

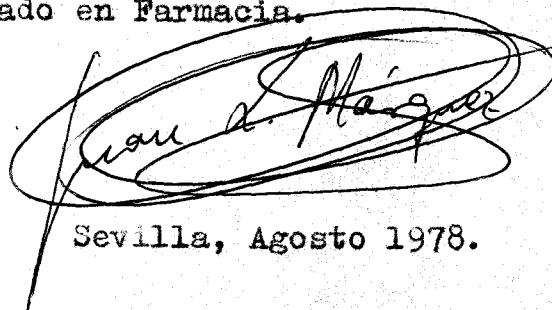
UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE FARMACIA

CATEDRA DE TOXICOLOGIA

INVESTIGACION TOXICOLOGICA DE LA MUSCARINA

Trabajo que presenta Juan Luis
Márquez Varela para optar al grado de
Licenciado en Farmacia.

A handwritten signature in black ink, which appears to read "Juan A. Márquez". The signature is enclosed within a large, loopy, circular scribble that also overlaps the text below it.

Sevilla, Agosto 1978.

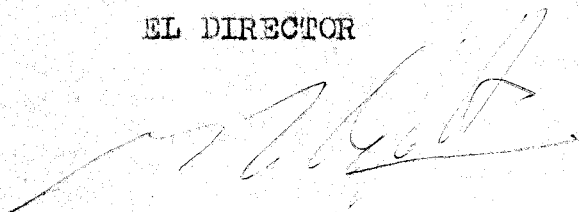
UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE FARMACIA

CATEDRA DE TOXICOLOGIA

Vº Bº

EL DIRECTOR

A handwritten signature in dark ink, appearing to read 'M. Repetto', written over a horizontal line.

Fdo: Dr. Manuel Repetto

Profesor de Toxicología.

•

Mi agradecimiento sincero al Dr.
D. Manuel Repetto, que me ha orientado y di-
rigido en la elaboración de este trabajo.

Mi gratitud a la Dr. Dña. M^a Paz
Jiménez y a todos los componentes del Ins-
tituto Nacional de Toxicología de Sevilla
que hicieron más agradable mi trabajo.

Y, finalmente, agradezco su colabo-
ración a todos los que en más pequeña o mayor
parte hicieron posible que este trabajo se
realizara.

S U M A R I O

I. INTRODUCCION.

II. PARTE TEORICA.

II. 1. NATURALEZA QUIMICA.

II. 2. FUENTES BOTANICAS.

II. 2. 1. Amanita muscaria.

II. 2. 2. Clitocybe.

II. 2. 3. Inocybe.

II. 2. 4. Contenido en principio activo.

II. 3. FARMACOLOGIA.

II. 3. 1. Sistema Cardiovascular.

II. 3. 2. Sistema Respiratorio.

II. 3. 3. Tracto Gastrointestinal.

II. 3. 4. Glándulas.

II. 3. 5. Tracto Urinario.

II. 3. 6. Ojo.

II. 4. MECANISMO DE ACCION.

II. 5. INTOXICACION.

II. 6. ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS DE METODOS ANALITICOS.

III. PARTE EXPERIMENTAL.

III. 1. TRABAJO CON PRODUCTO PURO.

III. 1. 1. Espectrofotometría u.v.

III. 1. 2. Cromatografía en capa fina.

III. 2. TECNICA DE EXTRACCION.

III. 3. TRABAJO CON ANIMALES.

III. 3. 1. En sangre.

III. 3. 2. En vísceras.

IV. CONCLUSIONES.

V. BIBLIOGRAFIA.

I. INTRODUCCION

Ante todo me gustaría expresar las razones que me han inducido a trabajar sobre esta materia.

En primer lugar existe una razón fundamental y ésta no es otra que mi inclinación personal o preferencia por dicha temática.

En segundo lugar la existencia de dos hechos también muy importantes:

a) Los escasos datos encontrados sobre este tema en la bibliografía especializada; se encuentran numerosas citas bibliográficas sobre la Faloidina pero muy pocas sobre Muscarina, aproximadamente el 8%. Ello aumentaba más el interés por todo lo que de nuevo se pudiera aportar sobre el tema; de esta forma el campo de acción es mucho más amplio, lo cual contribuye a dar mayor libertad en su realización, aunque la escasa información hacía presagiar dificultades. Tanto es así que Kohn-Abrest (1934) indica las muchas dificultades que tiene la extracción de Muscarina de vísceras, y Le Breton (1965) afirma que el diagnóstico de una intoxicación por Muscarina queda como un diagnóstico clínico en la mayor parte de las ocasiones.

b) Los más o menos frecuentes casos de intoxicación por Muscarina producidos principalmente por ingestión de hongos pertenecientes a la especie Amanita muscaria y a los géneros Inocybe y Clitocybe.

Hemos de decir aquí, que, contrariamente a lo que muchos piensan, estos envenenamientos producen un cuadro clínico notable, que se especificará más adelante, pero que no suelen ser mortales, a menos que se ingieran cantidades excesivas.

El método que se ha seguido ha procurado ser lo más racional posible; la primera parte es la puesta a punto de una técnica sencilla y fiable para identificar el principio activo, trabajando directamente con la solución madre de Muscarina en agua. Después se le administró a animales y se ensayó su extracción e identificación por la técnica anteriormente usada.

Esta técnica consiste principalmente en aislar o, mejor dicho, extraer la Muscarina del medio orgánico con el que se vaya a trabajar (sangre, vísceras,...) en una columna de intercambio iónico conteniendo resina aniónica y posteriormente identificarla por técnicas de

cromatografía en capa fina de silicagel.

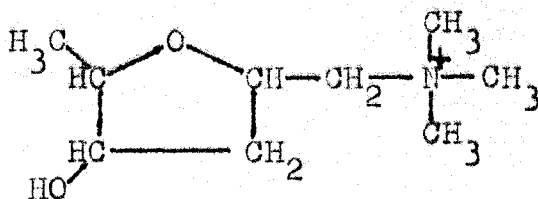
II. PARTE TEORICA

II. 1. NATURALEZA QUIMICA

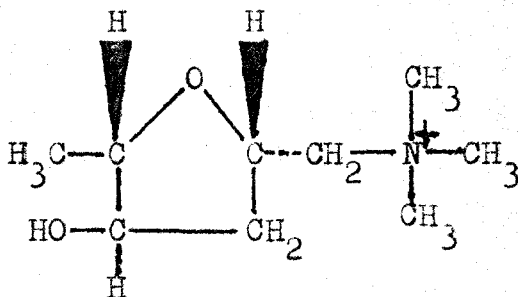
La Muscarina es un alcaloide natural, principio activo del hongo venenoso Amanita muscaria.

Fue descubierta en 1868 por Schmiedeberg y Koepe y poco después se sintetizó un compuesto similar a partir de la colina.

Su naturaleza química es una base de amonio cuaternario con un anillo pentagonal, uno de cuyos vértices lo ocupa un átomo de oxígeno; responde su estructura a la fórmula siguiente:



En perspectiva se vería así:



La Muscarina tiene carácter de base fuerte, por lo que se combina con los ácidos para dar sales. En la naturaleza puede existir al estado de base o de sal, que es lo más frecuente. .

Es un sólido de estructura cristalina, delicuescente; no tiene sabor y es característico el que desarrolla un olor a tabaco al someterlo a una temperatura de 100°C: así lo afirmó Kohn-Abrest en 1934.

También se caracteriza por fijar el anhídrido carbónico del aire.

Un dato muy importante es la solubilidad, pues en ella se basa su extracción, y se ha visto que es soluble en agua y en alcohol, insoluble en éter y poco soluble en cloroformo.

II. 2. FUENTES BOTANICAS

Los champiñones responsables de producir el síndrome Muscarínico o Sudoriano son la *Amanita muscaria* y diversas especies de los géneros *Clitocybe* e *Inocybe*, entre las que se distinguen: *Clitocybe dealbata*, *C. rivulosa*, *Inocybe patouillardii*, *I. fastigiata*, *I. napipes*, *I. geophylla*, *I. griseolilacina*, *I. dulcamara*, *I. asterospora*, *I. squamata*, *I. jurana*.

Stadelmann y col. en 1976 encontraron los estereoisómeros de la Muscarina (Muscarina, Epi-muscarina y Allo-muscarina) aunque en bajas concentraciones (menos de 2 mg. por 100 mg. de peso neto) en el cuerpo carnoso de las siguientes especies: *Amanita phalloides*, *A. pantherina*, *Boletus calopus*, *B. luridus*, *Clitocybe hydrogramma*, *C. gibba*, *C. vermicularis*, *Clitopilus intermedius*, *Collybia peronata*, *Hygrocybe nigrescens*, *Hypholoma fasciculare*, *Lactarius rufus*, *L. trivialis*, *Mycena pelianthina*, *M. pura*, *Paxillus involutus*, *Rhodophyllus rhodopogon*, *R. sinuatus*, *Russula emetica*, *Tricholoma sulfureum* y *Tylopilus fellens*.

La toxina responsable del cuadro clínico sudoral es la Muscarina cuya dosis letal cincuenta se cifra en 10mg. por vía oral.

El contenido en principio activo de los distintos hongos es variable y más adelante veremos los factores que pueden modificarlo; basta una gota del jugo de cualquiera de los hongos causales del síndrome muscarínico sobre el corazón de la rana para que éste se detenga en diástole.

El cuadro clínico es aparatoso pero de buen pronóstico; el tiempo de latencia es corto, alrededor de una a dos horas; aparte de una sintomatología digestiva muy ligera o , incluso, ausente, aparece sensación de calor, aumento de la transpiración, miosis y hipersialorrea, bradicardia... Todo ello desaparece de ocho a dieciséis horas después del inicio. La evolución es fatal en el 4% de los casos y la muerte se debe a paro cardíaco, shock o edema pulmonar.

Un tanto por ciento elevado de las intoxicaciones que se producen por Muscarina se deben a la ingestión de setas pertenecientes a la especie Amanita muscaria, por confusión con la succulenta y exquisita Amanita

caesarea que está considerada como la mejor de las setas y la más hermosa.

Las denominaciones vulgares en las distintas regiones españolas de Amanita muscaria son las siguientes:

Castellano: Oronja falsa, Oronja matamoscas, Oronja pintada.

Catalán: Reig bord.

Vasco: Kuleto paltsoa.

De Amanita caesarea:

Castellano: Oronja, Seta real, Amanita de los Césares.

Catalán: Reig, Ou de reig, Rovell d'ou, Monjola, Bolet d'or.

Vasco: Kuleto, Gorringo, Arrautzeco,

Otras setas venenosas tienen también estas denominaciones; así, la Inocybe patouillardii, en castellano la llaman Bruja y también Inocybe lobulado.

Los hongos que aquí tratamos pertenecen a los Basidiomicetos que se caracterizan por tener esporas y porque éstas se originan en unas células que reciben el nombre de Basidios.

II. 2. 1. Amanita muscaria

En ella puede apreciarse una parte aérea que es el Receptáculo fructífero que soporta los esporos u órganos de la reproducción, y otra parte generalmente subterránea, constituida por una infinidad de filamentos blancos muy finos que se designa con el nombre de Micelio. Si el receptáculo o aparato reproductor puede compararse al fruto de las plantas superiores, el micelio representa el aparato vegetativo.

El micelio tiene un aspecto de múltiples filamentos blancos muy finos, situado debajo de la capa donde tiene origen el carpóforo con el cual está unido. El micelio puede crecer durante largo tiempo sin que nada lo descubra al exterior, hasta el momento en que, siendo las condiciones favorables, surgen desde él al exterior los carpóforos. Esto explica el que dichos hongos se suelen encontrar siempre en el mismo sitio, lo mismo si aparecen regularmente cada año, como si tardan más tiempo sin dar aparato fructífero hasta que las circunstancias del medio son favorables.

El Receptáculo está constituido generalmente por un conjunto de filamentos micelianos asociados paralela-

mente o diversamente entrecruzados. El receptáculo tiene su origen en el micelio; este carpóforo, que al principio recibe el nombre de Primordium, está cubierto por la tierra hasta que alcanza el tamaño de un huevo, del cual tiene el aspecto. Si en este estado damos al hongo un corte longitudinal, observamos la presencia de una envoltura externa, bastante espesa, de color blanco que rodea al ejemplar completamente. Esta envoltura es la Volva o Velo general. En el interior de esta envoltura se reconocen las diferentes partes del hongo adulto, el sombrero y el pie, éste, soldado por la parte inferior a la volva.

Durante el crecimiento del hongo, el pie y el sombrero lo hacen más de prisa que la volva por lo que la volva se disgrega por la parte superior en trozos o verrugas que quedan fijadas al sombrero, y por la parte inferior queda como una bolsa alrededor del pie.

El Pie es la parte del carpóforo que soporta el sombrero; está formado por hifas dispuestas generalmente en haces paralelos o entrecruzadas anárquicamente. La Amanita muscaria se caracteriza también por la existencia de un anillo proveniente del velo parcial.

En resumen, el género *Amanita* perteneciente a la familia Agaricaceas, del orden Agaricales, se caracteriza porque el velo general es casi siempre persistente y da lugar a la formación de la volva; el velo parcial constituye el anillo. El sombrero y el pie, las esporas son de color blanco, grandes, globulosas o elipsoidales; es característica la trama bilateral de las laminillas que están cortadas en ángulo recto en su extremidad posterior.

La *Amanita muscaria* tiene un sombrero convexo que después se extiende, alcanzando un diametro que oscila entre los 8 y 20 cm.; es carnoso, un poco viscoso con la humedad, de color rojo a rojo anaranjado, cubierto de numerosas verrugas blancas o un poco amarillas, con bordes estriados en los ejemplares adultos. Las laminillas son abundantes y muy juntas unas a otras, ventrudas, libres, blancas.

Las características principales que distinguen la *Amanita muscaria* de la *A. caesarea* son:

A. caesarea

Sombrero desnudo

Laminillas amarillas *

Pie amarillo

Volva resistente y

persistente

A. muscaria

Sombrero con restos de
volva

Laminillas blancas

Pie blanco

Volva, restos

II. 2. 2. Clitocybe

La especie tóxica representativa es la *C. rivulosa*. Tienen un sombrero bastante carnoso, convexo, después plano y finalmente en embudo, que mide de 3 a 5 cm. de color blanco, brillante, satinado, que puede hacerse en ocasiones gris pálido; la margen es delgada, incurvada, ondulada.

Las laminillas son abundantes, apretadas, decurrentes y de color blanco.

El pie frecuentemente incurvado, es tenaz, igual, del mismo color que el sombrero.

Su carne es blanca, de gusto dulce y olor a harina. Las esporas son blancas, en masa, hialinas, elipsoidales, de 5 por 3 micras, aproximadamente.

II. 2. 3. Inocybe

Es un género muy homogéneo, cuyas especies son de difícil diferenciación si no se recurre al microscopio. Existen bastantes especies tóxicas y otras que no lo son.

Entre las venenosas destaca la *I. patouillardii*: tiene el sombrero cónico acampanado, después extendido, alcanzando un diámetro de 3 a 8 cm., mamelonado en el centro, seco, sedoso, blanco amarillento al principio, después pardo rojizo, bordes hendidos. Las láminas son muy abundantes y apretadas unas a otras, de color blanco y después gris verdoso manchado de pardo rojizo. El pie es cilíndrico, un poco bulboso en la base, blanco y después manchado de rojo. La carne es blanca, firme de olor fuerte. Las esporas son de color ocráceo, lisas de 12 por 7 micras aproximadamente.

II. 2. 4. Contenido en principio activo

Estas setas contienen todas ellas, en mayor o menor proporción, un principio activo que es la Muscarina, responsable de los envenenamientos que producen.

Se pueden observar en las consultas médicas, cuadros gastroenteríticos más o menos graves, de origen alimentario, producidos por ingestión de estos hongos. Entre los hechos que hacen pensar en la causa alimentaria, quizá el más importante sea el de su aparición simultánea en varias personas, afectando a veces a toda una familia, y suceden frecuentemente tras una salida al campo.

El grado de gravedad de las intoxicaciones que producen estas setas depende de la cantidad ingerida, además de las especies que se hayan consumido.

Las variaciones de la toxicidad que se pueden producir son considerables y existen numerosos factores que la modifican:

- Variaciones según la región: está probado que el consumo de Amanita muscaria en ciertos países se efectúa sin peligro alguno por todos sus habitantes. La concentración en toxina varía igualmente con las estaciones.

- Variaciones según las resistencias personales: numerosos hechos lo demuestran. En Alemania un joven intentó suicidarse tomando cuatro ejemplares de *A. muscaria*; no obtuvo más que una pérdida de conciencia y algunas alucinaciones.

Buck en 1963 cita de una parte, el caso de un bioquímico que ensayó vanamente su mitridato, de otra parte un caso donde la absorción accidental de varios champiñones no tuvo ningún efecto.

- Variaciones según la preparación: la desecación de las setas quita una parte del poder patógeno así como la ebullición.

Es importante el reseñar aquí un trabajo publicado en 1970 por Catalano y Bugster en el que afirman que la *A. muscaria* contiene Muscarina pero en cantidades no consideradas como para ser el principal acento responsable de los efectos fisiológicos atribuidos a estos champiñones; dejan constancia de los importantes papeles que juegan el ácido Iboténico y su metabolito, el Muscimol, en sus efectos sobre el sistema nervioso central. También especifican que es erróneo el pensar que la Bufotenina sea el agente alucinógeno de la *A. muscaria* porque

se inactiva al administrarlo por vía oral.

II. 3. FARMACOLOGIA

La Muscarina tiene una clara acción farmacológica parasimpaticomimética pura.

Con la designación de fármacos colinérgicos o parasimpaticomiméticos se comprende aquellas sustancias que actuando sobre las células efectoras en forma directa o indirecta, producen efectos similares a los que provoca la estimulación de las fibras colinérgicas postganglionares, en su mayor parte parasimpáticas.

Su acción la realiza principalmente al estimular las glándulas y músculos lisos y al deprimir el corazón, estructuras inervadas por las fibras parasimpáticas postganglionares (colinérgicas).

Vamos a describir a continuación los efectos que produce la Muscarina sobre los distintos sistemas y aparatos orgánicos.

II. 3. 1. Sistema cardiovascular: la acción se ejerce sobre el corazón y los vasos.

a) Corazón: en el corazón aislado, la Muscarina posee una acción inhibidora, disminuyendo

la frecuencia y amplitud de las contracciones hasta llegar al paro cardíaco. En los animales intactos, la acción de la Muscarina es semejante.

El análisis de la acción cardíaca demuestra que la Muscarina por inyección intravenosa produce, según dijeron Noth y colaboradores en 1939: 1) depresión del nódulo sinoauricular (bradicardia sinusal); 2) depresión del músculo auricular (alteraciones de la onda P del electrocardiograma); 3) depresión del nódulo aurículoventricular y del haz de His (bloqueo aurículoventricular), pudiendo llegar hasta el paro cardíaco. En una palabra, posee la misma acción que la estimulación del vago.

b) Vasos: la inyección intravenosa de pequeñas dosis de Muscarina en los mamíferos (perro, gato,) produce caída de la presión arterial debido especialmente a depresión cardíaca (efecto vagal) y a vasodilatación perifé-

rica, ésta última demostrada por aumento del volumen visceral y por experimentos de perfusión.

- II. 3. 2. Sistema Respiratorio: la Muscarina contrae los bronquiolos en los animales y en el hombre, y son capaces de producir un acceso en pacientes asmáticos; la secreción bronquial también es aumentada.
- II. 3. 3. Tracto gastrointestinal: la Muscarina aumenta el tono, las contracciones y las secreciones del estómago e intestino, lo que se observa en órganos aislados y en animales intactos.
- II. 3. 4. Glándulas: todas las glándulas inervadas por nervios colinérgicos son estimuladas por la acción muscarínica; ya se ha hablado del aumento de las secreciones digestivas, debiendo agregarse también la producción de sudoración, que puede ser profusa, y lagrimeo.
- II. 3. 5. Tracto urinario: la Muscarina contrae la musculatura de la vejiga (detrusor), y puede originar deseo de orinar en los sujetos normales;

la musculatura ureteral también es estimulada.

II. 3. 6. Ojo: la Muscarina produce miosis, después de una secrección de gruesas lágrimas.

II. 4. MECANISMO DE ACCION

Se ha postulado la existencia de un receptor celular específico de la Muscarina, receptor muscarínico, que por su unión con la Muscarina es el responsable de las acciones mencionadas.

Se establece un modelo del receptor muscarínico: la molécula de Muscarina es rígida y de una estructura que debe adaptarse al receptor correspondiente, de manera que cualquier modificación en sus grupos químicos o en su posición espacial disminuye mucho o anula su actividad. En cualquier caso, el catión amonio cuaternario debe unirse con un anión, probablemente un grupo carboxilo existente en el receptor. En esta forma, el receptor muscarínico debe tener una calidad que contenga una zona aniónica, un grupo carboxilo, que se una por enlace electrovalente con el catión amonio cuaternario de la Muscarina; una segunda zona, zona catiónica, con carga positiva, que se una al oxígeno por un enlace probablemente bipolar, y una tercera zona, zona catiónica, que se una al oxígeno del grupo hidroxilo por el mismo tipo de enlace.

II. 5. INTOXICACION

La Muscarina administrada por vía bucal, subcutánea e intramuscular es capaz de originar manifestaciones indeseables en los sistemas gastrointestinal, respiratorio y cardiovascular.

a) Los trastornos gastrointestinales consisten en molestias epigástricas, náuseas, vómitos, cólicos intensos y diarrea.

b) Los síntomas respiratorios consisten en disnea asmática (broncoconstricción) hasta la producción de accesos disneicos.

c) Los trastornos cardiovasculares consisten en rubicundez de la cara, cefalea, caída de la presión arterial, bradicardia intensa, mareos y lipotimia con pérdida de la conciencia.

Es un síndrome de corta incubación asociándose a los trastornos anteriores una afección nerviosa funcional.

La incubación dura de una a cuatro horas de media. Los signos digestivos son bastante marcados.

Los signos neurológicos son capitales para el diagnóstico; se pueden presentar distintos cuadros:

- Manifestaciones delirantes con alucinaciones visuales, pesadillas, locuras. El intoxicado no está absolutamente lúcido, pasando de una alegría extraordinaria a un estado de locura furiosa.

- Cuadro de agitación con confusión mental simple.

- Forma convulsiva con hipertonia muscular generalizada y pérdida del conocimiento.

- Forma hipnótica pudiendo ir hasta coma profundo.

Normalmente este estado dura algunas horas y se termina por un período comatoso de dos a diez horas, al final del cual el enfermo se restablece espontáneamente. En algunos persisten los vértigos y las alucinaciones auditivas ligeras.

La evolución se hace hacia la curación total en 24 horas poco más o menos.

El tratamiento es únicamente sintomático, quedando bien entendido que la evacuación (vómitos provocados,

lavado de estómago, purga) es lo primero a realizar.

La Atropina, preconizada otras veces en intoxicaciones similares, debe estar formalmente contraindicada pues no hace más que agravar los síntomas.

Otros autores como Menu y Faure, en 1967, opinan que la Atropina es el antagonista específico de la Muscarina; citan experimentos realizados con animales que, protegidos por este producto, soportan dosis varias veces letales; indican que la vía de administración ideal, cuando el diagnóstico es evidente, es la subcutánea, en cantidades de 0,5 a 1 mg.

Todos los autores coinciden en que se pueden administrar fármacos tranquilizantes (Clorpromazina) y antihistamínicos (Fenergan) a pequeñas dosis. Durante el período comatoso, una depresión cardiorrespiratoria puede necesitar analépticos. Las pérdidas digestivas deben ser compensadas si son muy abundantes; esto raramente se da pues la duración de la intoxicación es breve.

II. 6. ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS DE METODOS

ANALITICOS

Existen pocos datos sobre la determinación química de Muscarina en toda la bibliografía consultada.

Sullivan y Brady en 1965, intentan separar Colina, Betaina y Muscarina por el método cromatográfico de Waldi, para separación de compuestos de amonio cuaternario, pero éste no fue satisfactoria; realizan esta separación en óxido de aluminio activado G con un disolvente MeOH-CCl₄-AcOH (28 : 12 : 1); obtienen un valor representativo R_F para la Muscarina de 0,87.

Existe otro trabajo de Aslanian y col. en 1977 en que obtienen la conformación del esqueleto O-C-C-N de la Muscarina, en la forma cristalina y en soluciones acuosas, por el espectro Raman.

Existen antecedentes de determinación de sustancias relacionadas con la Muscarina, como son las toxinas de otras especies de Amanita, por técnicas de cromatografía en capa fina y espectrofotometría ultravioleta.

Así, Palyza en 1973 detecta las toxinas de Amanita phalloides por cromatografía en capa fina de Sili-

cagel, pulverizada con PO_4H_3 alcohólico y calentando las placas a $110^{\circ}C$. durante 15 a 20 minutos.

Hay un test muy específico descrito por Palyza en 1974 para separar e. identificar las toxinas de *A. phalloides*; el extracto del hongo se separó sobre una capa fina de Silicagel mediante una mezcla de disolventes formada por 60-70 partes de 2-etoxietanol o 2-butoxietanol, frente a 40 partes de solución acuosa al 25% de amoníaco y 0,25 a 0,4 partes de aldehído cinámico; las manchas violetas representantes de las toxinas se hacen visibles por la exposición al vapor de ácido clorhídrico.

Otros autores como Wieland, en 1966, determinan las toxinas de *Amanita verna*; éste trata el extracto metanólico, homogeneizado y seco, con varias técnicas cromatográficas y posteriormente identifica las fracciones por espectrografía ultravioleta.

III. P A R T E E X P E R I M E N T A L

III. 1. TRABAJO CON PRODUCTO PURO

Se operó con una solución madre de DL-Muscari-
na de la casa SIGMA, preparada con 10 mg. del princi-
pio activo que se disolvió en 50 ml. de agua destila-
da; así, la disolución quedó a una concentración de
0,2 mg./ml.

Con porciones de esta disolución se intentaron
diferentes métodos analíticos; éstos se encaminaban so-
bre todo a dos tipos de técnicas: Espectrofotometría
ultravioleta y Cromatografía en capa fina.

III. 1. 1. Espectrofotometría u.v.

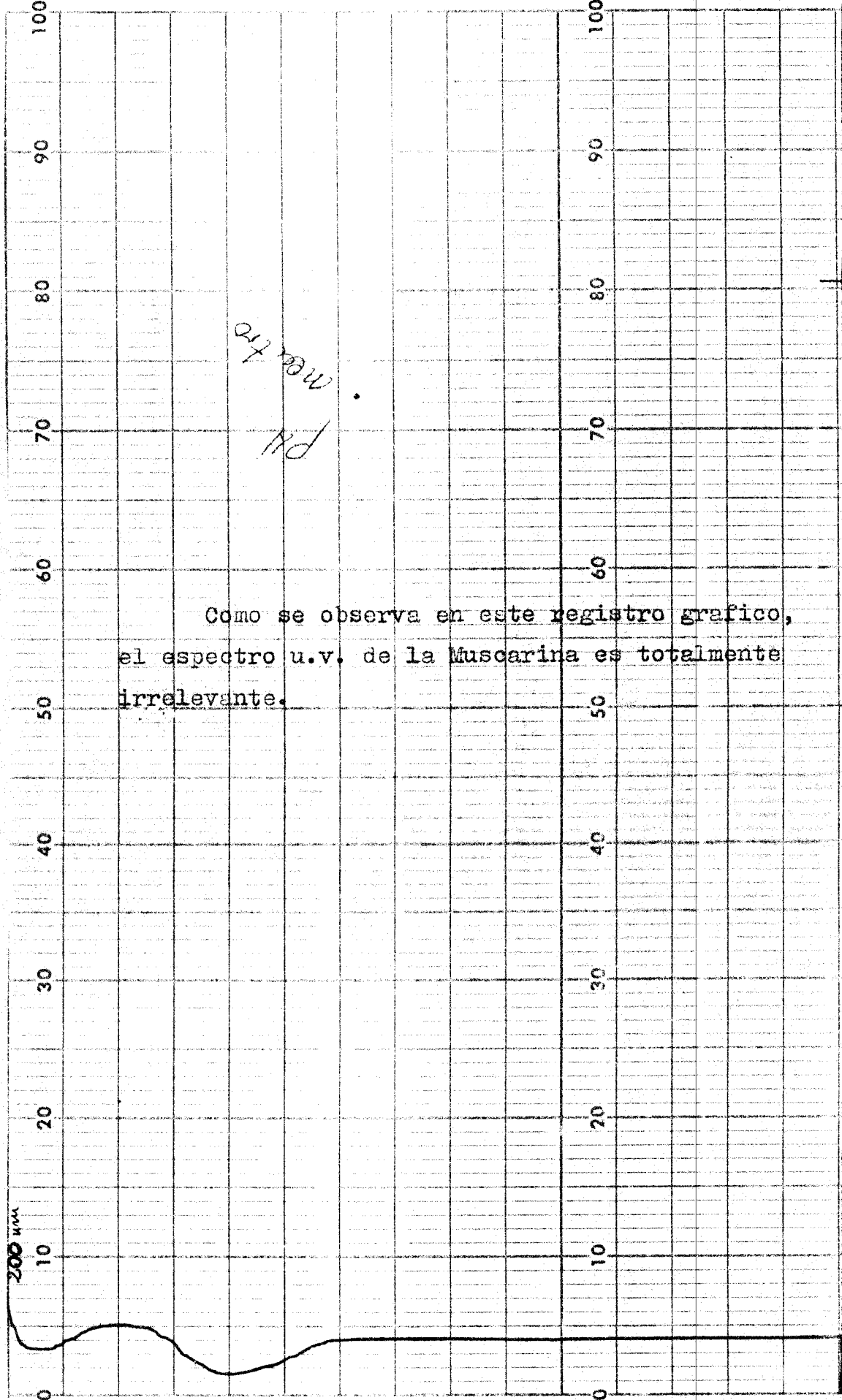
Se intentaron distintos espectros de la disolución de Muscarina a diferentes pH: neutro, ácido y alcalino. Se cubrió en todos ellos un campo de 350 nm. a 200 nm. de longitud de onda, abarcando así la mayor parte del espectro ultravioleta más característico.

En ninguno de los tres casos se observó la existencia de algún pico característico de absorción por el que posteriormente se pudiera identificar el producto; solamente se aprecia un mínimo que empieza a los 258 nm. y alcanza la máxima intensidad a 240 nm.; pero de todas formas, su apreciación no nos sirve para identificar el principio activo, debido a la poca especificidad que posee esta curva. Esto es debido a que la Muscarina es una sustancia orgánica con un heteroátomo de N que posee electrones libres (electrones n) y que no presentan absorción más que por debajo de los 200 nm. metiéndose ya en el campo del ultravioleta lejano (o de vacío).

Cabría la posibilidad de preguntarse si registrando el espectro ampliado desde 240 a 260 nm. para

aumentar la curva y poderla visualizar mejor, se lograría una determinación correcta del producto, pero se llegó a la conclusión de que la curva es demasiado poco específica y no nos serviría para ello.

Por estas razones nos dedicamos de lleno a la puesta a punto de la técnica cromatográfica de la que a continuación vamos a tratar.



Como se observa en este registro grafico,
 el espectro u.v. de la Muscarina es totalmente
 irrelevante.

200 nm

III. 1. 2. Cromatografía en capa fina

Es una técnica separativa consistente en poner la muestra en la Cromatoplaca (placa de cristal con una capa fina de Silicagel) y una vez seca se lleva a una caja de cristal en cuyo fondo está el eluyente; al ir subiendo el eluyente se van separando las sustancias y, si es preciso, se hace un revelado, para visualizar las manchas. Por el diámetro de las manchas se semicuantifica la sustancia, y si no es suficiente, se cuantifica por un Fotodensitómetro; la determinación cualitativa se efectúa por la distancia alcanzada, o lo que existe un parámetro llamado R_f , que es el cociente entre la distancia alcanzada por la sustancia en cuestión y el frente del eluyente.

El principal problema con que nos encontramos a la hora de usar esta técnica es el de encontrar un revelador apropiado que ponga de manifiesto la Muscarina; también fue una dificultad a resolver, encontrar el eluyente adecuado que separara, lo suficiente para su apreciación, los frentes del eluyente y de la sustancia problema.

III. 1. 2. 1. Revelador: En primer lugar se operó en papel de filtro poniendo manchas de la solución acuosa de Muscarina, de concentración 0,2 mg./ml.; se fueron probando distintos reactivos que revelaran la presencia de la Muscarina. En muchos de ellos no se apreció reacción, tales como: Iodoplatinato, Verde de Bromocresol al 0,1% en alcohol, solución de Cloruro mercuríco al 2%, Iodobismutato, Paradimetilamino benzaldehído, Dianisidina en Molibdato sódico y ácido sulfúrico, mezcla de Ferriclanuro potásico y Cloruro férrico, Cloruro paladioso al 0,5% en ácido Clorhídrico, Nitrato mercurioso, solución acuosa de Ioduro potásico, solución sulfúrica de sulfato de Cerio; tampoco daba una coloración característica al someterlo a radiación ultravioleta de $\lambda = 240$ nm.

Fueron positivas las pruebas realizadas con los siguientes reactivos, apareciendo

siempre la Muscarina situada en los bordes de la mancha por difundir más rápidamente hacia la periferia; las coloraciones aparecían después de calentar las tiras de papel a unos 85-90°C.:

- Mezcla de Permanganato potásico al 1% y Carbonato sódico al 2%: se obtiene una coloración amarilla.

- Solución saturada de Nitrato mercurioso: da un halo negruzco.

- Rojo Congo al 0,4% en etanol: da un halo azulado.

- Rodamina B: hay reacción pero de poca intensidad.

- Solución de Nitrato de plata 0,1 N: es la que tiene una reacción más clara dando un halo negruzco.

- Tanino al 5%: da un halo negruzco parecido al anterior pero menos claro.

A continuación hay que comprobar qué reactivos de los anteriormente citados dan po-

sitivo en las placas de Cromatografía en capa fina; para ello se concentran 19ml. de la solución acuosa de Muscarina hasta un volumen de unos 2 ml; con este concentrado se ponen manchas en placas pequeñas con una capa de Silicagel y se revelan con los anteriores reactivos. De todos ellos, el único que tenía una reacción constante con la Muscarina era la solución de Nitrato de plata de concentración 0,1 N, dando siempre un halo de color negrozco después de ser calentada la placa a unos 90°C.; los demás reveladores oscilaban en sus reacciones, dando unas veces positivo y otras no, por lo que optamos en prescindir de éstos y seguir nuestro trabajo utilizando siempre como revelador de la Muscarina la solución de Nitrato de plata 0,1 N.

Hubiera cabido siempre la posibilidad de revelar con ácido sulfúrico del 50% que siempre dará positivo después de calentar,

debido a que el ácido quema toda materia orgánica; pero tiene el inconveniente de ser aún menos específico.

III. 1. 2. 2. Eluyente: el siguiente paso era encontrar el eluyente ideal que arrastrara el producto problema, de tal forma que hubiera suficiente separación entre los frentes de elución para su posterior identificación.

Se probaron los siguientes eluyentes:

- Metanol: Amoníaco (100: 1,5)
- Metanol con una gota de clorhídrico
- n-Butanol: Fórmico: Agua (20: 1: 2)
- Metanol
- Butanol.

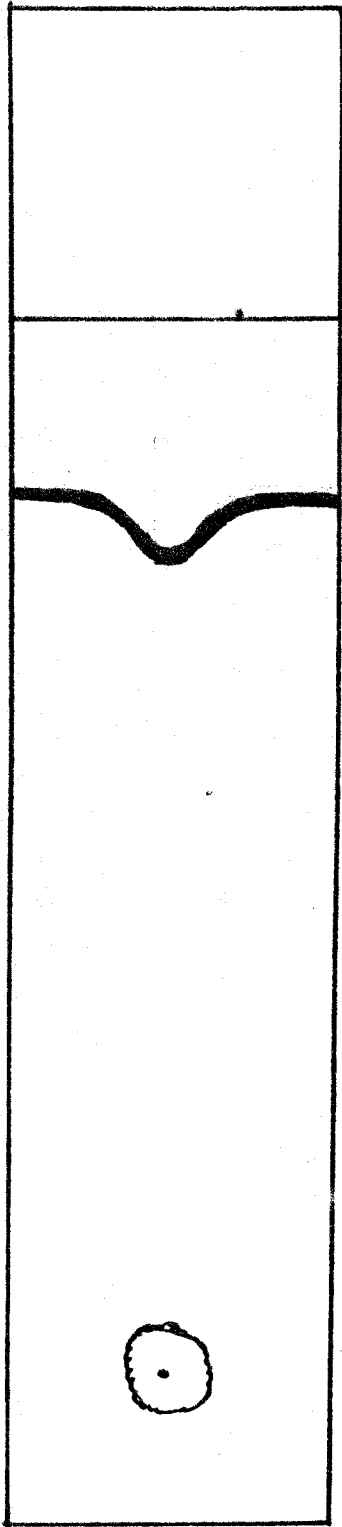
Después de ponerse de manifiesto la Muscarina al revelar con $\text{NO}_3 \text{Ag}$ y posterior calentamiento, se llegó a la conclusión de que el eluyente que mejor iba era el Metanol porque es el que más claramente separa los frentes de elución.

Por tanto, se llegó a la conclusión de que

era factible la identificación de la Muscarina por Cromatografía en capa fina de Silicagel, usando como eluyente Metanol y revelando con solución de NO_3Ag 0,1 N; operando así, y después de calentar la placa, aparece una banda negruzca correspondiente a la Muscarina con la particularidad de que en el centro de la banda la Muscarina avanza un poco menos. Esta banda aparece a una distancia de 11,4 cm. del centro de la mancha inicial cuando el eluyente ha recorrido una distancia de 14 cm.;

luego:

$$R_F = \frac{11,4}{14} = 0,81$$



Frente del eluyente

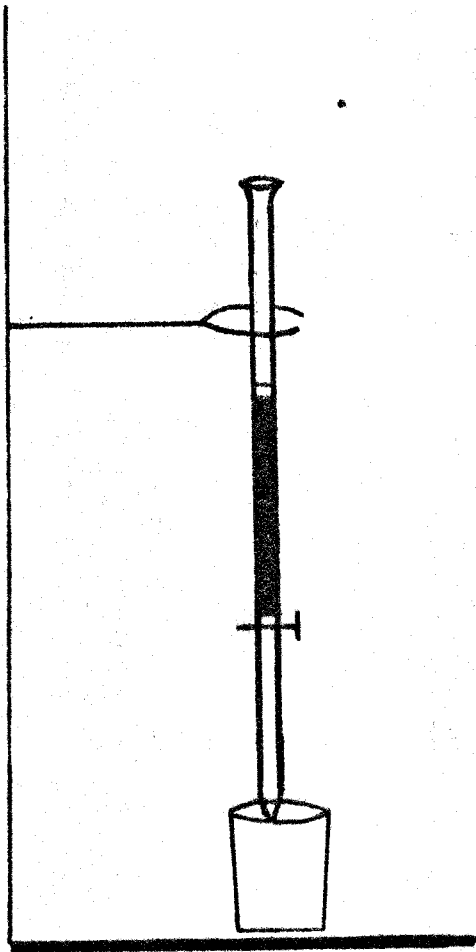
Banda de la Muscarina

$$R_F = \frac{11,4}{14} = 0,81$$

III. 2. TECNICA DE EXTRACCION

Con el fin de poner a punto un método de extracción de medios biológicos, aplicable tanto a las setas, a los restos de alimentos, como a vómitos, sangre y vísceras de intoxicados, se realizaron ensayos previos con la disolución acuosa de Muscarina. Según los resultados obtenidos, nos decidimos por la técnica consistente en pasar la disolución por una columna de intercambio iónico que contenga una sustancia capaz de retener la Muscarina; por ser ésta un amonio cuaternario se usó la resina cambiadora Amberlita IR-120.

Para ello se utiliza una columna pequeña, de 1 cm. de diámetro, de la que se llenaron unos 10 cm. con Amberlita aniónica; se pasa a su través abundante cantidad de agua destilada para que se lave y esponje bien y evitando las vías de aire por las que posteriormente se pudiera escapar el producto. Así, con el agua, se deja 24 horas. Seguidamente se activa la resina mediante un pretratamiento con 50 cc. de ácido nítrico 2 N, de forma que vaya saliendo gota a gota para que la activa-



ción sea correcta. A continuación se pasa agua por la columna hasta que salga casi neutra. Después se pasa 1 cc. de la solución acuosa de Muscarina (blanco). Ahora se lava la columna con 10 cc. de agua para que se lleve las posibles impurezas que pudieran existir; este agua de lavado se recoge y se investiga en ella la presencia de Muscarina, pero es negativa. Más tarde se eluye la columna con una solución saturada de nitrato amónico (10 cc.) y se recoge el eluido; en éste se determina la presencia del producto por cromatografía en capa fina de Silicagel utilizando como eluyente el metanol y revelando posteriormente con NO_3Ag 0,1 N. Para realizar esta técnica había que concentrar el eluido del nitrato amónico; esto se hace en un evaporador rotativo en baño de agua, a presión reducida; pero, al haberse evaporado el agua de la solución saturada del nitrato amónico, cristaliza éste al enfriar. Para solucionar esto y poderse preparar las cromatoplasmas se añade al cristalizado anterior, metanol en exceso que se llevará la Muscarina. Después se centrifuga para separar el metanol con el principio activo del cristalizado de NO_3NH_4 . A conti-

nuación se concentra el metanol con la Muscarina y se prepara una placa de cromatografía, se eluye con metanol, se revela con NO_3Ag 0,1 N y después de calentar sale una banda característica de la Muscarina con un $R_f = 0,81$.

Luego, resumiendo la técnica de extracción, hay que pasar a través de la columna con resina aniónica, y en el siguiente orden, lo siguiente:

- Agua
- 50 cc. de NO_3H 2 N
- Agua
- Problema
- 10 cc. de agua
- 10 cc. de solución saturada de NO_3NH_4
- Concentrar el eluido del NO_3NH_4
- Añadir Metanol
- Centrifugar
- Preparar cromatoplaca.

III. 3. TRABAJO CON ANIMALES

Los animales utilizados en el presente estudio han sido las ratas Ch. River.

A fin de tener la seguridad de poder posteriormente aislar e identificar la Muscarina, se le administró a una rata una dosis aproximadamente doble de la DL_{50} ; así se subsanaban las posibles pérdidas por extracción y por metabolismo del animal.

Se considera que la DL_{50} de la Muscarina administrada por vía intravenosa es de 230 microgramos por cada Kilogramo de peso corporal; como una rata adulta tiene normalmente 250 gramos de peso, la DL_{50} por rata viene a ser unos 60 microgramos.

La vía de administración que se utilizó fue la intraperitoneal, por lo que hay que considerar las pérdidas por absorción.

En definitiva, se administró a la rata 1 mililitro de la solución acuosa de Muscarina de concentración 0,2 mg./ml., es decir, unos 200 microgramos de principio activo.

Al cabo de unos 10 minutos aproximadamente, aparecieron los primeros síntomas correspondientes a la intoxicación con un parasimpaticomimético: Diarrea, Miosis, Postración, No pérdida de reflejos...

A las 20 horas y viendo que se había recuperado se le administró, también por vía intraperitoneal, otros 200 microgramos de Muscarina y a las 2 horas se sacrificó. Previamente se le extrajeron 4 centímetros cúbicos de sangre (lo máximo que se pudo) y posteriormente se le extirparon el hígado y los riñones.

Es en sangre y en estas vísceras donde se procederá a su análisis para la extracción e identificación del principio activo causante de la intoxicación.

III. 3. 1. En Sangre

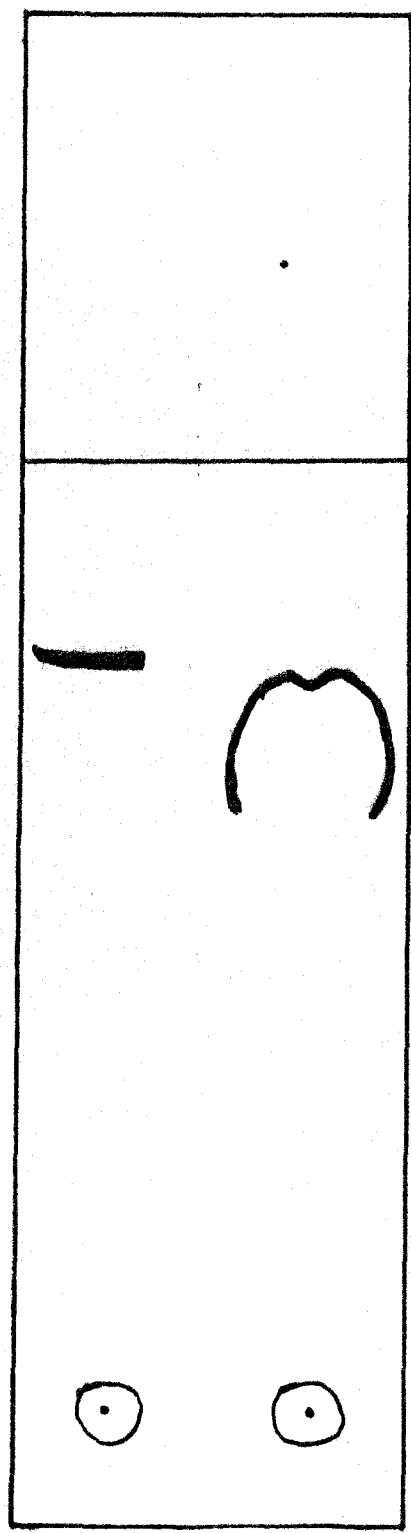
La sangre extraída de la rata se acidifica con unos 2 ml. de SO_4H_2 del 25% y se deja así unas 20 horas, al cabo de las cuales se centrifuga y se obtiene el suero donde, en teoría, deberá ir la Muscarina; aquí ensayaremos la extracción e identificación del producto.

Usamos para la extracción la columna descrita anteriormente con la Amberlita aniónica; previamente se ha de activar, por lo que se sigue el mismo procedimiento que se detalló antes: se lava con agua, se activa con NO_3H 2 N, se lava con agua hasta que salga a un pH próximo a la neutralidad, se pasa el suero, se lava con agua que arrastrará las posibles impurezas y quedará la Muscarina retenida en la columna, se eluye con solución saturada de NO_3NH_4 que arrastrará la Muscarina.

Hasta aquí es el procedimiento de extracción; a continuación se realiza el de identificación que se hace por la técnica anteriormente reseñada de cromatografía en capa fina.

Para preparar la cromatoplaça se concentra el eluido del NO_3NH_4 , se le añade Metanol en exceso en don-

de se disolverá la Muscarina, se centrifuga para separarlo del NO_3NH_4 y se pone en la placa; junto a ella se pone el testigo; se eluye en metanol, se revela con NO_3Ag 0,1 N, se calienta y sale una banda con un $R_F = 0,81$.



Frente del eluyente

Bandas de la Muscarina

$$R_F = \frac{10}{12,4} = 0,81$$

Patrón Sangre

III. 3. 2. En Visceras

Las Visceras extraídas de la rata, hígado y riñones, se trocean el máximo posible, se ponen en un erlenmeyer y se cubren con agua; se acidifican con ácido nítrico y se dejan a temperatura ambiente veinticuatro horas. Así las sustancias hidrosolubles como es la Muscarina se disolverán en el agua. Esta se separa por filtración y en ella se ensaya la extracción y posterior identificación del principio activo.

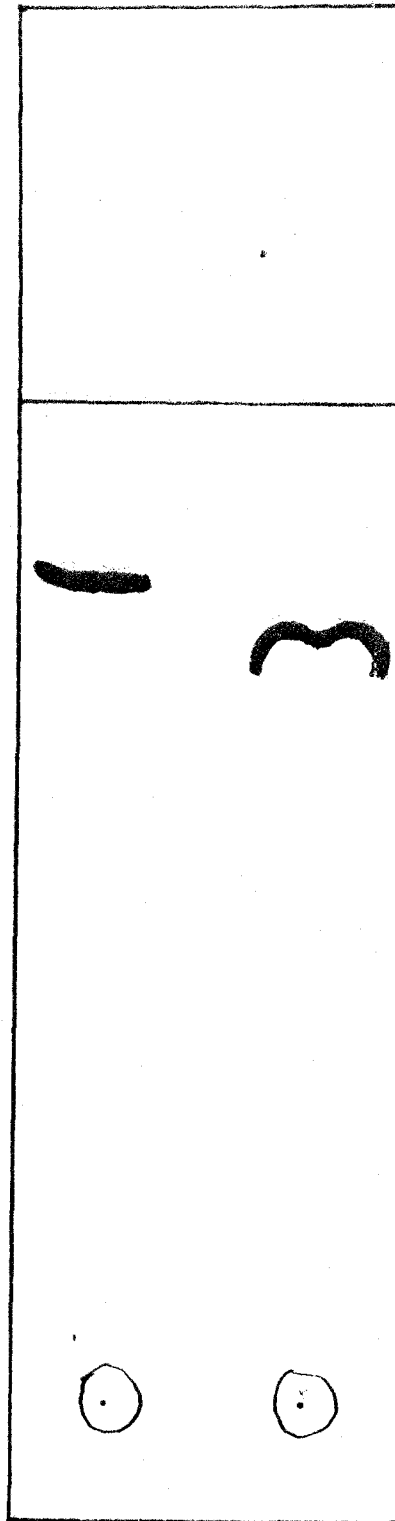
Esto se hace siguiendo las técnicas que anteriormente se han descrito:

Extracción: la realizamos en la columna de intercambio iónico.

Identificación: por cromatografía en capa fina usando metanol como eluyente, y NO_3Ag 0,1 N como revelador y posterior calentamiento; aquí la banda de la Muscarina sale un poco más retrasada que la del patrón, y da un $R_F = 0,76$; esto puede deberse a la presencia de distintas sustancias (como restos de nitrato amónico o de productos

del suero que no hayan sido eliminados por la columna); estas sustancias parece que retienen a la Muscarina frenando ligeramente su desplazamiento. Pero la diferencia no es grande y puede estimarse como prueba comparativa correcta.

$$R_F = \frac{10,8}{13,2} = 0,81$$



Patrón

Vísceras

Frente del eluyente

Bandas de la Muscarina

$$R_F = \frac{10,1}{13,2} = 0,76$$

IV. CONCLUSIONES

- 1ª.- Se ha podido encontrar muy poca información bibliográfica sobre la determinación toxicológica de la Muscarina. Incluso se afirma (Kohn-Abrest y Le Breton) que la detección química en vísceras es muy incierta.
- 2ª.- Hemos podido comprobar que esta falta de referencias está motivada por la escasa capacidad de reacción de esta sustancia con los reactivos precipitadores y de color comunes y no presentar espectro característico de absorción en el rango ultravioleta. Tampoco es factible su separación por los métodos toxicológicos más usuales.
- 3ª.- Nosotros hemos logrado aislar la Muscarina del suero sanguíneo y de vísceras de animales intoxicados por un procedimiento que describimos en el trabajo, mediante una columna de intercambio iónico, usando como resina cambiadora la Amberlita aniónica IR-120 y eluyendo el principio activo con solución saturada de nitrato amónico.
- 4ª.- Hemos identificado la Muscarina por técnica de cromatografía en capa fina de Silicagel. Se usa como

eluyente el alcohol metílico y como reveladores
solución de nitrato de plata 0,1 N y calor, o so-
lución de ácido sulfúrico 50% v.v.

V. BIBLIOGRAFIA

- Andary, C.; Enjalbert, F.; Privat, G. 1977.

"Determination of amatoxins in *A. phalloides* Fries (Basidiomycetos) by direct spectrometric measurements of chromatograms".

J. Chromatogr., 132 (3), 525-32.

- Aslanian, D.; Balkanski, M.; Lantie, A. 1977.

"Conformational changes of acetylcholine and some of its analogs".

J. Am. Chem. Soc., 99 (6), 1974-6.

- Buck, R. N. 1963.

"Toxicity of *Amanita muscaria*".

Jama, 185, n° 8, 663-4.

- Busca, J. 1967.

"Guía para recolectar las principales setas comestibles que crecen en Europa".

49-56, 84-85. Ed. Icharöpena, Zarauz.

- Catalformo, P.; Eugster, C., 1970.

"L'*Amanita muscaria*: connaissance actuelle de ses principes chimiques".

Bull. Stupef. XXII (4), 35.

- Chilton, W.; Ott, J. 1976.

"Toxic metabolites of *Amanita pantherina*, *A. cothurnata*,

- A. muscaria and other Amanita species".
Lloydia, 39 (2-3), 150-7.
- Deichmann, W.; Gerarde, H., 1969.
"Toxicology of Drugs and Chemicals".
409-10. Ed. Academic Press, New York.
- Douris, R. 1951.
"Toxicologic Moderne".
12^a edición; 427-9. Ed. Vigot Frères, París.
- Gamulinn, S. 1971.
"Pharmacological analysis of the mydriatic activity
of extracts from Amanita muscaria".
Bull. Sci., Cons. Acad. Sci. Arts RSP Yougoslavie,
Sect. A 1970, 15 (7-8), 246-7.
- Kamp, P.; De Wit, W. 1968.
"Identification of toxic compounds in A. phalloides".
Pharm. Weekbl., 103 (27), 813-22.
- Kohn- Abrest, E. 1934.
"Précis de Toxicologie".
226-318. Ed. G. Doiu et Cie, París.

- Le Breton, R. 1965.

"Est-il toujours possible d'établir la preuve de l'intoxication par les Amanites a partir des visceres".

Bull. Med. Leg. Marzo, 149.

- Litter, M. 1973.

" Farmacología experimental y clínica".

4ª edición; 525. Ed. El Ateneo, Buenos Aires.

- Lizan, L. 1967.

"Identificación de hongos comestibles".

Publicaciones del Ministerio de Agricultura, serie J, nº 39. Madrid.

- Menu, J.P.; Faure, J. 1967.

" L'intoxication par les champignons".

76-8. Ed. Masson et Cie., Lyon.

- Palyza, V. 1973.

"Chromatography of Amanita toxins. III. Detection of amanitine with phosphoric acid".

J. Chromatogr., 76 (2), 499-501.

- Palyza, V. 1974.

"Solvent for chromatographic detection of Amanita phalloides toxins".

Czech. 148, 265 (Cl. G. Ol n), 15 Apr 1973, Appl.

6153-71, 27 Aug 1971.

- Palyza, V. 1975.

"Chromatography of Amanita toxins. IV. Rapid identification of amanitins in mushroom tissues".

Arch. Toxicol., 32 (2), 190-14.

- Raaen, H. 1969.

"Improved thin-layer-chromatographic separation of Amanita toxins on silicagel G chromatoplates".

J. Chromatogr., 38 (3), 403-7.

- Stadelman, R.; Mueller, E.; Eugster, G. 1976.

"Muscarine and related substances. The distribution of stereoisomeric muscarines within the order Agaricales".

Helv. Chim. Acta, 59 (7), 2432-6.

- Sullivan, G.; Brady, L. 1965.

"Thin-layer-chromatographic separation of betaine, choline and muscarine".

Lloydia, 28 (1), 68-70.

- Swenberg, M. L.; Kelleher, W. J.; Schwarting, A. E.
1967.

"Muscarine: isolation from cultures of *Clitocybe
rivulosa*".

Science 155 (3767), 1259.

- Wieland, T.; Schiefer, H.; Gebert, U. 1966.

"Poisons from *Amanita verna*".

Naturwissenschaften, 53 (2), 39-40.