

**ESTUDIO DE METABOLITOS SECUNDARIOS Y EVALUACIÓN  
DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS DE FLORES  
DE *Brugmansia suaveolens* (Fam. *Solanaceae*)**

**John Alexander Rodríguez Meléndez**

**Trabajo de Grado para Optar el título de Químico**

**Directora:**

**Elena E. Stashenko, Química, Ph.D.**

**Co-directores:**

**Jairo R. Martínez, Químico, Ph.D.**

**Lady J. Sierra Prada, Química**

**Universidad Industrial de Santander**

**Facultad de Ciencias**

**Escuela de Química**

**Bucaramanga**

**2018**

## **Dedicatoria**

*A mis padres, este pequeño paso es gracias a ustedes*

### **Agradecimientos**

A mis padres Silvana y Jesús por su compañía, dedicación, educación y apoyo.

A mis hermanos Martha y Jesús D. por ser fuente de motivación para seguir adelante.

A la profesora Elena Stashenko y el profesor Jairo René Martínez, por la oportunidad de trabajar con ellos y por todas las enseñanzas que no se olvidaran.

A todo el equipo de trabajo de los grupos de investigación CENIVAM, CIBIMOL y CROMMASS, por toda la colaboración prestada en el desarrollo de este trabajo.

A la Universidad Industrial de Santander

A COLCIENCIAS, Francisco José de Caldas (RC-0572-2012).

A Lady, Fausto, Jessica, Luis M., Paipa, Liliána, un gran grupo de amigos de los cuales aprendí muchas cosas.

A Jesica B. por la amistad de toda una larga carrera, por seguirme y no dejarme solo.

A Julián, por la gran compañía, apoyo y dedicación que me dio, gracias por enseñarme el valor de la amistad.

**Tabla de contenido**

|  | <b>Página</b> |
|--|---------------|
| Introducción .....   | 24            |
| 1. Objetivos .....   | 27            |
| 1.1. Objetivo general.....   | 27            |
| 1.2. Objetivos específicos .....   | 27            |
| 2. Marco referencial.....  | 28            |
| 2.1. Marco de antecedentes .....   | 28            |
| 2.2. Marco teórico .....   | 31            |
| 2.2.1. Fragancia de las flores. ....   | 34            |
| 2.2.1.1. Biosíntesis de terpenos. ....   | 36            |
| 2.2.2. Alcaloides.....   | 37            |
| 2.2.2.1. Escopolamina. ....  | 39            |
| 2.2.2.2. Biosíntesis de la escopolamina. ....  | 40            |
| 2.3. Técnicas de extracción.....   | 41            |
| 2.3.1. Micro-extracción en fase sólida. ....   | 41            |
| 2.3.2. Dispersión de la matriz en fase sólida. ....  | 42            |
| 2.3.3. Extracción con solventes.....   | 43            |
| 2.4. Evaluación de la capacidad antioxidante. ....   | 43            |
| 2.4.1. Capacidad de absorción del radical de oxígeno. ....   | 44            |
| 2.5. Análisis cromatográfico .....   | 45            |
| 2.5.1. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. ....                                 | 45            |
| 2.5.2. Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas con analizador de tiempo de vuelo..... | 46            |
| 3. Metodología .....   | 47            |

|  |    |
|--|----|
| 3.1. Materiales y reactivos. ....  | 47 |
| 3.2. Recolección del material vegetal .....  | 49 |
| 3.3. Identificación botánica .....   | 49 |
| 3.4. Extracción de la fracción volátil de flores de <i>B. suaveolens</i> .....   | 49 |
| 3.4.1. Micro-extracción en fase sólida en el espacio de cabeza. ....   | 49 |
| 3.5. Obtención de extractos .....  | 50 |
| 3.5.2. Dispersión de la matriz en fase sólida. ....  | 51 |
| 3.6. Evaluación de la capacidad de absorción de radicales de oxígeno. ....   | 53 |
| 3.7. Análisis cromatográfico .....   | 53 |
| 3.7.1. Análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. ....  | 53 |
| 3.7.2. Análisis por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas con analizador de tiempo de vuelo. ....                                   | 56 |
| 4. Análisis de resultados.....   | 58 |
| 4.1. Identificación botánica .....   | 58 |
| 4.2. Análisis por HS-SPME/GC-MS de compuestos volátiles de flores de <i>B. suaveolens</i> . ....   | 60 |
| 4.2.1. Extracción por HS-SPME de la fracción volátil de flores de <i>B. suaveolens</i> , con diferentes recubrimientos poliméricos de fibra SPME. .... | 60 |
| 4.2.2. Extracción por HS-SPME (CAR-PDMS/DVB) de la fracción volátil de flores de <i>B. suaveolens</i> . ....   | 64 |
| 4.3. Análisis por GC-MS de alcaloides en flores de <i>B. suaveolens</i> . ....   | 74 |
| 4.4. Estudio de condiciones operacionales de LC-ESI <sup>+</sup> -TOF-MS para el análisis de escopolamina. ....  | 80 |
| 4.5. Cuantificación por LC-ESI <sup>+</sup> -TOF-MS de escopolamina aislada por MSPD de flores de <i>B. suaveolens</i> . ....                          | 88 |
| 4.6. Análisis por LC-ESI <sup>+</sup> -TOF-MS de metabolitos secundarios aislados de <i>B. suaveolens</i> . ....                                       | 94 |
| 4.6.1. Análisis por LC-ESI <sup>+</sup> -TOF-MS de metabolitos secundarios aislados por MSPD de flores de <i>B. suaveolens</i> . ....                  | 94 |
| 4.6.2. Análisis por LC-ESI <sup>+</sup> -TOF-MS de metabolitos secundarios extraídos con solvente de flores de <i>B. suaveolens</i> . ....             | 99 |

|   |     |
|---|-----|
| 4.7. Evaluación de la actividad antioxidante de extractos de flores de <i>B. suaveolens</i> ..... | 105 |
| 5. Conclusiones .....   | 108 |
| 6. Recomendaciones.....   | 110 |
| Referencias Bibliográficas .....  | 111 |
| Apéndices.....  | 124 |

**Lista de figuras**

|  | <b>Página</b> |
|--|---------------|
| <b>Figura 1.</b> Relación de publicaciones en el periodo de 1977-2016. Fecha de búsqueda: 20 de noviembre de 2017. Fuente: Scopus (Elsevier). Período de observación: 1977-2017. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABS-KEY (“ <i>Brugmansia suaveolens</i> ”). ..... | 28            |
| <b>Figura 2.</b> Relación de publicaciones, según el área de estudio. Fecha de búsqueda: 20 de noviembre de 2017. Fuente: Scopus (Elsevier). Período de observación: 1977-2017. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABS-KEY (“ <i>Brugmansia suaveolens</i> ”). .....  | 29            |
| <b>Figura 3.</b> Flores de <i>Brugmansia suaveolens</i> . Foto tomada por el autor, Centro de Excelencia CENIVAM, UIS, Bucaramanga, 16 de julio de 2016. ....  | 33            |
| <b>Figura 4.</b> Estructura química: A. Isopreno y B. Isopentano. ....   | 35            |
| <b>Figura 5.</b> Esquema general de biosíntesis de terpenos. ....  | 37            |
| <b>Figura 6.</b> Estructuras químicas básicas de algunos alcaloides. ....  | 38            |
| <b>Figura 7.</b> Estructura química de la escopolamina y la hiosciamina. ....  | 39            |
| <b>Figura 9.</b> Esquema de dispositivo holder para SPME. Esquema hecho por el autor. ....   | 42            |
| <b>Figura 10.</b> Esquema del montaje para muestreo de la fase vapor por SPME. ....  | 50            |

- Figura 11.** Plantas *B. suaveolens*. Fotos tomadas por el autor, centro de Excelencia CENIVAM, UIS, Bucaramanga, 16 de julio de 2016. .... 59
- Figura 12.** Número de compuestos aislados por HS-SPME y detectados por GC-MS (>0.1%), a diferentes horas del día, usando diferentes recubrimientos poliméricos de la fibra SPME..... 61
- Figura 13.** Perfiles cromatográficos, obtenidos por GC-MS, de las fracciones volátiles de *B. suaveolens* extraídas por HS-SPME con diferentes recubrimientos poliméricos de fibra SPME, a las 6:00 p.m. Columna DB-WAX, 60 m. Detector selectivo de masas (EI, 70 eV), modo de inyección: *splitless*. .... 64
- Figura 14.** Perfiles cromatográficos, obtenidos por GC-MS, de las fracciones volátiles aisladas por HS-SPME (CAR-PDMS/DVB) de flores de *B. suaveolens* a diferentes horas del día (6:00 a.m., 12:00 m., o 6:00 p.m.). Columna DB-WAX, 60 m. Detector selectivo de masas (EI, 70 eV), modo de inyección: *splitless*. .... 65
- Figura 15.** Relación  $\Sigma A_{total}/A_{Istd}$ , según la familia de compuestos presentes en la fracción volátil de flores de *B. suaveolens*..... 67
- Figura 16.** Perfil cromatográfico, obtenido por GC-MS, de la fracción volátil aislada por HS-SPME (CAR-PDMS/DVB) de flores de *B. suaveolens*, monitoreadas a las 6:00 a.m. Columna DB-WAX, 60 m. Detector selectivo de masas (EI, 70 eV), modo de inyección: *splitless*. .... 69

- Figura 17.** Relación  $\Sigma A_{total}/A_{Istd}$ , de los compuestos mayoritarios presentes en la fracción volátil de flores de *B. suaveolens*, monitoreadas *in-vitro* por HS-SPME (CAR-PDMS/DVB), a diferentes horas del día. .... 70
- Figura 18.** Espectro de masas, obtenido por GC-MS (EI, 70 eV), y patrón de fragmentación del trans- $\beta$ -ocimeno. .... 73
- Figura 19.** Espectro de masas, obtenido por GC-MS (EI, 70 eV), y patrón de fragmentación del benzoato de metilo. .... 74
- Figura 20.** Perfil cromatográfico, obtenido por GC-MS, de alcaloides aislados por MSPD de flores blancas de *B. suaveolens*. Columna DB-5, 60 m. Detector selectivo de masas (EI, 70 eV), modo de inyección: *split* 1:30. .... 77
- Figura 21.** Perfil cromatográfico, obtenidos por GC-MS, de alcaloides aislados por MSPD de flores rosadas de *B. suaveolens*. Columna DB-5, 60 m. Detector selectivo de masas (EI, 70 eV), modo de inyección: *split* 1:30. .... 77
- Figura 22.** Estructura química de la escopolamina, la hiosciamina, el 3 $\beta$ -hidroxi-6 $\beta$ -tigloiloxitropano y la Apoescopolamina. .... 78
- Figura 23.** Espectro de masas obtenido por GC-MS de escopolamina. Columna DB-5, 60 m. Detector selectivo de masas (EI, 70 eV). .... 79

**Figura 24.** Áreas de las corrientes iónicas extraídas de la escopolamina protonada  $[M+H]^+$  ( $C_{17}H_{22}NO_4$ ,  $m/z$  304.1543), obtenidas por LC-ESI<sup>+</sup>-TOF-MS, en función de diferentes voltajes de capilar y del fragmentador. Fase móvil, A: ácido fórmico (0.2%) en agua, B: ácido fórmico (0.2%) en **acetonitrilo** (n=3). ..... 81

**Figura 25.** Áreas de las corrientes iónicas extraídas de la escopolamina protonada  $[M+H]^+$  ( $C_{17}H_{22}NO_4$ ,  $m/z$  304.1543), obtenidas por LC-ESI<sup>+</sup>-TOF-MS, en función de diferentes voltajes de capilar y del fragmentador. Fase móvil, A: ácido fórmico (0.2%) en agua, B: ácido fórmico (0.2%) en **metanol** (n=3). ..... 81

**Figura 26.** Espectros de masas de la escopolamina protonada  $[M+H]^+$  ( $C_{17}H_{22}NO_4$ ,  $m/z$  304.1543), obtenidos por LC-ESI<sup>+</sup>-TOF-MS. Voltaje de capilar 1 kV. Voltaje del fragmentador 150 y 250 V. Fase móvil, A: ácido fórmico (0.2%) en agua, B: ácido fórmico (0.2%) en acetonitrilo. .... 82

**Figura 27.** Áreas de las corrientes iónicas extraídas de la escopolamina protonada  $[M+H]^+$  ( $C_{17}H_{22}NO_4$ ,  $m/z$  304.1543), obtenidas por LC-ESI<sup>+</sup>-TOF-MS, en función de diferentes voltajes de fragmentador. Voltaje de capilar 1 kV. Fase móvil, A: ácido fórmico (0.2%) en agua, B: ácido fórmico (0.2%) en acetonitrilo o metanol (n=3). ..... 84

**Figura 28.** Áreas de las corrientes iónicas extraídas de la escopolamina protonada  $[M+H]^+$  ( $C_{17}H_{22}NO_4$ ,  $m/z$  304.1543), obtenidas por LC-ESI<sup>+</sup>-TOF-MS. Voltaje de capilar 1 kV. Voltaje de fragmentador 150 V. Fase móvil, A: ácido fórmico (0.2, 0.002 y 0.0001%) en agua, B: ácido fórmico (0.2, 0.002 y 0.0001%) en acetonitrilo o metanol (n=3). ..... 85

**Figura 29.** Relación señal/ruido (S/N) de las áreas de las corrientes iónicas extraídas de la escopolamina protonada  $[M+H]^+$  ( $C_{17}H_{22}NO_4$ ,  $m/z$  304.1543), obtenidas por LC-ESI<sup>+</sup>-TOF-MS. Voltaje de capilar 1 kV. Voltaje de fragmentador 150 V. Fase móvil, A: ácido fórmico (0.2, 0.002 y 0.0001%) en agua, B: ácido fórmico (0.2, 0.002 y 0.0001%) en acetonitrilo o metanol (n=3). 86

**Figura 30.** Factor cromatográfico de simetría de las áreas de las corrientes iónicas extraídas de la escopolamina protonada  $[M+H]^+$  ( $C_{17}H_{22}NO_4$ ,  $m/z$  304.1543), obtenidas por LC-ESI<sup>+</sup>-TOF-MS. Voltaje de capilar 1 kV. Voltaje de fragmentador 150 V. Fase móvil, A: ácido fórmico (0.2, 0.002 y 0.0001%) en agua, B: ácido fórmico (0.2, 0.002 y 0.0001%) en acetonitrilo o metanol (n=3). 86

**Figura 31.** Curva de calibración construida a partir de las áreas de las corrientes iónicas extraídas obtenidas por LC-ESI<sup>+</sup>-TOF-MS para la escopolamina protonada  $[M+H]^+$  ( $C_{17}H_{22}NO_4$ ,  $m/z$  304.1543). ..... 89

**Figura 32.** Diagrama de Pareto para la extracción por MSPD de escopolamina en flores blancas de *B. suaveolens*. ..... 91

**Figura 33.** Gráfica de superficie de respuesta estimada para los efectos de la cantidad de  $K_2CO_3$  y el tipo de soporte sólido, en el nivel inferior de volumen de elución (5 mL). ..... 92

**Figura 34.** Gráfica de superficie de respuesta estimada para los efectos: cantidad de  $K_2CO_3$  y el tipo de soporte sólido, en el nivel superior de volumen de elución (10 mL). ..... 93

**Figura 35.** Representación gráfica del diseño  $2^3$ , con los valores de la concentración de escopolamina. .... 93

- Figura 36.** Estructura química de la cocaína ( $[M+H]^+$   $C_{17}H_{22}NO_4$ ,  $m/z$  304.1543), usada como estándar interno en el análisis por LC-ESI<sup>+</sup>-TOF-MS de extractos hidroalcohólicos u obtenidos por MSPD, de flores de *B. suaveolens*. ..... 95
- Figura 37.** Corrientes iónicas extraídas (EIC) obtenidos por LC-ESI<sup>+</sup>-TOF-MS de los patrones certificados de escopolamina ( $t_R=15.44$  min) y cocaína ( $t_R=16.67$  min), ( $[M+H]^+$ ,  $C_{17}H_{22}NO_4$ ) usando el ion en  $m/z$  304.1543. .... 95
- Figura 38.** Corrientes iónicas extraídas (EIC), por LC-ESI<sup>+</sup>-TOF-MS, de moléculas protonadas presentes en extractos obtenidos por MSPD de flores blancas y rosadas de *B. suaveolens*. ..... 96
- Figura 39.** Corrientes iónicas extraídas (EIC), por LC-ESI<sup>+</sup>-TOF-MS de moléculas protonadas presentes en extractos obtenidos con solvente de flores blancas y rosadas de *B. suaveolens*. ..... 99

## Lista de tablas

|  | <b>Página</b> |
|--|---------------|
| <b>Tabla 1.</b> Identificación taxonómica de la especie <i>Brugmansia suaveolens</i> . .....   | 34            |
| <b>Tabla 2.</b> Clasificación de los terpenos, según el número de unidades de isopreno. ....   | 35            |
| <b>Tabla 3.</b> Reactivos, materiales y equipos utilizados en la investigación. ....   | 47            |
| <b>Tabla 4.</b> Matriz de experimentos para el diseño experimental $2^3$ de la extracción por dispersión de la matriz en fase sólida. ....   | 52            |
| <b>Tabla 5.</b> Parámetros estudiados en el diseño experimental.....   | 56            |
| <b>Tabla 6.</b> Identificación taxonómica de <i>B. suaveolens</i> (Humb. & Bonpl, ex Willd.) Sweet.....  | 58            |
| <b>Tabla 7.</b> Análisis por GC-MS de la fracción volátil obtenida por HS-SPME (CAR-PDMS y CAR-PDMS/DVB) de flores de <i>B. suaveolens</i> a las 6:00 p.m.....   | 62            |
| <b>Tabla 8.</b> Variación de $\Sigma A_{total}/A_{Istd}$ de los volátiles, aislados por HS-SPME, de flores de <i>B. suaveolens</i> , usando diferentes recubrimientos poliméricos de fibra de SPME. .... | 63            |
| <b>Tabla 9.</b> Monitoreo de compuestos volátiles de flores de <i>B. suaveolens</i> , obtenidos por HS-SPME (CAR-PDMS/DVB), a diferentes horas del día. ....   | 66            |

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabla 10.</b> Identificación por GC-MS de alcaloides obtenidos por MSPD de flores blancas de <i>B. suaveolens</i> .....   | 75 |
| <b>Tabla 11.</b> Identificación por GC-MS de los alcaloides obtenidos por MSPD de flores rosadas de <i>B. suaveolens</i> .....   | 76 |
| <b>Tabla 12.</b> Áreas obtenidas por LC-ESI <sup>+</sup> -TOF-MS de las corrientes iónicas extraídas de la escopolamina protonada [M+H] <sup>+</sup> (C <sub>17</sub> H <sub>22</sub> NO <sub>4</sub> , <i>m/z</i> 304.1543), aislada por MSPD de flores blancas de <i>B. suaveolens</i> ..... | 89 |
| <b>Tabla 13.</b> Concentración de la escopolamina extraída por MSPD de flores de <i>B. suaveolens</i> de color blanca.....   | 90 |
| <b>Tabla 14.</b> Resultados del ANOVA aplicado al diseño experimental 2 <sup>3</sup> , con los efectos de las variables de estudio y combinaciones; A: Tipo de soporte sólido, B: Volumen de elución, mL y C: Cantidad de K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , g.....                              | 90 |
| <b>Tabla 15.</b> Compuestos identificados, por LC-ESI <sup>+</sup> -TOF-MS, en extractos obtenidos por MSPD de flores blancas y rosadas de <i>B. suaveolens</i> .....  | 96 |
| <b>Tabla 16.</b> Cuantificación, por LC-ESI <sup>+</sup> -TOF-MS, de alcaloides presentes en extractos MSPD de flores blancas y rosadas de <i>B. suaveolens</i> .....  | 97 |

|  |     |
|--|-----|
| <b>Tabla 17.</b> Compuestos identificados, por LC-ESI <sup>+</sup> -TOF-MS, en extractos hidroalcohólicos de flores blancas y rosadas de <i>B. suaveolens</i> .....                | 100 |
| <b>Tabla 18.</b> Cuantificación, por LC-ESI <sup>+</sup> -TOF-MS, de alcaloides presentes en extractos hidroalcohólicos de flores blancas y rosadas de <i>B. suaveolens</i> . .... | 101 |
| <b>Tabla 19.</b> Contenido total de alcaloides en los extractos obtenidos con solventes o por MSPD de flores blancas y rosadas de <i>B. suaveolens</i> . ....                      | 103 |
| <b>Tabla 20.</b> Metabolitos secundarios identificados, por LC-MS o GC-MS, en extractos o en la fracción volátil de flores blancas de <i>B. suaveolens</i> .....                   | 105 |
| <b>Tabla 21.</b> Actividad antioxidante de extractos obtenidos con solvente o por MSPD de flores blancas y rosadas de <i>B. suaveolens</i> . ....                                  | 106 |

## Lista de apéndices

|   | <b>Página</b> |
|---|---------------|
| <b>Apéndice A.</b> Perfil cromatográfico típico, obtenido por GC-MS, de la fracción volátil aislada por HS-SPME (CAR-PDMS/DVB) a las 12:00 m., de flores blancas de <i>B. suaveolens</i> . Columna DB-WAX, 60 m. Detector selectivo de masas (EI, 70 eV), inyección: <i>splitless</i> ..... | 124           |
| <b>Apéndice B.</b> Perfil cromatográfico típico, obtenido por GC-MS, de la fracción volátil aislada por HS-SPME (CAR-PDMS/DVB) a las 6:00 pm., de flores blancas de <i>B. suaveolens</i> . Columna DB-WAX, 60 m. Detector selectivo de masas (EI, 70 eV), inyección: <i>splitless</i> ..... | 124           |
| <b>Apéndice C.</b> Espectro de masas, obtenido por GC-MS, del compuesto N° 8 ( $t_R=52.56$ min) presente en el extracto MSPD de flores blancas de <i>B. suaveolens</i> . .....  | 125           |
| <b>Apéndice D.</b> Espectro de masas, obtenido por GC-MS, del compuesto N° 21 ( $t_R=61.54$ min) presente en el extracto MSPD de flores blancas de <i>B. suaveolens</i> . .....   | 125           |
| <b>Apéndice E.</b> Espectro de masas, obtenido por GC-MS, del compuesto N° 24 ( $t_R=68.90$ min) presente en el extracto MSPD de flores blancas de <i>B. suaveolens</i> . .....   | 126           |
| <b>Apéndice F.</b> Estructuras químicas e iones característicos de alcaloides tropánicos, identificados por GC-MS, extraídos por MSPD de flores blancas de <i>B. suaveolens</i> . Columna DB-5, 60 m. Detector selectivo de masas (EI, 70 eV), modo de inyección: <i>split</i> 1:30. ....   | 127           |

- Apéndice G.** Áreas de las corrientes iónicas extraídas de la escopolamina protonada  $[M+H]^+$  ( $C_{17}H_{22}NO_4$ ,  $m/z$  304.1543), obtenidas por LC-ESI<sup>+</sup>-TOF-MS, en función de diferentes voltajes de capilar y del fragmentador. Fase móvil, A: ácido fórmico (0.002, 0.0001 %) en agua, B: ácido fórmico (0.002, 0.0001 %) en acetonitrilo o metanol (n=3). ..... 129
- Apéndice H.** Curva de calibración, obtenida por LC-ESI<sup>+</sup>-TOF-MS, para la cuantificar la escopolamina, usando el ion  $[M+H]^+$  ( $C_{17}H_{22}NO_4$ ,  $m/z$  304.1543) de la escopolamina. .... 131
- Apéndice I.** Espectros de masas de los patrones certificados de escopolamina y cocaína  $[M+H]^+$  ( $C_{17}H_{22}NO_4$ ,  $m/z$  304.1543), obtenidos por LC-ESI<sup>+</sup>-TOF-MS. voltajes de capilar (1 kV) y del fragmentador (150 V). ..... 131
- Apéndice J.** Estructura química de la 6,7-dihidrohiosciamina, la hiosciamina, la apoatropina, la apoescopolamina y la 7-hidrohiosciamina. .... 132

**Abreviaturas y acrónimos**

|              |   |
|--------------|---|
| AAPH         | <i>2,2'-Azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride</i><br>[Hidrocloreuro de 2,2'-azo-bis-(2-amidino-propano)]                 |
| ABC          | Área bajo la curva  |
| AT           | <i>Agilent Technologies</i>   |
| BHT          | <i>Butylated hydroxytoluene</i> (2,6-di- <i>terc</i> -Butil-4-metilfenol)   |
| ca.          | <i>Circa</i> (aproximadamente)  |
| CAR-PDMS     | <i>Carboxen®/Poly(dimethylsiloxane)</i><br>[Carboxeno®/poli(dimetilsiloxano)]   |
| CAR-PDMS/DVB | <i>Carboxen®/Poly(dimethylsiloxane)/Divinylbenzene</i><br>[Carboxeno®/Poli(dimetilsiloxano)/divinilbenceno]                 |
| CENIVAM      | Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización<br>de Especies Vegetales Aromáticas Medicinales Tropicales |
| CIBIMOL      | Centro de Investigación en Biomoléculas   |
| CROM-MASS    | Centro de Cromatografía y Espectrometría de Masas   |
| $d_f$        | Espesor de la fase estacionaria ( $\mu\text{m}$ )   |
| D.I.         | Diámetro interno de la columna cromatográfica (mm)  |
| DMAPP        | Difosfato de dimetilalilo   |
| EE.UU.       | Estados Unidos  |
| e.g.         | <i>Exempli gratia</i> (Por ejemplo)   |
| EI           | <i>Electron Ionization</i> (Ionización con electrones)  |
| EIC          | <i>Extracted Ion Current</i> (Corriente iónica extraída)  |
| ESI          | <i>Electrospray Ionization</i> (Ionización por electronebulización)   |

|                      |   |
|----------------------|---|
| <i>et al.</i>        | <i>et allí</i> (y otros)  |
| FL                   | Fluoresceína  |
| FPP                  | Difosfato de farnesilo  |
| GC                   | <i>Gas Chromatography</i> (Cromatografía de gases)  |
| GPP                  | Difosfato de geranilo   |
| <i>i.e.</i>          | <i>Id est</i> (Es decir)  |
| IPP                  | Difosfato de isopentilo   |
| IRL                  | Índices de retención lineales   |
| <i>Istd</i>          | <i>Internal Standard</i> (Estandar interno)   |
| LC                   | <i>Liquid Chromatography</i> (Cromatografía líquida)  |
| MEP                  | Fosfato de metileritrilo  |
| MS                   | <i>Mass Spectrometry</i> (Espectrometría de masas)  |
| MSPD                 | <i>Matrix Solid-Phase Dispersion</i> (Dispersión de la matriz en fase sólida)   |
| <i>m/z</i>           | Relación masa/carga   |
| ORAC                 | <i>Oxygen Radical Absorbance Capacity</i> (Capacidad de absorción de radicales de oxígeno)                                |
| SE                   | <i>Solvent Extraction</i> (Extracción con solvente)   |
| SPME                 | <i>Solid-Phase Microextraction</i> (Microextracción en fase sólida)   |
| TIC                  | <i>Total Ion Current</i> (Corriente iónica total)   |
| TOF                  | <i>Time-of-Flight</i> (Tiempo de vuelo)   |
| <i>t<sub>R</sub></i> | Tiempo de retención   |
| Trolox®              | <i>6-Hidroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid</i><br>(Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) |

## Resumen

**TÍTULO:** ESTUDIO DE METABOLITOS SECUNDARIOS Y EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS DE FLORES DE *Brugmansia suaveolens* (Fam. *Solanaceae*)\*

**AUTOR:** John Alexander Rodríguez Meléndez \*\*

**Palabras clave:** *Brugmansia suaveolens*, HS-SPME, MSPD, ORAC, GC-MS, LC-MS.

### DESCRIPCIÓN:

La familia *Solanaceae* está distribuida principalmente en zonas tropicales. Cuenta con más de 2600 especies que se cultivan industrialmente en muchos países. Las flores del género *Brugmansia*, se caracterizan por una fragancia fuerte, pero agradable. *B. suaveolens* es originaria de Sudamérica; es un arbusto de 2-4 m de altura muy ramificado, posee hojas de forma elíptica-ovada, presenta flores hermafroditas de ca. 35 cm de longitud, son péndulas con cáliz tubular y una corola que puede ser de color blanco o rosado hacia la base y de color naranja hacia el ápice.

El objetivo de este trabajo fue caracterizar los metabolitos secundarios presentes en la fracción volátil de flores, en extractos hidro-alcohólicos y obtenidos por MSPD de flores de *B. suaveolens* y evaluar su actividad antioxidante.

La extracción de los compuestos volátiles y semi-volátiles se realizó por HS-SPME, de flores en fresco; las fracciones volátiles, caracterizadas por GC-MS, se colectaron a las 6:00 a.m., 12:00 m. y 6:00 p.m., por triplicado, usando dos diferentes recubrimientos poliméricos de fibra SPME. Los alcaloides, de las flores, se aislaron con diclorometano y se analizaron por GC-MS. Los extractos hidro-alcohólicos y los extractos obtenidos por MSPD se analizaron por LC-MS. La actividad antioxidante de los extractos se determinó por el método ORAC. En la fragancia de las flores, la mayor emisión de compuestos se observó a las 6:00 a.m. y a las 6:00 p.m., usando el recubrimiento polimérico CAR-PDMS/DVB. Los compuestos mayoritarios fueron *trans*- $\beta$ -ocimeno, 1,8-cineol y benzoato de metilo. Para encontrar las mejores condiciones del análisis por LC-ESI<sup>+</sup>-TOF-MS, se estudiaron las siguientes variables: fase móvil A y B voltajes de fragmentador y de capilar. En los extractos hidro-alcohólicos y obtenidos por MSPD se identificaron y cuantificaron alcaloides tropánicos. Los extractos de las flores de *B. suaveolens*, presentaron valores ORAC mayores que las sustancias de referencia,  $\alpha$ -tocoferol y BHT.

---

\*Proyecto de grado

\*\*Facultad de Ciencias, Escuela de Química, Directora: Elena E. Stashenko, Química, Ph.D.

Co-directores: Jairo R. Martínez, Químico, Ph.D. y Lady J. Sierra, Química

### Abstract

**TITLE:** STUDY OF SECONDARY METABOLITES AND EVALUATION OF THE ANTIOXIDANT CAPACITY OF FLOWER EXTRACTS OF *Brugmansia suaveolens* (Fam. Solanaceae) \*

**AUTHOR:** John Alexander Rodríguez Meléndez \*\*

**Keywords:** *Brugmansia suaveolens*, HS-SPME, MSPD, ORAC, GC-MS, LC-MS.

### DESCRIPTION:

The Solanaceae family is distributed mainly in tropical areas. It has more than 2600 species grown industrially in many countries. The genus *Brugmansia* belongs to this family. It is characterized by a strong and pleasant flower fragrance, especially at night. *Brugmansia suaveolens* is native to South America; It is a 2-4 m tall shrub with many branches and elliptical – ovate leaves. It presents pendulous hermaphrodite flowers of about 35 cm in length, with tubular calyx and corolla that can be white or pink at the base and orange toward the apex.

The aim of this work was to characterize the secondary metabolites present in the volatile fraction of flowers, in hydro-alcoholic extracts and obtained by MSPD of flowers of *B. suaveolens* and to evaluate their antioxidant activity.

The extraction of the volatile and semi-volatile compounds was carried out by HS-SPME, of fresh flowers; volatile fractions, characterized by GC-MS, were collected at 6:00 a.m., 12:00 m. and 6:00 p.m., in triplicate, using two different SPME fiber polymer coatings. The alkaloids, from the flowers, were isolated with dichloromethane and analyzed by GC-MS. Hydro-alcohol extracts and extracts obtained by MSPD were analyzed by LC-MS. The antioxidant activity of the extracts was determined by the ORAC method. In the fragrance of flowers, the highest emission of compounds was observed at 6:00 a.m. and at 6:00 p.m., using the CAR-PDMS / DVB polymeric coating. The major compounds were trans- $\beta$ -ocimene, 1,8-cineole and methyl benzoate. To find the best conditions of the analysis by LC-ESI<sup>+</sup>-TOF-MS, the following variables were studied: mobile phase A and B, fragmentor and capillary voltages. In the hydro-alcoholic extracts and obtained by MSPD, tropanic alkaloids were identified and quantified. Extracts of *B. suaveolens* flowers showed higher ORAC values than reference substances,  $\alpha$ -tocopherol and BHT.

---

\*Bachelor Thesis

\*\*Facultad de Ciencias, Escuela de Química, Directora: Elena E. Stashenko, Química Ph.D.

Co-directores: Jairo R. Martínez, Químico Ph.D. y Lady J. Sierra, Química

## Introducción

Las plantas de la familia Solanaceae están distribuidas alrededor del mundo en zonas tropicales. Esta familia cuenta con más de 2600 especies, que son de suma importancia como cultivos industriales y medicinales, en varios países, *e.g.*, Chile, Colombia, Perú, Venezuela, Uruguay, entre otros. En Colombia, la familia Solanaceae cuenta con cultivos hortícolas como la papa y el tomate, que se llevan a cabo, principalmente, en los departamentos de Cundinamarca, Boyacá, Nariño y Antioquia (Álvarez, 2008; Krarup y Konar, s.f).

A la familia *Solanaceae*, pertenecen los géneros *Atropa*, *Datura*, *Nicotiana*, *Scopolia* y *Brugmansia*, que son fuentes naturales de alcaloides como la nicotina, la atropina y la escopolamina (Bussmann & Sharon, 2006; Krarup y Konar, s.f; Lenaerts, 2006; Schultes, 1970).

El género *Brugmansia* es de uso común en rituales de chamanismo y brujería por diferentes grupos indígenas. En Colombia, en las regiones Andina y Amazónica, este género se usa, especialmente, como fuente de medicinas y alucinógenos (Bussmann & Sharon, 2006; Lenaerts, 2006; Schultes, 1970).

Algunas especies, como *B. candida* y *B. suaveolens*, poseen la característica de tener una fragancia floral fuerte, en especial, durante la noche. Los volátiles que liberan las flores son de gran agrado al olfato; por ende, podrían poseer aplicaciones en la industria cosmética y perfumística (Stashenko & Martínez, 2008).

Los compuestos presentes en la fragancia floral, de gran interés para el estudio científico, son metabolitos secundarios que desarrollan las plantas con diferentes fines, para la defensa o la atracción de insectos con propósito de polinización. Algunos de estos metabolitos son

compuestos antioxidantes que previenen la oxidación de un sustrato cuando están en bajas concentraciones (Halliwell, 1995).

Con el aumento progresivo de la población humana y la pérdida constante de especies vegetales, existe la necesidad de estudiar plantas autóctonas, usadas popularmente con fines medicinales y ornamentales, con el propósito de identificar, aislar y sintetizar nuevos compuestos aplicables en las industrias farmacéutica, cosmética y de aromas.

En este trabajo, se estudió la fracción volátil en las flores de *B. suaveolens*, con diferentes recubrimientos poliméricos de fibras SPME. Se determinó la composición química de extractos obtenidos con solvente y por dispersión de la matriz en fase sólida, MSPD, y se evaluó su capacidad antioxidante.

Para la separación e identificación de los componentes volátiles de la fragancia, se utilizó la cromatografía de gases acoplada a un detector selectivo de masas. Para la separación e identificación de los compuestos químicos de los extractos obtenidos con solvente y por dispersión de la matriz en fase sólida, se utilizó cromatografía líquida acoplada a un espectrómetro de masas con analizador de tiempo de vuelo. La evaluación de la actividad antioxidante se realizó por medio del ensayo ORAC (capacidad de absorción de radicales de oxígeno).

El desarrollo de este trabajo hace parte del macro-Proyecto “Búsqueda sistemática de especies vegetales promisorias de la biodiversidad colombiana, extracción, caracterización y evaluación de sus metabolitos secundarios y derivados funcionalizados”, financiado por COLCIENCIAS y desarrollado por el Centro de Investigación en Biomoléculas, CIBIMOL, de la Universidad Industrial de Santander, que pertenece al Programa “Bioprospección y desarrollo de ingredientes naturales para las industrias cosmética, farmacéutica y de productos

de aseo con base en la biodiversidad colombiana”, que lleva a cabo la Unión Temporal Bio-Red-CO-CENIVAM.

En el desarrollo de esta investigación, algunos resultados fueron divulgados en modalidad de póster, en diferentes eventos nacionales e internacionales, a saber: Primer Encuentro Científico de la Facultad de Ciencias UIS (UIS-2015 en Bucaramanga, Colombia), V congreso Iberoamericano de Productos Naturales (CIPNat-2016 en Bogotá, Colombia), y 8th Simposio Brasileiro de Aceites Esenciales (SBOE-2015 en Río de Janeiro, Brasil), y en modalidad de presentación oral en el IV Congreso Latinoamericano de Plantas Medicinales (COLAPLAMED-2016 en Barranquilla, Colombia).

## 1. Objetivos

### 1.1. Objetivo general

- Caracterizar por GC-MS y LC-MS los extractos de flores de *B. suaveolens* obtenidos por diferentes técnicas de extracción y evaluar *in vitro* su actividad antioxidante.

### 1.2. Objetivos específicos

- Establecer la variación en la composición de los metabolitos secundarios, a diferentes horas del día, de la fracción volátil de flores de *B. suaveolens*, utilizando microextracción en fase sólida.
- Determinar por GC-MS, los alcaloides tropánicos presentes en flores de *B. suaveolens*.
- Encontrar las mejores condiciones para el análisis de escopolamina por LC-ESI<sup>+</sup>-TOF-MS.
- Identificar y cuantificar por LC-MS, los compuestos presentes en los extractos de flores de *B. suaveolens*.
- Evaluar la actividad antioxidante de los extractos de flores de *B. suaveolens*, usando el método ORAC.

## 2. Marco referencial

### 2.1. Marco de antecedentes

Para estimar el número de investigaciones que se han desarrollado sobre *B. suaveolens*, se buscó la producción científica existente desde el año 1977 hasta el año 2017 (durante 40 años), empleando la base de datos *Scopus* (*Elsevier*) (Véanse Figuras 1 y 2).

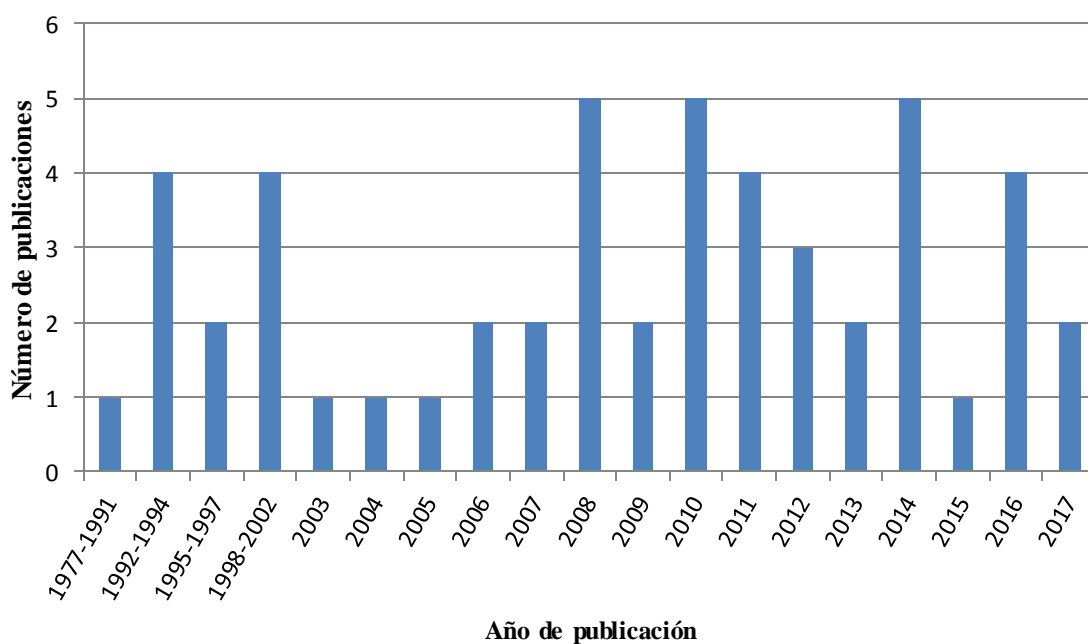


Figura 1. Relación de publicaciones en el periodo de 1977-2016. Fecha de búsqueda: 20 de noviembre de 2017. Fuente: *Scopus* (*Elsevier*). Período de observación: 1977-2017. Ecuación de búsqueda: *TITLE-ABS-KEY* (“*Brugmansia suaveolens*”).

En la Figura 1, se observa la relación de publicaciones científicas por año, desde 1977 hasta el 2017. Usando como ecuación de búsqueda *TITLE-ABS-KEY* (“*Brugmansia suaveolens*”), se

realizó la consulta el mes de noviembre de 2017, con un total de 52 artículos científicos publicados. Se puede observar, que el número de publicaciones es relativamente pequeño, siendo los años 2008, 2010 y 2014, cuando más se publicó, con cinco publicaciones por año. En los años, que no aparecen en el gráfico, no hubo publicaciones. Las investigaciones tratan temas como el hallazgo de cuatro nuevos flavonoides en las hojas de *B. suaveolens* (Geller *et al.*, 2014), la generación de escopolamina como medio de defensa contra herbívoros de *B. suaveolens* y el estudio de la concentración de este alcaloide en diferentes partes de la planta (Alves, Sartoratto, & Trigo, 2007), y de la fracción volátil por SPME, con una fibra de poli(dimetilsiloxano) (PDMS) a diferentes horas del día, con el propósito de saber a qué hora se genera la mayor cantidad de volátiles (Stashenko & Martínez, 2008).

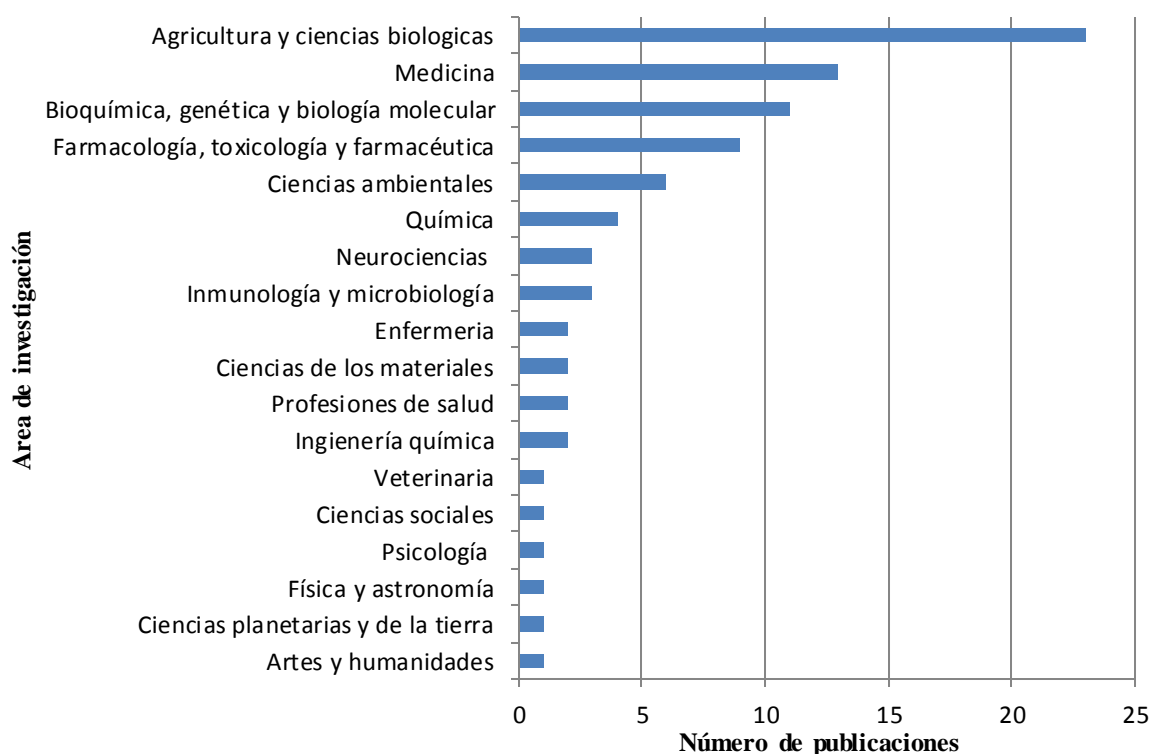


Figura 2. Relación de publicaciones, según el área de estudio. Fecha de búsqueda: 20 de noviembre de 2017. Fuente: *Scopus (Elsevier)*. Período de observación: 1977-2017. Ecuación de búsqueda: *TITLE-ABS-KEY ("Brugmansia suaveolens")*.

En la *Figura 2*, se observan las áreas de investigación y su número respectivo de publicaciones; en química, se aprecia una cantidad de publicaciones baja, con solo cuatro artículos científicos. Las áreas que presentan una cantidad de publicaciones mayor son la agricultura y las ciencias biológicas, con 23 artículos publicados. Se evidencia una investigación escasa sobre la especie *B. suaveolens*.

Entre los estudios más importantes desarrollados sobre la especie *B. suaveolens*, se encuentran los siguientes:

Suganda, Nishiyama, Yamakawa, y Sugiyama, (2006) encontraron un método para diferenciar las especies *B. suaveolens*, *B. candida*, y *B. versicolor*, ya que estas especies no se pueden distinguir por el análisis de sus metabolitos. El proceso que llevaron a cabo para lograr diferenciar las tres especies fue el aislamiento del ADN, seguido del análisis de la amplificación aleatoria del ADN polimórfico. Los investigadores observaron que cada especie tiene patrones diferentes de fragmentos de ADN.

Chang *et al.* (1999) realizaron un estudio clínico en pacientes con intoxicación por el consumo de *B. suaveolens*. Reportaron el seguimiento que realizaron a los pacientes, dando a conocer sus respectivos síntomas y el proceso que usaron para su desintoxicación; lograron presentar, en forma de artículo, las causas que puede tener el consumo de una planta que contiene alcaloides tropanicos. Por otra parte, Molina (2005), realizó la identificación de la composición química de la fragancia de flores rosadas de *B. suaveolens* extraída por HS-SPME, a diferentes horas del día, empleando el recubrimiento de PDMS/DVB, y realizó la identificación de metabolitos secundarios presentes en el extracto obtenido mediante extracción por fluido supercrítico (CO<sub>2</sub>), encontrando como compuesto mayoritario la escopolamina.

El desarrollo de este trabajo hace parte del macro-Proyecto “Búsqueda sistemática de especies vegetales promisorias de la biodiversidad colombiana, extracción, caracterización y evaluación de sus metabolitos secundarios y derivados funcionalizados”, financiado por COLCIENCIAS y desarrollado por el Centro de Investigación en Biomoléculas, CIBIMOL, de la Universidad Industrial de Santander, que lleva a cabo la Unión Temporal Bio-Red-CO-CENIVAM. Una línea de investigación del macro-Proyecto está enfocada en el estudio de flores de diferentes plantas, *e.g.*, *Coffea arabica* (Stashenko, Martínez, Cárdenas, Saavedra, & Durán, 2013), *Cattleya trianae* (Hernández, 2014), *Cattleya mendelii* (Hernández, 2014), *Brownea macrophylla* (Jaimes, 2016), *Petrea volubilis* L. (Gualteros, 2017) y *Medinilla myriantha* (Díaz, 2017).

De acuerdo con la revisión bibliográfica realizada, es posible concluir que la investigación sobre *B. suaveolens* es deficiente, ya que puede ser una alternativa agroindustrial para la producción de moléculas con aplicaciones cosméticas y farmacéuticas. Los compuestos químicos presentes en los extractos de flores de *B. suaveolens* poseen actividades biológicas que requieren más estudios en los que se analicen los efectos producidos por variables como el método de extracción y el color de las flores. Es necesario identificar las moléculas presentes en la fracción volátil y en los extractos de flores de *B. suaveolens* ya que es una matriz de compuestos químicos bastante promisoría.

## **2.2. Marco teórico**

La familia *Solanaceae* está compuesta aproximadamente por 98 géneros y 2700 especies; en esta familia, se encuentran plantas herbáceas, arbustos, árboles y lianas que presentan hojas generalmente alternadas. La familia está distribuida por todo el mundo, con excepción de la

Antártida. La mayor cantidad de especies se encuentran en América del Sur y América Central (Álvarez, 2008).

Muchas de las especies de la familia *Solanaceae* son de interés económico, como cultivos industriales, *e.g.*, tabaco (*Nicotiana tabacum*), cultivos alimenticios, *e.g.*, papa (*Solanum tuberosum*); berenjena (*Solanum melongena*) y los ajés, chiles o pimientos (*Capsicum spp*); y como plantas ornamentales, *e.g.*, *Datura*, *Petunia*, *Brugmansia* y *Salpiglossis*, varias de estas especies se conocen por sus usos medicinales y por poseer efectos psicotrópicos (Krarup y Konar, s.f; Mata y Salas, 2014).

El género *Brugmansia* fue descrito por Christiaan Hendrik Persoon en 1805 (Álvarez, 2008), teniendo como especie de estudio a la *B. candida*. En este grupo de plantas, se registran al menos nueve nombres específicos, que se caracterizan por ser arbustos o pequeños árboles con bastantes ramificaciones, de madera blanda y de aproximadamente tres metros de altura. Este género se conoce comúnmente como Borrachero, Floripondio, Cacao Sabanero o Trompeta de Ángel. Estas denominaciones son asociadas con los usos y la morfología de las flores; a las *Brugmansias*, se les conoce como “borracheros” por la asociación con su alto contenido de alcaloides y, en particular, de escopolamina. Es frecuente la intoxicación inducida con fines ilícitos (Álvarez, 2008; García, 1974).

Las plantas de este género no solo se han usado con fines ilícitos, a través de la historia, también, se han utilizado en tratamientos de enfermedades mentales, y asma; las hojas se aplican sobre quemaduras e inflamaciones. Desde el siglo XX, los alcaloides presentes en este género se han usado terapéuticamente, *i.e.*, la escopolamina, ha sido utilizada en procedimientos

oftalmológicos para prolongar la dilatación de la pupila, como sedante y en el tratamiento de algunas manifestaciones del mal de Parkinson (Gilman, Gilman, y Goodman, 1994).

La especie *B. suaveolens* tiene como sinónimo *Datura suaveolens*, y como nombres comunes “Borrachero”, “Floripondio”, “Cacao sabanero”. Es un arbusto perenne de 2-4 m de altura, con ramas abundantes en la parte superior, madera blanda, hojas en forma elíptica-ovadas y base asimétrica; presenta flores hermafroditas de 35 cm de longitud aproximadamente, son péndulas, con cáliz tubular, y una corola que puede ser blanca o rosada en su base y amarilla en el ápice (Véase *Figura 3*); las flores duran aproximadamente una semana (Álvarez, 2008).



*Figura 3.* Flores de *Brugmansia suaveolens*. Centro de Excelencia CENIVAM, UIS, Bucaramanga, 16 de julio de 2016.

*B. suaveolens* se encuentra distribuida en Colombia, principalmente, en los departamentos de Antioquia, Amazonas, Nariño, Putumayo, Santander y Valle del Cauca. Tiene usos comunes

como planta ornamental, en la medicina tradicional para calmar el dolor ocasionado por quemaduras y como materia prima para drogas de uso ilícito (García, 1974; Gilman, *et al.*, 1994; Mata y Salas, 2014).

Tabla 1. *Identificación taxonómica de la especie Brugmansia suaveolens* (Hay, 2011).

| REINO   | PLANTAE           |
|---------|-------------------|
| Phylum  | Magnoliophyta     |
| Clase   | Magnoliopsida     |
| Orden   | Solanales         |
| Familia | <i>Solanaceae</i> |
| Género  | <i>Brugmansia</i> |
| Especie | <i>suaveolens</i> |

**2.2.1. Fragancia de las flores.** La fragancia de las plantas, que es percibida por el olfato, comprende una serie de compuestos llamados metabolitos secundarios volátiles. Estos compuestos proporcionan propiedades específicas a las plantas, ya sea medicinales, atrayentes o repelentes de insectos y culinarias. Los procesos de producción de metabolitos secundarios no demuestran una función directa con procesos metabólicos primarios, i.e., la fotosíntesis, respiración, transporte de nutrientes, entre otros; la distribución de los metabolitos secundarios está restringida o se limita a especies o subespecies únicas (Gros, Burton, Pomilio & Seldes, 1985; Harborne, 1984; Taiz & Zeiger, 2002; Trease y Evans, 1991).

Las flores usan sus colores y sus fragancias como medio de defensa contra herbívoros y como señales para atraer polinizadores. Los principales componentes de las fragancias de las flores son alcoholes, compuestos carbonílicos, éteres, ésteres y terpenos (Flamini, Cioni & Morelli, 2003; Gros, *et al.*, 1985; Harborne, 1984; Taiz & Zeiger, 2002; Trease y Evans, 1991).

Los terpenos son los metabolitos secundarios más comunes en las plantas, se derivan del isopreno o del isopentano (Véase *Figura 4*); sin embargo, el isopreno no tiene relación con la biosíntesis de terpenos en las plantas, pero, el conocimiento del isopreno como componente de la estructura de los terpenos y de la unión de dos o más unidades isoprénicas ha servido para saber sus estructuras (Gros, *et al.*, 1985; Ikan, 1998; Taiz & Zeiger, 2002).



*Figura 4.* Estructura química: A. Isopreno y B. Isopentano.

Teniendo en cuenta el número de unidades isoprénicas condensadas, se obtienen monoterpenos y derivados de mayor tamaño molecular. En la Tabla 2, se muestra la clasificación de los terpenos según las unidades de isopreno, que constituyen su estructura (Gros, *et al.*, 1985; Ikan, 1998; Taiz & Zeiger, 2002).

*Tabla 2.* Clasificación de los terpenos, según el número de unidades de isopreno.

| Unidades de isopreno | Fórmula química                 | Nombre o clase |
|----------------------|---------------------------------|----------------|
| 1                    | C <sub>5</sub> H <sub>8</sub>   | Isopreno       |
| 2                    | C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> | Monoterpenos   |
| 3                    | C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> | Sesquiterpenos |
| 4                    | C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> | Diterpenos     |
| 6                    | C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> | Triterpenos    |
| 8                    | C <sub>40</sub> H <sub>64</sub> | Tetraterpenos  |

**2.2.1.1. Biosíntesis de terpenos.** Los terpenos son sintetizados mediante las rutas del ácido mevalónico y del metileritritol fosfato (MEP), usando como precursores metabolitos primarios (Dewick, 2002).

La ruta del ácido mevalónico inicia con la unión de tres moléculas de acetil-coenzima A para formar el mevalonato, un intermediario de seis carbonos, que luego de fosforilarse forma el difosfato de isopentenilo (IPP), que se convierte, enzimáticamente, en difosfato de dimetilalilo (DMAPP) hasta generar un equilibrio entre los dos. Estos productos son punto de partida para la síntesis de terpenos (Dewick, 2002; Logan, Monson & Potosnak, 2000).

En la ruta del MEP, el gliceraldehído 3-fosfato reacciona con el ácido pirúvico para generar el intermediario MEP, que se transforma a IPP y su isómero DMAPP (Logan, *et al.*, 2000).

El enlace entre el IPP (“cabeza”) con el DMAPP (“cola”), conocido como unión “cabeza-cola” produce geranyl difosfato (GPP) a partir del cual se forman los monoterpenos. La adición de más unidades a la unión “cabeza-cola” produce precursores para terpenos de cadenas más largas (Véase *Figura 5*) (Sell, 2003).

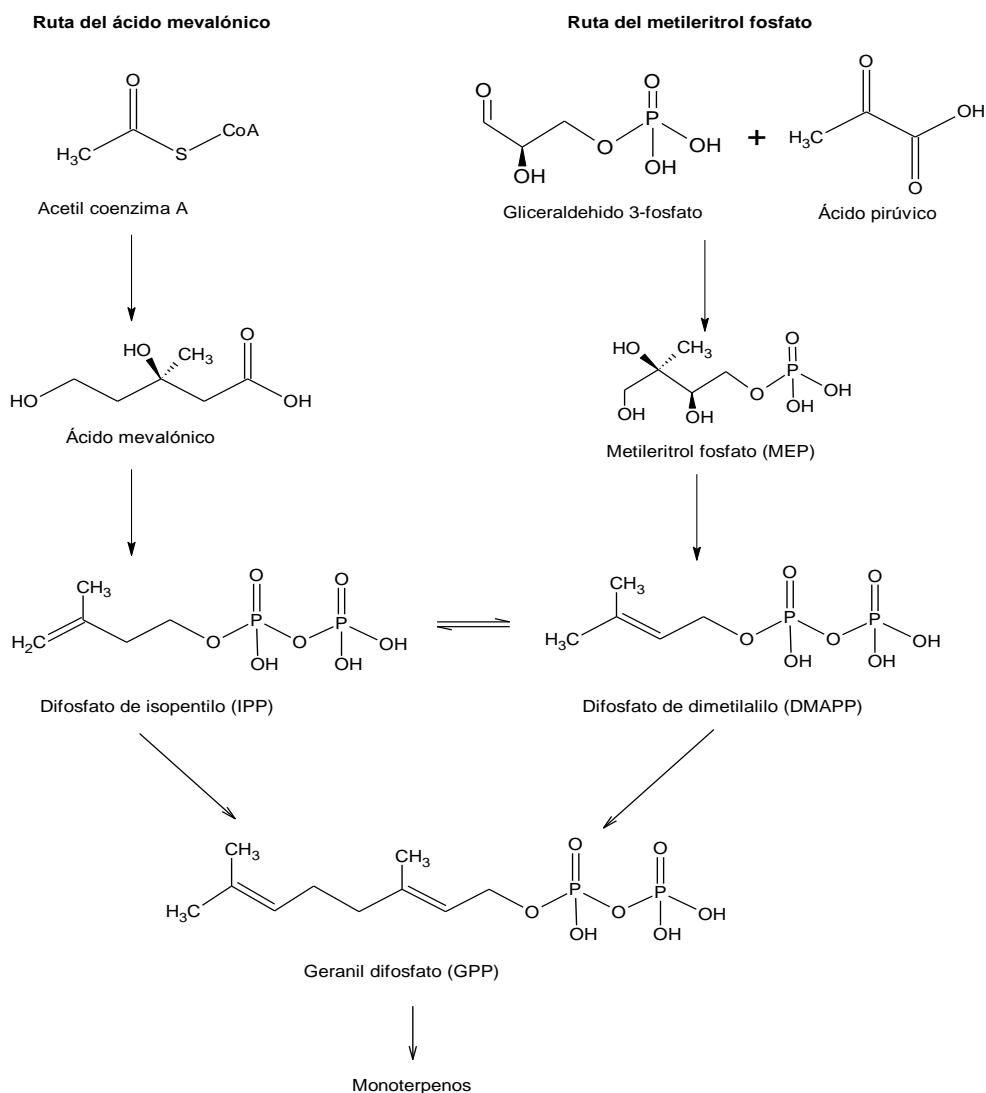
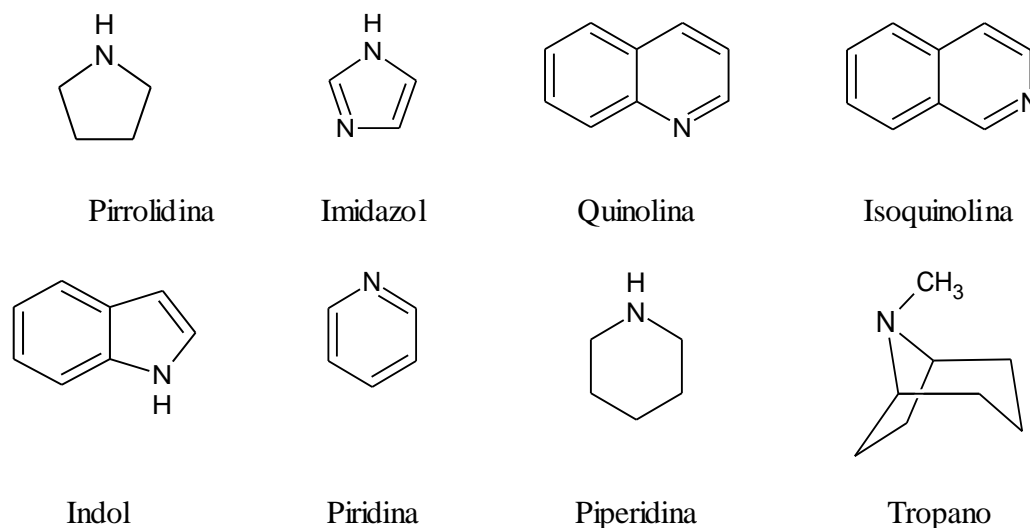


Figura 5. Esquema general de biosíntesis de terpenos (Dewick, 2002; Logan, *et al.*, 2000; Sell, 2003).

**2.2.2. Alcaloides.** Las moléculas que pertenecen a los alcaloides no representan un grupo homogéneo de compuestos, desde el punto de vista químico y bioquímico. Los alcaloides típicos son de origen vegetal, y contienen, en su estructura, uno o más átomos de nitrógeno en forma de aminas (generalmente, heterociclos). Los alcaloides poseen acción fisiológica en los seres vivos (Dewick, 2002; Gros, *et al.*, 1985; Harborne, 1984; Kaufman, Cseke, Warber, Duke, & Briemann, 1998; Taiz & Zeiger, 2002; Trease y Evans, 1991).

La mayoría de los alcaloides son sustancias cristalinas que poseen propiedades básicas por la presencia de nitrógeno en sus estructuras. En las plantas, existen en forma libre, formando sales, o como N-óxidos (Gros, *et al.*, 1985; Ikan, 1998; Trease y Evans, 1991).

Los alcaloides presentan estructuras químicas variadas; por tanto, existen diferentes formas de clasificarlos. La más común, se basa en la estructura química de la cual se derivan (Dewick, 2002; García, 1974). En la *Figura 6*, se encuentran las principales estructuras químicas encontradas en los diferentes alcaloides.



*Figura 6.* Estructuras químicas básicas de algunos alcaloides (Dewick, 2002).

Doncheva, Berkov & Philipov (2006) realizaron un estudio comparativo de los alcaloides presentes en 20 tallos y hojas de especies del género *Datura* y *Brugmansia*, entre ellas, *B. suaveolens*. En el trabajo publicado, los alcaloides principales de *B. suaveolens* fueron hiosciamina y escopolamina (Véase *Figura 7*).

**2.2.2.1. Escopolamina.** La escopolamina es un alcaloide heterocíclico del tipo tropano. Se encuentra en las plantas de la familia *Solanaceae*, principalmente, de los géneros *Brugmansia*, *Mandragora*, *Scopolia*, *Datura* y *Duboisia*, siendo los dos últimos, las principales fuentes de L-hioscina (escopolamina) y su enantiómero D-hioscina. En 1892, este alcaloide se aisló de una *Scopolia*, de ahí proviene su nombre (Gritsanapan, 1995; Trease y Evans, 1991).

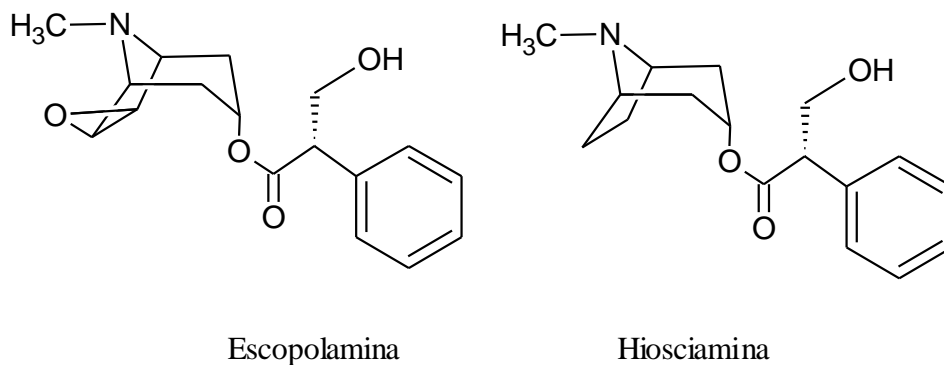
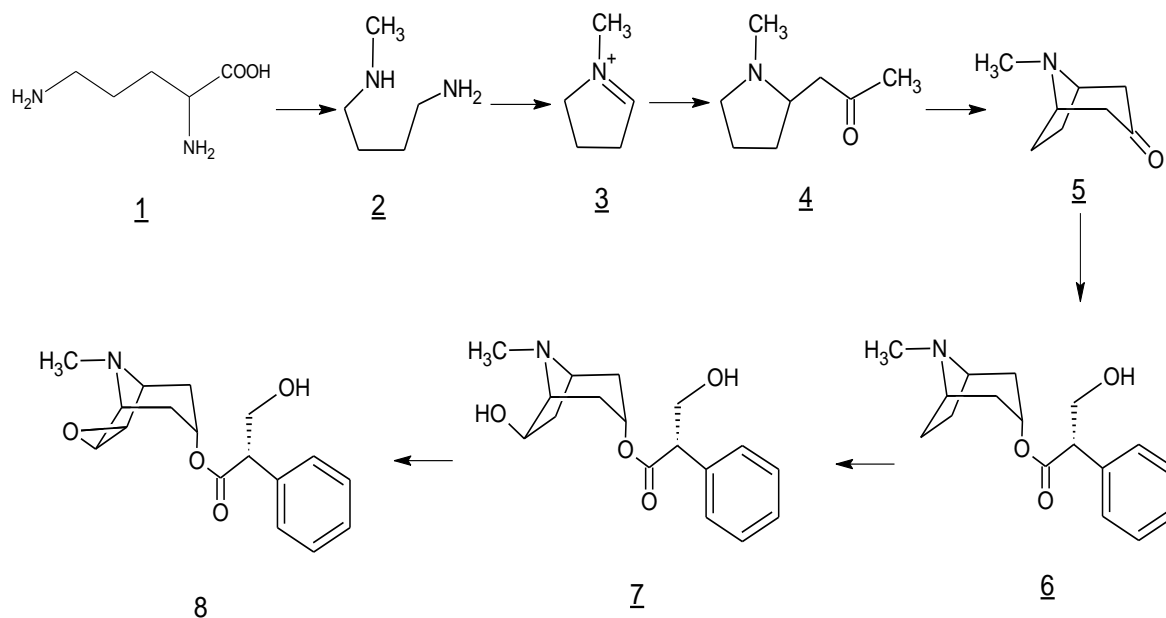


Figura 7. Estructura química de la escopolamina y la hiosciamina.

La escopolamina se extrae, comúnmente, con solvente orgánico a pH básico (8.5) de las partes aéreas de la planta. Los solventes más utilizados son la mezcla de diclorometano-hidróxido de amonio (30:2) y cloroformo. También, en la extracción con fluido supercrítico se utiliza el dióxido de carbono, junto con modificadores como metanol (Jun, *et al.*, 1996; Yeustratota & Kudrgashov, 1994)

**2.2.2.2. Biosíntesis de la escopolamina.** La biosíntesis de la escopolamina comienza con la descarboxilación de la ornitina (1) para dar origen a la putrescina, que se convierte a N-metilputrescina (2) por medio de una metilación, esta última, por una desaminación oxidativa, forma el catión N-metil- $\Delta^1$ -pirrolino (3), parte fundamental de los diferentes alcaloides tropánicos. El catión formado se convierte a higrina (4), que al reaccionar con la acetil-coA, genera la tropinona (5). La reducción enzimática del grupo carbonilo produce tropina que pasa a hiosciamina (6) debido a la esterificación con el ácido feniláctico.

La hiosciamina es catalizada enzimáticamente, para adicionar un grupo hidroxilo en la posición  $7\beta$  (7), cuya oxidación permite la formación del epóxido, entre los carbonos  $6\beta$  y  $7\beta$ , dando lugar a la escopolamina (Véase *Figura 8*) (Dewick, 2002; Robins, Woolley, Ansarin, Eagles & Goodfellow, 1994; Leete, 1984; Ansarin & Woolley, 1994; Watson, Freer, Robins & Walton, 1993; Abraham, & Leete, 1995).



*Figura 8.* Esquema general de biosíntesis de la escopolamina (Dewick, 2002).

## 2.3. Técnicas de extracción

**2.3.1. Micro-extracción en fase sólida.** En 1990, Pawliszyn y Arthur desarrollaron la técnica de micro-extracción en fase sólida (SPME, por sus siglas en inglés) para la obtención de contaminantes tipo BTEX en agua. SPME es una técnica de preparación de muestra libre de solvente, en ella, se usa un recubrimiento polimérico sobre una fibra de sílice fundida. La SPME resulta ser un método de extracción alternativo para el aislamiento de compuestos de matrices diferentes (Arthur & Pawliszyn, 1990).

Las aplicaciones de esta técnica de extracción abarcan la obtención de analitos volátiles y semivolátiles en alimentos, cosméticos, fármacos, plantas, entre otros. La extracción selectiva de compuestos por SPME depende de factores diversos, a saber: recubrimiento polimérico de la fibra, agitación de la muestra, temperatura, tiempo de equilibrio, pH, tiempo de exposición de la fibra de SPME, entre otros (Arthur & Pawliszyn, 1990; Morales, *et al.*, 2010; Smith, 2003; Stashenko & Martínez, 2008).

En SPME, el dispositivo que se usa como cámara para guardar la fibra polimérica se conoce como *holder* (Véase *Figura 9*). Este cumple la función de jeringa, para exponer y retraer la fibra.

Las fibras más utilizadas son de sílice fundida y las recubre un material polimérico con capacidad adsorbente o absorbente. Existen varios tipos de recubrimientos o fases estacionarias, de diferentes polaridades y espesor. Generalmente, los parámetros que se tienen en cuenta para la selección del recubrimiento son la polaridad y la volatilidad de las especies químicas bajo estudio (Pawliszyn, 2000).

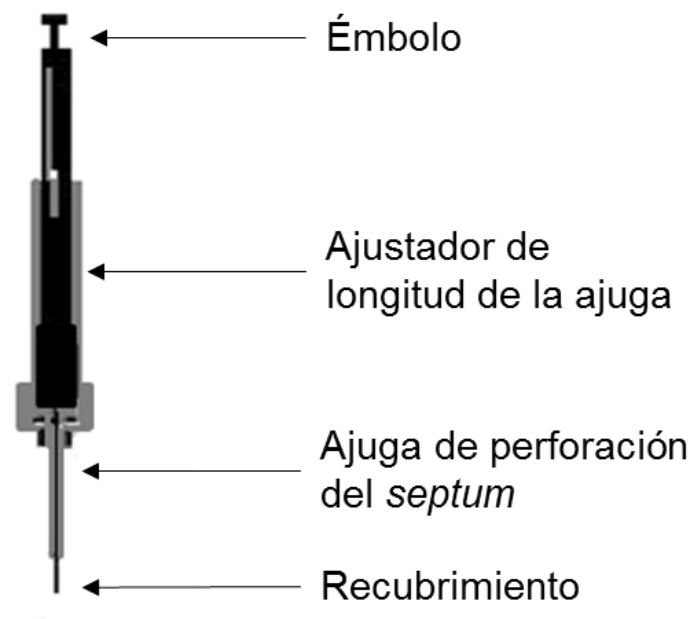


Figura 9. Esquema de dispositivo *holder* para SPME.

Existen tres modos básicos en que puede ser desarrollada la extracción por SPME: (1) extracción directa, (2) extracción en el *headspace* y (3) extracción con membrana protectora. En el modo de extracción directa, la fibra se inserta en la muestra a analizar y los analitos acceden directamente al recubrimiento de la fibra. En el modo *headspace*, los analitos se encuentran en fase vapor en un equilibrio con la muestra y la fibra se inserta en la fase vapor sin tocar la muestra. En el tercer modo, con la membrana protectora, la muestra y la fibra son separadas por una membrana selectiva que permite solo el paso de los analitos de peso molecular bajo hacia la fibra (Smith, 2003).

**2.3.2. Dispersión de la matriz en fase sólida.** La dispersión de matriz en fase sólida (MSPD, por sus siglas en inglés) es una técnica eficaz reportada por primera vez en 1989 (Barker, Long & Short, 1989). Esta técnica proporciona una estructura porosa la cual permite que el disolvente atraviese la matriz y extraiga los analitos.

En MSPD, la muestra se mezcla con un sorbente, *e.g.*, sulfato de sodio, sílice unida a cadenas de dieciocho carbonos, entre otros, seguido de un lavado y de la elución con un pequeño volumen de disolvente. Esta técnica resulta eficaz porque reduce la cantidad de solvente en comparación con la extracción líquido-líquido y no se necesita de extracciones múltiples para obtener un extracto adecuado. MSPD puede ser usada para determinar residuos y contaminantes, a nivel de trazas, en alimentos, para extracción de isoflavonoides, alcaloides, entre otros (Barker, 2007; Ridgway, Lalljie & Smith, 2007; Xiao, Krucker, Albert & Liang, 2004).

**2.3.3. Extracción con solventes.** En la extracción con solvente, se logra separar uno o más componentes de una fase sólida o líquida mediante el uso de una fase líquida o disolvente. Para lograr aislar la mayor cantidad de analitos de una muestra por extracción con solvente, se debe tener en cuenta la solubilidad de los analitos en disolventes orgánicos. Se puede extraer compuestos de polaridad alta, media o apolares, según el solvente usado (Stashenko y Martínez, 2011).

Entre las aplicaciones de la extracción con solvente se encuentra la enfocada hacia la industria de alimentos como: extracción de grasas animales y vegetales, obtención de extractos de material vegetal, fabricación de té, entre otras. También, esta técnica se usa para la obtención de alcaloides en material vegetal o animal (Ibarz & Ribas, 2005; Yeustratota & Kudrgashov, 1994).

#### **2.4. Evaluación de la capacidad antioxidante.**

Un antioxidante se define como *“cualquier sustancia que, cuando está presente en bajas concentraciones comparadas con las de un sustrato oxidable, disminuye o previene la*

*oxidación de este sustrato*” (Halliwell, 1995, p.1341). La necesidad de medir la gran cantidad de compuestos polifenólicos en tejidos vegetales llevo consigo la creación de métodos para su conteo total (Schlesier, Harwat, Böhm & Bitsch, 2002).

Para medir la capacidad que posee una sustancia, como antioxidante, existen algunos métodos como el ensayo FRAP (*ferricreducing/antioxidant power*), el ensayo de decoloración del catión radical  $\alpha$ - $\alpha$ -difeníl- $\beta$ -picrilhidrazilo (DPPH<sup>•</sup>) y el ensayo de capacidad de absorción del radical de oxígeno ORAC (*oxygen radical absorbance capacity*), entre otros (Badarinath, *et al.*, 2010; Schlesier, *et al.*, 2002).

**2.4.1. Capacidad de absorción del radical de oxígeno.** El método para evaluar la capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC, por sus siglas en inglés) tiene como base la inhibición de la oxidación de los radicales peroxilo. La reacción de oxidación de los radicales peroxilo fue estudiada por primera vez por Glazer, (1988); luego, el método fue mejorado por Cao, Alessio, & Cutler, (1993).

En este ensayo, los radicales peroxilo reaccionan con un compuesto fluorescente y forman un producto sin fluorescencia. La capacidad antioxidante se determina por la disminución de la fluorescencia y la cantidad de producto formado en función del tiempo (Prior, Wu, & Schaich, 2005).

Los primeros estudios realizados con el método ORAC usaban la  $\beta$ -ficoeritina como sustancia fluorescente. Sin embargo, la poca reproducibilidad condujo al empleo de diferentes compuestos, como fluoresceína o diclorofluoresceína (Singleton & Rossi, 1965).

## 2.5. Análisis cromatográfico

La cromatografía es un método de separación en el cual los componentes (analitos) de una muestra, logran separarse por medio de la distribución entre dos fases, una de las cuales es estacionaria (fase estacionaria), y la otra, se mueve en una dirección definida (fase móvil). La separación se debe a la diferencia en la distribución de los componentes individuales de la muestra entre las dos fases (Stashenko y Martínez, 2011).

**2.5.1. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.** En cromatografía de gases (GC, por sus siglas en inglés), la fase móvil es un gas, *e.g.*, nitrógeno, hidrógeno o helio. En GC, la muestra interactúa con la fase estacionaria depositada en la pared interna de la columna cromatográfica. Actualmente, se usan columnas tubulares abiertas, que son capilares hechos de sílice fundida, son recubiertos internamente por una capa de un polímero (Stashenko y Martínez, 2011).

El sistema de detección e identificación usado es el detector selectivo de masas (MSD, por sus siglas en inglés). El acoplamiento en la GC con espectrometría de masas (GC-MS), presenta ventajas en el estudio de componentes volátiles y fragancias, ya que combina la separación con la identificación de cada componente de la muestra (Stashenko y Martínez, 2011).

**2.5.2. Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas con analizador de tiempo de vuelo.** En la cromatografía líquida (LC, por sus siglas en inglés), la fase móvil es un líquido que puede ser un solvente de alta pureza o una mezcla de solventes y, la fase estacionaria, se deposita en una columna de menor longitud que la usada en cromatografía de gases. En cromatografía líquida, la muestra interacciona con la fase móvil y con la fase estacionaria, lo cual produce la separación de los componentes de la muestra. La cromatografía líquida puede ser en fase normal o en fase reversa. En fase normal, la fase móvil es menos polar que la fase estacionaria, y en fase reversa, la fase móvil es más polar que la fase estacionaria. La fase estacionaria común está formada por grupos no polares unidos a la sílice (Rubinson & Rubinson, 2000).

El acoplamiento de la cromatografía líquida con espectrometría de masas (LC-MS, por sus siglas en inglés), es una herramienta que permite la medición de las masas exactas de moléculas y la determinación de sus fórmulas moleculares, lo que facilita la identificación de diferentes compuestos, entre ellos, algunos metabolitos secundarios de especies vegetales (Quirantes, *et al.*, 2013).

La interfaz más usada en el acoplamiento de la LC-MS, es la electronebulización (ESI, por sus siglas en inglés), que permite la ionización suave, de moléculas, produce moléculas protonadas o deprotonadas, según el modo de ionización que se usa en la interfaz, *i.e.*, positivo  $[M+H]^+$  o negativo  $[M-H]^-$  (Quirantes, *et al.*, 2013).

En el analizador de tiempo de vuelo (TOF, por sus siglas en inglés), los iones son acelerados en un campo eléctrico de fuerza conocida, de tal manera que todos tengan la misma energía cinética y que la única diferencia que exista entre los iones sea la velocidad que depende de la

masa ( $m/z$ ) de cada ion, lo que hace posible determinar el tiempo que tarda en llegar cada ion al detector. En equipos de alta resolución, TOF con reflectrón, se pueden diferenciar compuestos con la misma masa nominal, pero diferente composición elemental (Guilhaus, 1995).

### 3. Metodología

#### 3.1. Materiales y reactivos.

En la Tabla 3, se muestran los reactivos, solventes, materiales y equipos auxiliares de laboratorio utilizados para desarrollar este trabajo de investigación.

Tabla 3. *Reactivos, materiales y equipos utilizados en la investigación.*

| NOMBRE   | ESPECIFICACIONES   |
|--|--|
| <b>Reactivos y solventes</b>                                     |  |
| <i>n</i> -Hexadecano   | Pureza: 99%; <i>Sigma Aldrich</i> (Milwaukee, Wisconsin, EE. UU.).                     |
| Etanol   | Pureza: 99.8%; <i>Mallinckrodt Baker Inc.</i> (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, EE. UU.). |
| Trolox® (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) | Pureza: 97%; <i>Sigma-Aldrich</i> (St. Louis, MO, EE. UU.).                            |
| AAPH   | Pureza: 98%; <i>Sigma-Aldrich</i> (St. Louis, MO, EE. UU.).                            |
| Fluoresceína   | <i>Sigma-Aldrich</i> (St. Louis, EE. UU.).   |
| Metanol  | Pureza: 99%; <i>Merck</i> (Darmstadt, Alemania).                                       |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                                  | Pureza: 99.1%; (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, EE. UU.).                                |
| Metanol  | Pureza 99.8%; <i>Mallinckrodt Baker Inc.</i> (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, EE. UU.).  |
| Acetonitrilo, grado LC-MS  | Pureza ≥ 99.9%; <i>Honeywell Burdick &amp; Jackson</i> (New Jersey, EE. UU.).          |
| Ácido clorhídrico  | Pureza: 37%; <i>Merck</i> (Darmstadt, Alemania).                                       |
| Ácido fórmico  | Pureza: 98%; <i>Merck</i> (Darmstadt, Alemania).                                       |
| α-Tocoferol  | Pureza: 97%; <i>Sigma-Aldrich</i> (St. Louis, MO, EE. UU.).                            |

Tabla 3. Continuación

|   |  |
|---|--|
| Butil hidroxitolueno (BHT)                            | Pureza: 99%; <i>Sigma-Aldrich</i> (St. Louis, MO, EE. UU.).  |
| Escopolamina  | Estándar analítico; <i>Sigma-Aldrich</i> (St. Louis, MO, EE. UU.).   |
| Cocaína   | Estándar analítico; <i>Sigma-Aldrich</i> (St. Louis, MO, EE. UU.).   |
| Diclorometano   | Pureza: 99.9%; <i>Merck</i> (Darmstadt, Alemania).   |
| <i>n</i> -Hexano                                      | Pureza: 99.9%; <i>Merck</i> (Darmstadt, Alemania).   |
| <b>Materiales y equipos auxiliares de laboratorio</b> |  |
| Balones aforados                                      | 1 mL; <i>Scott</i> (Texas, EE. UU.).   |
| Balones aforados                                      | 5 mL; <i>Scott</i> (Texas, EE. UU.).   |
| Pipetas Pasteur                                       | 230 mm; <i>Brand GMBH Co.</i> (Wertheim, Alemania).  |
| Viales para cromatografía                             | 2 mL; <i>Agilent Technologies</i> (Santa Clara, California, EE. UU.).  |
| Viales  | 15 mL; <i>Agilent Technologies</i> (Santa Clara, California, EE. UU.).   |
| Vaso de precipitados                                  | 50 mL; <i>Scott</i> (Texas, EE. UU.).  |
| Balones aforados                                      | 5 mL; <i>Scott</i> (Texas, EE. UU.).   |
| Micropipetas  | 2–20, 25–250 y 100–1000 $\mu$ L; <i>Brand</i> (Wertheim, Alemania).  |
| <i>Transferpette</i> multicanal                       | 10–200 $\mu$ L; -8/-12 <i>Electronic Brand</i> (Wertheim, Alemania).   |
| Filtros de membrana                                   | Filtros de membrana PVDF de 0.22 $\mu$ m de <i>Millipore</i> (São Paulo, Brasil).  |
| Microplacas   | Microplacas negras de poli(estireno) de 96 pozos <i>ThermoFisher Scientific</i> (Massachusetts, EE. UU.).  |
| Micropipetas  | 2–20, 25–250 y 100–1000 $\mu$ L; <i>Brand</i> (Wertheim, Alemania).  |
| <b>Equipos de laboratorio</b>                         |  |
| Recubrimientos sobre la fibra de SPME                 | CAR-PDMS de 75 $\mu$ m de grosor; <i>Supelco</i> (St. Louis, MO, EE. UU.).<br>CAR-PDMS/DVB de 95 $\mu$ m de grosor; <i>Supelco</i> (St. Louis, MO, EE. UU.). |
| Balanza analítica                                     | <i>Mettler-Toledo</i> AL204 (Nänicon, Suiza).  |
| pH-Metro  | MPC227; <i>Mettler-Toledo</i> (Schwezenbach, Suiza).   |
| Baño de ultrasonido                                   | <i>Elmasonic</i> E30H (Elma, Alemania).  |
| Lector de microplacas                                 | <i>Turner Biosystems Inc., Modulus<sup>TM</sup> II Microplate Multimode Reader</i> (Sunnyvale, CA, EE. UU.).   |
| <i>MS2 Minishaker</i>                                 | <i>IKA</i> (Wilmington, EE. UU.).  |
| Centrífuga  | <i>Compac II Centrifuge, Clay Adams</i> (Sparks, M.D. EE. UU.).  |
| Plancha de calentamiento y agitación                  | <i>RC Velp Scientifica</i> (Usmate, Italy).  |

### 3.2. Recolección del material vegetal

Las flores de *B. suaveolens* se colectaron de la zona de cultivos experimentales del Centro de Investigación de Excelencia, CENIVAM, ubicado en el campus central de la Universidad Industrial de Santander. Para SPME, las flores se utilizaron en fresco. El material vegetal empleado para la extracción con solvente o MSPD se secó en un liofilizador de bandejas *Virtis Advance Plus* (*SP Scientific*, New York, EE.UU.) durante 48 h; posteriormente, las flores se picaron y tamizaron para reducir el tamaño de partículas, para posterior extracción.

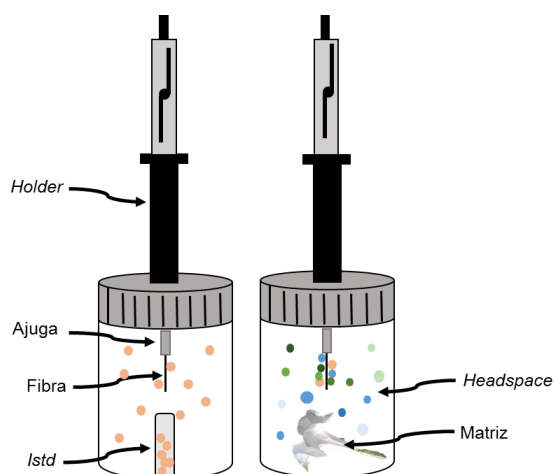
### 3.3. Identificación botánica

Las *exsiccatae* se elaboraron de flores, tallos y hojas de las especies bajo estudio, y se enviaron al Herbario Nacional Colombiano, Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia en Bogotá, y se guardaron también sus copias en CENIVAM.

### 3.4. Extracción de la fracción volátil de flores de *B. suaveolens*.

**3.4.1. Micro-extracción en fase sólida en el espacio de cabeza.** La técnica de micro-extracción en fase sólida, se realizó, según la metodología propuesta por Stashenko, *et al.*, (2013). La flor de *B. suaveolens* (ca. 10 g), se depositó en un dispositivo cilíndrico de 750 cm<sup>3</sup>, se sometió a proceso de pre-equilibrio, durante 10 min, a 60 °C; después, la fibra recubierta con CAR-PDMS o CAR-PDMS/DVB, por 30 min se expuso al espacio de cabeza en el interior del recipiente.

El muestreo por HS-SPME se realizó a diferentes horas del día (6 a.m., 12 m., 6 p.m.), por triplicado. El estándar interno, *n*-hexadecano (ca. 2 mg), se incorporó mediante la exposición de la fibra SPME durante 5 s a 60 °C; posteriormente, la fibra se llevó al interior del dispositivo cilíndrico que contenía la flor de *B. suaveolens*. Luego, se depositó en el puerto de inyección del GC-MS durante 15 min a 250 °C (Véase *Figura 10*).



*Figura 10.* Esquema del montaje para muestreo de la fase vapor por SPME.

### 3.5. Obtención de extractos

Los extractos de flores de *B. suaveolens*, se obtuvieron por extracción con solvente (SE, por sus siglas en inglés) y dispersión de la matriz en fase sólida (MSPD, por sus siglas en inglés).

**3.5.1. Extracción con solvente.** Para la extracción con solvente, se usó la metodología propuesta por Borrás, *et al.*, (2015), con algunas modificaciones. Se pesaron flores liofilizadas (1 g), se adicionó una solución de etanol (20 mL, 70 % v/v en agua Tipo I) y se llevó a un baño de ultrasonido (*Elmasonic S15H*, Singen, Alemania), durante 20 min a 30 °C. El residuo se separó por filtración por gravedad y se extrajo una vez más, bajo las mismas condiciones. Los

extractos obtenidos se concentraron por roto-evaporación (*Heidolph, Hei-VAP, Advantage HL*, Chicago, EE. UU.), se liofilizaron (*Virtis Advance Plus*, New York, EE.UU.) y se almacenaron en oscuridad a 4 °C.

**3.5.2. Dispersión de la matriz en fase sólida.** La extracción por dispersión de la matriz en fase sólida se realizó, según el procedimiento descrito por Barker, (2007), con algunas modificaciones. La sílice-octadecilo (C<sub>18</sub>) o sílice se utilizaron como soporte sólido, el diclorometano como solvente de elución y el carbonato de potasio como modificador de pH.

Con el fin de encontrar las mejores condiciones de extracción, se realizó un diseño experimental 2<sup>3</sup> con cuatro réplicas en un punto, donde el observable fue la cantidad de escopolamina, determinada por medio del método de estándar externo con patrón de referencia certificado. El rango de concentraciones, con las que se realizó la curva de calibración, fue desde 1 hasta 500 ppb.

Las siguientes fueron las tres variables estudiadas: (1) tipo de soporte sólido, (2) volumen de elución y (3) cantidad de carbonato de potasio. En la Tabla 4, se pueden observar los niveles para cada una de las variables de estudio.

La extracción se realizó con flores blancas y secas de *B. suaveolens* (100 mg), soporte sólido (400 mg); se utilizó *iso*-propanol (1 mL) como agente dispersante. La mezcla se homogeneizó por maceración, se depositó en una columna, con algodón como filtro y se eluyó con diclorometano. Del extracto, se tomó una alícuota (10 µL) y se disolvió en una solución (1 mL) conformada por 50 % de agua (0.2 % de ácido fórmico) y 50 % de acetonitrilo (0.2 % de ácido fórmico). La disolución se pasó por un filtro de PVDF (0.22 µm) y se inyectó en el LC-MS.

El análisis por GC-MS se realizó a partir de un extracto obtenido de flores liofilizadas y secas de *B. suaveolens* (3 g), usando sílice-octadecilo C<sub>18</sub> (3 g) y diclorometano (30 mL) como solvente de elución. El extracto se llevó hasta sequedad por roto-evaporación y se aciduló con una solución de HCl (10 mL, 1% v/v en agua Tipo I). Después, se realizó una limpieza con *n*-hexano (10 mL), este procedimiento se repitió tres veces, a la fase acuosa se añadió NH<sub>4</sub>OH (1 mL 28% p/v en agua Tipo I). Finalmente, se realizó una extracción líquido-líquido con diclorometano (5 mL), por triplicado; la fase orgánica se llevó a sequedad con corriente de nitrógeno, se reconstituyó con diclorometano (1 mL) y se inyectó al GC-MS.

Tabla 4. *Matriz de experimentos para el diseño experimental 2<sup>3</sup> de la extracción por dispersión de la matriz en fase sólida.*

| <b>Experimento</b>  | <b>X1</b>                         | <b>X2</b> | <b>X3</b> |
|---|-----------------------------------|-----------|-----------|
| 1-1   | -1                                | -1        | -1        |
| 1-2   | -1                                | -1        | -1        |
| 1-3   | -1                                | -1        | -1        |
| 1-4   | -1                                | -1        | -1        |
| 2   | +1                                | -1        | -1        |
| 3   | -1                                | +1        | -1        |
| 4   | +1                                | +1        | -1        |
| 5   | -1                                | -1        | +1        |
| 6   | +1                                | -1        | +1        |
| 7   | -1                                | +1        | +1        |
| 8   | +1                                | +1        | +1        |
| <b>Variable X1, Tipo de soporte sólido</b>                      |                                   |           |           |
|   | -1                                |           | +1        |
|   | sílice-octadecilo C <sub>18</sub> |           | sílice    |
| <b>Variable X2, Volumen de elución (mL)</b>                     |                                   |           |           |
|   | -1                                |           | +1        |
|   | 5                                 |           | 10        |
| <b>Variable X3, Cantidad de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (g)</b> |                                   |           |           |
|   | -1                                |           | +1        |
|   | 0                                 |           | 0.3       |

### 3.6. Evaluación de la capacidad de absorción de radicales de oxígeno.

El procedimiento para determinar la actividad antioxidante de extractos obtenidos por dispersión de la matriz en fase sólida y con solvente se realizó con base en la metodología descrita por Ou, Hampsch & Prior, (2001). En cada pozo de la microplaca, se agregaron extracto diluido (25  $\mu\text{L}$ , 10000 mg/L, en metanol) y fluoresceína (150  $\mu\text{L}$ ,  $8.16 \times 10^{-5}$  M, en agua Tipo I), después, se incubó a 37 °C durante 20 min, en un lector de microplacas (*Turner Biosystems*, California, EE. UU.), que se operó en modo de fluorescencia. Posteriormente, se adicionó una solución de AAPH (volumen, concentración, en agua Tipo I) y se monitoreó, durante 80 min a 37 °C, la disminución de la fluorescencia de la fluoresceína, con longitudes de onda de emisión de 510 nm y excitación de 490 nm.

La capacidad antioxidante de los extractos se determinó a partir de la diferencia en la disminución de fluorescencia, entre el área bajo la curva (ABC) de los extractos y el blanco (Véase Ecuación 1), se cuantificó usando una curva de calibración de Trolox<sup>®</sup> y los resultados se expresaron en  $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$  de extracto. Las sustancias de referencia BHT y  $\alpha$ -tocoferol se evaluaron, según el procedimiento descrito.

$$ABC_{\text{neta}} = ABC_{\text{extracto}} - ABC_{\text{blanco}}$$

Ecuación 1

### 3.7. Análisis cromatográfico

**3.7.1. Análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.** La identificación de los metabolitos secundarios volatilizables se realizó en un equipo GC *Agilent Technologies (AT) 6890 Plus* (Palo Alto, CA, EE. UU.) acoplado a un detector selectivo de masas *AT MDS 5973 Network*.

La separación de los compuestos presentes en la fracción volátil obtenida por SPME se realizó en una columna capilar con fase estacionaria polar, de poli(etilenglicol) (DB-WAX, *J & W Scientific*, Folsom, CA, EE. UU.), de 60 m x 0,25 mm, D.I. x 25  $\mu\text{m}$   $d_f$ ; modo de inyección: *splitless*. Los metabolitos se liberaron de la fibra SPME por desorción, durante 15 min, en el puerto de inyección a una temperatura de 250 °C. La programación del horno cromatográfico fue de 50 °C (5 min) hasta 150 °C (2 min) a 5 °C/min y después hasta 230 °C (35 min), a 5 °C/min, la velocidad lineal media del gas fue de 25 cm/s. La temperatura de la línea de transferencia se mantuvo a 230° C, la fuente de ionización, a 230° C. Los espectros de masas se obtuvieron por impacto de electrones (EI), con energía de 70 eV, usando un barrido automático de radiofrecuencia (*full scan*) de 4 *scans/s*, en un rango de masas de  $m/z$  30- 350 Da.

La separación de los alcaloides obtenidos del extracto MSPD se llevó a cabo en una columna apolar de 5%-fenil-poli(metilsiloxano) (DB-5 MS, *J&W Scientific*, Folsom, CA, EE. UU.) de 60 m x 0,25 mm, D.I. x 0,25  $\mu\text{m}$   $d_f$ ; se empleó helio (99,995%, Linde, Bucaramanga, Colombia) como gas de arrastre, con una presión de entrada de 16,47 psi y un flujo de 1 mL/min. Se inyectó un volumen de 2  $\mu\text{L}$  en modo *split* (1:30), la temperatura del puerto de inyección fue de 250 °C. En el horno, la programación de temperatura fue desde 45 a 150 °C, a 4 °C/min, luego, se aumentó a 250 °C (5 min), a 5 °C/min, y después se elevó a 275 °C (15 min), a 10 °C/min; la velocidad lineal media del gas fue de 26 cm/s. La temperatura de la línea de transferencia se mantuvo a 285° C, la fuente de ionización, a 230° C. Los espectros de masas se obtuvieron por impacto de electrones (EI), con energía de 70 eV, usando barrido automático de radiofrecuencia (*full scan*) de 3,58 *scans/s*, en un rango de masas de  $m/z$  45 -450 Da.

Los compuestos volátiles analizados se identificaron, según criterios cromatográficos y espectrométricos.

Criterios cromatográficos: La identificación de los compuestos se realizó con base en los índices de retención lineales (LRI) calculados a partir del tiempo de retención del compuesto y las sustancias de referencia certificadas de *n*-parafinas, según la Ecuación 2.

$$I_R = 100 \times n + 100 \left[ \frac{t_{Rx} - t_{Rn}}{t_{RN} - t_{Rn}} \right] \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde:

$I_R$ : índice de retención lineal del compuesto de interés, *x*.

*N* y *n*: número de átomos de carbono del hidrocarburo que eluye antes (*n*) y después (*N*) del compuesto de interés, *x*, respectivamente.

$t_{Rx}$ : tiempo de retención del compuesto de interés, *x*.

$t_{Rn}$  y  $t_{RN}$ : tiempos de retención del hidrocarburo que eluye antes y después del analito de interés, *x*.

Criterios espectrométricos: los espectros de masas que se obtuvieron para cada uno de los compuestos presentes en las muestras, se compararon con los presentes en las bases de datos Adams, (2004), Willey y NIST.

**3.7.2. Análisis por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas con analizador de tiempo de vuelo.** Con el fin de encontrar las mejores condiciones de operación del equipo para el análisis de alcaloides tropanicos, se realizó un diseño experimental, donde los observables fueron: el área de la corriente iónica extraída (EIC, por sus siglas en inglés) de la escopolamina protonada  $[M+H]^+ = m/z$  304.1543 ( $C_{17}H_{21}NO_4$ ), la relación señal/ruido (S/N, por sus siglas en inglés) y el factor de simetría del pico cromatográfico. La concentración de escopolamina fue de 1 mg/L.

Las variables estudiadas fueron: voltajes de capilar y fragmentador, fase móvil y el porcentaje de ácido fórmico en la fase móvil. En la Tabla 5, se pueden observar los parámetros estudiados.

Tabla 5. *Parámetros estudiados en el diseño experimental*

| <b>Variable</b>                                 |                       |
|---|-----------------------|
| Voltaje capilar, kV                             | 1, 2, 3, 4 y 5        |
| Voltaje del fragmentador, V                     | 100, 150, 200, 250    |
| Solvente B                                      | Acetonitrilo, metanol |
| Porcentaje de ácido fórmico en la fase móvil, % | 0.2, 0.002 o 0.0001   |

El análisis por LC-MS se realizó en un equipo de HPLC 1200 *Series* (AT, Palo Alto, CA, EE. UU.), con una columna Kinetex  $C_{18}$  (*Phenomenex*, CA, EE. UU.) de 100 mm  $\times$  4,6 mm D.I., 2.6  $\mu$ m de tamaño de partícula, a 35°C. La composición de la fase móvil A fue: ácido fórmico al 0.2, 0.002 o 0.0001% en agua Tipo I y de la fase B: ácido fórmico al 0.2, 0.002 o 0.0001% en metanol (MeOH) o acetonitrilo (ACN), con el mismo contenido de ácido fórmico.

La condición inicial del gradiente fue de 95% de A y 5% de B, que cambió linealmente hasta 10% de B en 3 min, luego, a 20% de B en 5 min, y 80% de B, en 10 min, se mantuvo durante 5

min; posteriormente, se cambió a 100% de B en 5 min, durante 5 min, el retorno a las condiciones iniciales se realizó en 15 min. El tiempo total de la corrida fue de 40 min. El flujo de fase móvil fue de 0,2 mL/min, y el volumen de inyección, 4 µL.

La ionización fue por electronebulización en modo positivo, el analizador de masas es un tiempo de vuelo (TOF AT 6210, Series, Palo Alto, CA, EE. UU.). Los espectros de masas se adquirieron en el rango de masas de  $m/z$  100–950, con una velocidad de adquisición de 2 espectros/s. Se realizó la corrección de la masa en tiempo real utilizando una solución de purina ( $C_5H_4N_4$ ,  $m/z$  121,05087) y hexaquis (1H, 1H, 3H-tetrafluoropentoxi)-fosfa ze no ( $C_{18}H_{18}O_6N_3P_3F_{24}$ ,  $m/z$  922,00980). Los valores de relación señal/ruido y factor de simetría fueron calculados usando el *software* de datos *AT MassHunter* (Versión B.06.00-SP3).

La identificación de los compuestos en los extractos se realizó con base en la corriente iónica extraída para cada uno de los metabolitos protonados, *i.e.*, fragmentograma de masas, y medición de masas exactas.

La cuantificación de los alcaloides tropánicos presentes en los extractos se realizó por el método de estándar interno, para ello, se utilizó cocaína (500 µg/L, en agua Tipo I), como patrón de referencia, según la siguiente ecuación:

$$C_x = C_{istd} \times (A_x/A_{istd}) \quad \text{Ecuación 3}$$

Donde:

C<sub>x</sub>: Concentración (µg/L) del analito en la muestra.

A<sub>x</sub>: Área del pico cromatográfico del analito (en cuentas)

$C_{istd}$ : Concentración ( $\mu\text{g/L}$ ) del patrón interno (*istd*).

$A_{istd}$ : Área del pico cromatográfico del patrón interno (en cuentas).

#### 4. Análisis de resultados

##### 4.1. Identificación botánica

La identificación botánica y taxonómica de las especies bajo estudio se llevó a cabo en el Herbario Nacional del Instituto de Ciencias en la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, por la doctora Clara Inés Orozco, así: *Brugmansia suaveolens* (Humb. & Bonpl, ex Willd.) Sweet (Solanaceae), número COL 582525 y *Brugmansia suaveolens* (Humb. & Bonpl, ex Willd.) Sweet (Solanaceae), número COL 582526 (Véase Tabla 6).

Tabla 6. Identificación taxonómica de *B. suaveolens* (Humb. & Bonpl, ex Willd.) Sweet.

| Género            | Especie           | Familia    | Color de flor | N° COL |
|-------------------|-------------------|------------|---------------|--------|
| <i>Brugmansia</i> | <i>suaveolens</i> | Solanaceae | Rosada        | 582525 |
| <i>Brugmansia</i> | <i>suaveolens</i> | Solanaceae | Blanca        | 582526 |



Figura 11. Plantas *B. suaveolens*, centro de Excelencia CENIVAM, UIS, Bucaramanga, 16 de julio de 2016.

En la Figura 11, se muestran las plantas de *B. suaveolens* que se estudiaron, estas miden de 2-3 m de altura. Las flores rosadas duran ca. 8 días hasta entrar en estado de senescencia, mientras que las flores blancas duran ca. 5 días.

En las plantas estudiadas se observó la presencia de himenópteros durante el día, pero no se llevó a cabo el proceso de polinización ya que no hubo producción de fruto. Knapp, (2010) describe como posibles polinizadores del género *Brugmansia* a colibríes, murciélagos, polillas y abejas. Mejicano, (2011) estudió el cambio en la cantidad de polen para 70 flores de *B. suaveolens* y encontró que el polen disminuye generalmente en las noches, sugiriendo que

los polinizadores de las flores son nocturnos, probablemente murciélagos o polillas y que las abejas pueden ser polinizadores secundarios durante el día.

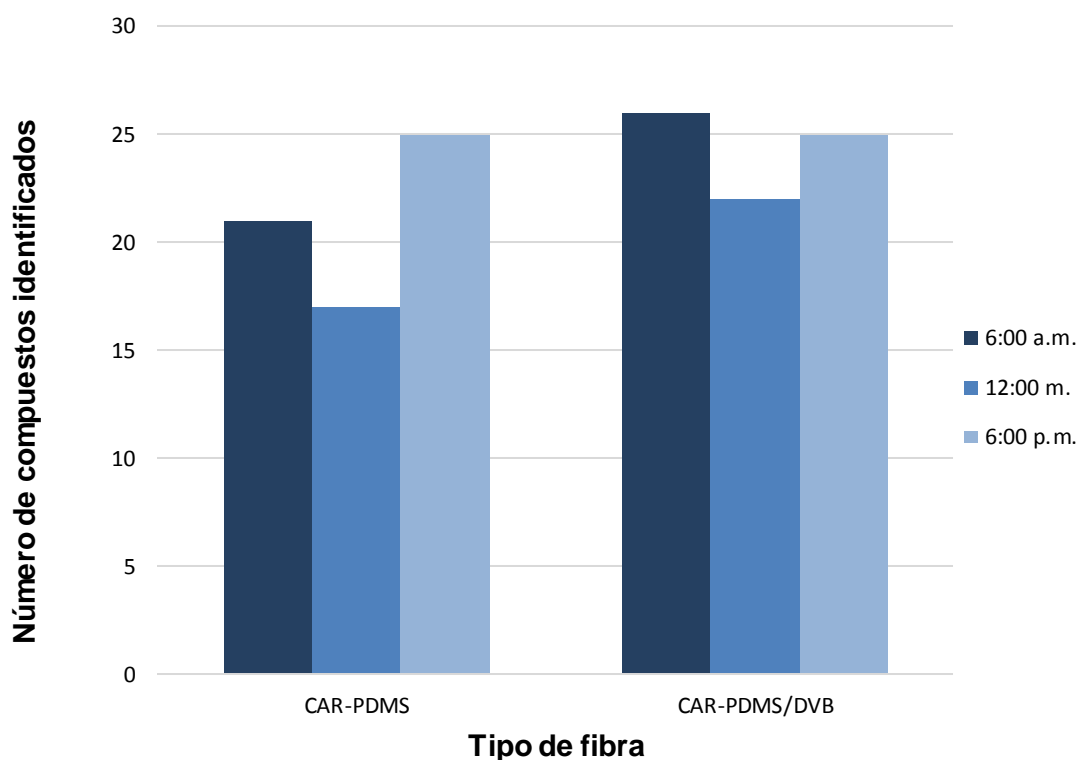
#### **4.2. Análisis por HS-SPME/GC-MS de compuestos volátiles de flores de *B. suaveolens*.**

**4.2.1. Extracción por HS-SPME de la fracción volátil de flores de *B. suaveolens*, con diferentes recubrimientos poliméricos de fibra SPME.** La extracción por HS-SPME se realizó con base en la metodología descrita en la Sección 2.4.1.; la identificación de los metabolitos secundarios presentes en la fracción volátil se realizó por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), según la metodología descrita en la Sección 2.8.1.

En la Tabla 7, se reporta la composición química de la fragancia de flores de *B. suaveolens* extraída por HS-SPME, con los recubrimientos poliméricos CAR-PDMS o CAR-PDMS/DVB. Los compuestos principales de la fragancia de flores de *B. suaveolens*, son monoterpenos y compuestos oxigenados. El *trans*- $\beta$ -ocimeno y el benzoato de metilo son los compuestos mayoritarios obtenidos con las dos fibras seleccionadas.

La composición química de la fragancia de las flores, fue similar para las extracciones realizadas los dos recubrimientos poliméricos evaluados. La fibra recubierta con CAR-PDMS/DVB presentó mayor selectividad para monoterpenos oxigenados, y sesquiterpenos oxigenados (Véase Tabla 7). Esto se puede explicar, según la naturaleza del recubrimiento, ya que CAR-PDMS es un recubrimiento de polaridad media-alta, pero CAR-PDMS/DVB es más polar y extrae más compuestos polares.

El número de compuestos identificados fue mayor a las 6:00 a.m. y a las 6:00 p.m., comparado con el de las fracciones aisladas al medio día, tal como se muestra en la *Figura 12*. En la *Tabla 8*, se puede observar que los valores de  $\Sigma A_{total}/A_{std}$ , obtenidos para las 6:00 a.m. y 6:00 p.m., no presentaron diferencias significativas entre los dos recubrimientos evaluados. Por tanto, esta variable no tiene significancia sobre el monitoreo de volátiles de flores de *B. suaveolens*.



*Figura 12.* Número de compuestos aislados por HS-SPME y detectados por GC-MS (>0.1%), a diferentes horas del día, usando diferentes recubrimientos poliméricos de la fibra SPME.

Tabla 7. Análisis por GC-MS de la fracción volátil obtenida por HS-SPME (CAR-PDMS y CAR-PDMS/DVB) de flores de *B. suaveolens* a las 6:00 p.m.

| Compuesto                                      | DB-WAX             |                      | GC Área relativa (% Valor $\pm$ SD, $n=3$ ) |                            |
|--|--------------------|----------------------|---|----------------------------|
|  | IRL <sub>Exp</sub> | IRL <sub>Lit</sub> * | CAR-PDMS                                    | CAR-PDMS/DVB               |
| Sabineno                                       | 1111               | 1122                 | 0,40 $\pm$ 0,07                             | -                          |
| $\beta$ -Mirceno                               | 1151               | 1160                 | 2 $\pm$ 1                                   | 3 $\pm$ 1                  |
| $\alpha$ -Terpineno                            | 1173               | 1178                 | 0,5 $\pm$ 0,2                               | 0,30 $\pm$ 0,04            |
| Limoneno                                       | 1190               | 1198                 | 3 $\pm$ 1                                   | 3 $\pm$ 1                  |
| 1,8-Cineol                                     | 1203               | 1211                 | 5 $\pm$ 2                                   | 16 $\pm$ 3                 |
| <i>cis</i> - $\beta$ -Ocimeno                  | 1222               | 1235                 | 0,6 $\pm$ 0,1                               | 0,50 $\pm$ 0,05            |
| <b><i>trans</i>-<math>\beta</math>-Ocimeno</b> | <b>1241</b>        | <b>1250</b>          | <b>49<math>\pm</math>13</b>                 | <b>50<math>\pm</math>6</b> |
| <i>p</i> -Cimeno                               | 1260               | 1270                 | 0,2 $\pm$ 0,1                               | 0,10 $\pm$ 0,05            |
| Terpinoleno                                    | 1274               | 1282                 | 0,20 $\pm$ 0,02                             | 0,20 $\pm$ 0,05            |
| <i>allo</i> -Ocimeno                           | 1359               | 1367                 | 1,3 $\pm$ 0,4                               | 0,8 $\pm$ 0,1              |
| Tetradecano                                    | 1394               | 1400                 | 0,5 $\pm$ 0,1                               | 0,10 $\pm$ 0,06            |
| Perilleno                                      | 1418               | 1425                 | 0,10 $\pm$ 0,03                             | -                          |
| <i>p</i> -Cimeneno                             | 1422               | 1438                 | 0,10 $\pm$ 0,02                             | 0,10 $\pm$ 0,01            |
| Cosmeno  | 1431               | 1411                 | 1,0 $\pm$ 0,2                               | 0,30 $\pm$ 0,06            |
| Hidrato de <i>cis</i> -sabineno                | 1450               | 1460                 | 0,10 $\pm$ 0,01                             | 0,10 $\pm$ 0,06            |
| Citronelal                                     | 1464               | 1475                 | 0,2 $\pm$ 0,1                               | 0,30 $\pm$ 0,01            |
| Pentadecano                                    | 1493               | 1500                 | 0,10 $\pm$ 0,03                             | 0,10 $\pm$ 0,03            |
| Benzaldehído                                   | 1503               | 1519                 | 2 $\pm$ 1                                   | 1,0 $\pm$ 0,5              |
| Linalol  | 1522               | 1543                 | 0,20 $\pm$ 0,05                             | 0,3 $\pm$ 0,2              |
| Terpinen-4-ol                                  | 1588               | 1601                 | 0,10 $\pm$ 0,07                             | 0,10 $\pm$ 0,04            |
| <b>Benzoato de metilo</b>                      | <b>1605</b>        | <b>1616</b>          | <b>30<math>\pm</math>7</b>                  | <b>15<math>\pm</math>5</b> |
| <i>trans</i> - $\beta$ -Farneseno              | 1652               | 1664                 | -   | 0,2 $\pm$ 0,1              |
| $\alpha$ -Terpineol                            | 1680               | 1694                 | 1,0 $\pm$ 0,3                               | 3,0 $\pm$ 0,1              |
| Salicilato de metilo                           | 1760               | 1768                 | 0,3 $\pm$ 0,1                               | 0,2 $\pm$ 0,1              |
| Alcohol bencílico                              | 1846               | 1865                 | 1,0 $\pm$ 0,7                               | 0,10 $\pm$ 0,07            |
| Alcohol feniletílico                           | 1883               | 1903                 | -   | 0,10 $\pm$ 0,01            |
| $\beta$ -Nerolidol                             | 2015               | 2036                 | 0,40 $\pm$ 0,01                             | 0,8 $\pm$ 0,1              |
| Monoterpenos                                   |                    |                      | 58 $\pm$ 12                                 | 60 $\pm$ 4                 |
| Monoterpenos oxigenados                        |                    |                      | 7 $\pm$ 3                                   | 20 $\pm$ 11                |
| Sesquiterpenos                                 |                    |                      | -   | 0,10 $\pm$ 0,01            |
| Sesquiterpenos oxigenados                      |                    |                      | 0,40 $\pm$ 0,01                             | 0,8 $\pm$ 0,1              |
| Compuestos oxigenados, alifáticos y otros      |                    |                      | 35 $\pm$ 5                                  | 20 $\pm$ 8                 |

Nota: \* (Babushok, Linstrom & Zenkevich, 2011).

Tabla 8. Variación de  $\Sigma A_{total}/A_{std}$  de los volátiles, aislados por HS-SPME, de flores de *B. suaveolens*, usando diferentes recubrimientos poliméricos de fibra de SPME.

| Fibra        | $\Sigma A_{total}/A_{std}$ (prom $\pm$ SD, $n=3$ ) |               |           |
|--------------|--|---------------|-----------|
|              | 6:00 a.m.  | 12:00 m.      | 6:00 p.m. |
| CAR-PDMS     | 6,7 $\pm$ 0,7                                      | 0,7 $\pm$ 0,1 | 6 $\pm$ 2 |
| CAR-PDMS/DVB | 6 $\pm$ 2  | 0,5 $\pm$ 0,1 | 6 $\pm$ 2 |

En resumen, los resultados anteriores mostraron una composición similar para los extractos obtenidos por HS-SPME, con los polímeros CAR-PDMS o CAR-PDMS/DVB. La diferencia estuvo en la cantidad de compuestos extraídos con los recubrimientos evaluados; con el recubrimiento de CAR-PDMS/DVB se logró extraer mayor número de compuestos, comparado con el recubrimiento de CAR-PDMS. Por tal razón, la fibra que se utilizó para realizar el monitoreo de volátiles florales fue CAR-PDMS/DVB.

En la *Figura 13*, aparecen los perfiles cromatográficos de la fragancia de flores de *B. suaveolens*, a las 6:00 p.m., obtenidos por HS-SPME utilizando los recubrimientos CAR-PDMS o CAR-PDMS/DVB.

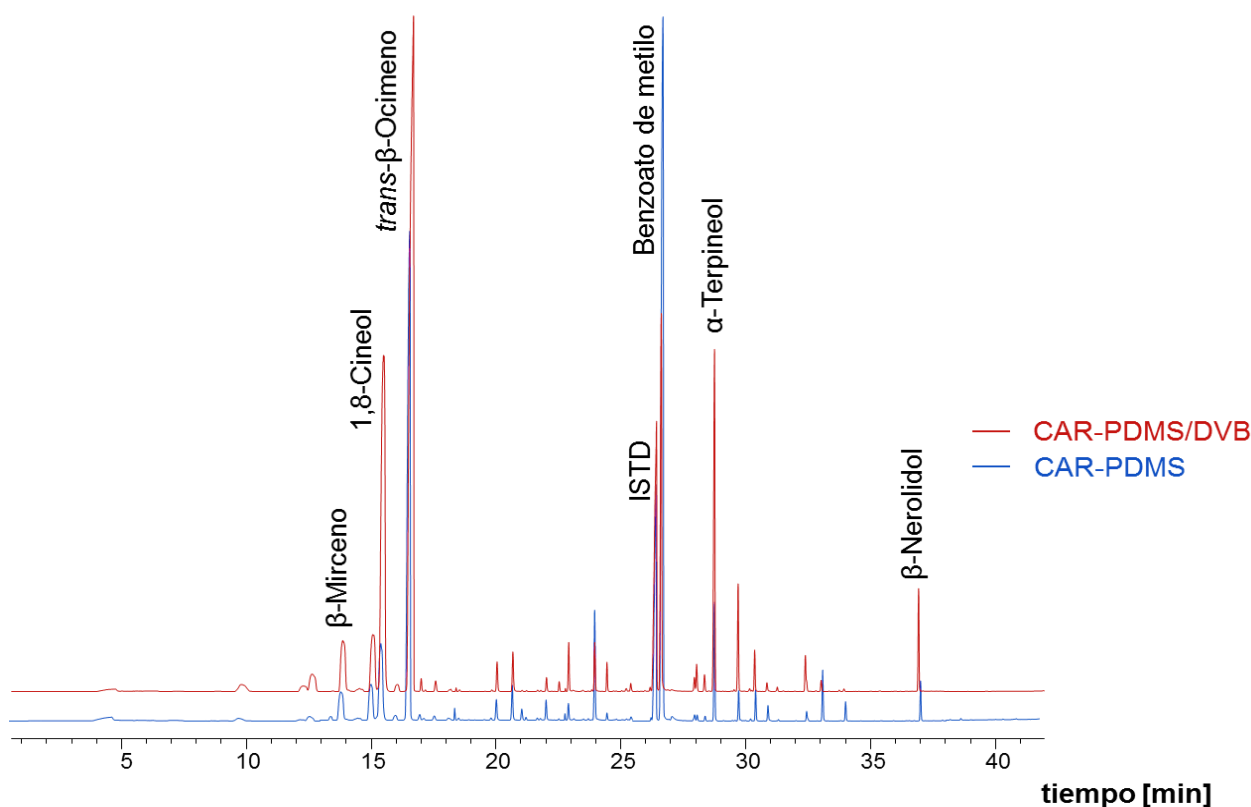


Figura 13. Perfiles cromatográficos, obtenidos por GC-MS, de las fracciones volátiles de *B. suaveolens* extraídas por HS-SPME con diferentes recubrimientos poliméricos de fibra SPME, a las 6:00 p.m. Columna DB-WAX, 60 m. Detector selectivo de masas (EI, 70 eV), modo de inyección: *splitless*.

**4.2.2. Extracción por HS-SPME (CAR-PDMS/DVB) de la fracción volátil de flores de *B. suaveolens*.** En la Tabla 9, se reporta la composición química, extraída por HS-SPME (CAR-PDMS/DVB) de la fragancia *in-vitro* de flores de *B. suaveolens* a las 6:00 a.m., 12:00 m. y 6:00 p.m. En la Figura 14, se muestran los perfiles cromatográficos típicos de los volátiles obtenidos por HS-SPME (CAR-PDMS/DVB), a diferentes horas del día.

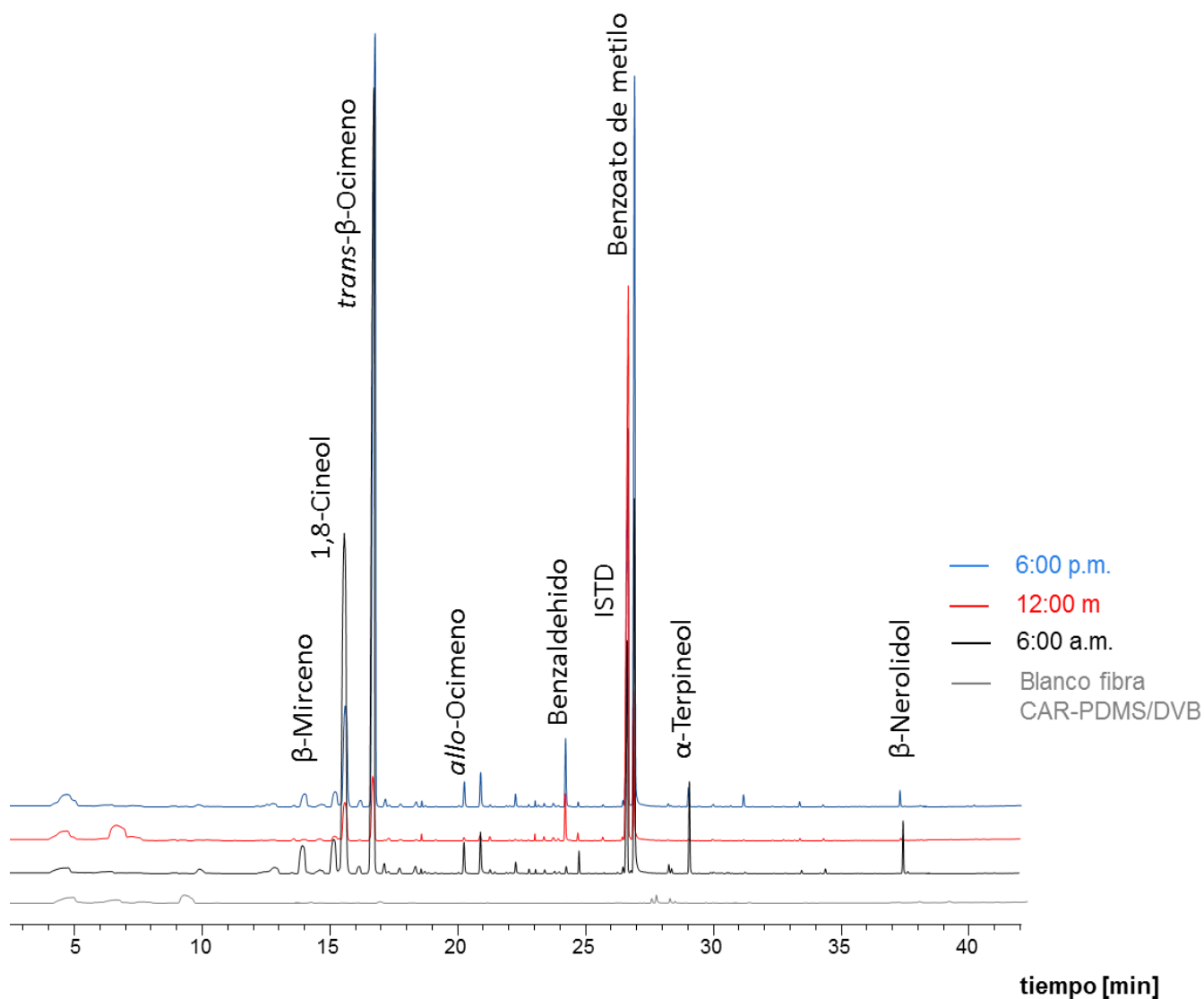


Figura 14. Perfiles cromatográficos, obtenidos por GC-MS, de las fracciones volátiles aisladas por HS-SPME (CAR-PDMS/DVB) de flores de *B. suaveolens* a diferentes horas del día (6:00 a.m., 12:00 m., o 6:00 p.m.). Columna DB-WAX, 60 m. Detector selectivo de masas (EI, 70 eV), modo de inyección: *splitless*.

Tabla 9. Monitoreo de compuestos volátiles de flores de *B. suaveolens*, obtenidos por HS-SPME (CAR-PDMS/DVB), a diferentes horas del día.

| Compuesto                                      | DB-WAX             |                      | GC Área relativa (% Valor $\pm$ SD, $n=3$ ) |                            |                            |
|--|--------------------|----------------------|---|----------------------------|----------------------------|
|  | IRL <sub>Exp</sub> | IRL <sub>Lit</sub> * | 6:00 a.m.                                   | 12:00 m.                   | 6:00 p.m.                  |
| $\beta$ -Mirceno                               | 1151               | 1160                 | 2 $\pm$ 1                                   | 1,0 $\pm$ 0,1              | 3 $\pm$ 1                  |
| $\alpha$ -Terpineno                            | 1173               | 1178                 | 0,6 $\pm$ 0,2                               | 2,0 $\pm$ 0,5              | 0,30 $\pm$ 0,04            |
| Limoneno                                       | 1190               | 1198                 | 2,0 $\pm$ 0,8                               | 3,0 $\pm$ 0,6              | 3 $\pm$ 1                  |
| Dodecano                                       | 1196               | 1200                 | -   | 0,7 $\pm$ 0,1              |                            |
| 1,8-Cineol                                     | 1203               | 1211                 | 27 $\pm$ 4                                  | 16 $\pm$ 4                 | 16 $\pm$ 3                 |
| <i>cis</i> - $\beta$ -Ocimeno                  | 1222               | 1235                 | 0,50 $\pm$ 0,01                             | -                          | 0,50 $\pm$ 0,05            |
| <b><i>trans</i>-<math>\beta</math>-Ocimeno</b> | <b>1241</b>        | <b>1250</b>          | <b>47<math>\pm</math>3</b>                  | <b>29<math>\pm</math>2</b> | <b>50<math>\pm</math>6</b> |
| <i>p</i> -Cimeno                               | 1260               | 1270                 | 0,3 $\pm$ 0,1                               | 1,0 $\pm$ 0,2              | 0,10 $\pm$ 0,05            |
| Terpinoleno                                    | 1274               | 1282                 | 0,30 $\pm$ 0,05                             | 0,6 $\pm$ 0,2              | 0,20 $\pm$ 0,05            |
| Metilheptenona                                 | 1320               | 1337                 | 0,10 $\pm$ 0,01                             | 0,40 $\pm$ 0,04            |                            |
| <i>allo</i> -Ocimeno                           | 1359               | 1367                 | 1,00 $\pm$ 0,05                             | 0,8 $\pm$ 0,1              | 0,8 $\pm$ 0,1              |
| Tetradecano                                    | 1394               | 1400                 | 0,3 $\pm$ 0,2                               | 0,9 $\pm$ 0,1              | 0,10 $\pm$ 0,06            |
| <i>p</i> -Cimeno                               | 1422               | 1438                 | 0,10 $\pm$ 0,05                             | -                          | 0,10 $\pm$ 0,01            |
| Cosmeno  | 1431               | 1411                 | 0,34 $\pm$ 0,01                             | 0,40 $\pm$ 0,02            | 0,30 $\pm$ 0,06            |
| Hidrato de <i>cis</i> -sabineno                | 1450               | 1460                 | 0,12 $\pm$ 0,01                             | 0,3 $\pm$ 0,1              | 0,10 $\pm$ 0,06            |
| Citronelal                                     | 1464               | 1475                 | -   | -                          | 0,30 $\pm$ 0,01            |
| Decanal  | 1485               | 1496                 | -   | 0,8 $\pm$ 0,1              |                            |
| Pentadecano                                    | 1493               | 1500                 | 0,2 $\pm$ 0,1                               | 0,5 $\pm$ 0,1              | 0,10 $\pm$ 0,03            |
| Benzaldehído                                   | 1503               | 1519                 | 0,7 $\pm$ 0,1                               | 5 $\pm$ 3                  | 1,0 $\pm$ 0,5              |
| Linalol  | 1522               | 1543                 | 0,7 $\pm$ 0,1                               | 0,7 $\pm$ 0,4              | 0,3 $\pm$ 0,2              |
| Terpinen-4-ol                                  | 1588               | 1601                 | 0,2 $\pm$ 0,1                               | 1,0 $\pm$ 0,5              | 0,10 $\pm$ 0,04            |
| <i>trans</i> - $\beta$ -Cariofileno            | 1600               | 1599                 | 0,10 $\pm$ 0,03                             | -                          |                            |
| <b>Benzoato de metilo</b>                      | <b>1605</b>        | <b>1616</b>          | <b>14<math>\pm</math>4</b>                  | <b>40<math>\pm</math>7</b> | <b>15<math>\pm</math>5</b> |
| <i>trans</i> - $\beta$ -Farneseno              | 1652               | 1664                 | 0,20 $\pm$ 0,05                             | -                          | 0,2 $\pm$ 0,1              |
| $\alpha$ -Terpineol                            | 1680               | 1694                 | 2 $\pm$ 1                                   | 0,2 $\pm$ 0,1              | 3,0 $\pm$ 0,1              |
| Salicilato de metilo                           | 1760               | 1768                 | 0,10 $\pm$ 0,05                             | -                          | 0,2 $\pm$ 0,1              |
| Alcohol bencílico                              | 1846               | 1865                 | 0,10 $\pm$ 0,05                             | -                          | 0,10 $\pm$ 0,07            |
| Alcohol feniletílico                           | 1883               | 1903                 | 0,20 $\pm$ 0,08                             | 0,3 $\pm$ 0,1              | 0,10 $\pm$ 0,01            |
| $\beta$ -Nerolidol                             | 2015               | 2036                 | 0,7 $\pm$ 0,3                               | 0,40 $\pm$ 0,04            | 0,8 $\pm$ 0,1              |
| Monoterpenos                                   |                    |                      | 54 $\pm$ 4                                  | 37 $\pm$ 3                 | 60 $\pm$ 4                 |
| Monoterpenos oxigenados                        |                    |                      | 29 $\pm$ 4                                  | 18 $\pm$ 4                 | 20 $\pm$ 11                |
| Sesquiterpenos                                 |                    |                      | 0,30 $\pm$ 0,04                             | -                          | 0,10 $\pm$ 0,01            |
| Sesquiterpenos oxigenados                      |                    |                      | 0,70 $\pm$ 0,03                             | 0,40 $\pm$ 0,04            | 0,8 $\pm$ 0,1              |
| Compuestos oxigenados, alifáticos y otros      |                    |                      | 14 $\pm$ 8                                  | 42 $\pm$ 4                 | 19 $\pm$ 8                 |

Nota: \* (Babushok, Linstrom & Zenkevich, 2011).

Se lograron identificar por HS-SPME/GC-MS *ca.* 29 compuestos en la fragancia floral de *B. suaveolens*. El *trans*- $\beta$ -ocimeno, 1,8-cineol y benzoato de metilo fueron los compuestos mayoritarios.

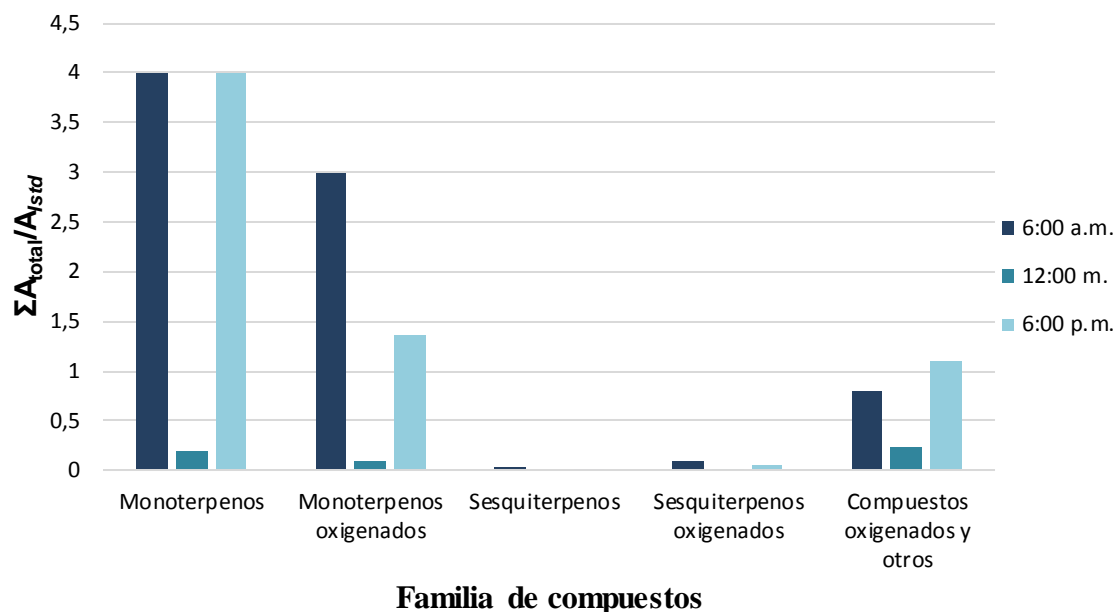


Figura 15. Relación  $\Sigma A_{total}/A_{std}$ , según la familia de compuestos presentes en la fracción volátil de flores de *B. suaveolens*.

La emisión más intensa de monoterpenos oxigenados, sesquiterpenos y sesquiterpenos oxigenados se registró a las 6:00 a.m. La mayor cantidad de compuestos oxigenados se presentó a las 6:00 p.m. Los monoterpenos tuvieron igual emisión a las 6:00 a.m. y 6:00 p.m. Pocos compuestos volátiles se emiten al medio día. (Figura 15).

La fracción volátil de flores de *B. suaveolens*, a las 6:00 a.m., estuvo compuesta, principalmente, por *trans*- $\beta$ -ocimeno ( $47\pm 3\%$ ), 1,8-cineol ( $27\pm 4\%$ ), benzoato de metilo ( $14\pm 4\%$ ) y limoneno ( $2,0\pm 0,8\%$ ). Compuestos como *cis*- $\beta$ -ocimeno, *p*-cimeneno, *trans*- $\beta$ -farneseno, salicilato de metilo y alcohol bencílico solo estuvieron presentes en la fracción volátil emitida a las 6:00 a.m. y 6:00 p.m.

*trans*- $\beta$ -Cariofileno sólo aparece en la fracción volátil a las 6:00 a.m.; este compuesto posee efecto antiinflamatorio y citoprotector del tracto gastro-intestinal (Tambe, Tsujiuchi, Honda, Ikeshiro & Tanaka, 1996).

Al medio día, se emiten menos volátiles de flores de *B. suaveolens*, entre ellos, los principales son benzoato de metilo ( $40\pm 7\%$ ), *trans*- $\beta$ -ocimeno ( $29\pm 2\%$ ) y 1,8-cineol ( $16\pm 4\%$ ).

El perfil de volátiles de flores de *B. suaveolens*, muestreado a las 6:00 p.m., estuvo compuesto, principalmente, por *trans*- $\beta$ -ocimeno ( $50\pm 6\%$ ), 1,8-cineol ( $16\pm 3\%$ ), benzoato de metilo ( $15\pm 5\%$ ) y limoneno ( $3\pm 1\%$ ). Citronelal aparece solo durante el monitoreo a las 6:00 p.m., este monoterpeno oxigenado es uno de los más reportados en aceites esenciales de varias especies aromáticas y se usa en perfumería, cosméticos y en la industria de jabones (Lenardao, Botteselle, de Azambuja, Perin & Jacob 2007; Quintans, *et al.*, 2008; Lawless, 2013).

En la *Figura 16*, se muestra el perfil cromatográfico de volátiles emitidos por flores de *B. suaveolens* a las 6:00 a.m.; los perfiles cromatográficos de los volátiles monitoreados a las 12:00 m. y 6:00 p.m. aparecen en los Apéndices A y B. La fracción volátil de las flores de *B. suaveolens*, monitoreada a las 6:00 a.m., estuvo compuesta, principalmente, por monoterpenos: *trans*- $\beta$ -ocimeno ( $47\pm 3\%$ ), limoneno ( $2,0\pm 0,8\%$ ) y  $\beta$ -mirceno ( $2\pm 1\%$ ); monoterpenos oxigenados: 1,8-cineol ( $27\pm 4\%$ ),  $\alpha$ -terpineol ( $2\pm 1\%$ ) y linalol ( $0,7\pm 0,1\%$ ); sesquiterpenos: *trans*- $\beta$ -farneseno ( $0,20\pm 0,05\%$ ) y *trans*- $\beta$ -cariofileno ( $0,10\pm 0,03\%$ ); sesquiterpenos oxigenados:  $\beta$ -nerolidol ( $0,7\pm 0,3\%$ ) y compuestos oxigenados: benzoato de metilo ( $14\pm 4\%$ ), benzaldehído ( $0,7\pm 0,1\%$ ) y alcohol feniletílico ( $0,20\pm 0,08\%$ ).

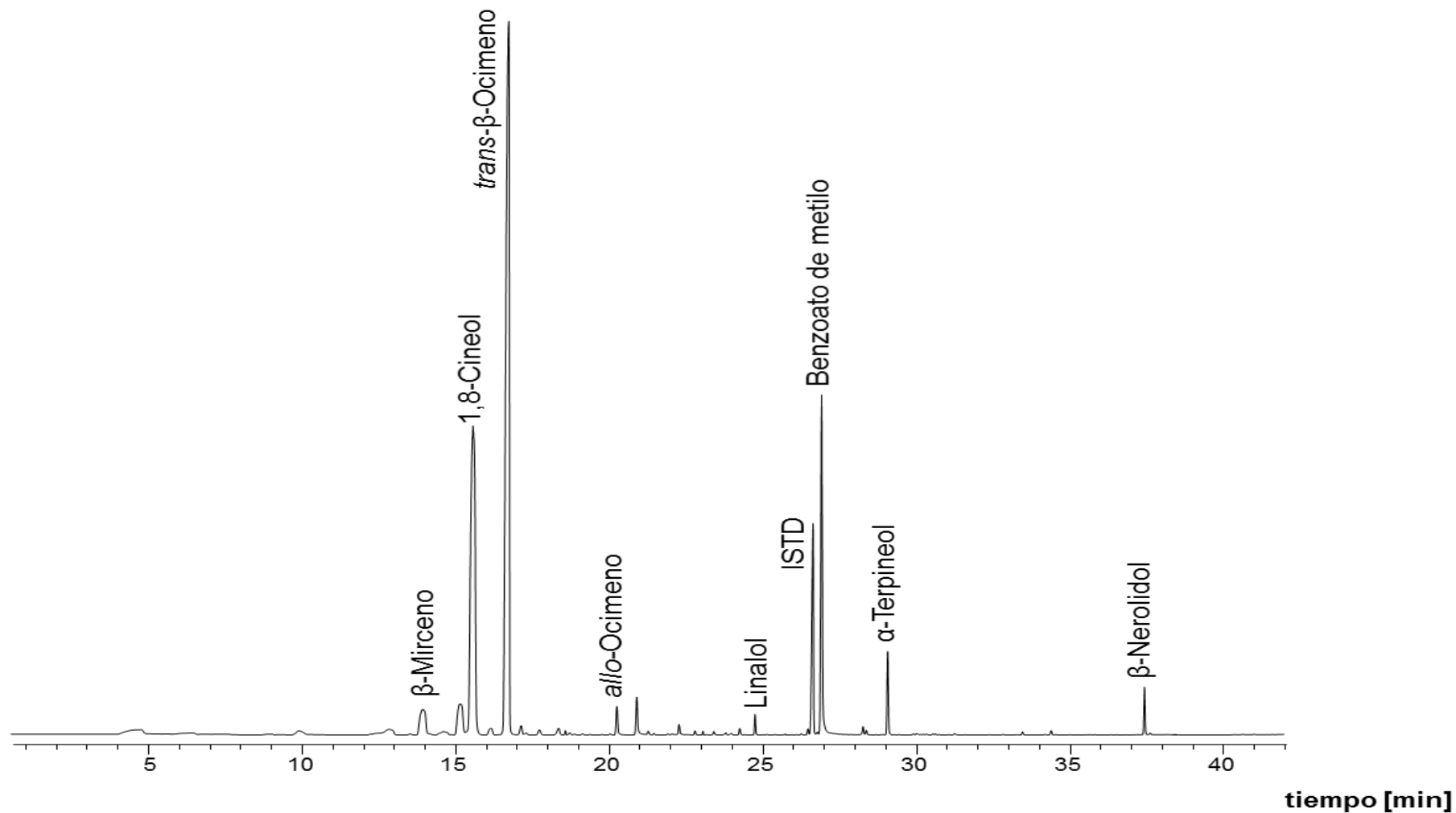


Figura 16. Perfil cromatográfico, obtenido por GC-MS, de la fracción volátil aislada por HS-SPME (CAR-PDMS/DVB) de flores de *B. suaveolens*, monitoreadas a las 6:00 a.m. Columna DB-WAX, 60 m. Detector selectivo de masas (EI, 70 eV), modo de inyección: *splitless*.

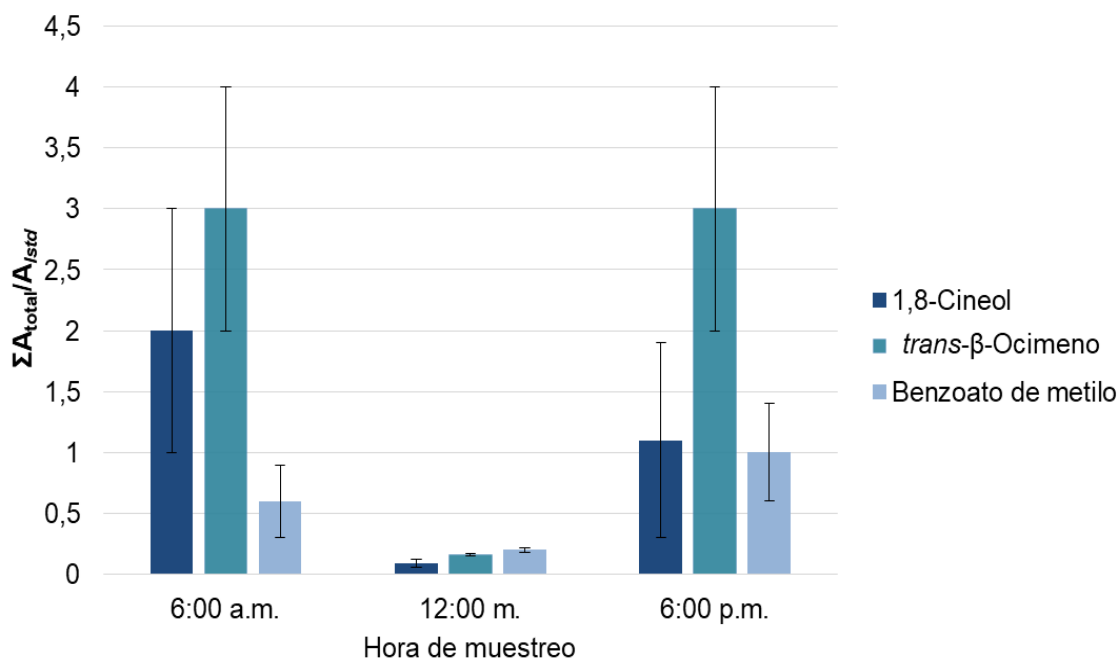


Figura 17. Relación  $\Sigma A_{total}/A_{istd}$ , de los compuestos mayoritarios presentes en la fracción volátil de flores de *B. suaveolens*, monitoreadas *in-vitro* por HS-SPME (CAR-PDMS/DVB), a diferentes horas del día.

El *trans*-β-ocimeno es el compuesto más abundante emitido por las flores de *B. suaveolens* a las 6:00 p.m. (Figura 17). El *trans*-β-ocimeno posee efecto atrayente del depredador de araña roja (*Tetranychidae*) en plantas pertenecientes al género *Torenia* (Shimoda, Nishihara, Ozawa, Takabayashi & Arimura, 2012), también, es atrayente de mariposas (*Heliconius melpomene*), que ayudan a la polinización de flores de *Lantana cámara* (Andersson & Dobson, 2003); y actúa como feromona de larvas jóvenes de abejas melíferas (*Apis mellifera*) para expresar sus necesidades nutricionales a las abejas obreras (Maisonasse, Lenoir, Beslay, Crauser & Le Conte, 2010).

El 1,8-cineol es el segundo componente más abundante de la fracción volátil de flores de *B. suaveolens*, monitoreada a las 6:00 p.m. El 1,8-cineol presenta actividad insecticida

(Jacobson & Haller, 1947), antiinflamatoria (Juergens, *et al.*, 2003), antinociceptiva (Liapi, *et al.*, 2007) y efecto cardiovascular sobre ratas normotensivas (Lahlou, Figueiredo, Magalhães & Leal, 2002).

El benzoato de metilo es el componente mayoritario, emitido a las 12:00 m., pero su abundancia disminuye a las 6:00 a.m., en comparación con el *trans*- $\beta$ -ocimeno y el 1,8-cineol. El benzoato de metilo es atrayente de abejas de las orquídeas (Euglossini) (Schiestl & Roubik, 2003).

Existen pocos estudios sobre compuestos volátiles de *Brugmansia*. Kite & Leon (1995) usaron *headspace* dinámico *in-vivo* con trampa Tenax para estudiar los volátiles emitidos por flores y hojas de *B. candida*. Stashenko & Martínez (2008) realizaron HS-SPME *in-vivo* usando fibra recubierta con PDMS para monitorear la variación de la fracción volátil de flores de *B. suaveolens*. Anthony, Zuchowski & Setzer (2009) usaron destilación-extracción simultánea con cloroformo de flores de *B. suaveolens*, para estudiar el cambio composicional de los volátiles en flores frescas y senescentes, Molina (2005) realizó HS-SPME, a diferentes horas del día, empleando el recubrimiento de PDMS/DVB para monitorear la fracción volátil de flores rosadas de *B. suaveolens*. En estos estudios, el *trans*- $\beta$ -ocimeno y el 1,8-cineol eran compuestos mayoritarios de la fragancia floral, al igual que lo encontrado en la presente investigación.

Para la identificación de los metabolitos secundarios volátiles presentes en la fragancia de flores de *B. suaveolens*, se utilizaron los índices de retención lineales y la comparación de los espectros de masas experimentales con los presentes en bases de datos, junto con el estudio de

los patrones de fragmentación de los compuestos. Como ejemplo se presentan los esquemas de fragmentación del *trans*- $\beta$ -ocimeno y del benzoato de metilo.

En la *Figura 18*, se muestra el espectro de masas del *trans*- $\beta$ -ocimeno y su patrón de fragmentación. El ion molecular  $[M]^+$  en  $m/z$  136 posee una intensidad baja (8%) y su fragmentación conduce a la formación de iones característicos para monoterpenos, a saber:  $(M-CH_3)^+$  en  $m/z$  121 (20%),  $(M-CH_3-C_2H_4)^+$  en  $m/z$  93, como el ion pico de base, y el fragmento  $(M-CH_3-C_2H_4-2H)^+$  en  $m/z$  91 (53%). El fragmento en  $m/z$  107 (8%), proviene de la eliminación del radical etilo,  $C_2H_5^{\cdot}$ , del ion  $M^+$ .

En el espectro de masas del benzoato de metilo, el ion molecular  $[M]^+$  en  $m/z$  136 (41%) presenta una ruptura  $\alpha$  que produce el fragmento en  $m/z$  105 (100%), que es característico para los benzoatos, seguida de la pérdida de CO, para formar el ion en  $m/z$  77 (55%), consecutivamente, que expulsa el acetileno,  $C_2H_2$ , para formar el fragmento en  $m/z$  51 (17%). El espectro de masas y la ruta de fragmentación del benzoato de metilo, se muestran en la *Figura 19*.

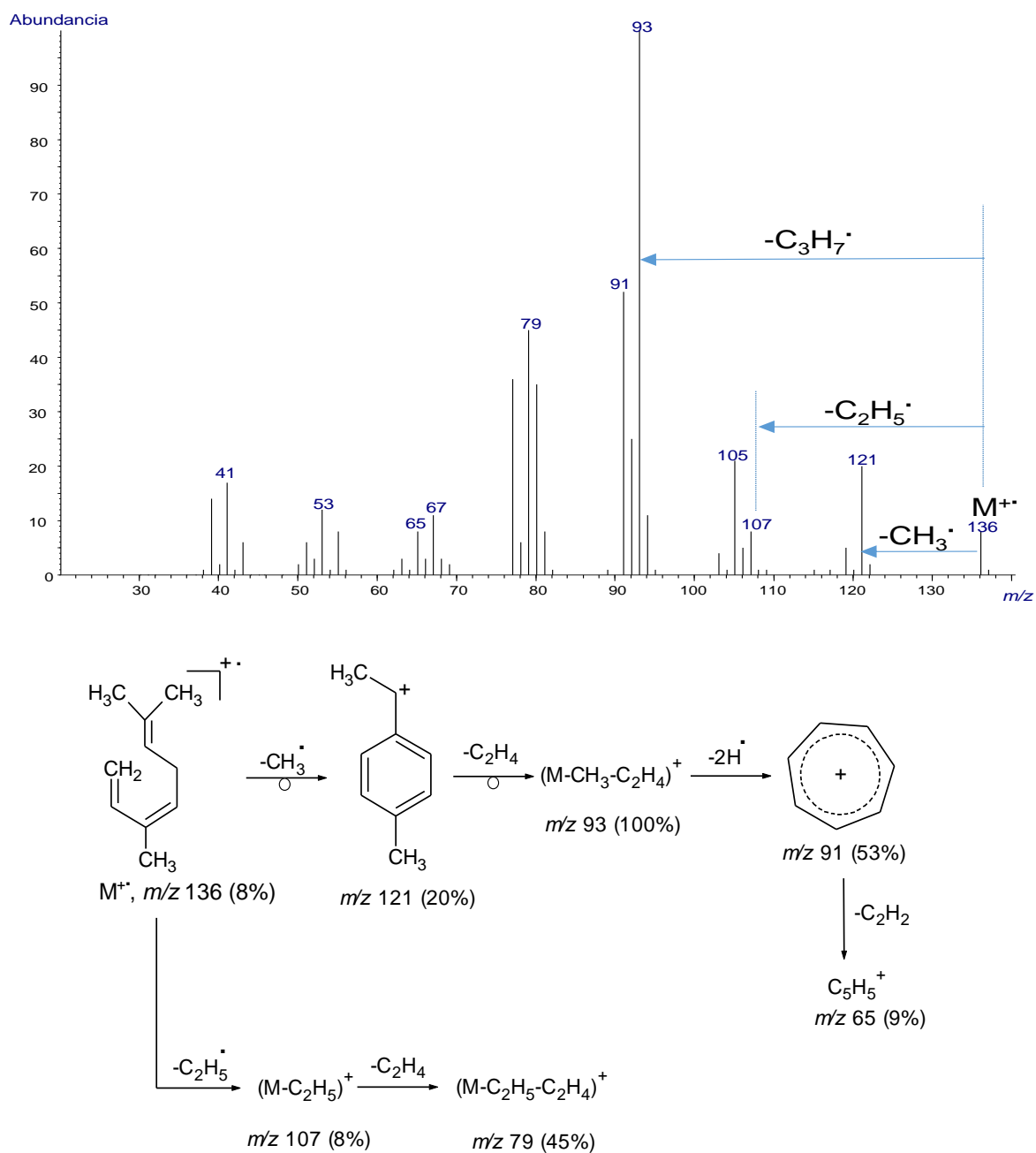


Figura 18. Espectro de masas, obtenido por GC-MS (EI, 70 eV), y patrón de fragmentación del *trans*- $\beta$ -ocimeno.

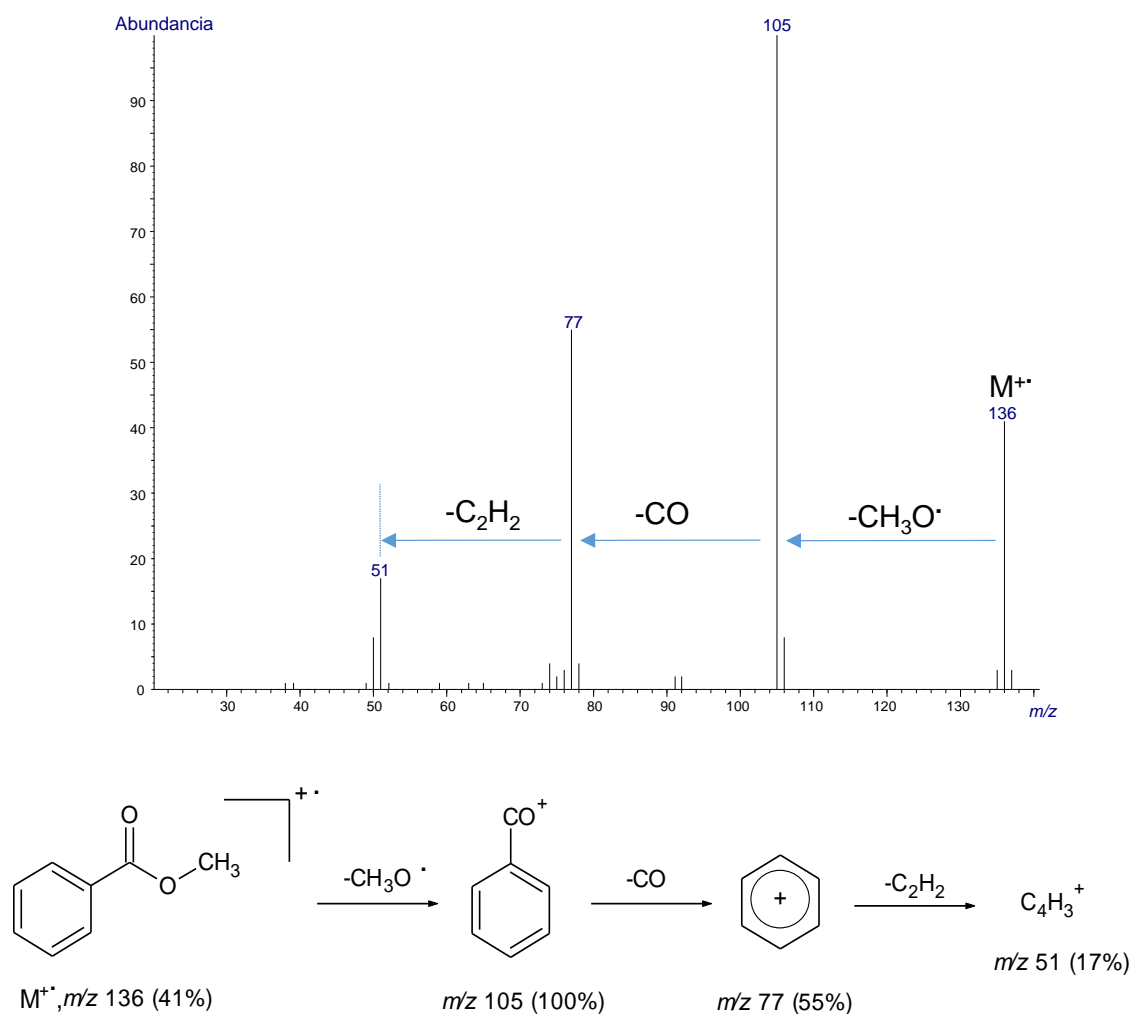


Figura 19. Espectro de masas, obtenido por GC-MS (EI, 70 eV), y patrón de fragmentación del benzoato de metilo.

#### 4.3. Análisis por GC-MS de alcaloides en flores de *B. suaveolens*.

La extracción de alcaloides de flores blancas y rosadas de *B. suaveolens* se realizó por MSPD, siguiendo la metodología descrita en la Sección 2.5.2.; los alcaloides aislados se identificaron por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), según el procedimiento descrito en la Sección 2.8.1. En las Figuras 20 y 21, se muestran los perfiles

cromatográficos de los extractos de las dos flores. La identificación de los compuestos aislados se encuentra en las Tablas 10 y 11.

Tabla 10. Identificación por GC-MS de alcaloides obtenidos por MSPD de flores blancas de *B. suaveolens*.

| Pico N°<br>Fig. 20 | Compuesto   | IRL<br>Exp,<br>DB-5 | Cantidad<br>relativa, % | Ref.      |
|--------------------|---|---------------------|-------------------------|-----------|
| 1                  | 3 $\alpha$ -Hidroxi-6-(2-metilbutiriloxi)tropano  | 1787                | 0.4                     | [a, b]    |
| 2                  | 3 $\beta$ -Hidroxi-6-(2-metilbutiriloxi)tropano   | 1795                | 0.1                     | [a, b]    |
| 3                  | 3 $\alpha$ -Tigloiloxi-6 $\beta$ -hidroxitropano  | 1883                | 0.1                     | [a, b]    |
| 4                  | 3 $\alpha$ -Hidroxi-6 $\beta$ -tigloiloxitropano  | 1891                | 0.4                     | [a, b]    |
| 5                  | 3 $\beta$ -Hidroxi-6 $\beta$ -tigloiloxitropano   | 1901                | 6.0                     | [a, b]    |
| 6                  | 3 $\alpha$ -Tigloiloxi-6 $\beta$ -acetoxitropano  | 1934                | 1.6                     | [a, b]    |
| 7                  | 3 $\alpha$ -Tigloiloxi-6 $\beta$ -propioniloxitropano   | 2020                | 0.1                     | [a, b]    |
| 8                  | N.I.; <i>m/z</i> (I%): 297 (M <sup>+</sup> , 1%), 198 (4%), 138 (42%), 137 (31%), 95 (35%), 94 (100%), 55 (19%) | 2088                | 1.4                     |           |
| 9                  | Apoatropina   | 2096                | 0.2                     | [a, b, c] |
| 10                 | 3-Tigloiloxi-6-metilbutiriloxitropano   | 2136                | 0.1                     | [a, b]    |
| 11                 | 6,7-Dihidrohiosciamina  | 2190                | 0.3                     | [d, e]    |
| 12                 | Apoescopolamina   | 2211                | 1.3                     | [a, b]    |
| 13                 | Hiosciamina   | 2247                | 11                      | [a, b]    |
| 14                 | 3 $\alpha$ -6 $\beta$ -Ditigloiloxitropano  | 2261                | 0.1                     | [a, b]    |
| 15                 | 3-Tigloiloxi-6-isovaleriloxi-7-hidroxitropano   | 2272                | 0.1                     | [f]       |
| 16                 | Escopolamina  | 2391                | 72.0                    | [a, b]    |
| 17                 | 3-6-Ditigloiloxi-7-hidroxitropano   | 2402                | 0.4                     | [a, b]    |
| 18                 | 7-Hidroxihiosciamina  | 2447                | 0.3                     | [a, c]    |
| 19                 | 3-(2'-Hidroxitropoiloxi)-6,7-epoxitropano   | 2456                | 0.9                     | [a, g]    |
| 20                 | 3-Tropoiloxi-6-acetoxitropano   | 2489                | 1.0                     | [a, h]    |
| 21                 | N.I.; <i>m/z</i> (I%): 347 (M <sup>+</sup> , 5%), 303 (12%), 140 (31%), 95 (72%), 94 (100%), 55 (13%)           | 2508                | 0.1                     |           |
| 22                 | 3 $\alpha$ -Tropoiloxi-6-tigloiloxitropano  | 2827                | 0.8                     | [a, b]    |
| 23                 | 3 $\beta$ -Tropoiloxi-6-tigloiloxitropano   | 2840                | 0.5                     | [a, b]    |
| 24                 | N.I.; <i>m/z</i> (I%): 385 (M <sup>+</sup> , 3%), 303 (14%), 138 (76%), 95 (53%), 94 (100%), 55 (25%)           | 2977                | 1.0                     |           |

*Nota:* N.I.: Compuesto no identificado, a. Doncheva, *et al.* (2006), b. Witte, Müller & Arfmann (1987), c. Ionkova, Witte & Alfermann (1994), d. El Bazaoui, Bellimam & Soulaymani, (2011), e. Blossey, Budzikiewicz, Ohashi, Fodor & Djerassi, (1964), f. Evans & Major, (1968), g. Evans & Lampard, (1972), h. Berkov, Pavlov, Kovatcheva, Stanimirova & Philipov, (2003).

Tabla 11. *Identificación por GC-MS de los alcaloides obtenidos por MSPD de flores rosadas de B. suaveolens.*

| Compuesto    | LRI Exp,<br>DB-5 | Cantidad relativa, % | Ref.   |
|--------------|------------------|----------------------|--------|
| Escopolamina | 2381             | 100                  | [a, b] |

*Nota:* a. Doncheva, *et al.* (2006), b. Witte, Müller & Arfmann (1987).

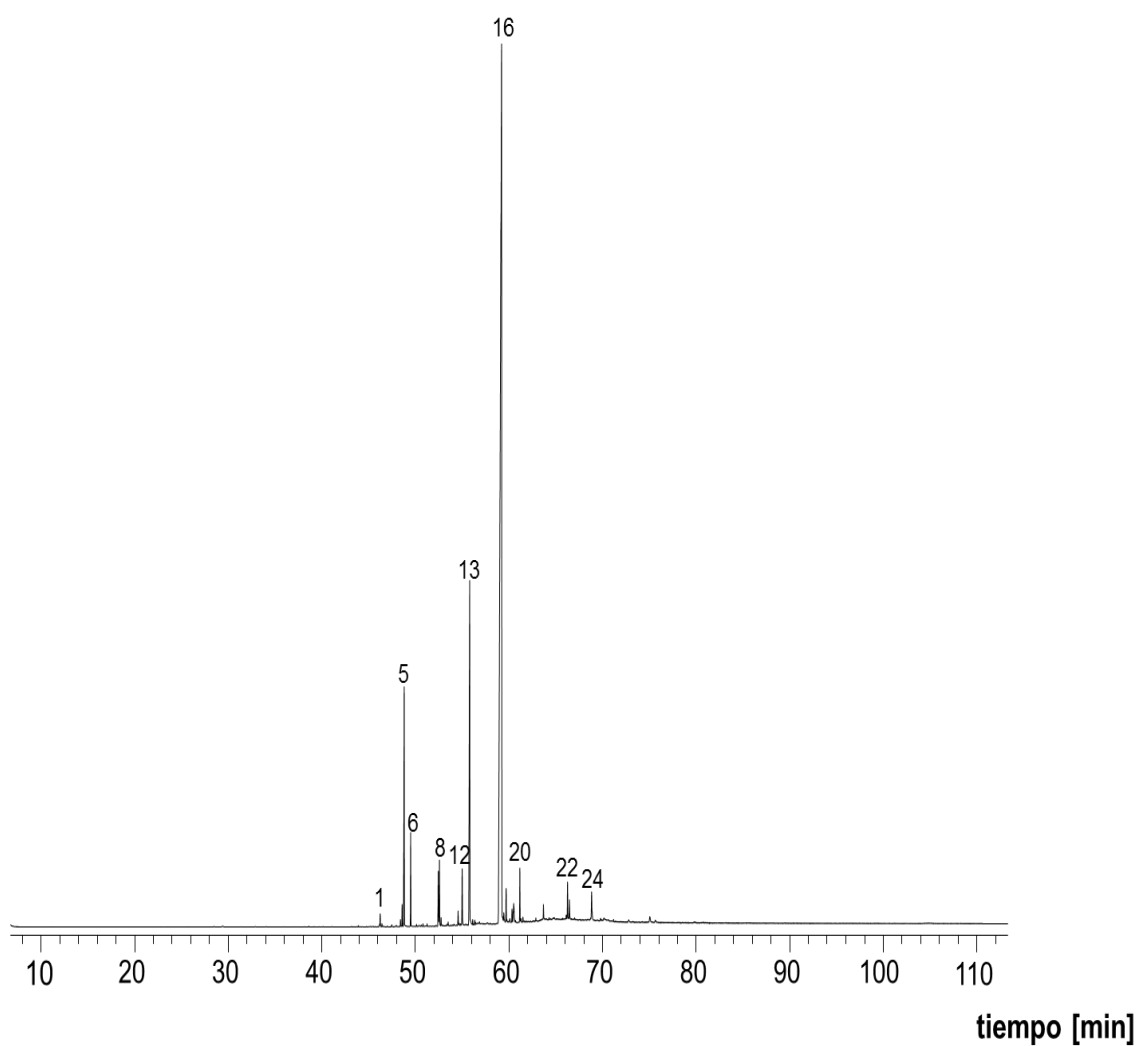


Figura 20. Perfil cromatográfico, obtenido por GC-MS, de alcaloides aislados por MSPD de flores blancas de *B. suaveolens*. Columna DB-5, 60 m. Detector selectivo de masas (EI, 70 eV), modo de inyección: *split* 1:30.

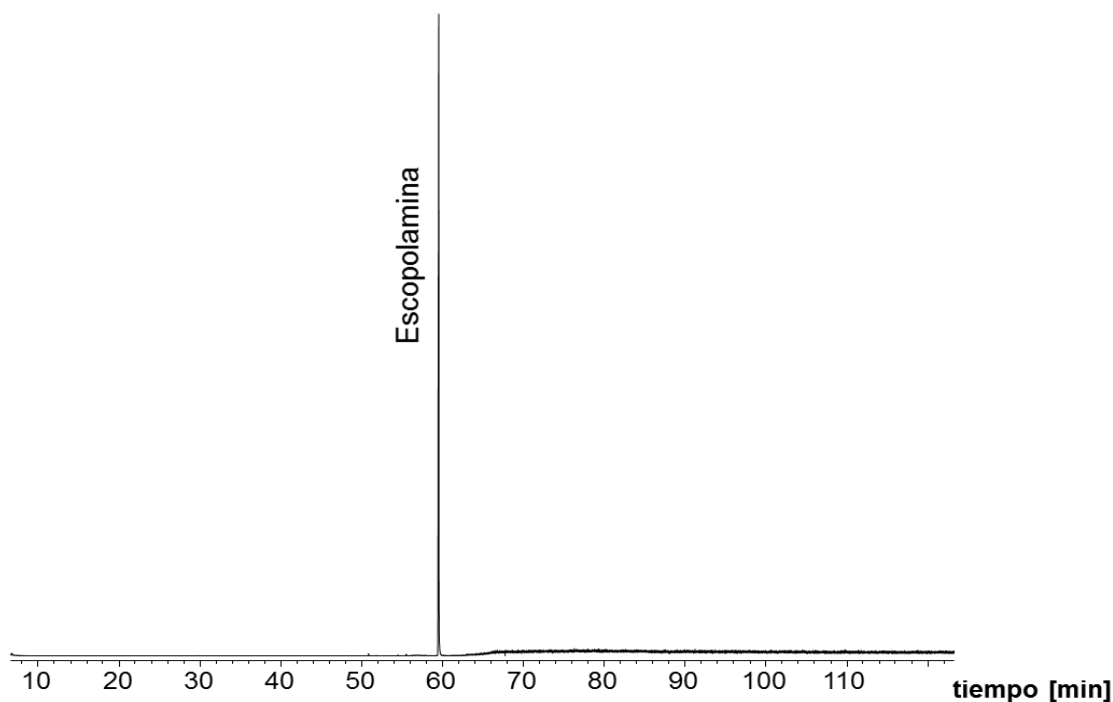
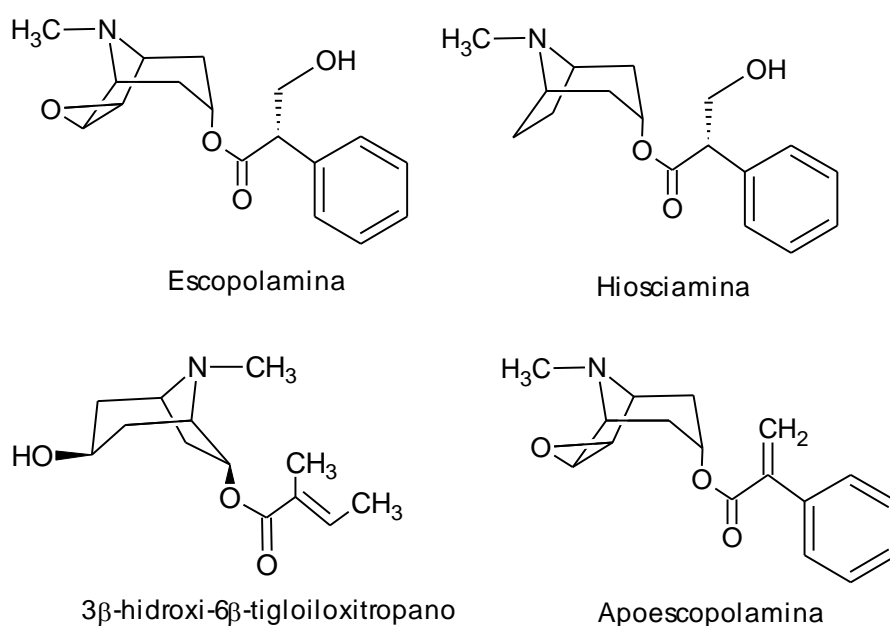


Figura 21. Perfil cromatográfico, obtenidos por GC-MS, de alcaloides aislados por MSPD de flores rosadas de *B. suaveolens*. Columna DB-5, 60 m. Detector selectivo de masas (EI, 70 eV), modo de inyección: *split* 1:30.

En el extracto de flores blancas de *B. suaveolens* se identificaron 21 alcaloides tropánicos, en cantidades relativas  $> 0,1\%$ , representados por el 98% del área cromatográfica total. En el extracto de flores rosadas solo se identificó la escopolamina. En los Apéndices C, D y E, se muestran los espectros de masas (EI, 70 eV) de los compuestos no identificados mencionados en la Tabla 10.

En los estudios realizados con hojas y tallos de *B. suaveolens* se han reportado diferentes alcaloides tropánicos (Doncheva, *et al.*, 2006; Evans & Lampard, 1972), mientras que las investigaciones realizadas en flores solo mencionan a la escopolamina (Alves, Sartoratto & Trigo, 2007; Mai, 2017).

En el extracto obtenido por MSPD de flores blancas de *B. suaveolens* los compuestos mayoritarios fueron escopolamina (72%), hiosciamina (11%) y 3 $\beta$ -hidroxi-6 $\beta$ -tigloiloxitropano (6%), (Véase *Figura 22*). Los alcaloides 6,7-dihidrohiosciamina y 3-tigloiloxi-6-isovaleriloxi-7-hidroxitropano no han sido reportados previamente en *B. suaveolens*. En la *Figura 23*, se muestra el espectro de masas de la escopolamina.



*Figura 22.* Estructura química de la escopolamina, la hiosciamina, el 3 $\beta$ -hidroxi-6 $\beta$ -tigloiloxitropano y la Apoescolamina.

En el espectro de masas de la escopolamina, aparece el ion molecular  $[M]^+$  en  $m/z$  303 (38%). La pérdida de agua genera un fragmento de baja intensidad en  $m/z$  285 (1%). La ruptura  $\alpha$  del enlace éster produce los fragmentos en  $m/z$  154 (39%) y 138 (93%), el fragmento en  $m/z$  137 (19%) se genera por la eliminación de ácido trópico, consecutivamente, se da la ruptura de

los enlaces 6-5 y 7-1 del biciclo tropano para formar el fragmento en  $m/z$  95 (11%); este fragmento se estabiliza con la pérdida de un hidrógeno para formar el catión *N*-metilpiridinio, ion pico de base en  $m/z$  94, la localización de la carga, en las rupturas mencionadas, se da sobre el fragmento nitrogenado. Este patrón de fragmentación es típico para los alcaloides tropanicos sustituidos en las posiciones 3, 6 o 7 (Blossey, *et al.*, 1964).

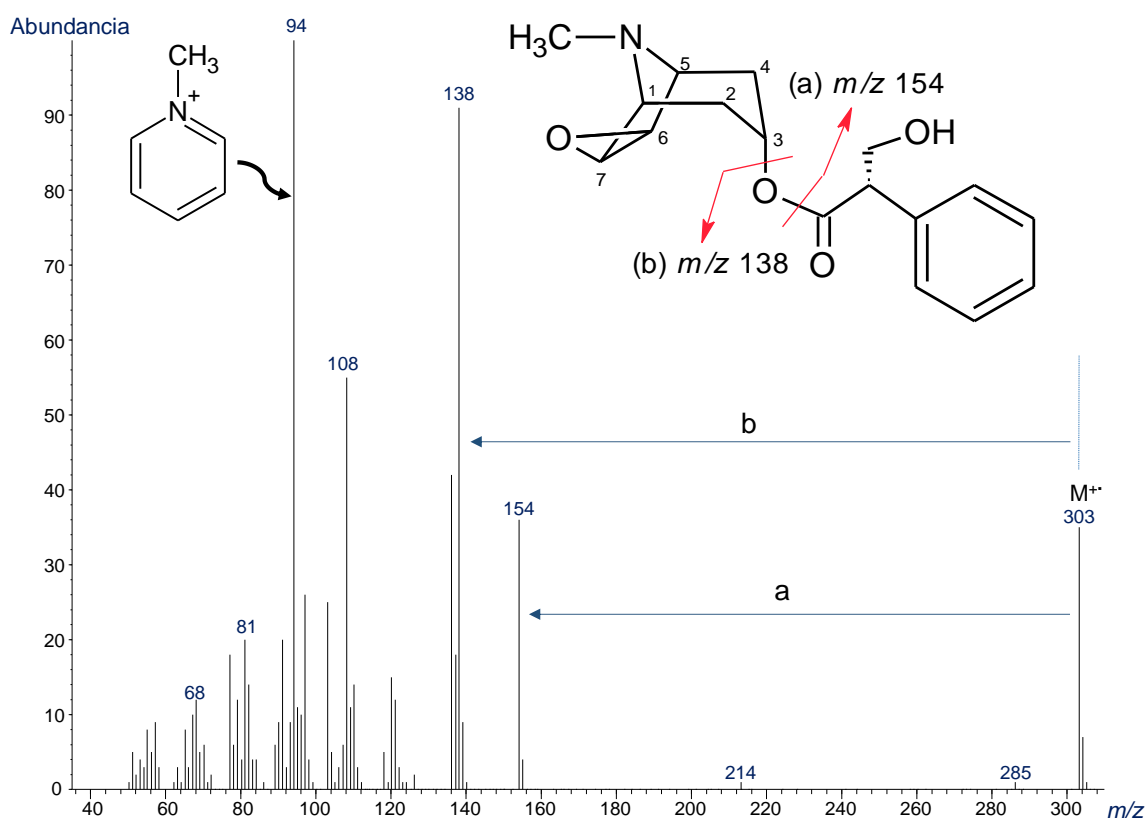


Figura 23. Espectro de masas obtenido por GC-MS de escopolamina. Columna DB-5, 60 m. Detector selectivo de masas (EI, 70 eV).

La escopolamina se usa en pequeñas dosis para prevenir y tratar el mareo, las náuseas y el vómito *post*-operatorio (Kotelko, *et al.*, 1989; Bailey, *et al.*, 1990; Koski, *et al.*, 1990). También, posee efecto antiespasmódico y tranquilizante (Álvarez, 2008).

En el Apéndice F, se muestra la estructura y los iones característicos de los alcaloides tropánicos extraídos por MSPD de flores blancas de *B. suaveolens* e identificados por GC-MS, usando la columna DB-5 (60 m), detector selectivo de masas (EI, 70 eV), modo de inyección: *split* 1:30.

#### **4.4. Estudio de condiciones operacionales de LC-ESI<sup>+</sup>-TOF-MS para el análisis de escopolamina.**

Se realizó el diseño experimental descrito en la Sección 2.8.2., con el fin de establecer las mejores condiciones de operación de LC-MS; se usó un patrón certificado de escopolamina.

En las *Figuras* 24 y 25, se muestran los resultados de las áreas las corrientes iónicas extraídas de la escopolamina protonada  $[M+H]^+$  ( $C_{17}H_{22}NO_4$ , en  $m/z$  304.1543) en función de diferentes valores de voltaje de capilar y fragmentador, con fase móvil: A-ácido fórmico 0.2% en agua y B-ácido fórmico al 0.2% en acetonitrilo o en metanol. En el Apéndice G, se muestran los resultados para los diferentes valores estudiados de porcentaje de ácido fórmico en la fase móvil.

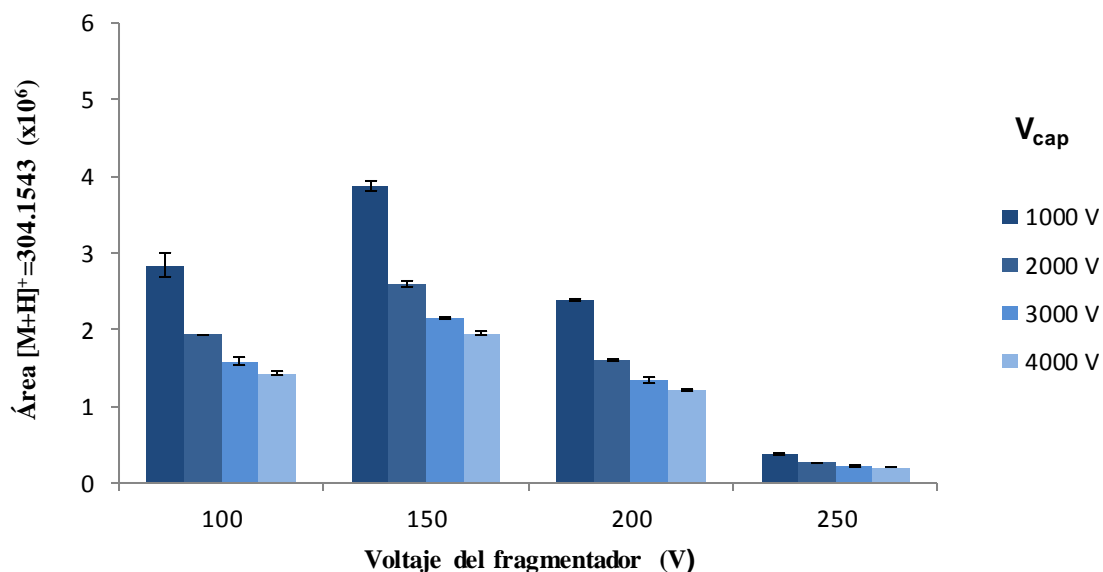


Figura 24. Áreas de las corrientes iónicas extraídas de la escopolamina protonada  $[M+H]^+$  ( $C_{17}H_{22}NO_4, m/z.304.1543$ ), obtenidas por LC-ESI<sup>+</sup>-TOF-MS, en función de diferentes voltajes de capilar y del fragmentador. Fase móvil, A: ácido fórmico (0.2%) en agua, B: ácido fórmico (0.2%) en **acetonitrilo** ( $n=3$ ).

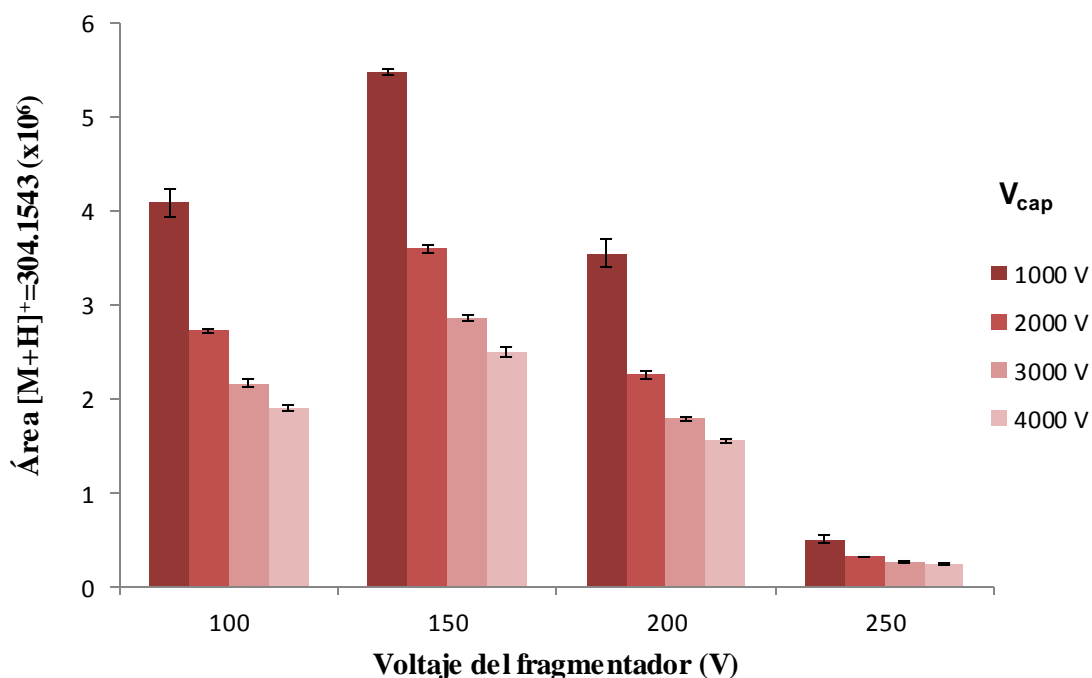


Figura 25. Áreas de las corrientes iónicas extraídas de la escopolamina protonada  $[M+H]^+$  ( $C_{17}H_{22}NO_4, m/z.304.1543$ ), obtenidas por LC-ESI<sup>+</sup>-TOF-MS, en función de diferentes voltajes

de capilar y del fragmentador. Fase móvil, A: ácido fórmico (0.2%) en agua, B: ácido fórmico (0.2%) en metanol ( $n=3$ ).

En las Figuras 24 y 25, se observa que los valores de las áreas de las corrientes iónicas extraídas de la escopolamina protonada  $[M+H]^+$  ( $C_{17}H_{22}NO_4$ ,  $m/z$  304.1543), disminuyen al aumentar el voltaje de capilar, es decir, se obtiene mayor respuesta con un voltaje de capilar de 1 kV. La misma tendencia se observa a los diferentes valores estudiados de porcentaje de ácido fórmico en la fase móvil (Véase Apéndice G).

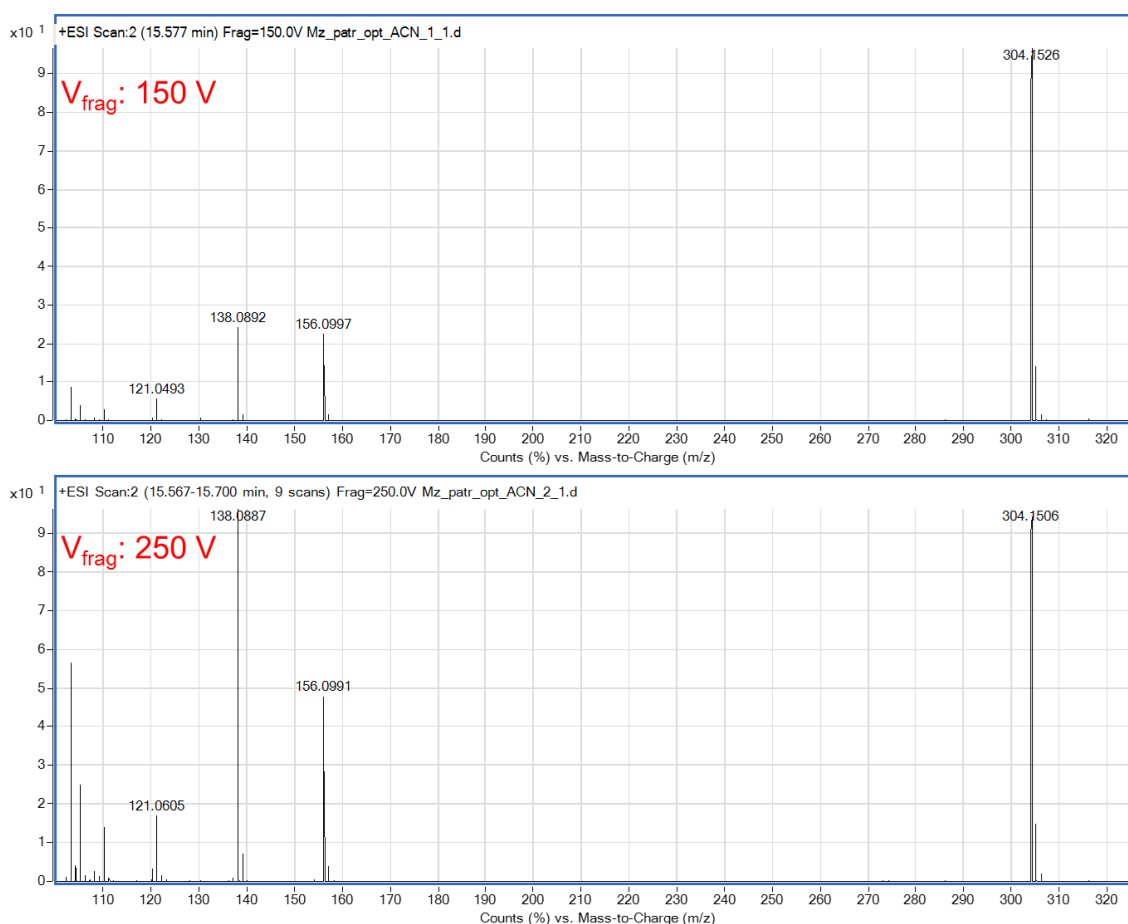


Figura 26. Espectros de masas de la escopolamina protonada  $[M+H]^+$  ( $C_{17}H_{22}NO_4$ ,  $m/z$  304.1543), obtenidos por LC-ESI<sup>+</sup>-TOF-MS. Voltaje de capilar 1 kV. Voltaje del fragmentador 150 y 250 V. Fase móvil, A: ácido fórmico (0.2%) en agua, B: ácido fórmico (0.2%) en acetonitrilo.

En la *Figura 26*, se presentan dos espectros de masas de la escopolamina protonada  $[M+H]^+$  ( $C_{17}H_{22}NO_4$ ,  $m/z$  304.1543), obtenidos por LC-ESI<sup>+</sup>-TOF-MS, manteniendo el voltaje de capilar de 1 kV, con voltaje del fragmentador de 150 y 250 V. En esta gráfica, se observa que la fragmentación de la escopolamina protonada aumenta proporcionalmente con el voltaje del fragmentador, *e.g.*, el porcentaje de abundancia del ion en  $m/z$  138 (correspondiente a la ruptura  $\alpha$  del enlace éster) es más alto con un voltaje del fragmentador de 250 V (100%) que con uno de 150 V (26%).

En la *Figura 27*, se muestran los resultados de las áreas de las corrientes iónicas extraídas de la escopolamina protonada  $[M+H]^+$  ( $C_{17}H_{22}NO_4$ ,  $m/z$  304.1543) en función de voltajes de fragmentador, manteniendo el voltaje de capilar de 1 kV, fase móvil: A-ácido fórmico 0.2% en agua y B-ácido fórmico al 0.2% en acetonitrilo o en metanol. En esta gráfica, se observa que los valores más altos para la escopolamina protonada  $[M+H]^+$  ( $C_{17}H_{22}NO_4$ ,  $m/z$  304.1543), se obtuvieron con un voltaje del fragmentador de 150 V, y los valores más bajos se lograron con un voltaje de fragmentador de 250 V. También, se observaron diferencias significativas entre los valores de las áreas cromatográficas obtenidas al usar acetonitrilo o metanol como solvente orgánico de la fase móvil.

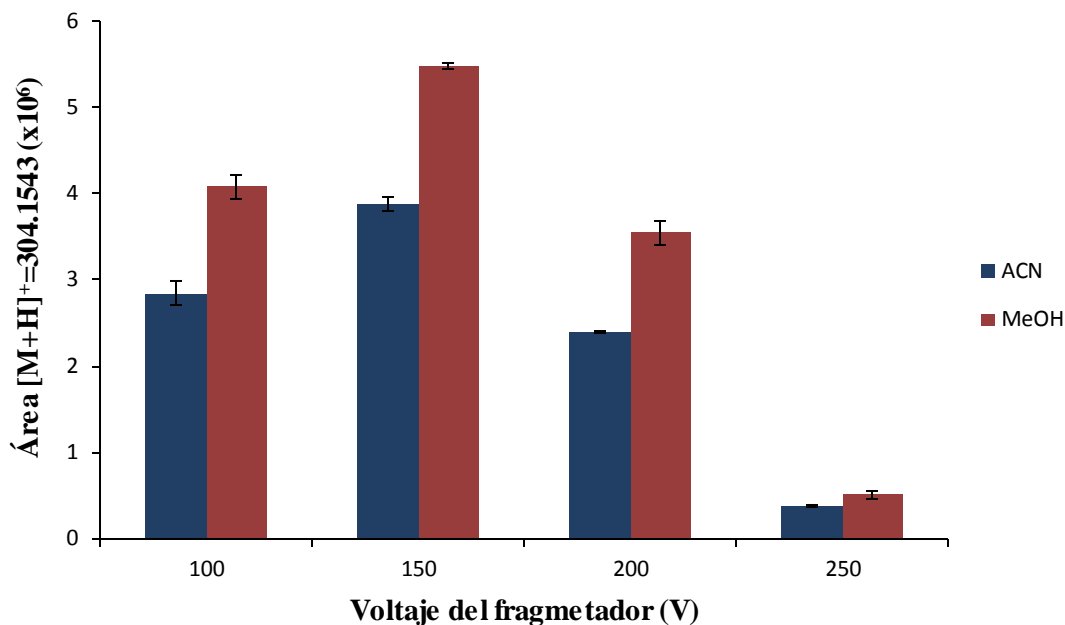


Figura 27. Áreas de las corrientes iónicas extraídas de la escopolamina protonada  $[M+H]^+$  ( $C_{17}H_{22}NO_4$ ,  $m/z$  304.1543), obtenidas por LC-ESI<sup>+</sup>-TOF-MS, en función de diferentes voltajes de fragmentador. Voltaje de capilar 1 kV. Fase móvil, A: ácido fórmico (0.2%) en agua, B: ácido fórmico (0.2%) en acetonitrilo o metanol ( $n=3$ ).

En la Figura 28, se muestran los resultados de las áreas de las corrientes iónicas extraídas de la escopolamina protonada  $[M+H]^+$  ( $C_{17}H_{22}NO_4$ ,  $m/z$  304.1543), con un voltaje de capilar de 1 kV y voltaje del fragmentador de 150 V, con fase móvil: A-ácido fórmico 0.2, 0.002 o 0.0001%, en agua, y B-ácido fórmico al 0.2, 0.002 o 0.0001%, en acetonitrilo o en metanol.

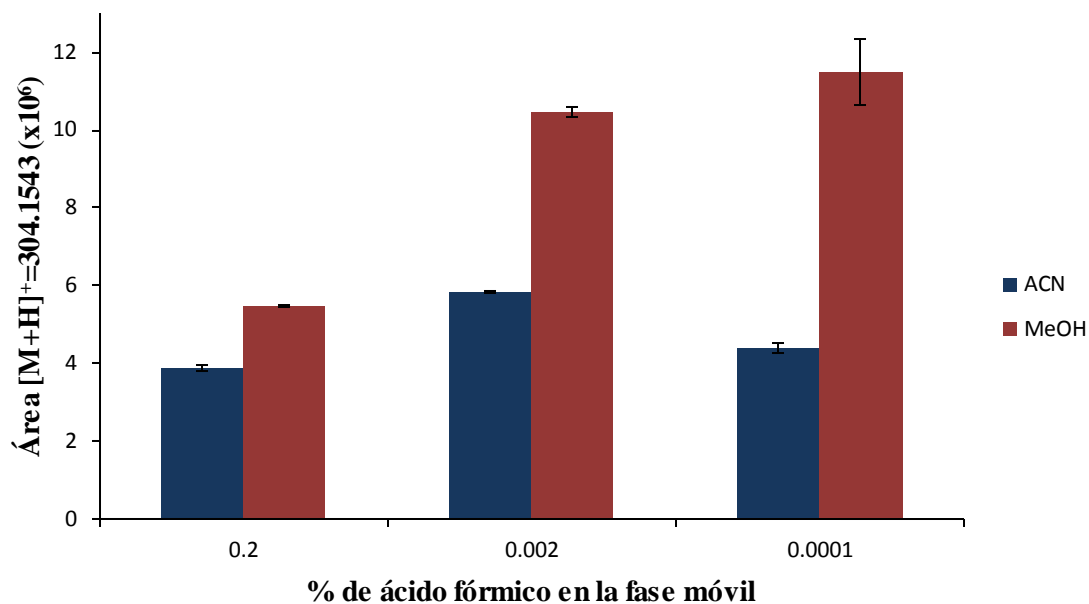


Figura 28. Áreas de las corrientes iónicas extraídas de la escopolamina protonada  $[M+H]^+$  ( $C_{17}H_{22}NO_4$ ,  $m/z$  304.1543), obtenidas por LC-ESI<sup>+</sup>-TOF-MS. Voltaje de capilar 1 kV. Voltaje de fragmentador 150 V. Fase móvil, A: ácido fórmico (0.2, 0.002 y 0.0001%) en agua, B: ácido fórmico (0.2, 0.002 y 0.0001%) en acetonitrilo o metanol ( $n=3$ ).

En la Figura 28, se observa que al aumentar el porcentaje de ácido fórmico en la fase móvil, disminuye el valor del área de la corriente iónica extraída para la escopolamina protonada  $[M+H]^+$  ( $C_{17}H_{22}NO_4$ ,  $m/z$  304.1543), cuando se usa como fase móvil B: metanol, mientras que al usar acetonitrilo como fase móvil B, la respuesta más alta corresponde al valor de 0.002% del ácido fórmico en la fase móvil. Para elegir el valor de porcentaje de ácido fórmico de la fase móvil y el solvente B de la fase móvil a usar para el análisis de la escopolamina, se tuvieron en cuenta los observables relación señal/ruido y factor cromatográfico de simetría para el ion  $[M+H]^+=304.1543$ , con un voltaje de capilar de 1000 V y voltaje del fragmentador de 150 V (Véanse las Figuras 29 y 30).

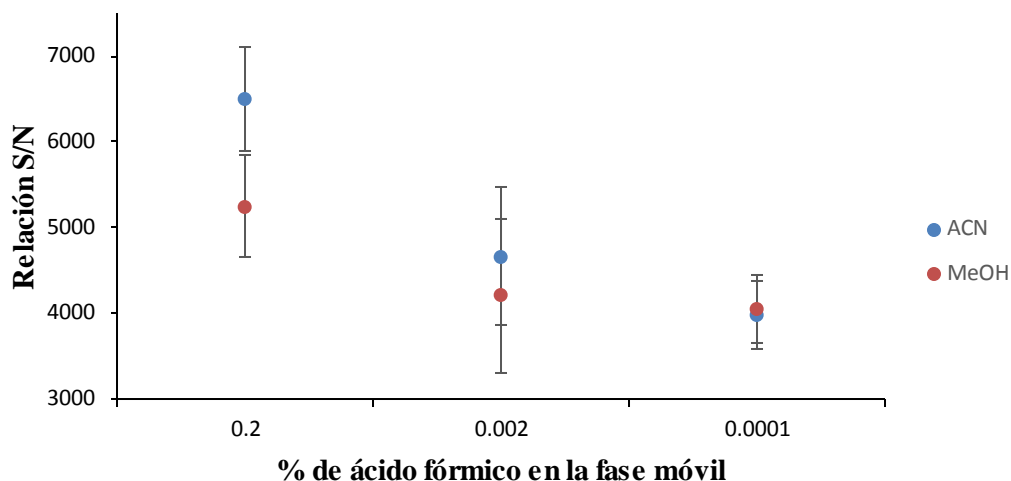


Figura 29. Relación señal/ruido (S/N) de las áreas de las corrientes iónicas extraídas de la escopolamina protonada  $[M+H]^+$  ( $C_{17}H_{22}NO_4$ ,  $m/z$  304.1543), obtenidas por LC-ESI<sup>+</sup>-TOF-MS. Voltaje de capilar 1 kV. Voltaje de fragmentador 150 V. Fase móvil, A: ácido fórmico (0.2, 0.002 y 0.0001%) en agua, B: ácido fórmico (0.2, 0.002 y 0.0001%) en acetonitrilo o metanol ( $n=3$ ).

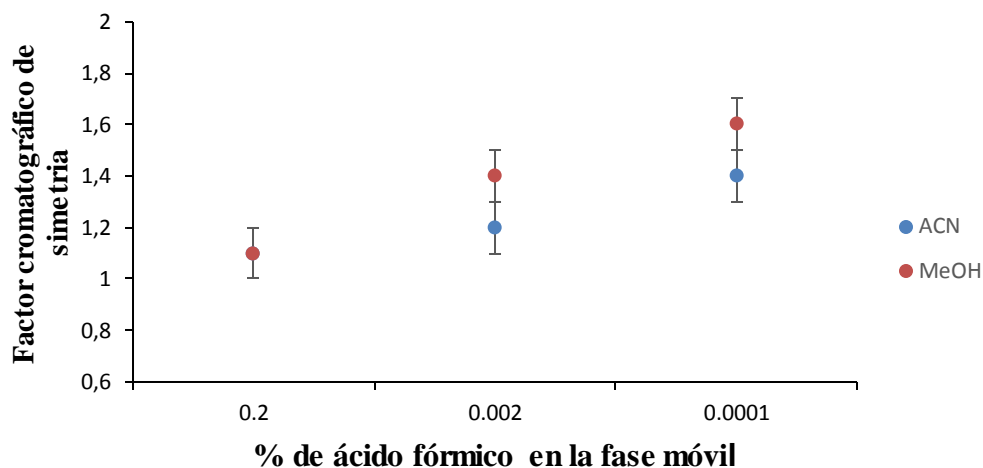


Figura 30. Factor cromatográfico de simetría de las áreas de las corrientes iónicas extraídas de la escopolamina protonada  $[M+H]^+$  ( $C_{17}H_{22}NO_4$ ,  $m/z$  304.1543), obtenidas por LC-ESI<sup>+</sup>-TOF-MS. Voltaje de capilar 1 kV. Voltaje de fragmentador 150 V. Fase móvil, A: ácido fórmico (0.2, 0.002 y 0.0001%) en agua, B: ácido fórmico (0.2, 0.002 y 0.0001%) en acetonitrilo o metanol ( $n=3$ ).

En la *Figura 29*, se puede observar, que el valor de relación S/N, más alto, se logró con la fase móvil: A- ácido fórmico al 0,2% en agua y B-ácido fórmico al 0,2% en acetonitrilo, así mismo, se observa que al disminuir el % de ácido fórmico en la fase móvil, el valor de relación S/N disminuye. En la *Figura 30*, se observa que los picos cromatográficos para la escopolamina protonada, estudiados con diferentes porcentajes del ácido fórmico en la fase móvil y diferentes solventes orgánicos de la fase móvil, presentan coleo (factor cromatográfico de simetría  $> 1$ ), el valor de factor cromatográfico de simetría, más cercano a 1, se obtuvo con la fase móvil: A-ácido fórmico 0.2% en agua y B-ácido fórmico al 0,2% en acetonitrilo o metanol, además, se observa que el factor cromatográfico de simetría disminuye al aumentar el porcentaje del ácido fórmico en la fase móvil.

A partir de los análisis realizados, con las áreas cromatográficas obtenidas a diferentes voltajes de capilar y de fragmentador, los valores de relación señal/ruido y factor cromatográfico de simetría, se escogieron las condiciones experimentales con las que se obtiene el área cromatográfica y, la relación señal/ruido mayores, con el factor cromatográfico de simetría más cercano a 1, correspondientes a voltaje de capilar de 1000 V, voltaje del fragmentador de 150 V y fase móvil: A-ácido fórmico 0.2% en agua y B-ácido fórmico al 0.2% en acetonitrilo. En estudios sobre detección de escopolamina por LC-ESI<sup>+</sup>-MS se reportan valores de voltaje de capilar, que varían, entre 2100 y 3500 V (Jakabová, 2012; Roman, Ström, Tell & Josefsson, 2013; Teng, *et al.*, 2015), pero en ninguno de los trabajos se realizó un estudio sobre las variables operacionales y su optimización.

Con los parámetros elegidos, se realizó el análisis de los extractos hidroalcohólicos y los obtenidos por MSPD de las flores blancas y rosadas de *B. suaveolens*.

#### **4.5. Cuantificación por LC-ESI<sup>+</sup>-TOF-MS de escopolamina aislada por MSPD de flores de *B. suaveolens*.**

La concentración de escopolamina, se determinó en los extractos MSPD de flores blancas de *B. suaveolens*. Para ello, se realizó un diseño experimental  $2^3$ , con tres variables, para cada una de ellas dos niveles y cuatro réplicas en un punto del diseño. El análisis de los extractos obtenidos se realizó por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas, siguiendo la metodología descrita en la Sección 2.8.2, y los parámetros encontrados en el estudio previo sobre las condiciones operacionales de LC-ESI<sup>+</sup>-TOF-MS para la escopolamina (Véase Sección 3.3.).

El observable fue la concentración de escopolamina, que se determinó por medio del método de estándar externo; las áreas cromatográficas para la escopolamina protonada que se registraron en cada una de las muestras se encuentran en la Tabla 12. Con estos valores se procedió a calcular la concentración de escopolamina usando la curva de calibración que se muestra en la *Figura 31*, teniendo en cuenta las diluciones realizadas y, finalmente, los resultados del observable (Véase Tabla 13) se expresaron en mg de escopolamina/g de material vegetal seco.

Tabla 12. Áreas obtenidas por LC-ESI<sup>+</sup>-TOF-MS de las corrientes iónicas extraídas de la escopolamina protonada [M+H]<sup>+</sup> (C<sub>17</sub>H<sub>22</sub>NO<sub>4</sub>, m/z 304.1543), aislada por MSPD de flores blancas de *B. suaveolens*.

| Experimento | Área cromatográfica para la escopolamina protonada, cuentas |
|-------------|---|
| 1-1         | 4418847.2   |
| 1-2         | 4057270.9   |
| 1-3         | 4287815   |
| 1-4         | 4148071   |
| 2           | 80827.5   |
| 3           | 1891673   |
| 4           | 55686   |
| 5           | 2927264   |
| 6           | 109111  |
| 7           | 1510769.3   |
| 8           | 139597.4  |

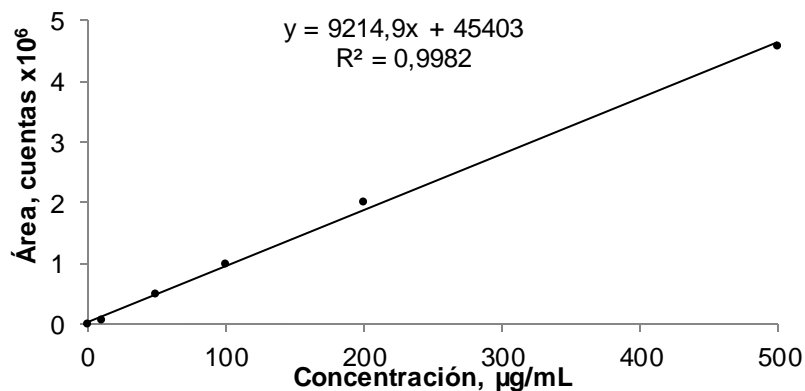


Figura 31. Curva de calibración construida a partir de las áreas de las corrientes iónicas extraídas obtenidas por LC-ESI<sup>+</sup>-TOF-MS para la escopolamina protonada [M+H]<sup>+</sup> (C<sub>17</sub>H<sub>22</sub>NO<sub>4</sub>, m/z 304.1543).

Tabla 13. Concentración de la escopolamina extraída por MSPD de flores de *B. suaveolens* de color blanca.

| Experimento | X1<br>Tipo de soporte sólido      | X2<br>Volumen de elución, mL | X3<br>Cantidad de K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , g | mg de escopolamina/<br>g de material vegetal seco |
|-------------|-----------------------------------|------------------------------|--|---|
| 1-1         | sílice-octadecilo C <sub>18</sub> | 5                            | 0  | 2.37  |
| 1-2         | sílice-octadecilo C <sub>18</sub> | 5                            | 0  | 2.17  |
| 1-3         | sílice-octadecilo C <sub>18</sub> | 5                            | 0  | 2.30  |
| 1-4         | sílice-octadecilo C <sub>18</sub> | 5                            | 0  | 2.22  |
| 2           | sílice                            | 5                            | 0  | 0.02  |
| 3           | sílice-octadecilo C <sub>18</sub> | 10                           | 0  | 1.99  |
| 4           | sílice                            | 10                           | 0  | 0.01  |
| 5           | sílice-octadecilo C <sub>18</sub> | 5                            | 0.3  | 1.56  |
| 6           | sílice                            | 5                            | 0.3  | 0.03  |
| 7           | sílice-octadecilo C <sub>18</sub> | 10                           | 0.3  | 1.59  |
| 8           | sílice                            | 10                           | 0.3  | 0.10  |

En la Tabla 13, se muestra que el experimento 1 contiene la cantidad de escopolamina más alta. Sin embargo, se realizó un ANOVA, para establecer cuáles variables e interacciones entre las variables fueron significativas en la extracción de la escopolamina.

Tabla 14. Resultados del ANOVA aplicado al diseño experimental 2<sup>3</sup>, con los efectos de las variables de estudio y combinaciones; A: Tipo de soporte sólido, B: Volumen de elución, mL y C: Cantidad de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, g.

| Valores Fisher | A      | B    | C     | AB   | AC    | BC   | ABC  |
|----------------|--------|------|-------|------|-------|------|------|
| F. calculado   | 911.01 | 1.49 | 20.50 | 2.92 | 29.13 | 3.97 | 1.89 |
| F. umbral *    | 10.12  |      |       |      |       |      |      |

Nota: \*Valor calculado usando el software Microsoft Excel.

En el ANOVA, se realizó un análisis de efectos principales por medio de la prueba F con el 95% de confianza, y se encontró, que las variables A, C y la interacción AC, poseen un efecto significativo (Tabla 14). Esto quiere decir que el tipo de soporte sólido, la cantidad de  $K_2CO_3$  y la interacción entre el soporte sólido usado y la cantidad de  $K_2CO_3$  agregado, inciden significativamente sobre la eficiencia de extracción de escopolamina. El efecto correspondiente al tipo de soporte sólido fue el más alto (911.01), lo que indica que esta variable es de gran importancia para la MSPD de escopolamina.

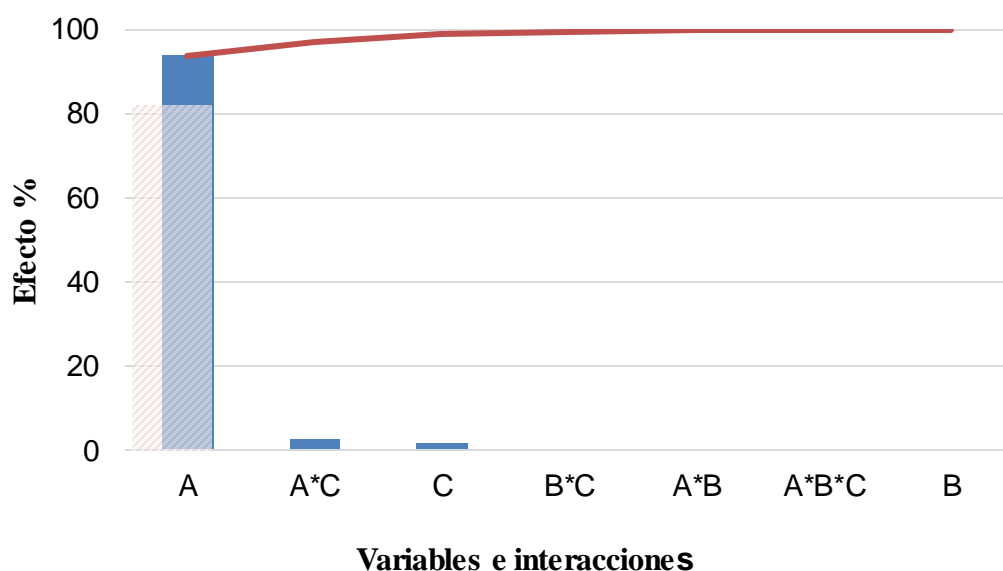


Figura 32. Diagrama de Pareto para la extracción por MSPD de escopolamina en flores blancas de *B. suaveolens*.

El gráfico de Pareto (Figura 32), muestra cuáles eran las variables o interacciones que tenían los efectos más importantes. Aquellos, que se muestran dentro de la zona sombreada explican el 80% de la varianza total de los datos. En este caso, el tipo de soporte sólido usado tuvo el efecto más grande, y explica el 94% de la varianza total de los datos.

Estos resultados coinciden con los reportados por Atlabachew, Torto, Chandravanshi & Redi (2013) que estudiaron el contenido de catinona, catina y norefedrina, en hojas de *Catha*

*edulis*, extraídas por MSPD y analizada por HPLC-DAD, los autores encontraron que existe un cambio significativo al usar diferentes tipos de soporte sólido y seleccionaron la sílice-octadecilo como el soporte sólido óptimo para la extracción de estas moléculas. También, estudiaron el cambio de las áreas cromatográficas de la catinona, catina y norefedrina, al variar el volumen de solvente de elución y encontraron que para catina y catinona el aumento en el volumen de solvente de elución no tuvo efecto significativo para su extracción, lo que coincide con el diseño experimental que se realizó en el presente trabajo: al usar sílice-octadecilo como soporte sólido se logró extraer la mayor cantidad de escopolamina y el volumen empleado del solvente de elución no presentó efecto significativo sobre la extracción.

En las Figuras 33 y 34 se muestra la influencia de los niveles de las variables sobre la cantidad de escopolamina extraída, cuando la variable volumen de elución se mantuvo constante. En ambas figuras, se puede observar que existe una tendencia de aumento de escopolamina extraída a niveles inferiores de cantidad de  $K_2CO_3$  y el tipo de soporte sólido.

Volumen de elución (-1): 5 mL

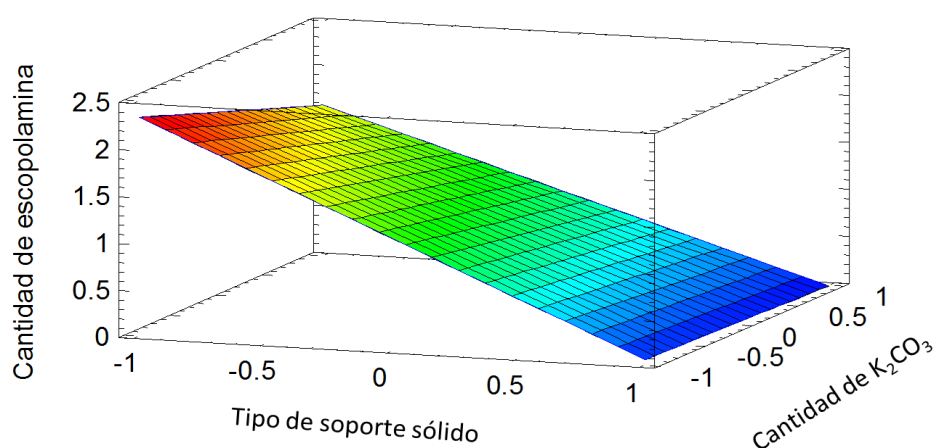


Figura 33. Gráfica de superficie de respuesta estimada para los efectos de la cantidad de  $K_2CO_3$  y el tipo de soporte sólido, en el nivel inferior de volumen de elución (5 mL).

Volumen de elución (+1): 10 mL

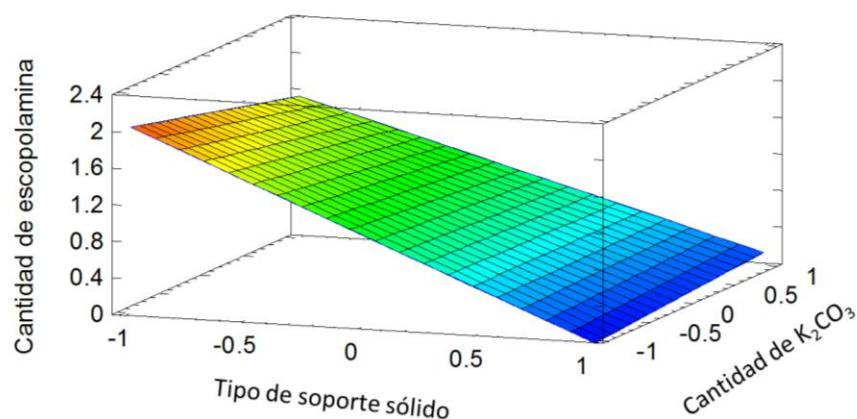


Figura 34. Gráfica de superficie de respuesta estimada para los efectos: cantidad de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> y el tipo de soporte sólido, en el nivel superior de volumen de elución (10 mL).

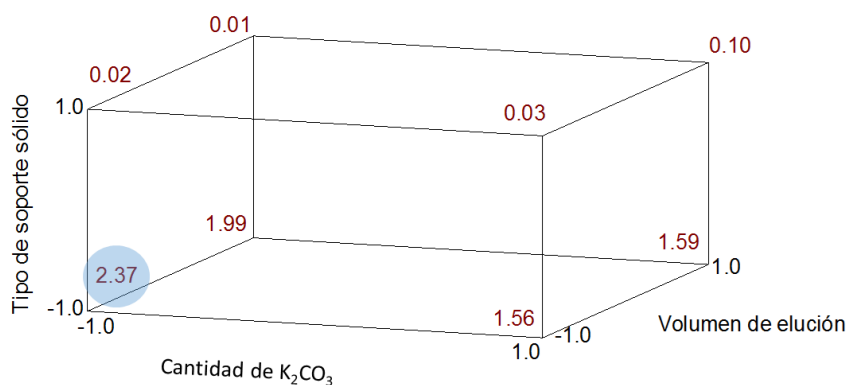


Figura 35. Representación gráfica del diseño 2<sup>3</sup>, con los valores de la concentración de escopolamina.

En la Figura 35, se muestra el campo de muestreo con los valores de concentración de escopolamina; se puede observar que las siguientes fueron las condiciones de extracción para obtener la mayor cantidad de escopolamina: tipo de soporte sólido (sílice-octadecilo), cantidad de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0 g) y volumen de elución (5 mL).

Usando las condiciones encontradas, se obtuvieron extractos de flores blancas y rosadas de *B. suaveolens*, para determinar su actividad antioxidante y realizar análisis composicional por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas.

#### 4.6. Análisis por LC-ESI<sup>+</sup>-TOF-MS de metabolitos secundarios aislados de *B. suaveolens*.

**4.6.1. Análisis por LC-ESI<sup>+</sup>-TOF-MS de metabolitos secundarios aislados por MSPD de flores de *B. suaveolens*.** La identificación y la cuantificación de los metabolitos secundarios presentes en los extractos obtenidos por MSPD de flores blancas y rosadas de *B. suaveolens*, se realizó por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas, siguiendo la metodología descrita en la Sección 2.8.2., y los parámetros operacionales descritos en la Sección 3.3.; la identificación de los compuestos se realizó a partir de la medición de sus masas exactas usando el *software* de datos *AT MassHunter* (Versión B.06.00-SP3), la exactitud de las masas  $\Delta$ ppm (Ecuación 4), y por comparación de tiempos de retención y la fragmentación experimentales con los de patrones certificados.

$$\Delta\text{ppm} = \frac{\text{Masa}_{\text{calculada}} - \text{Masa}_{\text{experimental}}}{\text{Masa}_{\text{calculada}}} \times 10^6 \quad \text{Ecuación 4}$$

La cuantificación de los compuestos identificados en los extractos, se realizó por el método del estándar externo, se construyó una curva de calibración, para la escopolamina (Véase Apéndice H); mientras que para los otros compuestos identificados, la cuantificación se realizó por el método del estándar interno, usando el alcaloide tropánico, cocaína (C<sub>17</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>4</sub>) como patrón interno, (Véase *Figura 36*), a una concentración de 500 µg/L.

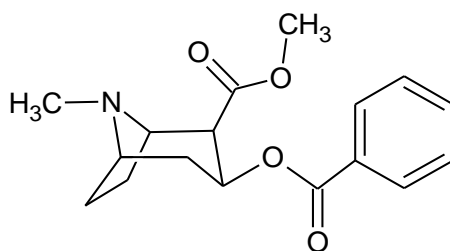


Figura 36. Estructura química de la cocaína ( $[M+H]^+$  C<sub>17</sub>H<sub>22</sub>NO<sub>4</sub>,  $m/z$  304.1543), usada como estándar interno en el análisis por LC-ESI<sup>+</sup>-TOF-MS de extractos hidroalcohólicos u obtenidos por MSPD, de flores de *B. suaveolens*.

La cocaína es un isómero estructural de escopolamina, por lo que, al obtener la EIC para el  $[M+H]^+=304.1543$ , se observan dos picos cromatográficos con diferentes tiempos de retención. En la Figura 37, se muestran las EIC ( $m/z=304.1543$ ) de los patrones certificados de escopolamina ( $t_R=15.44$  min) y de cocaína ( $t_R=16.67$  min). En el Apéndice I, se muestran los espectros de masas de los patrones certificados.

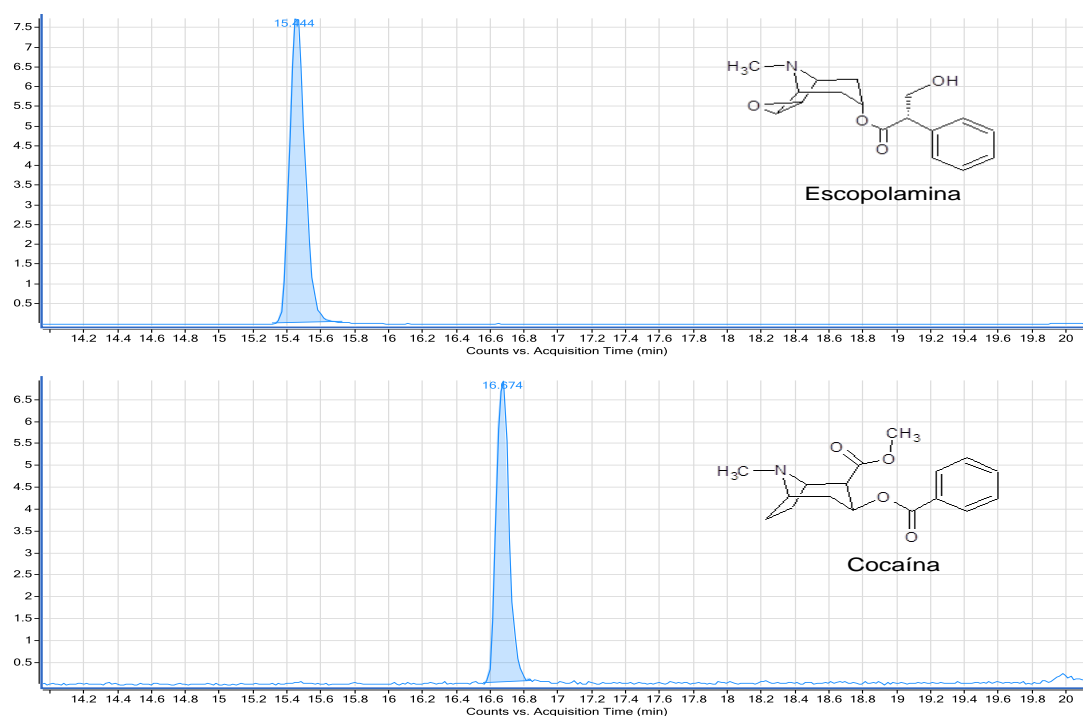
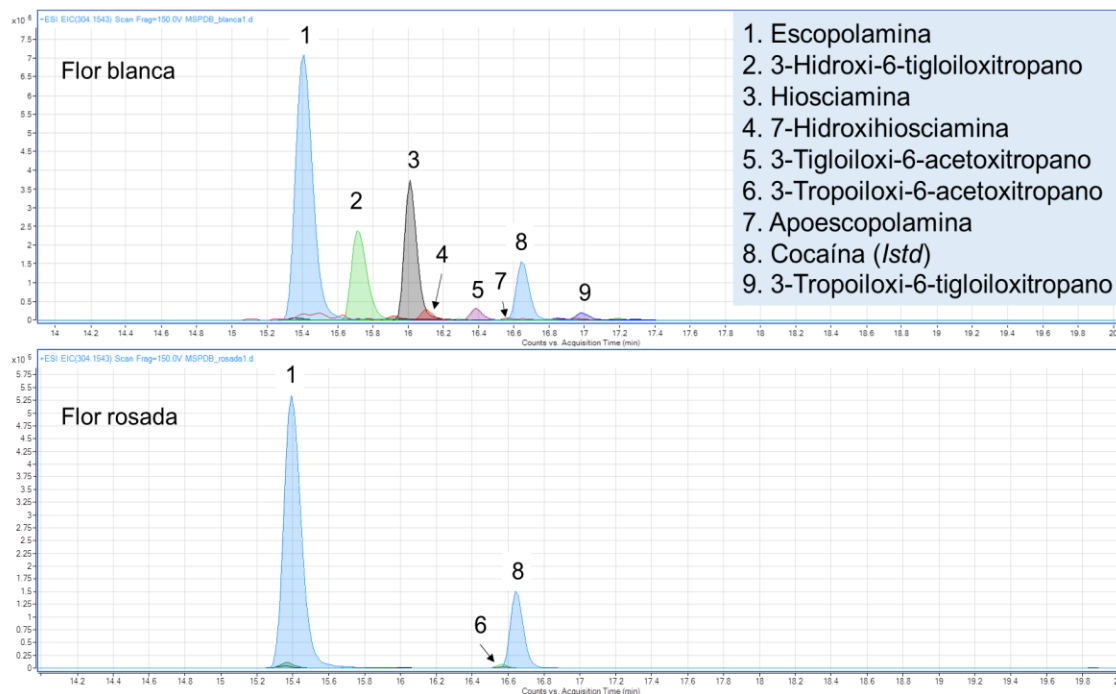


Figura 37. Corrientes iónicas extraídas (EIC) obtenidos por LC-ESI<sup>+</sup>-TOF-MS de los patrones certificados de escopolamina ( $t_R=15.44$  min) y cocaína ( $t_R=16.67$  min), ( $[M+H]^+$ , C<sub>17</sub>H<sub>22</sub>NO<sub>4</sub>) usando el ion en  $m/z$  304.1543.

En la *Figura 38* y en las Tablas 15 y 16, se muestran los compuestos identificados en los extractos obtenidos por MSPD de flores blancas y rosadas de *B. suaveolens* con su respectiva cuantificación.



*Figura 38.* Corrientes iónicas extraídas (EIC), por LC-ESI<sup>+</sup>-TOF-MS, de moléculas protonadas presentes en extractos obtenidos por MSPD de flores blancas y rosadas de *B. suaveolens*.

*Tabla 15.* Compuestos identificados, por LC-ESI<sup>+</sup>-TOF-MS, en extractos obtenidos por MSPD de flores blancas y rosadas de *B. suaveolens*.

| Compuesto                              | t <sub>R</sub> , min | Fórmula   | Masas     |              | Δppm |
|--|----------------------|---|-----------|--------------|------|
|  |                      |   | Calculada | Experimental |      |
| Escopolamina                           | 15.4                 | C <sub>17</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>4</sub> | 304.1543  | 304.1544     | 0.04 |
| 3-Hidroxi-6-tigloiloxitropano          | 15.7                 | C <sub>13</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>3</sub> | 240.1594  | 240.1592     | 1.24 |
| 3-Hidroxi-6-(2-metilbutiriloxi)tropano | 15.9                 | C <sub>13</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>3</sub> | 242.1751  | 242.1752     | 0.45 |
| 6,7-Dihydrohiosciamina                 | 15.9                 | C <sub>17</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>3</sub> | 288.1594  | 288.1589     | 1.73 |
| Hiosciamina                            | 16.0                 | C <sub>17</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>3</sub> | 290.1751  | 290.1748     | 1.03 |

Tabla 15. Continuación.

|   |      |   |          |          |      |
|---|------|---|----------|----------|------|
| 7-Hidroxihiosciamina                          | 16.1 | C <sub>17</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>4</sub> | 306.1700 | 306.1698 | 0.65 |
| 3-Tigloiloxi-6-acetoxitropano                 | 16.3 | C <sub>15</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>4</sub> | 282.1700 | 282.1703 | 1.06 |
| 3-Tropoiloxi-6-acetoxitropano                 | 16.5 | C <sub>19</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>5</sub> | 348.1805 | 348.1796 | 0.79 |
| Apoescopolamina                               | 16.5 | C <sub>17</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>3</sub> | 286.1438 | 286.1435 | 1.04 |
| 3-6-Ditigloiloxi-7-hidroxitropano             | 16.8 | C <sub>18</sub> H <sub>27</sub> NO <sub>5</sub> | 338.1962 | 338.1962 | 0.39 |
| Apoatropina                                   | 16.8 | C <sub>17</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>2</sub> | 272.1645 | 272.1648 | 1.10 |
| 3-Tigloiloxi-6-isovaleriloxi-7-hidroxitropano | 16.9 | C <sub>18</sub> H <sub>29</sub> NO <sub>5</sub> | 340.2118 | 340.2120 | 0.06 |
| 3-Tropoiloxi-6-tigloiloxitropano              | 16.9 | C <sub>22</sub> H <sub>29</sub> NO <sub>5</sub> | 388.2118 | 388.2116 | 0.25 |
| 3-6-Ditigloiloxitropano                       | 17.1 | C <sub>18</sub> H <sub>27</sub> NO <sub>4</sub> | 322.2013 | 322.2018 | 0.27 |
| 3-Tigloiloxi-6-metilbutiriloxitropano         | 17.2 | C <sub>18</sub> H <sub>29</sub> NO <sub>4</sub> | 324.2169 | 324.2171 | 0.61 |

Tabla 16. Cuantificación, por LC-ESI<sup>+</sup>-TOF-MS, de alcaloides presentes en extractos MSPD de flores blancas y rosadas de *B. suaveolens*.

| Compuesto                                | µg Compuesto/ g Material vegetal seco<br>(±SD, n=3) |             |
|--|---|-------------|
|  | Flor blanca   | Flor rosada |
| Escopolamina*                            | 2230±42   | 1740±17     |
| 3-Hidroxi-6-tigloiloxitropano**          | 440±22  | 5.1±0.2     |
| 3-Hidroxi-6-(2-metilbutiriloxi)tropano** | 18±1  | -           |
| 6,7-Dihidrohiosciamina**                 | 7.4±0.6   | -           |
| Hiosciamina**                            | 570±36  | 2.8±0.2     |
| 7-Hidroxihiosciamina**                   | 39±2  | -           |
| 3-Tigloiloxi-6-acetoxitropano**          | 46±2  | -           |
| 3-Tropoiloxi-6-acetoxitropano**          | 0.80±0.09   | 10.7±0.4    |
| Apoescopolamina**                        | 7.0±0.8   | 5.0±0.2     |

Tabla 16. Continuación

|   |         |   |
|---|---------|---|
| 3-Tigloiloxi-6-propioniloxitropano**            | 1.1±0.1 | - |
| 3-6-Ditigloiloxi-7-hidroxitropano**             | 2.7±0.1 | - |
| Apoatropina**                                   | 9.0±0.5 | - |
| 3-Tigloiloxi-6-isovaleriloxi-7-hidroxitropano** | 5.9±0.4 | - |
| 3-Tropoiloxi-6-tigloiloxitropano**              | 31±2    | - |
| 3-6-Ditigloiloxitropano**                       | 5.6±0.3 | - |
| 3-Tigloiloxi-6-metilbutiriloxitropano**         | 3.4±0.2 | - |

*Nota:* \* Cuantificación por el método del estándar externo, usando curva de calibración del patrón certificado de escopolamina.

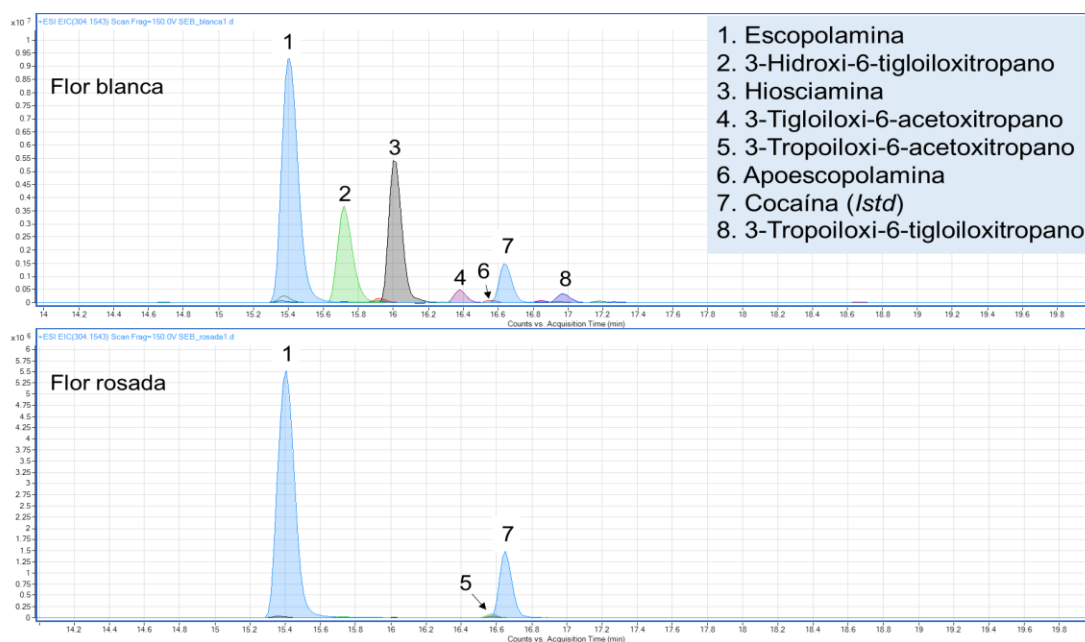
\*\* Cuantificación por el método del estándar interno.

En los extractos obtenidos por MSPD de flores blancas de *B. suaveolens*, se identificaron 16 alcaloides tropánicos, los siguientes compuestos fueron mayoritarios: escopolamina (2230±42 µg/g de flor seca), hiosciamina (570±36 µg/g de flor seca) y 3-hidroxi-6-tigloiloxitropano (440±22 µg/g de flor seca). En los extractos obtenidos por MSPD de flores rosadas, se identificaron cinco alcaloides tropánicos, entre ellos, la escopolamina (1740±17 µg/g de flor seca) fue el compuesto mayoritario, seguido de 3-tropoiloxi-6-acetoxitropano (10.7±0.4 µg/g de flor seca) y 3-hidroxi-6-tigloiloxitropano (5.1±0.2 µg/g de flor seca). Los alcaloides 6,7-dihidrohiosciamina y 3-tigloiloxi-6-isovaleriloxi-7-hidroxitropano se reportan por primera vez en este trabajo. En el Apéndice J, se muestra la estructura de algunos alcaloides tropánicos extraídos por MSPD de flores de *B. suaveolens*.

Marín, Romero & Frenich, (2016) estudiaron extractos obtenidos por MSPD de semillas de *B. arborea* y determinaron la cantidad de hiosciamina por HPLC-MS/MS. Reportaron 320±9 mg de hiosciamina/ kg de semillas.

**4.6.2. Análisis por LC-ESI<sup>+</sup>-TOF-MS de metabolitos secundarios extraídos con solvente de flores de *B. suaveolens*.** La identificación y la cuantificación de los metabolitos secundarios presentes en los extractos hidroalcohólicos de flores blancas y rosadas de *B. suaveolens*, se realizó por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas, siguiendo la metodología descrita en la Sección 2.8.2., y los parámetros operacionales descritos en la Sección 3.3.; la identificación de los compuestos se realizó a partir de la medición de sus masas exactas, usando el *software* de datos *AT MassHunter* (Versión B.06.00-SP3), la exactitud de las masas  $\Delta$ ppm (Ecuación 4), y por comparación de tiempos de retención y la fragmentación experimentales con los de patrones certificados. La cuantificación de los compuestos identificados, en los extractos hidroalcohólicos, se realizó como se describe en la Sección 3.5.1.

En la *Figura 39* y en las Tablas 17 y 18, se muestran los compuestos identificados en los extractos hidroalcohólicos de flores blancas y rosadas de *B. suaveolens* con su cuantificación respectiva.



*Figura 39.* Corrientes iónicas extraídas (EIC), por LC-ESI<sup>+</sup>-TOF-MS de moléculas protonadas presentes en extractos obtenidos con solvente de flores blancas y rosadas de *B. suaveolens*.

Tabla 17. *Compuestos identificados, por LC-ESI<sup>+</sup>-TOF-MS, en extractos hidroalcohólicos de flores blancas y rosadas de B. suaveolens.*

| Compuesto                                     | t <sub>R</sub> ,<br>min | Fórmula   | Masas     |              | Δppm |
|---|-------------------------|---|-----------|--------------|------|
|   |                         |   | Calculada | Experimental |      |
| Escopolamina                                  | 15.4                    | C <sub>17</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>4</sub> | 304.1543  | 304.1544     | 0.03 |
| 3-Hidroxi-6-tigloiloxitropano                 | 15.7                    | C <sub>13</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>3</sub> | 240.1594  | 240.1592     | 1.20 |
| 3-Hidroxi-6-(2-metilbutiriloxi)tropano        | 15.9                    | C <sub>13</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>3</sub> | 242.1751  | 242.1754     | 1.05 |
| 6,7-Dihidrohiosciamina                        | 15.9                    | C <sub>17</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>3</sub> | 288.1594  | 288.1599     | 1.77 |
| Hiosciamina                                   | 16.0                    | C <sub>17</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>3</sub> | 290.1751  | 290.1753     | 0.68 |
| 7-Hidroxihiosciamina                          | 16.1                    | C <sub>17</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>4</sub> | 306.1700  | 306.1694     | 1.40 |
| 3-Tigloiloxi-6-acetoxitropano                 | 16.3                    | C <sub>15</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>4</sub> | 282.1700  | 282.1704     | 1.41 |
| 3-Tropoiloxi-6-acetoxitropano                 | 16.5                    | C <sub>19</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>5</sub> | 348.1805  | 348.1807     | 1.50 |
| Apoescopolamina                               | 16.5                    | C <sub>17</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>3</sub> | 286.1438  | 286.1441     | 1.04 |
| 3-6-Ditigloiloxi-7-hidroxitropano             | 16.8                    | C <sub>18</sub> H <sub>27</sub> NO <sub>5</sub> | 338.1962  | 338.1967     | 1.40 |
| Apoatropina                                   | 16.8                    | C <sub>17</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>2</sub> | 272.1645  | 272.1641     | 1.28 |
| 3-Tigloiloxi-6-isovaleriloxi-7-hidroxitropano | 16.9                    | C <sub>18</sub> H <sub>29</sub> NO <sub>5</sub> | 340.2118  | 340.2122     | 1.17 |
| 3-Tropoiloxi-6-tigloiloxitropano              | 16.9                    | C <sub>22</sub> H <sub>29</sub> NO <sub>5</sub> | 388.2118  | 388.2125     | 1.80 |
| 3-6-Ditigloiloxitropano                       | 17.1                    | C <sub>18</sub> H <sub>27</sub> NO <sub>4</sub> | 322.2013  | 322.202      | 1.60 |
| 3-Tigloiloxi-6-metilbutiriloxitropano         | 17.2                    | C <sub>18</sub> H <sub>29</sub> NO <sub>4</sub> | 324.2169  | 324.2172     | 0.92 |

Tabla 18. Cuantificación, por LC-ESI<sup>+</sup>-TOF-MS, de alcaloides presentes en extractos hidroalcohólicos de flores blancas y rosadas de *B. suaveolens*.

| Compuesto  | µg Compuesto/ g Material vegetal seco<br>(±SD, n=3) |             |
|--|---|-------------|
|  | Flor blanca   | Flor rosada |
| Escopolamina*                                    | 1180±12   | 690±13      |
| 3-Hidroxi-6-tigloiloxitropano**                  | 290±2   | 2.35±0.08   |
| 3-Hidroxi-6-(2-metilbutiriloxi)tropano**         | 11.7±0.1  | -           |
| 6,7-Dihidrohiosciamina**                         | 5.71±0.06   | -           |
| Hiosciamina**                                    | 380±4   | 0.51±0.01   |
| 7-Hidroxi-hiosciamina**                          | 28±1  | -           |
| 3-Tigloiloxi-6-acetoxitropano**                  | 32.1±0.4  | -           |
| 3-Tropoiloxi-6-acetoxitropano**                  | -   | 5.4±0.2     |
| Apoescopolamina**                                | 6.3±0.1   | 2.68±0.05   |
| Apoatropina**                                    | 6.2±0.1   | -           |
| 3-6-Ditigloiloxi-7-hidroxitropano**              | 1.98±0.06   | -           |
| 3-Tigloiloxi-6-iso valeriloxi-7-hidroxitropano** | 3.59±0.02   | -           |
| 3-Tropoiloxi-6-tigloiloxitropano**               | 25.1±0.3  | -           |
| 3-6-Ditigloiloxitropano**                        | 4.7±0.1   | -           |
| 3-Tigloiloxi-6-metilbutiriloxitropano**          | 2.7±0.1   | -           |

Nota: \* Cuantificación por el método del estándar externo, usando curva de calibración del patrón certificado de escopolamina.

\*\* Cuantificación por el método del estándar interno.

En los extractos hidroalcohólicos, de flores blancas de *B. suaveolens* se identificaron 15 alcaloides tropánicos, los siguientes fueron compuestos mayoritarios: escopolamina (1180±12 µg/g de flor seca), hiosciamina (380±4 µg/g de flor seca) y 3-hidroxi-6-tigloiloxitropano (290±2 µg/g de flor seca). En los extractos hidroalcohólicos obtenidos de flores rosadas se identificaron cinco alcaloides tropánicos, entre estos, la escopolamina (690±13 µg/g de flor seca) fue el compuesto mayoritario, seguido de 3-tropoiloxi-6-acetoxitropano (5.4±0.2 µg/g de

flor seca) y 3-hidroxi-6-tigloiloxitropano ( $2.35 \pm 0.08 \mu\text{g/g}$  de flor seca). En el **Anexo 10**, se muestra la estructura de algunos alcaloides tropánicos extraídos con solvente de flores de *B. suaveolens*.

En los extractos obtenidos por MSPD de flores blancas y rosadas de *B. suaveolens*, se logró identificar un alto número de alcaloides y en mayor concentración, en comparación con los de los extractos hidroalcohólicos (Véanse las Tablas 15-18); así mismo, en el extracto obtenido por MSPD de flores blancas se logró extraer la mayor cantidad de escopolamina ( $2230 \pm 42 \mu\text{g/g}$  de flor seca) en comparación con otros extractos. Las concentraciones más altas de los compuestos aislados por MSPD, pueden deberse a que el movimiento mecánico durante la homogeneización de las muestras junto con la sílice-octadecilo, facilita la transferencia de masa desde la matriz hacia el solvente de elución. En los extractos hidroalcohólicos y los obtenidos por MSPD de flores rosadas se detectaron hiosciamina, apoescopolamina, 3-hidroxi-6-tigloiloxitropano y 3-tropoiloxi-6-acetoxitropano, en bajas concentraciones; estos alcaloides no se detectaron cuando el análisis se realizó por GC-MS (Véase Sección 3.2.3.), esto se debe a que LC-ESI<sup>+</sup>-TOF-MS es una técnica más sensible que GC-MS, particularmente, para compuestos polares fáciles de protonar, pero poco volátiles.

En la Tabla 19, se puede observar la cantidad de alcaloides totales extraídos por MSPD o con EtOH:H<sub>2</sub>O de flores blancas y rosadas de *B. suaveolens*; existen diferencias significativas entre los métodos utilizados para la extracción de alcaloides, también una diferencia notoria entre la cantidad de alcaloides presentes en flores blancas y flores rosadas: por ambos métodos de extracción, la flor blanca tiene la cantidad y el número de alcaloides más altos.

Tabla 19. Contenido total de alcaloides en los extractos obtenidos con solventes o por MSPD de flores blancas y rosadas de *B. suaveolens*.

| Método                | µg Alcaloides/ g Material vegetal seco ( $\pm$ SD, $n=3$ ) |               |
|-----------------------|--|---------------|
|                       | Flor blanca  | Flor rosada   |
| MSPD                  | 3400 $\pm$ 113   | 1760 $\pm$ 18 |
| EtOH:H <sub>2</sub> O | 1980 $\pm$ 18  | 700 $\pm$ 13  |

De Feo (2004) realizó un estudio sobre el uso tradicional de plantas pertenecientes al género *Brugmansia* en el norte de Perú, y encontró que son muy usadas en forma de infusión o como cataplasma para aliviar diferentes tipos de dolores. En este estudio, se encontró que las hojas y las flores de *B. suaveolens* se emplean para calmar el dolor causado por la mordedura de la serpiente zumbadora (*Drymarchon melanurus*) y como antiséptico en caso de dismenorrea.

Parker, *et al.* (2007) estudiaron el efecto antinociceptivo del extracto acuoso de flores de *B. suaveolens* en ratones, usando la prueba de la placa caliente, y encontraron que al administrar dosis intraperitoneales del extracto (100 y 300 mg/kg de peso corporal) se logró obtener un efecto antinociceptivo sobre los ratones. No obstante, los autores no realizaron un análisis de la composición del extracto y no hicieron una descripción detallada sobre tipo de flores usadas en el trabajo.

Mai (2017) cuantificó escopolamina en extractos metanólicos de flores, hojas y tallos de *B. suaveolens*, y encontró que en las flores la cantidad de escopolamina es de 2700 $\pm$ 72 µg/ g de flor seca. Asimismo, Alves, *et al.* (2007), realizaron un estudio sobre la localización y la respuesta inducida por herbívora, de escopolamina en *B. suaveolens*. Los autores encontraron que la cantidad de escopolamina aumentaba en los diferentes estados fenológicos de la planta y que su mayor concentración fue en frutos verdes (*ca.* 2000 µg/ g de material seco), mientras

que en las flores la concentración alcanzaba *ca.* 1000 µg/ g de material seco. Las concentraciones reportadas por Alves, *et al.* (2007) y Mai (2017) se parecen en su orden a las encontradas en el presente trabajo.

Parrott (1986) realizó un estudio sobre el efecto de la aplicación transdérmica y la ingesta de la escopolamina en seres humanos y encontró que en dosis de 0.1, 0.3, 0.6 y 1.2 mg de escopolamina, produce decrecimiento de la atención continua y del almacenamiento de nueva información. Mirakhur (1978) estudió el efecto del consumo oral de atropina y escopolamina en seres humanos y encontró que al aumentar la dosis de 0.25 a 2 mg, el ritmo cardiaco y el tamaño de pupila aumentaban y que la producción de saliva disminuía.

Lo anterior evidencia que en los extractos de flores de *B. suaveolens* se encuentran alcaloides a los cuales se les han atribuido propiedades biológicas, pero, a su vez, se encuentran otros alcaloides, aún no estudiados, aunque se encuentran en altas concentraciones en los extractos. Muchos de los estudios no hacen mención a la composición química de los extractos usados, y, como se observó en este trabajo, la composición química de los extractos de flores blancas y rosadas son muy diferentes.

Los compuestos en los extractos obtenidos con EtOH:H<sub>2</sub>O o por MSPD, junto con los de la fracción volátil aislada por HS-SPME (CAR-PDMS/DVB) de flores blancas de *B. suaveolens*, caracterizados por LC-MS y GC-MS, se registran en la Tabla 20.

Tabla 20. *Metabolitos secundarios identificados, por LC-MS o GC-MS, en extractos o en la fracción volátil de flores blancas de B. suaveolens.*

| Compuesto                          | Fórmula   | Método de extracción  |      |      | Clasificación       |
|------------------------------------|---|-----------------------|------|------|---------------------|
|                                    |   | EtOH:H <sub>2</sub> O | MSPD | SPME |                     |
| Escopolamina                       | C <sub>17</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>4</sub> | +                     | +    | -    | Alcaloide           |
| Hiosciamina                        | C <sub>17</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>3</sub> | +                     | +    | -    | Alcaloide           |
| 3-Hidroxi-6-tigloiloxitropano      | C <sub>13</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>3</sub> | +                     | +    | -    | Alcaloide           |
| 3-Tropoiloxi-6-acetoxitropano      | C <sub>19</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>5</sub> | +                     | -    | -    | Alcaloide           |
| Apoescopolamina                    | C <sub>17</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>3</sub> | +                     | +    | -    | Alcaloide           |
| 3-Tigloiloxi-6-acetoxitropano      | C <sub>15</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>4</sub> | +                     | +    | -    | Alcaloide           |
| 3-Tropoiloxi-6-tigloiloxitropano   | C <sub>22</sub> H <sub>29</sub> NO <sub>5</sub> | +                     | +    | -    | Alcaloide           |
| 3-Tigloiloxi-6-propioniloxitropano | C <sub>16</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>4</sub> | +                     | -    | -    | Alcaloide           |
| <i>trans</i> -β-Ocimeno            | C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>                 | -                     | -    | +    | Monoterpeno         |
| 1,8-Cineol                         | C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O               | -                     | -    | +    | Monoterpenoide      |
| Benzoato de metilo                 | C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>    | -                     | -    | +    | Compuesto oxigenado |
| Limoneno                           | C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>                 | -                     | -    | +    | Monoterpeno         |
| β-Mirceno                          | C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>                 | -                     | -    | +    | Monoterpeno         |
| <i>allo</i> -Ocimeno               | C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>                 | -                     | -    | +    | Monoterpeno         |
| α-Terpineol                        | C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O               | -                     | -    | +    | Monoterpenoide      |

#### 4.7. Evaluación de la actividad antioxidante de extractos de flores de *B. suaveolens*.

La actividad antioxidante de los extractos hidroalcohólicos, y los obtenidos por MSPD, así como de las sustancias de referencia (BHT y α-tocoferol); se midió usando la metodología

descrita en la Sección 2.6. Los extractos se evaluaron a través del ensayo ORAC y los resultados se expresaron en  $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$  de extracto (Véase Tabla 21).

Tabla 21. *Actividad antioxidante de extractos obtenidos con solvente o por MSPD de flores blancas y rosadas de B. suaveolens.*

| Método                               | ORAC $\pm$ SD, n=3  |               |
|--------------------------------------|---|---------------|
|                                      | ( $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$ de extracto) |               |
|                                      | Flor blanca   | Flor rosada   |
| <b>MSPD</b>                          | 770 $\pm$ 18  | 1500 $\pm$ 18 |
| <b>EtOH:H<sub>2</sub>O</b>           | 1370 $\pm$ 46   | 2220 $\pm$ 15 |
| <b>BHT</b>                           | 520 $\pm$ 18  |               |
| <b><math>\alpha</math>-Tocoferol</b> | 430 $\pm$ 5   |               |
| <b>Escopolamina</b>                  | 0.20 $\pm$ 0.02   |               |

A través del ensayo ORAC, se evaluó la capacidad que tiene una sustancia para secuestrar los radicales libres y desacelerar los procesos oxidativos provocados por ellos. Este método se basa en la transferencia de un átomo de hidrógeno de la sustancia antioxidante, hacia el radical, formado por degradación térmica de AAPH (Huang, Ou & Prior, 2005; Ou, *et al.*, 2001).

Los valores ORAC, para los extractos hidroalcohólicos y los obtenidos por MSPD fueron mayores, que los obtenidos para las sustancias de referencia BHT (520 $\pm$ 18  $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$  de extracto) y  $\alpha$ -tocoferol (430 $\pm$ 5  $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$  de extracto).

Los extractos hidroalcohólicos de flores de *B. suaveolens*, presentaron valores ORAC 1370 $\pm$ 46  $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$  de extracto (flor blanca) y 2220 $\pm$ 15  $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$  de extracto (flor rosada), superiores a los observados para los extractos MSPD 770 $\pm$ 18  $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$  de extracto (flor blanca) y 1500 $\pm$ 18  $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$  de extracto (flor rosada). El patrón de

referencia de escopolamina presentó un valor ORAC inferior ( $0.20 \pm 0.02 \mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$  de extracto), que el obtenido para las sustancias de referencia BHT ( $520 \pm 18 \mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$  de extracto) y  $\alpha$ -tocoferol ( $430 \pm 5 \mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$  de extracto), la actividad antioxidante de los extractos estudiados no se debe al contenido de escopolamina, pero probablemente a otros compuestos presentes, por ejemplo, alcaloides tropanicos con grupos hidroxilo, *e.g.*, 3-(2'-hidroxitropoiloxi)-6,7-epoxitropano, 3-hidroxi-6-tigloiloxitropano 6,7-dihidrohiosciamina y hiosciamina, que pueden presentar un valor ORAC mayor que el obtenido para escopolamina.

Guler (2012) determinó la actividad antioxidante de extractos de *Hyoscyamus reticulatus* (*Solanaceae*), por el ensayo de reducción del hierro (FRAP) y encontró que los valores FRAP de los extractos en etanol ( $211.20 \pm 0.73 \text{ mg de ácido ascórbico/g}$  de muestra) fueron más altos que los de los extractos en acetona ( $40.30 \pm 0.47 \text{ mg de ácido ascórbico/g}$  de muestra) y metanol ( $83.40 \pm 0.95 \text{ mg de ácido ascórbico/g}$  de muestra).

Nandakumar, Vaganan, Sundararaju & Udayakumar (2017) determinaron la cantidad de alcaloides y flavonoides, presentes en hojas de *D. metel*, *D. innoxia* y *B. suaveolens*, y encontraron que *B. suaveolens* presentó  $5.90 \pm 0.01 \text{ mg de alcaloides/g}$  de hoja y  $4.95 \pm 0.02 \text{ mg de flavonoides/g}$  de hoja. En el presente trabajo, en los extractos hidroalcohólicos y los obtenidos por MSPD de flores blancas y rosadas de *B. suaveolens* no se detectaron compuestos fenólicos, posiblemente, la concentración en la que se encuentren esté por debajo de su límite de detección por los métodos usados.

## 5. Conclusiones

Se compararon los recubrimientos poliméricos CAR-PDMS y CAR-PDMS/DVB, se observaron el número de compuestos extraídos y el área total. Con la fibra con recubrimiento polimérico CAR-PDMS/DVB se logró extraer un número más alto de monoterpenos oxigenados, sesquiterpenos y sesquiterpenos oxigenados en comparación con el polímero de CAR-PDMS.

En la fracción volátil de flores de *B. suaveolens* se identificaron monoterpenos (*trans*- $\beta$ -ocimeno, limoneno,  $\beta$ -mirreno) y sus derivados oxigenados (1,8-cineol,  $\alpha$ -terpineol y linalol), sesquiterpenos (*trans*- $\beta$ -farneseno, *trans*- $\beta$ -cariofileno y  $\beta$ -nerolidol), y compuestos aromáticos (benzoato de metilo, benzaldehído y alcohol feniletílico). El *trans*- $\beta$ -ocimeno, 1,8-cineol y benzoato de metilo, fueron compuestos mayoritarios, aunque su emisión se disminuye hacia el mediodía.

Se identificaron por GC-MS 21 alcaloides tropanicos en el extracto de flores blancas de *B. suaveolens*, mientras que en flores rosadas solo se detectó la escopolamina.

Las mayores áreas cromatográficas de la molécula de escopolamina protonada  $[M+H]^+$  ( $C_{17}H_{22}NO_4$ ,  $m/z$  304.1543), el factor de simetría más bajo y la relación señal/ruido más alta, se obtuvieron usando las siguientes condiciones operacionales de LC-ESI<sup>+</sup>-TOF-MS a saber: voltajes de capilar (1 kV) y del fragmentador (150 V). La fase móvil A: ácido fórmico al 0.2% en agua y B: ácido fórmico al 0.2% en acetonitrilo.

Mediante la implementación de un diseño experimental <sup>23</sup>, donde el observable fue la cantidad de escopolamina extraída (mg de escopolamina/g de material vegetal seco), se encontró que las siguientes variables: tipo de soporte sólido, cantidad de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (g) y sus interacciones, tuvieron un efecto significativo sobre la eficiencia de extracción de escopolamina. Cuando se usó soporte sólido (sílice-octadecilo), sin K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> y el volumen de elución fue 5 mL, la respuesta del observable fue mayor.

En los extractos obtenidos por MSPD tanto de flores blancas, como de flores rosadas de *B. suaveolens* se detectaron más compuestos y en concentraciones más altas que en los extractos obtenidos con solventes. Los alcaloides 6,7-dihidrohiosciamina y 3-tigloiloxi-6-isovaleriloxi-7-hidroxitropano se reportan por primera vez en este trabajo.

Los valores de actividad antioxidante, obtenidos por el método de ORAC, de los extractos hidroalcohólicos y de los obtenidos por MSPD, fueron más altos, en comparación con los de los compuestos de referencia, BHT y  $\alpha$ -tocoferol.

Los extractos hidroalcohólicos de flores de *B. suaveolens*, presentaron valores ORAC 1370 $\pm$ 46  $\mu$ mol Trolox<sup>®</sup>/g de extracto (flor blanca) y 2220 $\pm$ 15  $\mu$ mol Trolox<sup>®</sup>/g de extracto (flor rosada), superiores a los valores ORAC de los extractos obtenidos por MSPD 770 $\pm$ 18  $\mu$ mol Trolox<sup>®</sup>/g de extracto (flor blanca) y 1500 $\pm$ 18  $\mu$ mol Trolox<sup>®</sup>/g de extracto (flor rosada). La actividad antioxidante de los extractos estudiados no se debe al contenido de escopolamina, pero probablemente a otros compuestos presentes, por ejemplo, alcaloides tropanicos con grupos hidroxilo, *e.g.*, 3-(2'-hidroxitropoiloxi)-6,7-epoxitropano, 3-hidroxi-6-tigloiloxitropano 6,7-dihidrohiosciamina y hiosciamina, que pueden presentar un valor ORAC más alto que el obtenido para escopolamina (0.20 $\pm$ 0.02  $\mu$ mol Trolox<sup>®</sup>/g de extracto).

## 6. Recomendaciones

Se recomienda realizar estudios de actividad biológica, *i.e.*, antiespasmódica, antinociceptiva, anticolinérgica, de los extractos de flores blancas y rosadas de *B. suaveolens*, para explorar las posibles aplicaciones de las flores de la especie bajo estudio.

Se sugiere determinar, usando otros métodos de medición: poder de reducción antioxidante del hierro (FRAP) o el ensayo de decoloración del catión-radical ABTS<sup>•+</sup> (2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico), la capacidad antioxidante de extractos de flores de *B. suaveolens*, con el propósito de estudiar los diferentes mecanismos por los cuales los componentes de extractos exhiben un poder antioxidante.

### Referencias Bibliográficas

- Álvarez, L. (2008). Borrachero, cacao sabanero o floripondio (*brugmansia* spp.). Un grupo de plantas por redescubrir en la biodiversidad latinoamericana. *Cultura y Droga*, 13 (15), 77-93.
- Abraham, W. & Leete, E. (1995). New intermediate in the biosynthesis of the tropane alkaloids in *Datura innoxia*. *Journal of the American Chemical Society*, 117(31), 8100-8105.
- Adams, P. (2004). *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry*. Illinois, EE.UU: Allured Publishing Corporation.
- Alves, N., Sartoratto, A. & Trigo, R. (2007). Scopolamine in *Brugmansia suaveolens* (Solanaceae): defense, allocation, costs, and induced response. *Journal of Chemical Ecology*, 33(2), 297-309.
- Andersson, S., & Dobson, E. (2003). Behavioral foraging responses by the butterfly *Heliconius melpomene* to *Lantana camara* floral scent. *Journal of Chemical Ecology*, 29(10), 2303-2318.
- Ansarin, M. & Woolley, G. (1994). The rearrangement of phenyllactate in the biosynthesis of tropic acid. *Phytochemistry*, 35(4), 935-939.
- Anthony, J., Zuchowski, W., & Setzer, N. (2009). Composition of the floral essential oil of *Brugmansia suaveolens*. *Records of Natural Products*, 3(2), 76.

- Arthur, L. & Pawliszyn, J. (1990). Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Analytical Chemistry*, 62(19), 2145-2148.
- Atlabachew, M., Torto, N., Chandravanshi, S., & Redi, M. (2013). Matrix solid-phase dispersion for the HPLC–DAD determination of psychoactive phenylpropylamino alkaloids from Khat (*Catha edulis* Forsk) chewing leaves. *Chromatographia*, 76(7-8), 401-408.
- Babushok, I., Linstrom, J. & Zenkevich, G. (2011). Retention indices for frequently reported compounds of plant essential oils. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, 40(4), 1-47.
- Badarinath, V., Rao, M., Chetty, S., Ramkanth, S., Rajan, S. & Gnanaprakash, K. (2010). A review on in-vitro antioxidant methods: comparisons, correlations and considerations. *International Journal of PharmTech Research*, 2(2), 1276-1285.
- Bailey, L., Streisand, B., Pace, L., Bubbers, J., East, A., Mulder, S., & Stanley, H. (1990). Transdermal scopolamine reduces nausea and vomiting after outpatient laparoscopy. *Anesthesiology*, 72(6), 977-980.
- Barker, A. (2007). Matrix solid phase dispersion (MSPD). *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 70(2), 151-162.
- Barker, A., Long, R. & Short, R. (1989). Isolation of drug residues from tissues by solid phase dispersion. *Journal of Chromatography A*, 475(2), 353-361.
- Berkov, S., Pavlov, A., Kovatcheva, P., Stanimirova, P., & Philipov, S. (2003). Alkaloid spectrum in diploid and tetraploid hairy root cultures of *Datura stramonium*. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 58(1-2), 42-46.

- Blossey, C., Budzikiewicz, H., Ohashi, M., Fodor, G., & Djerassi, C. (1964). Mass spectrometry in structural and stereochemical problems—XXXIX: Tropane alkaloids. *Tetrahedron*, 20(3), 585-595.
- Borrás, I., Fernández, S., Arráez, D., Palmeros, A., Del Val, R., Andrade, I., Fernández, A., Gómez, J. & Segura, A. (2015). Characterization of phenolic compounds, anthocyanidin, antioxidant and antimicrobial activity of 25 varieties of Mexican Roselle (*Hibiscus sabdariffa*). *Industrial Crops and Products*, 69, 385-394.
- Bussmann, W. & Sharon, D. (2006). Traditional medicinal plant use in Northern Peru: tracking two thousand years of healing culture. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 2(1), 47.
- Cao, G., Alessio, M., & Cutler, G. (1993). Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine*, 14(3), 303-311.
- Chang, S., Wu, M., Deng, F., Lee, C., Chin, F. & Liao, J. (1999). Poisoning by *Datura* leaves used as edible wild vegetables. *Veterinary and Human Toxicology*, 41(4), 242-245.
- De Feo, V. (2004). The ritual use of *Brugmansia* species in traditional Andean medicine in northern Peru. *Economic Botany*, 58(1), S221-S229.
- Dewick, P. (2002). *Medicinal natural products: a biosynthetic approach*. Nueva York. EE. UU.: John Wiley & Sons.
- Díaz, M. (2017). *Identificación por GC-MS Y LC-MS de metabolitos secundarios aislados de Medinilla myriantha (Melastomataceae) y evaluación de su actividad antioxidante* (tesis de pregrado). Universidad Industrial de Santander. Colombia.

- Doncheva, T., Berkov, S. & Philipov, S. (2006). Comparative study of the alkaloids in tribe Datureae and their chemosystematic significance. *Biochemical Systematics and Ecology*, 34(6), 478-488.
- El Bazaoui, A., Bellimam, M., & Soulaymani, A. (2011). Nine new tropane alkaloids from *Datura stramonium* L. identified by GC/MS. *Fitoterapia*, 82(2), 193-197.
- Evans, C., & Lampard, F. (1972). Alkaloids of *Datura suaveolens*. *Phytochemistry*, 11(11), 3293-3298.
- Evans, C., & Major, A. (1968). The alkaloids of the genus *Datura*, section *Brugmansia*. Part V. Alkaloids of *D. sanguinea* R. and P. and related esters of tropane-3 $\alpha$ , 6 $\beta$ , 7 $\beta$ -triol. *Journal of the Chemical Society C: Organic*, 2775-2778.
- Flamini, G., Cioni, L. & Morelli, I. (2003). Use of solid-phase micro-extraction as a sampling technique in the determination of volatiles emitted by flowers, isolated flower parts and pollen. *Journal of Chromatography A*, 998(1-2), 229-233.
- García, H. (1974). *Flora medicinal de Colombia: botánica médica*. Santafé de Bogotá, Colombia: Tercer mundo editores.
- Geller, F., Murillo, R., Steinhauser, L., Heinzmann, B., Albert, K., Merfort, I. & Laufer, S. (2014). Four new flavonol glycosides from the leaves of *Brugmansia suaveolens*. *Molecules*, 19(5), 6727-6736.
- Gilman, G., Gilman, A. & Goodman, S. (1994). *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. Ciudad de México, México: Editorial Revolucionaria.
- Glazer, N. (1988). Fluorescence-based assay for reactive oxygen species: a protective role for creatinine. *The FASEB Journal*, 2(9), 2487-2491.

- Gritsanapan, W. (1995). *Duboisia*: a major source of hyoscine. *Warasan Phesatchasat*, 22(1), 178-190.
- Gros, G., Burton, G., Pomilio, B. & Seldes, M. (1985). *Introducción al estudio de los productos naturales*. Washington. EE. UU.: Organización de los Estados Americanos.
- Gualteros, L. (2017). *Aislamiento por diferentes métodos de extracción de metabolitos secundarios de flores de Petrea volubilis L. (Fam. Verbenaceae) y evaluación de su capacidad antioxidante in-vitro* (tesis de pregrado). Universidad Industrial de Santander. Colombia.
- Guilhaus, M. (1995). Special feature: Tutorial. Principles and instrumentation in time-of-flight mass spectrometry. Physical and instrumental concepts. *Journal of Mass Spectrometry*, 30(11), 1519-1532.
- Guler, O. (2012). Studies on antioxidant properties of the different solvent extracts and fatty acid composition of *Hyoscyamus reticulatus L.* *Journal of Food Biochemistry*, 36(5), 532-538.
- Halliwell, B. (1995). Antioxidant characterization: methodology and mechanism. *Biochemical Pharmacology*, 49(10), 1341-1348.
- Harborne, J. (1984). *Methods of plant analysis. In Phytochemical methods*. Dordrecht, Países Bajos: Springer.
- Hay, A. (2011). *Universidad Nacional de Colombia: Collections*. Santafé de Bogotá, Colombia: Universidad Nacional de Colombia. Recuperado de <http://www.biovirtual.unal.edu.co/en/collections/detail/95336/>

- Hernández, W. (2014). *Caracterización por GC-MS de las fracciones volátiles de las orquídeas cattleya trianae y cattleya mendelii a diferentes horas del día, utilizando HS-SPME in vivo e in vitro* (tesis de pregrado). Universidad Industrial de Santander. Colombia.
- Huang, D., Ou, B., & Prior, L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 1841-1856.
- Ibarz, A. & Ribas, I. (2005). *Operaciones unitarias en la ingeniería de alimentos*. Madrid, España: Mundi-Prensa Libros.
- Ikan, R. (1998). *Natural products: a laboratory guide*. San Diego. EE. UU.: Academic Press.
- Ionkova, I., Witte, L., & Alfermann, W. (1994). Spectrum of tropane alkaloids in transformed roots of *Datura innoxia* and *Hyoscyamus györfgyi* cultivated in vitro. *Planta Medica*, 60(04), 382-384.
- Jacobson, M., & Haller, L. (1947). The insecticidal component of *Eugenia haitiensis* identified as 1, 8-cineol. *Journal of the American Chemical Society*, 69(3), 709-710.
- Jaimes, K. (2016). *Estudio de la composición química y evaluación de la capacidad antioxidante de los extractos de la flor de Brownea macrophylla obtenidos por diferentes técnicas de aislamiento*. (tesis de pregrado). Universidad Industrial de Santander. Colombia.
- Jakabová, S., Vincze, L., Farkas, Á., Kilár, F., Boros, B., & Felinger, A. (2012). Determination of tropane alkaloids atropine and scopolamine by liquid chromatography–mass spectrometry in plant organs of *Datura* species. *Journal of Chromatography A*, 1232, 295-301.

- Juergens, R., Dethlefsen, U., Steinkamp, G., Gillissen, A., Repges, R., & Vetter, H. (2003). Anti-inflammatory activity of 1.8-cineol (eucalyptol) in bronchial asthma: a double-blind placebo-controlled trial. *Respiratory Medicine*, 97(3), 250-256.
- Jun, B., Dingguo, C., Mingjuan, G., Huawu, Z., Zhengliang, L. & Ling, L. (1996). Extracting scopolamine from *Datura metel* by CO<sub>2</sub> supercritical fluid extraction. *Zhongguo Yao Xue Za Zhi*. 31(10), 588-590.
- Kaufman, P., Cseke, J., Warber, S., Duke, A. & Briemann, L. (1998). *Natural products from plants*. Boca Ratón, EE. UU.: CRC Press Inc.
- Kite, C., & Leon, C. (1995). Volatile compounds emitted from flowers and leaves of *Brugmansia candida* (Solanaceae). *Phytochemistry*, 40(4), 1093-1095.
- Knapp, S. (2010). On 'various contrivances': pollination, phylogeny and flower form in the Solanaceae. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 365(1539), 449-460.
- Koski, J., Mattila, K., Knapik, D., Toivanen, T., Ruusukallio, H., Andersson, P., & Freudenthal, Y. (1990). Double blind comparison of transdermal hyoscine and placebo for the prevention of postoperative nausea. *BJA: British Journal of Anaesthesia*, 64(1), 16-20.
- Kotelko, M., Rottman, L., Wright, C., Stone, J., Yamashiro, Y., & Rosenblatt, M. (1989). Transdermal scopolamine decreases nausea and vomiting following cesarean section in patients receiving epidural morphine. *Anesthesiology*, 71(5), 675-678.

- Krurup, C. y Konar, P. (s.f). *Hortalizas de Estación Cálida*. Santiago, Chile.: Pontificia Universidad Católica de Chile. Recuperado de [http://www7.uc.cl/sw\\_educ/hortalizas/html/solanaceae.html](http://www7.uc.cl/sw_educ/hortalizas/html/solanaceae.html)
- Lahlou, S., Figueiredo, F., Magalhães, C., & Leal, H. (2002). Cardiovascular effects of 1,8-cineole, a terpenoid oxide present in many plant essential oils, in normotensive rats. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 80(12), 1125-1131.
- Lawless, J. (2013). *The Encyclopedia of essential oils: the complete guide to the use of aromatic oils in aromatherapy, herbalism, health, and well being*. Newburyport, EE.UU.: Conari Press.
- Leete, E. (1984). Chemistry of the tropane alkaloids. 34. 1,2-Migration of hydrogen during the biosynthesis of tropic acid from phenylalanine. *Journal of the American Chemical Society*, 106(23), 7271-7272.
- Lenaerts, M. (2006). Substances, relationships and the omnipresence of the body: an overview of Ashéninka ethnomedicine (Western Amazonia). *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 2(1), 49.
- Lenardao, J., Botteselle, V., de Azambuja, F., Perin, G., & Jacob, G. (2007). Citronellal as key compound in organic synthesis. *Tetrahedron*, 63(29), 6671-6712.
- Liapi, C., Anifantis, G., Chinou, I., Kourounakis, P., Theodosopoulos, S., & Galanopoulou, P. (2007). Antinociceptive properties of 1,8-cineole and  $\beta$ -pinene, from the essential oil of *Eucalyptus camaldulensis* leaves, in rodents. *Planta Medica*, 73(12), 1247-1254.
- Logan, B., Monson, K. & Potosnak, J. (2000). Biochemistry and physiology of foliar isoprene production. *Trends in Plant Science*, 5(11), 477-481.

- Mai, T. (2017). Quantitative Analysis Of Scopolamine In *Brugmansia Suaveolens* By HPLC-MS Method. *Journal of Multidisciplinary Engineering Science and Technology*, 4(1), 8176- 8179.
- Maisonnasse, A., Lenoir, C., Beslay, D., Crauser, D., & Le Conte, Y. (2010). E- $\beta$ -ocimene, a volatile brood pheromone involved in social regulation in the honey bee colony (*Apis mellifera*). *PLoS One*, 5(10), e13531.
- Marín, J., Romero, R., & Frenich, G. (2016). Enantiomeric determination and evaluation of the racemization process of atropine in Solanaceae seeds and contaminated samples by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1474, 79-84.
- Mata, J. y Salas, A. (2014). *Solanaceae. Banco de germoplasma*. CATIE. Recuperado de <http://bancodegermoplasma.catie.ac.cr/solanaceae.php>
- Mejicano, E. (2011). *Pollination syndrome and nectar protection in Brugmansia suaveolens (Solanaceae)*. Recuperado de <http://digital.lib.usf.edu/SFS0001417/00001>
- Mirakhur, K. (1978). Comparative study of the effects of oral and i.m. atropine and hyoscine in volunteers. *British Journal of Anaesthesia*, 50(6), 591-598.
- Molina, J. (2005). *Estudio de la variación composicional de la fragancia de las flores de Brugmansia suaveolens durante el día y la noche* (tesis de pregrado). Universidad Industrial de Santander. Colombia.
- Morales, H., Silva, C., Paterson, M., Oliveira, M., Venâncio, A. & Lima, N. (2010). Microextraction and gas chromatography/mass spectrometry for improved analysis of

- geosmin and other fungal “off” volatiles in grape juice. *Journal of Microbiological Methods*, 83(1), 48-52.
- Nandakumar, A., Vaganan, M., Sundararaju, P., & Udayakumar, R. (2017). Phytochemical Analysis and Nematicidal Activity of Ethanolic Leaf Extracts of *Datura metel*, *Datura innoxia* and *Brugmansia suaveolens* Against *Meloidogyne incognita*. *Asian Journal of Biology*, 2(1), 1-11.
- Ou, B., Hampsch, M. & Prior, L. (2001). Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(10), 4619-4626.
- Parker, G., Peraza, G., Sena, J., Silva, S., Soares, F., Vaz, C., & Muccillo-Baisch, L. (2007). Antinociceptive effects of the aqueous extract of *Brugmansia suaveolens* flowers in mice. *Biological Research for Nursing*, 8(3), 234-239.
- Parrott, C. (1986). The effects of transdermal scopolamine and four dose levels of oral scopolamine (0.15, 0.3, 0.6, and 1.2 mg) upon psychological performance. *Psychopharmacology*, 89(3), 347-354.
- Pawliszyn, J. (2000). Theory of solid-phase microextraction. *Journal of Chromatographic Science*, 38(7), 270-278.
- Prior, L., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 4290-4302.
- Quintans, J., Souza, T., Leite, S., Lessa, N., Bonjardim, R., Santos, V., & Antonioli, R. (2008). Phytochemical screening and anticonvulsant activity of *Cymbopogon*

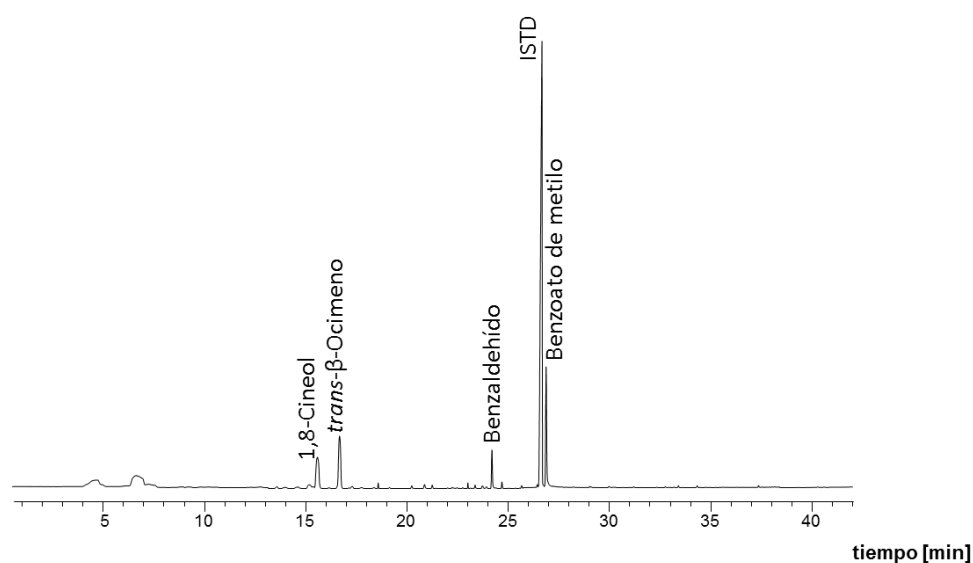
- winterianus* Jowitt (Poaceae) leaf essential oil in rodents. *Phytomedicine*, 15(8), 619-624.
- Quirantes, R., Lozano, J., Herrero, M., Ibáñez, E., Segura, A. & Fernández, A. (2013). HPLC–ESI–QTOF–MS as a Powerful Analytical Tool for Characterising Phenolic Compounds in Olive-leaf Extracts. *Phytochemical Analysis*, 24(3), 213-223.
- Ridgway, K., Lalljie, P. & Smith, M. (2007). Sample preparation techniques for the determination of trace residues and contaminants in foods. *Journal of Chromatography A*, 1153(1-2), 36-53.
- Robins, J., Woolley, G., Ansarin, M., Eagles, J. & Goodfellow, J. (1994). Phenyllactic acid but not tropic acid is an intermediate in the biosynthesis of tropane alkaloids in *Datura* and *Brugmansia* transformed root cultures. *Planta*, 194(1), 86-94.
- Roman, M., Ström, L., Tell, H., & Josefsson, M. (2013). Liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry analysis of postmortem blood samples for targeted toxicological screening. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405(12), 4107-4125.
- Rubinson, K. & Rubinson, J. (2000). *Análisis Instrumental*. Madrid, España: Pearson Education.
- Schiestl, P., & Roubik, W. (2003). Odor compound detection in male euglossine bees. *Journal of Chemical Ecology*, 29(1), 253-257.
- Schlesier, K., Harwat, M., Böhm, V. & Bitsch, R. (2002). Assessment of antioxidant activity by using different in vitro methods. *Free Radical Research*, 36(2), 177-187.
- Schultes, R. (1970). The botanical and chemical distribution of hallucinogens. *Annual Review of Plant Physiology*, 21(1), 571-598.

- Sell, C. (2003). *A fragrant introduction to terpenoid chemistry*. Cambridge, Inglaterra: The Royal Society of Chemistry.
- Shimoda, T., Nishihara, M., Ozawa, R., Takabayashi, J., & Arimura, I. (2012). The effect of genetically enriched (E)- $\beta$ -ocimene and the role of floral scent in the attraction of the predatory mite *Phytoseiulus persimilis* to spider mite-induced volatile blends of torenia. *New Phytologist*, *193*(4), 1009-1021.
- Singleton, L. & Rossi, A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, *16*(3), 144-158.
- Smith, M. (2003). Before the injection modern methods of sample preparation for separation techniques. *Journal of Chromatography A*, *1000*(1-2), 3-27.
- Stashenko, E. & Martínez, J. (2008). Sampling flower scent for chromatographic analysis. *Journal of Separation Science*, *31*(11), 2022-2031.
- Stashenko, E. y Martínez, J. (2011). Preparación de la muestra: un paso crucial para el análisis de GC-MS. *Scientia Chromatographica*. *3*(1). 25-48.
- Stashenko, E., Martínez, J., Cárdenas, S., Saavedra, R. & Durán, C. (2013). GC-MS study of compounds isolated from *Coffea arabica* flowers by different extraction techniques. *Journal of separation science*, *36*(17), 2901-2914.
- Suganda, A., Nishiyama, Y., Yamakawa, T. & Sugiyama, N. (2006). Random amplified polymorphic DNA analysis to distinguish *Brugmansia suaveolens*, *B. candida* and *B. versicolor*. *Plant Biotechnology*, *23*(5), 519-520.

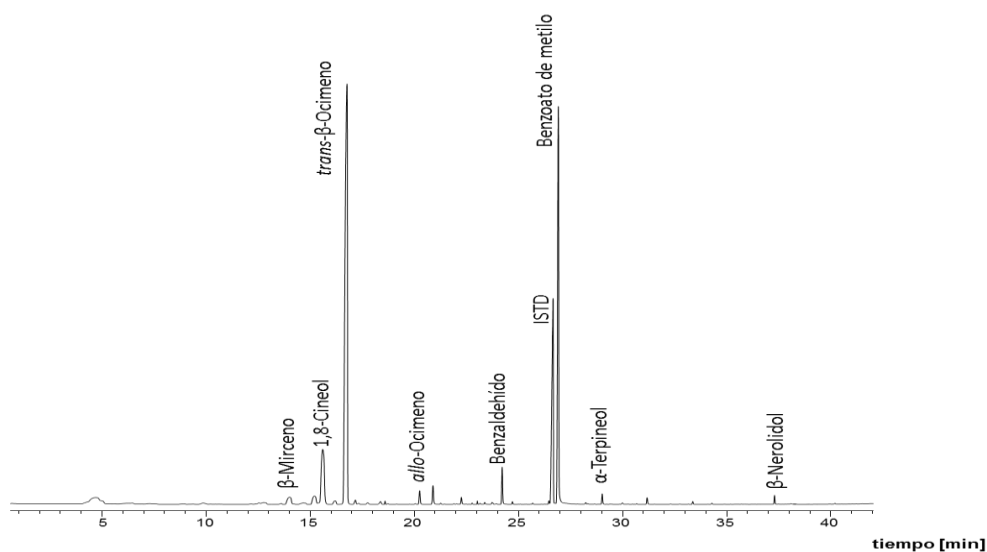
- Taiz, L. & Zeiger, E. (2002). *Plant Physiology*. Massachusetts. EE. UU.: Sinauer Associates.
- Tambe, Y., Tsujiuchi, H., Honda, G., Ikeshiro, Y., & Tanaka, S. (1996). Gastric cytoprotection of the non-steroidal anti-inflammatory sesquiterpene,  $\beta$ -caryophyllene. *Planta Medica*, 62(05), 469-470.
- Teng, X., Liang, C., Wang, R., Sun, T., Rao, Y., Ni, C., & Zhang, Y. (2015). Screening of drugs of abuse and toxic compounds in human whole blood using online solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Separation Science*, 38(1), 50-59.
- Trease, W. y Evans, C. (1991). *Farmacognosia*. Ciudad de México, México: Interamericana McGraw Hill.
- Watson, B., Freer, K., Robins, J. & Walton, J. (1993). Stereochemistry of the enzymic processes involved in the biosynthesis of scopolamine from hyoscyamine. *Journal of Natural Products*, 56(8), 1234-1238.
- Witte, L., Müller, K., & Arfmann, A. (1987). Investigation of the alkaloid pattern of *Datura innoxia* plants by capillary gas-liquid-chromatography-mass spectrometry. *Planta Medica*, 53(02), 192-197.
- Xiao, B., Krucker, M., Albert, K. & Liang, M. (2004). Determination and identification of isoflavonoids in *Radix astragali* by matrix solid-phase dispersion extraction and high-performance liquid chromatography with photodiode array and mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*, 1032(1-2), 117-124.
- Yeustratota, K. & Kudrgashov, M. (1994). Analysis of scopolamine from *Datura indiana* seeds. *Farmatsiya*. 43(1), 37-44.

## Apéndices

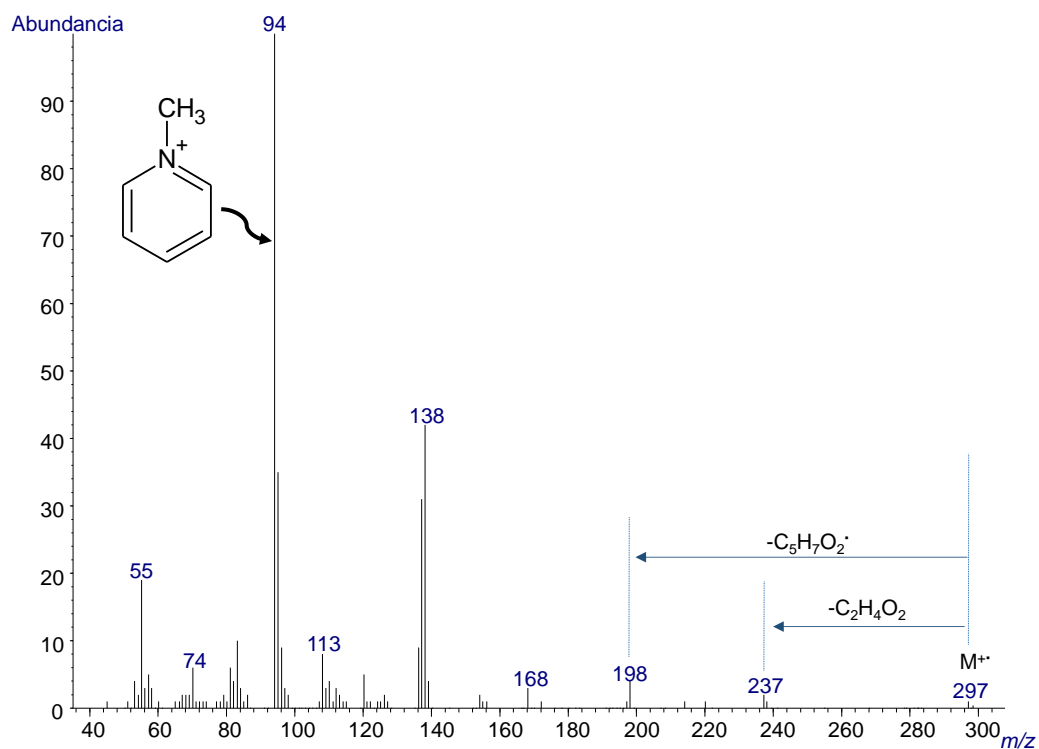
Apéndice A. Perfil cromatográfico típico, obtenido por GC-MS, de la fracción volátil aislada por HS-SPME (CAR-PDMS/DVB) a las 12:00 m., de flores blancas de *B. suaveolens*. Columna DB-WAX, 60 m. Detector selectivo de masas (EI, 70 eV), inyección: *splitless*.



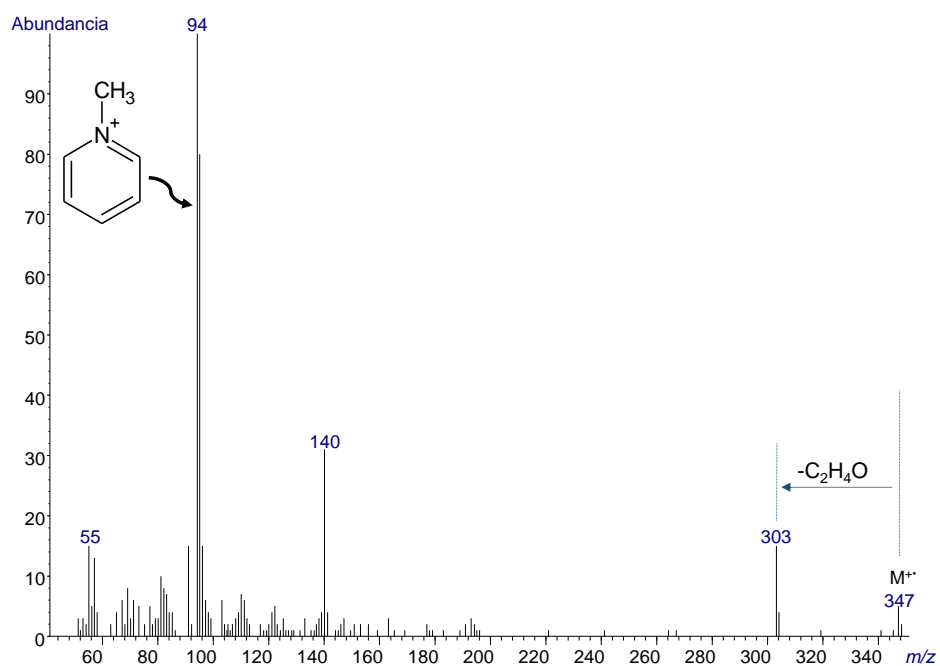
Apéndice B. Perfil cromatográfico típico, obtenido por GC-MS, de la fracción volátil aislada por HS-SPME (CAR-PDMS/DVB) a las 6:00 pm., de flores blancas de *B. suaveolens*. Columna DB-WAX, 60 m. Detector selectivo de masas (EI, 70 eV), inyección: *splitless*.



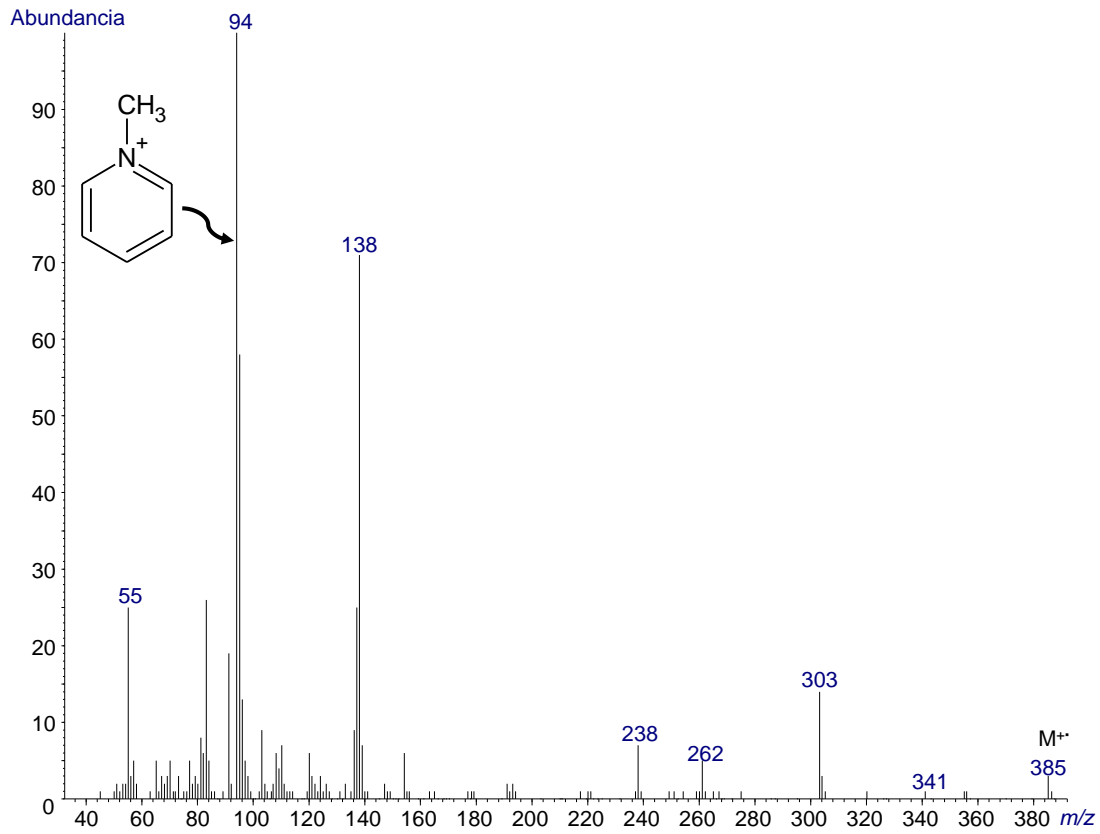
Apéndice C. Espectro de masas, obtenido por GC-MS, del compuesto N° 8 ( $t_R=52.56$  min) presente en el extracto MSPD de flores blancas de *B. suaveolens*.



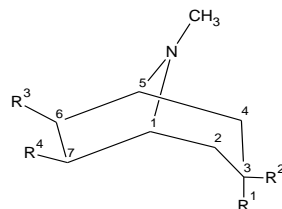
Apéndice D. Espectro de masas, obtenido por GC-MS, del compuesto N° 21 ( $t_R=61.54$  min) presente en el extracto MSPD de flores blancas de *B. suaveolens*.



Apéndice E. Espectro de masas, obtenido por GC-MS, del compuesto N° 24 ( $t_R=68.90$  min) presente en el extracto MSPD de flores blancas de *B. suaveolens*.



Apéndice F. Estructuras químicas e iones característicos de alcaloides tropánicos, identificados por GC-MS, extraídos por MSPD de flores blancas de *B. suaveolens*. Columna DB-5, 60 m. Detector selectivo de masas (EI, 70 eV), modo de inyección: *split* 1:30.

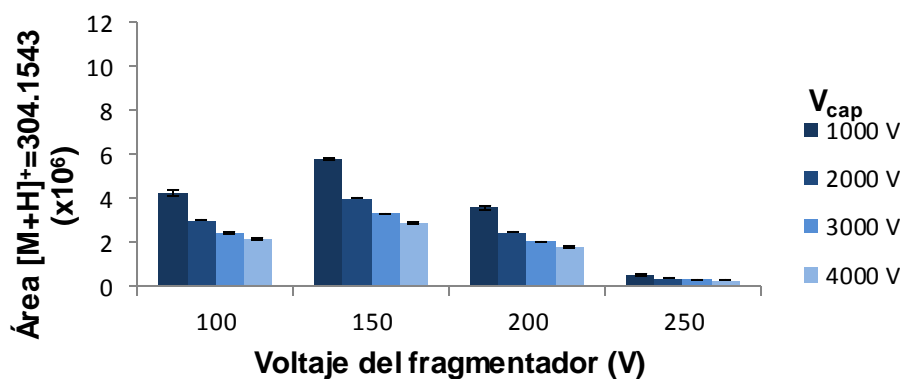


| Nombre   | Iones característicos, <i>m/z</i> (I, %)  |                |   |                |                  |           |            |          |           |
|--|---|----------------|---|----------------|------------------|-----------|------------|----------|-----------|
| <b>Alcaloides tropánicos 3-monosustituídos</b>       |   |                |   |                |                  |           |            |          |           |
|  | R <sup>1</sup>  | R <sup>2</sup> | R <sup>3</sup>  | R <sup>4</sup> | [M] <sup>+</sup> | 1         | 2          | 3        | 4         |
| Apoatropina  | $\begin{array}{c} \text{O}-\text{CO}-\text{C}-\text{C}_6\text{H}_5 \\    \\ \text{H}_2\text{C} \end{array}$               | H              | H   | H              | 271 (19%)        | 140 (9%)  | 124 (100%) | 95 (11%) | 94 (32%)  |
| 6,7-Dihidrohiosciamina                               | $\begin{array}{c} \text{O}-\text{CO}-\text{CH}-\text{C}_6\text{H}_5 \\   \\ \text{H}_2\text{C}-\text{OH} \end{array}$     | H              | Doble enlace  |                | 287 (39%)        | 138 (40%) | 122 (73%)  | 95 (34%) | 94 (100%) |
| Hiosciamina  | $\begin{array}{c} \text{O}-\text{CO}-\text{CH}-\text{C}_6\text{H}_5 \\   \\ \text{H}_2\text{C}-\text{OH} \end{array}$     | H              | H   | H              | 289 (15%)        | 140 (7%)  | 124 (100%) | 95 (7%)  | 94 (17%)  |
| <b>Alcaloides tropánicos 3,6 o 3,7-disustituídos</b> |   |                |   |                |                  |           |            |          |           |
| 3 $\alpha$ -Hidroxi-6-(2-metilbutiriloxi)tropano     | OH  | H              | $\begin{array}{c} \text{O}-\text{CO}-\text{CH}-\text{C}_2\text{H}_5 \\   \\ \text{H}_3\text{C} \end{array}$               | H              | 241 (16%)        | 140 (14%) | 113 (100%) | 96 (39%) | 94 (22%)  |
| 3 $\beta$ -Hidroxi-6-(2-metilbutiriloxi)tropano      | H   | OH             | $\begin{array}{c} \text{O}-\text{CO}-\text{CH}-\text{C}_2\text{H}_5 \\   \\ \text{H}_3\text{C} \end{array}$               | H              | 241 (18%)        | 140 (19%) | 113 (100%) | 96 (45%) | 94 (35%)  |
| 3 $\alpha$ -Tigloiloxi-6 $\beta$ -hidroxitropano     | $\begin{array}{c} \text{O}-\text{CO}-\text{C}=\text{CH} \\   \quad   \\ \text{H}_3\text{C} \quad \text{CH}_3 \end{array}$ | H              | OH  | H              | 239 (6%)         | 195 (3%)  | 140 (20%)  | 95 (61%) | 94 (100%) |
| 3 $\alpha$ -Hidroxi-6 $\beta$ -tigloiloxitropano     | OH  | H              | $\begin{array}{c} \text{O}-\text{CO}-\text{C}=\text{CH} \\   \quad   \\ \text{H}_3\text{C} \quad \text{CH}_3 \end{array}$ | H              | 239 (6%)         | 156 (8%)  | 113 (100%) | 96 (38%) | 94 (31%)  |
| 3 $\beta$ -Hidroxi-6 $\beta$ -tigloiloxitropano      | H   | OH             | $\begin{array}{c} \text{O}-\text{CO}-\text{C}=\text{CH} \\   \quad   \\ \text{H}_3\text{C} \quad \text{CH}_3 \end{array}$ | H              | 239 (18%)        | 156 (7%)  | 113 (100%) | 96 (42%) | 94 (30%)  |
| 3-Tigloiloxi-6-acetoxitropano                        | $\begin{array}{c} \text{O}-\text{CO}-\text{C}=\text{CH} \\   \quad   \\ \text{H}_3\text{C} \quad \text{CH}_3 \end{array}$ | H              | O-CO-CH <sub>3</sub>  | H              | 281 (8%)         | 182 (11%) | 122 (42%)  | 95 (58%) | 94 (100%) |

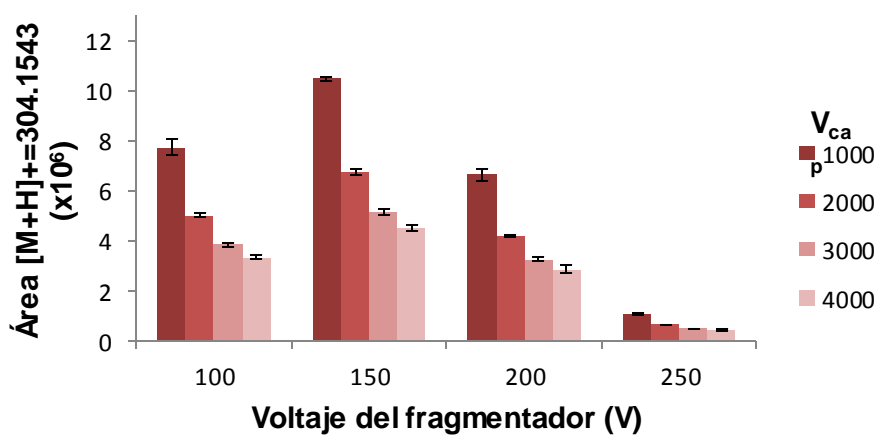
## Apéndice 6. Continuación

|  |  |   |  |    |           |           |           |           |           |
|--|--|---|--|----|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 3-Tigloiloxi-6-propioniloxitropano                 | $\begin{array}{c} \text{O}-\text{CO}-\text{C}=\text{CH} \\   \quad   \\ \text{H}_3\text{C} \quad \text{CH}_3 \end{array}$              | H   | $\text{O}-\text{CO}-\text{C}_2\text{H}_5$  | H  | 295 (7%)  | 196 (12%) | 122 (41%) | 95 (66%)  | 94 (100%) |
| 3-Tigloiloxi-6-metilbutiriloxitropano              | $\begin{array}{c} \text{O}-\text{CO}-\text{C}=\text{CH} \\   \quad   \\ \text{H}_3\text{C} \quad \text{CH}_3 \end{array}$              | H   | $\text{O}-\text{CO}-\text{C}_4\text{H}_9$  | H  | 323 (9%)  | 224 (9%)  | 122 (41%) | 95 (87%)  | 94 (100%) |
| 3 $\alpha$ -6 $\beta$ -Ditigloiloxitropano         | $\begin{array}{c} \text{O}-\text{CO}-\text{C}=\text{CH} \\   \quad   \\ \text{H}_3\text{C} \quad \text{CH}_3 \end{array}$              | H   | $\begin{array}{c} \text{O}-\text{CO}-\text{C}=\text{CH} \\   \quad   \\ \text{H}_3\text{C} \quad \text{CH}_3 \end{array}$    | H  | 321 (6%)  | 222 (14%) | 122 (32%) | 95 (62%)  | 94 (100%) |
| 7-Hidroxihiosciamina                               | $\begin{array}{c} \text{O}-\text{CO}-\text{CH}-\text{C}_6\text{H}_5 \\   \\ \text{H}_2\text{C}-\text{OH} \end{array}$                  | H   | H  | OH | 305 (5%)  | 261 (19%) | 140 (35%) | 95 (70%)  | 94 (100%) |
| 3-Tropoiloxi-6-acetoxitropano                      | $\begin{array}{c} \text{O}-\text{CO}-\text{CH}-\text{C}_6\text{H}_5 \\   \\ \text{H}_2\text{C}-\text{OH} \end{array}$                  | H   | $\text{O}-\text{CO}-\text{CH}_3$   | H  | 347 (14%) | 182 (46%) | 122 (59%) | 95 (72%)  | 94 (100%) |
| 3 $\alpha$ -Tropoiloxi-6-tigloiloxitropano         | $\begin{array}{c} \text{O}-\text{CO}-\text{CH}-\text{C}_6\text{H}_5 \\   \\ \text{H}_2\text{C}-\text{OH} \end{array}$                  | H   | $\begin{array}{c} \text{O}-\text{CO}-\text{C}=\text{CH} \\   \quad   \\ \text{H}_3\text{C} \quad \text{CH}_3 \end{array}$    | H  | 387 (10%) | 222 (40%) | 122 (49%) | 95 (75%)  | 94 (100%) |
| 3 $\beta$ -Tropoiloxi-6-tigloiloxitropano          | H  | $\begin{array}{c} \text{O}-\text{CO}-\text{CH}-\text{C}_6\text{H}_5 \\   \\ \text{H}_2\text{C}-\text{OH} \end{array}$ | $\begin{array}{c} \text{O}-\text{CO}-\text{C}=\text{CH} \\   \quad   \\ \text{H}_3\text{C} \quad \text{CH}_3 \end{array}$    | H  | 387 (9%)  | 222 (42%) | 122 (48%) | 95 (79%)  | 94 (100%) |
| <b>Alcaloides 3-sustituídos -6,7 epoxitropanos</b> |  |   |  |    |           |           |           |           |           |
| Apoescopolamina                                    | $\begin{array}{c} \text{O}-\text{CO}-\text{C}-\text{C}_6\text{H}_5 \\    \\ \text{H}_2\text{C} \end{array}$                            | H   | -O-  |    | 285 (45%) | 154 (33%) | 138 (59%) | 95 (14%)  | 94 (100%) |
| Escopolamina                                       | $\begin{array}{c} \text{O}-\text{CO}-\text{CH}-\text{C}_6\text{H}_5 \\   \\ \text{H}_2\text{C}-\text{OH} \end{array}$                  | H   | -O-  |    | 303 (38%) | 154 (39%) | 138 (97%) | 95 (11%)  | 94 (100%) |
| 3-(2'-Hidroxitropoiloxi)-6,7-epoxitropano          | $\begin{array}{c} \text{OH} \\   \\ \text{O}-\text{CO}-\text{C}-\text{C}_6\text{H}_5 \\   \\ \text{H}_2\text{C}-\text{OH} \end{array}$ | H   | -O-  |    | 319 (27%) | 154 (15%) | 138 (89%) | 95 (34%)  | 94 (100%) |
| <b>Alcaloides tropánicos 3,6,7-trisustituídos</b>  |  |   |  |    |           |           |           |           |           |
| 3-Tigloiloxi-6-isovaleriloxi-7-hidroxitropano      | $\begin{array}{c} \text{O}-\text{CO}-\text{C}=\text{CH} \\   \quad   \\ \text{H}_3\text{C} \quad \text{CH}_3 \end{array}$              | H   | $\begin{array}{c} \text{O}-\text{CO}-\text{CH}-\text{CH}_2 \\   \quad   \\ \text{H}_3\text{C} \quad \text{CH}_3 \end{array}$ | OH | 339 (1%)  | 240 (3%)  | 238 (1%)  | 138 (57%) | 94 (100%) |
| 3-6-Ditigloiloxi-7-hidroxitropano                  | $\begin{array}{c} \text{O}-\text{CO}-\text{C}=\text{CH} \\   \quad   \\ \text{H}_3\text{C} \quad \text{CH}_3 \end{array}$              | H   | $\begin{array}{c} \text{O}-\text{CO}-\text{C}=\text{CH} \\   \quad   \\ \text{H}_3\text{C} \quad \text{CH}_3 \end{array}$    | OH | 337 (1%)  | 237 (3%)  | 138 (48%) | 137 (34%) | 94 (100%) |

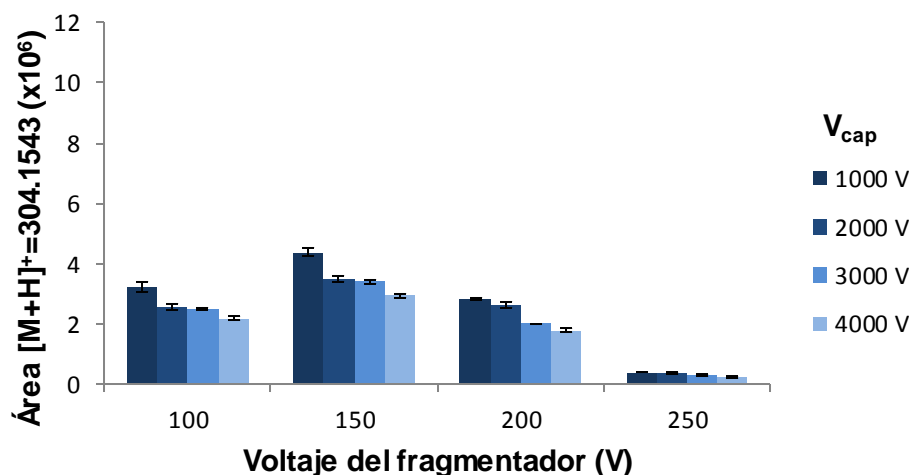
Apéndice G. Áreas de las corrientes iónicas extraídas de la escopolamina protonada  $[M+H]^+$  ( $C_{17}H_{22}NO_4$ ,  $m/z$  304.1543), obtenidas por LC-ESI<sup>+</sup>-TOF-MS, en función de diferentes voltajes de capilar y del fragmentador. Fase móvil, A: ácido fórmico (0.002, 0.0001 %) en agua, B: ácido fórmico (0.002, 0.0001 %) en acetonitrilo o metanol ( $n=3$ ).



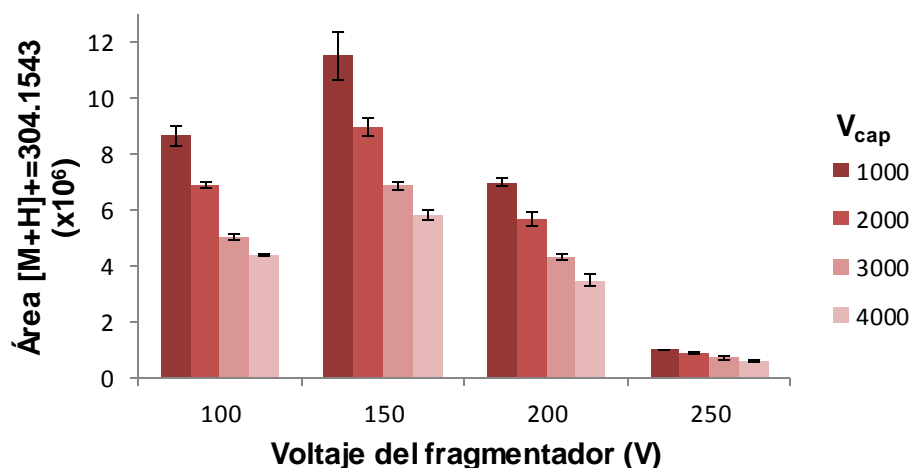
Apéndice G.1. Áreas de las corrientes iónicas extraídas de la escopolamina protonada  $[M+H]^+$  ( $C_{17}H_{22}NO_4$ ,  $m/z$  304.1543), obtenidas por LC-ESI<sup>+</sup>-TOF-MS, en función de diferentes voltajes de capilar y del fragmentador. Fase móvil, A: ácido fórmico **0.002%** en agua y B: ácido fórmico al **0.002% en acetonitrilo** ( $n=3$ ).



Apéndice G.2. Áreas de las corrientes iónicas extraídas de la escopolamina protonada  $[M+H]^+$  ( $C_{17}H_{22}NO_4$ ,  $m/z$  304.1543), obtenidas por LC-ESI<sup>+</sup>-TOF-MS, en función de diferentes voltajes de capilar y del fragmentador. Fase móvil, A: ácido fórmico **0.002%** en agua y B: ácido fórmico al **0.002% en metanol** ( $n=3$ ).

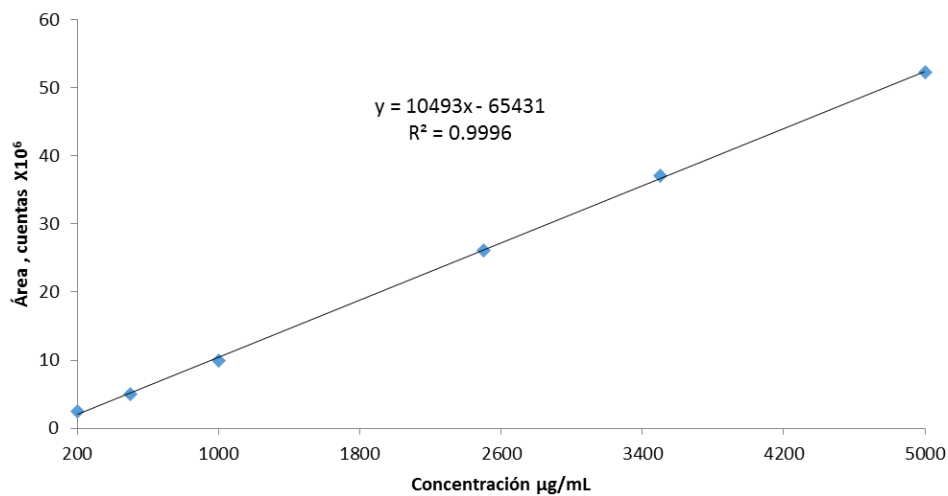


Apéndice G.3. Áreas de las corrientes iónicas extraídas de la escopolamina protonada  $[M+H]^+$  ( $C_{17}H_{22}NO_4$ ,  $m/z$  304.1543), obtenidas por LC-ESI<sup>+</sup>-TOF-MS, en función de diferentes voltajes de capilar y del fragmentador. Fase móvil, A: ácido fórmico **0.0001%** en agua y B: ácido fórmico al **0.0001%** en acetonitrilo ( $n=3$ ).

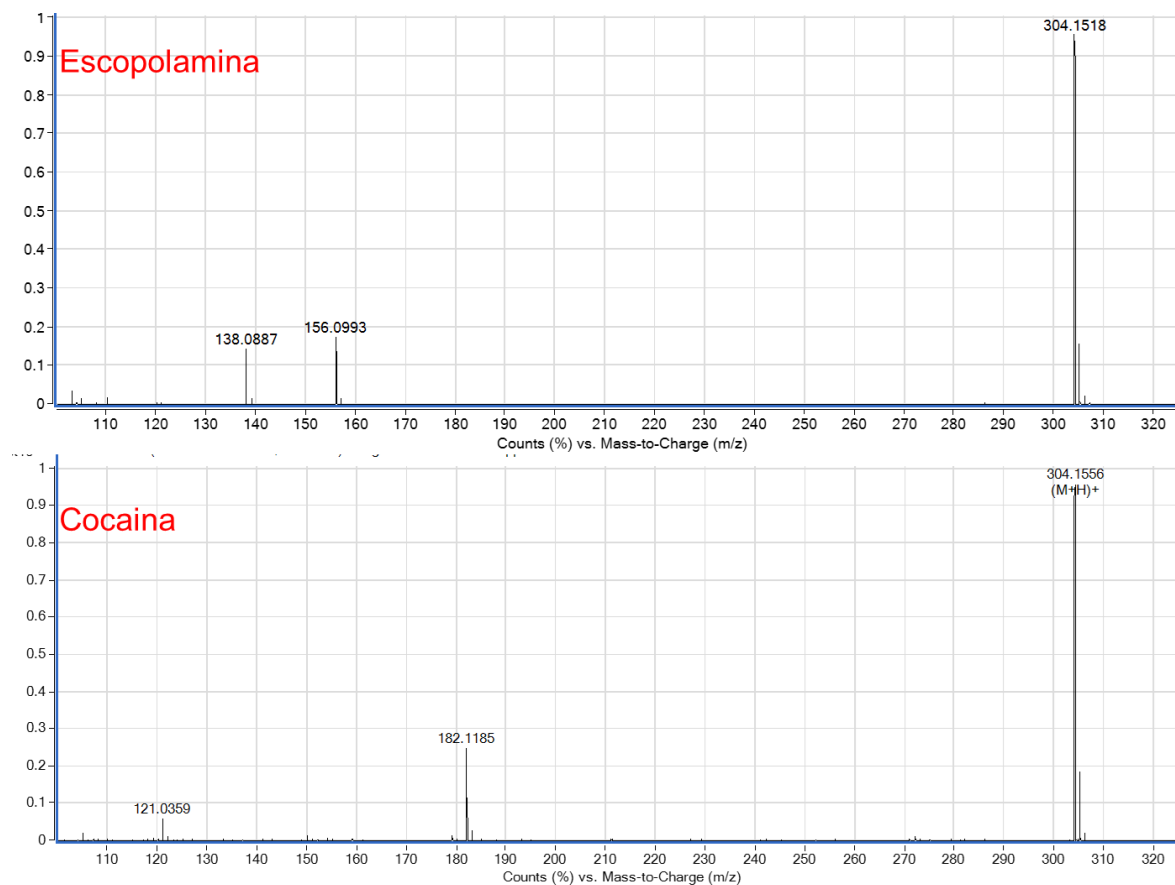


Apéndice G.4. Áreas de las corrientes iónicas extraídas de la escopolamina protonada  $[M+H]^+$  ( $C_{17}H_{22}NO_4$ ,  $m/z$  304.1543), obtenidas por LC-ESI<sup>+</sup>-TOF-MS, en función de diferentes voltajes de capilar y del fragmentador. Fase móvil, A: ácido fórmico **0.0001%** en agua y B: ácido fórmico al **0.0001%** en metanol ( $n=3$ ).

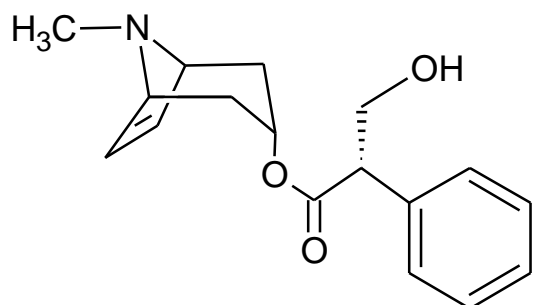
Apéndice H. Curva de calibración, obtenida por LC-ESI<sup>+</sup>-TOF-MS, para la cuantificar la escopolamina, usando el ion [M+H]<sup>+</sup> (C<sub>17</sub>H<sub>22</sub>NO<sub>4</sub>, m/z 304.1543) de la escopolamina.



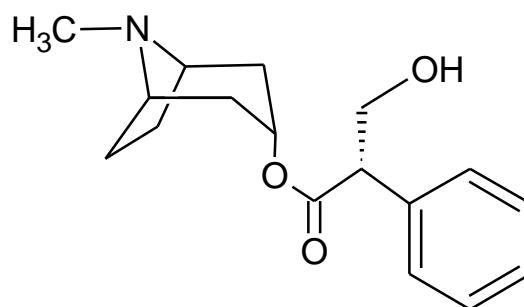
Apéndice I. Espectros de masas de los patrones certificados de escopolamina y cocaína [M+H]<sup>+</sup> (C<sub>17</sub>H<sub>22</sub>NO<sub>4</sub>, m/z 304.1543), obtenidos por LC-ESI<sup>+</sup>-TOF-MS. voltajes de capilar (1 kV) y del fragmentador (150 V).



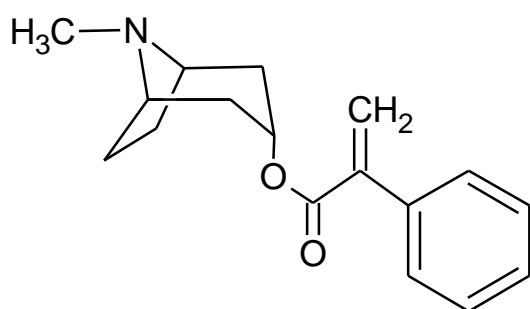
Apéndice J. Estructura química de la 6,7-dihidrohiosciamina, la hiosciamina, la apoatropina, la apoescopolamina y la 7-hidrohiosciamina.



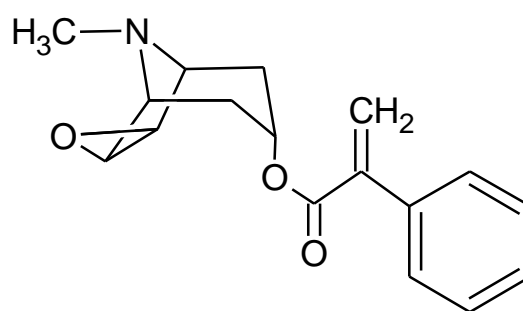
6,7-Dihidrohiosciamina



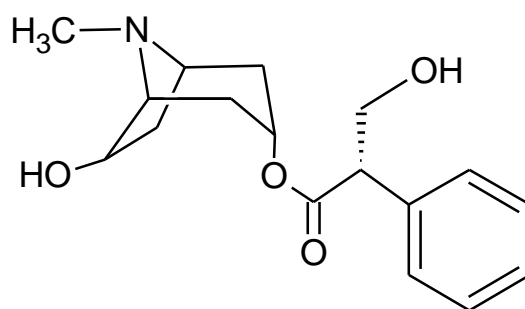
Hiosciamina



Apoatropina



Apoescopolamina



7-Hidrohiosciamina