

**ESTUDIO POR TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS Y DE ESPECTROMETRÍA
DE MASAS DE LOS ALCALOIDES HARMALA EN EXTRACTOS
DE *Banisteriopsis caapi* Y EN MUESTRAS DE ORINA**

CRISTIAN ANDRÉS OLIVEROS

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA
2015**

**ESTUDIO POR TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS Y DE ESPECTROMETRÍA
DE MASAS DE LOS ALCALOIDES HARMALA EN EXTRACTOS
DE *Banisteriopsis caapi* Y EN MUESTRAS DE ORINA**

CRISTIAN ANDRÉS OLIVEROS

Tesis de grado para optar al título de Químico

DIRECTORES:

ELENA E. STASHENKO, Química, Ph. D.

JAIRO RENÉ MARTÍNEZ, Químico, Ph. D.

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2015

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, mi madre Smith, mi tía Doris, mis abuelos Hersilia y Pablo, mi hermano Felipe y mi prima Daniela, por todas las palabras de apoyo, por sus consejos y su amor incondicional.

A los Doctores Elena Stashenko y Jairo René Martínez, maestros de la vida y del conocimiento, por sus enseñanzas de la química analítica, por ser ejemplos de perseverancia y dedicación en la construcción de ciencia en Colombia.

A los compañeros y compañeras de CENIVAM, por el intercambio de conocimientos y los momentos agradables.

A mis amigos y amigas, al colectivo Misión Lápiz y Papel, por mantener vivas las esperanzas por un mejor mañana, camino a la transformación social.

A Freddy Janamejoy y al taita Bernardo Queta, por sus enseñanzas acerca del remedio y de la cosmovisión de los mayores que cuidan la madre tierra.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	24
2. MARCO TEÓRICO	27
2.1. <i>BANISTERIOPSIS CAAPI</i>	27
2.1.1. Consumo del brebaje de yagé y análogos	28
2.2. ALCALOIDES.....	30
2.3. TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN.....	32
2.3.1. Obtención de extractos	32
2.3.2. Extracción con disolventes orgánicos	33
2.3.3. Extracción por dispersión de la matriz en fase sólida	34
2.4. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA	36
2.5. TÉCNICAS ANALÍTICAS INSTRUMENTALES.....	37
2.5.1. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas	37
2.5.2. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas <i>tándem</i>	38
2.5.2.1. Barrido completo (<i>Full scan</i>)	41
2.5.2.2. Barrido de ion(es) seleccionado(s) (<i>Selected Ion Monitoring</i>).....	41
2.5.2.3. Barrido del ion-fragmento (<i>Product-Ion Scan</i>).....	42
2.5.2.4. Barrido del ion-precursor (<i>Parent-Ion Scan</i>)	43
2.5.2.5. Monitoreo de reacción múltiple (<i>Multiple Reaction Monitoring</i>)	43
2.5.2.6. Barrido de fragmento neutro (<i>Neutral Loss Scan</i>).....	44

2.5.3.	Cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas	45
2.5.4.	Cuantificación.....	47
3.	CIENCIOMETRÍA.....	49
4.	DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	55
4.1.	REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS DE LABORATORIO	55
4.2.	MATERIAL VEGETAL.....	56
4.3.	MUESTRA DE ORINA HUMANA.....	57
4.4.	EXTRACCIÓN DE LOS ALCALOIDES <i>HARMALA</i> DE LA CORTEZA DE <i>B. CAAPI</i>	57
4.4.1.	Extracción con disolventes orgánicos	57
4.4.2.	Extracción por dispersión de la matriz en fase sólida	57
4.5.	EXTRACCIÓN DE LOS ALCALOIDES <i>HARMALA</i> Y SUS METABOLITOS EN ORINA HUMANA.....	58
4.6.	PREPARACIÓN DE LA MUESTRA PARA EL ANÁLISIS DE LOS ALCALOIDES <i>HARMALA</i> POR GC-MS, GC-MS/MS Y LC-MS.....	58
4.6.1.	Extracto obtenido con disolventes orgánicos	58
4.6.2.	Extracto obtenido por dispersión de la matriz en fase sólida	59
4.6.3.	Extracto obtenido de la orina.....	59
4.7.	ANÁLISIS INSTRUMENTAL	60
4.7.1.	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas	60
4.7.2.	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas <i>tándem</i>	61
4.7.2.1.	Parámetros de adquisición del GC-QqQ-MS	63
4.7.3.	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas.....	63

4.7.3.1.	Parámetros de adquisición del LC-ESI(+)-TOF-MS	65
5.	ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	66
5.1.	CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS	66
5.2.	CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS <i>TÁNDEM</i>	69
5.2.1.	Modos de inyección	69
5.2.2.	Modos de adquisición	70
5.2.2.1.	Barrido completo	70
5.2.2.2.	Monitoreo del ion seleccionado.....	72
5.2.2.3.	Barrido de iones-producto de los iones M^+ y $[M-CH_3]^+$, de harmina y tetrahydroharmina.....	73
5.2.2.4.	Barrido de iones-precusores de los fragmentos $[M-CH_3-CO]^+$ y $[M-CHO]^+$ de la harmina y de los fragmentos $[M-CH_3NH]^+$ y $[M-CH_2NH]^+$, de la tetrahydroharmina.....	77
5.2.2.5.	Monitoreo de reacciones múltiples: $212 \rightarrow 197$ y $216 \rightarrow 201$	81
5.2.3.	Rutas de fragmentación	85
5.2.4.	Análisis de la orina	88
5.2.5.	Ensayo de derivatización con deuterio.....	89
5.3.	CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS	93
5.3.1.	Cantidad relativa de los alcaloides <i>harmala</i> aislados por LLE de la corteza de <i>B. caapi</i>	93
5.3.2.	Cantidad relativa de los alcaloides <i>harmala</i> aislados por MSPD de la corteza de <i>B. caapi</i>	95

5.3.3.	Influencia de voltajes del capilar y <i>fragmentor</i> sobre las corrientes iónicas de iones MH^+ y sus fragmentos	97
5.3.4.	Análisis de los alcaloides y sus metabolitos en la orina	107
5.3.5.	Cuantificación de los alcaloides <i>harmala</i> en la orina.....	116
CONCLUSIONES		119
BIBLIOGRAFÍA.....		121

LISTADO DE FIGURAS

Pág.

Figura 1. Partes aéreas de <i>Banisteriopsis caapi</i> , hojas y liana. Fotografía tomada por el autor en el jardín botánico del Laboratorio de Cromatografía y Espectrometría de Masas CROM–MASS, UIS – Bucaramanga, el 16 de julio de 2014.....	27
Figura 2. Las estructuras de: A. β -Carbolina ($C_{11}H_8N_2$) y B. Triptamina ($C_{10}H_{12}N_2$)	31
Figura 3. Alcaloides en forma libre y protonada, según la variación del pH. Para la harmina ($pK_a = 7.7$), la extracción más eficiente será a $pH = 10,7$	33
Figura 4. Esquema general de la técnica de extracción por dispersión de la matriz en fase sólida. Tomado de: Barker, 2007.	35
Figura 5. Aspecto externo de la ubicación de los tres cuadrupolos. Fotografía tomada por el autor en el Laboratorio de Cromatografía y Espectrometría de Masas CROM–MASS, UIS – Bucaramanga, el 17 de octubre de 2014.....	40
Figura 6. Esquema del proceso de ionización por electronebulización. Adoptado de: Cech y Enke, 2001.....	46
Figura 7. Desarrollo cronológico de publicaciones científicas sobre <i>B. caapi</i> . Base de datos: <i>Scopus</i> (<i>Elsevier</i> , 2014). Periodo de observación: 2000-2014. Palabra-clave: “ <i>Banisteriopsis caapi</i> ”. Fecha de consulta: 24 de octubre de 2014.	49
Figura 8. Revistas principales, en las cuales se ha publicado mayor número de trabajos sobre la especie <i>B. caapi</i> . Base de datos: <i>Scopus</i> (<i>Elsevier</i> , 2014). Periodo de observación: 1970-2014. Palabra-clave: “ <i>Banisteriopsis caapi</i> ”. Fecha de consulta: 24 de octubre de 2014.....	50

Figura 9. Principales áreas de investigación sobre la especie <i>B. caapi</i> . Base de datos: <i>Scopus</i> (<i>Elsevier</i> , 2014). Periodo de observación: 1970-2014. Palabras-clave: “ <i>Banisteriopsis caapi</i> ”. Fecha de consulta: 24 de octubre de 2014.	51
Figura 10. Comparación de publicaciones sobre alcaloides β -carbolinas y las técnicas analíticas instrumentales de GC, GC-MS, HPLC y LC-MS. Base de datos: <i>Scopus</i> (<i>Elsevier</i> , 2014). Periodo de observación: 1990-2015. Palabras-clave: “ β -Carboline AND GC”, “ β -Carboline AND GC-MS”, “ β -Carboline AND HPLC” y “ β -Carboline AND LC-MS”. Fecha de consulta: 24 de octubre de 2014.....	53
Figura 11. Equipo de GC-MS utilizado en la investigación. Fotografía tomada por el autor en el Laboratorio de Cromatografía y Espectrometría de Masas, CROM-MASS, UIS – Bucaramanga, el 17 de octubre de 2014.	60
Figura 12. Equipo de GC-QqQ-MS utilizado en la investigación. Fotografía tomada por el autor en el Laboratorio de Cromatografía y Espectrometría de Masas, CROM-MASS, UIS – Bucaramanga, el 17 de octubre de 2014.	62
Figura 13. Equipo de LC-ESI-TOF-MS utilizado en la investigación. Fotografía tomada por el autor en el Laboratorio de Cromatografía y Espectrometría de Masas, CROM-MASS, UIS – Bucaramanga, el 17 de octubre de 2014.	64
Figura 14. Perfil cromatográfico típico, obtenido por GC-MS, de los alcaloides <i>harmala</i> , aislados por LLE de la corteza de <i>B. caapi</i> . A. TIC y B. Identificación de picos cromatográficos. Columna DB-5MS (60 m), modo de inyección: <i>split</i> (1:10), MSD (<i>EI</i> , 70 eV).....	67
Figura 15. Comparación del espectro de masas asignado a la tetrahidroharmina (A), con el de la base de datos NIST (B) para esta sustancia (conocida también con el nombre de leptaflorina).....	67
Figura 16. Comparación del espectro de masas asignado a la harmalina (A) con el de la base de datos NIST (B).....	68
Figura 17. Comparación del espectro de masas asignado a la harmina (A) con el de la base de datos NIST (B).....	68
Figura 18. Perfiles cromatográficos típicos, obtenidos por GC-QqQ-MS, con inyección en modos <i>split</i> (1:30), <i>splitless</i> y <i>pulsed splitless</i> , de los alcaloides	

<i>harmala</i> , aislados por LLE de la corteza de <i>B. caapi</i> . Columna DB-5MS (60m), volumen de inyección: 1 μ L.	69
Figura 19. Perfiles cromatográficos obtenidos por GC-QqQ-MS (modo <i>full scan</i>), de los alcaloides <i>harmala</i> , aislados por LLE de la corteza de <i>B. caapi</i> . Columna DB-5MS (60m), modo de inyección: <i>split</i> (1:30), volumen de inyección: 1 μ L.	71
Figura 20. Espectros de masas (<i>EI</i> , 70 eV), obtenidos por GC-QqQ-MS (modo <i>full scan</i>), de los alcaloides <i>harmala</i> : A. Tetrahydroharmina, B. Harmalina y C. Harmina.	72
Figura 21. Fragmentograma de masas (detección selectiva), obtenido por GC-QqQ-MS (<i>EI</i> , 70 eV), operado en modo SIM, usando los iones moleculares (<i>m/z</i> 212, 214 y 216) de los alcaloides <i>harmala</i> , aislados por LLE de la corteza de <i>B. caapi</i> . Columna DB-5MS (60m), modo de inyección: <i>split</i> (1:30), volumen de inyección: 1 μ L.	73
Figura 22. Espectros de masas (<i>EI</i> , 70 eV), obtenidos por GC-QqQ-MS, operado en modo de <i>product-ion scan</i> , de los iones M^+ y $[M-CH_3]^+$, de la harmina. Aparecen los valores de las corrientes iónicas (áreas en cuentas) para transiciones iónicas estudiadas a diferentes valores de las energías de colisiones activadas: A. 5 eV; B. 10 eV; C. 15 eV y D. 25 eV.	75
Figura 23. Espectros de masas (<i>EI</i> , 70 eV), obtenidos por GC-QqQ-MS, operado en modo de <i>product-ion scan</i> , de los iones M^+ y $[M-CH_3]^+$, de la tetrahydroharmina. Aparecen los valores de las corrientes iónicas (áreas en cuentas) para transiciones iónicas estudiadas a diferentes valores de las energías de colisiones activadas: A. 5 eV; B. 10 eV; C. 15 eV y D. 25 eV.	76
Figura 24. Espectros de masas (<i>EI</i> , 70 eV), obtenidos por GC-QqQ-MS, operado en modo de <i>precursor-ion scan</i> , de los fragmentos $[M-CH_3-CO]^+$ y $[M-CHO]^+$, de la harmina. Aparecen los valores de las corrientes iónicas (área en cuentas) para transiciones iónicas estudiadas a diferentes valores de las energías de colisiones activadas: A. 5 eV; B. 10 eV; C. 15 eV y D. 25 eV.	79
Figura 25. Espectros de masas (<i>EI</i> , 70 eV), obtenidos por GC-QqQ-MS, operado en modo <i>precursor-ion scan</i> , de los fragmentos $[M-CH_3NH]^+$ y $[M-CH_2NH]^+$, de la	

tetrahidroharmina. Aparecen los valores de las corrientes iónicas (áreas en cuentas) para transiciones iónicas estudiadas a diferentes valores de las energías de colisiones activadas: A. 5 eV; B. 10 eV; C. 15 eV y D. 25 eV.....	80
Figura 26. Corrientes iónicas totales de las transiciones: A. $M^{+}_{216} \rightarrow [M-CH_3]^{+}_{201}$ y B. $M^{+}_{212} \rightarrow [M-CH_3]^{+}_{197}$, en los espectros de masas de harmina y tetrahidroharmina, obtenidos por GC-QqQ-MS, operado en modo MRM, variando las energías de colisiones activadas.....	82
Figura 27. Corrientes iónicas totales, obtenidas por MRM-GC-QqQ-MS de las transiciones: A. $M^{+}_{216} \rightarrow [M-CH_3]^{+}_{201}$ y B. $M^{+}_{212} \rightarrow [M-CH_3]^{+}_{197}$, en función de la combinación de los parámetros de “resolución” del analizador QqQ.....	84
Figura 28. Corrientes iónicas totales de los alcaloides <i>harmala</i> , obtenidas por GC-QqQ-MS, operado en los modos: A. <i>Full scan</i> ; B. SIM (<i>m/z</i> 216, 212); C. MRM (212 \rightarrow 197) y D. MRM (216 \rightarrow 201). En el modo MRM se observa la relación S/R mucho más alta, en comparación con las obtenidas en los modos de adquisición <i>full scan</i> o SIM.	85
Figura 29. Formación de iones $[M-CH_3]^{+}$ en <i>m/z</i> 197 y $[M-CH_3-CO]^{+}$ en <i>m/z</i> 169 a partir del ion M^{+} en <i>m/z</i> 212 de la harmina. CA – Colisiones activadas.....	86
Figura 30. Formación del ion $[M-CHO]^{+}$ en <i>m/z</i> 183 a partir del ion M^{+} en <i>m/z</i> 212 de la harmina.	87
Figura 31. Formación del catión-radical $[M-CH_2=NH]^{+}$ en <i>m/z</i> 187, por ruptura retro-Diels-Alder (RDA) del ion M^{+} en <i>m/z</i> 216 de la tetrahidroharmina.....	87
Figura 32. Formación del catión $[M-CH_3]^{+}$ en <i>m/z</i> 201 a partir del ion M^{+} en <i>m/z</i> 216 de la tetrahidroharmina.	88
Figura 33. Fragmentograma obtenido por MRM-GC-QqQ-MS para transiciones de iones 216 \rightarrow 201 y 212 \rightarrow 197, de los alcaloides tetrahidroharmina y harmina, presentes en el extracto de la orina, obtenida de un consumidor de yagé, ocho horas después de su consumo.	88
Figura 34. Espectro de masas (<i>EI</i> , 70 eV), obtenidos por GC-QqQ-MS (<i>full scan</i>) de: A. Harmina y B. Su análogo deuterado. Aparecen los iones-fragmento $[Md_1-CH_3]^{+}$ en <i>m/z</i> 198 y $[Md_1-CH_3-CO]^{+}$ en <i>m/z</i> 170, en la harmina deuterada.	89

Figura 35. Espectro de masas (<i>EI</i> , 70 eV), obtenidos por GC-QqQ-MS (<i>full scan</i>), de: A. Tetrahydroharmina y B. Su análogo deuterado. En la tetrahydroharmina deuterada, aparecen los fragmentos en <i>m/z</i> 187 y <i>m/z</i> 188, correspondientes a la ruptura retro-Diels-Alder, de los iones moleculares mono- y di- deuterados.	90
Figura 36. Corrientes iónicas totales, obtenidas por MRM-GC-QqQ-MS de la transición 218 → 203, de la tetrahydroharmina deuterada, variando las energías de colisiones activadas.	91
Figura 37. Formación de iones $[Md_1-CH_2=ND]^+$ en <i>m/z</i> 187, $[Md_1-CH_2=NH]^+$ y $[Md_2-CH_2=ND]$ en <i>m/z</i> 188, por ruptura retro-Diels-Alder, de las moléculas deuteradas de la tetrahydroharmina.	91
Figura 38. Perfiles cromatográficos típicos, obtenidos por GC-QqQ-MS, con inyección en modo <i>split</i> (1:30), <i>splitless</i> , <i>pulsed splitless</i> y <i>cold splitless</i> , de una mezcla de alcaloides <i>harmala</i> y el agua deuterada, presentes en el extracto LLE obtenido de la corteza de <i>B. caapi</i>	92
Figura 39. Corrientes iónicas extraídas y cantidades relativas (%), obtenidas por LC-ESI(+)-TOF-MS, de los alcaloides <i>harmala</i> , aislados por LLE de la corteza de <i>B. caapi</i>	93
Figura 40. Espectros de masas, obtenidos por LC-ESI(+)-TOF-MS, de los alcaloides <i>harmala</i> : A. Harmina; B. Harmalina y C. Tetrahydroharmina. $V_{cap} = 1000$ V, $V_{frag.} = 150$ V.	95
Figura 41. Corrientes iónicas de los iones moleculares protonados, obtenidos por LC-ESI(+)-TOF-MS: 1. Harmina; 2. Harmalina y 3. Tetrahydroharmina, aislados por MSPD de la corteza de <i>B. caapi</i> usando diferentes agentes dispersantes.	96
Figura 42. Corrientes iónicas del ion MH^+ ($C_{13}H_{13}N_2O$, <i>m/z</i> 213,1022) de la harmina, obtenidas por LC-ESI(+)-TOF-MS, en función de diferentes voltajes del capilar y <i>fragmentor</i>	99
Figura 43. Corrientes iónicas del ion MH^+ ($C_{13}H_{15}N_2O$, <i>m/z</i> 215,1179) de la harmalina, obtenidas por LC-ESI(+)-TOF-MS, en función de diferentes voltajes del capilar y <i>fragmentor</i>	100

Figura 44. Corrientes iónicas del ion MH^+ ($C_{13}H_{17}N_2O$, m/z 217,1335) de la tetrahydroharmina, obtenidas por LC-ESI(+)-TOF-MS, en función de diferentes voltajes del capilar y <i>fragmentor</i>	100
Figura 45. Corrientes iónicas extraídas (EIC) del ion molecular protonado MH^+ (m/z 213,1022) de la harmina, obtenidas por LC-ESI(+)-TOF-MS, según el voltaje del capilar, V_{cap} . El voltaje del <i>fragmentor</i> se mantuvo constante en 150 V.....	101
Figura 46. Corrientes iónicas extraídas (EIC) obtenidas por LC-ESI(+)-TOF-MS, de los iones moleculares protonados: A. Harmina (m/z 213,1022); B. Harmalina (m/z 215,1179) y C. Tetrahydroharmina (m/z 217,1335), a diferentes voltajes del <i>fragmentor</i> . $V_{cap} = 1000$ V.....	103
Figura 47. Espectros de masas, obtenidos por LC-ESI(+)-TOF-MS, de la harmina, a diferentes voltajes del <i>fragmentor</i> . A. 150 V; B. 200 V y C. 250 V; con el aumento de este voltaje, aumenta la fragmentación del ion MH^+ y la intensidad de los iones-producto $[(M+H)-CH_3]^+$ y $[(M+H)-CH_3-CO]^+$	105
Figura 48. Espectros de masas, obtenidos por LC-ESI(+)-TOF-MS, de la tetrahydroharmina, a diferentes voltajes del <i>fragmentor</i> . A. 100 V; B. 150 V y C. 250 V; con el aumento de este voltaje, se incrementa la fragmentación de los iones MH^+ ; a 250V, en el espectro solo aparecen iones-producto $[(M+H)-CH_2NH]^+$ en m/z 188,1069, $[(M+H)-CH_2NH-CH_3]^+$ en m/z 173,0815 y $[(M+H)-CH_2NH-2CH_3]^+$ en m/z 158,0598.	106
Figura 49. Perfiles cromatográficos (TIC y EIC), obtenidos por LC-ESI(+)-TOF-MS, del extracto de la orina, recolectada ocho horas después del consumo del brebaje de yagé; se observa la presencia de los alcaloides <i>harmala</i> y N,N-dimetiltriptamina. $V_{cap} = 1000$ V, $V_{frag.} = 150$ V.	107
Figura 50. Perfil cromatográfico, obtenido por LC-ESI(+)-TOF-MS, del extracto de la orina de una consumidor de yagé. Se observa la presencia del alcaloide harmina y sus metabolitos.	109
Figura 51. Espectros de masas, obtenidos por LC-ESI(+)-TOF-MS de: A. Harmina hidroxilada y B. Harmina-5-O-glucurónido, metabolitos de la harmina, encontrados en la orina de un consumidor de yagé.	109

Figura 52. Espectros de masas, obtenidos por LC-ESI(+)-TOF-MS de: A. Harmol y B. Harmol glucurónido, metabolitos de la harmina, encontrados en la orina de un consumidor de yagé.....	110
Figura 53. Perfil cromatográfico, obtenido por LC-ESI(+)-TOF-MS del extracto de la orina de un consumidor de yagé, que revela la presencia de harmalina y su metabolito harmalol.....	111
Figura 54. Espectro de masas, obtenido por LC-ESI(+)-TOF-MS del harmalol, metabolito de la harmalina, encontrado en la orina de un consumidor de yagé. .	111
Figura 55. Perfil cromatográfico, obtenido por LC-ESI(+)-TOF-MS, del extracto de la orina de un consumidor de yagé, que revela la presencia de tetrahydroharmina y sus metabolitos, tetrahydroharmol y tetrahydroharmina hidroxilada.	112
Figura 56. Espectros de masas, obtenidos por LC-ESI(+)-TOF-MS de: A. Tetrahydroharmol y B. Tetrahydroharmina hidroxilada, metabolitos de la tetrahydroharmina encontrados en la orina de un consumidor de yagé.	113
Figura 57. Perfil cromatográfico, obtenido por LC-ESI(+)-TOF-MS del extracto de la orina de un consumidor yagé, que demuestra la presencia del alcaloide N,N-dimetiltriptamina y su metabolito, 5-hidroxi-N,N-dimetiltriptamina.....	114
Figura 58. Espectros de masas, obtenidos por LC-ESI(+)-TOF-MS, de: A. N,N-Dimetiltriptamina y B. 5-Hidroxi-N,N-dimetiltriptamina, encontrados en la orina de un consumidor de yagé.....	115
Figura 59. Curva de calibración, obtenida por LC-ESI(+)-TOF-MS de la harmina, $V_{frag.} = 150$ V; $V_{cap.} = 1000$ V.	117
Figura 60. Curva de calibración, obtenida por LC-ESI(+)-TOF-MS de la harmalina, $V_{frag.} = 150$ V; $V_{cap.} = 1000$ V.	118
Figura 61. Curva de calibración, obtenida por LC-ESI(+)-TOF-MS de la tetrahydroharmina, $V_{frag.} = 100$ V; $V_{cap.} = 1000$ V.	118

LISTADO DE TABLAS

Pág.

Tabla 1. Identificación taxonómica de la especie <i>B. caapi</i>	28
Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas de los alcaloides <i>harmala</i>	31
Tabla 3. Materiales, reactivos y equipos empleados en el presente estudio.....	55
Tabla 4. Corrientes iónicas de los iones M^+ y $[M-CH_3]^+$ de harmina y tetrahydroharmina, obtenidas por GC-QqQ-MS (<i>EI</i> , 70 eV), en función de la energía de colisiones activadas.	74
Tabla 5. Intensidad (%) de los productos de los iones M^+ y $[M-CH_3]^+$, en el espectro de masas de la harmina (<i>EI</i> , 70 eV), según las energías de colisiones activadas.....	74
Tabla 6. Intensidad (%) de los productos de los iones M^+ y $[M-CH_3]^+$, en el espectro de masas de la tetrahydroharmina (<i>EI</i> , 70 eV), según las energías de colisiones activadas.	77
Tabla 7. Corrientes iónicas de los fragmentos $[M-CH_3-CO]^+$ y $[M-CHO]^+$, de la harmina y de los fragmentos $[M-CH_3NH]^+$ y $[M-CH_2NH]^+$, de la tetrahydroharmina, obtenidos por GC-QqQ-MS (<i>EI</i> , 70 eV), en función de la energía de colisiones activadas.....	77
Tabla 8. Intensidad (%) de los precursores de los fragmentos $[M-CH_3-CO]^+$ y $[M-CHO]^+$, en el espectro de masas de la harmina (<i>EI</i> , 70 eV), según las energías de colisiones activadas.	78
Tabla 9. Intensidad (%) de los precursores de los fragmentos $[M-CH_3NH]^+$ y $[M-CH_2NH]^+$, en el espectro de masas de la tetrahydroharmina (<i>EI</i> , 70 eV), según las energías de colisiones activadas.	81

Tabla 10. Corrientes iónicas totales de las transiciones iónicas 216 → 201 en el espectro de la tetrahydroharmina y 212 → 197, en la de harmina, obtenidas por GC-QqQ-MS (<i>EI</i> , 70 eV), en función de la energía de colisiones activadas.	81
Tabla 11. Corrientes iónicas totales ($\times 10^6$, cuentas) de las transiciones de iones 216 → 201 (10 eV) de la tetrahydroharmina y 212 → 197 (15 eV) de la harmina, según la “resolución” en ambos analizadores.	83
Tabla 12. Cantidad relativa y determinación por LC-ESI(+)-TOF-MS de masas exactas de iones moleculares protonados MH^+ , de los alcaloides <i>harmala</i> , aislados por LLE de la corteza de <i>B. caapi</i>	94
Tabla 13. Cantidad relativa (%) por LC-ESI(+)-TOF-MS, de los alcaloides <i>harmala</i> presentes en el extracto obtenido por MSPD de la corteza de <i>B. caapi</i> , usando dos agentes dispersantes.	97
Tabla 14. Corrientes iónicas ($\times 10^6$, cuentas) del ion MH^+ (m/z 213,1022) de la harmina, obtenidas por LC-ESI(+)-TOF-MS, según diferentes voltajes del capilar y <i>fragmentor</i> usados.	98
Tabla 15. Corrientes iónicas ($\times 10^6$, cuentas) del ion MH^+ (m/z 215,1179) de la harmalina, obtenidas por LC-ESI(+)-TOF-MS, según diferentes voltajes del capilar y <i>fragmentor</i> usados.	98
Tabla 16. Corrientes iónicas ($\times 10^5$, cuentas) del ion MH^+ (m/z 217,1335) de la tetrahydroharmina, obtenidas por LC-ESI(+)-TOF-MS, según diferentes voltajes del capilar y <i>fragmentor</i> usados.	98
Tabla 17. Corrientes iónicas de los iones MH^+ de los alcaloides <i>harmala</i> , obtenidas por LC-ESI(+)-TOF-MS, según diferentes voltajes del <i>fragmentor</i> ($V_{cap} = 1000$ V).	102
Tabla 18. Determinación por LC-ESI(+)-TOF-MS, a diferentes voltajes del <i>fragmentor</i> , de masas exactas de los iones-fragmento, de la harmina y tetrahydroharmina.	104
Tabla 19. Determinación por LC-ESI(+)-TOF-MS de masas exactas de los iones MH^+ , de los alcaloides <i>harmala</i> y N,N-dimetiltriptamina, detectados en la orina de un consumidor de yagé.	108

Tabla 20. Composición elemental y determinación por LC-ESI(+)-TOF-MS de masas exactas de iones moleculares protonados MH^+ de la harmina y sus metabolitos, detectados en la orina de un consumidor de yagé.	110
Tabla 21. Composición elemental y determinación por LC-ESI(+)-TOF-MS de masas exactas de iones moleculares protonados MH^+ de la harmalina y su metabolito harmalol, detectados en la orina de un consumidor de yagé.	112
Tabla 22. Composición elemental y determinación por LC-ESI(+)-TOF-MS de masas exactas de iones moleculares protonados MH^+ de los metabolitos tetrahydroharmol y tetrahydroharmina hidroxilada, detectados en la orina de un consumidor de yagé.....	113
Tabla 23. Composición elemental y determinación por LC-ESI(+)-TOF-MS de masas exactas de iones moleculares protonados MH^+ de la N,N-dimetiltriptamina y su metabolito 5-hidroxi-N,N-dimetiltriptamina, detectados en la orina de un consumidor de yagé.....	115
Tabla 24. Corrientes iónicas de los iones MH^+ , obtenidas por LC-ESI(+)-TOF-MS, de los alcaloides <i>harmala</i> , en función de sus concentraciones.	116
Tabla 25. Contenido de los alcaloides <i>harmala</i> ($\mu\text{g/mL}$), encontrados en orina de consumidores de yagé.....	117

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

APCI	<i>Atmospheric Pressure Chemical Ionization</i> (Ionización química a presión atmosférica).
ca.	<i>Circa</i> (aproximadamente).
CENIVAM	Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinales Tropicales.
CID	<i>Collision-Induced Dissociation</i> (Disociación inducida por colisión)
CROM-MASS	Centro de Cromatografía y de Espectrometría de Masas.
DB-5MS	Columna cromatográfica de 5%-fenil-poli(metilsiloxano).
d _f	Espesor de la fase estacionaria.
D.I.	Diámetro interno.
DMT	N,N-Dimetiltriptamina.
EI	<i>Electron Ionization</i> (Ionización por electrones).
EIC	<i>Extract Ion Current</i> (Corriente iónica extraída).
e.g.	<i>exempli gratia</i> (por ejemplo).
ESI	<i>Electrospray Ionization</i> (Ionización por electronebulización).
et al.	<i>et alii</i> (y otros).
eV	Electrón-Voltio(s).
GC	<i>Gas Chromatography</i> (Cromatografía de gases o Cromatógrafo de gases).
GC-MS	<i>Gas Chromatography-Mass Spectrometry</i> (Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas).
GC-MS/MS	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas tándem.
<i>Harmala</i>	Familia de alcaloides harmina, harmalina, tetrahydroharmina.
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografía líquida de alta eficiencia).

<i>i.e.</i>	<i>id est</i> (es decir, esto es).
ISTD	<i>Internal Standard</i> (Estándar interno).
LC-MS	<i>Liquid Chromatography-Mass Spectrometry</i> (Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas).
LLE	<i>Liquid-Liquid Extraction</i> (Extracción líquido-líquido).
MAO	Enzima monoamino oxidasa.
MRM	<i>Multiple Reaction Monitoring</i> (Monitoreo de reacciones múltiples).
MS	<i>Mass Spectrometry</i> (Espectrometría de masas o Espectrómetro de masas).
MSD	<i>Mass Selective Detector</i> (Detector selectivo de masas).
MSPD	<i>Matrix Solid-Phase Dispersion</i> (Dispersión de la matriz en fase sólida).
<i>m/z</i>	<i>Mass-to-charge ratio</i> (Relación masa/carga).
QqQ	<i>Triple Quadrupole</i> (Triple cuadrupolo).
RDA	Reacción retro-Diels-Alder
SD	<i>Standard Deviation</i> (Desviación estándar).
SIM	<i>Selected Ion Monitoring</i> [Monitoreo de ion(es) seleccionado(s)].
SRM	<i>Selected Reaction Monitoring</i> (Monitoreo de reacción seleccionada).
TIC	<i>Total Ion Current</i> (Corriente iónica total).
THH	Tetrahidroharmina.
TOF-MS	<i>Time-of-flight</i> (Tiempo de vuelo). Analizador de masas de tiempo de vuelo
t_R	Tiempo de retención.
UIS	Universidad Industrial de Santander

RESUMEN

TITULO: ESTUDIO POR TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS Y DE ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE LOS ALCALOIDES HARMALA EN EXTRACTOS DE *Banisteriopsis caapi* Y EN MUESTRAS DE ORINA*.

AUTOR: Cristian Andrés Oliveros**

PALABRAS CLAVE: Yagé, *Banisteriopsis caapi*, alcaloides *harmala*, cromatografía, espectrometría de masas, fluidos fisiológicos (orina).

DESCRIPCIÓN:

En este trabajo de investigación, se aislaron los alcaloides *harmala* de la corteza de *Banisteriopsis caapi*, usando para su extracción, disolventes orgánicos (metanol y cloroformo) y el método de dispersión de la matriz en fase sólida. El estudio de los alcaloides *harmala*, se realizó por las técnicas de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas tándem (GC-QqQ-MS) y cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-ESI(+)-TOF-MS).

Las herramientas usadas para la identificación de los alcaloides *harmala*, fueron los espectros de masas, obtenidos por impacto con electrones (70 eV), electronebulización y, el estudio de las rutas de fragmentación de la harmina y la tetrahydroharmina.

Para maximizar la respuesta de los sistemas de detección de las técnicas GC-QqQ-MS y LC-ESI(+)-TOF-MS, se estudiaron varios parámetros operacionales, *e.g.*, las energías de colisiones activadas y los voltajes del capilar y del *fragmentor*, respectivamente. El conjunto de los valores experimentales encontrados permitió obtener las corrientes iónicas de los alcaloides *harmala* con una sensibilidad requerida para detectarlos en muestras biológicas (*e.g.*, orina).

En el análisis por LC-ESI(+)-TOF-MS de la orina de un consumidor de yagé, se detectaron los alcaloides *harmala*, *i.e.*, harmina, harmalina, tetrahydroharmina, junto con la N,N-dimetiltriptamina; se encontraron también ocho metabolitos de los alcaloides: harmol, harmol glucurónico, harmina hidroxilada, harmina 5-O-glucurónico, harmalol, tetrahydroharmol, tetrahydroharmina hidroxilada y 5-hidroxi-N,N-dimetiltriptamina.

* Trabajo de grado

** Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Directores: Elena Stashenko, Química, Ph.D. y Jairo René Martínez, Químico, Ph.D.

ABSTRACT

TITLE: ANALYSIS BY CHROMATOGRAPHY AND MASS SPECTROMETRY OF HARMALA ALKALOIDS FROM *Banisteriopsis caapi* EXTRACTS AND URINE SAMPLES*

AUTHOR: Cristian Andrés Oliveros **

KEYWORDS: Yagé, *Banisteriopsis caapi*, *harmala* alkaloids, chromatography, mass spectrometry, physiological fluids (urine).

DESCRIPTION:

In this research, the *harmala* alkaloids from the stems of *Banisteriopsis caapi* were extracted using organic solvents (methanol and chloroform) and matrix solid-phase dispersion. The study of *harmala* alkaloids was performed by techniques, such as, gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry (GC-QqQ-MS), and liquid chromatography mass spectrometry (LC-ESI(+)-TOF-MS).

The identification of *harmala* alkaloids was performed using mass spectra obtained by electron impact (70 eV), electrospray, and studying the fragmentation routes of harmine and tetrahydroharmine.

To maximize the response of the detection systems, several operating parameters were investigated, e.g. activated collision energies for GC-QqQ-MS, and capillary and fragmentor voltages for LC-ESI(+)-TOF-MS. All experimental values permitted to have the ionic currents with enough sensitivity to detect *harmala* alkaloids in biological samples (e.g., urine).

In the analysis by LC-ESI(+)-TOF-MS, the alkaloids harmine, harmaline, tetrahydroharmine, N,N-dimethyltryptamine were detected in the urine of a yagé consumer. Additionally, eight metabolites were found: harmol, harmol glucuronide, hydroxylated harmine, harmine 5-O-glucuronide, harmalol, tetrahydroharmol, hydroxylated tetrahydroharmine, and 5-hydroxy-N,N-dimethyltryptamine.

* College thesis

** Science Faculty. School of Chemistry. Directed by Elena Stashenko, Chemist, Ph.D. and Jairo René Martínez, Chemist, Ph.D.

INTRODUCCIÓN

Los productos naturales son sustancias químicas que provienen de los organismos vivos, *i.e.*, plantas, microorganismos, entre otros; algunos poseen actividad biológica y el ser humano los ha usado desde miles de años. Durante ese tiempo, diferentes culturas han podido conocer mediante la experimentación el uso medicinal de plantas y las han habituado en ceremonias o rituales que hacen parte de su forma de organización social. Sin embargo, desde el siglo XIX, generaciones de químicos han utilizado estas fuentes de diversidad molecular como material de partida para obtener nuevos fármacos, teniendo en cuenta que la actividad biológica surge de las interacciones entre los organismos y su ambiente, para generar diversas sustancias químicas que mejoran su supervivencia y competitividad (Firn y Jones, 2003).

En la región del Amazonas, se usa un brebaje especial llamado Yagé, que utiliza en su composición básica dos especies vegetales *Banisteriopsis caapi* - ayahuasca- y *Psychotria viridis* (chacrana); su uso en las culturas indígenas es religioso y medicinal, al cual atribuyen diversas propiedades curativas en lo físico, emocional, afectivo y espiritual (Harner, 1973). Estas aplicaciones medicinales han creado un interés particular en personas que buscan medicinas alternativas, lo que ha generado también un aumento en su consumo urbano.

B. caapi es una especie que hace parte de la familia de las Malpigiáceas, es una liana o enredadera que contiene un grupo de alcaloides β -carbolinas, tipo *harmala*, *i.e.*, harmina, harmalina y tetrahydroharmina, cuyo uso en la farmacéutica se está estudiando desde su aislamiento e identificación (Schultes y Hoffman, 1980) hasta sus propiedades farmacológicas (Patel, 2012). Los alcaloides son sustancias químicas que contienen nitrógeno en su estructura, que en soluciones acuosas, mediante el cambio de pH, se pueden extraer de matrices complejas, *e.g.*, material vegetal, fluidos fisiológicos, *etc.*

En el presente trabajo, se realizó el estudio de los alcaloides *harmala* por las técnicas instrumentales de cromatografía y espectrometría de masas, GC-MS, GC-MS/MS y LC-MS.

Las siguientes matrices se usaron para realizar la preparación de la muestra: (1) los tallos de *B. caapi* y (2) la muestra de orina de un consumidor urbano de yagé; los alcaloides se obtuvieron por las técnicas de extracción con disolventes orgánicos y extracción por dispersión de la matriz en fase sólida.

El análisis por GC-MS permitió identificar los alcaloides *harmala* por comparación de sus espectros de masas con los reportados en la base de datos NIST.

El análisis por GC-MS/MS, se realizó en un equipo con analizador de triple cuadrupolo (QqQ-MS) y se estudiaron los siguientes modos de adquisición: barrido completo, monitoreo de ion seleccionado, espectros de iones-producto e iones-precursor, y monitoreo de reacciones múltiples (MRM). Se analizaron los parámetros de resolución QqQ para las transiciones de los iones 216 → 201 y 212 → 197, y las energías de colisiones activadas (CID); también, las rutas de fragmentación debidas al parentesco entre algunos iones-producto e iones-precursor, y se analizaron los espectros de masas de los análogos deuterados de harmina y tetrahydroharmina.

El análisis por LC-MS, se realizó en un equipo con analizador de masas de alta resolución (r-TOF-MS), con interface de electronebulización (ESI⁺), con adquisición de datos en modo positivo. Se estudió el efecto de voltajes del capilar y del *fragmentor* sobre la eficiencia de ionización de alcaloides *harmala*. En el extracto vegetal, se identificaron los alcaloides *harmala*, con base en sus masas exactas y se determinó la composición elemental de algunos iones-fragmento. La muestra de orina reveló la presencia de harmina, harmalina, tetrahydroharmina y N,N-dimetiltriptamina, junto con sus metabolitos, harmol, harmol glucurónico,

harmina hidroxilada, harmina-5-O-glucurónido, harmalol, tetrahidroharmol, tetrahidroharmina hidroxilada y 5-hidroxi-N,N-dimetiltriptamina, respectivamente.

Los resultados parciales de este trabajo de investigación se presentaron en el XV Congreso Latinoamericano de Cromatografía y Técnicas Afines COLACRO y VII Congreso Colombiano de Cromatografía COCOCRO (Cartagena, del 29 de septiembre al 3 de octubre de 2014), en dos trabajos titulados “Comparación en la cantidad relativa de los alcaloides *harmala* obtenidos por las técnicas de extracción con disolventes y dispersión de la matriz en fase sólida (MSPD)” y “Optimización de parámetros instrumentales de cromatografía líquida (LC-ESI+TOF-MS) y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas tándem (GC-QqQ-MS) para el análisis de β -carbolinas (alcaloides *harmala*)”, en la sección de Química Forense. Ambos trabajos se presentaron también en el Primer Simposio Internacional en Biotecnología y Agroindustria, realizado en la Universidad Industrial de Santander (Bucaramanga, 11 y 12 de diciembre de 2014).

2. MARCO TEÓRICO

2.1. *BANISTERIOPSIS CAAPI*

La especie vegetal *Banisteriopsis caapi* es endémica de la región suramericana, se encuentra distribuida en los ecosistemas de bosque húmedo tropical por toda la región de la selva amazónica en Brasil, Bolivia, Colombia, Ecuador, Perú, la región del Orinoco en Venezuela y la Costa Pacífica de Colombia y Ecuador. Dependiendo de la zona geográfica, la especie tiene diferentes nombres, e.g., “Ayahuasca”, “Caapi”, “Pildé”, “Yajé”, “Yagé”, “Natema”, “Dapa” y “Oofa”. Esta planta es esencial en la preparación del brebaje, conocido también como ayahuasca o yagé, que se usa por las culturas indígenas, que pueblan la zona, por sus propiedades medicinales, y al cual se adicionan también otras especies vegetales (Schultes, 1970).

Figura 1. Partes aéreas de *Banisteriopsis caapi*, hojas y liana. Fotografía tomada por el autor en el jardín botánico del Laboratorio de Cromatografía y Espectrometría de Masas CROM–MASS, UIS – Bucaramanga, el 16 de julio de 2014.



Es un bejuco leñoso de largos tallos sarmentosos bastante volubles (**Figura 1**), entrenudos distanciados; hojas opuestas, pecioladas enteras, ovado-lanceoladas con base redondeada y ápice largamente cuspidado; inflorescencias terminales y axiales cimoso-paniculadas, flores dispuestas en pequeñas umbelas, pétalos rosados sub-orbitulares u ovals (García-Barriga, 1992).

B. caapi crece en ambientes húmedos y bajo sombra; difícilmente florece por fuera de su zona de origen; su clasificación botánica se muestra en la **Tabla 1** (Herbario Nacional, No. COL. 580469, Universidad Nacional de Colombia, 2014).

Tabla 1. Identificación taxonómica de la especie *B. caapi*.

Generalidades	
Reino	Plantae
Phylum	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Polygalales
Familia	Malpighiaceae
Género	<i>Banisteriopsis</i>
Epíteto específico	<i>caapi</i>
Autor epíteto específico	(Spruce ex Griseb.) C.V. Morton
Colector	Oliveros, C. A.
Determinador	Rivera-Díaz, O.

2.1.1. Consumo del brebaje de yagé y análogos

El brebaje del yagé se prepara a partir de *B. caapi*, que contiene alcaloides *harmala* y de otras especies de plantas que aportan el alcaloide N,N-dimetiltriptamina (DMT) o sus derivados.

El método de preparación e ingesta, históricamente, han sido dirigidos, en cada cultura indígena, por chamanes especializados en el conocimiento botánico empírico de las plantas; según el carácter de la ceremonia o toma, el chamán puede agregar a la mezcla original otras especies vegetales con el propósito de potencializar algunos efectos específicos.

El consumo urbano de yagé como medicina alternativa viene en aumento, se realiza en sincretismos religiosos (*Santo Daime* y *Uniao do Vegetal*) en Brasil y en sesiones grupales de terapia psicodélica, asistida por médicos tradicionales, en diferentes ciudades de América del Sur (McIlhenny *et al.*, 2009). En Colombia, esta práctica se realiza en algunas ciudades (Vélez y Pérez, 2004).

La ingesta de yagé cataliza procesos neurobiológicos y psicológicos, que pueden apoyar la recuperación de la dependencia de drogas y la prevención del síndrome de abstinencia o recaída. Un estudio cualitativo, realizado por Loizaga-Velder y Verres (2014), en Colombia, Ecuador, Brasil, Perú, México y Argentina, concluye que la toma del brebaje del yagé, en entornos cuidadosamente estructurados, puede servir como una herramienta terapéutica eficaz para el tratamiento de adicciones o drogodependencia, sobre todo, en personas que participan regularmente en los rituales, tanto religiosos como urbanos. Sin embargo, dado el contexto de explotación económica y lucro, los autores advierten sobre posibles casos de “charlatanes” o “falsos ayahuasqueros”, cuyo brebaje es dudoso y no seguro, ya que puede contener aditivos tóxicos o peligrosos; lo que exige la regulación y profesionalización de la práctica ancestral. Además, la internacionalización de los beneficios de la ayahuasca requiere una cuidadosa adaptación de los rituales en diferentes entornos culturales debido al pensamiento y la cosmovisión propia de cada cultura.

Por otra parte, existe otro tipo de ingesta, conocida como “anahuasca” o “farmahuasca” (Brierley y Davidson, 2012), que consiste en el consumo de

bebidas o pastillas, que contienen los mismos compuestos químicos del brebaje tradicional, pero provenientes de fuentes de origen sintético o de otras especies de plantas, cuyo propósito pasa del ámbito de medicina alternativa a situaciones de consumo recreacional.

2.2. ALCALOIDES

Los alcaloides junto con terpenoides, derivados fenólicos, glucósidos, entre otros, pertenecen al grupo de los productos naturales; son metabolitos secundarios de las plantas que se producen o sintetizan con propósitos diferentes como mecanismo de adaptación a los cambios ambientales (temperatura, humedad) o para la supervivencia, como respuestas químicas a la presencia de otras plantas o al ataque de herbívoros (Stashenko, 2011a).

Un alcaloide es un compuesto orgánico de origen natural o sintético, generalmente vegetal, nitrogenado (el nitrógeno se encuentra usualmente intracíclico), derivado de aminoácidos, de carácter más o menos básico, de distribución restringida, con propiedades farmacológicas importantes a dosis bajas y que responde a reacciones comunes de precipitación (Evans, 2000).

Los alcaloides, en su estado natural, son sustancias presentes en todos los órganos de la planta, pueden encontrarse en cantidad más alta en hojas (e.g., cocaína, nicotina), en flores (escopolamina, atropina), en frutos (alcaloides del opio), en semillas (piperina), en corteza (harmina, quinina) y en la raíz (emetina y cefalina) (Arango, 2008). En cuanto a su naturaleza química, los alcaloides tienen masas moleculares entre 100 y 900 Da, son generalmente incoloros, sólidos a temperatura ambiente y presentan carácter básico; son poco solubles en agua.

Los alcaloides *harmala* son sustancias químicas derivadas de la β -carbolina (**Figura 2**). Su estructura consta de piridina, que está unida a un anillo de indol; en

la piridina son posibles diferentes niveles de saturación. La β -carbolina es similar a la triptamina, con la cadena de etilamina conectada al anillo de indol a través de un átomo de carbono adicional, para producir una estructura de tres anillos. Se supone, que la biosíntesis de β -carbolina sigue la ruta de los análogos de triptamina. Algunas propiedades fisicoquímicas de los alcaloides *harmala* se resumen en la **Tabla 2**.

Figura 2. Las estructuras de: **A.** β -Carbolina ($C_{11}H_8N_2$) y **B.** Triptamina ($C_{10}H_{12}N_2$)

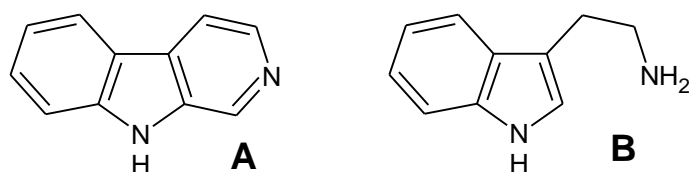


Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas de los alcaloides *harmala*.

	Harmina	Harmalina	Tetrahydroharmina
Estructura			
Nombre	7-Metoxi-1-metil-9-H-pirido [3,4-b]indol	3,4-Dihidro-7-metoxi-1-metil- β -carbolina	7-Metoxi-1-metil-1,2,3,4-tetrahidro- β -carbolina
Fórmula molecular	$C_{13}H_{12}N_2O$	$C_{13}H_{14}N_2O$	$C_{13}H_{16}N_2O$
Peso molecular, g/mol	212	214	216
Punto de fusión, °C	262-264	232-234	187-190
pK_a	7,7	9,8	-
Solubilidad	Insoluble en agua básica. Ligeramente soluble en agua. Soluble en acetona, cloroformo, etanol y éter etílico	Ligeramente soluble en agua básica, agua, etanol y éter etílico. Soluble en cloroformo y piridina.	Ligeramente soluble en agua. Soluble en cloroformo, etanol, metanol y acetato de etilo.
Clorhidrato	Soluble en agua. Insoluble en agua saturada con sal.	Soluble en agua. Insoluble en agua saturada con sal.	-

El componente mayoritario en *B. caapi* es la harmina (7-metoxi-1-metil-9H-pirido [3,4-b] indol), que se aisló por primera vez en 1847 de semillas de *Peganum harmala*. Harmina se usa como aditivo en los preparativos rituales y como medicina en el Medio Oriente, Asia Central y América del Sur; se encuentra distribuido en la naturaleza en diversas plantas, e.g., *B. caapi*, *P. harmala* y *Passiflora incarnata*, animales marinos, insectos, mamíferos, tejidos humanos y fluidos corporales. Su actividad biológica está asociada a la potenciación de las vías monoaminérgicas a través de la inhibición de la enzima monoamino oxidasa MAO-A o MAO-B, mediante el bloqueo de los sitios de recaptación y activación directa de los receptores de monoamina (Patel, 2012). Sus propiedades farmacológicas incluyen: actividades antiplaquetaria, antiplasmodial, antimutagénica, antígenotóxica y antioxidante; además, es un agente antidiabético (Fortunato *et. al.*, 2010, Riba *et. al.*, 2003).

2.3. TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN

2.3.1. Obtención de extractos

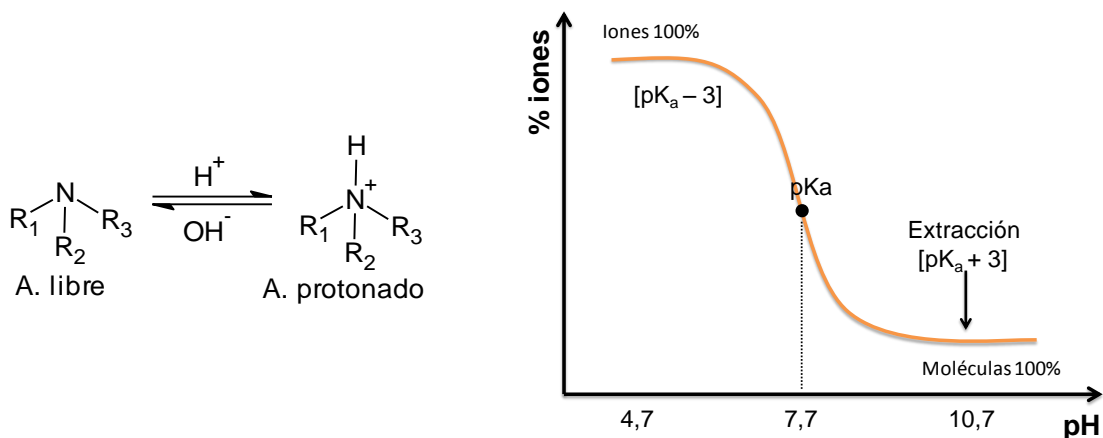
Un extracto vegetal es una mezcla compleja de sustancias químicas de alto, medio y bajo peso molecular, que provienen del metabolismo secundario de plantas y que se obtiene por extracción con diferentes disolventes o con fluido supercrítico (e.g., con CO₂). Los extractos vegetales pueden ser concretos o absolutos. Un extracto concreto se obtiene con un disolvente no polar, e.g., pentano, hexano, éter de petróleo, tolueno, *etc.*, y su posterior evaporación a presión reducida. El concreto, se puede disolver luego en etanol a temperatura ambiente o, como máximo, a 40-50 °C, en donde quedará una parte insoluble en el etanol, denominada resinoide. La parte soluble, después de que se separan por filtración resinoides, puede ser evaporada, para eliminarle el etanol, -siempre a baja temperatura y con reducción de presión-, y lo que queda se denomina absoluto (Bandoni, 2000).

Dado que el interés de la investigación se enfoca en tres analitos en particular, *i.e.*, harmina, harmalina y tetrahydroharmina, y que un extracto contiene una cantidad considerable de otros componentes químicos, se debe escoger la técnica de extracción más eficiente y, sobre todo, más selectiva. Para ello, se consideran los siguientes factores: (1) la naturaleza de la matriz y del analito a aislar (propiedades físicas y químicas); (2) el propósito del análisis, *i.e.*, cualitativo o cuantitativo; (3) la necesidad de confirmación de la estructura química del analito (identificación por técnicas espectroscópicas) y (4) el tiempo que se tiene para realizar el análisis (Stashenko y Martínez, 2011b).

2.3.2. Extracción con disolventes orgánicos

Los alcaloides *harmala* son compuestos de carácter básico, lo que se aprovecha para su extracción a pH básicos; su solubilidad en los diferentes disolventes varía según su naturaleza química y en función del pH, es decir, según su estado de alcaloide libre o protonado (**Figura 3**).

Figura 3. Alcaloides en forma libre y protonada, según la variación del pH. Para la harmina ($pK_a = 7.7$), la extracción más eficiente será a $pH = 10.7$.



En forma libre, los alcaloides se pueden extraer a pH de 2 a 3 unidades por encima de su valor pK_a , con un disolvente orgánico no polar o medianamente polar, *i.e.*, diclorometano, éter etílico, cloroformo. En su forma protonada, los alcaloides se pueden extraer a pH de 2 a 3 unidades por debajo de su valor pK_a con un disolvente polar, *i.e.*, agua, soluciones acuosas ácidas e hidroalcohólicas.

Usando métodos extractivos, el aislamiento de los analitos se hace con base en: (1) la solubilidad de estos en disolventes orgánicos; (2) su capacidad de adsorción o absorción sobre un sorbente (gel de sílice, alúmina, etc.) o en un polímero poroso (polidimetilsiloxano, resinas sintéticas, etc.). La extracción con disolventes separa uno o más componentes de una fase sólida o líquida, mediante la utilización de una fase líquida o disolvente. Los métodos más usados son extracción líquido-líquido (LLE), en fase sólida (SPE) y micro-extracción en fase sólida (SPME) (Stashenko y Martínez, 2011b).

Según la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC), la extracción con disolventes orgánicos (LLE) se define como “el proceso de transferencia de una sustancia disuelta de una fase líquida a otra fase líquida (inmiscible o parcialmente miscible) en contacto con ella”. Esta técnica de extracción, basado en el principio químico de solubilidad y escogiendo el disolvente adecuado, es eficiente para obtener analitos en cantidades incluso a nivel de trazas. Aunque posee la desventaja de usar grandes volúmenes de disolvente para su extracción, LLE es un método muy común y que cuenta con más de un siglo de uso (Clement y Hao, 2012).

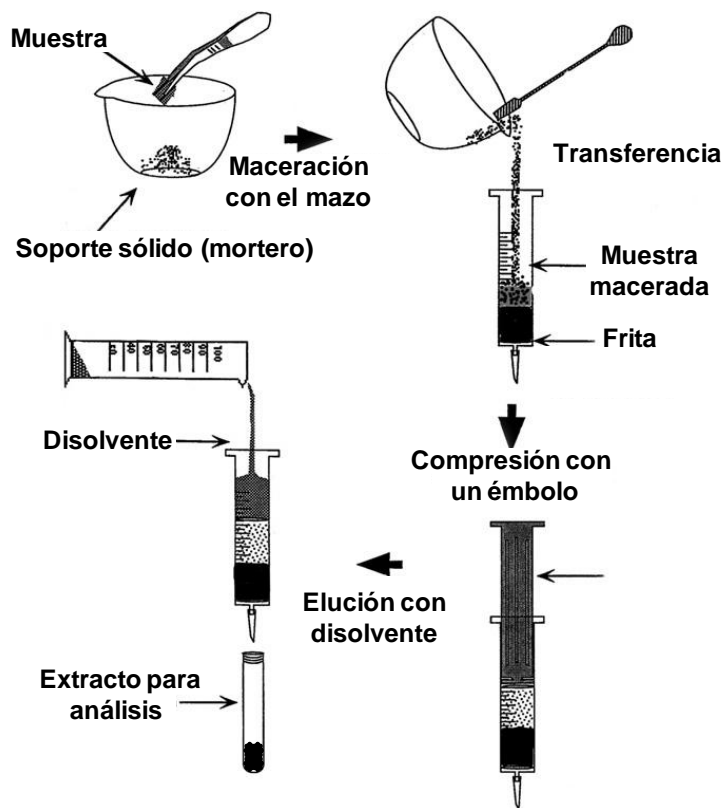
2.3.3. Extracción por dispersión de la matriz en fase sólida

Esta técnica es relativamente nueva, patentada por Barker y Long en 1993, pero ya ha demostrado ser muy eficaz para aislar una amplia gama de medicamentos, contaminantes ambientales, productos naturales y componentes biológicos

complejos (Barker, 2007). Su simplicidad y flexibilidad han contribuido a reemplazar métodos de extracción “clásicos” como, por ejemplo, la extracción con disolventes orgánicos.

En la extracción por MSPD, la muestra de interés se mezcla con un adsorbente (e.g., sílice, alúmina, florisil, sílice modificada con C₁₈), en un mortero de vidrio o ágata, después, la mezcla homogénea se envasa en una columna, en la cual los analitos se eluyen con uno o varios disolventes. Para finalizar, el extracto obtenido se concentra hasta sequedad (**Figura 4**). En caso de realizar la cuantificación, el estándar interno puede añadirse durante o antes del proceso de maceración. Para la extracción de alcaloides, es posible añadir en el mortero alguna sal inorgánica, por ejemplo, el bicarbonato de sodio, para facilitar su extracción (Barker, 2007).

Figura 4. Esquema general de la técnica de extracción por dispersión de la matriz en fase sólida. Tomado de: Barker, 2007.



Los siguientes son parámetros, que se deben considerar en esta técnica analítica, entre otros: 1) el efecto del tamaño de partícula del agente dispersante; 2) la polaridad del agente dispersante; 3) la relación de la cantidad de muestra con la del agente dispersante; la mayoría de veces esta relación es de 1 a 4 y depende de la aplicación, por ello, la relación debe ser examinada como una variable importante durante el desarrollo del método; 4) la modificación química de la matriz; la adición de agentes modificadores, ácidos, bases, quelantes, *etc.*, que pueden afectar la distribución y la elución de los analitos de interés de la muestra; 5) la elección de los disolventes y la secuencia de elución, que permite hacer limpieza previa para eliminar interferencias y facilitan el aislamiento de los analitos; 6) el volumen de elución, que también debe evaluarse para reducir la cantidad del disolvente al mínimo (Barker, 2007).

2.4. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

La preparación de la muestra es un procedimiento que incluye etapas de muestreo, extracción, limpieza, concentración y, en algunas ocasiones, requiere la derivatización de analitos; su objetivo es aislar preferiblemente solo aquellas sustancias que son “compatibles” con la técnica analítica a usar, *e.g.*, GC o GC-MS. Las sustancias termolábiles o de alto peso molecular, *e.g.*, proteínas, polímeros, glucósidos, *etc.*, compuestos muy polares (aminoácidos, azúcares, *etc.*), el agua y las sales orgánicas e inorgánicas, no son aptos para el análisis por GC (Stashenko y Martínez, 2011b).

En el presente trabajo, las siguientes matrices se usaron para realizar la preparación de la muestra: (1) los tallos de *B. caapi* y (2) la muestra de orina de un consumidor urbano de yagé. La orina es un desecho metabólico del organismo, su estado físico es líquido; su obtención no es invasiva, es una matriz que tiene pocas interferencias presentes (proteína, grasa) y posee la droga o sus metabolitos en concentraciones relativamente altas (Stashenko y Martínez, 2012).

2.5. TÉCNICAS ANALÍTICAS INSTRUMENTALES

La cadena analítica para identificar y cuantificar, por ejemplo, los alcaloides *harmala* presentes en una matriz vegetal, consta de los siguientes pasos: (1) muestreo; (2) preparación de la muestra; (3) separación, por regla general, por cromatografía; (4) detección, que puede ser por técnicas espectroscópicas; (5) análisis de datos y su interpretación (Stashenko y Martínez, 2011b). La cromatografía de gases o de líquidos acoplada a espectrometría de masas es un método más usado para la cuantificación e identificación de metabolitos secundarios aislados de plantas.

2.5.1. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

La cromatografía de gases es una técnica instrumental que permite separar las mezclas en sus constituyentes y cuantificarlos por medio de diversos sistemas de detección. GC sucede en tres pasos básicos: (1) inyección; (2) separación y (3) detección. El sistema de inyección sirve para volatilizar la mezcla; puede llevarse a cabo en modo directo (*on-column*), con división de muestra (*split*) o sin división de muestra (*splitless*). Para compuestos presentes a nivel de trazas, por ejemplo, analitos en fluidos fisiológicos, el modo de inyección recomendado es *splitless* (Stashenko y Martínez, 2012).

La separación ocurre en una columna cromatográfica. Actualmente, se usan columnas capilares, que son tubos abiertos largos (25-60 m) de sílice fundida, cuya pared interna se reviste con una delgada capa de un polímero denominado fase estacionaria. En el orificio del capilar, se introduce bajo presión un gas inerte (helio, hidrógeno o nitrógeno), que es la fase móvil o gas portador.

La detección ocurre por un dispositivo que genera una señal eléctrica, cuando ingresan en él las moléculas diferentes del gas portador. El gráfico de esta señal

eléctrica, en función del tiempo, se llama cromatograma. Cada pico cromatográfico representa idealmente una sola sustancia (si no hay coelución, es decir, dos componentes detectados en un mismo tiempo); el área del pico es proporcional a la cantidad del componente presente en la mezcla.

La cromatografía de gases acoplada (por medio de una interface) a espectrometría de masas, GC-MS, es una técnica que permite separar la mezcla en sus constituyentes, cuantificarlos e identificar sus estructuras. Los componentes separados en la columna ingresan, uno por uno, a la cámara de ionización del espectrómetro de masas. En la cámara de ionización, las moléculas colisionan con electrones de alta energía (70 eV) y a presión muy reducida (10^{-5} – 10^{-6} torr); sucede su ionización por pérdida de un electrón. La masa del electrón es despreciable con respecto a la masa de la molécula, por tanto, la molécula ionizada posee masa igual a la de la molécula neutra y se denomina ion molecular.

El ion molecular es una característica distintiva para determinar la estructura química de la molécula. Sin embargo, en el proceso de ionización una gran cantidad de moléculas ionizadas, con exceso de energía interna, se fragmentan o disocian, descomponiéndose en iones-fragmento con diferentes estructuras y masas, siendo éstas, partes constituyentes de la molécula misma. El conjunto de iones-fragmento e ion molecular conforman el espectro de masas y la forma cómo se fragmenta o disocia la molécula ionizada se denomina “patrón de fragmentación”, que es la base para identificar la estructura química (Stashenko y Martínez, 2012).

2.5.2. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas *tándem*

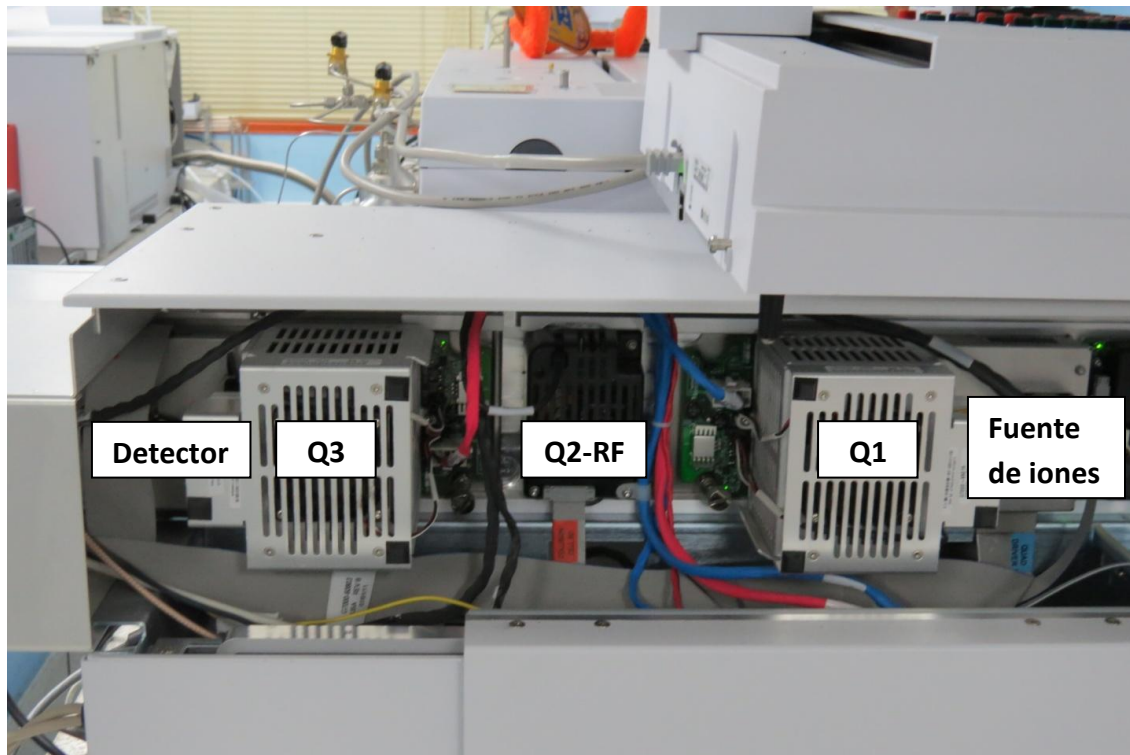
La espectrometría de masas *tándem*, MS/MS, involucra dos etapas de análisis de masas de iones separadas por una reacción de disociación, activada o inducida,

de iones. Ésta sucede entre la medición de m/z antes y después de la fragmentación de los iones, seleccionados en la primera etapa, provocada por la colisión del ion seleccionado con moléculas de gas inerte (He, Ar, Xe o N₂, a presión de 0,1-0,3 Pa); se aplica el potencial acelerador de un campo electrostático, en una celda de “activación”, en donde ocurren colisiones activadas o inducidas.

Los sistemas de masas *tándem* se dividen en dos grupos: (1) *tándem en tiempo*, e.g., trampas de iones lineales y cuadrupolares, trampas orbitales (*orbitrap*), etc.; (2) *tándem en espacio*, e.g., triple cuadrupolo (QqQ), configuraciones híbridas, e.g., cuadrupolo-tiempo de vuelo (Q-TOF), etc. En el primer grupo, es posible el estudio de iones-producto, es decir, la cascada de reacciones de disociación (iones-fragmento) permite el registro sucesivo de iones-hijo, iones-nieto, iones-bisnieto, iones-tataraniето, etc., hasta (MS)ⁿ. En el segundo grupo, no solo es posible el estudio de iones-producto, sino también de los iones-precursores, de las reacciones (transiciones) entre dos iones relacionados (“padre-hijo”) o el monitoreo de la pérdida de un fragmento neutro, entre otras posibilidades. Para el estudio de los alcaloides *harmala*, el sistema *tándem*, que se utilizó en este trabajo, fue el de cromatografía de gases acoplada a detector de espectrometría de masas con un analizador de triple cuadrupolo (GC-QqQ-MS) (**Figura 5**).

El primer cuadrupolo (analizador de masas MS1, Q1) y el tercer cuadrupolo (analizador de masas MS2, Q3) funcionan como analizadores másicos cuadrupolares tradicionales en modos de barrido completo (*full scan*) o de monitoreo de ion seleccionado (SIM), en formas independientes o enlazadas (*linked*). El segundo cuadrupolo (Q2 o q) tiene entrada de un gas inerte (He, Ar o N₂), funciona como una cámara (celda) de colisiones activadas y no hace barridos (*scan*), ya que solo se mantiene en modo de radio frecuencia (*RF-mode*) y permite guiar los iones (transmitir) del analizador Q1 al analizador Q3, con o sin un potencial aplicado.

Figura 5. Aspecto externo de la ubicación de los tres cuadrupolos. Fotografía tomada por el autor en el Laboratorio de Cromatografía y Espectrometría de Masas CROM–MASS, UIS – Bucaramanga, el 17 de octubre de 2014.



La configuración de triple cuadrupolo posee una variedad de experimentos y modos de adquisición de corrientes iónicas, cada uno aporta determinada información. Según el modo de adquisición, el analizador QqQ puede funcionar como un detector universal, un detector selectivo o un detector específico. El modo de adquisición de barrido completo (*full scan*) funciona como un detector universal; el modo de barrido de ion(es) seleccionado(s) (*SIM*) funciona como un detector selectivo; los modos de barrido de ion-producto (*product ion*), de ion-precursor (*parent ion*), de fragmento neutro (*constant neutral loss scan*) o el monitoreo de reacciones múltiples (*multiple reaction monitoring*) funcionan como detectores específicos.

Estos últimos modos de adquisición, facilitan también la elucidación de estructuras químicas, permiten determinar las rutas de fragmentación, la relación “parentesca” entre los iones, y sobre todo, permiten realizar análisis extremadamente selectivo (específico) y sensible (a nivel de *ppt*) de mezclas sumamente complejas, biológicas, ambientales, de alimentos o extractos naturales, entre otros (Stashenko y Martínez, 2010). A continuación, se describen cada uno de los posibles modos de adquisición del equipo QqQ.

2.5.2.1. Barrido completo (*Full scan*)

El primer analizador MS1 (Q1) hace un barrido completo y registra espectros de masas de cada uno de los analitos que emergen de la columna GC, que se ionizan y se fragmentan en iones moleculares y sus diferentes iones-producto. Los cuadrupolos Q2 (q) y Q3 (analizador de masas MS2) operan solo en modo de transmisión de iones. Este modo de adquisición funciona como un cuadrupolo sencillo, es decir, como un detector unidimensional.

2.5.2.2. Barrido de ion(es) seleccionado(s) (*Selected Ion Monitoring*)

El primer analizador MS1 (Q1) solo deja pasar un ion o varios iones seleccionados (usualmente, 2-3), típicos o característicos del analito-*target*, que se busca selectivamente en una mezcla compleja. Los otros dos cuadrupolos, Q2 (q, *RF mode*) y Q3 (MS2), solo transmiten iones filtrados por el MS1 (Q1). Con base en las corrientes iónicas parciales registradas, se construye el fragmentograma de masas.

Este modo de adquisición tiene la ventaja de determinar analitos en cantidades de trazas, debido a que los iones seleccionados se miden más prolongadamente, lo que disminuye el ruido químico (aumenta la relación S/N). Además, permite una cuantificación sensible; durante el análisis, deben coincidir los tiempos de

retención del compuesto-*target* y del compuesto-patrón certificado (material de referencia) y la relación de abundancias de iones seleccionados en sus respectivos fragmentogramas; también, se pueden registrar familias de compuestos monitoreando sus iones característicos. Este modo de adquisición funciona también como un cuadrupolo sencillo, es decir, como un detector unidimensional (Stashenko y Martínez, 2010).

2.5.2.3. Barrido del ion-fragmento (*Product-Ion Scan*)

En el primer analizador MS1 (Q1) operado en modo del monitoreo de ion seleccionado, SIM, se selecciona un ion-precursor (ion-padre). El ion-padre escogido en el MS1 (Q1), se dirige a la cámara de colisiones activadas (q), que opera con la radiofrecuencia aplicada (*RF-mode*) y permite transmitir los iones-fragmento al analizador MS2 (Q3). El gas de colisión suministrado a la celda (generalmente, He, Ar o N₂), por medio de choques con los iones, seleccionados por el MS1 (Q1), les proporciona la energía adicional (proceso de excitación de iones). El potencial aplicado en Q2 (q) permite acelerar los iones y convertir parte de su energía cinética en energía interna adicional (rotacional, vibracional y electrónica). El incremento de la energía interna de los iones conduce a su disociación y a la formación de diversos iones-fragmento (iones-producto), que se dirigen luego al segundo analizador de masas (MS2, Q3).

En el analizador Q3, se hace el barrido completo (*scan*) de los componentes U y V de las corrientes directa y alterna, a partir de las masas (*m/z*) menores que la masa del ion-padre seleccionado, ya que los iones-producto, evidentemente, pesan menos que sus precursores. En un espectro de masas de iones-producto, las señales observadas carecerán de sus acompañantes isotópicos.

2.5.2.4. Barrido del ion-precursor (*Parent-Ion Scan*)

El primer cuadrupolo (MS1, Q1) opera en el modo de barrido completo (*scan*), mientras que el tercer cuadrupolo (MS2, Q3) trabaja en el régimen de monitoreo de ion seleccionado (SIM). Este ion seleccionado, es el ion-producto (*daughter-ion*), cuyos precursores, precisamente, se buscan.

Técnicamente, esto se lleva a cabo así: en el analizador MS2 (Q3), solo se filtran iones-producto seleccionados, con una masa determinada, mientras que en el primer analizador, MS1 (Q1), se hace el barrido de todos los iones (*scan*) desde m/z del ion-producto hasta m/z del ion molecular (más 30-50 unidades); estos iones, provenientes del analizador de masas MS1 (Q1), atraviesan la cámara de colisiones activadas, Q2 (q), en donde se fragmentan, generando, entre otros, los iones-producto de interés, que se filtran luego en el analizador MS2 (Q3), operado en el modo (SIM); por medio de un software especializado, se reconstruyen los valores m/z e intensidades de aquellos iones-precusores, que -al fragmentarse-, producen iones-producto de interés.

El analizador de masas QqQ, operado en modo de barrido de iones-precusores, se convierte en un analizador cromatográfico selectivo (Stashenko y Martínez, 2010).

2.5.2.5. Monitoreo de reacción múltiple (*Multiple Reaction Monitoring*)

Cuando la adquisición de la corriente iónica se hace en el modo SIM, la probabilidad de que un ion seleccionado y una señal procedente del fondo (ruido químico) coincidan, no es nula; esto baja no solo la sensibilidad, sino la confiabilidad en la detección de sustancias: pueden presentarse falsos positivos o falsos negativos.

En el modo de MRM, el primer analizador MS1 (Q1), operado en modo SIM, filtra los iones-precursores seleccionados, F_1 , mientras que por el segundo analizador MS2 (Q3), pasan solo los iones-producto, F_2 , de la reacción de disociación $F_1 \rightarrow F_2$; el analizador MS2 (Q3) opera también en modo SIM. Ambos iones, F_1 y F_2 , deben ser “genéticamente” relacionados (padre-hijo), estables y, por lo general, de intensidad mediana o alta en el espectro de masas del analito.

El monitoreo de la reacción de transición de iones precursor e hijo (ion-producto), MRM, anula, casi completamente, la probabilidad de coincidencias de señales del analito con los del fondo (*chemical background*), además, se eleva el valor de S/N. Típicamente, el registro de dos transiciones independientes, junto con los valores de la retención cromatográfica (t_R), permiten confirmar, inequívocamente, la presencia de un analito-*target* en una mezcla compleja (Stashenko y Martínez, 2010).

Por tanto, el modo de adquisición MRM convierte el detector de masas de GC en un detector específico, es decir, altamente selectivo y sensible.

2.5.2.6. Barrido de fragmento neutro (*Neutral Loss Scan*)

En este modo de adquisición, ambos analizadores de masas, MS1 (Q1) y MS2 (Q3) operan en modo de barrido (*scan*) simultáneo y enlazado (*linked*). Sin embargo, el barrido de masas en MS1 (Q1) y MS2 (Q3) se hace para iones con una diferencia de masa (desplazamiento) fija, que corresponde a la masa de un fragmento (pérdida) neutro seleccionado. Si los iones $f_1, f_2, f_3, f_4, \text{etc.}$, pasan por el primer analizador MS1 (Q1) y luego atraviesan la cámara de colisiones activadas, Q2 (q), y experimentan fragmentaciones, por el analizador MS2 (Q3) solo pasarán aquellos iones con la diferencia másica Δm preestablecida fija, es decir, $(f_1 - \Delta m)$, $(f_2 - \Delta m)$, $(f_3 - \Delta m)$, $(f_4 - \Delta m)$, *etc.* (Stashenko y Martínez, 2010).

2.5.3. Cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas

En la cromatografía líquida, la fase móvil es un líquido (disolvente orgánico), que circula dentro de la columna a una presión de entrada muy alta, permitiendo separar componentes en las mezclas complejas. La fase móvil puede ser: (1) de elución isocrática, cuando no se cambia su composición; (2) de elución con gradiente, que utiliza la mezcla de dos o más disolventes diferentes, de manera que la composición de la fase móvil sí varía con el tiempo.

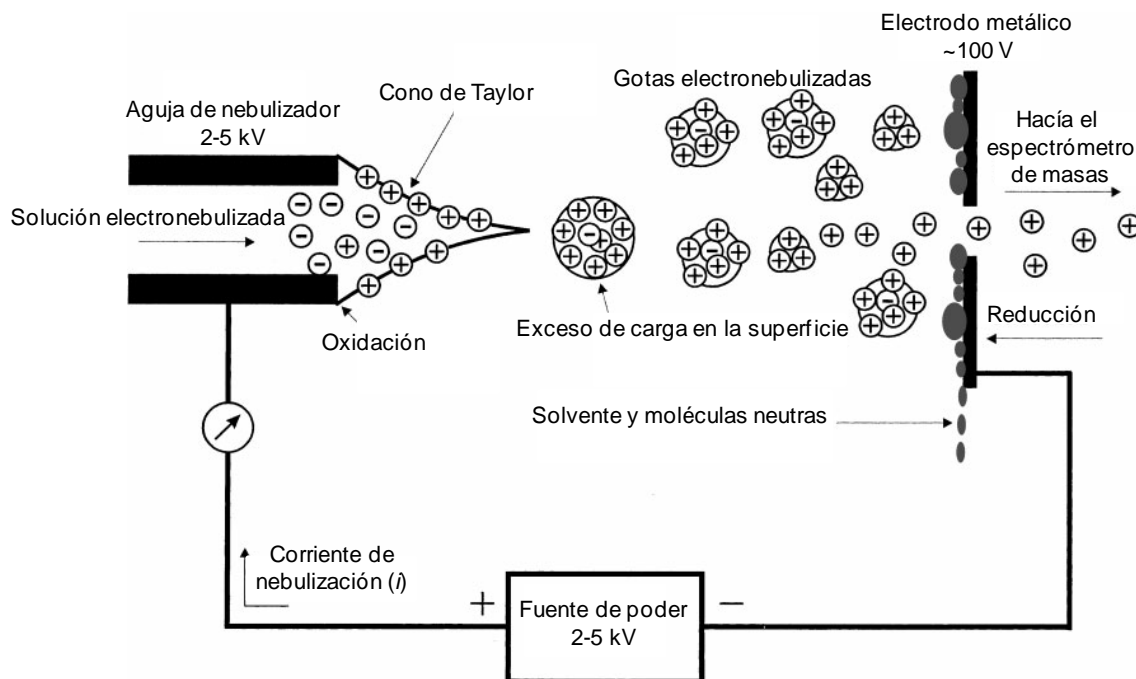
La cromatografía líquida puede llevarse a cabo en fase normal o en fase reversa. En fase normal, la fase estacionaria es más polar que la fase móvil, es decir, los enlaces en la fase estacionaria presentan momentos dipolares mayores que los enlaces de las moléculas del disolvente, y pueden ser de dos tipos de polímero, por ejemplo, de óxido de silicio hidratado (gel de sílice) y de óxido de aluminio hidratado (alúmina). En fase reversa, la fase estacionaria es menos polar que la fase móvil. La fase estacionaria más común está formada por grupos no polares unidos a la sílice como $-\text{CH}_3$, $-\text{C}_8\text{H}_{17}$, $-\text{C}_{18}\text{H}_{37}$, esta última conocida por las abreviaturas ODS y C18. Otro tipo de fase estacionaria está compuesta de partículas esféricas de polímero orgánico de poliestireno y divinilbenceno conocida por las abreviaturas PE/DVB (Rubinson y Rubinson, 2000). Para análisis de alcaloides *harmala* se recomienda el uso de columnas en fase reversa C18 y fase móvil, de elución en gradiente (Beyer *et. al.*, 2009, Zhao *et. al.*, 2012).

En la interfase (*ESI, Electrospray*), una solución diluida de analitos se bombea a través de un capilar, a una velocidad de flujo muy baja (0,1-10 mL/min); en la interfase, donde ocurre la electronebulización, se aplica un voltaje muy alto (1-6 kV). Dependiendo de la naturaleza química de los analitos, el voltaje puede ser positivo o negativo. El voltaje aplicado proporciona el gradiente de campo eléctrico requerido para producir la separación de cargas en la superficie del líquido,

haciendo que sobresalga de la punta capilar en lo que se conoce como “cono de Taylor” (**Figura 6**). Cuando la solución en el cono alcanza el límite de Rayleigh, es cuando el punto en el que la repulsión coulombica de carga en la superficie es igual a la tensión superficial de la solución, las gotas que contienen un exceso de carga, positiva o negativa, se desprenden de su punta.

Estas gotas se desplazan por la interfase, hacia la entrada del espectrómetro de masas, y generan moléculas de analitos cargados (iones). El mecanismo de fisión de Coulomb propone que el aumento de la densidad de carga, debido a la evaporación del disolvente, hace que las gotas grandes se dividan en gotas cada vez más y más pequeñas, que después se componen solo de iones individuales con la ayuda de un gas nebulizador (N_2) y el gas secante en contracorriente, que ayudan a eliminar tanto el disolvente, como las moléculas no ionizadas.

Figura 6. Esquema del proceso de ionización por electronebulización. Adoptado de: Cech y Enke, 2001.



Debido a que el proceso de electronebulización se lleva a cabo a presión atmosférica, mientras que el analizador de masas funciona a presiones muy bajas, se emplean bombas de vacío diferenciales; los octapolos, a través de los cuales los iones se aceleran y coliman, permiten pasar los iones al analizador de masas (Cech y Enke, 2001).

La cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas de alta resolución, por ejemplo, el analizador de tiempo de vuelo, ofrece grandes ventajas en el campo analítico, a saber: (1) especificidad, sus resultados pueden ofrecer la masa exacta de la molécula y sus productos específicos de desintegración; (2) amplia gama de aplicaciones, ya que no solo se limita a moléculas volátiles o de pesos moleculares por debajo de los 500 Da, sino que puede abarcar analitos de alto peso molecular y polares, e.g., aminoácidos; además, la preparación de la muestra es generalmente más sencilla; (3) flexibilidad, se puede desarrollar una gran cantidad de análisis y en un corto tiempo; (4) sistema de detección que genera bastante información, ya que en un solo análisis cromatográfico se pueden obtener resultados cuantitativos y cualitativos (Vogeser, 2008).

2.5.4. Cuantificación

En la cadena analítica, la cuantificación de los analitos-*target* se basa en la curva de calibración, que puede ser obtenida tanto por el método de *estandarización externa*, como *interna*, usando un compuesto estándar (Istd, *Internal Standard*), que se agrega al extracto final concentrado con el cual se cuantifica el analito-*target*.

En GC-MS, el modo de barrido completo (*full scan*) es el análisis cualitativo, que se lleva a cabo comúnmente. Sin embargo, para cuantificar un analito, por lo general, se usa el modo de monitoreo de ion(es) seleccionado(s), SIM, o, si se

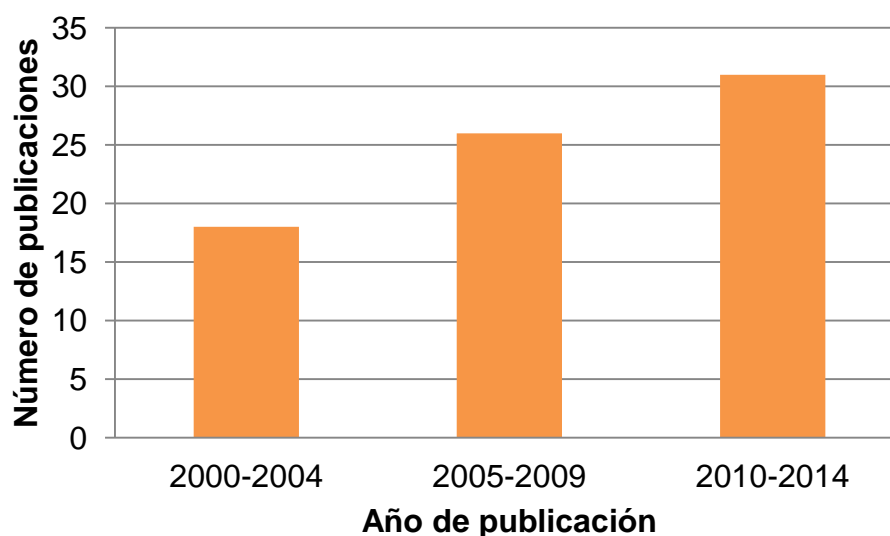
cuenta con una configuración tándem, por ejemplo, un analizador de triple cuadrupolo QqQ, a través del monitoreo de reacción múltiple (MRM) (Stashenko y Martínez, 2011b).

3. CIENCIOMETRÍA

Usando la base de datos *Scopus (Elsevier)*, se realizó un análisis cuantitativo para conocer el estado de las investigaciones científicas sobre la especie *B. caapi*. La fecha de consulta fue el 24 de octubre de 2014. Para el estudio, se utilizó la siguiente ecuación de búsqueda: TITLE-ABS-KEY ("*Banisteriopsis caapi*"). Como resultado, se registraron 89 publicaciones desde el año 1970 hasta 2014.

En la **Figura 7**, se observa el número de publicaciones, que se han realizado en los últimos quince años sobre la especie *B. caapi*. En ese periodo, se reportaron 75 de las 89 publicaciones encontradas desde 1970, lo que muestra un aumento del interés científico por esta especie.

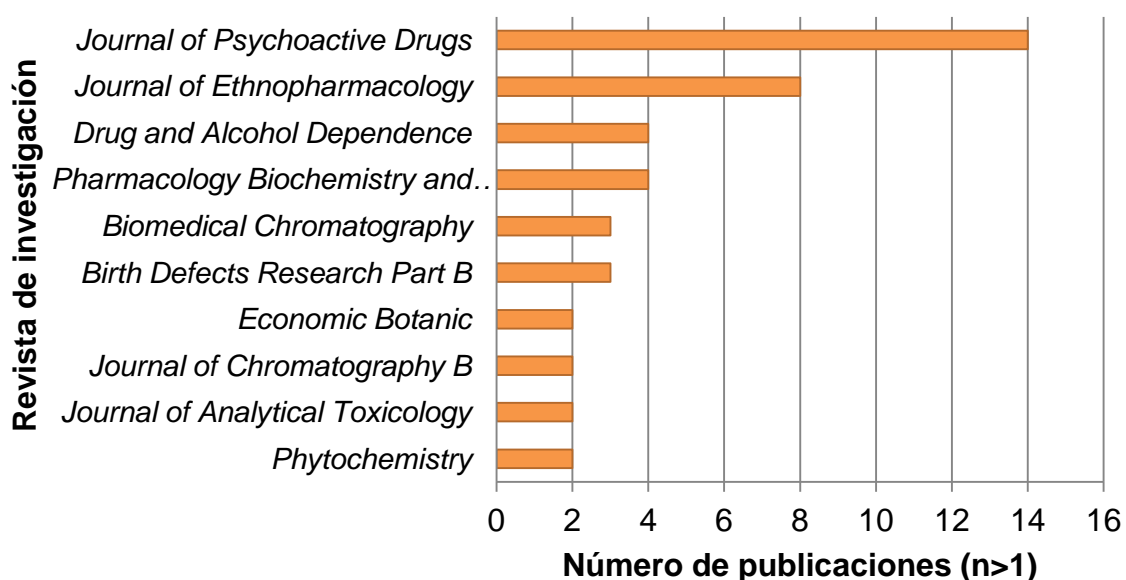
Figura 7. Desarrollo cronológico de publicaciones científicas sobre *B. caapi*. Base de datos: *Scopus (Elsevier, 2014)*. Periodo de observación: 2000-2014. Palabra clave: "*Banisteriopsis caapi*". Fecha de consulta: 24 de octubre de 2014.



Las siguientes son las revistas, en donde más se publicaron los resultados de investigación sobre esta especie, en orden decreciente: *Journal of Psychoactive*

Drugs, Journal of Ethnopharmacology, Drug and Alcohol Dependence, Pharmacology Biochemistry and Behavior, Biomedical Chromatography, entre otras (**Figura 8**).

Figura 8. Revistas principales, en las cuales se ha publicado mayor número de trabajos sobre la especie *B. caapi*. Base de datos: *Scopus (Elsevier, 2014)*. Periodo de observación: 1970-2014. Palabra-clave: “*Banisteriopsis caapi*”. Fecha de consulta: 24 de octubre de 2014.

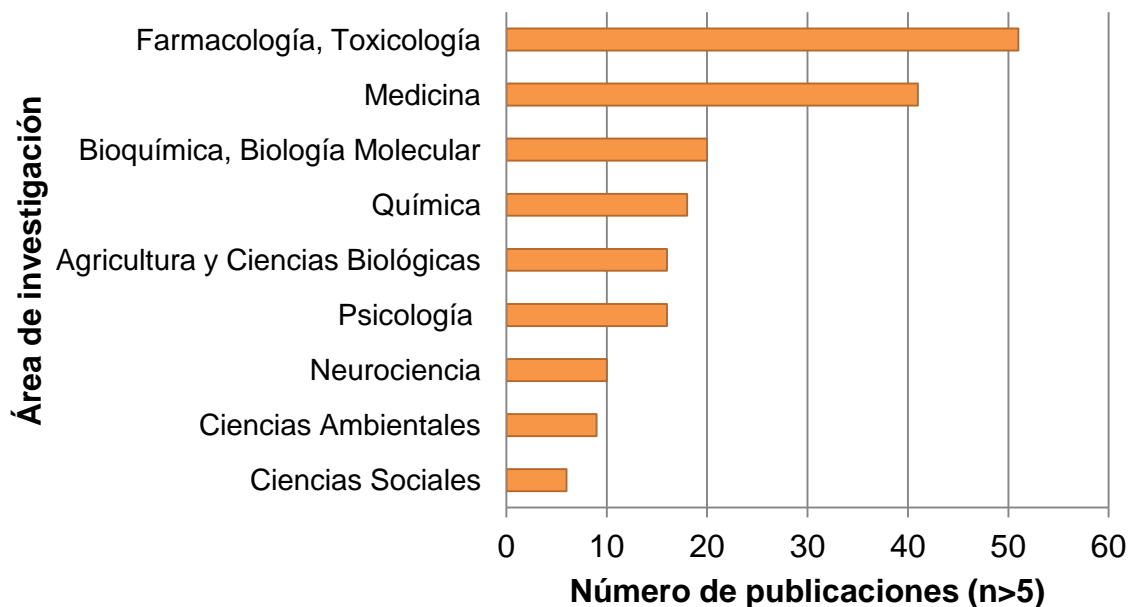


El tipo de revistas científicas, en las que se han publicado trabajos sobre *B. caapi*, tiene relación con las aplicaciones y usos del yagé. El “coctel químico” de alcaloides *harmala* con N,N-dimetiltriptamina (DMT) resulta ser alucinógeno. Esto, debido a que los alcaloides *harmala* son inhibidores de la enzima monoamino oxidasa (Udenfriend *et. al.*, 1958) y el alcaloide N,N-dimetiltriptamina se clasifica como una sustancia alucinógena en la Lista I de la Convención Única de 1961 sobre Estupefacientes de la Organización de las Naciones Unidas (ONU, 1961).

Sin embargo, el uso del brebaje del yagé se considera un patrimonio cultural en Brasil y Perú; existen protecciones jurídicas en algunos estados de EE.UU. (*Supreme Court of the United States*, 2006), y algunas revistas especializadas, por ejemplo, *International Journal of Drugs Policy*, que defiende en su editorial el uso de estas tradiciones, los sincretismos de las iglesias *UDV* o *Santo Daime*, y la no criminalización de sus consumidores (Anderson *et al.*, 2012).

Es interesante mencionar, que las áreas en que más se desarrollan y aplican los estudios sobre la especie *B. caapi*, son la farmacología y toxicología, medicina, bioquímica, química, agricultura, entre otras. En la **Figura 9**, se observa la relación de publicaciones en diferentes áreas de investigación.

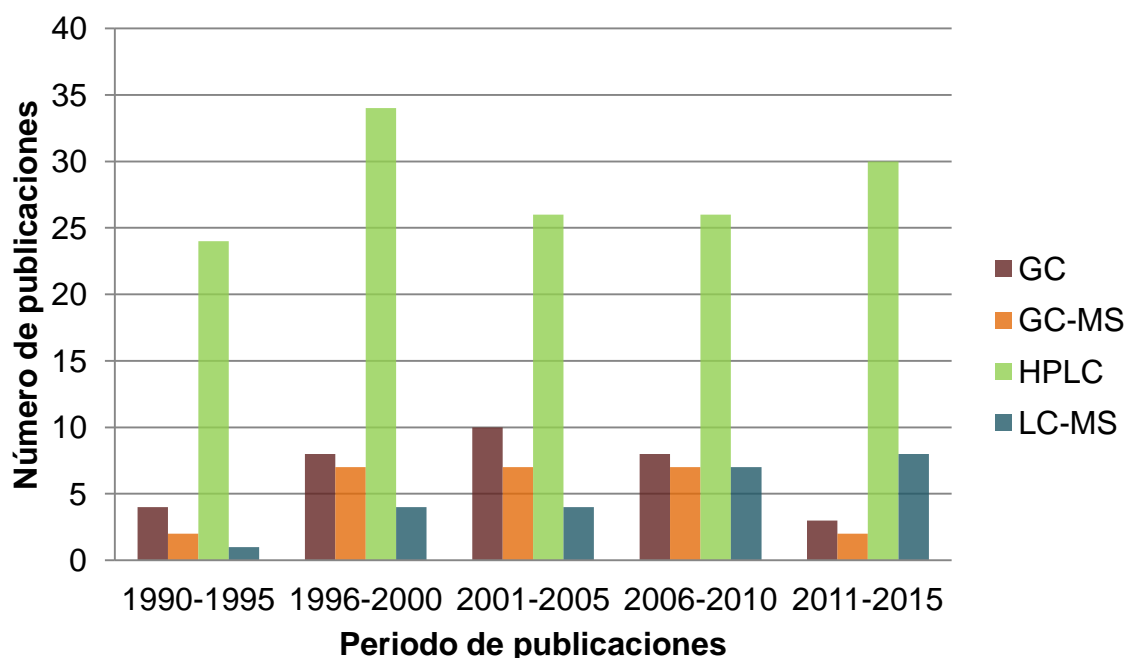
Figura 9. Principales áreas de investigación sobre la especie *B. caapi*. Base de datos: *Scopus* (*Elsevier*, 2014). Periodo de observación: 1970-2014. Palabras-clave: "*Banisteriopsis caap*". Fecha de consulta: 24 de octubre de 2014.



Las áreas de investigación, con mayor número de publicaciones, tienen relación con la actividad biológica de la especie. Udenfriend *et al.* (1958) y McKenna *et al.* (1984) demostraron que las propiedades farmacológicas de los alcaloides *harmala* presentes en *B. caapi*, se deben, principalmente, a que estas sustancias son potentes inhibidores de la enzima monoamino oxidasa, que se encuentra en el cuerpo humano, encargada de catalizar la desaminación oxidativa de los grupos funcionales amino y la degradación de neurotransmisores amina, *i.e.*, serotonina, noradrenalina y dopamina. También, en los alcaloides *harmala*, se han demostrado propiedades farmacológicas antibacteriales, antitumorales, antimutagénicos, antígenotóxicos, antioxidantes y actividad atrapadora de radicales; algunas investigaciones sugieren que estos alcaloides pueden presentar efectos antidepresivos y neuroprotectores (Fortunato *et. al.*, 2010, Herraiz *et. al.*, 2010).

Para complementar el análisis cuantitativo, se realizó otra búsqueda asociando las técnicas instrumentales de interés con los alcaloides β -carbolina. Las técnicas analíticas de cromatografía y cromatografía acoplada a espectrometría de masas son las más numerosas para la cromatografía líquida (**Figura 10**).

Figura 10. Comparación de publicaciones sobre alcaloides β -carbolinas y las técnicas analíticas instrumentales de GC, GC-MS, HPLC y LC-MS. Base de datos: *Scopus* (Elsevier, 2014). Periodo de observación: 1990-2015. Palabras-clave: “ β -Carboline AND GC”, “ β -Carboline AND GC-MS”, “ β -Carboline AND HPLC” y “ β -Carboline AND LC-MS”. Fecha de consulta: 24 de octubre de 2014.



Aunque la cromatografía de gases es un método muy sensible y conveniente para el análisis de drogas de uso ilícito (Stashenko y Martínez, 2012), la extracción de los analitos y la preparación de la muestra para GC-MS es mucho más compleja; a menudo, por ello, se prefieren las técnicas HPLC o LC-MS. A continuación, se mencionan algunas investigaciones al respecto.

Rivier y Lindgren (1972) analizaron nueve muestras que contenían *B. caapi* en el brebaje. El análisis se realizó por GC-MS en columna con fase estacionaria de OV-17 (2,25 m x 3,2 mm, tubo de vidrio). Todas las muestras con la especie *B. caapi* mostraron la presencia de harmina, harmalina y tetrahydroharmina; la identidad de los picos cromatográficos se corroboró con base en sus espectros de

masas. Los autores reportaron una aproximación del contenido de alcaloides presentes en las bebidas analizadas, así: en una porción de brebaje (200 mL), se toman, en promedio, 30 mg de harmina, 10 mg de THH, y 25 mg de DMT.

McIlhenny *et al.* (2009), analizaron tres muestras diferentes del brebaje de ayahuasca por cromatografía líquida usando electronebulización como método de ionización y analizador de masas tándem como sistema de detección. El análisis fue a través de la inyección directa –solo se diluyó la muestra (brebaje) en una mezcla de acetonitrilo-agua (1:9) y del ácido fórmico (0,1%)-, y se cuantificaron simultáneamente 11 sustancias químicas utilizando un patrón interno deuterado para cada sustancia.

Zhao *et al.* (2012), realizaron un estudio para establecer las vías metabólicas de los alcaloides *harmala* en las muestras de orina de rata; a las ratas, se les habían suministrado, por vía oral, cantidades específicas de alcaloides. Los análisis se hicieron por HPLC-ESI (APCI)-MS (trampa de iones), en una columna C18 MGII, con la fase móvil con gradiente de concentración de acetonitrilo y en modo de adquisición de iones positivos.

Con base en la revisión bibliográfica realizada en el presente trabajo, se usaron los métodos de extracción y de identificación, siguientes: la extracción de muestra con disolventes (metanol y cloroformo) y el análisis por cromatografía gaseosa o líquida acoplada a espectrometría de masas.

4. DESARROLLO EXPERIMENTAL

4.1. REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS DE LABORATORIO

En la **Tabla 3**, se encuentran los materiales, equipos, reactivos y sus especificaciones, que se emplearon en esta investigación.

Tabla 3. Materiales, reactivos y equipos empleados en el presente estudio.

Nombre	Especificaciones
Reactivos	
Metanol	EMSURE [®] , ACS, ISO, Reag. Ph Eur 99,9%, <i>Merck KGaA</i> , Darmstadt, Alemania.
Éter etílico	EMSURE [®] , ACS, ISO, Reag. Ph Eur 99,7%, <i>Merck KGaA</i> , Darmstadt, Alemania.
Cloroformo	ACS Reagent 99,8%, <i>Sigma-Aldrich</i> , Saint Louis, EE.UU.
Diclorometano	Analítico 99,8%, <i>Emscience</i> , <i>Merck KGaA</i> , Darmstadt, Alemania.
Acetonitrilo	LiChrosolv [®] <i>hypergrade for LC-MS</i> , >99,9%, <i>Merck KGaA</i> , Darmstadt, Alemania.
Dioxano	EMSURE [®] , ACS, ISO, Reag. Ph Eur 99,7%, <i>Merck KGaA</i> , Darmstadt, Alemania.
Ácido Fórmico	Suprapur [®] , 98-100%, <i>Merck KGaA</i> , Darmstadt, Alemania.
Agua	Tipo I, Sistema de purificación <i>Synergy UV</i> , Millipore S.A.S. Molsheim, Francia.
Iso-propanol	ACS Reagent 99,8%, <i>Sigma-Aldrich</i> , Saint Louis, EE.UU.
Ácido clorhídrico	ACS Reagent 36,5-38,0%, <i>Merck KGaA</i> , Darmstadt, Alemania.
Hidróxido de sodio	Pureza: 99%; <i>Merck KGaA</i> , Darmstadt, Alemania.
Sulfato de sodio anhidro	Pureza: 99,1%; <i>J. T. Baker</i> , Phillipsburg, NJ, EE.UU.
Bicarbonato de sodio	Reactivo, <i>Laboratorios León LTDA</i> , Bucaramanga, Colombia.
Carbonato de potasio	ACS Reagent 99,0%, <i>Sigma-Aldrich</i> , Saint Louis, EE.UU.
Gel de sílice (SiO ₂)	Tamaño de partícula: 0,063-0,2 mm, <i>Merck KGaA</i> , Darmstadt, Alemania.
Agua deuterada, D ₂ O	Pureza: 99,9%, <i>Sigma-Aldrich</i> , Milwaukee, EE.UU.
C18	Carbono 23%, Tamaño de partícula: 40-63 µm, <i>Silicycle Inc.</i> Québec, Canadá.

Tabla 3. Continuación

Materiales	
Erlenmeyer con salida lateral	400 mL; Pyrex [®] , México.
Embudo Büchner	Pyrex [®] , México.
Embudo de separación	250 mL; Pyrex [®] , México.
Balones aforados	1 mL; Pyrex [®] , México.
Pipetas Pasteur	230 mm, <i>Brand GMBH Co. Wertheim</i> , Alemania.
Viales para cromatografía	2 mL, <i>Agilent Technologies</i> , Santa Clara, California, EE.UU.
Equipos auxiliares	
Baño de ultrasonido	<i>S 15H Elmasonic, Elma- Hans Schmidbauer GmbH & Co</i> , Singen, Alemania.
Rotoevaporador	<i>Rotavapor-R, Büchi</i> , Flawil, Suiza.
Micropipetas	2 – 20, 25 – 250 y 100 – 1000 µL, <i>Brand</i> , Wertheim, Alemania.
Balanzas analíticas	<i>Mettler Toledo AL204</i> , Nänicon, Suiza. <i>Mettler Toledo PB1502-S</i> , Nänicon, Suiza.
pH-Metro	<i>MPC227, Mettler Toledo</i> , Schwezenbach, Suiza.
Generador de nitrógeno	<i>NM130LA-MS, Peak Scientific Instruments LTD</i> , Inchinnan, Escocia.

4.2. MATERIAL VEGETAL

El material vegetal se recolectó en el Complejo Agroindustrial Piloto de CENIVAM (977 msnm, N 07°08,422' W 073°06,960'), ubicado en la zona noroeste de la Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia.

Se separaron las partes aéreas de la planta y se escogieron las lianas únicamente. Las lianas se secaron a la sombra, entre 24-27 °C, humedad relativa entre 65-70%, durante 30 días. Después, se molieron a un tamaño de partícula pequeño y se almacenaron en frascos de vidrio.

4.3. MUESTRA DE ORINA HUMANA

La muestra de orina se obtuvo de un voluntario masculino (25 años, peso corporal ca. 60 kg), 8 h después de la ingestión del brebaje del yagé. Se midió el pH de la orina (8,7) y se filtró. La muestra se almacenó en un frasco ámbar, en refrigerador a 5°C, durante 30 días.

4.4. EXTRACCIÓN DE LOS ALCALOIDES *HARMALA* DE LA CORTEZA DE *B. CAAPI*

4.4.1. Extracción con disolventes orgánicos

Se tomaron lianas de *B. caapi* (10 g), previamente molidas y secas. Se agregó metanol (150 mL) y se realizó extracción múltiple (3 lotes), durante 4 h, en un baño ultrasónico. Se filtró al vacío la solución metanólica, se desechó el residuo sólido y se dejó el sobrenadante. El filtrado se rotoevaporó y se obtuvo el extracto.

El extracto se disolvió en una solución de ácido clorhídrico (60 mL, 1% v/v) con agitación constante, a 60 °C. Luego, se filtró al vacío y se desechó el residuo. La mezcla se extrajo con éter etílico (75 mL, 3 lotes) y se desechó la fase orgánica. Se ajustó el pH a 10,7 de la fase acuosa con bicarbonato de sodio (1,5 g) y una solución de hidróxido de sodio (3 mL, 10% p/v). La mezcla acuosa se extrajo con cloroformo (120 mL, 3 lotes). El cloroformo se rotoevaporó y se obtuvo el extracto con los alcaloides *harmala*.

4.4.2. Extracción por dispersión de la matriz en fase sólida

Para el método MSPD, se tomaron lianas de *B. caapi* (0,2 g), previamente molidas y secas, se homogeneizaron con carbonato de potasio (0,3 g), gel de sílice (0,8 g) e iso-propanol (1 mL), durante 10 min, en un mortero. El homogeneizado se

transfirió a una jeringa de 10 mL, se compactó y se eluyó con metanol (5 mL). El eluyente se almacenó para su análisis por LC-MS.

4.5. EXTRACCIÓN DE LOS ALCALOIDES *HARMALA* Y SUS METABOLITOS EN ORINA HUMANA

Para el análisis de los alcaloides *harmala* por GC-MS/MS, se tomó una alícuota de orina (1 mL), se mezcló con diclorometano (1 mL) y se centrifugó durante 10 min. La fracción con diclorometano se separó en un embudo de decantación y se almacenó. Para el análisis por LC-MS, se tomó una alícuota de orina (1 mL), se mezcló con acetonitrilo (1 mL) y se centrifugó durante 10 min. El sobrenadante (1 mL) se separó y se llevó a sequedad con flujo de gas de nitrógeno.

4.6. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA PARA EL ANÁLISIS DE LOS ALCALOIDES *HARMALA* POR GC-MS, GC-MS/MS Y LC-MS

4.6.1. Extracto obtenido con disolventes orgánicos

Para el análisis de los alcaloides *harmala* por GC-MS, se pesaron 5 mg de extracto (Véase **Sección 4.4.1.**) y se disolvieron en metanol hasta aforo (1 mL), en un balón, con agitación (1 min). La solución se filtró y se transfirió a un vial (1,5 mL).

Para el análisis de los alcaloides *harmala* por GC-MS/MS, se pesaron 0.5, 1 y 5 mg de extracto (Véase **Sección 4.4.1.**) y se disolvieron en metanol, cada uno, hasta aforo (1 mL), en un balón, con agitación (1 min). La solución se filtró y se transfirió a un vial (1,5 mL).

Para el análisis de los alcaloides *harmala* por LC-MS, se pesó el extracto (1 mg) (Véase **Sección 4.4.1.**) y se disolvió en una mezcla de acetonitrilo-agua (1:1) y del ácido fórmico (0,5%) hasta aforo (1 mL), en un balón. Se filtró la solución y se tomó una alícuota de 1 μ L. La alícuota se disolvió nuevamente en una mezcla de acetonitrilo-agua (1:1) y del ácido fórmico (0,5%) hasta aforo (1 mL) en un balón. La solución se transfirió a un vial (1,5 mL).

4.6.2. Extracto obtenido por dispersión de la matriz en fase sólida

Para el análisis de los alcaloides *harmala* por LC-MS, se tomó una alícuota del eluyente (40 μ L) (Véase **Sección 4.4.2.**) y se llevó a sequedad completa con flujo de gas nitrógeno. El residuo se reconstituyó en la mezcla de fase móvil de acetonitrilo-agua (1:1) y del ácido fórmico (0,5%) hasta aforo (1 mL). La solución se filtró y se transfirió a un vial (1,5 mL).

4.6.3. Extracto obtenido de la orina

Para el análisis de los alcaloides *harmala* por GC-MS/MS, se tomó una alícuota del extracto de la orina (200 μ L) (Véase **Sección 4.5.**) y se disolvió en diclorometano hasta aforo (1 mL), en un balón. La solución se filtró y se transfirió a un vial (1,5 mL).

Para el análisis de los alcaloides *harmala* por LC-MS, se tomó una alícuota del extracto de la orina (200 μ L) (Véase **Sección 4.5.**) y se disolvió en una mezcla de fase móvil de acetonitrilo-agua (1:1) y del ácido fórmico (0,5%) hasta aforo (1 mL), en un balón. La solución se filtró y se transfirió a un vial (1.5 mL).

4.7. ANÁLISIS INSTRUMENTAL

4.7.1. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

El análisis por GC-MS se realizó en un cromatógrafo de gases (GC 6890 System Plus, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EE.UU.) con detector selectivo de masas (MSD 5973 Network, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EE.UU.), usando ionización por impacto con electrones (EI, 70 eV). La inyección fue a través de un inyector automático (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EE.UU.), en modo *split* (relación 1:10), con una temperatura en el puerto de inyección de 250 °C (Figura 11).

Figura 11. Equipo de GC-MS utilizado en la investigación. Fotografía tomada por el autor en el Laboratorio de Cromatografía y Espectrometría de Masas, CROM-MASS, UIS – Bucaramanga, el 17 de octubre de 2014.



Se usó una columna apolar DB-5MS (*J & W Scientific, Folsom, CA, EE.UU.*) de 60 m x 0,25 mm, d.i. x 0,25 µm, d_f, con fase estacionaria de 5%-fenil-poli(metilsiloxano), la presión inicial en la cabeza de la columna fue 20,88 psi; el modo de operación fue con flujo constante (1,0 mL/min), usando como gas de arrastre helio (99,995%, Linde, Bucaramanga, Colombia). La programación del horno cromatográfico fue de 100 °C (5 min) hasta 280 °C (2 min), a razón de 10 °C/min.

La temperatura de la línea de transferencia fue de 285 °C. El rango de masas usado para la adquisición fue *m/z* 35-540 Da, con velocidad de adquisición de 4 scan/s, usando el software *MSDCHEMSTATION* Ver. G1701DA, de *Agilent Technologies*. Se compararon los espectros de masas obtenidos experimentalmente con los reportados en las bases de datos de *NIST* y *Willey*.

4.7.2. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas *tándem*

El análisis por GC-MS/MS se realizó en un cromatógrafo de gases (GC 7890A System, *Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EE.UU.*) con detector selectivo de masas (7000B GC/MS Triple Quad, *Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EE.UU.*) y un inyector automático *split/splitless* (AT 7693 Autosampler, *Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EE.UU.*) (**Figura 12**). La temperatura del puerto de inyección fue de 250 °C y el método de ionización fue por impacto con electrones (*EI*, 70 eV).

Se usó una columna apolar DB-5MS (*J & W Scientific, Folsom, CA, EE.UU.*) de 60 m x 0,25 mm, d.i. x 0,25 µm, d_f, con fase estacionaria de 5%-fenil-poli(metilsiloxano), la presión inicial en la cabeza de la columna fue 26,7 psi; el flujo de gas de arrastre fue en modo constante (1,3 mL/min), a una velocidad lineal de 30,1 cm/s; se usó helio (99,995%, Linde, Bucaramanga, Colombia) como gas de arrastre. La programación del horno cromatográfico fue de 100 °C (5 min) hasta

200 °C (1 min) a razón de 6 °C/min, y luego de 200 °C (1 min) hasta 280 °C (15 min), a razón de 10 °C/min.

Figura 12. Equipo de GC-QqQ-MS utilizado en la investigación. Fotografía tomada por el autor en el Laboratorio de Cromatografía y Espectrometría de Masas, CROM-MASS, UIS – Bucaramanga, el 17 de octubre de 2014.



La temperatura de la línea de transferencia fue de 285 °C. El rango de masas usado para la adquisición fue m/z 50-350 Da; tiempo de espera para el solvente (*solvent delay*) y comienzo de la adquisición se fijaron en 10 min. El flujo de nitrógeno en la celda de colisiones activadas fue de 2,25 mL/min, se usó helio como gas atenuador (*Quenching Gas*); la velocidad de adquisición de datos (espectros) fue 6,8 ciclos/s; se empleó un sistema de datos *MassHunter* Ver. B.07.00 de *Agilent Technologies*.

4.7.2.1. Parámetros de adquisición del GC-QqQ-MS

Para el desarrollo del método de monitoreo de reacciones múltiples (MRM) se estudiaron diferentes variables, a saber: tipo de transiciones metaestables (ion padre→hijo) y energías de colisiones activadas (CID), desde 5 hasta 25 eV. También, se realizaron los experimentos de estudio de fragmentación de diferentes iones-producto e iones-precursor, a diferentes energías de colisiones activadas (CID). Se llevaron a cabo los ensayos de derivatización con deuterio, para confirmar las rutas de fragmentación de los alcaloides *harmala* estudiados en este trabajo.

4.7.3. Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas

El análisis por LC-MS se realizó en un cromatógrafo líquido de alta eficiencia (LC-1200 Series, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EE.UU.), unido a un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo tipo reflectrón (rTOF-MS) (TOF 6210 Time-of-Flight LC/MS, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EE.UU.) (**Figura 13**).

La separación cromatográfica se llevó a cabo en una columna C₁₈ Kinetex (Phenomenex, Torrance, CA, EE.UU.) de 100 mm x 4,6 mm, d.i., 2,6 µm de tamaño de partícula. La fase móvil fue una solución acuosa del ácido fórmico al 0,5% (A) y solución de acetonitrilo con ácido fórmico al 0,5% (B). El gradiente de elución fue de 95% de A y 5% de B, cambiando linealmente hasta 10% de B en 3 min, luego, 20% de B en 5 min y 80% de B, en 10 min; este último se mantuvo durante 5 min, luego, cambió a 100% de B, en 5 min, y se mantuvo durante 5 min. El retorno a las condiciones iniciales se hizo en 15 min, y el tiempo total de la corrida cromatográfica fue de 40 min. El flujo fue de 0,2 ml/min y el volumen de inyección, 4 µL. El TOF-MS acoplado a la interface de ionización por electronebulización (*Electrospray, DualESI*), operado en modo positivo, adquiría los datos en el rango de masas *m/z* 100-1000, con la velocidad de adquisición de

2 espectros/s. Como gas secante se usó nitrógeno (350 °C, 7 L/min) y gas nebulizador también fue nitrógeno (presión, 40 psi). Después de optimización, el voltaje del capilar se fijó en 1000 V, del *fragmentor*, 150 V; de *skimmer*, 65 V, y el voltaje del primer octapolo fue de 250 V.

Figura 13. Equipo de LC-ESI-TOF-MS utilizado en la investigación. Fotografía tomada por el autor en el Laboratorio de Cromatografía y Espectrometría de Masas, CROM-MASS, UIS – Bucaramanga, el 17 de octubre de 2014.



Se realizó corrección de las masas en tiempo real usando una solución de referencia que incluye purina ($C_5H_4N_4$, en m/z 121,05087) y hexaquis [(1H, 1H, 3H-tetrafluoropentoxi)-fosfazeno ($C_{18}H_{18}O_6N_3P_3F_{24}$, en m/z 922,00980)]. El sistema de adquisición de datos fue *MassHunter* Ver. B.02.00 (B1128) de *Agilent Technologies*. Para la determinación de masas exactas de los alcaloides se usó el modo de cromatograma de iones extraídos (EIC).

4.7.3.1. Parámetros de adquisición del LC-ESI(+)-TOF-MS

Se estudió el efecto del voltaje del capilar (1000, 2000, 3000, 4000 y 5000 V) y, del voltaje del *fragmentor* (50, 75, 100, 150, 200 y 250 V) sobre las corrientes iónicas obtenidas de los alcaloides *harmala*, estudiados en el presente trabajo. Se fijó el valor de voltajes, en los cuales las corrientes iónicas de iones moleculares protonados tuvieron mayor respuesta.

5. ANÁLISIS DE RESULTADOS

5.1. CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS

El análisis de los alcaloides *harmala* en los extractos obtenidos de la corteza de *B. caapi*, se realizó por GC-MS. Los resultados de este análisis confirmaron que el procedimiento usado para su aislamiento fue eficiente. La identificación de cada pico cromatográfico se llevó a cabo comparando los espectros de masas para cada alcaloide con los reportados en la base de datos *NIST*.

El siguiente fue el orden de elución de los alcaloides en la columna apolar DB-5MS (60m): tetrahydroharmina (24,56 min), harmalina (24,86 min) y harmina (25,48 min). El alcaloide mayoritario fue harmina (66,6%), seguido de tetrahydroharmina (26,5%) y, en menor cantidad, se encontró harmalina (6,9%) (**Figura 14**). Los resultados fueron congruentes con los reportados por Rivier y Lindgren (1972). La corriente iónica total (TIC) obtenida por GC-MS, permitió determinar que la técnica de extracción con disolventes (LLE) aisló principalmente los alcaloides, ya que no se detectaron otras sustancias químicas en el extracto, por encima de los niveles mínimos de su detección, que depende de cada equipo.

La comparación (*matching* o *purity*) de los espectros de masas de cada alcaloide con los de la base de datos *NIST*, permitió observar coincidencia en más del 90%. Para el alcaloide tetrahydroharmina, el ion pico de base se registró en m/z 201, seguido, en orden decreciente de sus intensidades, por el ion M^+ en m/z 216 (32%) y los iones $[M-CH_2=NH-CH_3]^+$ en m/z 172 (21%) y $[M-CH_2=NH]^+$ en m/z 187 (14%) (**Figura 15**). Para el alcaloide harmalina, el ion pico de base $[M-H]^+$ se registró en m/z 213, seguido, en orden decreciente de sus intensidades, del ion M^+ en m/z 214 (88%) y los iones $[M-H-CH_3]^+$ en m/z 198 (23%) y $[M-H-CH_3-CO]^+$ en m/z 170 (18%) (**Figura 16**). Para el alcaloide harmina, el ion pico de base fue el

ion M^+ en m/z 212, seguido de los iones $[M-CH_3-CO]^+$ en m/z 169 (60%), $[M-CH_3]^+$ en m/z 197 (23%) y $[M-CHO]^+$ en m/z 183 (7%) (**Figura 17**).

Figura 14. Perfil cromatográfico típico, obtenido por GC-MS, de los alcaloides *harmala*, aislados por LLE de la corteza de *B. caapi*. **A.** TIC y **B.** Identificación de picos cromatográficos. Columna DB-5MS (60 m), modo de inyección: *split* (1:10), MSD (*EI*, 70 eV).

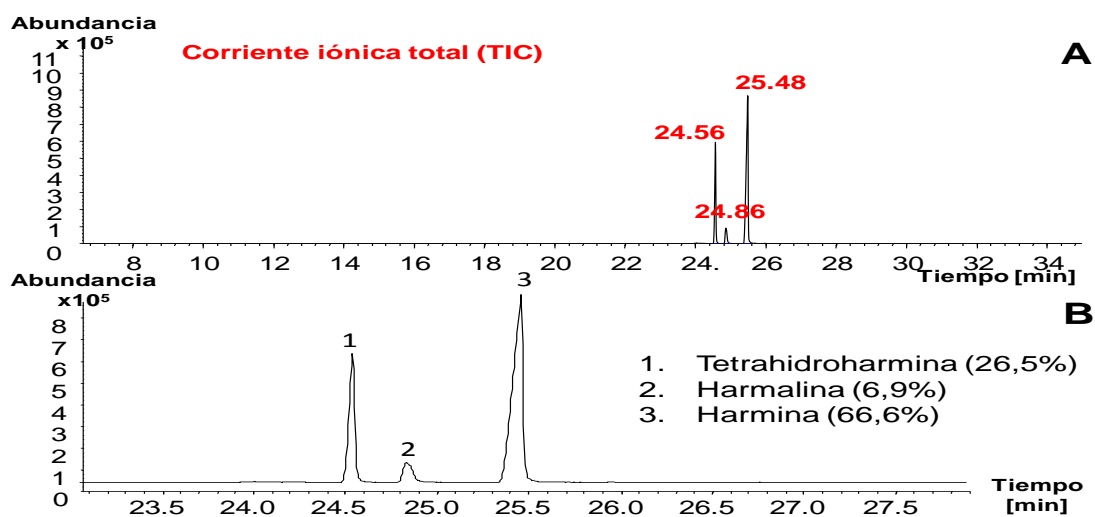


Figura 15. Comparación del espectro de masas asignado a la tetrahydroharmina (**A**), con el de la base de datos NIST (**B**) para esta sustancia (conocida también con el nombre de leptaflorina).

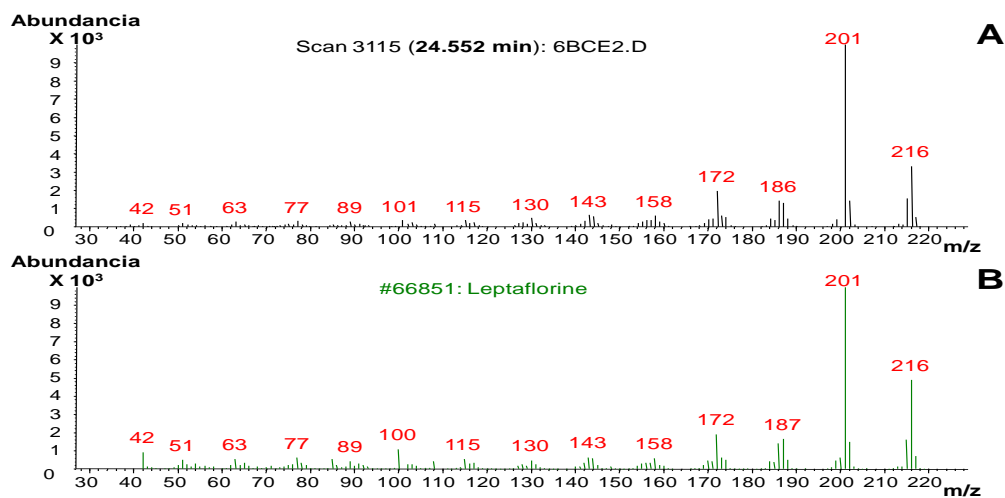


Figura 16. Comparación del espectro de masas asignado a la harmalina (A) con el de la base de datos NIST (B).

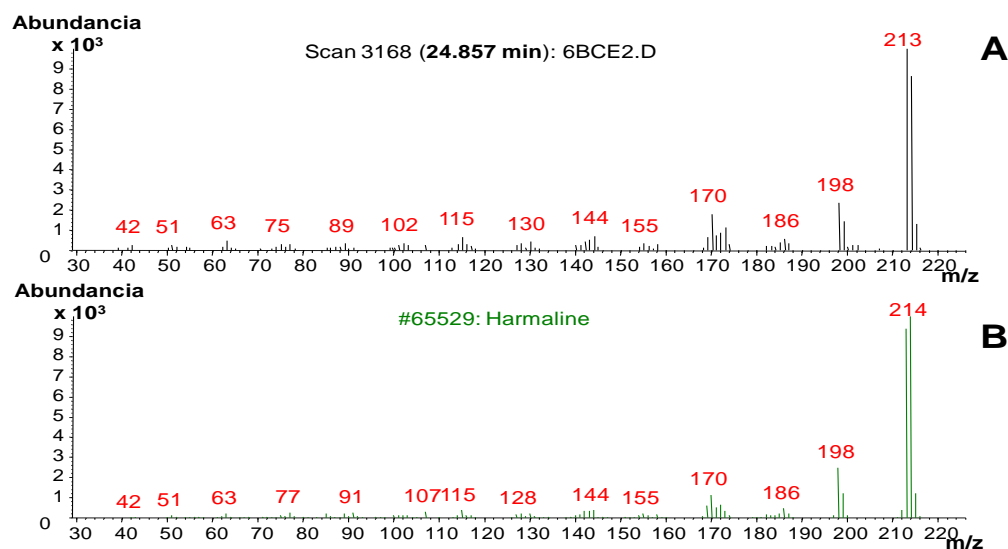
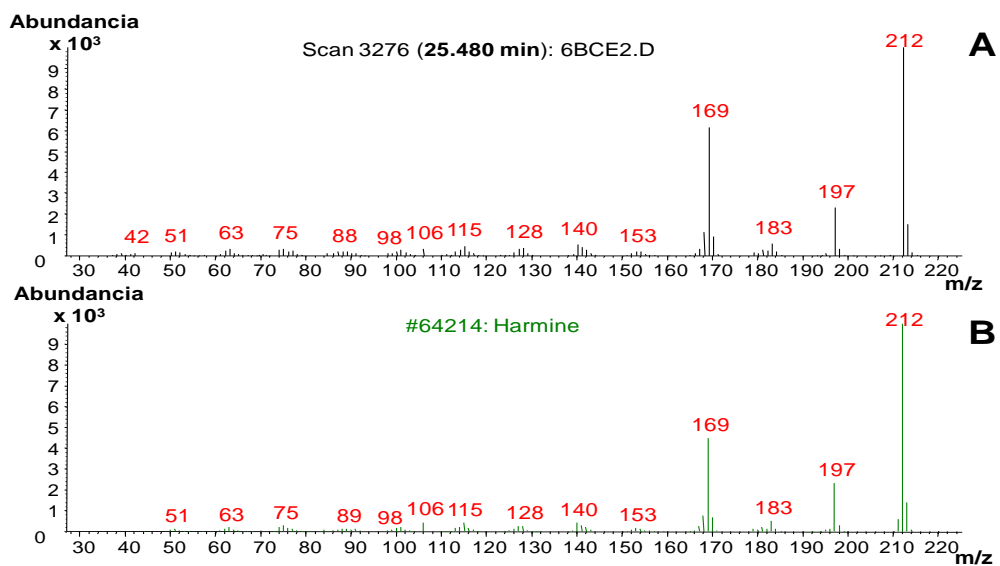


Figura 17. Comparación del espectro de masas asignado a la harmina (A) con el de la base de datos NIST (B).

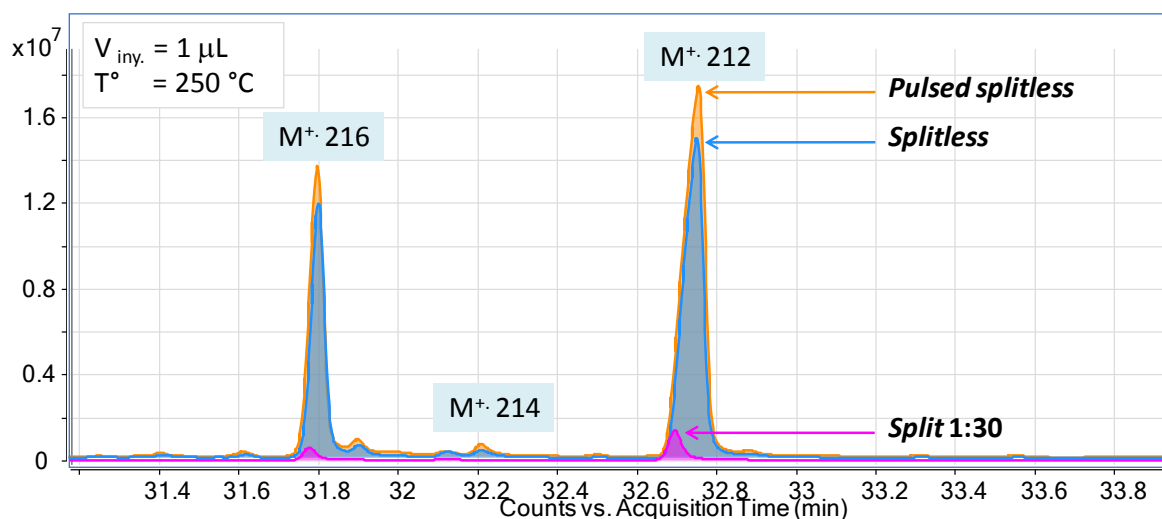


5.2. CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS TÁNDEM

5.2.1. Modos de inyección

Para el análisis de extractos de *B. caapi*, se ensayaron diferentes modos de inyección: *split* (1:30), *splitless* y *pulsed splitless*, usando las mismas condiciones cromatográficas (temperatura y volumen de inyección); se observó que el orden de respuesta (corrientes iónicas más altas) aumentó así: *split* 1:30 < *splitless* < *pulsed splitless* (Figura 18).

Figura 18. Perfiles cromatográficos típicos, obtenidos por GC-QqQ-MS, con inyección en modos *split* (1:30), *splitless* y *pulsed splitless*, de los alcaloides *harmala*, aislados por LLE de la corteza de *B. caapi*. Columna DB-5MS (60m), volumen de inyección: 1 μ L.



El modo de inyección *split* (con división de muestra en la entrada de la columna) se puede usar para el análisis de muestras de alcaloides, cuya concentración sea muy alta (>1000 ppm, e.g., extracto vegetal de *B. caapi*), mientras que el modo *splitless* (sin división de la muestra) se puede emplear para el análisis de muestras

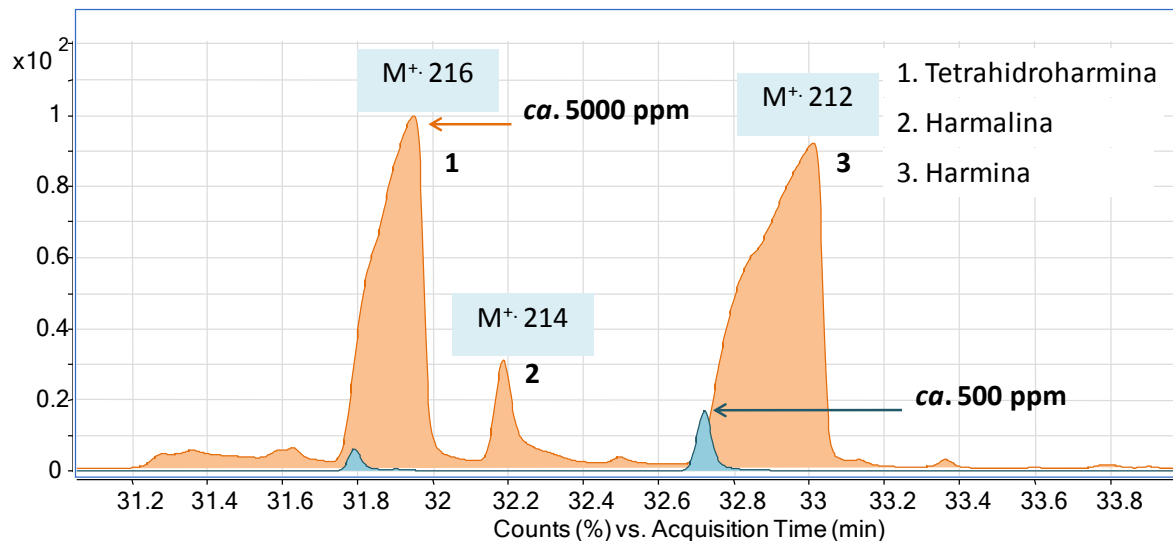
con analitos en concentración a nivel de trazas. Cuando se hace la inyección en modo de *pulsed splitless* (*splitless* pulsado), se aumenta la presión del gas de arrastre, en forma de pulso en la entrada del *liner*, lo que permite disminuir el tiempo de permanencia de la muestra en el *liner* y se evita así su pérdida o una posible descomposición; por ello, este modo de inyección puede usarse para muestras, con analitos a nivel de ultra- trazas (ppb, ppt), cuando se desea detectar los alcaloides *harmala* en matrices complejas como fluidos fisiológicos (orina, sangre, órganos, etc.).

5.2.2. Modos de adquisición

5.2.2.1. Barrido completo

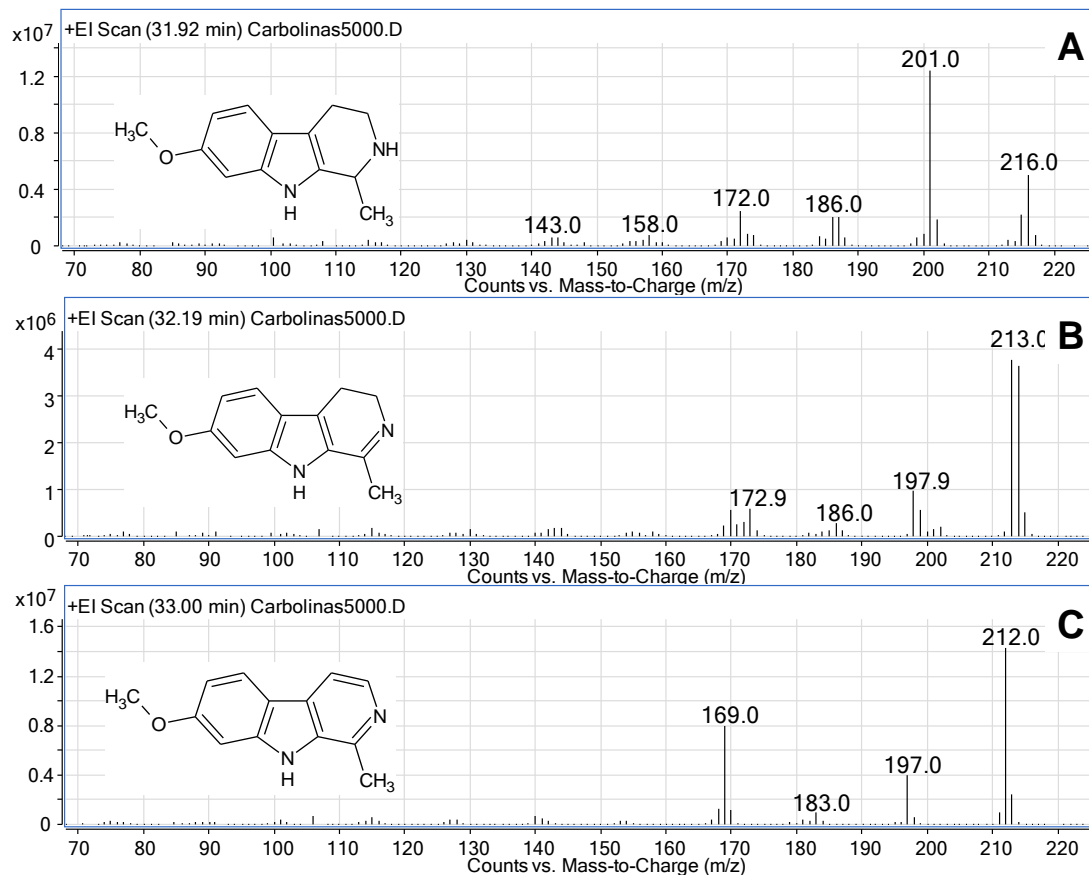
Se estudiaron dos muestras (en concentraciones de ca. 500 y 5000 ppm), con las que se comparó la respuesta del analizador QqQ-MS en función de la concentración del extracto (**Figura 19**). En la muestra con analitos presentes en concentración alta, el espectrómetro de masas detectó los tres alcaloides, en orden de elución: tetrahydroharmina (31.92 min), harmalina (32.19 min) y harmina (33,00 min); la separación de los picos cromatográficos fue eficiente, pero también, los picos fueron muy anchos y asimétricos, lo que evidencia la sobrecarga en la columna. En la muestra con alcaloides presentes en menor concentración, sin embargo, se detectaron únicamente dos alcaloides, *i.e.*, tetrahydroharmina (31,79 min) y harmina (32,72 min); los tiempos de retención se acortaron un poco, pero la línea base se mantuvo baja y se obtuvieron picos cromatográficos simétricos.

Figura 19. Perfiles cromatográficos obtenidos por GC-QqQ-MS (modo *full scan*), de los alcaloides *harmala*, aislados por LLE de la corteza de *B. caapi*. Columna DB-5MS (60m), modo de inyección: *split* (1:30), volumen de inyección: 1 μ L.



La **Figura 20** muestra los espectros de masas obtenidos para cada pico cromatográfico. En el espectro de masas de la tetrahydroharmina, se observa el ion pico de base $[M-CH_3]^+$ en m/z 201 e iones-fragmento $[M-CH_3-NH]^+$ en m/z 186, $[M-CH_2-NH-CH_3]^+$ en m/z 172; el espectro de masas de la harmalina, se caracteriza por la presencia del ion pico de base $[M-H]^+$ en m/z 213 e ion-fragmento característico en $[M-H-CH_3]^+$ en m/z 198; en el espectro de masas de la harmina, el ion pico de base fue el ion M^+ y los iones-fragmento característicos $[M-CH_3]^+$ en m/z 197, $[M-CHO]^+$ en m/z 183 y $[M-CH_3-CO]^+$ en m/z 169.

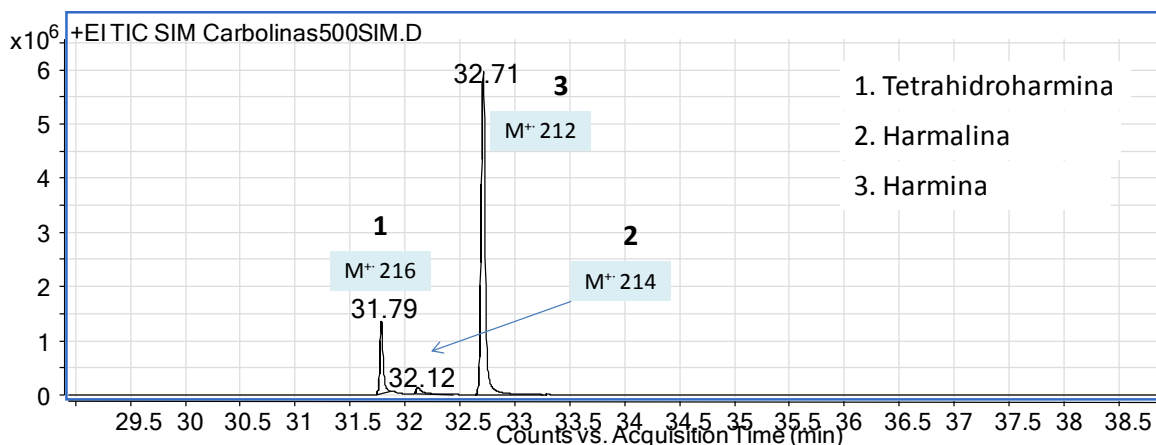
Figura 20. Espectros de masas (*EI*, 70 eV), obtenidos por GC-QqQ-MS (modo *full scan*), de los alcaloides *harmala*: **A.** Tetrahydroharmina, **B.** Harmalina y **C.** Harmina.



5.2.2.2. Monitoreo del ion seleccionado

Para el análisis en modo de ion seleccionado (SIM), se escogieron los iones M^+ para cada alcaloide (m/z 212, 214 y 216) y se obtuvieron los respectivos fragmentogramas de masas (**Figura 21**). A diferencia del cromatograma obtenido en modo de barrido completo, el modo SIM permitió registrar en la mezcla solo los compuestos de interés y reducir el ruido químico, lo que se manifestó en la resolución más alta de los picos sobre la línea base; se registró también la harmalina, que no aparece detectada cuando el modo de adquisición es *full scan* (Véase **Figura 19**).

Figura 21. Fragmentograma de masas (detección selectiva), obtenido por GC-QqQ-MS (*EI*, 70 eV), operado en modo SIM, usando los iones moleculares (*m/z* 212, 214 y 216) de los alcaloides *harmala*, aislados por LLE de la corteza de *B. caapi*. Columna DB-5MS (60m), modo de inyección: *split* (1:30), volumen de inyección: 1 μ L.



5.2.2.3. Barrido de iones-producto de los iones M^+ y $[M-CH_3]^+$, de harmina y tetrahydroharmina

Se estudiaron los iones-producto de los iones M^+ y $[M-CH_3]^+$ de harmina y tetrahydroharmina. Para maximizar la respuesta, se ensayaron varias energías de colisiones activadas en el rango de 5 a 25 eV (**Tabla 4**).

Para la fragmentación del ion M^+ de harmina, la corriente iónica más alta, se observó cuando la energía de colisión fue 15 eV, y para la tetrahydroharmina, este valor fue 10 eV; el ion-fragmento $[M-CH_3]^+$ de la harmina y de la tetrahydroharmina, tuvo la respuesta más alta, cuando los valores de la energía de colisiones fueron 10 y 15 eV, respectivamente.

Tabla 4. Corrientes iónicas de los iones M^+ y $[M-CH_3]^+$ de harmina y tetrahydroharmina, obtenidas por GC-QqQ-MS (EI , 70 eV), en función de la energía de colisiones activadas.

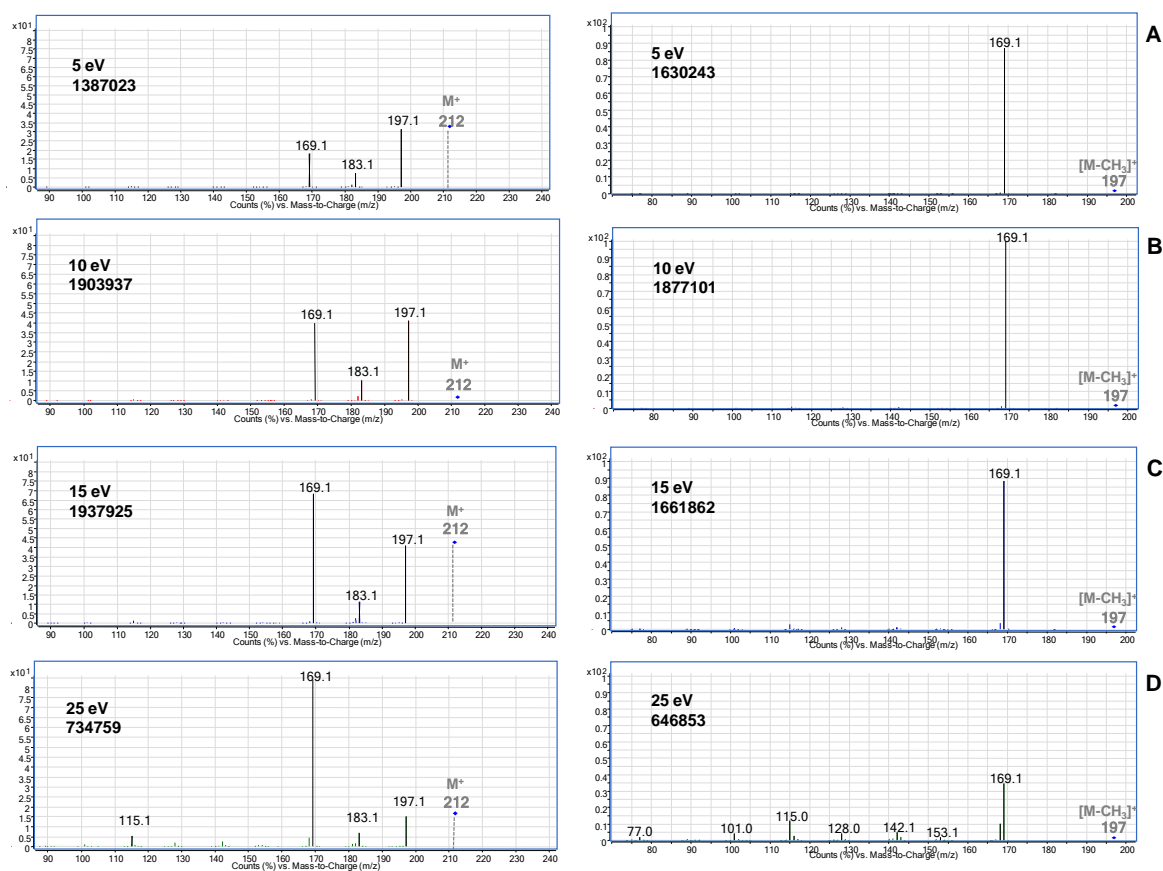
Energía de Colisión, eV	Corrientes iónicas $\times 10^6$, cuentas			
	Iones M^+		Iones $[M-CH_3]^+$	
	216 \rightarrow productos	212 \rightarrow productos	201 \rightarrow productos	197 \rightarrow productos
5	1,67	1,39	0,41	1,63
10	1,81	1,90	0,73	1,88
15	1,64	1,94	0,86	1,66
25	0,88	0,73	0,48	0,65

La **Figura 22** muestra cómo cambian los iones-producto de los iones M^+ y de los iones fragmento $[M-CH_3]^+$ de la harmina con el aumento de la energía de colisiones activadas. En los espectros de masas de estos iones se observa el aumento de número de los iones-fragmento y su intensidad. El ion M^+ , para las cuatro energías de colisión, generó en común, los iones-producto $[M-CH_3]^+$ en m/z 197, $[M-CHO]^+$, en m/z 183, y $[M-CH_3-CO]^+$, en m/z 169; mientras el ion-fragmento $[M-CH_3]^+$, generó el ion $[M-CH_3-CO]^+$ en m/z 169 (**Tabla 5**).

Tabla 5. Intensidad (%) de los productos de los iones M^+ y $[M-CH_3]^+$, en el espectro de masas de la harmina (EI , 70 eV), según las energías de colisiones activadas.

Energía de colisión, eV	m/z, Intensidad, %										
	Ion M^+ , m/z 212				Ion $[M-CH_3]^+$, m/z 197						
	197	183	169	115	169	153	142	128	115	101	77
5	100	27,8	57,7	-	100	-	-	-	-	-	-
10	100	25,3	97,2	-	100	-	-	-	-	-	-
15	59,9	16,9	100	-	100	-	-	-	-	-	-
25	15,2	7,0	100	5,5	100	5,5	14,6	42,2	33,9	12,7	6,5

Figura 22. Espectros de masas (*EI*, 70 eV), obtenidos por GC-QqQ-MS, operado en modo de *product-ion scan*, de los iones M^+ y $[M-CH_3]^+$, de la harmina. Aparecen los valores de las corrientes iónicas (áreas en cuentas) para transiciones iónicas estudiadas a diferentes valores de las energías de colisiones activadas: **A.** 5 eV; **B.** 10 eV; **C.** 15 eV y **D.** 25 eV.



La **Figura 23** muestra la variación de los iones-producto con el aumento de la energía de colisiones activadas del ion M^+ y del fragmento $[M-CH_3]^+$ de la tetrahydroharmina (*EI*, 70 eV). Los espectros de masas cambian; la cantidad e intensidad de los iones-hijo varían con la energía de colisiones activadas, el ion M^+ , para las cuatro energías de colisión diferentes, generó iones-producto comunes: $[M-CH_3]^+$, en m/z 201, y $[M-CH_2NH]^+$, en m/z 187; el ion-fragmento $[M-CH_3]^+$, generó el ion $[M-CH_3NH]^+$ en m/z 186, entre otros (**Tabla 6**).

Figura 23. Espectros de masas (*EI*, 70 eV), obtenidos por GC-QqQ-MS, operado en modo de *product-ion scan*, de los iones M^+ y $[M-CH_3]^+$, de la tetrahydroarmina. Aparecen los valores de las corrientes iónicas (áreas en cuentas) para transiciones iónicas estudiadas a diferentes valores de las energías de colisiones activadas: **A.** 5 eV; **B.** 10 eV; **C.** 15 eV y **D.** 25 eV.

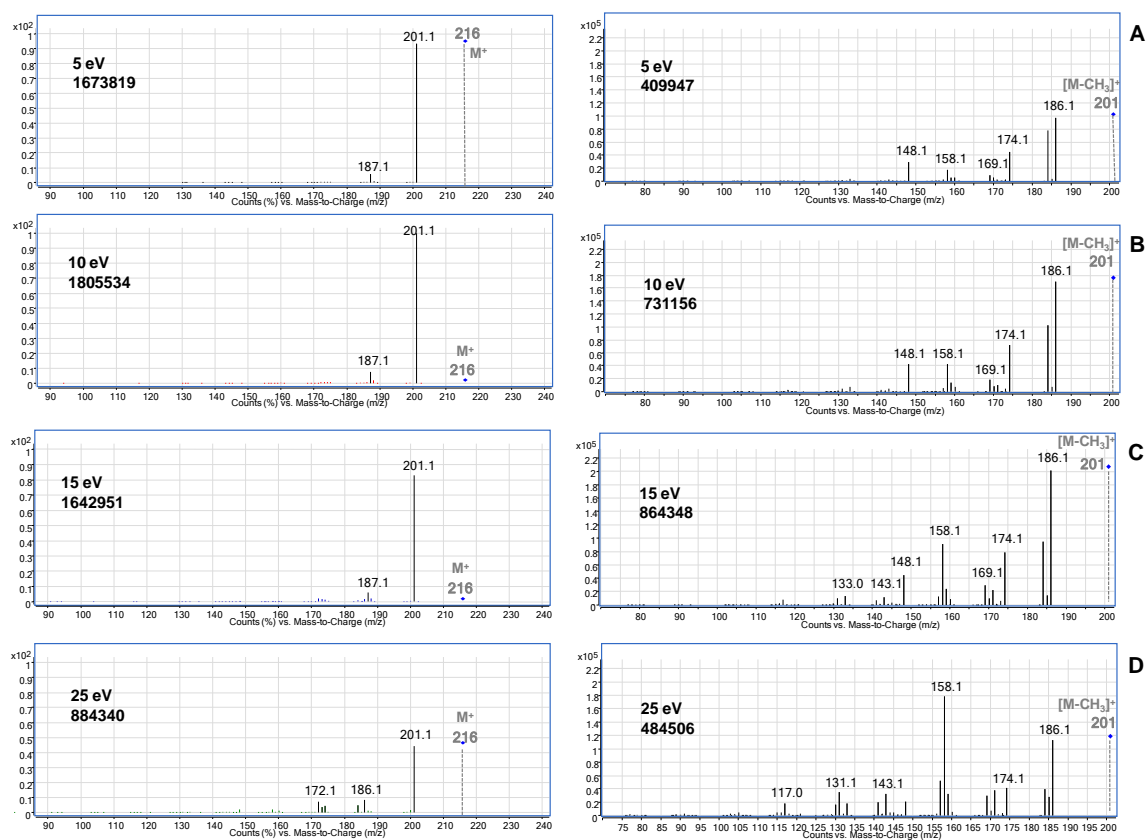


Tabla 6. Intensidad (%) de los productos de los iones M^+ y $[M-CH_3]^+$, en el espectro de masas de la tetrahydroharmina (*EI*, 70 eV), según las energías de colisiones activadas.

Energía de colisión, eV	m/z, Intensidad, %											
	Ion M^+ , m/z 216				Ion $[M-CH_3]^+$, m/z 201							
	201	187	186	172	186	174	169	158	148	143	133	117
5	100	6,1	-	-	100	46,2	8,3	17,0	30,1	-	-	-
10	100	7,1	-	-	100	42,4	10,6	25,1	24,9	-	-	-
15	100	7,1	-	-	100	39,3	14,5	45,6	22,1	6,0	6,6	-
25	100	-	17,2	14,1	63,5	22,9	16,8	100	11,9	18,4	10,3	10,6

5.2.2.4. Barrido de iones-precursores de los fragmentos $[M-CH_3-CO]^+$ y $[M-CHO]^+$ de la harmina y de los fragmentos $[M-CH_3NH]^+$ y $[M-CH_2NH]^+$, de la tetrahydroharmina

Se estudiaron los iones-precursores (iones-padre) de los fragmentos $[M-CH_3-CO]^+$ y $[M-CHO]^+$ de la harmina; así como de los fragmentos $[M-CH_3NH]^+$ y $[M-CH_2NH]^+$ de la tetrahydroharmina, en función de la energía de colisiones activadas, que varió desde 5 a 25 eV (**Tabla 7**).

Tabla 7. Corrientes iónicas de los fragmentos $[M-CH_3-CO]^+$ y $[M-CHO]^+$, de la harmina y de los fragmentos $[M-CH_3NH]^+$ y $[M-CH_2NH]^+$, de la tetrahydroharmina, obtenidos por GC-QqQ-MS (*EI*, 70 eV), en función de la energía de colisiones activadas.

Energía de colisión, eV	Corriente iónica $\times 10^6$, cuentas			
	Precursor \rightarrow 169	Precursor \rightarrow 183	Precursor \rightarrow 187	Precursor \rightarrow 186
5	0,58	0,32	0,07	0,34
10	1,37	0,44	0,08	0,58
15	2,42	0,50	0,08	0,69
25	3,75	0,31	0,02	0,38

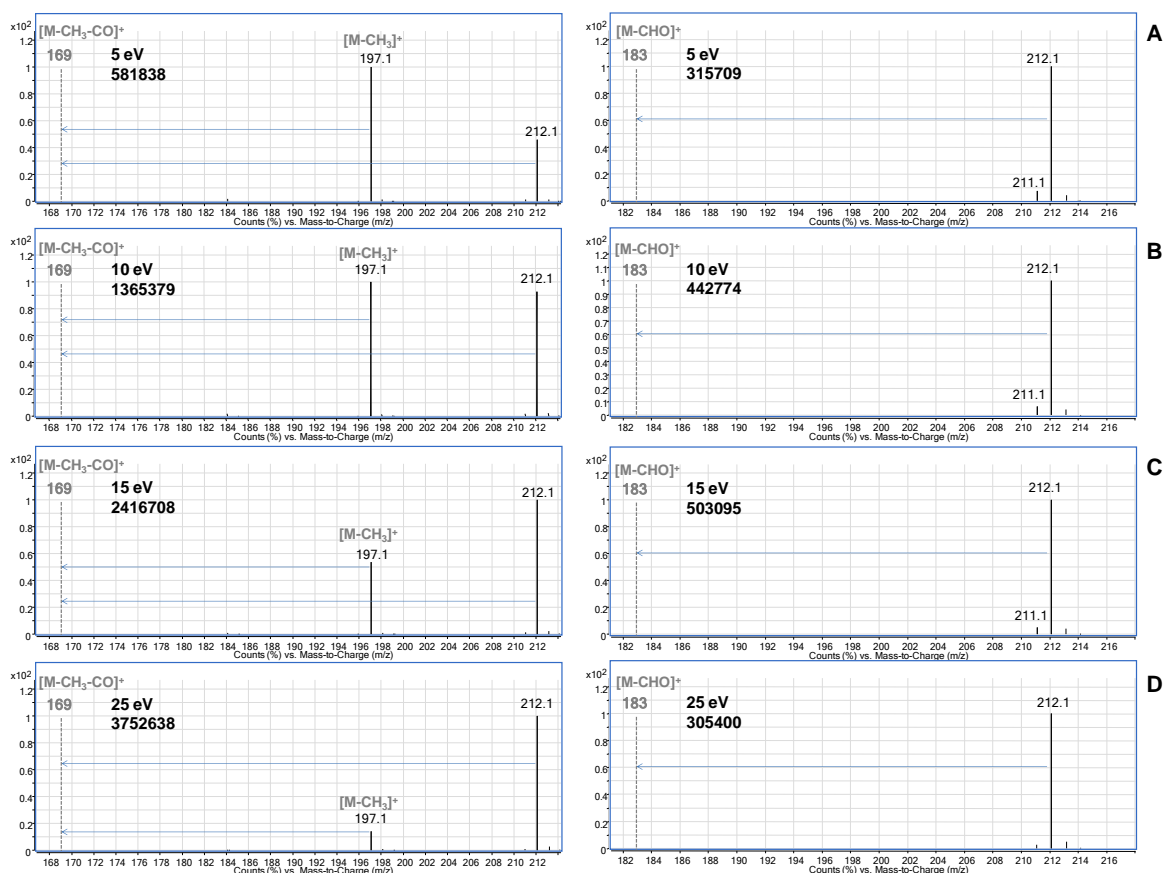
En el caso de la harmina, las corrientes iónicas totales más altas se registraron con las energías de colisiones activadas de 25 y 15 eV, para la formación de los fragmentos $[M-CH_3-CO]^+$ en m/z 169 y $[M-CHO]^+$ en m/z 183, respectivamente. En el espectro de la tetrahydroharmina, las corrientes iónicas más altas se registraron con las energías de colisiones activadas de 10 y 15 eV, para la formación de los fragmentos $[M-CH_2NH]^+$ en m/z 187 y $[M-CH_3NH]^+$ en m/z 186, a partir de sus iones precursores.

La **Figura 24** muestra el cambio de corrientes iónicas totales de precursores (iones-padre) con el aumento de la energía de colisiones activadas de los fragmentos en m/z 169 y m/z 183 de la harmina. El fragmento en m/z 169, proviene de iones $[M-CH_3]^+$ en m/z 197 y del M^+ en m/z 212; con el aumento de la energía de colisión, la intensidad del ion $[M-CH_3]^+$ disminuye y la del ion en m/z 212 aumenta. El fragmento en m/z 183, proviene de los precursores $[M-H]^+$ en m/z 211 y M^+ en m/z 212 (**Tabla 8**).

Tabla 8. Intensidad (%) de los precursores de los fragmentos $[M-CH_3-CO]^+$ y $[M-CHO]^+$, en el espectro de masas de la harmina (E_I , 70 eV), según las energías de colisiones activadas.

Energía de colisión, eV	<i>m/z</i> , Intensidad, %			
	$[M-CH_3-CO]^+$, <i>m/z</i> 169		$[M-CHO]^+$, <i>m/z</i> 183	
	197	212	211	212
5	100	45,7	7,2	100
10	100	98	6,7	100
15	53,6	100	6,3	100
25	13,8	100	-	100

Figura 24. Espectros de masas (*EI*, 70 eV), obtenidos por GC-QqQ-MS, operado en modo de *precursor-ion scan*, de los fragmentos $[M-CH_3-CO]^+$ y $[M-CHO]^+$, de la harmina. Aparecen los valores de las corrientes iónicas (área en cuentas) para transiciones iónicas estudiadas a diferentes valores de las energías de colisiones activadas: **A.** 5 eV; **B.** 10 eV; **C.** 15 eV y **D.** 25 eV.



La **Figura 25** muestra los precursores (iones-padre) y el cambio de intensidades de sus fragmentos en m/z 186 y m/z 187, con el aumento de la energía de colisiones activadas, en el espectro de masas de la tetrahydroharmina. El fragmento en m/z 186 tiene iones-precusores $[M-CH_3]^+$ en m/z 201 y M^+ en m/z 216; solo a 25 eV se registró el ion M^+ como precursor. El ion-fragmento en m/z 187 tiene iones-precusores en m/z 202 y m/z 216; al aumentar la energía de colisiones activadas, la intensidad del ion en m/z 202 aumentó, mientras que la del ion M^+ disminuyó (**Tabla 9**).

Figura 25. Espectros de masas (*EI*, 70 eV), obtenidos por GC-QqQ-MS, operado en modo *precursor-ion scan*, de los fragmentos $[M-CH_3NH]^+$ y $[M-CH_2NH]^+$, de la tetrahydroharmina. Aparecen los valores de las corrientes iónicas (áreas en cuentas) para transiciones iónicas estudiadas a diferentes valores de las energías de colisiones activadas: **A.** 5 eV; **B.** 10 eV; **C.** 15 eV y **D.** 25 eV.

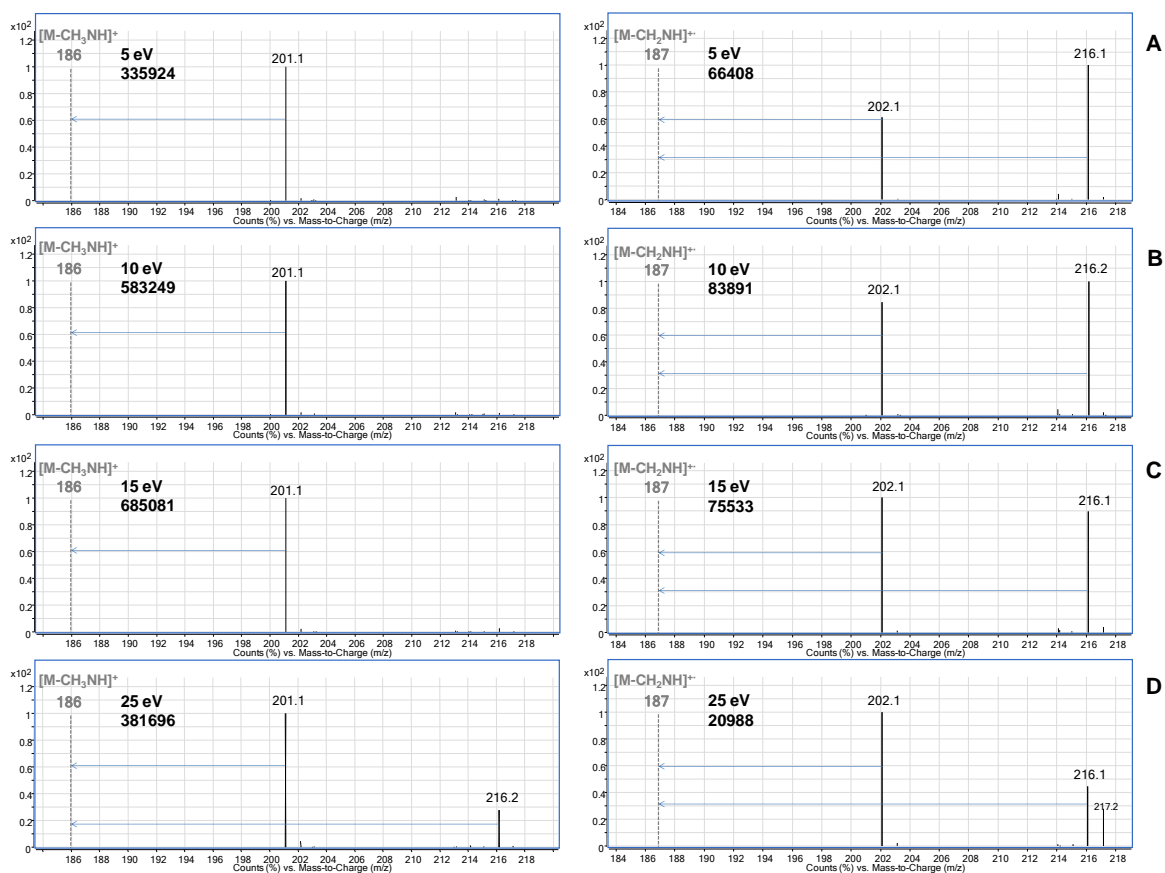


Tabla 9. Intensidad (%) de los precursores de los fragmentos $[M-CH_3NH]^+$ y $[M-CH_2NH]^+$, en el espectro de masas de la tetrahydroharmina (*EI*, 70 eV), según las energías de colisiones activadas.

Energía de colisión, eV	<i>m/z</i> , Intensidad, %			
	$[M-CH_3NH]^+$, <i>m/z</i> 186		$[M-CH_2NH]^+$, <i>m/z</i> 187	
	201	216	202	216
5	100	-	61,1	100
10	100	-	84,4	100
15	100	-	100	89,6
25	100	27,9	100	44,7

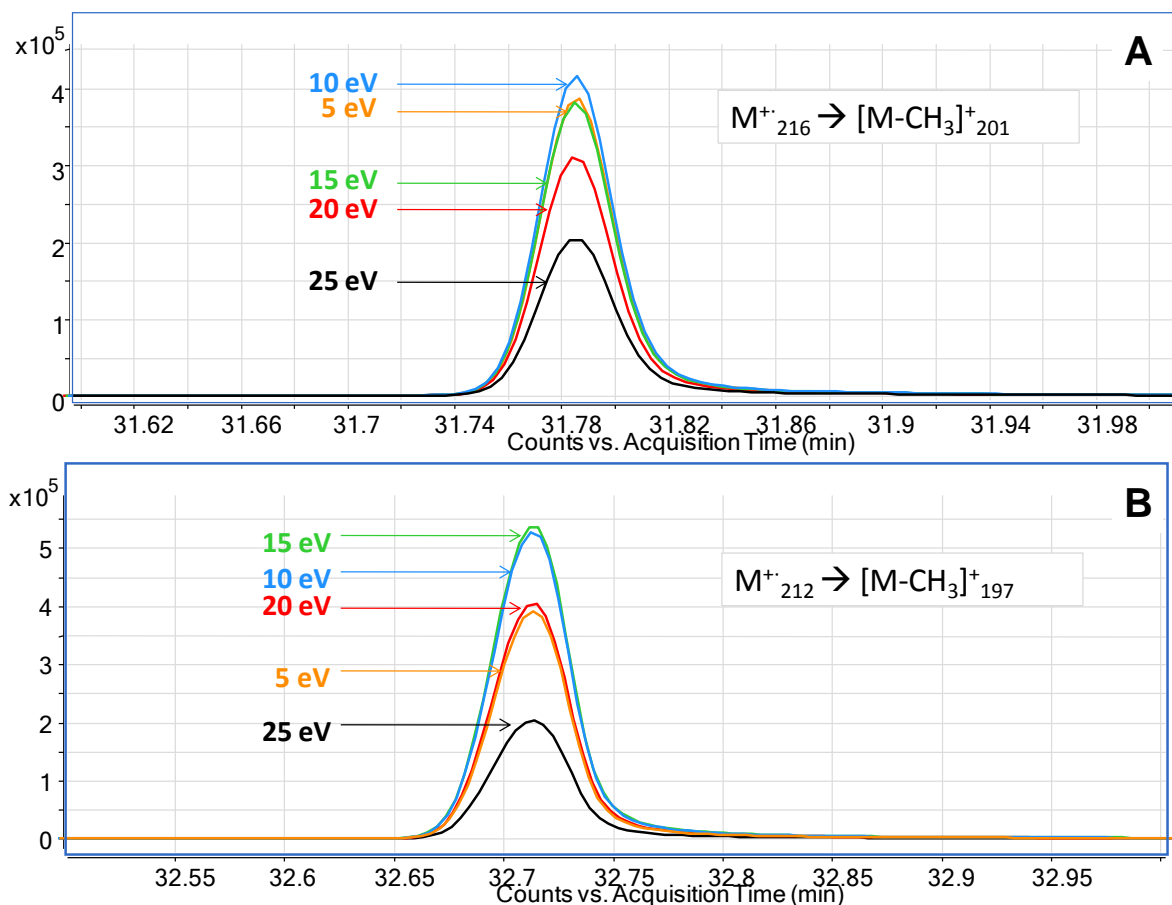
5.2.2.5. Monitoreo de reacciones múltiples: 212→197 y 216→201

Se estudiaron las reacciones de transición $212 \rightarrow 197$ y $216 \rightarrow 201$, a diferentes energías de colisiones activadas. Las corrientes iónicas totales más altas, se obtuvieron a 15 eV, para la harmina, y a 10 eV, para la tetrahydroharmina (**Tabla 10 y Figura 26**).

Tabla 10. Corrientes iónicas totales de las transiciones iónicas $216 \rightarrow 201$ en el espectro de la tetrahydroharmina y $212 \rightarrow 197$, en la de harmina, obtenidas por GC-QqQ-MS (*EI*, 70 eV), en función de la energía de colisiones activadas.

Energía de colisión, eV	$M^+_{216} \rightarrow [M-CH_3]^+_{201}$		$M^+_{212} \rightarrow [M-CH_3]^+_{197}$	
	<i>t_R</i> , min	Corriente iónica $\times 10^6$, cuentas	<i>t_R</i> , min	Corriente iónica $\times 10^6$, cuentas
5	31,79	0,87	32,71	1,11
10	31,79	0,94	32,71	1,51
15	31,79	0,86	32,71	1,55
20	31,79	0,70	32,71	1,16
25	31,79	0,47	32,71	0,60

Figura 26. Corrientes iónicas totales de las transiciones: **A.** $M^{+}_{216} \rightarrow [M-CH_3]^{+}_{201}$ y **B.** $M^{+}_{212} \rightarrow [M-CH_3]^{+}_{197}$, en los espectros de masas de harmina y tetrahydroharmina, obtenidos por GC-QqQ-MS, operado en modo MRM, variando las energías de colisiones activadas.



Se estudió la “resolución” del analizador QqQ-MS, determinada a través de un intervalo en la anchura de pico, en unidades de masa atómica (u.m.a.), medida a la mitad de la altura del pico cromatográfico. Las tres “resoluciones” analizadas (**Tabla 11**), tanto para los iones-precusores (m/z 212 y 216) como para los iones-producto (m/z 197 y 201) fueron *Unit* (0,7 u.m.a.), *Wide* (1,2 u.m.a.) y *Widest* (2.5 u.m.a.). Para los dos alcaloides, harmina y tetrahydroharmina, se observó que la combinación “*Widest-Widest*” tuvo la sensibilidad más alta, mientras que con la

combinación “Unit-Unit” se podrá alcanzar una selectividad mucho más alta (Figura 27).

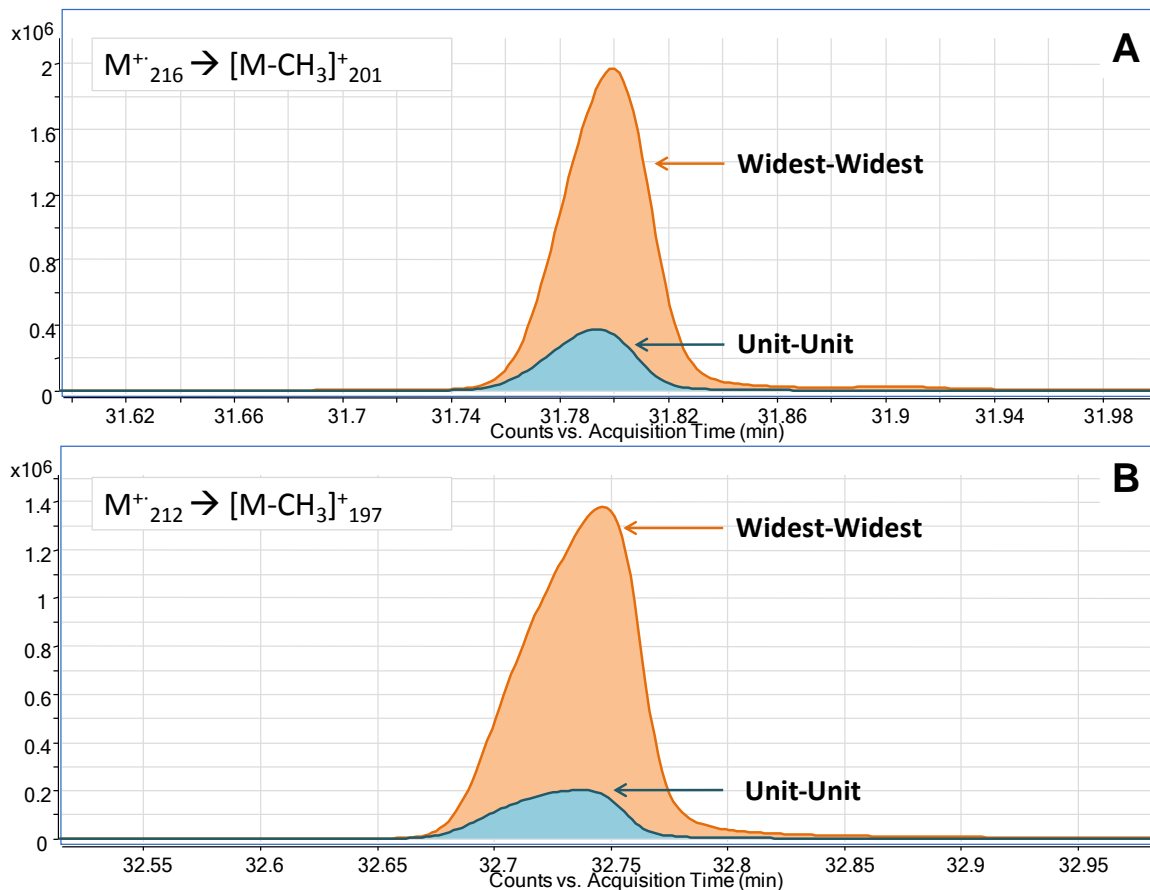
Tabla 11. Corrientes iónicas totales ($\times 10^6$, cuentas) de las transiciones de iones 216 \rightarrow 201 (10 eV) de la tetrahydroharmina y 212 \rightarrow 197 (15 eV) de la harmina, según la “resolución” en ambos analizadores.

Precursor 216, 212/ modo de adquisición	Producto 201, 197/ modo de adquisición					
	<i>Widest</i>		<i>Wide</i>		<i>Unit</i>	
	10 eV	15 eV	10 eV	15 eV	10 eV	15 eV
<i>Widest</i>	3,63	3,66	1,79	1,49	1,06	0,84
<i>Wide</i>	2,26	2,46	1,41	1,09	0,84	0,64
<i>Unit</i>	1,39	1,58	0,89	0,80	0,56	0,45

El monitoreo de la reacción de transición de iones 212 \rightarrow 197 y 216 \rightarrow 201 permite aumentar la especificidad del analizador de masas QqQ, porque elimina virtualmente todas las coincidencias entre las señales de iones propios de los alcaloides y las del ruido o *background* químico del equipo. El modo de adquisición MRM, de esta manera, es adecuado para la detección de los alcaloides *harmala* en matrices complejas como fluidos fisiológicos (orina, sangre, plasma, etc.).

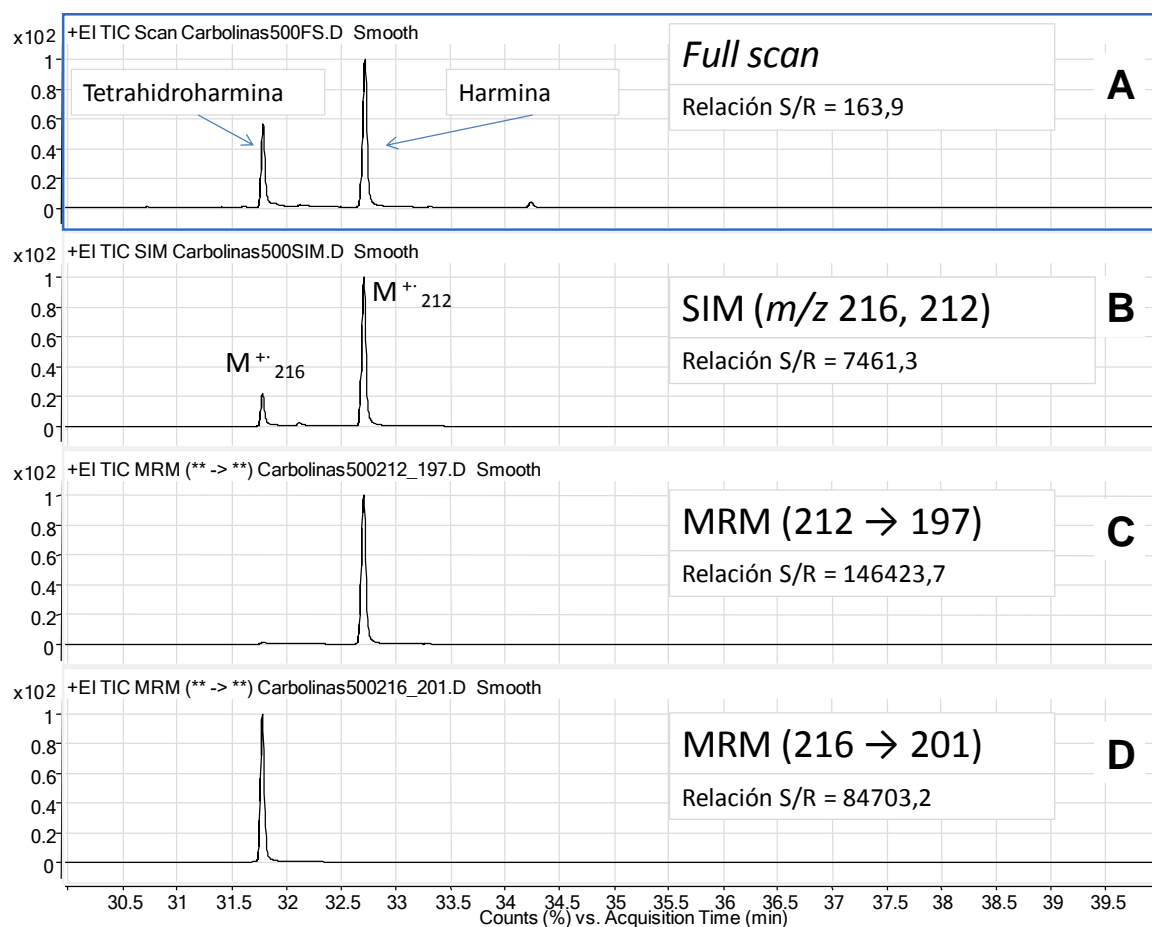
Los tiempos de retención de harmina y tetrahydroharmina en MRM, también coincidieron con los obtenidos en modo de adquisición por SIM, barrido de iones-precursor y de iones-producto, lo que permitió confirmar inequívocamente la presencia de estos alcaloides en la muestra preparada por LLE de la corteza de *B. caapi*.

Figura 27. Corrientes iónicas totales, obtenidas por MRM-GC-QqQ-MS de las transiciones: **A.** $M^{+}_{216} \rightarrow [M-CH_3]^{+}_{201}$ y **B.** $M^{+}_{212} \rightarrow [M-CH_3]^{+}_{197}$, en función de la combinación de los parámetros de “resolución” del analizador QqQ.



En la **Figura 28** aparecen corrientes iónicas totales de la harmina y tetrahydroharmina, adquiridos en los modos *full scan*, SIM y MRM; se puede apreciar que el modo MRM se destaca por su alta selectividad, debido a la relación S/R más alto.

Figura 28. Corrientes iónicas totales de los alcaloides *harmala*, obtenidas por GC-QqQ-MS, operado en los modos: **A.** *Full scan*; **B.** SIM (m/z 216, 212); **C.** MRM (212 \rightarrow 197) y **D.** MRM (216 \rightarrow 201). En el modo MRM se observa la relación S/R mucho más alta, en comparación con las obtenidas en los modos de adquisición *full scan* o SIM.

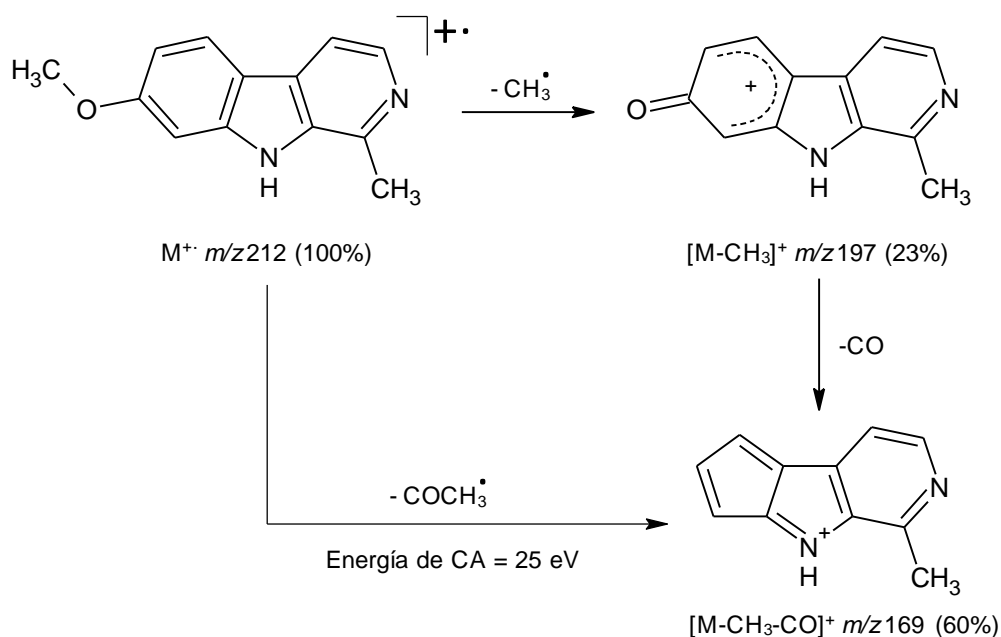


5.2.3. Rutas de fragmentación

Con base en los resultados obtenidos en los espectros de masas de iones-productos y precursores, se propusieron esquemas de fragmentación de la harmina y de la tetrahydroharmina.

La **Figura 29**, muestra el patrón de fragmentación de la harmina. Los espectros de masas, tomados a diferentes energías de colisiones activadas, evidenciaron que, la disociación del ion molecular sigue procesos de fragmentación competitivos, paralelos y sucesivos; algunos iones M^+ , perdieron directamente el fragmento de 43 unidades ($\cdot\text{CH}_3\text{-CO}$) (Véase **Figura 24**), mientras que otros, en forma sucesiva (Véase **Figura 22**): primero, fue la pérdida del radical metilo con formación del catión $[\text{M}-\text{CH}_3]^+$ en m/z 197, y luego, la eliminación a partir de éste, de la molécula CO, con la aparición del catión $[\text{M}-\text{CH}_3\text{-CO}]^+$ en m/z 169.

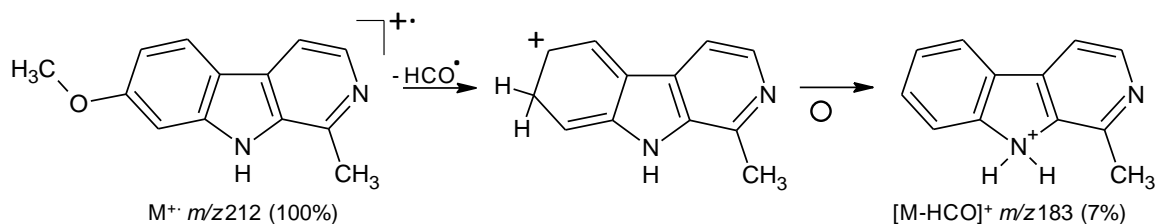
Figura 29. Formación de iones $[\text{M}-\text{CH}_3]^+$ en m/z 197 y $[\text{M}-\text{CH}_3\text{-CO}]^+$ en m/z 169 a partir del ion M^+ en m/z 212 de la harmina. CA – Colisiones activadas.



Otra relación típica encontrada en los espectros de masas de la harmina está relacionada con los iones en m/z 212 y m/z 183. El ion-fragmento $[\text{M}-\text{CHO}]^+$ en m/z 183 se forma por migración de hidrógeno del carbono metílico enlazado con el oxígeno al carbono del anillo aromático y posterior transposición de otro átomo de

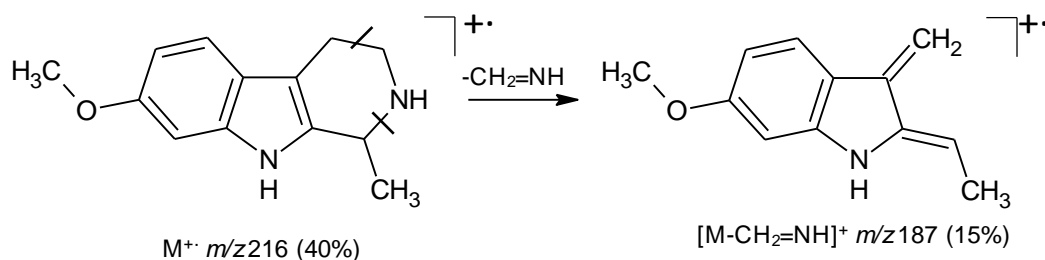
hidrógeno, proceso que se acompaña por la deslocalización la carga positiva, según la ruta de fragmentación propuesta por Coutts *et. al.*, 1970 (**Figura 30**).

Figura 30. Formación del ion $[M-CHO]^+$ en m/z 183 a partir del ion M^+ en m/z 212 de la harmina.



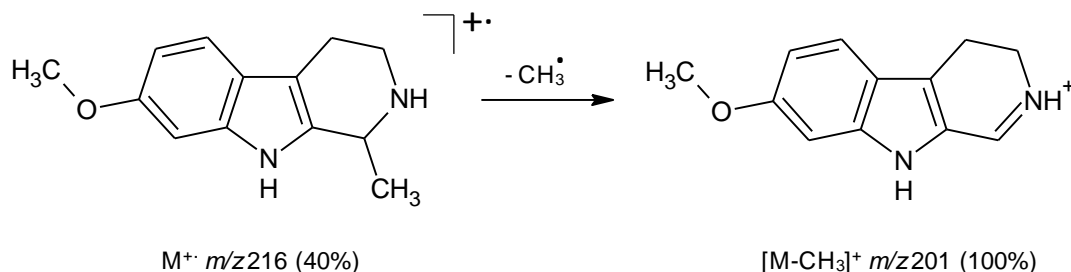
La tetrahydroharmina presenta en todos sus espectros de masas, la relación típica entre los iones en m/z 216 y m/z 187, correspondiente a la ruptura retro-Diels-Alder (RDA), que es característica para aquellos compuestos, que poseen un ciclo de seis miembros con un enlace doble. La ruptura RDA en la molécula de la tetrahydroharmina sucede por pérdida del fragmento $CH_2=NH$ (**Figura 31**).

Figura 31. Formación del catión-radical $[M-CH_2=NH]^+$ en m/z 187, por ruptura retro-Diels-Alder (RDA) del ion M^+ en m/z 216 de la tetrahydroharmina.



Otra relación típica encontrada en los espectros de la tetrahydroharmina está relacionada con los iones en m/z 216 y m/z 201. El ion-fragmento $[M-CH_3]^+$ en m/z 201 se forma por la pérdida del radical metilo (**Figura 32**).

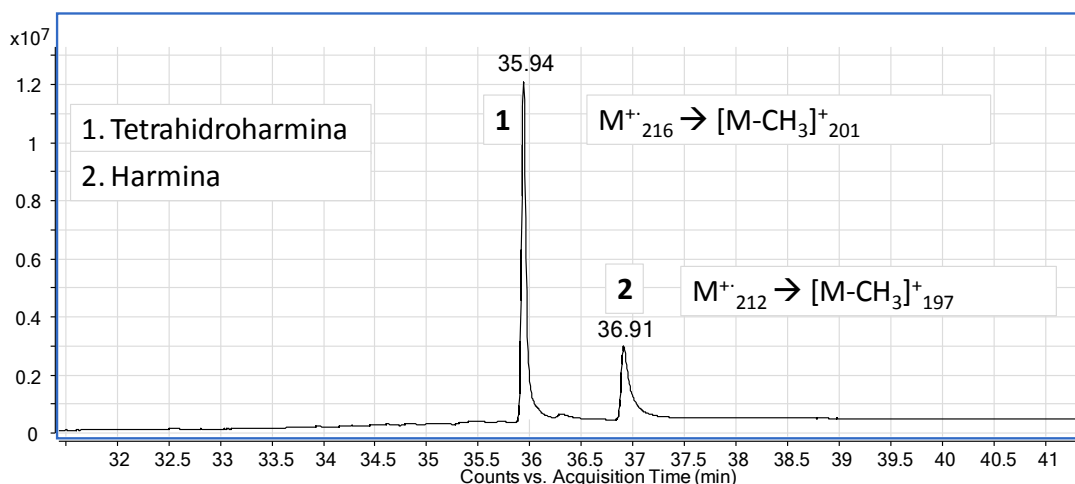
Figura 32. Formación del catión $[M-CH_3]^+$ en m/z 201 a partir del ion M^+ en m/z 216 de la tetrahydroharmina.



5.2.4. Análisis de la orina

Usando el método de adquisición por MRM y transiciones iónicas $212 \rightarrow 197$ y $216 \rightarrow 201$, en la muestra de orina, se encontraron los alcaloides harmina ($t_R = 36,91$ min) y tetrahydroharmina ($t_R = 35,94$ min). Los tiempos de retención de estos alcaloides en la muestra de orina, coincidieron con los de los alcaloides *harmala*, presentes en el extracto LLE obtenido de la corteza de *B. caapi* (**Figura 33**).

Figura 33. Fragmentograma obtenido por MRM-GC-QqQ-MS para transiciones de iones $216 \rightarrow 201$ y $212 \rightarrow 197$, de los alcaloides tetrahydroharmina y harmina, presentes en el extracto de la orina, obtenida de un consumidor de yagé, ocho horas después de su consumo.



5.2.5. Ensayo de derivatización con deuterio

El cambio de los hidrógenos lábiles en las moléculas de la harmina y la tetrahydroharmina, se llevó a cabo *in situ*, directamente en el inyector de GC (250 °C), mezclando los alcaloides disueltos en dioxano con el agua pesada, D₂O (Véase especificaciones de reactivos en la **Tabla 3**). Los tiempos de retención de los alcaloides y sus análogos deuterados fueron iguales, ya que coeluyen en la columna.

Sin embargo, en los espectros de masas de la harmina (**Figura 34**) y de la tetrahydroharmina (**Figura 35**), aparecen iones moleculares deuterados: harmina, Md₁⁺ en *m/z* 213, y tetrahydroharmina, Md₁⁺, en *m/z* 217 (deuteración parcial) y Md₂⁺, en *m/z* 218 (intercambio de dos hidrógenos lábiles).

Figura 34. Espectro de masas (*EI*, 70 eV), obtenidos por GC-QqQ-MS (*full scan*) de: **A.** Harmina y **B.** Su análogo deuterado. Aparecen los iones-fragmento [Md₁-CH₃]⁺ en *m/z* 198 y [Md₁-CH₃-CO]⁺ en *m/z* 170, en la harmina deuterada.

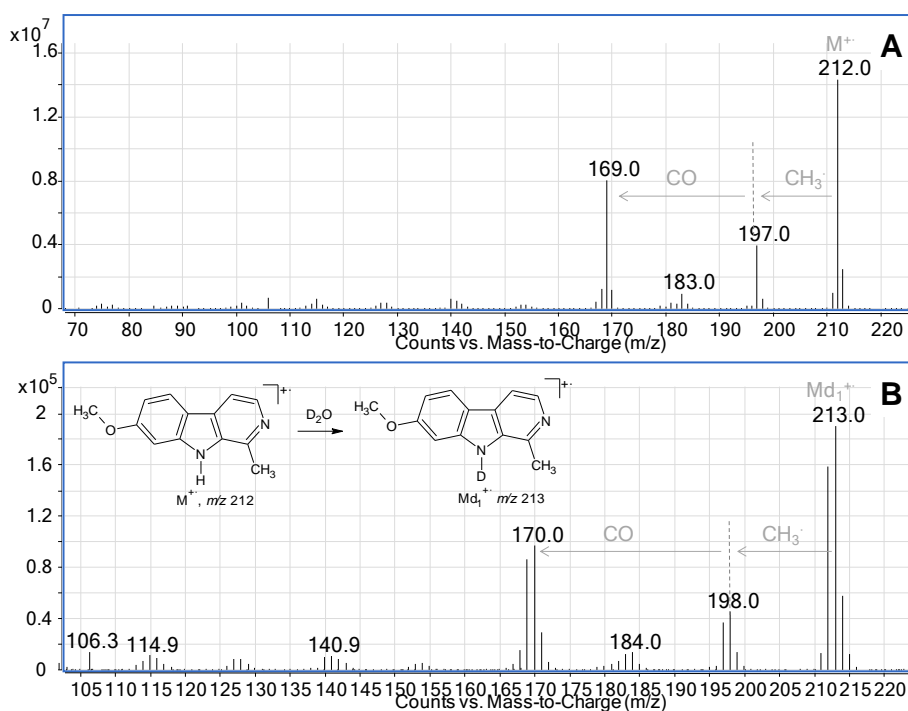
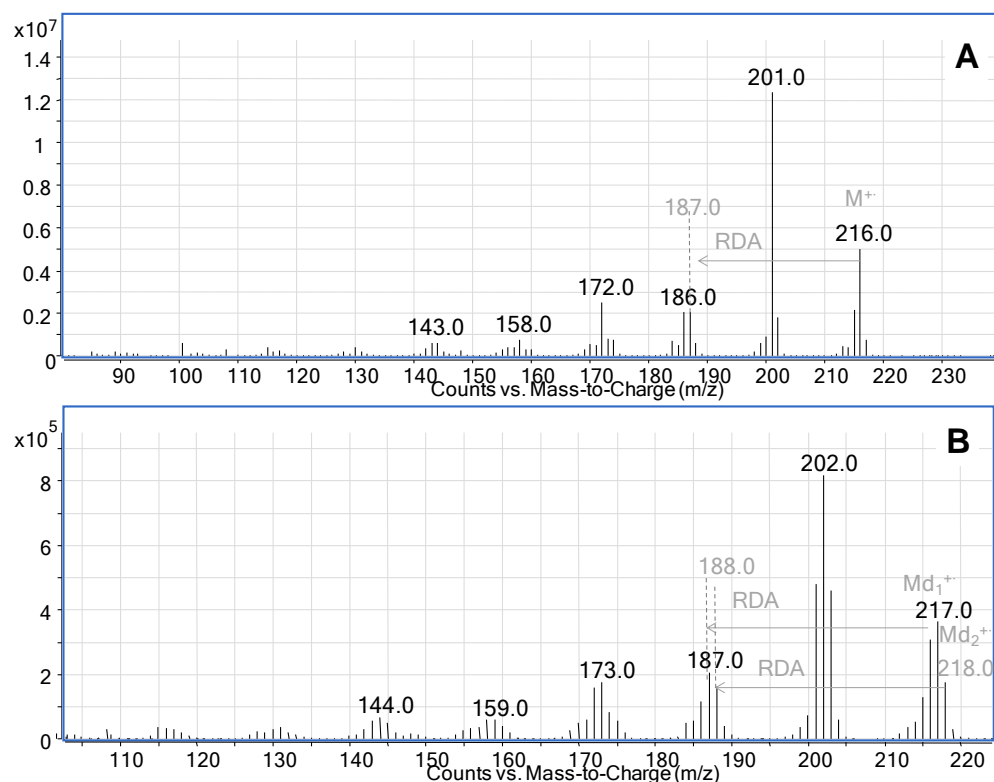
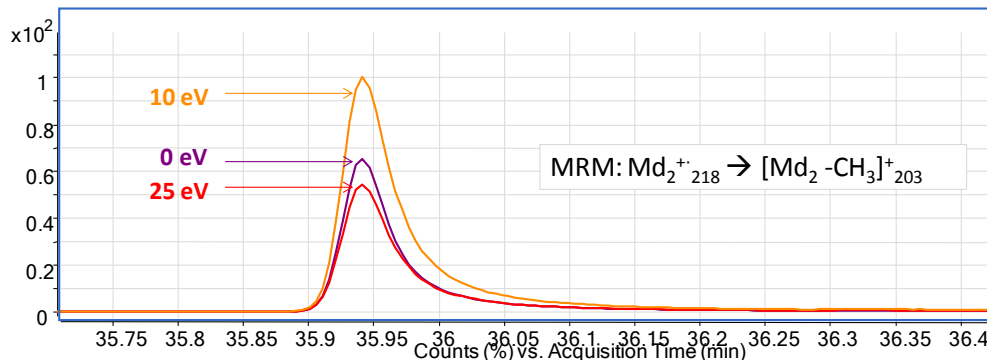


Figura 35. Espectro de masas (*EI*, 70 eV), obtenidos por GC-QqQ-MS (*full scan*), de: **A.** Tetrahydroharmina y **B.** Su análogo deuterado. En la tetrahydroharmina deuterada, aparecen los fragmentos en m/z 187 y m/z 188, correspondientes a la ruptura retro-Diels-Alder, de los iones moleculares mono- y di- deuterados.



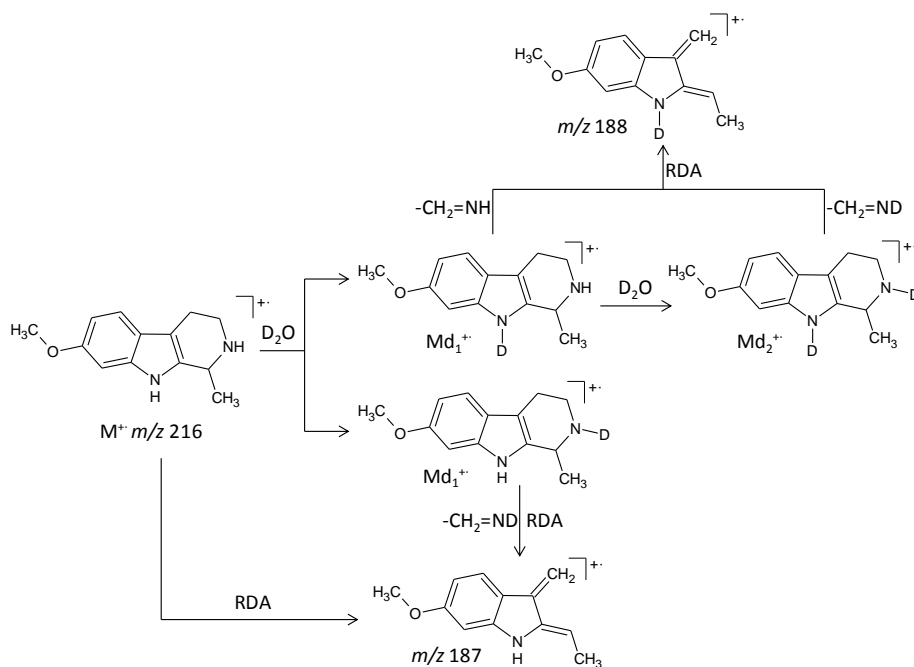
Se realizó una adquisición en modo MRM, siguiendo la reacción de transición $218 \rightarrow 213$, que confirmó el cambio total de los hidrógenos lábiles por deuterios, en la molécula de la tetrahydroharmina (**Figura 36**).

Figura 36. Corrientes iónicas totales, obtenidas por MRM-GC-QqQ-MS de la transición 218 → 203, de la tetrahydroarmina deuterada, variando las energías de colisiones activadas.



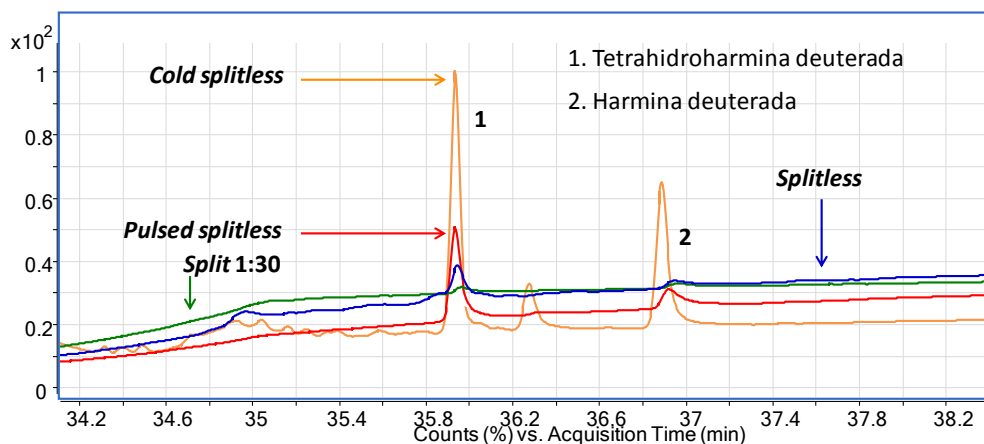
La **Figura 37** muestra el esquema de fragmentación (ruptura retro-Diels-Alder) en las moléculas deuteradas de la tetrahydroarmina y la formación de los iones en m/z 187 y m/z 188.

Figura 37. Formación de iones $[\text{Md}_1\text{-CH}_2\text{=ND}]^+$ en m/z 187, $[\text{Md}_1\text{-CH}_2\text{=NH}]^+$ y $[\text{Md}_2\text{-CH}_2\text{=ND}]$ en m/z 188, por ruptura retro-Diels-Alder, de las moléculas deuteradas de la tetrahydroarmina.



Otro estudio, que se realizó con los derivados deuterados, fue el modo de inyección. Se compararon los modos de inyección *split* 1:30, *splitless*, *pulsed splitless* y *cold splitless*, bajo las mismas condiciones cromatográficas (temperatura y volumen de inyección) y se pudo corroborar que el orden de respuesta (mayores corrientes iónicas) fue *split* 1:30 < *splitless* < *pulsed splitless* < *cold splitless* (**Figura 38**). En los modos de inyección, *split* y *splitless*, el grado de la deuteración fue bajo, mientras que la señal más alta, se obtuvo con el modo *cold splitless*.

Figura 38. Perfiles cromatográficos típicos, obtenidos por GC-QqQ-MS, con inyección en modo *split* (1:30), *splitless*, *pulsed splitless* y *cold splitless*, de una mezcla de alcaloides *harmala* y el agua deuterada, presentes en el extracto LLE obtenido de la corteza de *B. caapi*.

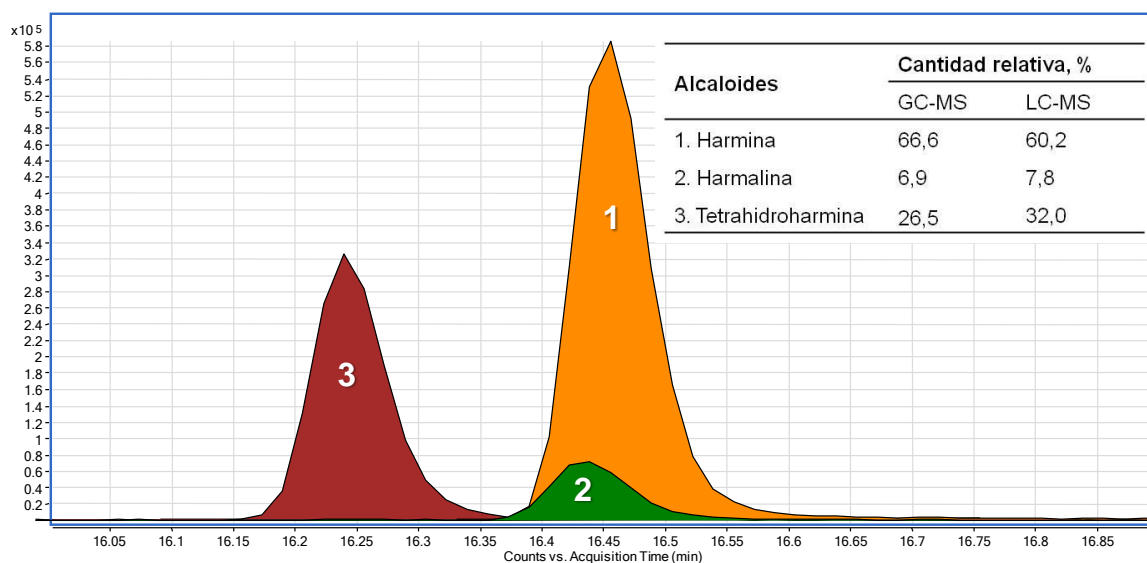


5.3. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS

5.3.1. Cantidad relativa de los alcaloides *harmala* aislados por LLE de la corteza de *B. caapi*

Se determinaron las masas exactas de los iones moleculares protonados, MH^+ , de los alcaloides bajo estudio y se calcularon con base en las áreas cromatográficas (corrientes iónicas extraídas), sus cantidades relativas; el alcaloide mayoritario fue la harmina ($60,2 \pm 0,7\%$), seguido de la tetrahydroharmina ($32,0 \pm 0,3\%$) y, en menor cantidad, se encontró la harmalina ($7,8 \pm 0,4\%$). Estos resultados, mostraron una buena coincidencia con los obtenidos por la técnica de GC-MS (**Figura 39**). Con base en la medición de masas exactas y composiciones elementales ($\Delta ppm < 3$), se determinó la identidad química de los alcaloides *harmala* (**Tabla 12**).

Figura 39. Corrientes iónicas extraídas y cantidades relativas (%), obtenidas por LC-ESI(+)-TOF-MS, de los alcaloides *harmala*, aislados por LLE de la corteza de *B. caapi*.

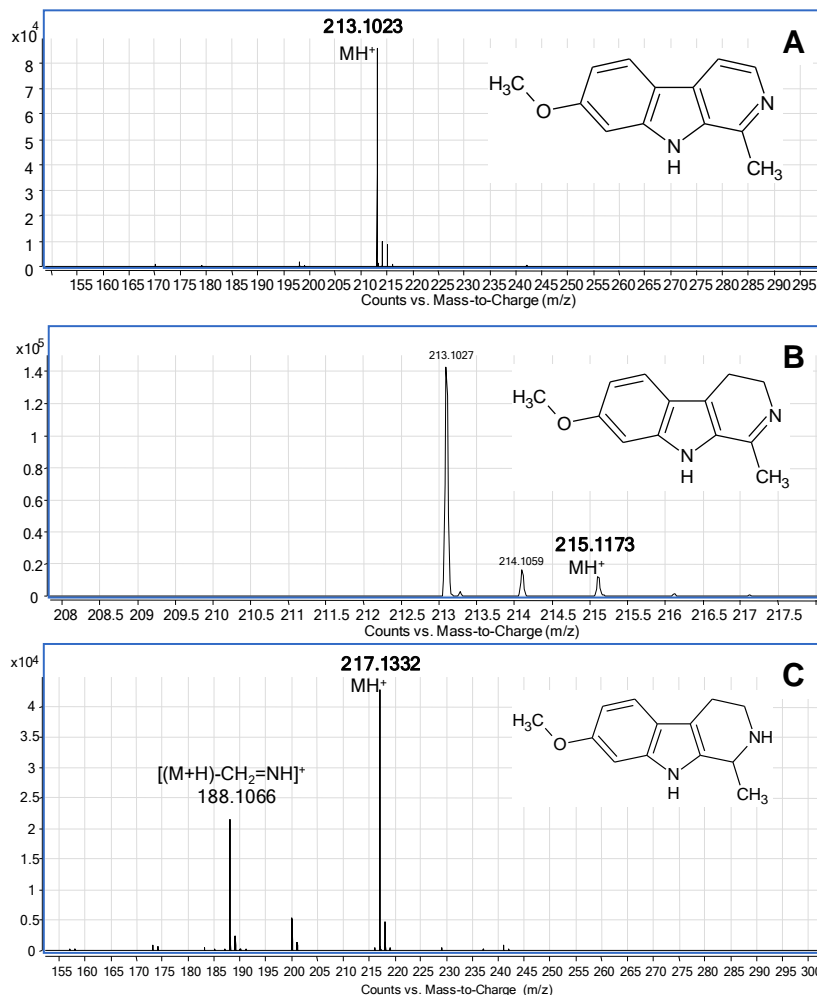


La **Tabla 12** resume la información sobre la cantidad relativa (%) y los errores en la medición de masas (Δ ppm) de los iones MH^+ de cada alcaloide. Las corrientes iónicas extraídas fueron construidas con base en masas exactas de iones moleculares protonados y usando las fórmulas condensadas de los alcaloides bajo estudio (**Figura 40**).

Tabla 12. Cantidad relativa y determinación por LC-ESI(+)-TOF-MS de masas exactas de iones moleculares protonados MH^+ , de los alcaloides *harmala*, aislados por LLE de la corteza de *B. caapi*.

Alcaloides	Cantidad relativa, % \pm SD (n= 3)	Masas		
		Calculada	Experimental	Δ ppm
Harmina	60,2 \pm 0,7	213,1022	213,1023	0,48
Harmalina	7,8 \pm 0,4	215,1179	215,1173	2,64
Tetrahydroharmina	32,0 \pm 0,3	217,1335	217,1332	1,75

Figura 40. Espectros de masas, obtenidos por LC-ESI(+)-TOF-MS, de los alcaloides *harmala*: **A.** Harmina; **B.** Harmalina y **C.** Tetrahydroharmina. $V_{cap} = 1000$ V, $V_{frag.} = 150$ V.

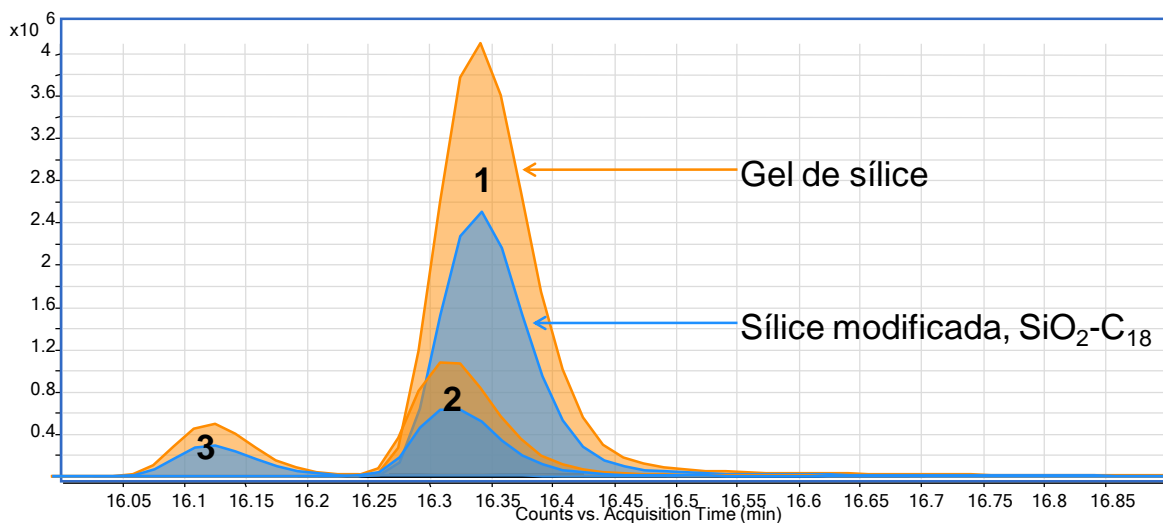


5.3.2. Cantidad relativa de los alcaloides *harmala* aislados por MSPD de la corteza de *B. caapi*

La extracción MSPD se realizó utilizando dos agentes dispersantes, gel de sílice y sílice modificada, SiO_2 -C18 y, como eluyente, metanol. La mayor cantidad de alcaloides se obtuvo cuando se usó el gel de sílice (**Figura 41**). Esto se debe, posiblemente, a una mayor afinidad de este agente dispersante con los alcaloides,

que son sustancias polares, y tuvieron una mayor adsorción sobre su superficie durante la maceración con el material vegetal.

Figura 41. Corrientes iónicas de los iones moleculares protonados, obtenidos por LC-ESI(+)-TOF-MS: 1. Harmina; 2. Harmalina y 3. Tetrahydroharmina, aislados por MSPD de la corteza de *B. caapi* usando diferentes agentes dispersantes.



La cantidad relativa (%) de los alcaloides presentes en los extractos obtenidos por MSPD con ambos agentes dispersantes fueron similares (**Tabla 13**), pero difirieron de las obtenidas por la técnica de extracción con disolventes orgánicos (metanol y cloroformo) (Véase **Figura 39**), ya que la técnica LLE, aunque posee la desventaja de usar volúmenes grandes de disolvente, es más eficiente, dada su “plasticidad” en los parámetros de solubilidad y pH.

Tabla 13. Cantidad relativa (%) por LC-ESI(+)-TOF-MS, de los alcaloides *harmala* presentes en el extracto obtenido por MSPD de la corteza de *B. caapi*, usando dos agentes dispersantes.

Alcaloides	Cantidad relativa, % \pm SD (n=3)	
	Gel de sílice	Sílice modificada, SiO ₂ -C ₁₈
Tetrahydroharmina	6,4 \pm 1,0	7,6 \pm 0,3
Harmalina	19,2 \pm 0,6	19,4 \pm 0,9
Harmina	74,5 \pm 0,4	73,1 \pm 0,6

5.3.3. Influencia de voltajes del capilar y *fragmentor* sobre las corrientes iónicas de iones MH⁺ y sus fragmentos

En un equipo de LC-MS, las variables a optimizar para una detección sensible son: 1). La fase móvil (composición, pH); 2). El flujo de nitrógeno o gas nebulizador; 3). El flujo de la fase móvil en la columna; 4). El voltaje del capilar y 5). El voltaje del *fragmentor*. En este estudio, las tres primeras variables se mantuvieron constantes en todos los experimentos (Véase **Sección 4.7.3.**); se cambiaban los voltajes del capilar y del *fragmentor*, que conducen a las corrientes iónicas más altas, dependiendo de la naturaleza química del analito.

El primer parámetro a estudiar, para obtener las corrientes iónicas más altas de cada uno de los alcaloides *harmala*, fue el voltaje del capilar. Los voltajes del capilar variaron desde 1000 a 5000 V, en combinación con diferentes voltajes del *fragmentor*.

Las **Tablas 14-16** muestran la respuesta, *i.e.*, corrientes iónicas, obtenidas para los alcaloides harmina, harmalina y tetrahydroharmina, en función de los voltajes del capilar y *fragmentor*, respectivamente.

Tabla 14. Corrientes iónicas ($\times 10^6$, cuentas) del ion MH^+ (m/z 213,1022) de la harmina, obtenidas por LC-ESI(+)-TOF-MS, según diferentes voltajes del capilar y *fragmentor* usados.

Voltaje del <i>fragmentor</i>, V	Voltaje del capilar, V				
	1000	2000	3000	4000	5000
100	3,11	1,49	1,27	1,10	1,01
150	3,94	1,81	1,37	1,17	0,98
200	3,37	1,60	1,21	1,02	0,88
250	1,23	0,62	0,51	0,43	0,39

Tabla 15. Corrientes iónicas ($\times 10^6$, cuentas) del ion MH^+ (m/z 215,1179) de la harmalina, obtenidas por LC-ESI(+)-TOF-MS, según diferentes voltajes del capilar y *fragmentor* usados.

Voltaje del <i>fragmentor</i>, V	Voltaje del capilar, V				
	1000	2000	3000	4000	5000
100	0,48	0,25	0,22	0,20	0,17
150	0,60	0,29	0,23	0,19	0,17
200	0,49	0,24	0,20	0,17	0,15
250	0,18	0,10	0,08	0,08	0,07

Tabla 16. Corrientes iónicas ($\times 10^5$, cuentas) del ion MH^+ (m/z 217,1335) de la tetrahydroharmina, obtenidas por LC-ESI(+)-TOF-MS, según diferentes voltajes del capilar y *fragmentor* usados.

Voltaje del <i>fragmentor</i>, V	Voltaje del capilar $\times 10^5$, V				
	1000	2000	3000	4000	5000
100	3,76	2,50	2,39	2,17	2,07
150	3,09	1,92	1,66	1,47	1,31
200	0,13	0,13	0,11	0,11	0,11
250	0,03	0,04	0,03	0,03	0,05

Las corrientes iónicas más altas de iones protonados de los alcaloides *harmala*, fueron observadas a voltajes bajos (1000 V) del capilar. Los resultados obtenidos en este trabajo fueron diferentes a los publicados por Barceló-Barrachina *et al.* (2004) y de Kikura-Hanajiri *et al.* (2005), en sus trabajos se usaron voltajes de 3000 y 3500 V, respectivamente, y no se hizo la optimización de este parámetro. Las **Figuras 42-44** muestran los resultados, en forma grafica, de los ensayos realizados para encontrar los mejores valores del voltaje del capilar que permitieron obtener la respuesta (corriente iónica del ion extraído) más alta.

Figura 42. Corrientes iónicas del ion MH^+ ($C_{13}H_{13}N_2O$, m/z 213,1022) de la harmina, obtenidas por LC-ESI(+)-TOF-MS, en función de diferentes voltajes del capilar y *fragmentor*.

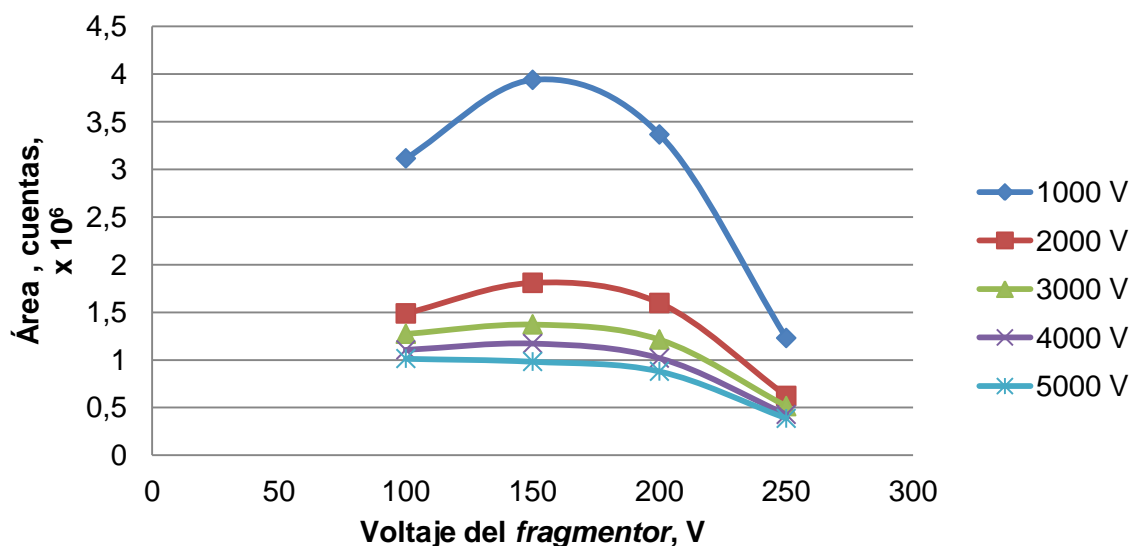


Figura 43. Corrientes iónicas del ion MH^+ ($C_{13}H_{15}N_2O$, m/z 215,1179) de la harmalina, obtenidas por LC-ESI(+)-TOF-MS, en función de diferentes voltajes del capilar y *fragmentor*.

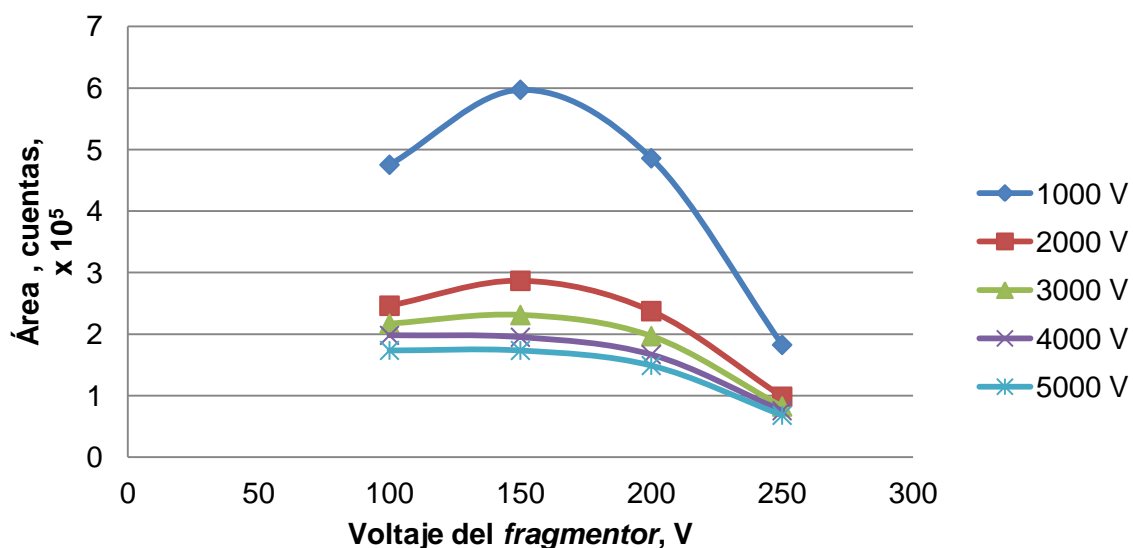
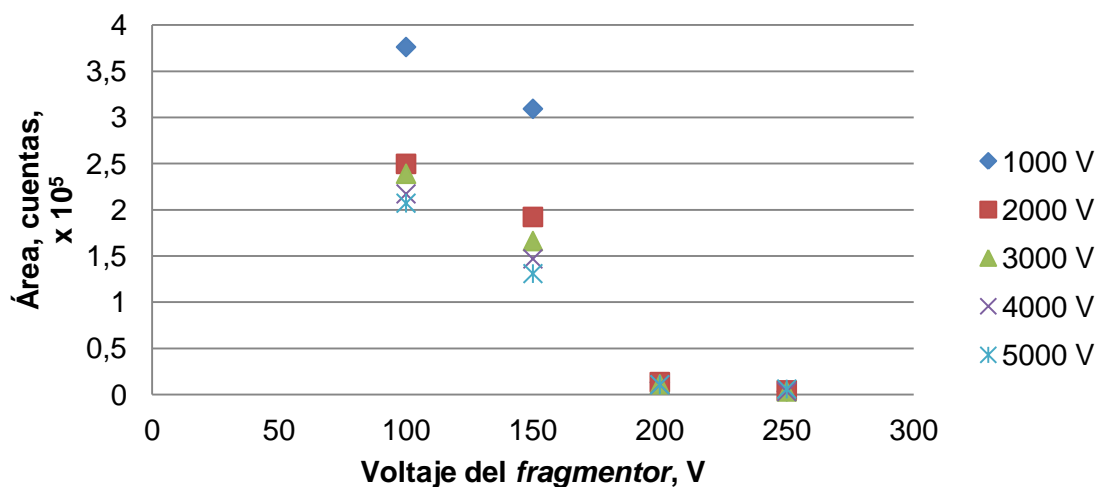
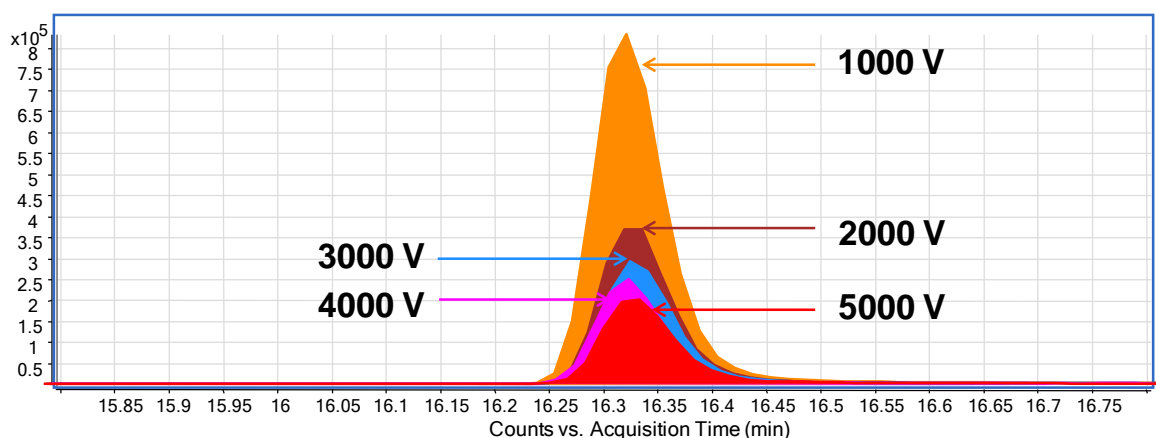


Figura 44. Corrientes iónicas del ion MH^+ ($C_{13}H_{17}N_2O$, m/z 217,1335) de la tetrahydroharmina, obtenidas por LC-ESI(+)-TOF-MS, en función de diferentes voltajes del capilar y *fragmentor*.



Se determinó, que las corrientes de iones moleculares protonados se disminuyen notablemente con el aumento de voltaje del capilar. Por ejemplo, para harmina, el alcaloide mayoritario en los extractos de *B. caapi*, el área del pico del MH^+ disminuyó a la mitad, cuando el voltaje aumentó de 1000 a 2000 V (**Figura 45**).

Figura 45. Corrientes iónicas extraídas (EIC) del ion molecular protonado MH^+ (m/z 213,1022) de la harmina, obtenidas por LC-ESI(+)-TOF-MS, según el voltaje del capilar, V_{cap} . El voltaje del *fragmentor* se mantuvo constante en 150 V.



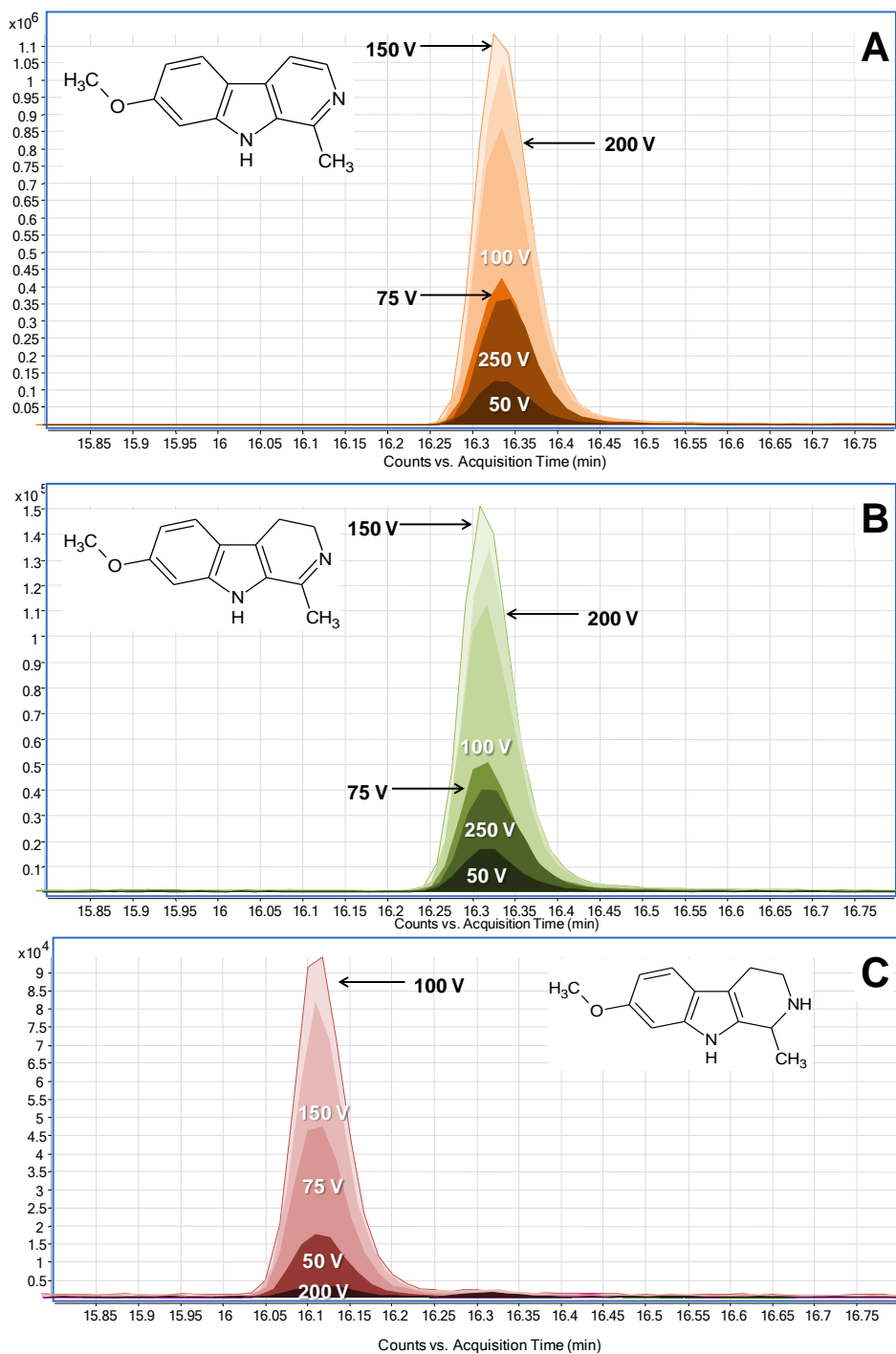
Con base en la tendencia observada (Véase **Figura 44**), se consideró interesante explorar también valores más bajos de voltaje del *fragmentor*. Estos resultados aparecen en la **Tabla 17**.

Tabla 17. Corrientes iónicas de los iones MH^+ de los alcaloides *harmala*, obtenidas por LC-ESI(+)-TOF-MS, según diferentes voltajes del *fragmentor* ($V_{cap} = 1000$ V).

Voltaje del <i>fragmentor</i> , V	Corrientes iónicas $\times 10^6$		
	Harmina, MH^+ m/z 213,1022	Harmalina, MH^+ m/z 215,1179	Tetrahidroharmina, MH^+ m/z 217,1335
50	0,60	0,08	0,09
75	1,90	0,24	0,22
100	4,02	0,52	0,42
150	5,32	0,69	0,34
200	4,76	0,60	0,02
250	1,74	0,20	0,01

Las corrientes iónicas más altas de iones protonados de los alcaloides harmina y harmalina fueron obtenidos, cuando el voltaje del *fragmentor* se fijó en 150 V, mientras que para tetrahidroharmina, en 100 V. La **Figura 46** muestra el cambio en la respuesta (corrientes iónicas) para cada valor de voltaje del *fragmentor*, en el caso de tetrahidroharmina, a voltajes mayores de 150 V, las corrientes iónicas del ion MH^+ disminuyeron notablemente, tanto que a 250 V no se registró el ion molecular protonado $[MH^+]$, solamente sus fragmentos $[(M+H)-CH_2=NH]^+$ en m/z 188,1069; $[(M+H)-CH_2=NH-CH_3]^+$ en m/z 173,0815 y $[(M+H)-CH_2=NH-2CH_3]^+$ en m/z 158,0598.

Figura 46. Corrientes iónicas extraídas (EIC) obtenidas por LC-ESI(+)-TOF-MS, de los iones moleculares protonados: **A.** Harmina (m/z 213,1022); **B.** Harmalina (m/z 215,1179) y **C.** Tetrahydroharmina (m/z 217,1335), a diferentes voltajes del fragmentor. $V_{cap} = 1000$ V.



En los espectros de masas de harmina y tetrahydroharmina, se observó, que cuando se usan los voltajes del *fragmentor* altos (>150 V), la energía impartida es suficiente para romper algunos enlaces y generar iones-fragmento. Para la harmina, a voltajes de 200 y 250 V, se observaron los iones-fragmento [(M+H)-CH₃]⁺ en *m/z* 198,0788 y [(M+H)-CH₃-CO]⁺ en *m/z* 170,0830; para la tetrahydroharmina, a voltajes de 150 y 250 V, se registraron los iones-fragmento [(M+H)-CH₂=NH]⁺ en *m/z* 188,1069 y [(M+H)-CH₂=NH-2CH₃]⁺ en *m/z* 158,0598 (Tabla 18).

Tabla 18. Determinación por LC-ESI(+)-TOF-MS, a diferentes voltajes del *fragmentor*, de masas exactas de los iones-fragmento, de la harmina y tetrahydroharmina.

Alcaloides	Fragmentor, V	Ion-fragmento	Masas		
			Calculada	Experimental	Δppm
Harmina	200	[(M+H)-CH ₃] ⁺	198,0788	198,0787	0,18
		[(M+H)-CH ₃ -CO] ⁺	170,0838	170,0841	1,51
	250	[(M+H)-CH ₃] ⁺	198,0788	198,0794	3,40
		[(M+H)-CH ₃ -CO] ⁺	170,0838	170,0845	3,91
Tetrahydroharmina	150	[(M+H)-CH ₂ =NH] ⁺	188,1070	188,1071	0,40
	250	[(M+H)-CH ₂ =NH] ⁺	188,1070	188,1069	0,75
		[(M+H)-CH ₂ =NH-2CH ₃] ⁺	158,0600	158,0598	1,23

Para harmina, el ion-fragmento en *m/z* 198,0788 correspondió a la pérdida del radical metilo [(M+H)-CH₃]⁺, C₁₂H₁₀N₂O; el ion-fragmento en *m/z* 170,0838, se forma por pérdida sucesiva del radical metilo y monóxido de carbono [(M+H)-CH₃-CO]⁺, C₁₁H₁₀N₂ (Figura 47). Para tetrahydroharmina, el ion-fragmento en *m/z* 188,1070 corresponde al ion [(M+H)-CH₂=NH]⁺, C₁₂H₁₄NO, producto de la ruptura RDA (Retro Diels-Alder) en el anillo piperideínico; el ion en *m/z* 173,0835 se forma por pérdida consecutiva de fragmentos CH₂=NH y CH₃, [(M+H)-CH₂=NH-CH₃],

$C_{11}H_{11}NO$ y, el ion en m/z 158,0600 corresponde al fragmento $[(M+H)-CH_2=NH-2CH_3]^+$, $C_{10}H_8NO$ (Figura 48).

Figura 47. Espectros de masas, obtenidos por LC-ESI(+)-TOF-MS, de la harmina, a diferentes voltajes del *fragmentor*. **A.** 150 V; **B.** 200 V y **C.** 250 V; con el aumento de este voltaje, aumenta la fragmentación del ion MH^+ y la intensidad de los iones-producto $[(M+H)-CH_3]^+$ y $[(M+H)-CH_3-CO]^+$.

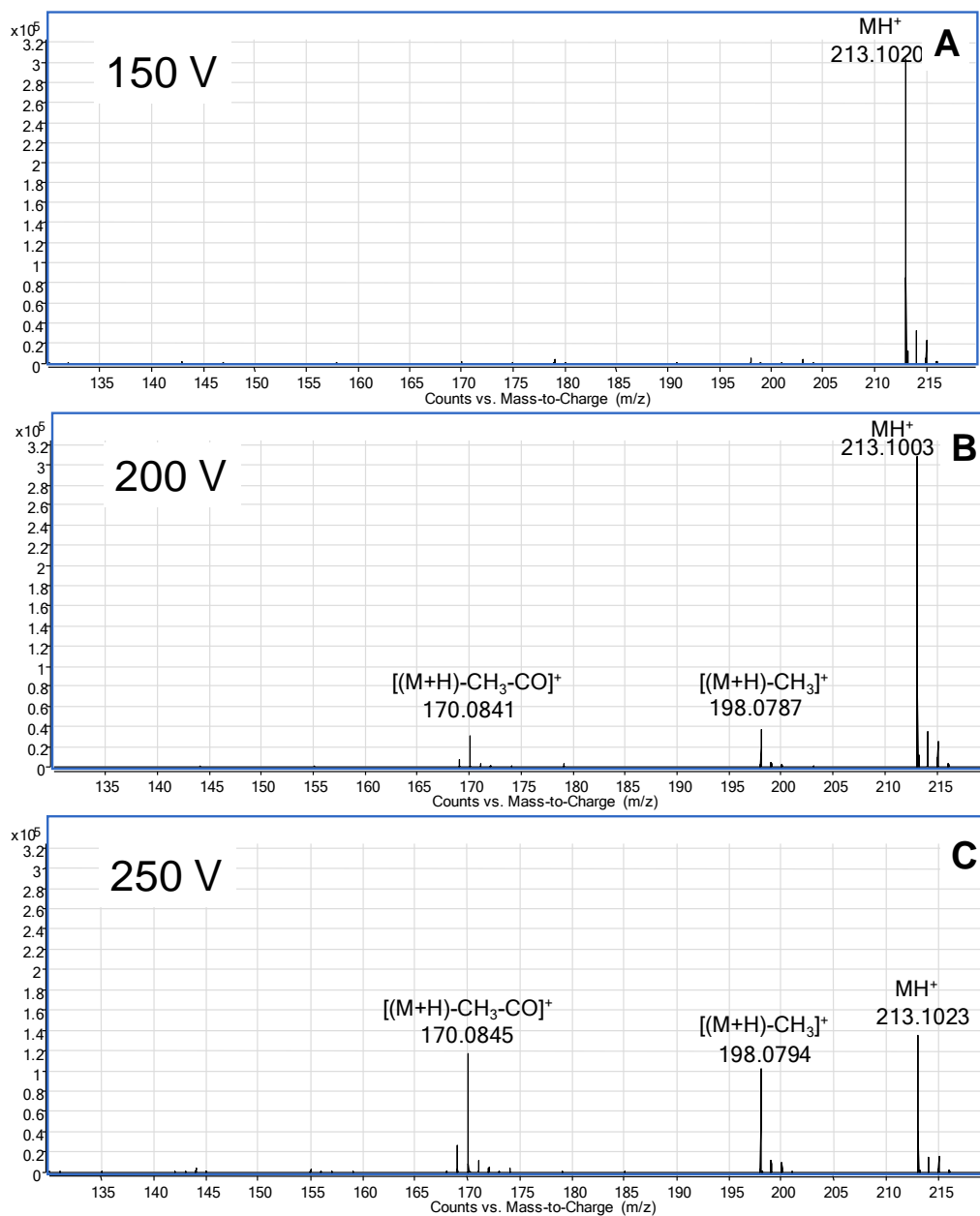
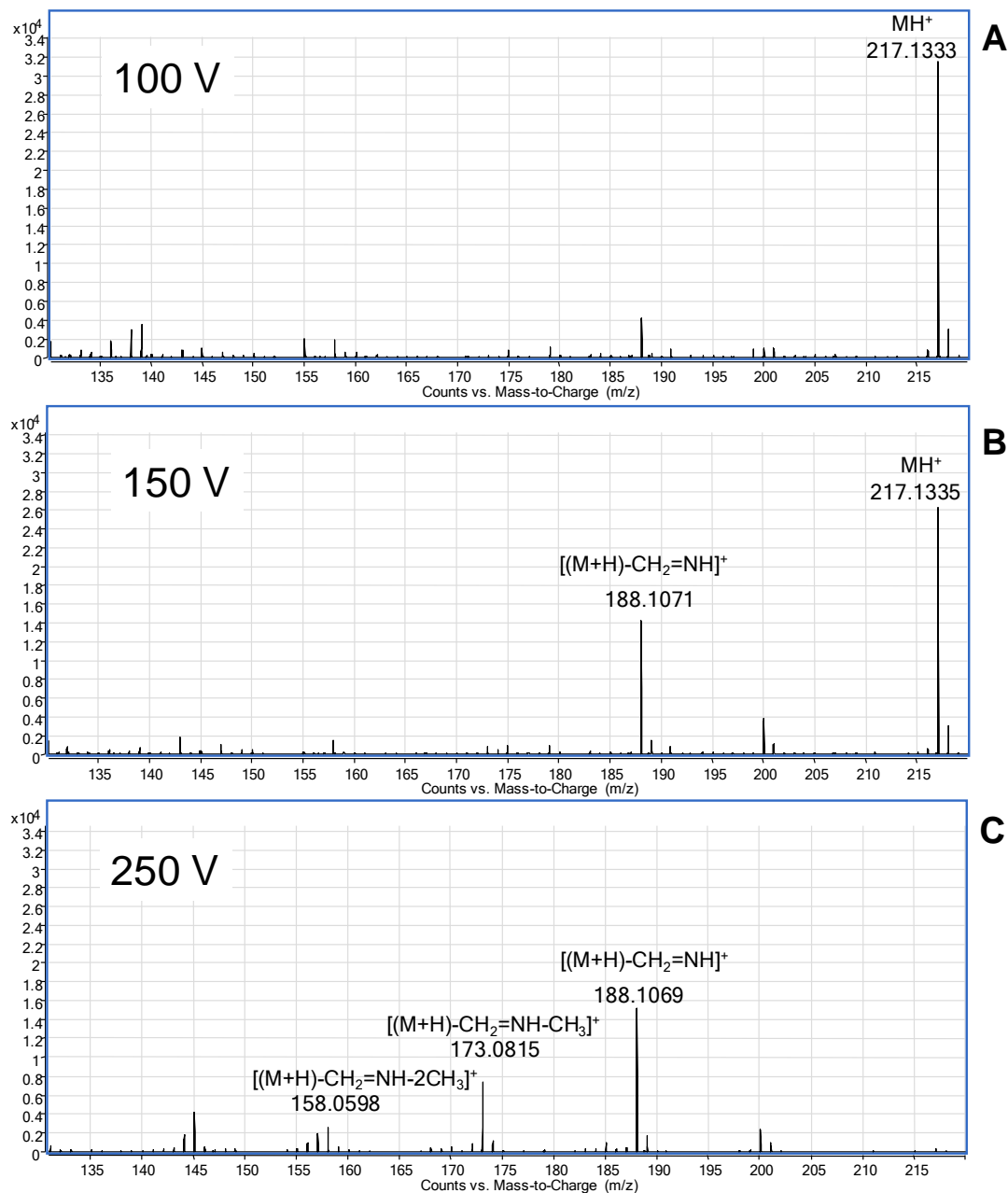


Figura 48. Espectros de masas, obtenidos por LC-ESI(+)-TOF-MS, de la tetrahydroarmina, a diferentes voltajes del *fragmentor*. **A.** 100 V; **B.** 150 V y **C.** 250 V; con el aumento de este voltaje, se incrementa la fragmentación de los iones MH^+ ; a 250V, en el espectro solo aparecen iones-producto $[(M+H)-CH_2NH]^+$ en m/z 188,1069, $[(M+H)-CH_2NH-CH_3]^+$ en m/z 173,0815 y $[(M+H)-CH_2NH-2CH_3]^+$ en m/z 158,0598.



5.3.4. Análisis de los alcaloides y sus metabolitos en la orina

Con base en la corriente iónica extraída (EIC), usando la masa exacta de cada sustancia química (**Figura 49**), en la muestra de orina, se encontraron los tres alcaloides *harmala* y el alcaloide N,N-dimetiltriptamina. La **Tabla 19**, resume la información sobre los errores experimentales en la medición de masas exactas (Δ ppm) de los iones MH^+ respectivos.

Figura 49. Perfiles cromatográficos (TIC y EIC), obtenidos por LC-ESI(+)-TOF-MS, del extracto de la orina, recolectada ocho horas después del consumo del brebaje de yagé; se observa la presencia de los alcaloides *harmala* y N,N-dimetiltriptamina. $V_{cap} = 1000$ V, $V_{frag.} = 150$ V.

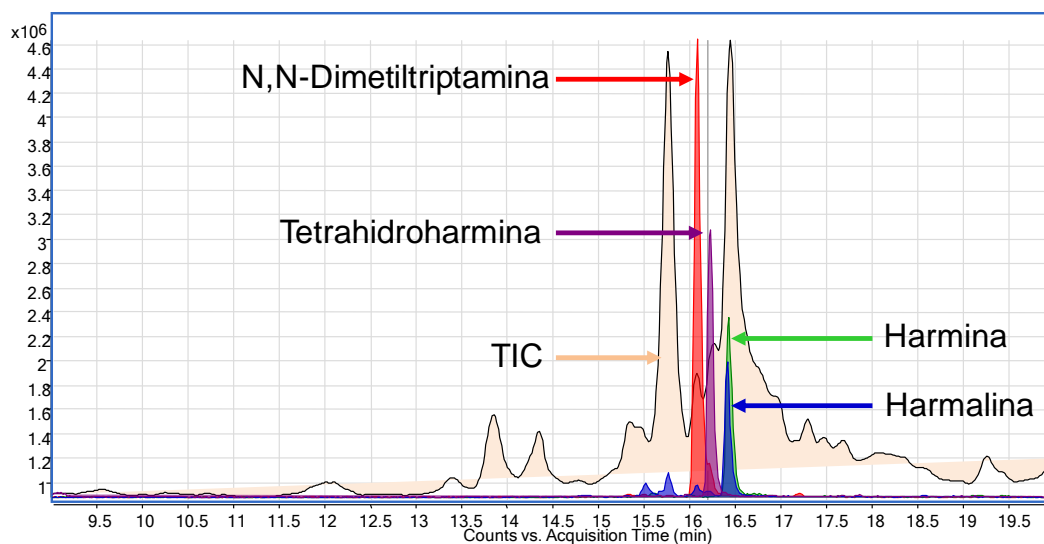


Tabla 19. Determinación por LC-ESI(+)-TOF-MS de masas exactas de los iones MH^+ , de los alcaloides *harmala* y N,N-dimetiltriptamina, detectados en la orina de un consumidor de yagé.

Alcaloides	Masas		
	Calculada	Experimental	Δ ppm
N,N-Dimetiltriptamina	189,1386	189,1378	4,20
Harmina	213,1022	213,1019	1,58
Harmalina	215,1179	215,1173	2,52
Tetrahidroharmina	217,1335	217,1330	2,41

En el extracto de orina, el alcaloide harmina se detectó junto con los siguientes metabolitos: harmol, harmol glucurónido, harmina hidroxilada y harmina-5-O-glucurónido (**Figura 50**). La **Figura 51**, presenta el espectro de masas de harmol (A) y su glucurónido (B); en la **Figura 52**, aparecen espectros de masas de harmina hidroxilada (A) y harmina-5-O-glucurónido (B). La **Tabla 20** resume la información sobre la composición elemental y los errores experimentales en la medición de masas exactas (Δ ppm) de los iones MH^+ de los metabolitos de harmina identificados.

Figura 50. Perfil cromatográfico, obtenido por LC-ESI(+)-TOF-MS, del extracto de la orina de una consumidor de yagé. Se observa la presencia del alcaloide harmina y sus metabolitos.

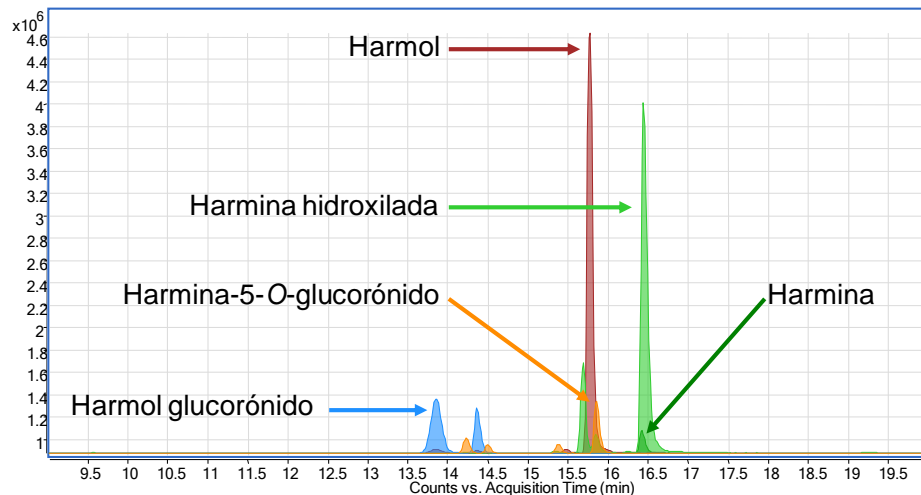


Figura 51. Espectros de masas, obtenidos por LC-ESI(+)-TOF-MS de: **A.** Harmina hidroxilada y **B.** Harmina-5-O-glucorónido, metabolitos de la harmina, encontrados en la orina de un consumidor de yagé.

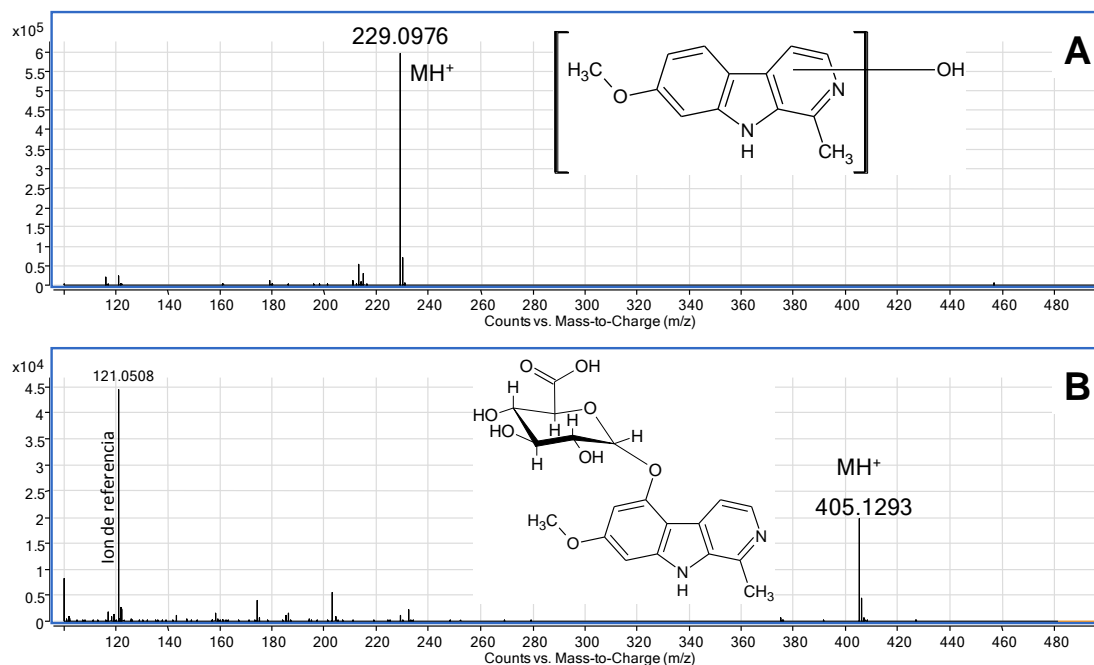


Figura 52. Espectros de masas, obtenidos por LC-ESI(+)-TOF-MS de: **A.** Harmol y **B.** Harmol glucurónico, metabolitos de la harmina, encontrados en la orina de un consumidor de yagé.

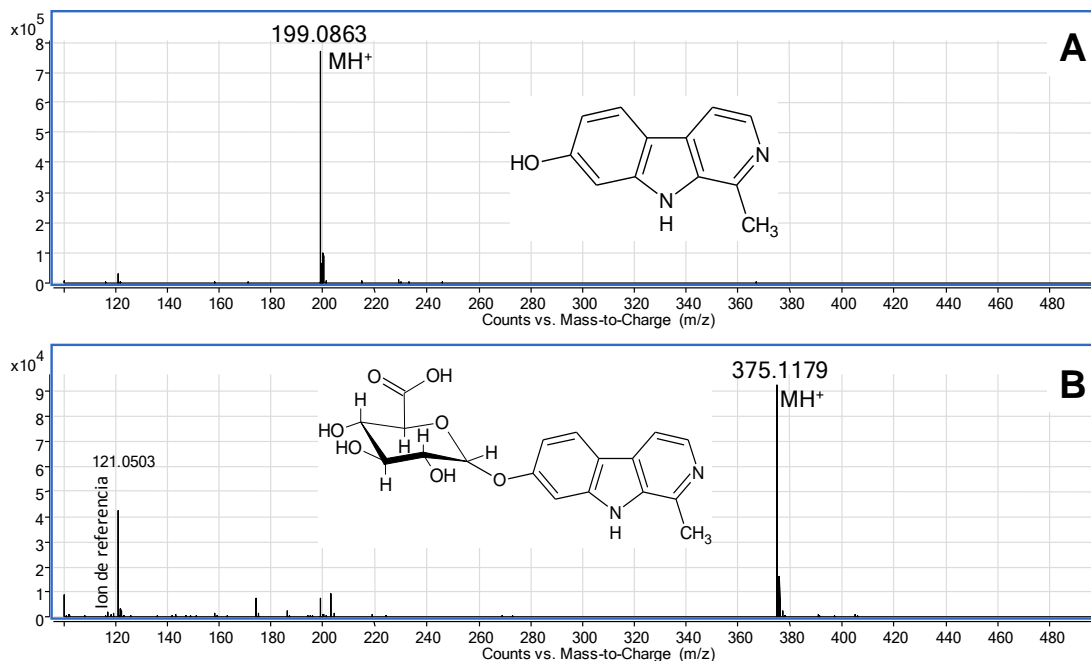


Tabla 20. Composición elemental y determinación por LC-ESI(+)-TOF-MS de masas exactas de iones moleculares protonados MH⁺ de los metabolitos de la harmina, detectados en la orina de un consumidor de yagé.

Alcaloides	Fórmula molecular, MH ⁺	Masas		
		Calculada	Experimental	Δppm
Harmol	C ₁₂ H ₁₁ N ₂ O	199,0866	199,0863	1,52
Harmina hidroxilada	C ₁₃ H ₁₃ N ₂ O ₂	229,0972	229,0976	2,08
Harmina-5- O-glucurónico	C ₁₉ N ₂ H ₂₁ N ₂ O ₈	405,1292	405,1293	0,15
Harmol glucurónico	C ₁₈ H ₁₉ N ₂ O ₇	375,1187	375,1179	2,01

En caso del alcaloide harmalina, se encontró harmalol como su único metabolito (**Figura 53**). La **Figura 54** presenta el espectro de masas del harmalol. La **Tabla 21** resume la información sobre la composición elemental y los errores

experimentales en la medición de masas exactas (Δ ppm) de los iones MH^+ de la harmalina y su metabolito, harmalol.

Figura 53. Perfil cromatográfico, obtenido por LC-ESI(+)-TOF-MS del extracto de la orina de un consumidor de yagé, que revela la presencia de harmalina y su metabolito harmalol.

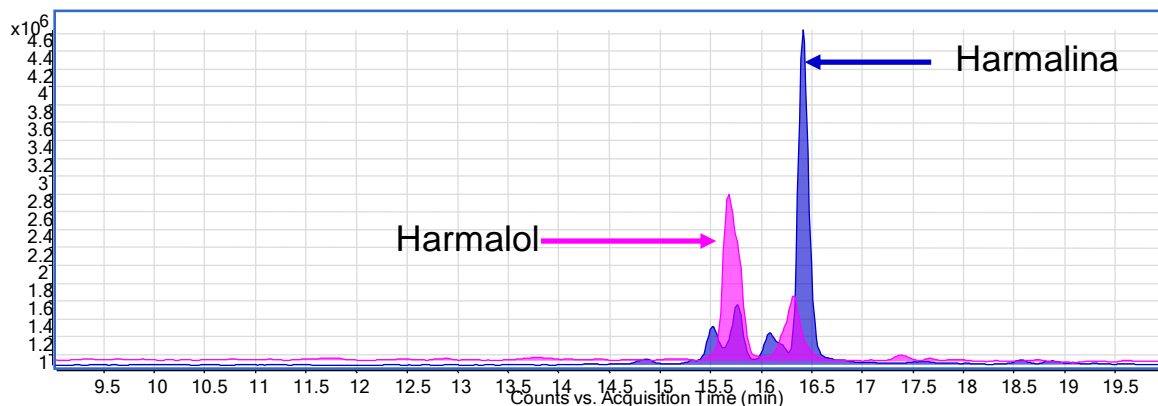


Figura 54. Espectro de masas, obtenido por LC-ESI(+)-TOF-MS del harmalol, metabolito de la harmalina, encontrado en la orina de un consumidor de yagé.

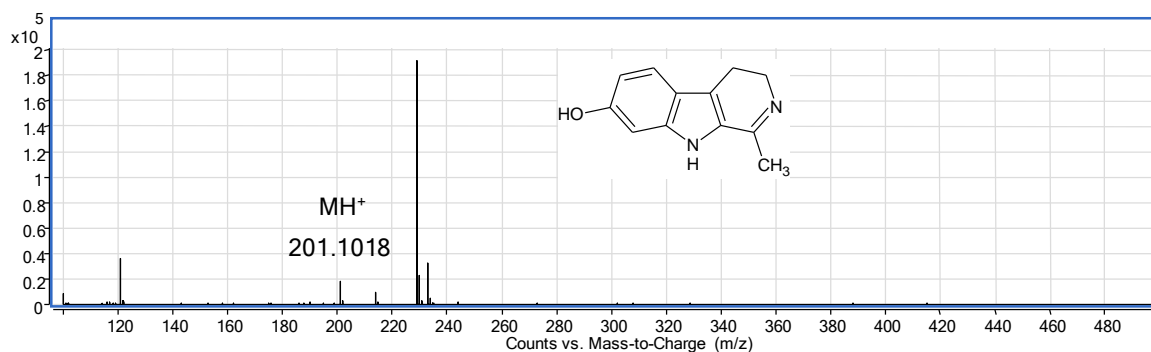


Tabla 21. Composición elemental y determinación por LC-ESI(+)-TOF-MS de masas exactas de iones moleculares protonados MH^+ de la harmalina y su metabolito harmalol, detectados en la orina de un consumidor de yagé.

Alcaloides	Fórmula molecular, MH^+	Masas		
		Calculada	Experimental	Δ ppm
Harmalina	$C_{13}H_{15}N_2O$	215,1179	215,1173	2,52
Harmalol	$C_{12}H_{13}N_2O$	201,1022	201,1018	2,04

Se encontraron dos metabolitos relacionados con el alcaloide tetrahydroharmina: tetrahydroharmol y tetrahydroharmina hidroxilada (**Figura 55**). La **Figura 56** presenta el espectro de masas del tetrahydroharmol (A) y de la tetrahydroharmina hidroxilada (B). La **Tabla 22** resume la información sobre la composición elemental y los errores experimentales en la medición de masas exactas (Δ ppm) de los iones MH^+ de los metabolitos de la tetrahydroharmina.

Figura 55. Perfil cromatográfico, obtenido por LC-ESI(+)-TOF-MS, del extracto de la orina de un consumidor de yagé, que revela la presencia de tetrahydroharmina y sus metabolitos, tetrahydroharmol y tetrahydroharmina hidroxilada.

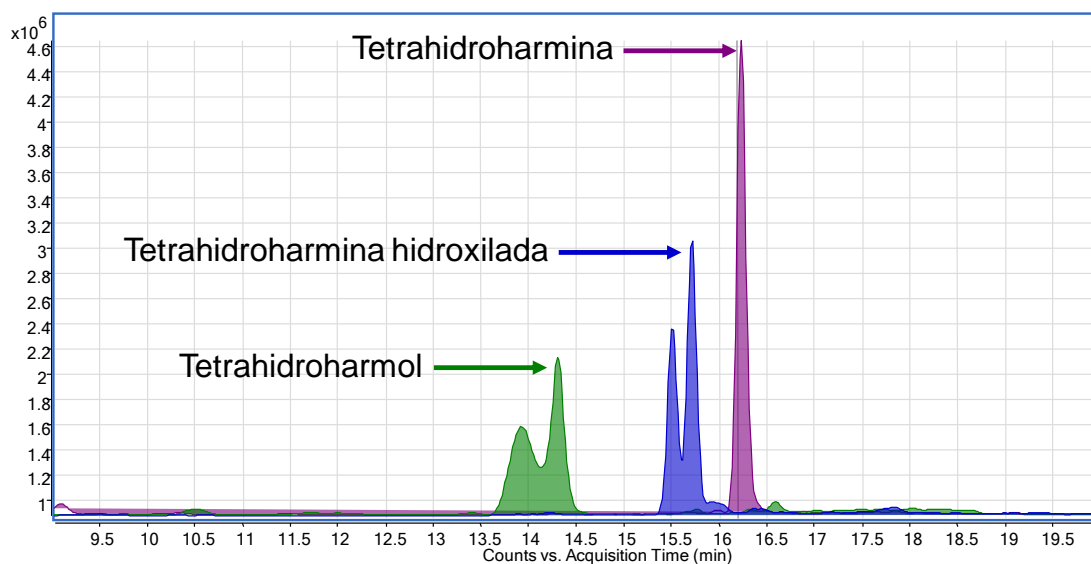


Figura 56. Espectros de masas, obtenidos por LC-ESI(+)-TOF-MS de: **A.** Tetrahidroharmol y **B.** Tetrahidroharmina hidroxilada, metabolitos de la tetrahidroharmina encontrados en la orina de un consumidor de yagé.

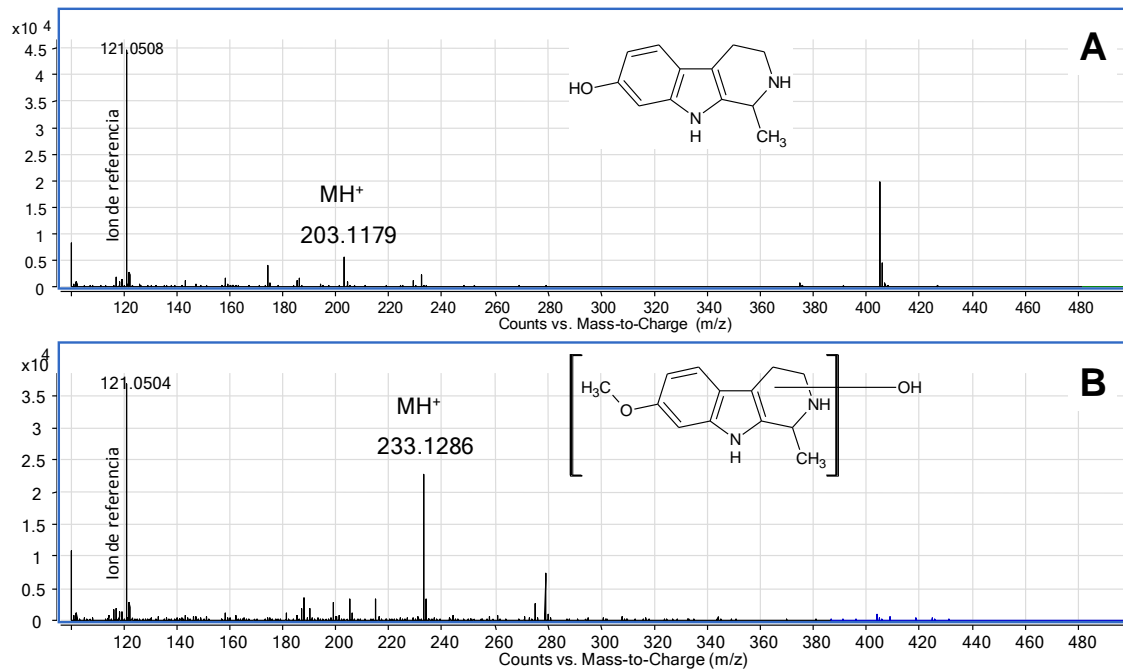


Tabla 22. Composición elemental y determinación por LC-ESI(+)-TOF-MS de masas exactas de iones moleculares protonados MH^+ de los metabolitos tetrahidroharmol y tetrahidroharmina hidroxilada, detectados en la orina de un consumidor de yagé.

Alcaloides	Fórmula molecular, MH^+	Masas		
		Calculada	Experimental	Δ ppm
Tetrahidroharmol	$C_{12}H_{15}N_2O$	203,1179	203,1179	0,03
Tetrahidroharmina hidroxilada	$C_{13}H_{17}N_2O_2$	233,1285	233,1286	0,78

Para el alcaloide N,N-dimetiltriptamina, se encontró también su metabolito: 5-hidroxi-N,N-dimetiltriptamina (**Figura 57**). La **Figura 58** presenta los espectros de masas de N,N-dimetiltriptamina (A) y 5-hidroxi-N,N-dimetiltriptamina (B). La **Tabla 23** resume la información sobre la composición elemental y los errores experimentales en la medición de masas exactas (Δ ppm) de los iones MH^+ de la N,N-dimetiltriptamina y su metabolito.

Figura 57. Perfil cromatográfico, obtenido por LC-ESI(+)-TOF-MS del extracto de la orina de un consumidor yagé, que demuestra la presencia del alcaloide N,N-dimetiltriptamina y su metabolito, 5-hidroxi-N,N-dimetiltriptamina.

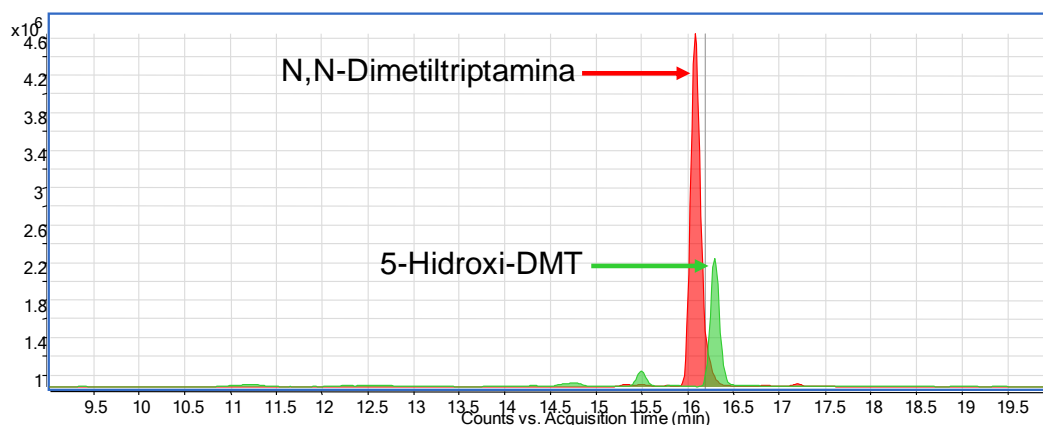


Figura 58. Espectros de masas, obtenidos por LC-ESI(+)-TOF-MS, de: **A.** N,N-Dimetiltriptamina y **B.** 5-Hidroxi-N,N-dimetiltriptamina, encontrados en la orina de un consumidor de yagé.

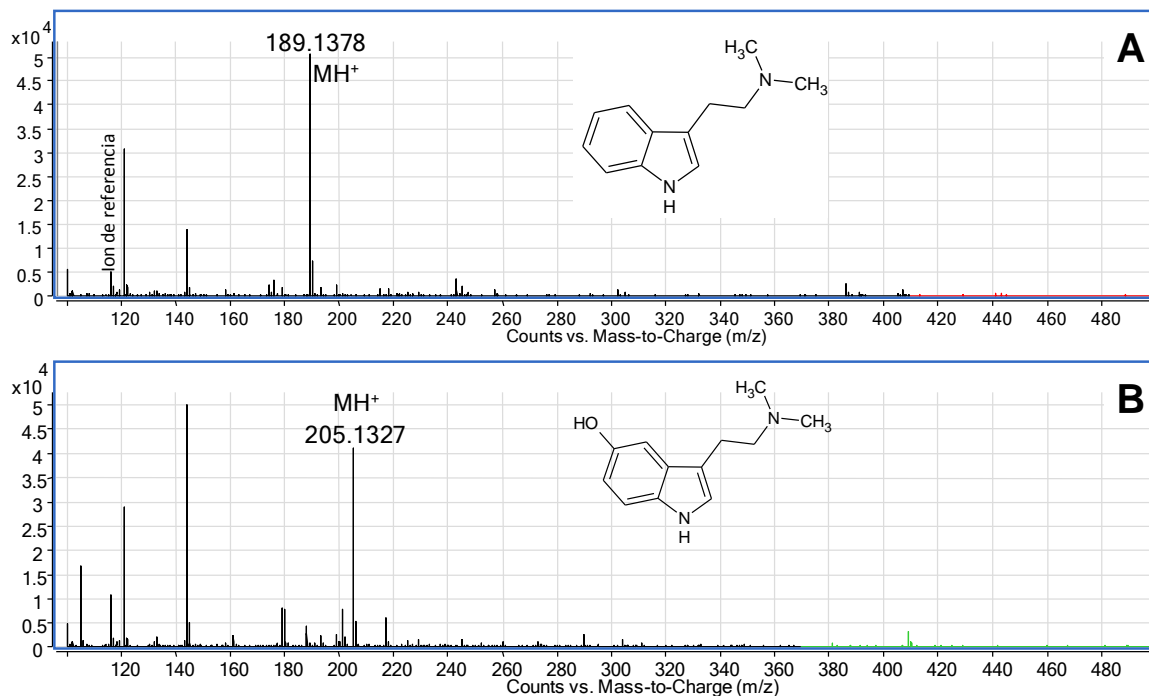


Tabla 23. Composición elemental y determinación por LC-ESI(+)-TOF-MS de masas exactas de iones moleculares protonados MH^+ de la N,N-dimetiltriptamina y su metabolito 5-hidroxi-N,N-dimetiltriptamina, detectados en la orina de un consumidor de yagé.

Alcaloides	Fórmula molecular, MH^+	Masas		
		Calculada	Experimental	Δ ppm
N,N-Dimetiltriptamina	$C_{12}H_{17}N_2$	189,1313	189,1378	4,20
5-OH-DMT	$C_{12}H_{17}N_2O$	205,1335	205,1327	4,23

5.3.5. Cuantificación de los alcaloides *harmala* en la orina

La cuantificación de los alcaloides en la orina de un consumidor de yagé se realizó con base en las curvas de calibración (**Figuras 59-61**). Se preparó una solución *stock* de los alcaloides obtenidos por la LLE de la corteza de *B. caapi*. y, a partir de ésta, las soluciones de trabajo, en diferentes concentraciones que se analizaron por LC-MS usando los mismos parámetros cromatográficos y otras variables como el voltaje del capilar y el voltaje del *fragmentor*. La **Tabla 24** muestra las corrientes iónicas de iones MH^+ de los alcaloides, usando las soluciones de trabajo preparadas, y de los alcaloides encontrados en la muestra de orina (alícuota de 200 μ L).

Tabla 24. Corrientes iónicas de los iones MH^+ , obtenidas por LC-ESI(+)-TOF-MS, de los alcaloides *harmala*, en función de sus concentraciones.

Concentración, ng/mL	Corrientes iónicas $\times 10^5$, cuentas. $V_{cap} = 1000$ V		
	Harmina	Harmalina	Tetrahydroharmina
	$V_{frag.} = 150$ V	$V_{frag.} = 150$ V	$V_{frag.} = 100$ V
25	0,81	0,13	0,09
50	1,63	0,31	0,25
75	2,40	0,35	0,35
100	3,15	0,61	0,50
250	9,37	1,60	1,25
500	20,32	3,25	2,31
Orina	6,65	4,62	10,85

Las siguientes fueron las cantidades de los alcaloides *harmala* encontradas en el extracto de orina, según la curva de calibración de cada alcaloide, a saber: harmina, 0,85 μ g/mL; harmalina, 3,6 μ g/mL; tetrahydroharmina, 11,55 μ g/mL. Los resultados obtenidos en este trabajo fueron similares a los publicados por McIlhenny *et. al* (2011) y de Riba *et. al* (2012) (**Tabla 25**). En los trabajos, el principal alcaloide *harmala* excretado fue tetrahydroharmina.

Tabla 25. Contenido de los alcaloides *harmala* ($\mu\text{g/mL}$), encontrados en orina de consumidores de yagé.

Alcaloides	Presente trabajo	Literatura	
		Mcllhenny <i>et. al</i> , 2011	Riba <i>et. al</i> , 2012
Harmina	0,85	0,12	0,08
Harmalina	3,60	0,50	0,98
Tetrahydroharmina	11,55	6,27	9,49

Figura 59. Curva de calibración, obtenida por LC-ESI(+)-TOF-MS de la harmina, $V_{frag.} = 150 \text{ V}$; $V_{cap.} = 1000 \text{ V}$.

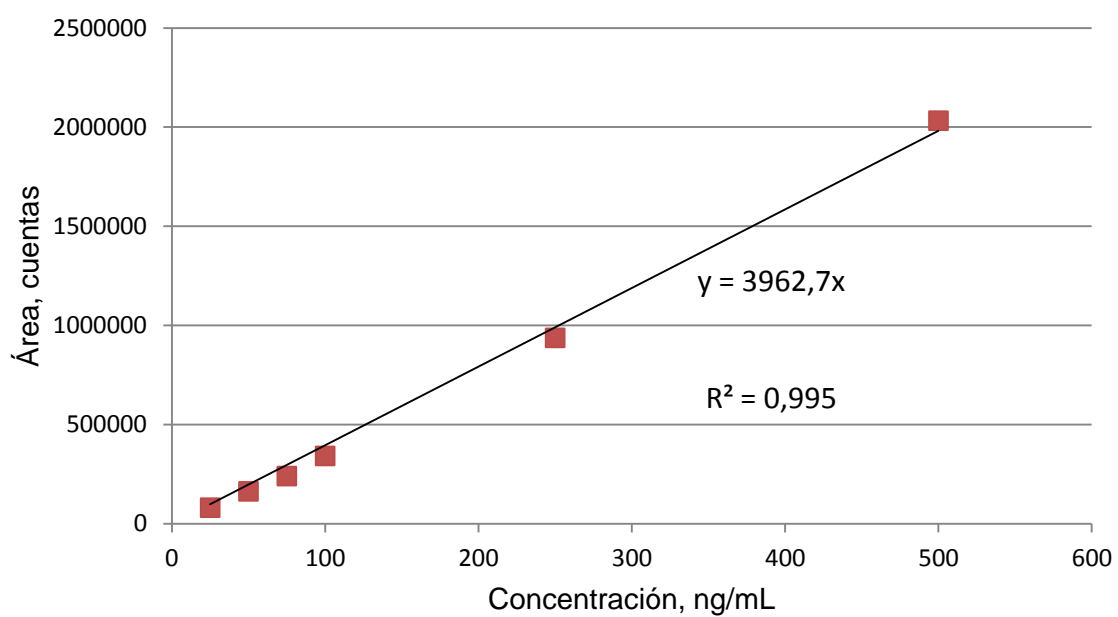


Figura 60. Curva de calibración, obtenida por LC-ESI(+)-TOF-MS de la harmalina, $V_{frag.} = 150 \text{ V}$; $V_{cap.} = 1000 \text{ V}$.

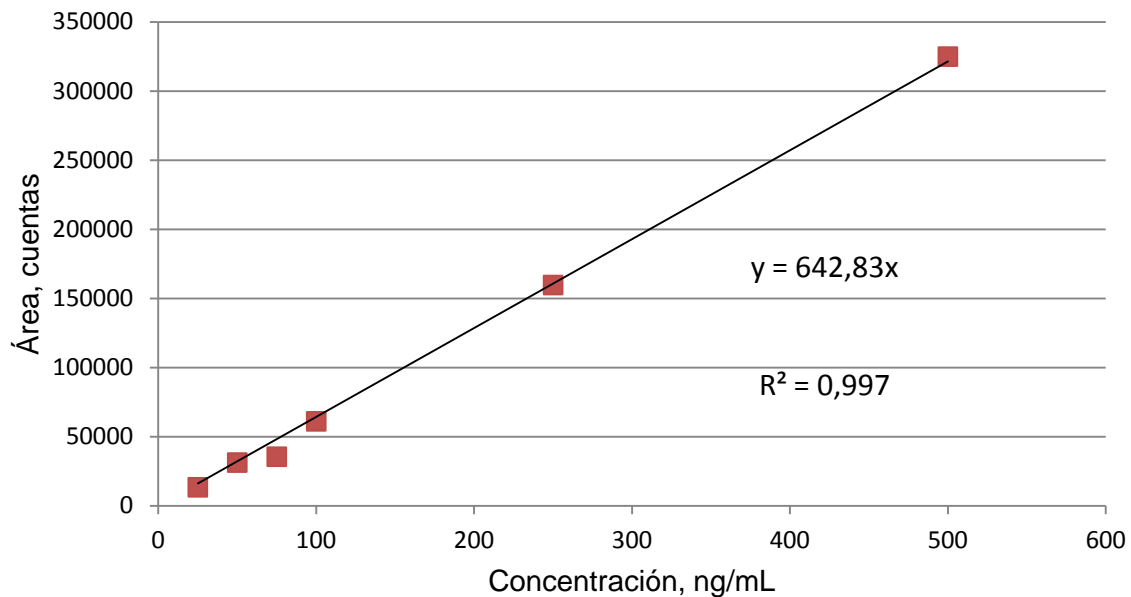
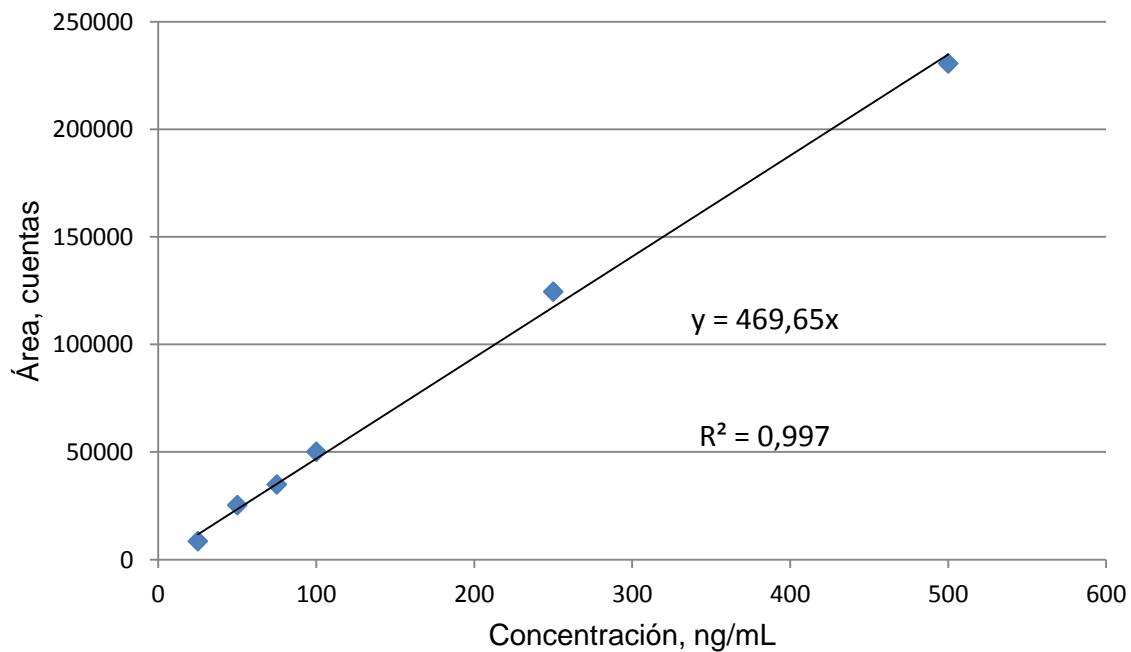


Figura 61. Curva de calibración, obtenida por LC-ESI(+)-TOF-MS de la tetrahydroharmina, $V_{frag.} = 100 \text{ V}$; $V_{cap.} = 1000 \text{ V}$.



CONCLUSIONES

1. Los alcaloides *harmala* se aislaron de la corteza de *Banisteriopsis caapi* (familia Malpigiáceas) (No. COL. 580469), usando para su extracción, disolventes orgánicos (metanol y cloroformo) y el método de dispersión de la matriz en fase sólida (MSPD). Los alcaloides *harmala* presentes en los extractos obtenidos por LLE de la corteza de *B. caapi*, presentaron la siguiente composición de alcaloides: harmina (66,6%), harmalina (6,9%), tetrahydroharmina (26,5%), cercana a la encontrada en otras investigaciones realizadas.
2. Los alcaloides *harmala* se identificaron por GC-MS, con base en sus espectros de masas (*EI*, 70 eV), y su comparación con los de la base de datos *NIST*; se estudiaron por GC-QqQ-MS las transiciones de diferentes iones y el patrón de fragmentación de la harmina y la tetrahydroharmina.
3. Se determinaron por LC-ESI(+)-TOF-MS, las masas exactas de los iones moleculares protonados de los alcaloides *harmala*, aislados de la corteza de *B. caapi*. El conjunto de datos experimentales de espectros de masas obtenidos por GC-MS, GC-MS/MS y LC-MS, permitió confirmar la identidad química de los alcaloides *harmala* aislados.
4. Para maximizar la respuesta de los sistemas de detección de las técnicas GC-MS/MS y LC-MS, se estudiaron varios parámetros operacionales, *e.g.*, las energías de colisiones activadas y los voltajes del capilar y del *fragmentor*, respectivamente. El conjunto de los valores experimentales encontrados permitió obtener las corrientes iónicas de los alcaloides *harmala* con una sensibilidad requerida para detectarlos en muestras biológicas (*e.g.*, orina).

5. Las metodologías desarrolladas se aplicaron al análisis por LC-ESI(+)-TOF-MS de la orina de un consumidor de yagé; en ella, se detectaron los alcaloides *harmala*, *i.e.*, harmina, harmalina, tetrahydroharmina, junto con la N,N-dimetiltriptamina; se encontraron también ocho metabolitos de los alcaloides: harmol, harmol glucurónido, harmina hidroxilada, harmina 5-O-glucurónido, harmalol, tetrahydroharmol, tetrahydroharmina hidroxilada y 5-hidroxi-N,N-dimetiltriptamina.

BIBLIOGRAFÍA

ANDERSON, B.T.; LABATE, B.C.; MEYER, M.; TUPPER, K.W.; BARBOSA, P.C.R.; GROB, C.S.; DAWSON, A.; McKENNA, D. Statement of Ayahuasca. *International Journal of Drugs Policy*. **2012**. 23. 173-175.

ARANGO, G.J. Alcaloides y compuestos nitrogenados. Primera edición. Medellín. Universidad de Antioquia. **2008**. 3-11.

BANDONI, A, (Ed.). Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica, su aprovechamiento industrial para la producción de aromas y sabores. Primera edición. La Plata, Argentina. Red de Editoriales Universitarias. **2000**. 19-20.

BARCELÓ-BARRACHINA, E.; MOYANO, E.; PUIGNOU, L.; GALCERAN, M.T. Evaluation of different liquid chromatography-electrospray mass spectrometry systems for the analysis of heterocyclic amines. *Journal of Chromatography A*. **2004**. 1023. 67-78.

BARKER, S.A.; LONG, A.R. Isolation of components from biological specimens via matrix solid-phase dispersion. *United States Patent*. **1993**. Patent Number: 5,272,094. 1-10.

BARKER, S.A. Review: Matrix solid-phase dispersion (MSPD). *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. **2007**. 70. 151-162.

BEYER, J.; DRUMMER, O.H.; MAURER, H.H. Review: Analysis of toxic alkaloids in body samples. *Forensic Science International*. **2009**. 185. 1-9.

BRIERLEY, D.I.; DAVIDSON C. Developments in harmine pharmacology – Implications for ayahuasca use and drug-dependence treatment. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*. **2012**. 39. 263-272.

CECH, N.B.; ENKE, C.G. Practical implications of some recent studies in electrospray ionization fundamentals. *Mass Spectrometry Reviews*. **2001**. 20. 362-387.

CLEMENT, R.E.; HAO, C. Liquid-Liquid Extraction: Basic Principles and Automation. Ontario, Canadá. Elsevier Inc. **2012**. 51-63.

COUTTS, R.T.; LOCOCK, R.A.; SLYWKA, G.W.A. Mass spectra of selected beta-carbolines [β -9H-pyrido(3,4-b)indoles]. *Organic Mass Spectrometry*. **1970**. 3. 879-889.

EVANS, W.C. "Trease and Evans–Pharmacognosy-". 16Th Edición. London. Editorial Saundders. **2009**. Cap. 26. 353-360.

FIRN, R.D.; JONES, C.G. Natural products – A simple model to explain chemical diversity. *Natural Products Report*. **2003**. 20. 382 – 391.

FORTUNATO, J.J.; RÉUS, G.Z.; KIRSCH, T.R.; STRINGARI, R.B.; FRIES, G.R.; KAPCZINSKI, F.; HALLAK, J.E.; ZUARDI, A.W.; CRIPPA, J.A.; QUEVEDO, J. Effects of β -carboline harmine on behavioral and physiological parameters observed in the chronic mild stress model: Further evidence of antidepressant properties. *Brain Research Bulletin*. **2010**. 81. 491-496.

GARCÍA-BARRIGA, H.G. Flora Medicinal de Colombia, Botánica médica. Segunda edición. Bogotá. Tercer mundo. Tomo II. **1992**. 49-75.

HARNER, M.J. Hallucinogens and Shamanism. Primera edición. London. Oxford University Press, **1973**. 5-15.

HERRAIZ, T.; GONZÁLEZ, D.; ANCÍN-AZPILICUETA, C.; ARÁN, V.J.; GUILLÉN, H. β -Carboline alkaloids in *Peganum harmala* and inhibition of human monoamine oxidase (MAO). *Food and Chemical Toxicology*. **2010**. 48. 839-845.

KIKURA-HANAJIRI, R.; HAYASHI, M.; SAISHO, K.; GODA, Y. Simultaneous determination of nineteen hallucinogenic triptamines/ β -carbolines and phenethylamines using gas chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*. **2005**. 825. 29-37.

LOIZAGA-VELDER, A.; VERRES, R. Therapeutic effects of ritual Ayahuasca use in the treatment of Substance dependence-Qualitative results. *Journal of Psychoactive Drugs*. **2014**. 46. 63-72.

McKENNA, D.J.; TOWERS, G.H.N.; ABBOTT, F. Monoamine oxidase inhibitors in South American hallucinogenic plants: triptamine and β -carboline constituents of ayahuasca. *Journal of Ethnopharmacology*. **1984**. 10. 195-223.

McILHENNY, E.H.; PIPKIN, K.E.; STANDISH, L.J.; WECHKIN, H.A.; STRASSMAN, R.; BARKER, S.A. Direct analysis of psychoactive tryptamine and harmala alkaloids in the Amazonian botanical medicine ayahuasca by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. **2009**. 1216. 8960-8968.

McILHENNY, E.H.; RIBA, J.; BARBANOJ, M.J.; STRASSMAN, R.; BARKER, S.A. Methodology for and the determination of the major constituents and metabolites of

the Amazonian botanical medicine ayahuasca in human urine. *Biomedical Chromatography*. **2011**. 25. 970-984.

ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS, ONU. Single Convention on Narcotic Drugs. United Nations Organization. **1961**. Fecha de consulta: 7 de febrero de 2014. (Disponible en: <http://www.unodc.org>).

PATEL, K.; GADEWAR, M.; TRIPATHI, R.; PRASAD, S.K.; PATEL, D.K. A review on medicinal importance, pharmacological activity and bioanalytical aspects of beta-carboline alkaloid "Harmine". *Asian Pacific Journal of Tropical of Biomedicine*. **2012**. 1. 600-664.

RIBA, J.; VALLE, M.; URBANO, G.; YRITIA, M.; MORTE, A.; BARBANOJ, M.J. Human pharmacology of Ayahuasca: subjective and cardiovascular effects, monoamine metabolite excretion, and pharmacokinetics. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. **2003**. 306. 73-83.

RIBA, J.; McILHENNY, E.H.; VALLE M.; BOUSO, J.C.; BARKER, S.A. Metabolism and disposition of N,N-dimethyltryptamine and harmala alkaloids after oral administration of ayahuasca. *Drug Testing and Analysis*. **2012**. 1. 1-7.

RIVIER, L.; LINDGREN, J.E. "Ayahuasca", the South American hallucinogenic drink: an ethnobotanical and chemical investigation. *Economic Botany*. **1972**. 26. 101-129.

RUBINSON, K.A.; RUBINSON, J.F. Análisis instrumental. Segunda edición. Pearson Education. Madrid. **2000**. 636-665.

SCHULTES, R. The botanical and chemistry distribution of hallucinogens. *Annual Review of Plant Physiology*. **1970**. 21. 571-598.

SCHULTES, R.; HOFFMAN, A. The botany and chemistry of hallucinogens. Segunda edición. Thomas. Florida, EE.UU. **1980**. 163-173.

STASHENKO, E.E.; MARTÍNEZ, J.R. GC-MS: más de un analizador de masas, ¿para qué?. *Sciencia Chromatographica*. **2010**. 2. 4. 33-59.

STASHENKO, E.E. Productos “sin químicos” y algunas hazañas e historias de los químicos. *Innovación y Ciencia*. **2011a**. 18. 3. 42-58.

STASHENKO, E.E.; MARTÍNEZ, J.R. Preparación de la muestra: un paso crucial para el análisis GC-MS. *Sciencia Chromatographica*. **2011b**. 3. 1. 25-48.

STASHENKO, E.E.; MARTÍNEZ, J.R. GC-MS: herramienta fundamental para el análisis de drogas de uso ilícito. *Sciencia Chromatographica*. **2012**. 4. 1. 1-13.

SUPREME COURT OF THE UNITED STATES. Certiorari To The United States Court Of Appeals For The Tenth Circuit. No. 04-1084. Alberto R. Gonzales. Attorney General et al., Petitioners V.O. Centro Espiritia Beneficente Uniao Do Vegetal et al. **2006**. Fecha de consulta: 16 de Julio de 2014. (Disponible en: <http://www.erowid.org/chemicals/ayahuasca/ayahuasca.law23.pdf>).

UDENFRIEND, S.; WITKOP, B; REDFIELD, B; WEISSBACH H. Estudios with reversible inhibitors of monoamine oxidase: harmaline y related compounds. *Biochemical Pharmacology*. **1958**. 1. 160-165.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA. Sede Bogotá. Herbario Nacional Colombiano. **2014**. Fecha de consulta: 14 de noviembre de 2014. (Disponible en: <http://www.biovirtual.unal.edu.co/ICN>).

VÉLEZ, A.C.; PÉREZ, A.P. Consumo urbano de yajé (ayahuasca) en Colombia. *Revista Adicciones*. **2004**. 16. 1-11.

VOGESER, M; SEGER, C. A decade of HPLC-MS/MS in the routine clinical laboratory-goals for further developments. *Clinical Biochemistry*. **2008**. 41. 649-662.

ZHAO, T.; ZHENG, S.S.; ZHANG, B.F.; LI, Y.Y.; BLIGH, A.; WANG, C.H.; WANG, Z.T. Metabolic pathways of the psychotropic - carboline alkaloids, harmaline and harmine, by liquid chromatography/mass spectrometry and NMR spectroscopy. *Food Chemistry*. **2012**. 134. 1096-1105.