicos: Solución de vainillina en alcohol al 10% y ácido clorhídrico 12N (2:1).

Al revelar con este reactivo, las mismas manchas fluorescentes dan coloración azul-violeta después de calentar por unos minutos a 60°C. (Reacción característica).

Los hRf para las cuatro manchas son los siguientes: 17.4; 51.6; 63.7; 73.9.

En conclusión: la muestra de miel tóxica contiene cuatro compuestos fenólicos, los cuales no fueron identificados por falta de patrones y porque no es el objeto de nuestro estudio, ya que se cree que dichas sustancias no produjeron la intoxicación en este caso. Los derivados carboxílicos fenólicos se extraen tanto con el cloroformo en medio alcalino, como con el benceno en medio ácido. La muestra de miel atóxica presenta al revelar con vainillina manchas amarillas.

5. *Cromatografía en capa fina para compuestos órgano-clorados* (8).

Se empleó como adsorbente sílica gel G en agua; espesor de la capa: 250 micrones; activación: 1 hora a 120°C. Se ensayaron 5 mezclas de solventes. Tiempo de saturación de las cámaras: dos horas.

Se emplearon patrones en solución bencénica al 0,5%: Dieldrin, Clordano, DDT, Aldrin, Endrin, BHC, Heptacloro, Toxafeno, Benceno hexacloruro. Igualmente se colocaron en la placa muestras de miel tóxica y no tóxica.

Solvente 1): n-Hexano. Al revelar con o-toluidina en alcohol al 0,5% se observa con la miel tóxica una mancha verde al U. V. corto (254 m μ), pero no se desplaza del punto de partida.

Solvente 2) : n-Hexano-Eter etílico (90:10). La miel tóxica presenta al revelar, una mancha verde en el punto de partida.

Solvente 3) : Benceno-Acido acético (90:10). La miel tóxica da al revelar y observar al U. V. corto (254 m μ) una mancha de color verde con hRf 6,66.

Solvente 4) : n-Hexano-Acido acético (90:10). La mancha correspondiente a la miel tóxica no se desplaza del punto de partida.

Solvente 5) : Cloroformo-Metanol (90:10). Fue el mejor solvente para los compuestos clorados. Se utilizó como revelador la solución de nitrato de plata-formaldehido (11).

Los hRf (Rf x 100) obtenidos con el solvente 5) fueron: Dieldrin: 94.6; DDT: 69.2; Aldrin: 83.4; Endrin: 46.6; BHC.: 50.6; Heptacloro: 81.5; Toxafeno: 82.1; Clordano: 92.8; Benceno hexacloruro; 2 manchas con hRf: 23.33 y 70.0; la miel tóxica da una mancha con hRf: 94.6; la miel no tóxica no da ninguna mancha al revelar con el reactivo nitrato de plata-formaldehido.

Es necesario anotar que generalmente los insecticidas que se encuentran en el comercio contienen impurezas; por ejemplo, el dieldrin puede contener trazas de clordano o cualquier otro clorado y viceversa.

Se concluye, según las pruebas efectuadas y la comprobación cromatográfica en capa delgada, que en la muestra de miel tóxica analizada está presente en pequeña cantidad un insecticida organoclorado, el cual se identifica como *Dieldrin*, que bien puede contener alguna traza de clordano.

IV. — IDENTIFICACION DEL ALCALOIDE O ALCALOIDES

El trabajo se orientó en esta parte a identificar por diferentes métodos, el grupo de alcaloides que podría ser responsable de la sintomatología de la intoxicación.

1. *Cromatografía en capa fina para la separación de los alcaloides del grupo del Tropano (9).*

Se emplearon placas cubiertas con sílica gel G en agua con un espesor de 250 micrones. Tiempo de activación a 120°C.: 1 hora.

La mezcla de solventes ensayada fue:

Benceno	4
Acetona	6
Eter etílico	1
Amoníaco al 10%	0,3

Tiempo de saturación de la cámara: dos horas.

Con este sistema solvente se obtuvo una buena separación tanto para los patrones, como para la miel tóxica.

Los patrones no se corrieron en forma pura, ya que varían los valores Rf; por tanto se resolvió correrlos en circunstancias lo más similares posibles a la muestra investigada; por ésto se contaminó una miel pura, a propósito con 0,1% de una mezcla a partes iguales de Escopolamina y Atropina bases.

Se colocaron muestras de: extracto clorofórmico de miel no tóxica, extracto clorofórmico de miel tóxica, y de miel atóxica contaminada con los patrones Escopolamina y Atropina.

El tiempo para un recorrido de 15 cms. es de 35 minutos.

Se revelaron los cromatogramas con una solución de Dragendorff modificada, que contiene ácido acético glacial y acetato de etilo. (10).

Al observar las placas al U. V. largo (366 m μ) antes de revelar con Dragendorff, tanto la miel tóxica como la atóxica presentan una mancha fluorescente azul turquesa con hRf 72.9. La mancha perteneciente a la miel no tóxica es muy tenue.

Luego, se revelaron las placas con solución de Dragendorff modificada y se obtuvieron manchas de color anaranjado oscuro tanto con la muestra de miel tóxica, como con la miel no tóxica que fue contaminada a propósito con escopolamina y atropina. En los dos casos se observan dos manchas (para la miel tóxica debe anotarse que las manchas no aparecen inmediatamente después de atomizar con el revelador, sino a los pocos segundos; la muestra que contiene los patrones sí revela su presencia de inmediato). Con la muestra de miel no tóxica no se obtiene ninguna mancha en presencia del Dragendorff.

Los hRf para la muestra de referencia con los patrones de escopolamina y atropina son respectivamente: 43.33 y 10.13.

Los hRf para la muestra de miel tóxica son respectivamente: 43.33 y 10.23.

Se concluye, según los resultados obtenidos por cromatografía en capa fina, que están presentes en la miel tóxica en estudio dos alcaloides del grupo del Tropano, comúnmente encontrados en las plantas de la familia de las Solanáceas. Son ellos: *Atropina y escopolamina*.

2. *Espectro al infrarrojo.*

Se tomaron los espectros de los cristales obtenidos de la miel tóxica, de escopolamina base obtenida a partir del bromhidrato, de atropina base obtenida a partir del sulfato y de una mezcla de atropina y escopolamina bases a partes iguales. Los espectros fueron tomados en todos los casos, a excepción del de la atropina base, en película (solvente: cloroformo); para la atropina se utilizó la fase sólida, en pastilla con bromuro de potasio.

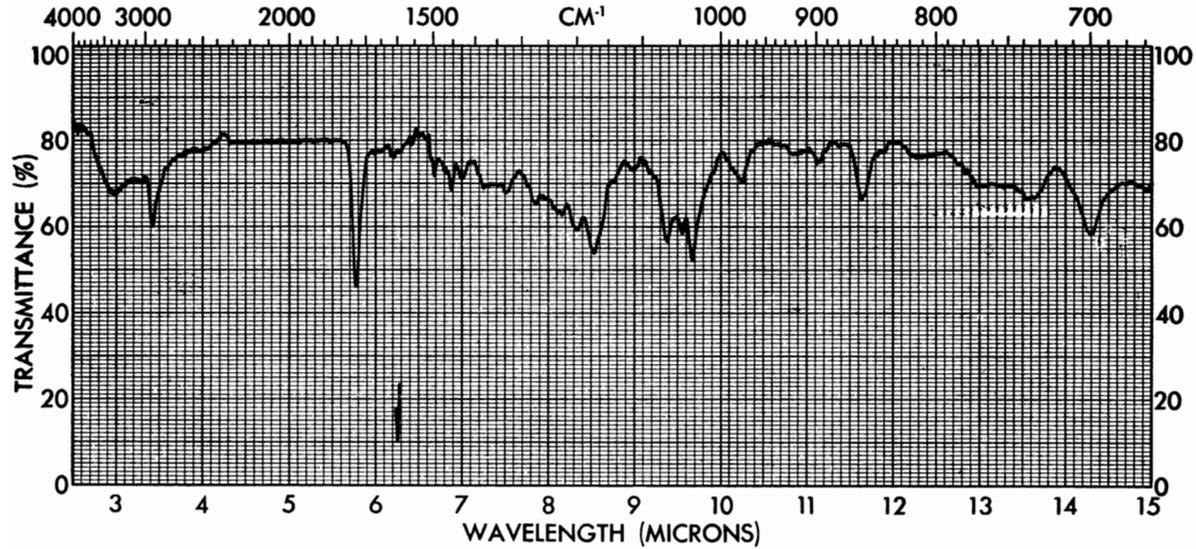
El estudio de los espectros se hizo comparativo, ya que se habían reconocido los dos alcaloides por cromatografía en capa fina, y por la forma de cristalización con el ácido pícrico (dos clases de cristales correspondientes a atropina: cuadros y a escopolamina: agujas formando haces).

Como puede apreciarse, al comparar los espectros, el correspondiente a la miel en estudio (figura 2) presenta las bandas características de la escopolamina y las de la atropina a determinadas longitudes de onda, y mejor aún se observa la igualdad en el caso del espectro de la mezcla de los dos alcaloides (figura 1) por otra parte la misma forma de los espectros indica claramente que la muestra de miel de abejas investigada contiene *escopolamina y atropina*.

3. *Ensayo farmacológico con los compuestos aislados.*

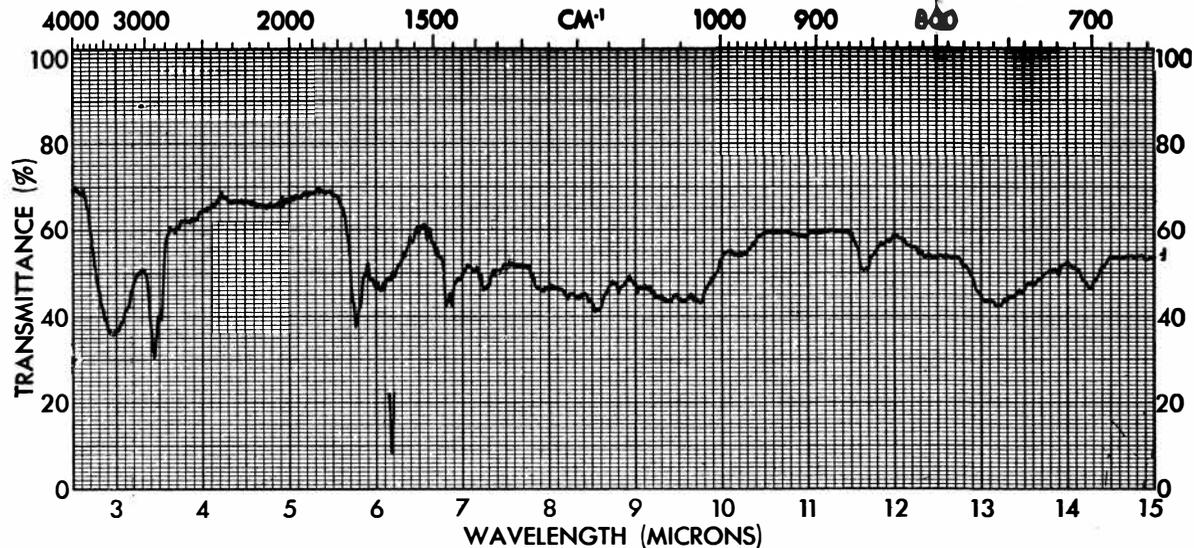
Se hicieron ensayos farmacológicos con el fin de comprobar la toxicidad de los compuestos aislados: los alcaloides contenidos en el extracto clorofórmico. Para este ensayo, en primer lugar fue necesario efectuar cromatografía preparatoria en capa fina, con capas de sílica gel G de 500 micrones.

Se efectuó la separación cromatográfica del extracto clorofórmico correspondiente a 10 g. de miel. Se rasparon las capas de sílica correspondientes a los dos alcaloides, se hizo la elución en clo-



SPECTRUM NO. _____	ORIGIN <small>Obtención a partir de</small>	LEGEND _____	REMARKS _____
SAMPLE <u>MEZCLA (aa) DE</u>	<u>las sales.</u>	1. _____	SAMPLE SPECTRUM NO. _____
<u>ATROPINA Y ESCOPOLAMINA</u>	PURITY _____	2. _____	
<u>BASES</u>	PHASE <small>Película en cloroformo</small>	DATE _____	
_____	THICKNESS _____	OPERATOR _____	

FIGURA No. 1



SPECTRUM NO. _____	ORIGIN <i>Miel Tóxica</i>	LEGEND _____	REMARKS _____
SAMPLE _____		1. _____	
MEZCLA DE ALCALOIDES	PURITY _____	2. _____	
	PHASE <i>Película en cloroformo</i>	DATE _____	
	THICKNESS _____	OPERATOR _____	

SPECTRUM NO. _____
SAMPLE _____

FART NO. 137-1281

FIGURA No, 2

roformo, se evaporó el solvente y se suspendió el residuo en agua (10 ml.).

Con esta suspensión acuosa se llevó a cabo la prueba.

Se inyectaron cinco ratones, de 20 a 25 g. de peso por vía intraperitoneal con las siguientes dosis:

- 1) 0,2 ml.
- 2) 0,4 ml.
- 3) 0,8 ml.
- 4) 1,6 ml.
- 5) 3,2 ml.

Se observaron los siguientes síntomas en todos los animales: ligera depresión, debilidad muscular.

En los ratones a los cuales se les inyectó las dosis mayores, o sea de 1,6 y 3,2 ml., se observó temblor generalizado, diferentes movimientos en el cuerpo y levantamiento de la cola. El animal inyectado con 3,2 ml. presentó disnea y murió aproximadamente a las diez horas de administrada la suspensión de los compuestos aislados.

Con este pequeño ensayo tan solo se pretendía observar la sintomatología de la intoxicación con los compuestos aislados por cromatografía en capa fina, ya que el estudio farmacológico y toxicológico propiamente dicho (DL50 etc.) será motivo de una posterior publicación.

4. *Propiedades físico-químicas.*

Aspecto de los cristales aislados: Blancos (transparentes), que por exposición al aire pasan a ser una masa gelatinosa de color amarillo. Por tanto se hace necesario protegerlos de la luz y del oxígeno del aire.

Solubilidad: los cristales son insolubles en agua, benceno, éter de petróleo, metanol y tetracloruro de carbono. Son solubles en cloroformo, etanol, éter etílico, acetona y ácidos diluídos.

Punto de fusión: fue tomado con el aparato "Reichert Wien" provisto de microscopio. Cabe anotar que se observaron al microscopio dos clases de cristales: unos en forma de pequeños cuadros y dentro de ellos diminutas esferas; lo cual hace suponer que se trata de una mezcla de dos compuestos. El punto de fusión es de 107,3°C.

Observación microscópica de los picratos (comparación con picrato de atropina y escopolamina patrones):

Con la muestra de miel tóxica se pueden observar al microscopio dos formas cristalinas: en forma de agujas casi siempre agrupadas en haces, y en forma de cuadros; igualmente los colores de estos cristales a la luz polarizada son característicos.

5. *Cromatografía en fase gaseosa* (13).

Comprobación cualitativa de los alcaloides: atropina y escopolamina:

Equipo:

Cromatógrafo de Gases Perkin Elmer. Modelo 880, el cual se operó en las siguientes condiciones:

Detector de ionización de llama.

Gas de arrastre: Nitrógeno. Presión: 50 libras.

Velocidad de flujo: 50 ml/min.

Columna de vidrio.

Longitud de la columna: 10 pies.

Diámetro interno de la columna: $\frac{1}{8}$ de pulgada.

Sólido soporte: Cromosorb W silanizado. Silicone gum rubber Z-SE 30 al 2% en cloroformo y cloruro de metileno en caliente. El polvo se pasó por malla N° 60.

Temperatura del inyector: 235°C.

Temperatura del detector: 210°C.

Temperatura de la columna: 190°C.

Atenuación del registrador: x 100.

Muestra inyectada (escopolamina): 0,3 microlitros (de una solución clorofórmica de 3 mg./ml.).

Muestra inyectada (atropina): 0,3 microlitros (de una solución clorofórmica de 3 mg. por ml.).

Muestra inyectada (mezcla de alcaloides presentes en la miel): 0,3 microlitros.

Preparación de las muestras:

Escopolamina y atropina: Disolución del bromhidrato y el sulfato, respectivamente, en agua destilada, alcalinización con solución de amoníaco y extracción con cloroformo y evaporación del solvente. A partir de estos residuos se prepararon soluciones en cloroformo que contenían 3 mg./ml.

CROMATOGRAMA DE ESCOPOLAMINA BASE
(obtenida a partir del Bromhidrato).

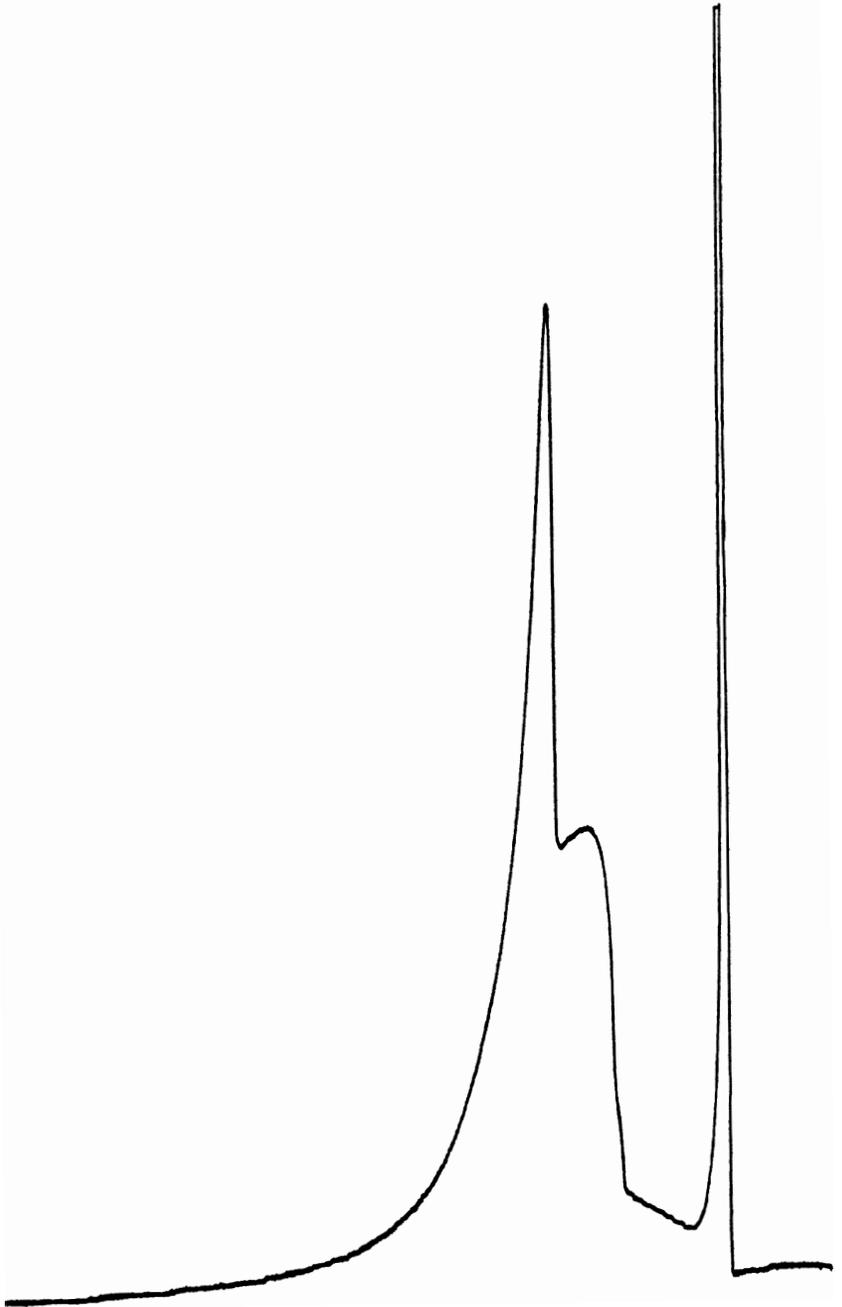


FIGURA No. 3

CROMATOGRAMA DE ATROPINA BASE
(obtenida a partir del Sulfato)

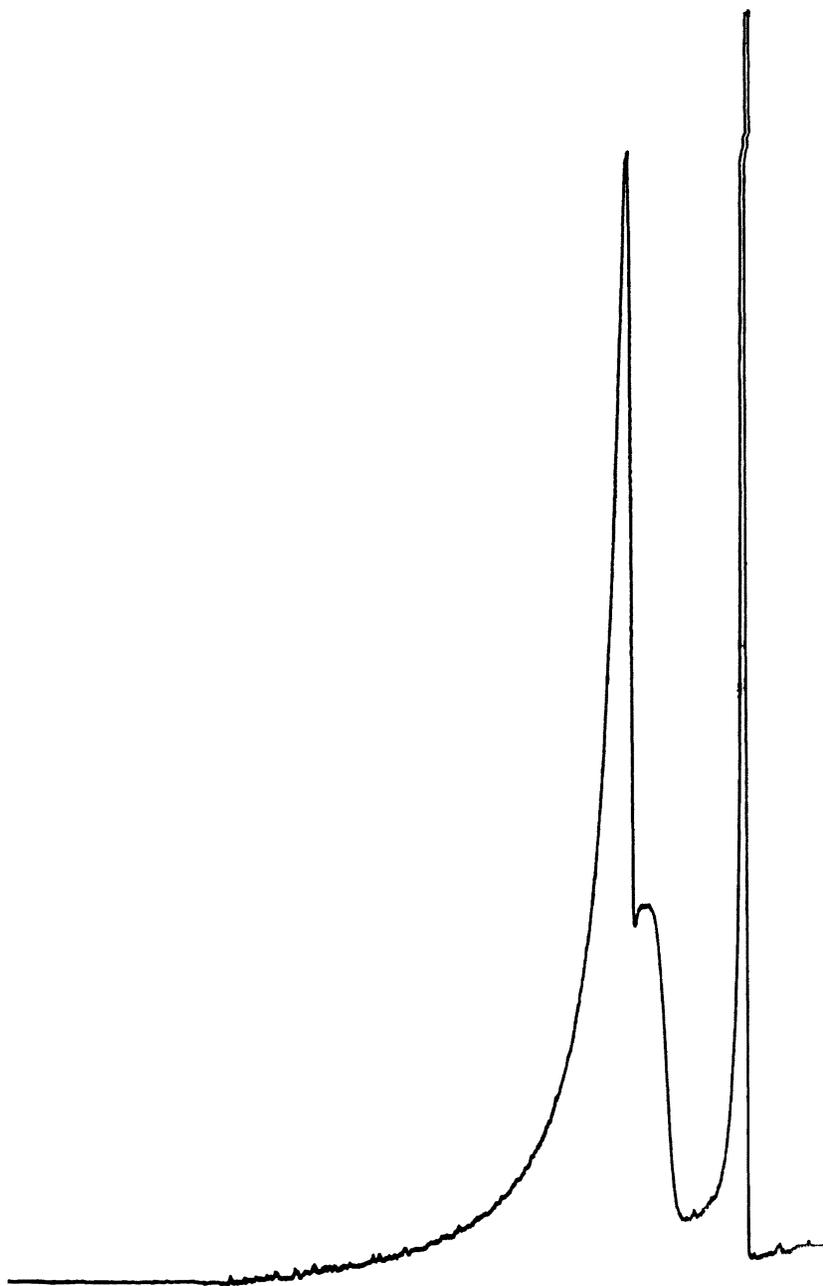


FIGURA No. 4

CROMATOGRAMA DE LA MEZCLA DE ALCALOIDES
(procedentes de la miel tóxica estudiada).

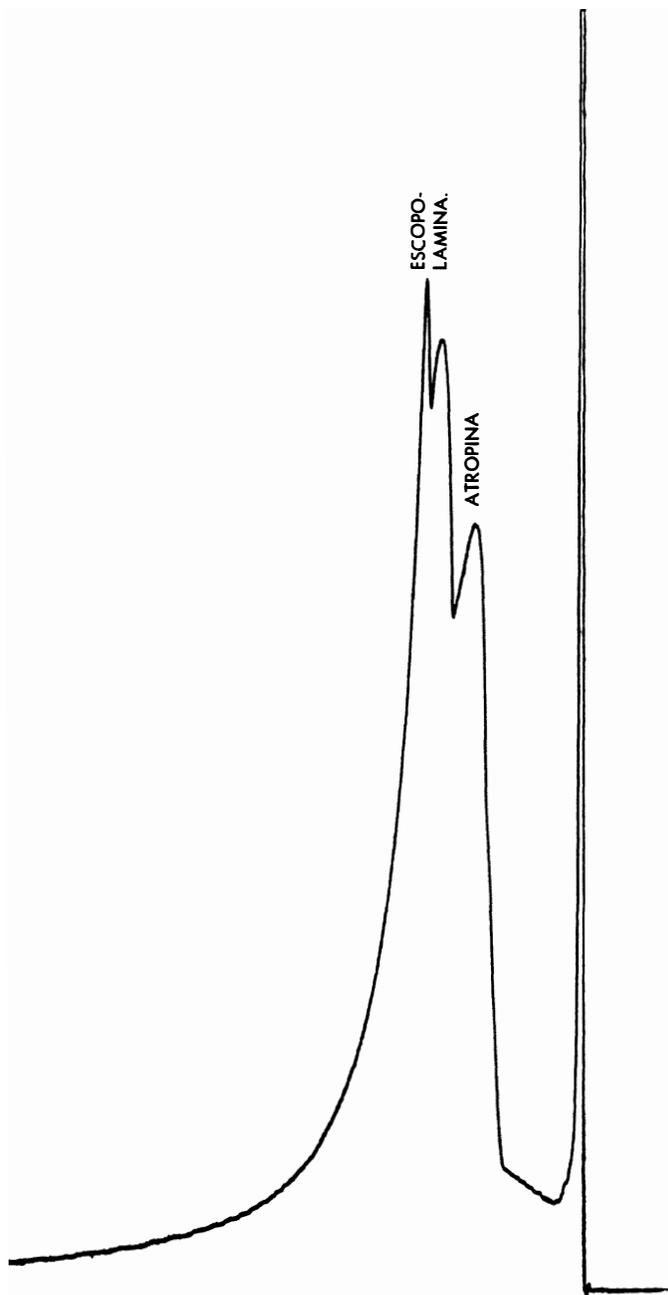


FIGURA No, 5

Solución problema (mezcla de alcaloides de la miel): se hizo a partir de los cristales ya purificados, como se anotó en el método de extracción. Se preparó una solución en cloroformo con una concentración de 5 mg./ml.

Comentarios: Se hicieron ensayos variando la temperatura de la columna desde 150°C hasta 200°C. De 150°C a 170°C se obtiene con la mezcla de alcaloides, un solo pico; luego no hay separación a estas temperaturas. A 180°C, 185°C, 190°C y 195°C se obtienen cromatogramas muy similares al presentado en la figura 5; y a 200°C se obtiene de nuevo un solo pico bastante ancho.

Por tanto, se debe trabajar con temperaturas para la columna comprendidas entre 180°C y 195°C.

No fue posible obtener una separación total de los dos alcaloides, debido a que los tiempos de retención para la atropina (figura 4) y para la escopolamina (figura 3) son muy cercanos (solo se diferencian en 48 segundos); en este caso, se necesitaría una columna de mayor longitud para obtener mejor resolución.

Se corrieron cromatogramas comparativos con los patrones. Como se puede observar, con la escopolamina y la atropina, no se obtienen picos bien definidos; presentan hombros que hacen suponer que se trata de mezclas isómeras. Por otra parte, en la mezcla de alcaloides procedente de la miel, en el pico correspondiente a la escopolamina, se observa la misma forma.

Resultados:

Tiempo de retención para la atropina: 100 segundos. Tiempo de retención para la escopolamina: 148 segundos. Por los tiempos de retención y por la misma forma de los picos se concluye que la mezcla de alcaloides en la miel corresponde a atropina y escopolamina.

V. — RECOMENDACIONES

Se recomienda seguir el estudio de las plantas de la región en donde se encuentran los apiarios y la exterminación de aquellas que contengan principios tóxicos y su reemplazo por otras plantas cuyo polen sea reconocido como atóxico, o sea que las flores no contengan sustancias tóxicas activas. Igualmente, se debe controlar continuamente la fumigación con insecticidas, en especial con

los órgano-clorados que tienen efecto acumulativo y los fosforados que no se destruyen por fermentación, como sucedería en el caso de los licores preparados a partir de la miel de abejas.

Cuando se inició el trabajo, se pensó en la posibilidad de dar a los apicultores una marcha analítica generalizada, para la extracción e identificación de los tóxicos que podrían contaminar las mieles. Realmente se debería tener un control, pero se haría necesario organizar un pequeño laboratorio con material y reactivos indispensables para realizar las más elementales pruebas; creemos además que para efectuar este tipo de análisis se requiere un profesional, que pueda dar su verdadero concepto, de acuerdo a las pruebas efectuadas y a los resultados obtenidos.

CONCLUSIONES

1. El método de extracción para alcaloides, por precipitación de los azúcares con un carbonato alcalino anhidro, disolución de los alcaloides en alcohol de 95°, purificación con cloroformo y cristalización con metanol y agua ofrece buenos resultados.
2. La extracción de insecticidas clorados y fosforados por maceración con benceno en medio ácido, da buenos resultados.
3. Las pruebas cualitativas para los diferentes grupos de venenos orgánicos no volátiles, dieron positivas para alcaloides e insecticidas clorados y negativas para heterósidos, barbitúricos e insecticidas fosforados.
4. Se separaron por cromatografía en capa fina, cuatro compuestos fenólicos.
5. Se identificó por cromatografía en capa fina, utilizando patrones, un insecticida clorado, reconocido como *Dieldrin*.
6. Se identificaron dos alcaloides del grupo del tropano, *atropina* y *escopolamina*, por los siguientes métodos:
 - a) Cromatografía en capa fina.
 - b) Espectros al infra-rojo.
 - c) Propiedades físico-químicas (aspecto, solubilidad, punto de fusión).
 - d) Formas de cristalización de los picratos.
 - e) Cromatografía de gases.
 - f) Ensayo farmacológico.

R E S U M E N

1. En una muestra de miel de abejas presumiblemente tóxica se emplearon los siguientes métodos de análisis toxicológico para compuestos orgánicos no volátiles (alcaloides, barbituratos, heterósidos e insecticidas clorados y fosforados).
 - a) Método de precipitación de proteínas con sulfato de amonio y posterior separación de las fracciones con solventes.
 - b) Método de digestión ácida, con ácido clorhídrico concentrado y extracción con solventes.
 - c) Extracción directa con solventes.
2. Con los diferentes extractos se hicieron pruebas cualitativas para alcaloides, heterósidos, barbitúricos, insecticidas clorados y fosforados.
3. Se llevó a cabo la identificación preliminar de los tóxicos (alcaloides e insecticidas clorados) por cromatografía en capa fina y utilizando patrones.
4. Se separaron también 4 compuestos fenólicos por cromatografía en capa fina.
5. Posteriormente se identificaron los alcaloides, escopolamina y atropina, por los siguientes métodos: cromatografía en capa fina, espectros al infrarrojo (comparativos), propiedades físico-químicas, formas de cristalización de los picratos, cromatografía de gases, ensayos farmacológicos.

S U M M A R Y

A sample of honey regarded as toxic was subjected to several toxicological analysis for detection of non-volatile organic compounds (alkaloids, barbiturates, glycosides, chlorinated hydrocarbon insecticides and organophosphorous insecticides).

These analysis included:

- a) Protein precipitation by ammonium sulphate and further separation of the fractions by solvent extraction.
- b) Acid digestion with concentrated hydrochloric acid and further solvent extraction.
- c) Direct solvent extraction.

All the extracts were tested for alkaloids, glycosides, barbiturates, chlorinated hydrocarbon and organophosphorous insecticides.

The preliminary identification of the toxic compounds (alkaloids, and chlorinated hydrocarbon insecticides) was made by TLC. Four phenolic compounds were isolated by TLC.

Further identification of the alkaloids was made by TLC, comparative IR spectra, physical-chemical properties, crystallization properties of the picrate derivatives, GLC and pharmacological assays.

R É S U M É

On a déterminé les alcaloïdes, les barbiturates et les insecticides chlorés et phosphorés présents dans un échantillon de miel d'abeille. Les méthodes suivantes ont été employées :

- a) Précipitation des protéines par le sulfate d'ammonium et séparation des fractions au moyen de solvants ;
- b) Digestion acide par HCl concentré et extraction par solvants ;
- c) Extraction directe.

Les substances indiquées ont été recherchées qualitativement dans chacune des fractions. La chromatographie en couche mince a permis une identification préliminaire des substances toxiques (alcaloïdes et insecticides chlorés). La même méthode a permis la séparation de quatre composés phénoliques. Finalement, on a caractérisé les alcaloïdes par chromatographie en couche mince et en phase gazeuse, par spectro-photométrie I-R, et par les propriétés physico-chimiques, les formes cristallines des picrates et les essais pharmacologiques.

B I B L I O G R A F I A

1. CLARKE E. G. C.: *Isolation and Identification of Drugs*. The Pharmaceutical Press. 17 Bloomsburg Square WC 1, London, 405, 1969.
2. THIENES HALEY: *Clinical Toxicology*. Lea & Febiger. Philadelphia, 411 1964.
3. STAHL EGON: *Thin layer Chromatography*. Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg. New York, 287, 1965.
4. *Ibid.*, 289, 1965.
5. BLAS L.: *Química Toxicológica Moderna*. Madrid, 176, 1955.

6. STAHL EGON: *Thin layer Chromatography*. Springer-Verlag. Berlin. Heidelberg. New York, 294-295, 1965.
7. *Ibid.*, 386, 1965.
8. STAHL EGON: *Thin layer Chromatography*. Springer-Verlag. Berlin. Heidelberg. New York, Second Edition, 643, 1969.
9. COMER J. P. and I. COMER: *Applications of thin layer Chromatography in Pharmaceutical analyses*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 56, 4, 418, 1967.
10. STAHL EGON: *Thin layer Chromatography*. Springer-Verlag. Berlin. Heidelberg. New York, 491, 1965.
11. *Ibid.*, 898, 1969.
12. METCALF R. L.: *Advances in pest control research*. Interscience Publishers, Inc. New York, I, 392.
13. ACHARI R. and F. NEWCOMBE: *Gas Chromatography of Tropane alkaloids*. Planta Médica, 19, 3, 241, 1971.
14. CALDERÓN G. EDUARDO: *Guía para análisis de Plantas y notas prácticas sobre Fitoquímica (Conferencias)*. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, 18, 1963.
15. STEWART C. and A. STOLMAN: *Toxicology Mechanisms and analytical methods. II*, Academic Press. New York and London, 752, 1961.
16. HORWITZ WILLIAM: *Official Methods of analysis of the Association of official Agricultural Chemists*. P. O. Box 540, Benjamín Franklin Station Washington 4, D. C., Ninth Edition, 58, 1960.
17. STEWART C. and A. STOLMAN: *Toxicology Mechanisms and analytical methods. II*, Academic Press. New York, and London, 61, 1961.