

ESTUDIO DE LA VARIACIÓN COMPOSICIONAL DE LA FRAGANCIA DE LAS  
FLORES DE *Brugmansia suaveolens* DURANTE EL DÍA Y LA NOCHE

**JOSÉ LUIS MOLINA GUEVARA**

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE QUÍMICA

BUCARAMANGA

2005

ESTUDIO DE LA VARIACIÓN COMPOSICIONAL DE LA FRAGANCIA DE LAS  
FLORES DE *Brugmansia suaveolens* DURANTE EL DÍA Y LA NOCHE

**JOSÉ LUIS MOLINA GUEVARA**

Trabajo presentado como requisito parcial para optar al título de Químico

Directora: **ELENA E. STASHENKO,**  
Química, Ph.D.

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE QUÍMICA  
BUCARAMANGA

2005

## **DEDICATORIA**

*Quiero dedicar este trabajo a mis padres Nelly Esperanza Guevara y Pedro Molina, por su sacrificio y confianza en mi preparación universitaria y bienestar recibido durante mis años de vida. Espero nunca decepcionarlos y contar siempre con su amor y apoyo incondicional de todo padre y madre hacia sus hijos.*

*A mis hermanos Pedro Alexander, en la gloria del Señor, espero este orgulloso de mi, Carlos Javier, Leonel Fernando, Silvia Juliana y a mis dos hermanitos Maria Alejandra y Andrés Felipe.*

## **AGRADECIMIENTOS**

*Mis grandes y sinceros agradecimientos a la Dra. Elena E. Stashenko por su confianza en mis habilidades y conocimiento, al igual que la excelente preparación académica recibida a su lado.*

*Al Dr. Jairo René Martínez, por su apoyo y recomendaciones en mi formación profesional.*

*A Ingrid Bibiana Ramírez, una amiga muy especial en la cual siempre confíe y quiero mucho.*

*A mis compañeros de universidad, Gloria Pino, Zulay Casteblanco, Fabio A. Muñoz, Elkin Darío Rueda, Emerson Delgado, Ciro Rozo, Susan Merlo y Alix Cuy, con los que pase momentos divertidos e inolvidables durante la carrera.*

*A Marthica Barrera, Libia, Cristina y Geovanna, cuatro compañeras muy inteligentes e integrales, que nunca olvidaré.*

*Quiero también agradecer a Amanda Lucia Mora, una persona muy especial y solidaria que siempre me extendió la mano, en los momentos necesarios.*

## TABLA DE CONTENIDO

	<b>pág.</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>14</b>
<b>1. ESTADO DEL ARTE</b>	<b>17</b>
1.1 FAMILIA SOLANACEAE	17
1.2 GÉNERO <i>BRUGMANSIA</i>	17
1.2.1 <i>Brugmansia suaveolens</i>	18
1.3 FRAGANCIA DE LAS FLORES	21
1.4 TERPENOS	22
1.4.1 Biosíntesis de los terpenos	24
1.5 ALCALOIDES	26
1.5.1 Escopolamina	27
1.5.2 Biosíntesis de la escopolamina	28
1.6 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN	29
1.6.1 Extracción con fluido supercrítico (SFE)	30
1.6.2 Microextracción en fase sólida (SPME)	31
1.7 DERIVATIZACIÓN QUÍMICA	35
1.7.1 Derivatización y SPME	36
1.8 MÉTODOS DE ANÁLISIS DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS DE <i>B. suaveolens</i>	38

<b>2.</b>	<b>PARTE EXPERIMENTAL</b>	<b>40</b>
2.1	RECOLECCIÓN DE LAS FLORES DE <i>B. suaveolens</i>	40
2.2	IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DE LA <i>B. suaveolens</i>	40
2.3	EXTRACCIÓN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS POR HS-SPME DURANTE EL DÍA Y LA NOCHE	40
2.3.1	Extracción por HS-SPME <i>in vivo</i> de los metabolitos secundarios de la fragancia	45
2.4	DERIVATIZACIÓN DE LOS COMPUESTOS CARBONÍlicos PRESENTES EN LA FRAGANCIA DE LAS FLORES	46
2.5	EXTRACCIÓN CON FLUIDO SUPERCRÍTICO DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS EN LA FLOR DE <i>B. suaveolens</i>	48
2.6	EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LA ESCOPOLAMINA EN LAS FLORES Y HOJAS DE <i>B. suaveolens</i>	51
2.7	ANÁLISIS POR CROMATOGRFÍA DE GASES	53
2.7.1	Análisis de los metabolitos secundarios extraídos por HS-SPME de la fragancia de las flores de <i>B. suaveolens</i>	53
2.7.2	Análisis de los componentes carbonílicos, derivatizados con PFPH, presentes en la fragancia de las flores de <i>B. suaveolens</i>	53
2.7.3	Identificación y cuantificación de escopolamina por LLE-B y SFE en cáliz, corola y hojas de la <i>B. suaveolens</i>	53
<b>3.</b>	<b>ANÁLISIS DE RESULTADOS</b>	<b>57</b>
3.1	SELECCIÓN DEL RECUBRIMIENTO DE LA FIBRA DE SPME	57
3.2	DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA FRAGANCIA DE LAS FLORES, DURANTE EL DÍA Y LA NOCHE	63
3.3	IDENTIFICACIÓN POR GC-MS DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS VOLÁTILES DE LA FRAGANCIA	71
3.3.1	$\beta$ -Mirceno	71
3.3.2	Geraniol	73

3.3.3	Benzoato de bencilo	73
3.3.4	Alcohol bencílico	76
3.3.5	Indol	76
3.4	MUESTREO POR HS-SPME-GC-MS <i>IN VIVO</i> DE LA FRAGANCIA DE LAS FLORES DE <i>B. suaveolens</i>	79
3.5	DERIVATIZACIÓN DE LOS COMPUESTOS CARBONÍLICOS PRESENTES EN LA FRAGANCIA DE FLORES DE <i>B. suaveolens</i>	82
3.6	EXTRACCIÓN CON FLUIDO SUPERCRÍTICO DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS EN LA FLOR DE <i>B. suaveolens</i>	84
3.7	IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LA ESCOPOLAMINA EN LA FLORES Y HOJAS DE <i>B. suaveolens</i>	86
4.	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>91</b>
5.	<b>RECOMENDACIONES</b>	<b>94</b>
	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>95</b>

## LISTA DE TABLAS

		pág.
<b>Tabla 1</b>	Clasificación de los terpenos de acuerdo con el número de unidades isoprenicas condensadas.	23
<b>Tabla 2</b>	Propiedades de algunos fluidos supercríticos.	30
<b>Tabla 3</b>	Composición y características de los recubrimientos de fibra utilizados en SPME.	32
<b>Tabla 4</b>	Cantidad de material vegetal utilizado para el análisis por HS-SPME, con los dos tipos de fibra.	41
<b>Tabla 5</b>	Parámetros operacionales del GC-MS para el análisis de los metabolitos secundarios extraídos por HS-SPME de la fragancia de las flores de <i>B. suaveolens</i> .	54
<b>Tabla 6</b>	Parámetros operacionales del GC-ECD, para el análisis de los derivados hidrazónicos de los componentes carbonílicos en la fragancia.	55
<b>Tabla 7</b>	Parámetros operacionales del GC-MS para la identificación y cuantificación de escopolamina.	56
<b>Tabla 8</b>	Composición química de la fragancia de las flores, extraída por HS-SPME, utilizando el recubrimiento de la fibra PDMS.	58
<b>Tabla 9</b>	Composición química de la fragancia de las flores, extraída por HS-SPME, utilizando el recubrimiento de la fibra PDMS/DVB.	59
<b>Tabla 10</b>	Composición química de la fragancia de las flores, extraída con la fibra SPME con el recubrimiento de PDMS/DVB, a diferentes horas del día.	64
<b>Tabla 11</b>	Cantidad relativa por familias de compuestos de la fragancia de las flores de <i>B. suaveolens</i> , en función del tiempo de muestreo.	70
<b>Tabla 12</b>	Composición química de la fragancia <i>in vivo</i> de flores de la <i>B. suaveolens</i> , obtenida por HS-SPME-GC-MS a las 9 p.m.	80

## LISTA DE FIGURAS

		pág.
<b>Figura 1</b>	Flores de <i>Brugmansia suaveolens</i> .	19
<b>Figura 2</b>	Estructura química del isopreno e isopentano.	23
<b>Figura 3</b>	Esquema general de la biosíntesis de algunos metabolitos secundarios (alcaloides y terpenos).	25
<b>Figura 4</b>	Estructuras químicas básicas de algunos alcaloides.	27
<b>Figura 5</b>	Estructuras químicas de la escopolamina e hiosciamina.	28
<b>Figura 6</b>	Esquema general de la biosíntesis de la escopolamina.	29
<b>Figura 7</b>	Dispositivo de SPME.	32
<b>Figura 8</b>	Modos de extracción por SPME.	33
<b>Figura 9</b>	Técnicas de derivación por SPME.	36
<b>Figura 10</b>	Reacción de derivatización de compuestos carbonílicos con la PFPH.	38
<b>Figura 11</b>	Muestreo por HS-SPME de los componentes volátiles de las flores de <i>B. suaveolens</i> .	43
<b>Figura 12</b>	Muestreo <i>in vivo</i> de la fragancia de flores de la <i>B. suaveolens</i> .	45
<b>Figura 13</b>	Derivatización <i>in situ</i> con PFPH de los compuestos carbonílicos, presentes en la fragancia de flores de <i>B. suaveolens</i> , usando HS-SPME.	47
<b>Figura 14</b>	Esquema del extractor Soxhlet de alta presión.	50
<b>Figura 15</b>	Variación del área cromatográfica total de los volátiles presentes en la fragancia, de acuerdo con la fibra empleada y diferentes horas del día.	60

<b>Figura 16</b>	Perfiles cromatográficos obtenidos por HS-SPME de la fragancia a la 9 p.m.	62
<b>Figura 17</b>	Cromatogramas típicos obtenidos por HS-SPME-GC-MS de la fragancia de flores de <i>B. suaveolens</i> , a diferentes horas del día.	65
<b>Figura 18</b>	Variación del área cromatográfica total de los volátiles presentes en la fragancia a diferentes horas del día.	66
<b>Figura 19</b>	Variación por familias de compuestos de la composición química de la fragancia de flores de <i>B. suaveolens</i> , a diferentes horas.	68
<b>Figura 20</b>	Estructuras químicas de los metabolitos secundarios volátiles extraídos de la fragancia de las flores de <i>B. suaveolens</i> .	70
<b>Figura 21</b>	Espectro de masas y patrón de fragmentación del $\beta$ -mirceno.	72
<b>Figura 22</b>	Espectro de masas y patrón de fragmentación del geraniol.	74
<b>Figura 23</b>	Espectro de masas y patrón de fragmentación del benzoato de bencilo.	75
<b>Figura 24</b>	Espectro de masas y patrón de fragmentación del alcohol bencílico.	77
<b>Figura 25</b>	Espectro de masas y patrón de fragmentación del indol.	78
<b>Figura 26</b>	Cromatogramas típicos obtenidos por HS-SPME de la fragancia de flores de <i>B. suaveolens</i> ; A. Muestreo <i>in vivo</i> y B. Muestreo de la flor recolectada.	81
<b>Figura 27</b>	Perfiles cromatográficos de los derivados hidrazónicos de compuestos carbonílicos, en la fragancia de las flores de <i>B. suaveolens</i> .	83
<b>Figura 28</b>	Perfiles cromatográficos de los extractos aislados por SFE de flores de <i>B. suaveolens</i> .	85
<b>Figura 29</b>	Perfiles cromatográficos de los extractos obtenidos por LLE-B, de diferentes partes de la planta <i>B. suaveolens</i> .	87

<b>Figura 30</b>	Espectros de masas de la escopolamina y la cocaína .	88
<b>Figura 31</b>	Cantidad de la escopolamina encontrada en diferentes partes de la <i>B. suaveolens</i> .	90

## ABREVIATURAS

CW/DVB	<i>Carbowax</i> /poli(divinilbenceno)
D-HS	<i>Headspace</i> dinámico
DMAPP	Difosfato de dimetilalilo
ECD	Detector de captura de electrones
FID	Detector de ionización en llama
GC	Cromatografía de gases
GC-ECD	Cromatógrafo de gases con detector de captura de electrones
GC-MS	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
HD	Hidrodestilación
HD-MW	Hidrodestilación asistida por la radiación de microondas
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficiencia
HS-SPME	Microextracción en fase sólida en modo <i>headspace</i>
IPP	Difosfato de isopentenilo
Istd	Patrón interno
LC	Cromatografía líquida
LLE-B	Extracción líquido-líquido por lotes
M <sup>+</sup>	Ion molecular
MEP	Metileritritol fosfato
MS	Espectro de masas o espectrometría de masas
MSD	Detector selectivo de masas

PA	Poli(acrilato)
PDMS	Poli(dimetilsiloxano)
PDMS/DVB	Poli(dimetilsiloxano)/poli(divinilbenceno)
PFPH	Pentafluorfenilhidracina
SDE	Destilación-extracción simultánea
SFE	Extracción con fluido supercrítico
S-HS	<i>Headspace</i> estático
SIM	Monitoreo del ion(es) seleccionado(s)
SPME	Microextracción en fase sólida

## Resumen

### TITULO: ESTUDIO DE LA VARIACIÓN COMPOSICIONAL DE LA FRAGANCIA DE LAS FLORES DE *B. suaveolens* DURANTE EL DÍA Y LA NOCHE\*

**Autor:** José Luis Molina\*\*

**Palabras claves:** *Brugmansia suaveolens*, fragancia, microextracción en fase sólida (SPME), terpenos.

Varias especies de plantas del género *Brugmansia* se caracterizan por una fragancia fuerte y agradable de sus flores, especialmente, durante la noche. Estas fragancias pueden ser estudiadas y aplicadas en la industria de perfumes y/o aromas en alimentos, por lo cual estos recursos naturales pueden ser fuente de desarrollo en regiones ricas en plantas aromáticas no explotadas. En la presente investigación, se determinó la composición de la fragancia de las flores de *B. suaveolens* y su perfil a diferentes horas en el día y la noche.

El aislamiento de los componentes en la fragancia se llevó a cabo mediante la SPME en el modo *headspace* (HS-SPME). Esta técnica libre de solvente, se basa en la retención de los compuestos de interés en un recubrimiento polimérico. La identificación de los componentes se realizó con base en el análisis de los espectros de masas e índices de retención de Kováts obtenidos experimentalmente en un cromatógrafo de gases acoplado a un detector selectivo de masas.

Se detectaron un total de 35 compuestos en los diferentes extractos obtenidos por HS-SPME de la fragancia de las flores, a diferentes horas del día. Los componentes mayoritarios presentes en la fragancia de las flores de *B. suaveolens*, correspondieron al *trans*- $\beta$ -ocimeno y 1,8-cineol (eucaliptol). Se determinó la fragancia como una fracción volátil rica en hidrocarburos monoterpénicos (47-56%), para todos los muestreos, seguido de los monoterpénos oxigenados (27-36%) y bencenoides (10-19%). En una cantidad relativamente más baja, estuvieron los compuestos oxigenados alifáticos (0,3-1,3%), *i.e.* hexanal, hexanol, nonanal y decanal. La fragancia intensa, con mayor número de volátiles y la presencia de indol, benzoato y salicilato de bencilo, fue encontrada durante la noche o en momentos cuando la intensidad solar era mínima.

---

\* Trabajo de grado

\*\* Universidad Industrial de Santander, Facultad de Ciencias, Escuela de Química.  
Directora, Elena E. Stashenko.

## Abstract

**TITLE: STUDY OF VARIATION COMPOSICIONAL OF THE FLOWERS FRAGRANCE OF *B. suaveolens* DURING THE DAY AND THE NIGHT \***

**Author:** Jose Luis Molina\*\*

**Key words:** *Brugmansia suaveolens*, fragrance, solid phase microextraction (SPME), terpenoids.

Several species of plants of the *Brugmansia* genus are characterized by a strong and pleasant fragrance of their flowers, specially, during the night. These fragrances can be studied and applied in the industry of perfumes and/or food aromas, thus these natural resources can be source of development in rich regions in aromatic plants. In the present investigation, was determined the composition of the flowers fragrance of *B. suaveolens* and its profile to different hours in the day and the night.

The isolation of the components in the fragrance was carried out by means of the SPME in the headspace mode (HS-SPME). This free technique of solvent is based on the retention of compounds of interest in a coated polymeric. The identification of the components was made with base in the analysis of the mass spectrum and Kováts retention indexes obtained experimentally in a GC-MS.

A total of 35 compounds were detected from different extracts obtained by HS-SPME of the flowers fragrance, to different hours from the day. The majority components present in the flowers fragrance of *B. suaveolens*, corresponded to the trans- $\beta$ -ocimene and 1,8-cineol (eucalyptol). The fragrance was a rich volatile fraction in monoterpenes hydrocarbons (47-56%), for all the samplings, followed of the oxygenated monoterpenes (27-36%) and benzenoids (10-19%). In an amount relatively more loss, was the aliphatic oxygenated compounds (0,3-1,3%), i.e. hexanal, hexanol, nonanal and decanal. The intense fragrance, with greater number of volatile and the presence of indole, benzyl benzoate and benzyl salicylate, was found during the night or at moments when the solar intensity was minimum.

---

\* Trabajo de grado

\*\* Universidad Industrial de Santander, Facultad de Ciencias, Escuela de Química.  
Directora, Elena E. Stashenko.

## INTRODUCCIÓN

La familia Solanaceae está compuesta por más de 2600 especies de plantas distribuidas en la mayoría de las regiones del planeta, especialmente, en la zona tropical. Esta familia es una de las más importantes de la flora colombiana debido a su riqueza en plantas comestibles y alcaloides [1,2].

En la familia de plantas Solanaceae, se encuentran el género *Brugmansia*, junto con otros como *Datura*, *Atropa*, *Hyoscyamus*, *Mandragora*, *Scopolia* y *Duboisia*, que representan las principales fuentes naturales de alcaloides tropánicos, *i.e.* atropina y escopolamina [3-5].

Varias especies del género *Brugmansia*, debido a sus efectos narcóticos y alucinógenos, han sido utilizadas desde tiempos remotos por grupos indígenas de diferentes regiones, en rituales o ceremonias, en las cuales diferentes partes de la planta son ingeridas en forma de infusiones o pulverizadas [1,4].

Actualmente se aprovechan especies como la *Brugmansia sanguinea*, por su alto contenido en alcaloides del tipo tropano, utilizados en el tratamiento de náuseas, vómitos, en procedimientos oftalmológicos y para combatir algunas manifestaciones del mal de Parkinson [1,4,6].

Sin embargo, algunas especies como *B. candida*, *B. sanguinea* y *B. suaveolens*, se caracterizan por la fragancia fuerte y agradable de sus flores, especialmente, durante la noche. Se estima que una exposición prolongada a la fragancia de las flores de estas especies, puede causar dolor de cabeza, trastornos y algunos desequilibrios mentales [1,4].

Varios componentes volátiles presentes en estas fragancias son agradables al olfato, por lo que pueden tener alguna aplicación potencial como componentes de perfumes o en la industria de alimentos, dando posibilidad, al desarrollo de regiones con una alta riqueza en plantas aromáticas.

Con el crecimiento de la población humana y así el exterminio progresivo de varias especies vegetales, es necesario el estudio de las plantas autóctonas utilizadas popularmente en diferentes regiones con fines medicinales o religiosos, con el propósito de caracterizar, aislar y sintetizar nuevos compuestos aplicables a la industria de aromas o farmacéutica.

En la presente investigación, se realizó el análisis de los componentes volátiles presentes en la fragancia emitida por las flores de la especie *Brugmansia suaveolens* y su perfil a diferentes horas, durante el día y la noche, con el propósito de plantear posibles aplicaciones, especialmente, en la industria de las fragancias.

Para llevar a cabo este estudio, se utilizó la microextracción en fase sólida en el modo *headspace* (HS-SPME), la cual posee varias ventajas sobre otras técnicas comúnmente utilizadas en estos tipos de estudios, *i.e.* destilación-extracción simultánea (SDE) y *headspace* dinámico (D-HS), al requerir menores cantidades de muestra, prescindir del uso de solventes y cortos tiempos de muestreo, y otras.

Adicionalmente, la HS-SPME, permite realizar el monitoreo de la fragancia *in vivo* (directamente en la flor viva), obteniendo un perfil más cercano al emitido por la flor, evitando en lo posible, la alteración de la fragancia a causa del deterioro de la planta después de su recolección. Para la separación e identificación de cada uno de los componentes volátiles presentes en la fragancia, se utilizó la cromatografía de gases acoplada al detector selectivo de masas (GC-MS), estableciendo la identidad de cada uno de los volátiles, con base en los espectros de masas obtenidos.

Los resultados obtenidos a lo largo de la investigación, fueron presentados en modalidad de póster, en los siguientes eventos: 25<sup>th</sup> INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON CHROMATOGRAPHY, Octubre 4-8, 2004, Paris-Francia; XIII Congreso Colombiano de Química, Octubre 15-17, 2004, Cartagena-Colombia; X CONGRESO LATINIAMERICANO DE CROMATOGRAFÍA Y TÉCNICAS AFINES, Octubre 18-22, 2004, Campos do Jordao-Brasil y THE 8<sup>th</sup> CONFERENCE OF THE ISRAEL ANALYTICAL CHEMISTRY SOCIETY, Enero 11-12, 2005, Tel Aviv-Israel.

## 1. ESTADO DEL ARTE

### 1.1 FAMILIA SOLANACEAE

La familia Solanaceae posee cerca de 90 géneros y más de 2600 especies, que se encuentran en diferentes regiones del planeta, principalmente, en Australia, América Central y del Sur. Muchas de estas especies son de interés económico, como cultivos industriales (tabaco, *Nicotiana tabacum*), medicinales (*Atropa belladonna*, *Brugmansia sanguinea*) y, especialmente, como cultivos hortícolas, entre los cuales figuran varios de importancia mundial como la papa, el tomate, pimiento, ají, berenjena, entre otros [1,2].

### 1.2 GÉNERO *BRUGMANSIA*

En América del Sur son varias las especies botánicas del género *Brugmansia* usadas por sus efectos psicoactivos, en actividades terapéuticas y religiosas por grupos indígenas nativos como los Chibchas, Kamsas, Sionas, Kofanes de Colombia y los Quechuas de Bolivia y Ecuador, entre otros. De acuerdo con la especie, este género tiene nombres comunes como: borrachero, floripondio, chamico y cacao sabanero [1,4,7].

Los efectos narcóticos y alucinógenos de las plantas del género *Brugmansia*, se deben principalmente al contenido de alcaloides tropánicos como la escopolamina y la atropina, presentes en las diferentes partes de la planta, especialmente, en hojas, flores y semillas. Puede presentarse una fuerte intoxicación por un consumo inadecuado de cualquiera de estas partes, por lo cual este género, junto con otros, como *Atropa*, fueron considerados como especies venenosas y motivo de desconfianza por muchos años [3,6].

A través de la historia, las plantas de este género se utilizaron en el tratamiento de enfermedades mentales, bronquitis, asma y de aplicación externa para quemaduras, inflamaciones y dolores reumáticos. Desde el siglo XX, varios alcaloides presentes en estas plantas se usan terapéuticamente, *i.e.* la escopolamina ha sido empleada en procedimientos oftalmológicos para causar midriasis prolongando la dilatación de la pupila, está indicada en el tratamiento de náuseas y vómitos, como sedante y fármaco preanestésico y en el tratamiento de algunas manifestaciones del mal de Parkinson [6,8].

**1.2.1 *Brugmansia suaveolens*.** Esta especie es un arbusto de 2-4 m de altura, muy ramificado en la parte superior, sus tallos son blandos, posee hojas de forma elíptica – ovadas y base asimétrica, sus flores 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.

La infusión de las hojas de esta especie se emplea como bebida narcótica por los indígenas Kofanes de Ecuador y Colombia. La *B. suaveolens* se encuentra distribuida en Colombia principalmente, en los departamentos de Antioquia, Nariño, Valle, Amazonas, Putumayo y Santander; en este último, en los municipios de Piedecuesta y en la Mesa de los Santos [1].

**Figura 1.** Flores de *Brugmansia suaveolens*.



Los estudios realizados para las diferentes especies del género *Brugmansia* y *Datura*, i.e. *candida*, *sanguinea*, *metel* e *indiana*, han sido relacionados con la formación, distribución y cantidad de alcaloides del tipo tropano, presentes en las diferentes partes de la planta como raíces, hojas y semillas. Es de resaltar, que la

cantidad de alcaloides presente en la planta, varía de una especie a otra y depende de las condiciones como cantidad y tipo de nutrientes en el suelo de cultivo, intensidad de luz, presencia de plagas, hidratación de la planta, entre otras [4,9-15].

La técnica de extracción de alcaloides empleada comúnmente, es la extracción con solventes orgánicos a pH básico (8.5), de los extractos acuosos de las diferentes partes de la planta. Entre los solventes orgánicos se encuentran: cloroformo y la mezcla de diclorometano-hidróxido de amonio (30:2). Adicionalmente, se han utilizado el dióxido de carbono junto con modificadores como metanol e hidróxido de amonio, en la extracción con fluido supercrítico (SFE) [9,11,13,16].

El estudio de los componentes volátiles presentes en flores, hojas u otras partes de las plantas del género *Brugmansia* y *Datura*, no ha sido tan exhaustivo como el de alcaloides. En el estudio de la fragancia de estas plantas, se han analizado los volátiles extraídos por la destilación con vapor de las hojas de *B. suaveolens* y el concreto (extracto de *n*-hexano) de las flores de *B. candida*. Los volátiles de las hojas corresponden generalmente a compuestos sesquiterpenos. En el concreto, se identificaron varios componentes, *i.e.* 4-metil-4-vinil- $\gamma$ -butirolactona, *trans*- $\alpha$ -irona, la 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona y 3,4-dimetil hexanona, entre otros [17,18].

En otro estudio [19], el análisis de los volátiles emitidos por las flores de *B. candida*, se realizó con el propósito de evaluar los posibles agentes tóxicos presentes en la fragancia, causantes de algunos trastornos mentales. La recolección de los volátiles de la flor, se realizó del *headspace* de la planta, usando una fase adsorbente (Tenax) y luego la desorción térmica de volátiles para analizarlos por GC-MS. Se encontraron varios terpenos y bencenoides, *i.e.*  $\alpha$ -terpineol, hidrato de *trans*-sabineno, alcohol  $\beta$ -feniletílico, benzaldehído, benzoato de metilo y otros, junto con el indol como un componente minoritario. Los componentes mayoritarios fueron el *trans*-ocimeno (38-52%) y 1,8-cineol (5-19%).

### 1.3 FRAGANCIA DE LAS FLORES

Los productos o “**metabolitos secundarios**” de las plantas comprenden una vasta serie de compuestos responsables por los “olores característicos” y colores de las plantas; también “proporcionan” a la planta sus propiedades culinarias, medicinales o venenosas. Estos productos naturales, no parecen tener una función directa o aún completamente definida en varios procesos del metabolismo primario, *i.e.* la fotosíntesis, respiración, en la asimilación y transporte de nutrientes, entre otros; y, a diferencia de los metabolitos primarios (aminoácidos, nucleótidos, carbohidratos, lípidos), su distribución es restringida en la naturaleza, en algunos casos, se limita a especies o subespecies únicas [5,20-22].

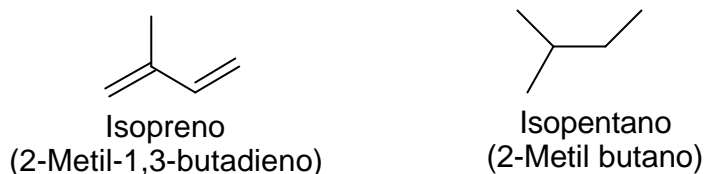
Tanto el color, como la fragancia de las flores, son las principales señales para atraer a los insectos polinizadores. Estos compuestos volátiles, constituyentes de la fragancia, permiten a los insectos reconocer específicamente la planta y acceder al polen y néctar, una fuente importante de alimento para muchos insectos, que se alimentan de las flores [5,23].

Entre los componentes que se encuentran en las fragancias de las flores están: alcoholes, ésteres, compuestos carbonílicos, éteres y terpenos; estos últimos son los que se encuentran principalmente, en la mayoría de los aceites esenciales y fragancias de muchas especies de plantas aromáticas [5,20].

#### **1.4 TERPENOS**

Estos compuestos comprenden el grupo más grande de productos naturales de las plantas. Todos son derivados del isopreno o del isopentano, un precursor de cinco carbonos. El isopreno es producido naturalmente, pero no está relacionado con la biosíntesis de terpenos en las plantas. Sin embargo, el conocimiento del isopreno como un componente de la estructura de los terpenos y de la unión de dos o más unidades isoprénicas, ha servido para la elucidación de sus estructuras. [21,22,24].

**Figura 2.** Estructura química del isopreno e isopentano.



De acuerdo con el número de unidades isoprénicas condensadas, se obtienen los monoterpenos, sesquiterpenos y derivados de mayor tamaño. En la **Tabla 1**, se muestra la clasificación de los terpenos según las unidades de isopreno constituyentes. Con base en su fórmula estructural, los terpenos se pueden clasificar como acíclicos y cíclicos, estos últimos, por su gran diversidad, pueden subdividirse en monocíclicos, bicíclicos y de aún mayor complejidad [21,22,24].

**Tabla 1.** Clasificación de los terpenos de acuerdo con el número de unidades isoprénicas condensadas.

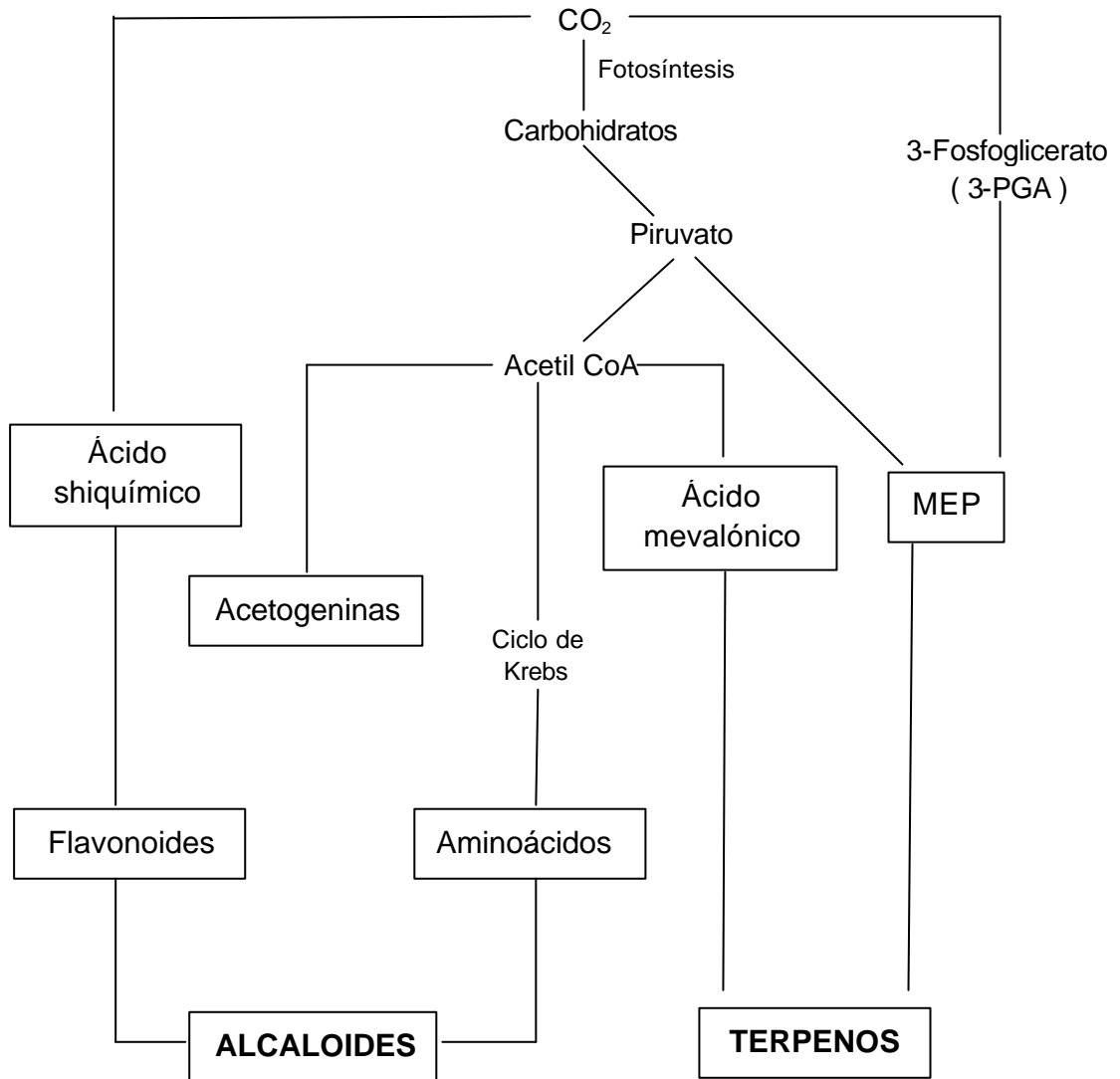
Unidades de isopreno	Fórmula química	Nombre o clase
1	$C_5H_8$	Isopreno
2	$C_{10}H_{16}$	Monoterpenos
3	$C_{15}H_{24}$	Sesquiterpenos
4	$C_{20}H_{32}$	Diterpenos
6	$C_{30}H_{48}$	Triterpenos
8	$C_{40}H_{64}$	Tetraterpenos

**1.4.1 Biosíntesis de los terpenos.** Los terpenos son sintetizados a partir de metabolitos primarios mediante dos mecanismos. Uno, de los mejores estudiados, es el del ácido mevalónico, donde tres moléculas de acetil-coenzima A se unen para formar este ácido, un intermediario de seis carbonos, que sufre una serie de reacciones comenzando con la fosforilación del grupo del alcohol primario, seguido de la descarboxilación y deshidratación, para formar el difosfato de isopentenilo (IPP) el cual es convertido, enzimáticamente, en difosfato de dimetilalilo (DMAPP) estableciendo un equilibrio entre los dos. Estos productos son punto de partida para la síntesis de terpenos.

En otros estudios, se descubrió que el IPP también puede ser sintetizado a partir de intermediarios de la glicólisis u otras reacciones fotosintéticas y, en conjunto, formar la ruta del metileritritol fosfato (MEP), la cual ocurre en cloroplastos y otros plástidos. En esta ruta, el 3-fosfato gliceraldehído y dos átomos de carbono derivados del piruvato, se combinan para generar el intermediario MEP, el cual es eventualmente convertido al IPP y DMAPP [21,25].

En la **Figura 3**, se muestra un esquema general de la síntesis de algunos metabolitos secundarios.

**Figura 3.** Esquema general de la biosíntesis de algunos metabolitos secundarios (alcaloides y terpenos) [21,25].



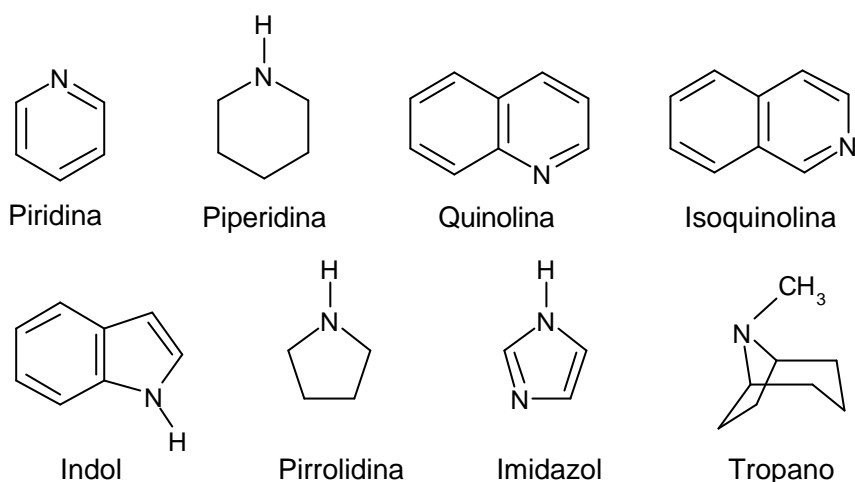
## 1.5 ALCALOIDES

Es difícil dar una definición precisa al término “alcaloide”, debido a que estas moléculas no representan un grupo homogéneo de compuestos desde el punto de vista químico, bioquímico y fisiológico. Los alcaloides típicos son de origen vegetal, contienen uno o más átomos de nitrógeno, típicamente como aminas primarias, secundarias y terciarias (generalmente, heterocíclicos); además, suelen poseer una marcada acción fisiológica en el ser humano y otros animales. Varios compuestos nitrogenados derivados de bacterias, hongos y animales, también son considerados como alcaloides [5,20-22,25,26].

La mayoría de los alcaloides son sustancias cristalinas que poseen propiedades básicas por la presencia de nitrógeno en sus estructuras. En las plantas pueden existir en forma libre, en estado de sales, o como N-óxidos [5,22,24].

Los alcaloides muestran una gran variedad en su origen botánico y bioquímico, así como en su estructura química y su acción farmacológica; por lo tanto, existen diversas formas de clasificarlos. La forma común de hacerlo es con base en la estructura química a partir de la cual se derivan [5,22]. En la **Figura 4**, aparecen las principales estructuras químicas encontradas en los diferentes tipos de alcaloides.

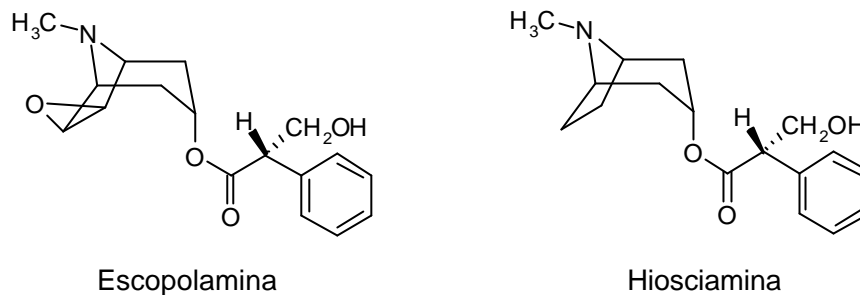
**Figura 4.** Estructuras químicas básicas de algunos alcaloides.



**1.5.1 Escopolamina.** Este alcaloide heterocíclico del tipo tropano, se encuentra en las plantas de la familia Solanaceae, principalmente, en los géneros *Datura*, *Atropa*, *Hyoscyamus*, *Mandragora*, *Scopolia* y *Duboisia*, siendo el primero y el último, las dos principales fuentes de escopolamina y su enantiómero hioscina. Puede ser preparado en el laboratorio a partir de varios precursores. El alcaloide fue aislado por primera vez en 1892 de una *Scopolia*, de ahí, proviene su nombre [3,5,27].

Este alcaloide es un éster orgánico formado por la combinación de un ácido aromático, el ácido trópico, y una base orgánica compleja, la escopina. Se puede establecer la presencia de un carbono quiral en la parte ácida de la molécula, dando así una mezcla de dos enantiómeros, la *l*-hioscina (escopolamina), que es mucho más activa que la *d*-hioscina [3,8,25]. En la **Figura 5** aparecen las estructuras químicas de los dos alcaloides, *i.e.* escopolamina e hiosciamina.

**Figura 5.** Estructuras químicas de la escopolamina e hiosciamina.

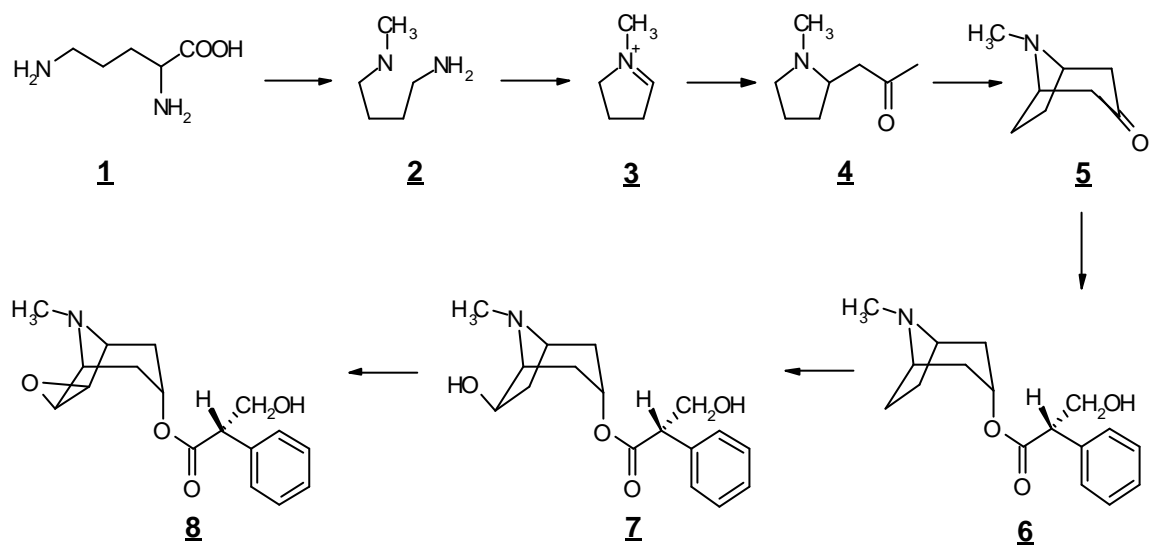


**1.5.2 Biosíntesis de la escopolamina.** Los sitios de síntesis y acumulación de la escopolamina, pueden diferir entre las plantas de un mismo género. En general, la escopolamina es sintetizada en las raíces y acumulada en diferentes partes de la planta sobre el nivel del suelo; cabe resaltar, que la reacción es regulada por varias enzimas en la planta [3].

La biosíntesis comienza con la descarboxilación de la ornitina (1) para obtener putrecina, la cual es metilada a Nmetil putrecina (2). La desaminación oxidativa de esta última, da lugar a la formación del catión N-metil- $\Delta^1$ -pirrolinio (3), bloque fundamental en la obtención de alcaloides tropanos. El catión formado es convertido a higrina (4), la cual reacciona con acetil-CoA, para dar lugar a la tropinona (5). La reducción enzimática del grupo carbonilo produce tropina, cuya esterificación con el ácido feniláctico produce hiosciamina (6).

Finalmente, la conversión a escopolamina es catalizada enzimáticamente, donde un grupo hidroxilo se adiciona en la posición 7 $\beta$  a la hiosciamina (**7**), cuya oxidación permite la formación del epóxido, entre los carbonos 6 $\beta$  y 7 $\beta$ , obteniendo la escopolamina (**8**) [25,28-32].

**Figura 6.** Esquema general de la biosíntesis de la escopolamina.



## 1.6 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN

La extracción con solventes orgánicos es uno de los métodos más aplicados a matrices sólidas para el aislamiento de compuestos de interés, *i.e.* alcaloides, presentes en material vegetal. Sin embargo, tiene las desventajas de utilizar cantidades considerables de solventes, generalmente tóxicos, y una baja

selectividad extrayendo una gran variedad de componentes diferentes a los de interés, requiriendo etapas de *clean-up* y concentración, con la posibilidad de pérdida o degradación de analitos volátiles o termoinestables [20,33,34].

**1.6.1 Extracción con fluido supercrítico (SFE).** El dióxido de carbono es el solvente empleado comúnmente en SFE, debido a su bajo costo y riesgo, baja viscosidad, alta velocidad de difusión y volatilidad, permitiendo la concentración de los analitos mediante la evaporación del fluido supercrítico. Otra ventaja son las condiciones (*i.e.* temperatura) y tiempo de extracción, adecuado en el aislamiento de compuestos termoinestables.

El principal problema es la polaridad relativamente baja del dióxido de carbono y la presión alta requerida en el proceso. Sin embargo, el uso de modificadores, *i.e.* metanol, permite la extracción de compuestos de mayor polaridad. Este método de extracción ha sido utilizado especialmente para matrices sólidas, *i.e.* alimentos, plantas, polímeros, suelos, entre otros [33-36].

**Tabla 2.** Propiedades de algunos fluidos supercríticos .

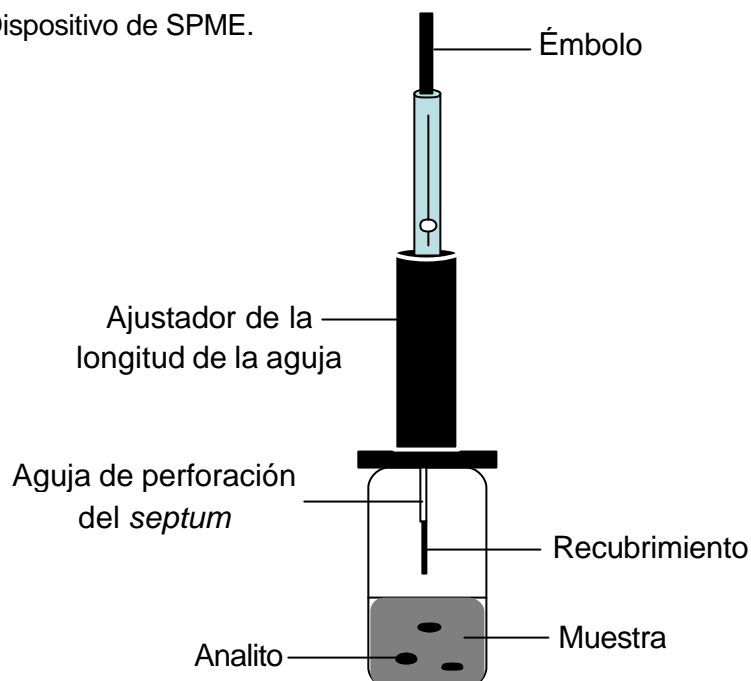
FLUIDO SUPERCRITICO	TEMPERATURA CRÍTICA, T <sub>c</sub> (°C)	PRESION CRITICA, P <sub>c</sub> (atm)	DENSIDAD EN T <sub>c</sub> y P <sub>c</sub> (g/mL)
CO <sub>2</sub>	31,3	72,9	0,47
N <sub>2</sub> O	36,5	71,7	0,45
NH <sub>3</sub>	132,5	112,5	0,24
<i>n</i> -Butano	152,0	37,5	0,23

**1.6.2 Microextracción en fase sólida (SPME).** La SPME fue introducida por Pawliszyn y colaboradores [34], como una técnica de preparación de muestra libre de solvente, donde se utiliza una fase estacionaria depositada sobre una fibra de sílice fundida, como medio de extracción. Este método se basa en la distribución de los analitos entre la matriz y el recubrimiento sobre la fibra. El recubrimiento o fase estacionaria, puede ser un líquido polimérico de alta viscosidad o una fase adsorbente (sólido poroso) [37-39].

La SPME se caracteriza por combinar las etapas de extracción y concentración, con la posterior introducción de la fibra al sistema de separación y análisis, que puede ser llevado a cabo directamente en el puerto de inyección de un cromatógrafo de gases (GC) donde los analitos se desorben térmicamente o son eluidos con un solvente hacia la válvula de inyección de un cromatógrafo líquido (LC) [39,40] En la **Figura 7**, se muestra el dispositivo de SPME.

En la actualidad, se encuentran disponibles varios recubrimientos o fases estacionarias, diferentes en polaridad y espesor, para la SPME. Los parámetros tomados en cuenta para la selección del recubrimiento, generalmente, son la polaridad y la volatilidad de las especies químicas bajo estudio. En la **Tabla 3**, aparecen algunos de los recubrimientos disponibles en el mercado y el tipo de compuestos a los cuales pueden ser aplicados [39,41].

**Figura 7.** Dispositivo de SPME.



**Tabla 3.** Composición y características de los recubrimientos de fibra utilizados en SPME.

Recubrimiento	Espesor, $\mu\text{m}$	Polaridad	Aplicaciones
PDMS <sup>a</sup>	100	Apolar	Volátiles
PDMS	30	Apolar	Semivolátiles apolares
PDMS	7	Apolar	Volátiles y semivolátiles de alto peso molecular
PA <sup>b</sup>	85	Polar	Volátiles y semivolátiles polares
PDMS / DVB <sup>c</sup>	65	Bipolar	Volátiles y compuestos nitroaromáticos
CW / DVB <sup>d</sup>	65	Polar	Alcoholes y compuestos polares

a : Poli(dimetilsiloxano)

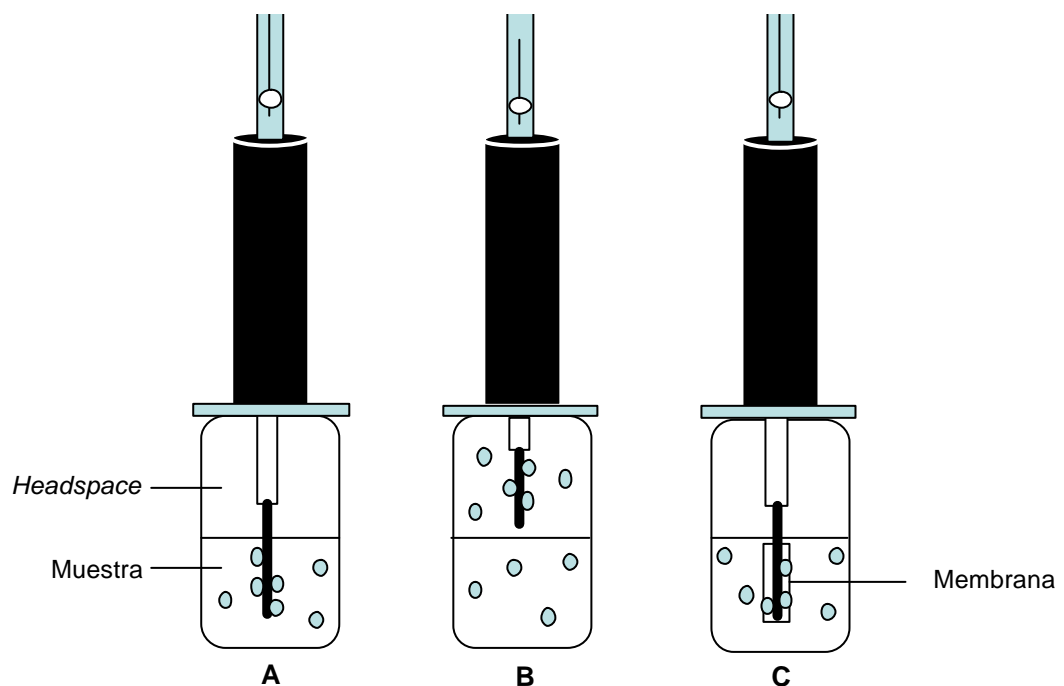
b : Poli(acrilato)

c : Poli(dimetilsiloxano) / poli(divinilbenceno)

d : Carbowax / poli(divinilbenceno)

El proceso de extracción por SPME puede ser desarrollado en tres modos básicos, a saber: extracción directa, extracción en el *headspace* y extracción con membrana protectora. En el modo de extracción directa, la fibra recubierta es insertada dentro de la muestra y los analitos son transportados directamente de la matriz al recubrimiento. En el modo *headspace*, los analitos son extraídos de la fase vapor, que se encuentra en equilibrio con la muestra (fase condensada). En el tercer modo, con la membrana protectora, la fibra es separada de la muestra por una membrana selectiva, la cual permite que los analitos de peso molecular más bajo pasen al recubrimiento, impidiendo el paso de compuestos de mayor tamaño, e.g. proteínas o materiales suspendidos, que puedan deteriorar la fase estacionaria de la fibra [39,41].

**Figura 8.** Modos de extracción por SPME: **A.** Directa; **B.** *Headspace* y **C.** con membrana [39,41].



Si los componentes de interés en una muestra sólida son volátiles, *i.e.* la fragancia de las flores, el método de estudio empleado consiste en analizar los volátiles en el *headspace* sobre la matriz, ya sea tomando una muestra gaseosa directamente o reteniéndolos en una fase absorbente o adsorbente. Los métodos *headspace* utilizados comúnmente en estos estudios son *headspace*-estático (S-HS), D-HS y más reciente, la HS-SPME [34,42,43].

Las técnicas de muestreo de la fragancia de flores generalmente son, SDE, SFE, S-HS, D-HS e hidrodestilación convencional (HD) o asistida por radiación de microondas (HD-MW); esta última para la extracción de aceites esenciales; todas estas técnicas han sido aplicadas al estudio de varias plantas aromáticas o medicinales, *i.e.* limonaria (*Cymbopogon citratus*), guaca (*Spilanthes americana*), plantas de la familia Umbelliferae, ylang-ylang (*Cananga odorata*), entre otras. Sin embargo, algunas de las técnicas, mencionadas anteriormente, tienen las desventajas de requerir considerables cantidades de material y tiempos de muestreo muy largos (8-24 horas); otras presentan riesgos de contaminación de la muestra, pérdida de los componentes volátiles durante la etapa de concentración y la baja selectividad en la extracción [23,44-47].

Recientemente, la HS-SPME se ha utilizado, con diferentes recubrimientos, para el estudio de los volátiles presentes en la fragancia de diferentes plantas aromáticas o medicinales, *i.e.* tabaco (*Nicotiana tabacum*), *Michelia alba*, *Rosmarinus officinalis*, *Valeriana officinalis*, *Citrus deliciosa* y otras [23,48-51].

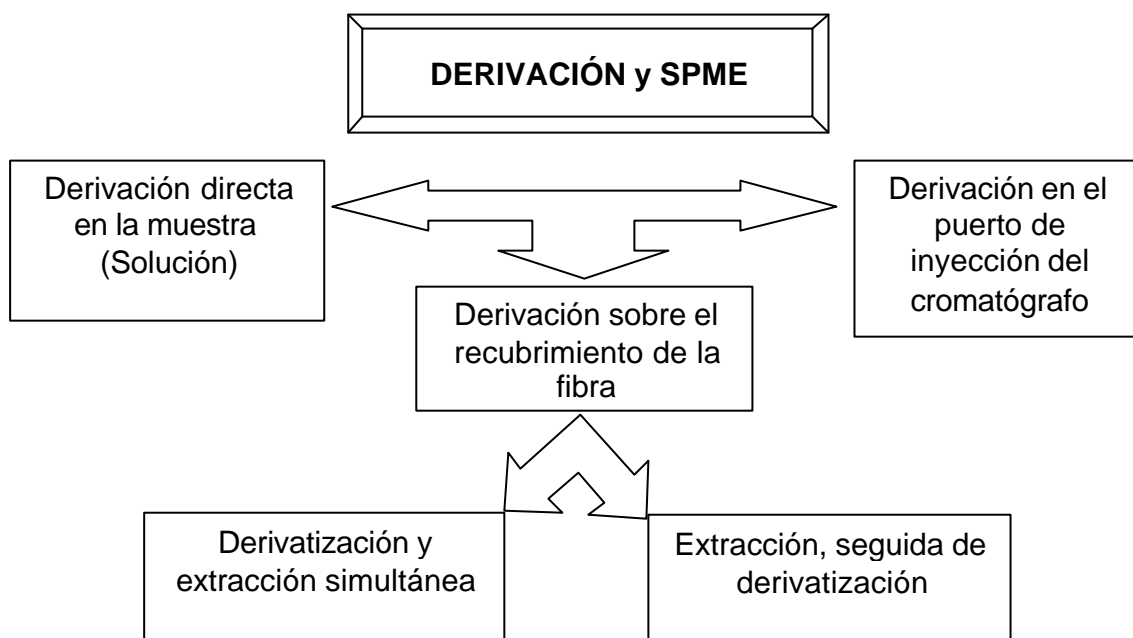
Los resultados de estudios, realizados por HS-SPME, han sido poco comparados con los de las técnicas *headspace* o métodos extractivos tradicionales. Sin embargo, HS-SPME tiene las ventajas de ser un método sencillo y de fácil manejo, libre de solvente, sensible y selectivo gracias a la variedad en polaridad de los recubrimientos, comparado con la baja sensibilidad y selectividad de S-HS y con la degradación o pérdida de volátiles durante la extracción y concentración en SDE y D-HS. Adicionalmente, la SPME requiere cantidades de muestra y tiempos de muestreo más cortos, lo cual puede disminuir la posible formación de artefactos debido al deterioro de la planta [23,34,43,48-51].

## **1.7 DERIVATIZACIÓN QUÍMICA**

La derivatización química consiste en la conversión de un analito, muy volátil, o muy polar, termoinestable, a una forma químicamente diferente a través de una reacción, con el objetivo de obtener derivados compatibles con los sistemas cromatográficos empleados, mejorando la resolución y forma de los picos, y de incrementar la respuesta del detector. Sin embargo, este proceso de conversión involucra una etapa química adicional, que no sólo consume tiempo, sino también puede introducir impurezas o artefactos e incertidumbre acerca de la conversión completa, por lo que se debe tener cuidado cuando se selecciona y se lleva a cabo la derivatización [52,53].

**1.7.1 Derivatización y SPME.** Existen varias técnicas de derivatización que pueden ser implementadas en combinación con SPME, entre las cuales se encuentran la derivatización directa en la muestra, derivatización en el puerto de inyección del cromatógrafo de gases y la derivatización sobre el recubrimiento de la fibra. Estas técnicas son resumidas en la **Figura 9**.

**Figura 9.** Técnicas de derivación por SPME [39].



En la derivatización directa, el agente derivatizante se adiciona primero a la muestra, seguidamente los derivados formados se extraen por SPME y se introducen dentro del instrumento analítico. La derivatización en el inyector del cromatógrafo se lleva a cabo a temperaturas altas directamente en el puerto de inyección, donde se mezclan los reactivos y ocurre la reacción en fase vapor entre el analito y el agente derivatizante.

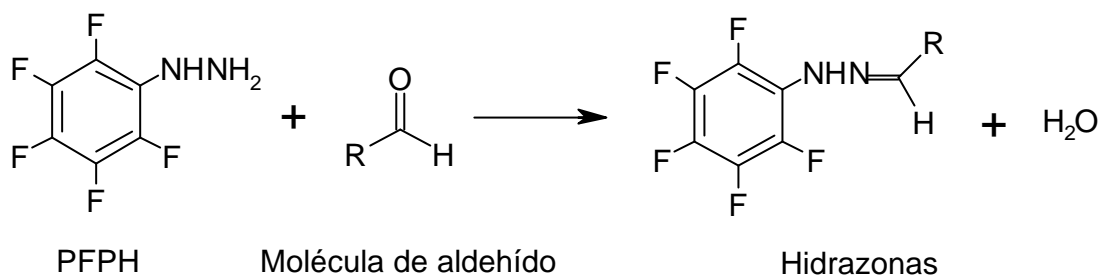
La derivación sobre la fibra se puede llevar a cabo de dos modos: derivación sobre la fibra después de la extracción, donde los analitos se extraen primero por el recubrimiento y posteriormente, se derivan exponiendo la fibra a los vapores del agente derivatizante para luego ser desorbidos en el puerto de inyección del GC. El segundo modo es la extracción y derivatización simultánea, desarrollada sobre la fibra, donde el recubrimiento se enriquece primero con el agente derivatizante y luego se expone a la matriz o a su *headspace*, así los analitos, que son extraídos, se derivatizan directamente sobre el recubrimiento [39,41].

En la fragancia de las flores y aceites esenciales generalmente, se encuentran componentes carbonílicos, algunos como derivados oxigenados de los terpenos; sin embargo, éstos pueden encontrarse a niveles de concentración muy bajos, sin llegar a ser registrados por el sistema de detección convencional (FID, MS) empleado en el análisis. En la actualidad, se han realizado estudios, en los cuales se utilizan métodos rápidos y sensibles para el análisis de compuestos carbonílicos volátiles con base en la SPME con derivatización y extracción simultánea, directamente sobre la fibra [54].

Entre los agentes derivatizantes más empleados en estos métodos, se encuentra la pentafluorfenilhidracina (PFPH). La PFPH es absorbida sobre el recubrimiento polimérico de la fibra, que seguidamente se expone a los vapores (*headspace*) de la muestra; si en éstos están presentes aldehídos, sucede su derivación y las hidrazonas formadas sobre la fibra son desorbidas luego en el puerto de inyección

y analizadas mediante el detector de captura de electrones (ECD), el cual es muy sensible a estos compuestos, que poseen varios grupos (-F) atrayentes de electrones [55,56].

**Figura 10.** Reacción de derivatización de aldehídos con la PFPH.



## 1.8 MÉTODOS DE ANÁLISIS DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS DE *B. suaveolens*

El principal método analítico utilizado para el análisis de componentes volátiles es la cromatografía de gases (GC). La cromatografía es un método de separación en el cual los componentes (analitos) de una muestra se separan, por medio de distribución entre dos fases, una de las cuales es estacionaria (la fase estacionaria), y la otra se mueve en una dirección definida (la fase móvil). La separación se debe a la diferencia en la distribución de los componentes individuales de la muestra, entre las dos fases. La fase estacionaria puede ser un papel (cromatografía en papel), una placa recubierta (cromatografía en capa fina), una columna confinada (cromatografía en columna), empacada con algún

sorbente o una columna capilar con la superficie interna recubierta con un polímero. La fase móvil puede tomar la forma de un líquido (cromatografía líquida, LC) o un gas (cromatografía gaseosa, GC) [35,57].

El sistema de detección e identificación utilizado en la mayoría de los estudios de volátiles en plantas, ha sido el detector selectivo de masas (MS). El acoplamiento de la GC con espectrometría de masas (GC-MS), presenta ventajas en el estudio de los componentes volátiles de fragancias y otras matrices gaseosas, ya que combina la separación e identificación de cada uno de los componentes de la muestra, presentando una alta sensibilidad en comparación con otras técnicas de identificación y cuantificación [48-51,58].

La separación e identificación de los alcaloides tropánicos presentes en extractos acuosos u orgánicos provenientes de plantas, son desarrolladas generalmente mediante técnicas cromatográficas, principalmente, cromatografía en capa fina (TLC), HPLC y, en menor grado, GC [9-11,13,14,16].

## **2. PARTE EXPERIMENTAL**

### **2.1 RECOLECCIÓN DE LAS FLORES DE *B. suaveolens***

Las flores de *B. suaveolens*, fueron recolectadas de un arbusto sembrado en la huerta de estudio, del Laboratorio de Cromatografía de la Universidad Industrial de Santander. Para cada extracción realizada, se utilizaron flores frescas con una fragancia intensa y un deterioro mínimo.

### **2.2 IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DE LA *B. suaveolens***

El material vegetal recolectado se envió al Herbario Nacional Colombiano de la Universidad Nacional de Colombia (Bogotá), donde se realizó la respectiva clasificación botánica. Se confirmó el nombre de *Brugmansia suaveolens*.

### **2.3 EXTRACCIÓN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS POR HS-SPME DURANTE EL DÍA Y LA NOCHE**

Para todos los muestreos realizados en esta etapa, se utilizaron flores con fragancia intensa, recién recolectadas del arbusto, las cuales fueron cortadas en pequeños pedazos. El material se pesó en una balanza analítica *Sartorius Basic* (BA310S) con una precisión de  $\pm 0.001$  g.

Para establecer el tipo de recubrimiento de la fibra del dispositivo de SPME a utilizar en esta etapa, se procedió a realizar la extracción de los componentes volátiles presentes en la fragancia, con dos recubrimientos de la fibra, a saber: PDMS (100  $\mu\text{m}$ ) y PDMS/DVB (65  $\mu\text{m}$ ), suministrados por SUPELCO; seleccionando posteriormente aquella que proporcione una mayor extracción en el número de componentes volátiles de la fragancia floral.

En la **Tabla 4**, se indica la cantidad de material vegetal en cada una de las muestras empleadas en el análisis para cada recubrimiento y la hora en la cual fue realizado el monitoreo. Cada extracción se realizó por duplicado.

**Tabla 4.** Cantidad de material vegetal utilizado para el análisis por HS-SPME, con los dos tipos de fibra.

HORA DEL ANÁLISIS	CANTIDAD DE MATERIAL VEGETAL, g			
	FIBRA PDMS (100 mm)		FIBRA PDMS/DVB (65 mm)	
9 a.m.	Muestreo 1	5,106	Muestreo 1	5,250
	Muestreo 2	5,307	Muestreo 2	4,996
3 p.m.	Muestreo 1	4,900	Muestreo 1	5,343
	Muestreo 2	5,120	Muestreo 2	5,201
9 p.m.	Muestreo 1	4,855	Muestreo 1	5,364
	Muestreo 2	5,218	Muestreo 2	5,146

Seleccionada la fibra a utilizar en el dispositivo de SPME, se realizó la extracción de los metabolitos secundarios de la fragancia de las flores por HS-SPME durante 24 horas, en intervalos de tres horas.

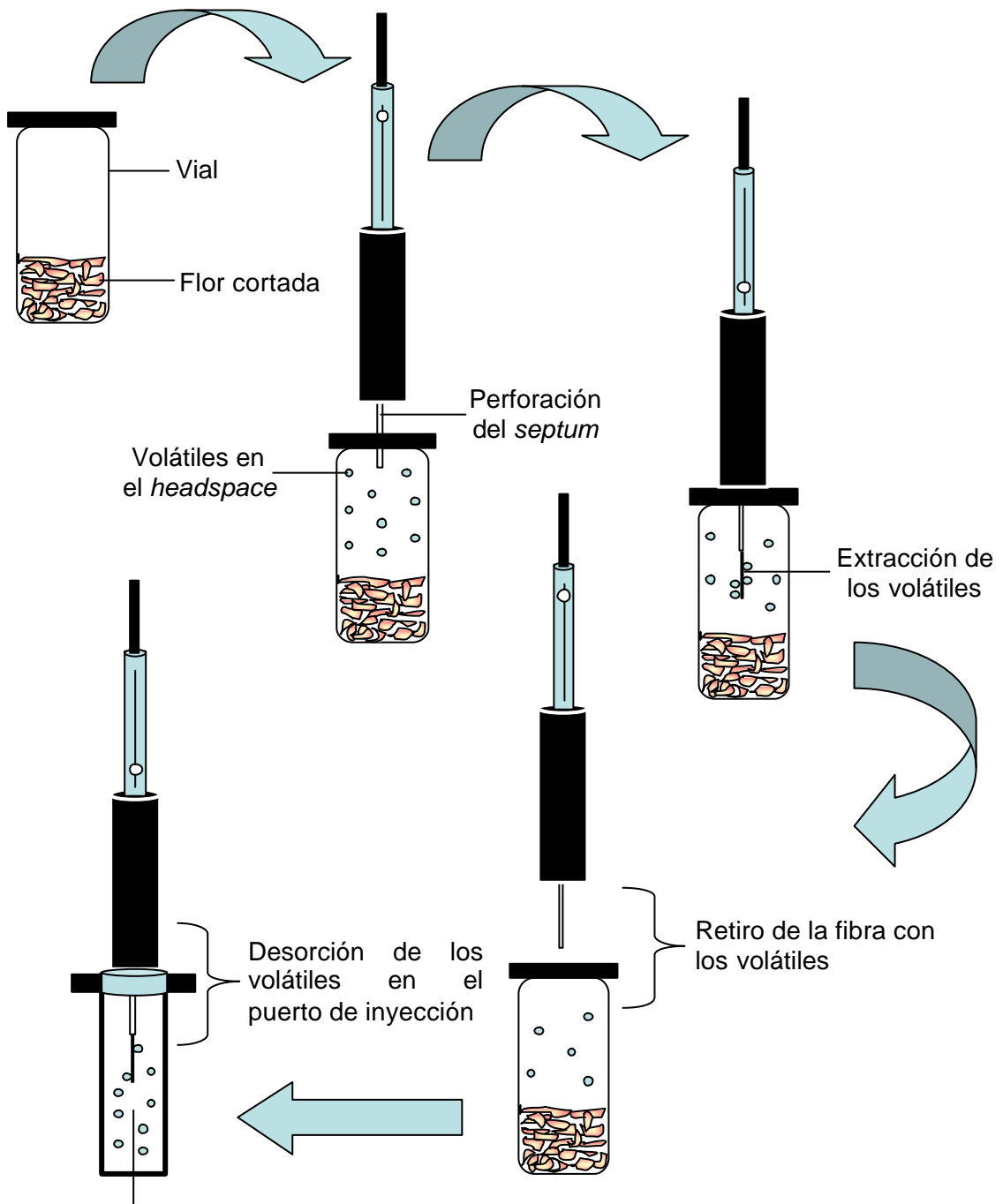
En todos los muestreos anteriores, el procedimiento fue el siguiente: una vez cortada y pesada la flor, ésta se colocó dentro de un vial de 10 mL, el cual fue sellado. Se dejó en todos los casos, un periodo de 10 minutos previo a la extracción de los componentes volátiles.

Transcurrido este tiempo, se procedió a perforar el *septum* del vial con la aguja del dispositivo de SPME y se expuso la fibra para la extracción de los metabolitos secundarios presentes en el *headspace* de la flor, por 30 minutos.

Realizada la extracción, se retiró la fibra para luego ser introducida al cromatógrafo de gases, donde los analitos, en el puerto de inyección, son desorbidos de la fibra térmicamente, para su posterior separación en la columna cromatográfica e identificación con base en sus MS.

La cantidad del material vegetal empleado en el estudio de la fragancia, por 24 horas, fue de  $5.121 \pm 0.25$  g para todos los muestreos.

**Figura 11.** Muestreo por HS-SPME de los componentes volátiles de las flores de *B. suaveolens*.



La identificación tentativa de los componentes volátiles presentes en la fragancia, se realizó mediante la determinación de los índices de retención de Kováts ( $I_K$ ), utilizando una serie de alcanos lineales como un estándar de referencia.

El patrón de  $n$ -hidrocarburos ( $C_{10}$ - $C_{25}$ ) se analizó por GC-MS a las mismas condiciones cromatográficas que los extractos, obtenidos por HS-SPME, con el fin de hallar los  $I_K$  para los componentes volátiles en la fragancia.

A continuación, aparece la fórmula para calcular los  $I_K$ , en un GC con temperatura programada:

$$I_K = 100n + 100 \frac{t_{RX} - t_{Rn}}{t_{RN} - t_{Rn}}$$

Donde:

$I_K$ : es el índice de retención de Kováts;

$n$ : número de átomos de carbono en el  $n$ -alcano que eluye antes del analito X;

$N$ : es el número de átomos de carbono en el  $N$ -alcano que eluye después de X;

$t_{RX}$ : tiempo de retención del analito X;

$t_{Rn}$ : tiempo de retención del  $n$ -alcano;

$t_{RN}$ : tiempo de retención del  $N$ -alcano.

**2.3.1 Extracción por HS-SPME *in vivo* de los metabolitos secundarios de la fragancia.** Con el propósito de evitar posibles alteraciones o cambios en la composición química de la fracción volátil aislada, después de que la flor es recolectada, se realizó también el muestreo de la fragancia de la flor directamente, *in vivo*, a las 9 p.m., cuando el olor era más intenso; se empleó el recubrimiento PDMS/DVB de la fibra.

**Figura 12.** Muestreo *in vivo* de la fragancia de flores de la *B. suaveolens*.



Para realizar el muestreo, se empleó un dispositivo en forma de cilindro, en el cual la flor seleccionada era introducida directamente del arbusto, sin llegar a dañarla. De igual forma, así como se describe en el numeral anterior, se mantuvo un lapso de 10 minutos previo a la extracción, después del cual mediante una abertura se

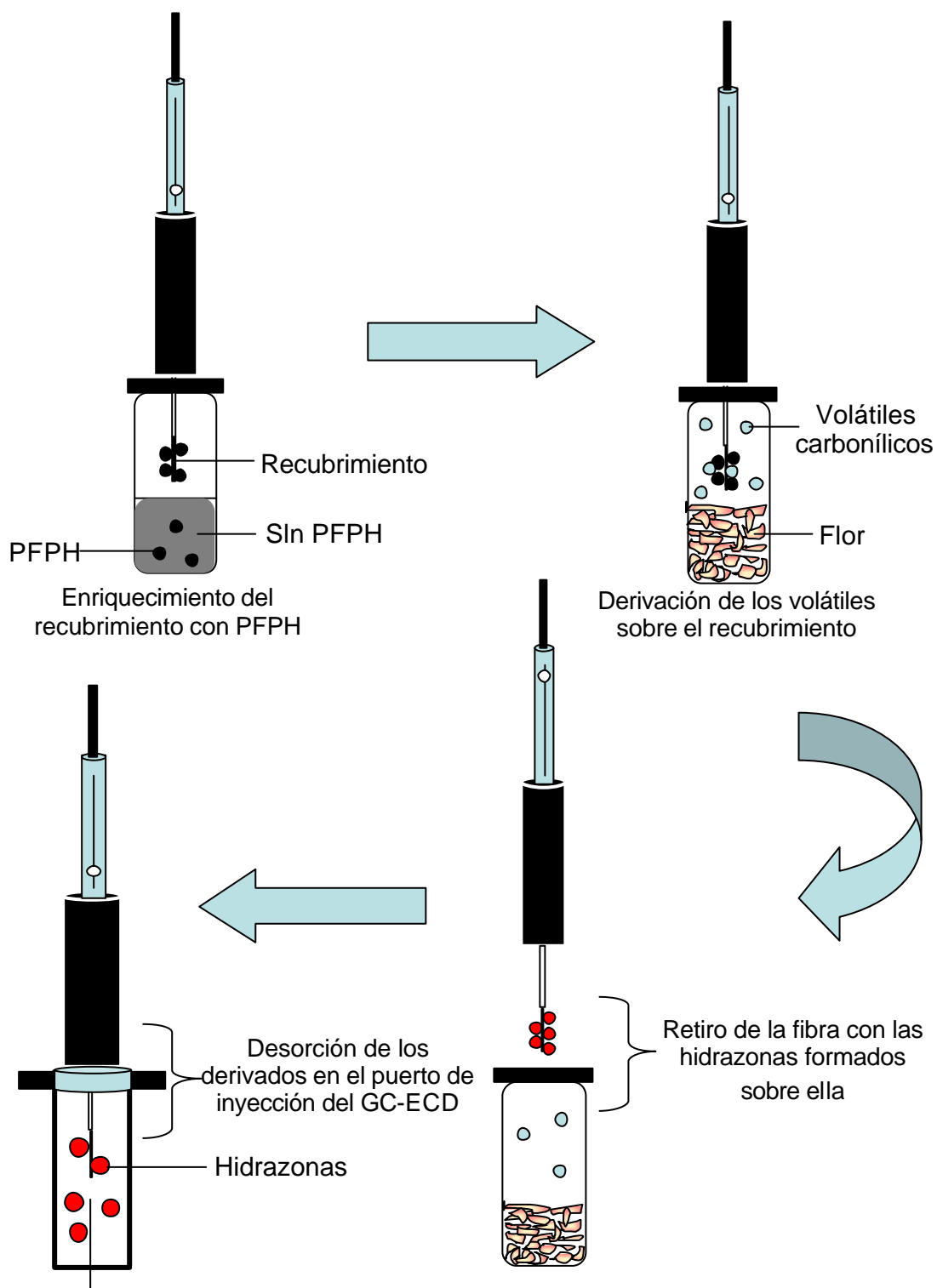
expuso la fibra del dispositivo de SPME, para la extracción de los metabolitos secundarios presentes en la fragancia, durante 30 minutos. Finalizado el muestreo, la fibra fue retirada e introducida rápidamente al puerto de inyección del GC-MS, para su análisis.

## **2.4 DERIVATIZACIÓN DE LOS COMPUESTOS CARBONÍlicos PRESENTES EN LA FRAGANCIA DE LAS FLORES**

Con la intención de detectar los componentes carbonílicos a nivel de trazas, presentes en la fragancia, se realizó la derivatización con PFPH, mediante el modo de extracción y derivatización simultánea sobre el recubrimiento de la fibra, para la obtención *in situ* de las respectivas hidrazonas. Los análisis se realizaron por triplicado a la 9 p.m., cuando el olor de las flores fue más intenso.

El procedimiento de derivatización se realizó para las dos formas de muestreos mencionadas anteriormente (en viales de 10 mL, con las flores debidamente picadas, ca. 4-5 g, y el muestreo *in vivo*). Para ambos casos, se procedió primero a exponer la fibra de PDMS/DVB durante 20 minutos, a los vapores de una solución acuosa 2,4 mM de PFPH agitada a 1000 rpm y temperatura ambiente (28°C), así como se describe en [54]. Posteriormente, la fibra con el agente derivatizante depositado, se expuso por 30 minutos al *headspace* de las flores recolectadas y *in vivo*.

**Figura 13.** Extracción-derivatización simultánea por HS-SPME de los compuestos carbonílicos presentes en la fragancia de flores de la *B. suaveolens*.



Después de la derivatización de los compuestos carbonílicos, la fibra utilizada fue introducida al cromatógrafo de gases equipado con el ECD, donde las hidrazonas obtenidas fueron desorbidas de la fibra térmicamente para su análisis, separación y detección respectivas.

Para la identificación de algunos aldehídos presentes en la fragancia de las flores de *B. suaveolens*, se usaron patrones certificados, los cuales se sometieron a las mismas condiciones de derivación y de análisis cromatográfico que las muestras evaluadas. Las soluciones de aldehídos certificados se prepararon en las siguientes concentraciones: citral, 80  $\mu\text{M}$ ; citronelal, 80  $\mu\text{M}$ ; benzaldehído, 80  $\mu\text{M}$  y la serie de aldehídos lineales C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>, 60  $\mu\text{M}$ .

## **2.5 EXTRACCIÓN CON FLUIDO SUPERCRÍTICO DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS EN LA FLOR DE *B. suaveolens***

En esta etapa de la investigación, se utilizó un extractor Soxhlet de alta presión (*J & W Scientific*, U.S. Pat. N° 4.006.062 y 4.265.860), el cual emplea CO<sub>2</sub> como fluido supercrítico. Al igual que en los procedimientos anteriores, se recolectó y se realizó la extracción de las flores a la 9 p.m., cuando la fragancia era intensa. La cantidad de material vegetal utilizado para cada extracción fue de ca. 18 g.

En la **Figura 14**, se presentan las diferentes partes que forman el extractor Soxhlet de alta presión utilizado. En el Soxhlet **A** se colocó el material vegetal recolectado. Se pesaron ca. 300 g de CO<sub>2</sub> sólido, los cuales fueron distribuidos entre las paredes del reactor metálico y del extractor Soxhlet. Una vez cerrado el reactor, la parte inferior de éste, ca. 7 cm, se sumergió en un baño de agua a 60°C.

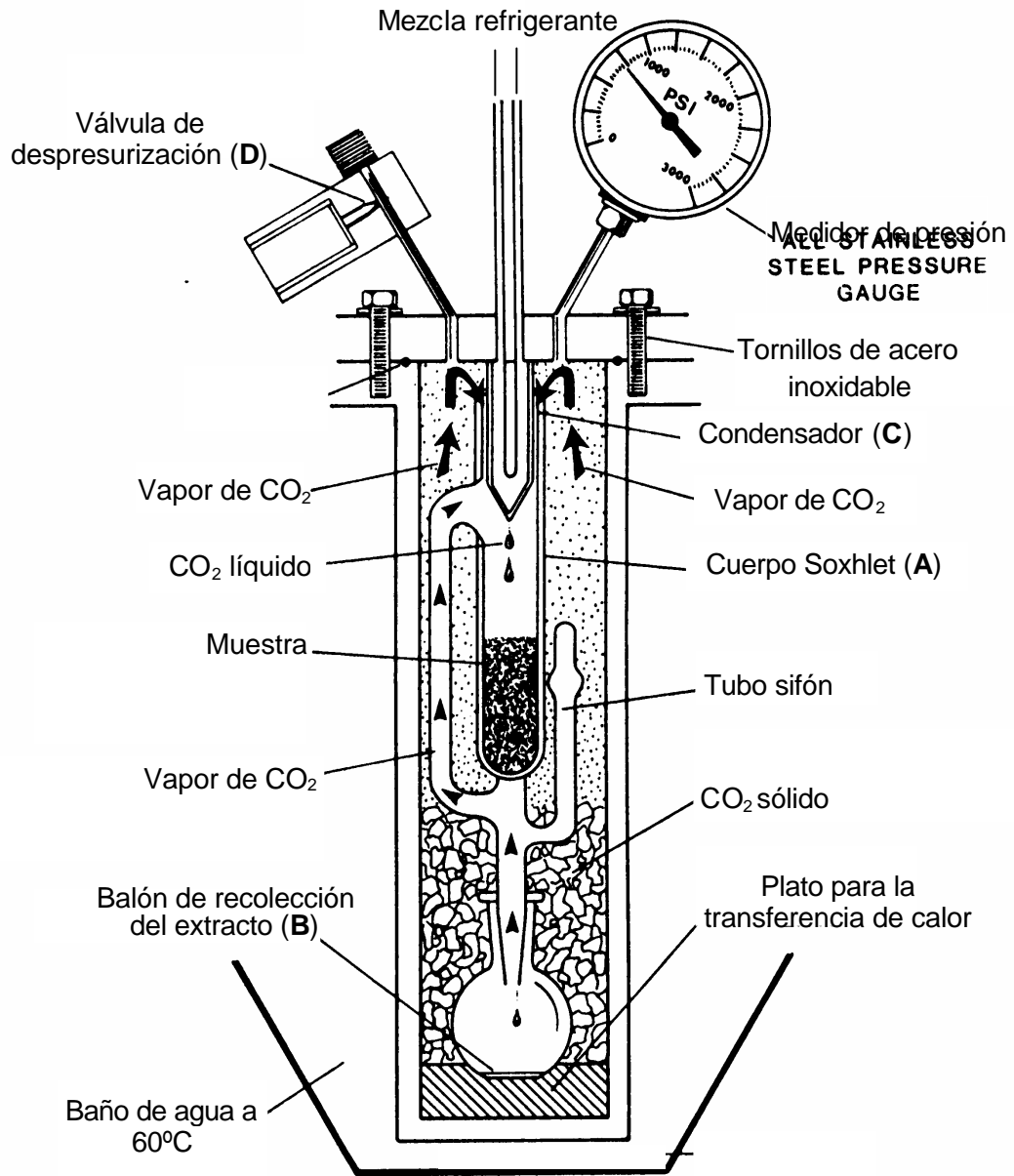
Para garantizar el reflujo del CO<sub>2</sub> en el sistema, a través del condensador **C** se hizo circular una mezcla refrigerante de agua-etilenglicol, utilizando para esto, un sistema de baño circulatorio.

Una vez alcanzada la presión de 1100 psi, y así el punto crítico, donde el CO<sub>2</sub> sólido se convierte a un fluido supercrítico, el proceso de extracción se realizó durante un periodo de dos horas, después del cual, el reactor se colocó en un baño de agua fría hasta bajar la presión a 500 psi. Posteriormente, se procedió a realizar la despresurización del reactor por medio de la válvula **D**.

Retirado el balón **B**, éste se lavó con diclorometano hasta obtener 1 mL de extracto. 1 µL de este último, se inyectó al GC-MS, para su análisis.

Cabe resaltar, que las extracciones realizadas para la flor en esta etapa, fueron llevadas a cabo por triplicado.

Figura 14. Esquema del extractor Soxhlet de alta presión.



## **2.6 EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LA ESCOPOLAMINA EN LAS FLORES Y HOJAS DE *B. suaveolens***

Con el propósito de confirmar y estimar la cantidad de escopolamina, presente en la especie *B. suaveolens*, se procedió a la identificación y cuantificación del alcaloide, en la corola y cáliz de la flor, al igual que en las hojas, de la especie vegetal bajo estudio.

El procedimiento realizado fue igual tanto para la corola y cáliz, como para las hojas. Se pesaron ca. 18 g de cada una de las partes de la planta antes mencionadas, seguidamente, se maceró el material vegetal y se sumergió al agua destilada (40 mL), que luego se llevó a un baño de ultrasonido por 30 minutos.

Se tomó el extracto acuoso, que fue llevado a pH 10, mediante la adición de bicarbonato de sodio. Posteriormente, se realizó la extracción líquido-líquido por lotes (LLE-B) con diclorometano (25 mL), por tres veces. La emulsión formada fue eliminada por la adición de una cantidad pequeña de cloruro de sodio. Se juntaron los extractos orgánicos obtenidos y se concentraron hasta 1 mL con una corriente de nitrógeno. 1 µL de este concentrado, se inyectó al GC-MS, para su análisis.

La cuantificación de escopolamina en cada uno de los extractos orgánicos obtenidos de la planta (cáliz, flor y hoja) se realizó mediante el método de adición de patrón interno (Istd), en el cual a cada uno de los extractos se adicionó, previo a la inyección, un patrón certificado de cocaína (patrón interno) hasta alcanzar una concentración de 11000 ppm del alcaloide en la mezcla.

Suponiendo que los factores de respuesta (relación entre la concentración y área cromatográfica) del patrón interno y del analito son similares, se halló la concentración de la escopolamina en los extractos orgánicos, mediante la siguiente ecuación:

$$C_x = \frac{C_{istd} \times A_x}{A_{istd}}$$

Donde:

$C_x$ : concentración de escopolamina en el extracto, ppm;

$C_{istd}$ : concentración de cocaína (Istd) en el extracto, ppm;

$A_x$ : área de la señal cromatográfica (cuentas) de la escopolamina;

$A_{istd}$ : área de la señal cromatográfica (cuentas) de la cocaína (Istd).

## 2.7 ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES

**2.7.1 Análisis de los metabolitos secundarios extraídos por HS-SPME de la fragancia de las flores de *B. suaveolens*.** El análisis se llevó a cabo en un cromatógrafo de gases *Agilent Technologies 6890 Plus* acoplado a un detector selectivo de masas *Agilent Technologies MSD 5973*. Los parámetros operacionales aparecen en la **Tabla 5**.

**2.7.2 Análisis de los componentes carbonílicos, derivatizados con PFPH, presentes en la fragancia de las flores de *B. suaveolens*.** Las hidrazonas obtenidas en la etapa de derivatización, según [55], fueron analizadas en un GC *Hewlett-Packard HP 5890 Serie II*, equipado con un detector de captura de electrones (ECD) (ver **Tabla 6**).

**2.7.3 Identificación y cuantificación de escopolamina por LLE-B y SFE en cáliz, corola y hojas de *B. suaveolens*.** La identificación y cuantificación de escopolamina se llevó a cabo en un GC *Hewlett-Packard HP 5890A Serie II*, acoplado a un MSD HP 5972. Las condiciones empleadas para el análisis GC-MS se muestran en la **Tabla 7**.

**Tabla 5.** Parámetros operacionales del GC-MS para el análisis de los metabolitos secundarios extraídos por HS-SPME de la fragancia de las flores de *B. suaveolens*.

<b>Cromatógrafo de gases <i>Agilent Technologies 6890 Plus</i>, acoplado a un detector selectivo de masas <i>Agilent Technologies MSD 5973</i></b>	
➤ Sistema de inyección:	
	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ Inyección <i>splitless</i> (1 minuto), 250°C</li> <li>◆ Gas de arrastre: He (99,9995%), velocidad lineal 30 cm s<sup>-1</sup></li> </ul>
➤ Sistema de separación:	
	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ Columna capilar de sílice fundida DB-1 [60 m x 0.25 mm, d.i. x 0.25 μm, f.e.]</li> <li>◆ Fase estacionaria: poli(dimetilsiloxano) entrecruzada e inmovilizada sobre la pared de la columna</li> <li>◆ Programación de la temperatura del horno : 45°C (1 min) hasta 250°C (10 min) @ 5°C min<sup>-1</sup></li> <li>◆ Temperatura de la cámara de ionización: 230°C</li> <li>◆ Temperatura de la línea de transferencia: 285°C.</li> <li>◆ Energía de electrones : 70 eV</li> <li>◆ Rango de masas : <i>m/z</i> 40-350</li> <li>◆ Analizador de masas cuadrupolar</li> </ul>
➤ Procesamiento de datos:	
	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ Sistema de datos HP MS <i>ChemStation</i> (Versión 1.05)</li> <li>◆ Bases de datos: NBS 75K, WILEY 138K y NIST 98.</li> </ul>

**Tabla 6.** Parámetros operacionales del GC-ECD, para el análisis de los derivados hidrazónicos de los componentes carbonílicos en la fragancia.

<b>Cromatógrafo de gases <i>Hewlett-Packard</i> HP 5890A Serie II</b>	
➤ Sistema de inyección:	
	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ Inyección <i>splitless</i> (2 minutos), 250°C</li> <li>◆ Gas de arrastre: He (99,9995%), velocidad lineal 30 cm s<sup>-1</sup></li> </ul>
➤ Sistema de separación:	
	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ Columna capilar de sílice fundida HP-5 [30 m x 0.32 mm, d.i. x 0.25 μm, f.e.]</li> <li>◆ Fase estacionaria : 5%-fenil-poli(metilsiloxano)</li> <li>◆ Programación de la temperatura del horno: 120°C hasta 250°C (4 min) @ 8°C min<sup>-1</sup></li> </ul>
➤ Sistema de detección:	
	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ Detector de captura de electrones (ECD, Ni<sup>63</sup>)</li> <li>◆ Temperatura : 280°C</li> <li>◆ Gas auxiliar : Ar : CH<sub>4</sub> (10%); 30 mL / min</li> </ul>
➤ Procesamiento de datos:	
	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ Sistema de datos <i>ChemStation</i> HP 3365-II</li> </ul>

**Tabla 7.** Parámetros operacionales del GC-MS para la identificación y cuantificación de escopolamina.

<b>Cromatógrafo de gases Hewlett-Packard HP 5890A Serie II, acoplado a un detector selectivo de masas HP 5972</b>	
➤ Sistema de inyección:	
	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ Inyección <i>split</i> (relación 1:30), 250°C</li> <li>◆ Gas de arrastre: He (99,9995%), velocidad lineal 30 cm s<sup>-1</sup></li> </ul>
➤ Sistema de separación:	
	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ Columna capilar de sílice fundida DB-5 [30 m x 0.25 mm, d.i. x 0.25 μm, f.e.]</li> <li>◆ Fase estacionaria: 5%-fenil- poli(metilsiloxano)</li> <li>◆ Programación de la temperatura del horno: 100°C (10 min) hasta 200°C @ 10°C min<sup>-1</sup>; luego hasta 270°C (25 min) @ 15°C min<sup>-1</sup></li> <li>◆ Temperatura de la cámara de ionización: 180°C</li> <li>◆ Temperatura de la línea de transferencia: 285°C.</li> <li>◆ Energía de electrones : 70 eV</li> <li>◆ Rango de masas : <i>m/z</i> 30-400</li> <li>◆ Analizador de masas cuadrupolar</li> </ul>
➤ Procesamiento de datos:	
	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ Sistema de datos HP MS <i>ChemStation</i> (Versión 1.05)</li> <li>◆ Bases de datos: NBS 75K y WILEY 138</li> </ul>

### 3. ANÁLISIS DE RESULTADOS

#### 3.1 SELECCIÓN DEL RECUBRIMIENTO DE LA FIBRA DE SPME

En las **Tablas 8 y 9**, se reporta la composición química de la fragancia de las flores extraída por HS-SPME, usando dos fibras de PDMS y PDMS/DVB, respectivamente. La identificación de los componentes volátiles se realizó con base en sus espectros de masas, y por su comparación con los de las bases de datos del GC-MS.

Los principales componentes de la fragancia de las flores de *B. suaveolens*, para cada uno de los muestreos, corresponden a monoterpenos y algunos de sus derivados oxigenados. De éstos, el 1,8-cineol (eucaliptol) y *trans*- $\beta$ -ocimeno, fueron los componentes mayoritarios, en todos los extractos, obtenidos con las dos fibras seleccionadas, *i.e.* PDMS y PDMS/DVB. Otros hidrocarburos monoterpénicos, *e.g.*  $\alpha$ -pineno y sabineno, como los derivados oxigenados, geraniol y geranial, se caracterizaron por el aumento de su cantidad relativa en la medida que transcurría el día hacia las horas de la noche. Un comportamiento similar, fue encontrado para el alcohol  $\beta$ -feniletílico, salicilato y benzoato de bencilo, e indol.

**Tabla 8.** Composición química de la fragancia de las flores de *B. suaveolens*, en función del tiempo de muestreo, obtenida por HS-SPME, utilizando el recubrimiento de PDMS.

Pico N <sup>o</sup> <sup>a</sup>	Compuesto	Cantidad relativa, %		
		9 a.m.	3 p.m.	9 p.m.
1	Hexanal	-	<i>tr</i>	<i>tr</i>
2	Hexanol	-	-	<i>tr</i>
3	$\alpha$ -Tuyeno	0,5	2,0	2,8
4	Benzaldehído	1,0	0,1	0,2
5	$\alpha$ -Pino	0,4	2,5	2,8
6	6-Metil-5-hepten-2-ona	0,3	0,1	0,1
7	Sabineno	1,5	4,0	4,4
8	$\beta$ -Pino	1,1	2,2	2,4
9	$\beta$ -Mirceno	2,5	6,2	6,5
10	Alcohol bencílico	0,4	0,1	0,2
11	1,8-Cineol	53,6	43,6	29,1
12	<i>cis</i> - $\beta$ -Ocimeno	4,1	4,0	2,4
13	<i>trans</i> - $\beta$ -Ocimeno	22,0	27,7	39,5
14	<i>trans</i> -Sabineno hidrato	0,1	0,1	0,2
15	Benzoato de metilo	0,3	0,1	0,1
16	Terpinoleno	-	0,1	0,2
17	Alcohol $\beta$ -feniletílico	-	-	0,5
18	<i>allo</i> -Ocimeno	-	0,1	0,2
19	Citronelal	0,5	1,4	0,8
20	Terpinen-4-ol	0,3	0,1	0,1
21	Salicilato de metilo	7,2	1,4	-
22	$\alpha$ -Terpineol	3,4	1,8	1,5
23	Citronelol	0,7	1,7	2,6
24	4-Metoxi benzaldehído	-	<i>tr</i>	<i>tr</i>
25	Neral	-	0,1	0,1
26	Geraniol	-	0,1	2,3
27	Geranial	0,2	0,6	0,8
28	Indol	-	-	0,3
29	Farnesol	-	-	<i>tr</i>
30	Farnesal	-	-	<i>tr</i>
31	Benzoato de bencilo	-	-	0,1
32	Salicilato de bencilo	-	-	0,1

\* Porcentajes calculados (promedio de dos mediciones), con base en los % de áreas de los picos cromatográficos.

*tr*: Trazas

a : N<sup>o</sup> de pico cromatográfico en la **Figura 16A**.

**Tabla 9.** Composición química de la fragancia de las flores de *B. suaveolens*, en función del tiempo de muestreo, obtenida por HS-SPME, con el recubrimiento de PDMS/DVB.

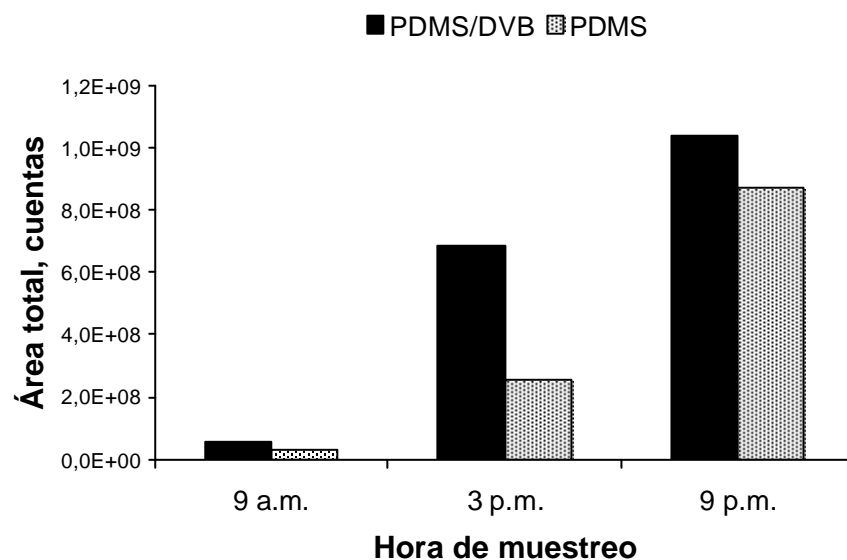
Pico N° <sup>a</sup>	Compuesto	Cantidad relativa, %		
		9 a.m.	3 p.m.	9 p.m.
1	Hexanal	-	<i>tr</i>	<i>tr</i>
2	(Z)-3-Hexen-1-ol	-	<i>tr</i>	<i>tr</i>
3	Hexanol	-	<i>tr</i>	<i>tr</i>
4	$\alpha$ -Tuyeno	1,1	1,9	1,8
5	Benzaldehído	9,3	1,2	0,5
6	$\alpha$ -Pino	0,9	1,0	2,1
7	6-Metil hept5-en-2-ona	2,9	<i>tr</i>	0,1
8	Sabineno	3,5	4,7	3,5
9	$\beta$ -Pino	2,4	1,7	1,5
10	$\beta$ -Mirceno	6,3	8,4	6,4
11	Alcohol bencílico	1,0	0,1	12,3
12	1,8-Cineol	33,0	24,5	19,0
13	<i>cis</i> - $\beta$ -Ocimeno	2,4	0,2	0,4
14	<i>trans</i> - $\beta$ -Ocimeno	14,5	45,2	37,4
15	<i>trans</i> -Sabineno hidrato	0,2	0,2	0,2
16	Benzoato de metilo	1,0	0,1	0,1
17	Terpinoleno	0,6	0,5	0,2
18	Nonanal	-	<i>tr</i>	<i>tr</i>
19	Alcohol $\beta$ -feniletílico	-	0,1	2,7
20	<i>allo</i> -Ocimeno	0,1	0,3	0,2
21	Citronelal	1,2	1,9	1,5
22	Terpinen-4-ol	0,4	0,2	0,1
23	Salicilato de metilo	12,2	0,7	0,1
24	$\alpha$ -Terpineol	2,5	2,1	1,4
25	Decanal	0,2	0,1	0,1
26	Citronelol	0,9	2,2	1,4
27	4-Metoxi benzaldehído	2,2	0,2	0,1
28	Neral	1,1	0,1	0,1
29	Geraniol	-	1,4	2,8
30	Geranial	0,3	1,4	1,0
31	Indol	-	<i>tr</i>	2,4
32	Farnesol	-	<i>tr</i>	0,3
33	Farnesal	-	<i>tr</i>	0,1
34	Benzoato de bencilo	-	<i>tr</i>	0,3
35	Salicilato de bencilo	-	-	0,2

\* Porcentajes calculados (promedio de dos mediciones), con base en los % de áreas de los picos cromatográficos, *tr*: Trazas y a : N° de pico cromatográfico en la **Figura 16B**.

La composición química de la fragancia de las flores, fue similar para las extracciones realizadas con los dos recubrimientos. Sin embargo, el recubrimiento de PDMS/DVB presentó una mayor eficiencia en la extracción (ver **Figura 15**), especialmente, para aldehídos, alcoholes, indol y compuestos polares.

Ésto se puede explicar con base en la naturaleza mixta del recubrimiento, donde el PDMS es un líquido polimérico con afinidad hacia los volátiles no polares, y el DVB un sólido adsorbente adecuado para componentes de mayor polaridad. Cabe resaltar, el aumento marcado en la cantidad de volátiles presentes en la fragancia durante la noche, en comparación, con la fragancia estudiada en el día (9 a.m.).

**Figura 15.** Variación del área cromatográfica total de los volátiles presentes en la fragancia, de acuerdo con la fibra empleada a diferentes horas del día.

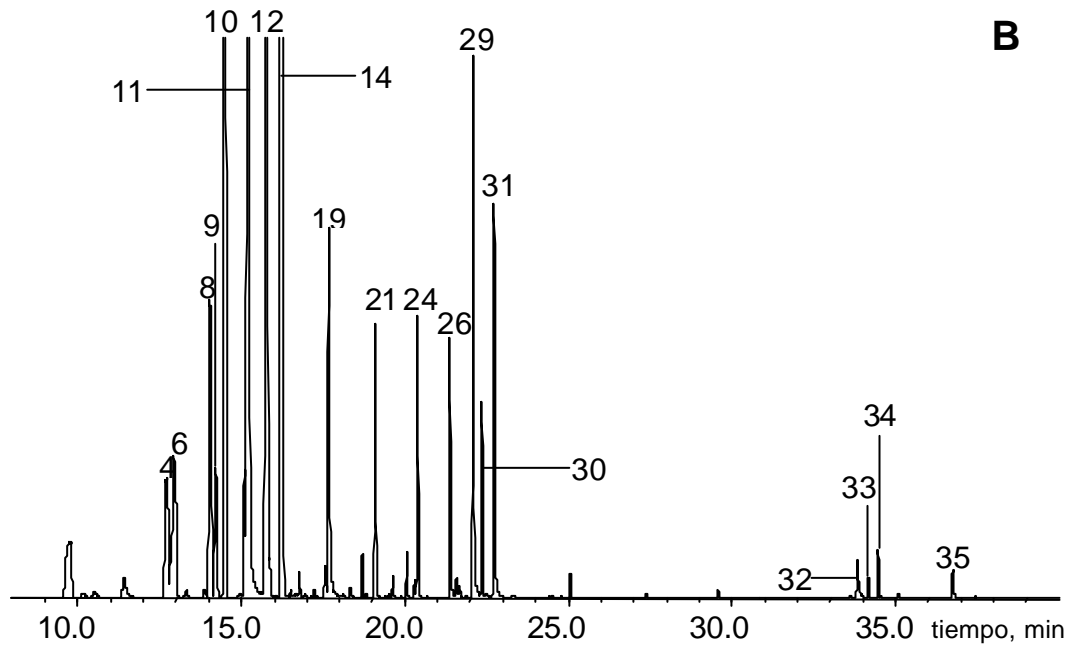
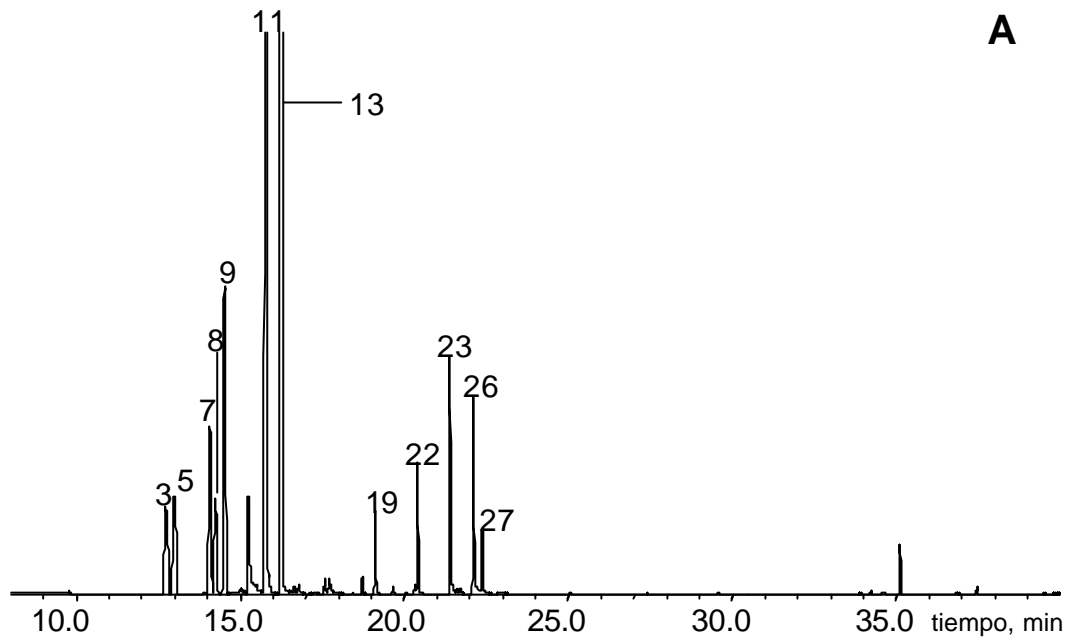


En resumen, los resultados anteriores mostraron una composición muy similar para los extractos obtenidos por HS-SPME, con las fibras de PDMS y PDMS/DVB. La diferencia estuvo en los cambios de la cantidad relativa para varios volátiles, entre las dos fibras, debido a la polaridad de los recubrimientos en éstas. Sin embargo, con la fibra de naturaleza mixta, PDMS/DVB, se aislaron tres componentes “adicionales”, *i.e.* nonanal, decanal y (Z)-3-hexen-1-ol.

De acuerdo con lo anterior, se decidió emplear el recubrimiento de PDMS/DVB para la fibra de SPME, que proporciona un rango más amplio de polaridad y así, la extracción de un mayor número de volátiles presentes en la fragancia de las flores de *B. suaveolens*.

En la **Figura 16**, aparecen los perfiles cromatográficos obtenidos por HS-SPME con los recubrimientos de PDMS y PDMS/DVB, de la fragancia de flores de la *B. suaveolens*, a la 9 p.m., cuando el olor fue más intenso.

**Figura 16.** Perfiles cromatográficos obtenidos por HS-SPME-GC-MS, de la fragancia de la flor de *B. suaveolens* a la 9 p.m. A. Recubrimiento de PDMS y B. Recubrimiento de PDMS/DVB.



### 3.2 DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA FRAGANCIA DE LAS FLORES, DURANTE EL DÍA Y LA NOCHE

En la **Tabla 10** se reporta la composición química de la fragancia de las flores de *B. suaveolens* extraída por HS-SPME, a diferentes horas del día, empleando el recubrimiento de PDMS/DVB. La identificación de los componentes volátiles se realizó con base en los espectros de masas e índices de retención de Kováts obtenidos experimentalmente. En la **Figura 17**, aparecen los perfiles cromatográficos de la fragancia de las flores, obtenidos por GC-MS, en función del tiempo de muestreo.

En total se identificaron 35 compuestos químicos presentes en la fragancia de las flores de *B. suaveolens*, extraídos por HS-SPME, de los cuales 4, 10 y 8 compuestos, no fueron hallados a las 6 a.m., 9 a.m. y 12 M, respectivamente, *i.e.* hexanal, hexanol, indol, sesquiterpenoides y algunos bencenoides.

Los datos presentados en la **Tabla 10** confirmaron, que el *trans*- $\beta$ -ocimeno (33-41%) y 1,8-cineol (18-26%), fueron los constituyentes mayoritarios en la fragancia para cada uno de los muestreos realizados, seguidos de monoterpenos,  $\beta$ -mirceno y sabineno. En la **Figura 18**, aparecen las estructuras químicas de los volátiles extraídos por HS-SPME de la fragancia de las flores.

**Tabla 10.** Composición química de la fragancia de las flores, extraída por HS-SPME, usando el recubrimiento de PDMS/DVB, a diferentes horas del día.

Pico Nº <sup>a</sup>	<i>I<sub>K</sub></i> <sup>b</sup>	Compuesto	Cantidad relativa, %							
			12 p.m.	3 a.m.	6 a.m.	9 a.m.	12 M	3 p.m.	6 p.m.	9 p.m.
1	-	Hexanal	<i>tr</i>	<i>tr</i>	-	-	-	<i>tr</i>	<i>tr</i>	<i>tr</i>
2	-	(Z)-3-Hexen-1-ol	0,1	<i>tr</i>	-	-	<i>tr</i>	<i>tr</i>	<i>tr</i>	0,1
3	-	Hexanol	-	<i>tr</i>	-	-	-	<i>tr</i>	<i>tr</i>	<i>tr</i>
4	-	α-Tuyeno	1,7	1,5	0,9	1,5	1,7	1,8	1,6	1,6
5	-	Benzaldehído	0,2	0,7	4,4	5,3	4,0	2,0	0,4	0,4
6	-	α-Pineno	2,0	3,0	0,5	1,6	1,6	1,8	1,7	1,6
7	-	6-Metil hept-5-en-2-ona	0,2	0,7	1,1	1,3	1,0	0,3	0,2	0,2
8	-	Sabineno	4,0	3,4	2,5	4,0	3,9	2,9	3,6	3,0
9	-	β-Pineno	1,7	1,4	1,1	1,6	2,0	1,6	1,3	1,4
10	-	β-Mirceno	6,6	6,3	6,0	5,6	6,2	6,0	7,0	6,0
11	1008	Alcohol bencílico	14,8	10,6	9,6	1,9	2,6	5,1	8,3	12,5
12	1026	1,8-Cineol	19,3	22,8	23,5	26,5	25,9	26,2	19,9	18,4
13	1026	<i>cis</i> -β-Ocimeno	0,3	0,3	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,3
14	1042	<i>trans</i> -β-Ocimeno	36,2	35,3	36,7	41,7	38,5	37,9	35,3	33,2
15	1057	<i>trans</i> -Sabineno hidrato	0,2	0,3	0,1	0,1	0,2	0,2	0,2	0,1
16	1071	Benzoato de metilo	0,1	0,2	0,4	0,4	0,4	0,2	0,2	0,2
17	1082	Terpinoleno	0,3	0,3	0,3	0,2	0,5	0,4	0,3	0,2
18	1082	Nonanal	<i>tr</i>	<i>tr</i>	0,1	-	-	0,1	0,1	<i>tr</i>
19	1086	Alcohol β-feniletílico	2,6	2,1	1,6	0,1	0,9	1,1	1,2	2,5
20	1119	<i>allo</i> -Ocimeno	0,3	0,4	0,4	0,4	0,5	0,3	0,3	0,2
21	1132	Citronelal	1,7	1,4	1,1	0,7	0,9	2,4	3,7	2,0
22	1151	Terpinen-4-ol	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	0,1
23	1172	Salicilato de metilo	0,3	2,4	3,3	3,9	3,7	1,0	0,2	0,3
24	1176	α-Terpineol	1,4	1,6	2,0	1,1	1,4	1,7	2,3	1,2
25	1185	Decanal	0,1	<i>tr</i>	<i>tr</i>	-	<i>tr</i>	<i>tr</i>	0,1	0,1
26	1209	Citronelol	2,1	1,6	1,1	0,5	1,8	3,1	4,0	3,0
27	1216	4-Metoxi benzaldehído	0,1	<i>tr</i>	0,1	1,3	1,1	1,3	0,2	0,1
28	1216	Neral	0,1	0,1	<i>tr</i>	<i>tr</i>	0,1	0,2	0,2	0,2
29	1234	Geraniol	2,3	1,2	0,5	<i>tr</i>	0,2	1,1	4,8	5,1
30	1244	Geranial	0,8	0,5	0,2	0,3	0,7	1,7	1,6	2,1
31	1259	Indol	0,7	0,7	1,5	-	-	0,1	1,3	1,9
32	1702	Farnesol	0,1	0,1	-	-	-	<i>tr</i>	0,1	0,2
33	1718	Farnesal	0,1	0,5	0,5	-	-	<i>tr</i>	<i>tr</i>	0,5
34	1732	Benzoato de bencilo	0,3	0,1	<i>tr</i>	-	-	<i>tr</i>	0,3	0,6
35	1840	Salicilato de bencilo	0,3	0,3	0,1	-	-	<i>tr</i>	0,2	0,9

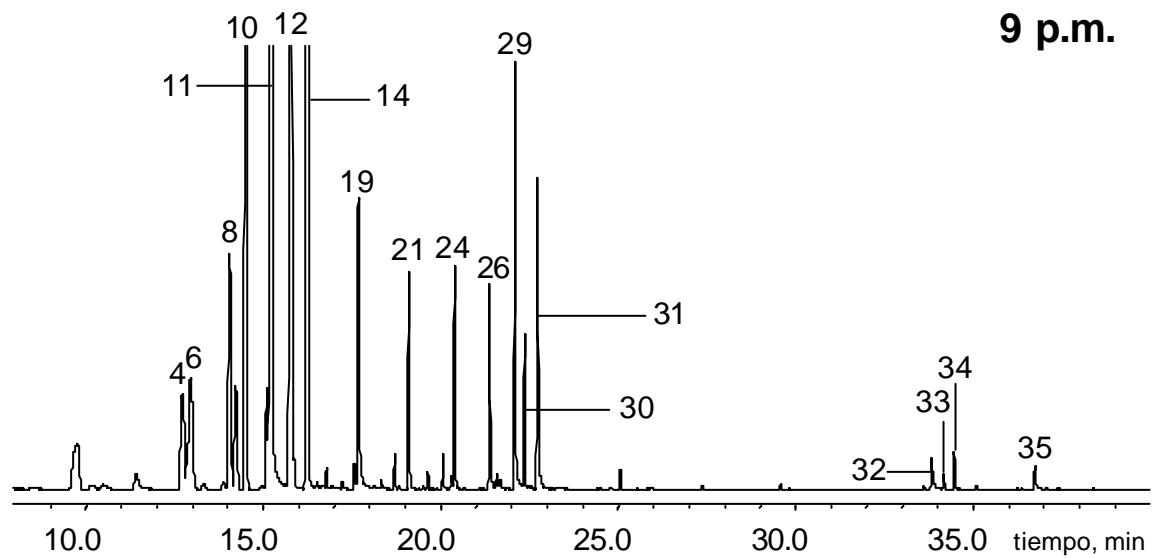
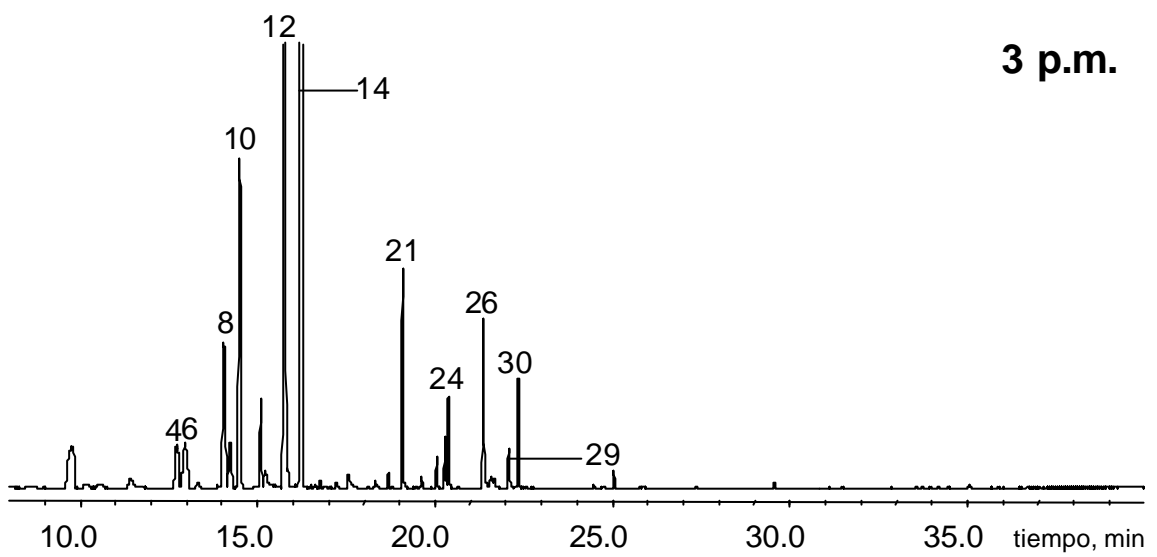
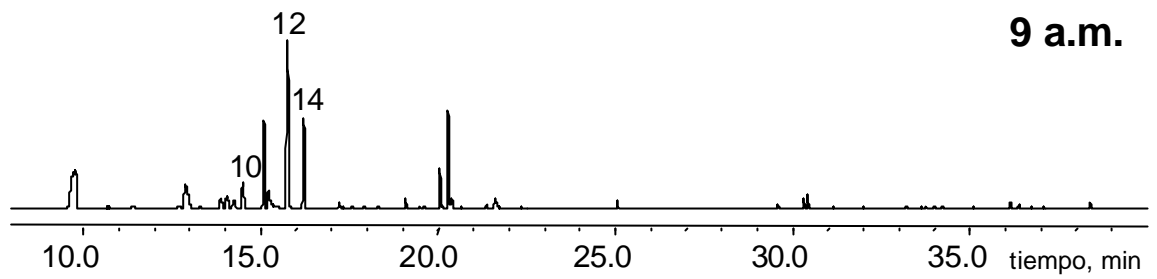
\* Porcentajes calculados (promedio de tres mediciones), con base en los % de áreas de los picos cromatográficos.

*tr*: Trazas

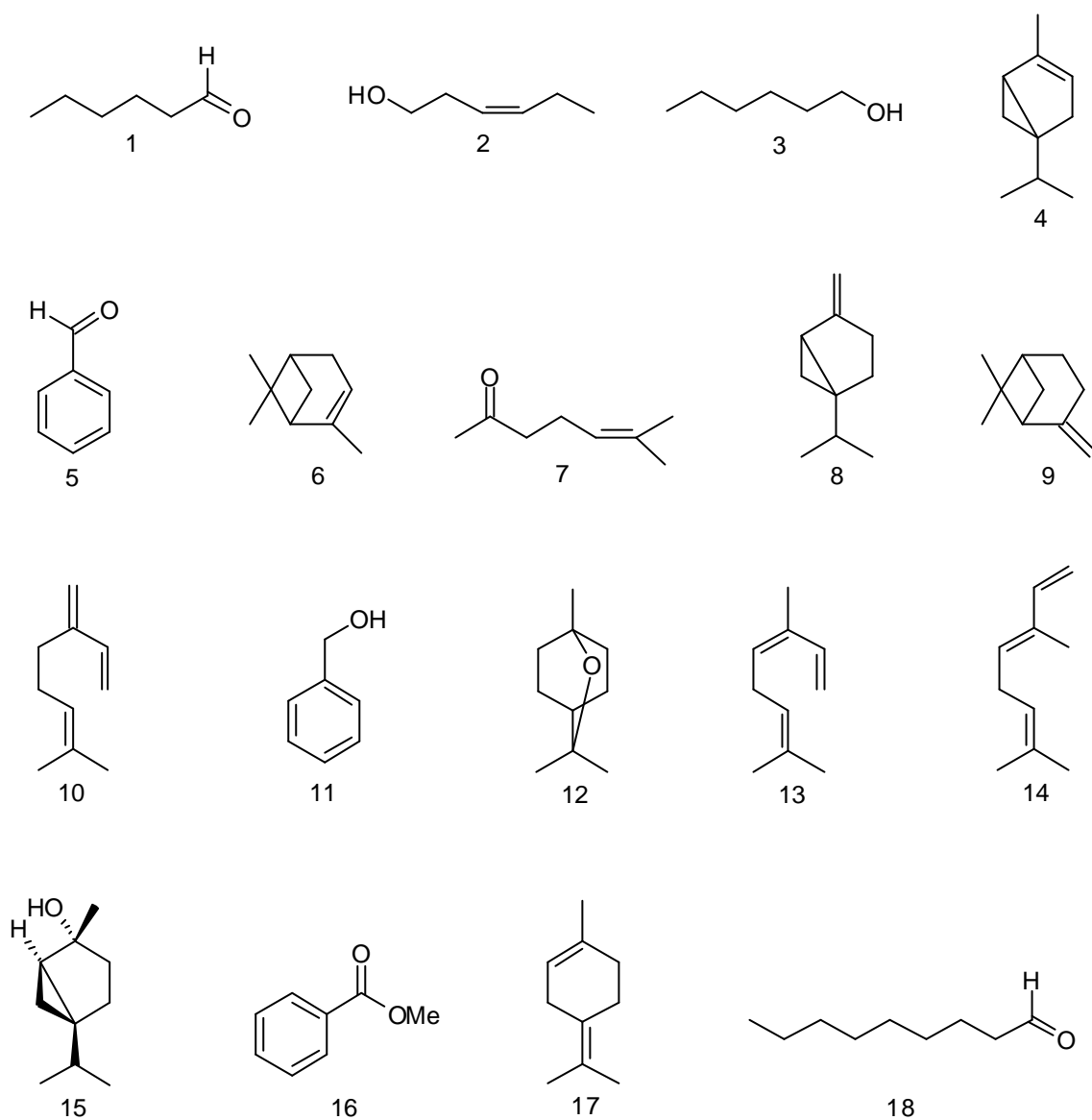
a : Nº de pico cromatográfico en la **Figura 17**

b : Índices de Kováts determinados experimentalmente en una columna DB-1 (60 m).

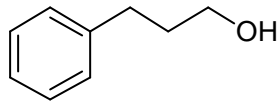
**Figura 17.** Cromatogramas típicos obtenidos por HS-SPME-GC-MS-(PDMS/DVB) de la fragancia de flores de la *B. suaveolens*, a diferentes horas del día.



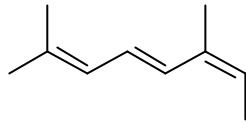
**Figura 18.** Estructuras químicas de los metabolitos secundarios volátiles extraídos de la fragancia de las flores de *B. suaveolens*. Ver identificación, según el número, en la **Tabla 10**.



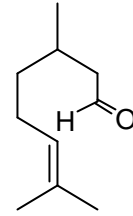
Continuación de la Figura 18



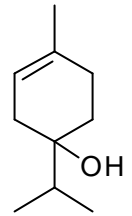
19



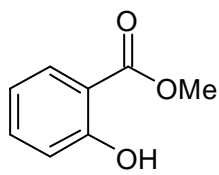
20



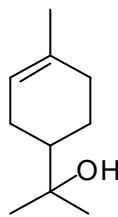
21



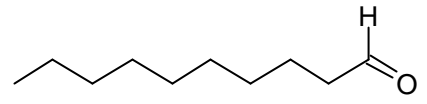
22



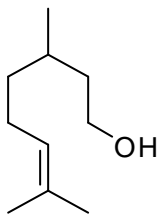
23



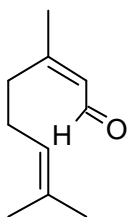
24



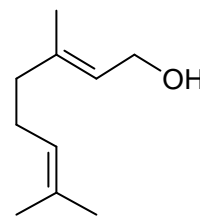
25



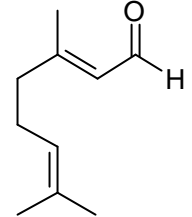
26



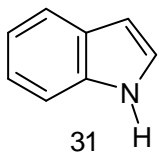
28



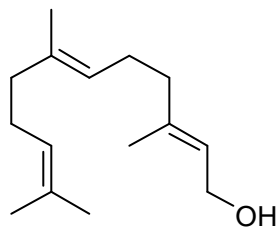
29



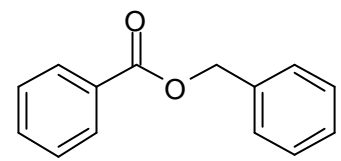
30



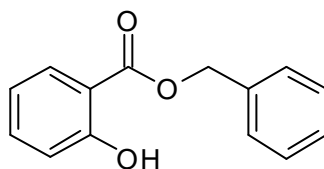
31



32



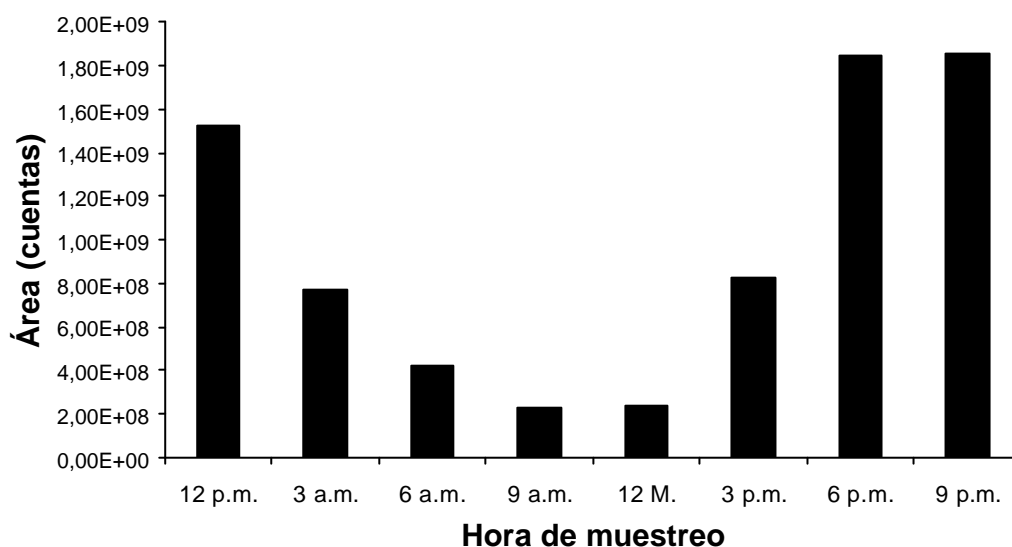
34



35

Se observó un aumento en el número y la cantidad extraída de varios componentes presentes en la fragancia, conforme avanzaba el día; especialmente, durante las horas de la tarde y la noche, entre 6 y 9 p.m., y en menor cantidad, durante el día, entre 9 a.m. y 12 M., como se aprecia en los cromatogramas de la **Figura 17** y, en la **Figura 19**.

**Figura 19.** Variación del área cromatográfica total de los volátiles presentes en la fragancia de las flores, en función de diferentes horas del día.



Se debe resaltar, la aparición en la mezcla durante las horas de la noche y en mayor proporción a la 9 p.m., del indol (1,9%), benzoato y salicilato de bencilo (0,6 y 0,9%, respectivamente), junto con los sesquiterpenoides farnesal (0,5%) y farnesol (0,2%). Adicionalmente, se observó el aumento en la cantidad relativa durante la noche, de algunos volátiles presentes en la fragancia (ver **Tabla 10**); e.g. la pareja de monoterpenos oxigenados citronelol-citronelal y geraniol-geranial,

estuvieron presentes en todos los muestreos, sin embargo, sus cantidades relativas fueron mayores a la 6 p.m. para citronelol-citronelal y 9 p.m. para geraniol-geranial. Los alcoholes bencílico y  $\beta$ -feniletílico, se caracterizaron por un aumento muy significativo en su cantidad relativa (14,8 y 2,6%, respectivamente), a las 12 p.m.

Otros compuestos oxigenados alifáticos, tales como hexanal, (Z)-3-hexen-1-ol, hexanol, nonanal y decanal, siempre estuvieron en proporciones muy bajas, a nivel de trazas o no cuantificables, especialmente, en las horas del día (6 a.m.-12 M).

La familia de compuestos que se halló en mayor proporción en la fragancia para todos los muestreos, fue la de hidrocarburos monoterpénicos, presentándose su cantidad relativa más alta (56,6%) a las 9 a.m.; los monoterpenos oxigenados alcanzaron el contenido relativo máximo (36,8%) a las 6 p.m.; en menor cantidad se encontraron los compuestos oxigenados alifáticos (alcoholes, aldehídos y cetonas) e indol, así como se muestra en la **Tabla 11** y la **Figura 20**. Sin embargo, se debe destacar, el alto contenido de compuestos oxigenados totales, en todos los muestreos, muy cercano al de los hidrocarburos monoterpénicos. Los bencenoides, *i.e.* ésteres y alcoholes aromáticos, estuvieron en mayor proporción (17-19%), durante la noche, especialmente, alrededor de la medianoche.

**Tabla 11.** Cantidad relativa (%) por familias de compuestos, presentes en la fragancia de las flores de *B. suaveolens*, en función del tiempo de muestreo.

Familia de compuestos	Cantidad relativa, %							
	12 p.m.	3 a.m.	6 a.m.	9 a.m.	12 M	3 p.m.	6 p.m.	9 p.m.
Hidrocarburos monoterpénicos	53,0	51,8	48,4	56,6	55,0	52,8	51,4	47,5
Monoterpenos oxigenados	27,9	29,6	28,7	29,3	31,3	36,8	36,8	32,2
Sesquiterpenoides <sup>a</sup>	0,3	0,6	0,5	-	-	tr	0,1	0,7
Bencenoides	18,6	16,4	19,5	12,8	12,8	10,7	10,9	17,5
Otros compuestos oxigenados <sup>b</sup>	0,3	0,7	1,1	1,3	1,0	0,3	0,3	0,3
Compuestos nitrogenados <sup>c</sup>	0,7	0,7	1,5	-	-	0,1	1,3	1,9
Compuestos oxigenados totales	47,0	47,3	49,8	43,4	45,1	47,9	48,0	50,7

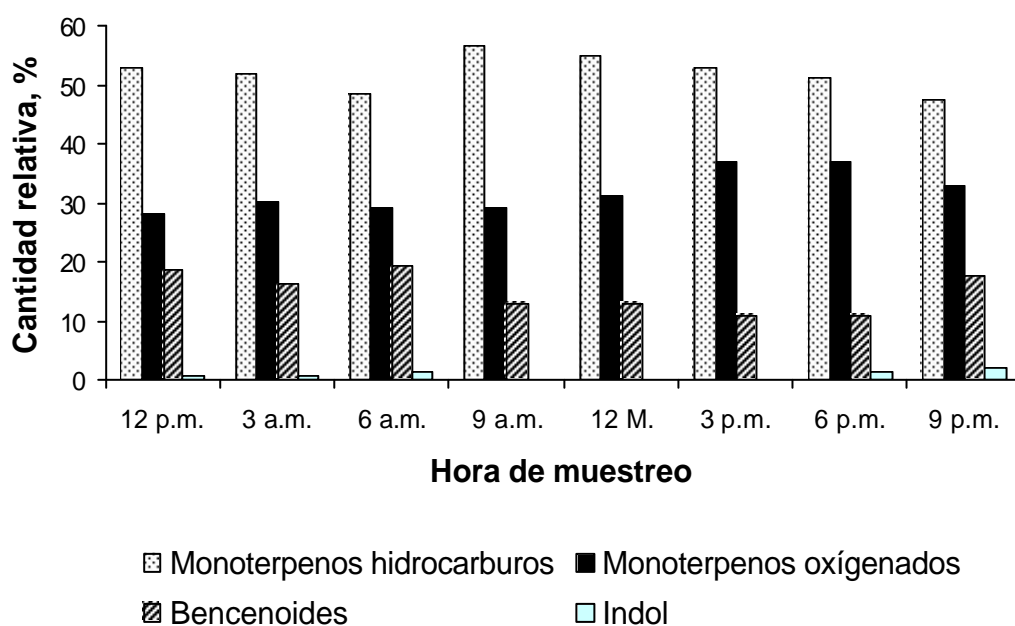
\* Porcentajes calculados (promedio de tres mediciones), con base en los % de áreas de los picos cromatográficos.

a : Farnesol y farnesal.

b : Aldehídos, cetonas y alcoholes alifáticos

c : Básicamente, indol

**Figura 20.** Variación por familias de compuestos en la fragancia de flores de la *B. suaveolens*, en función del tiempo de muestreo.

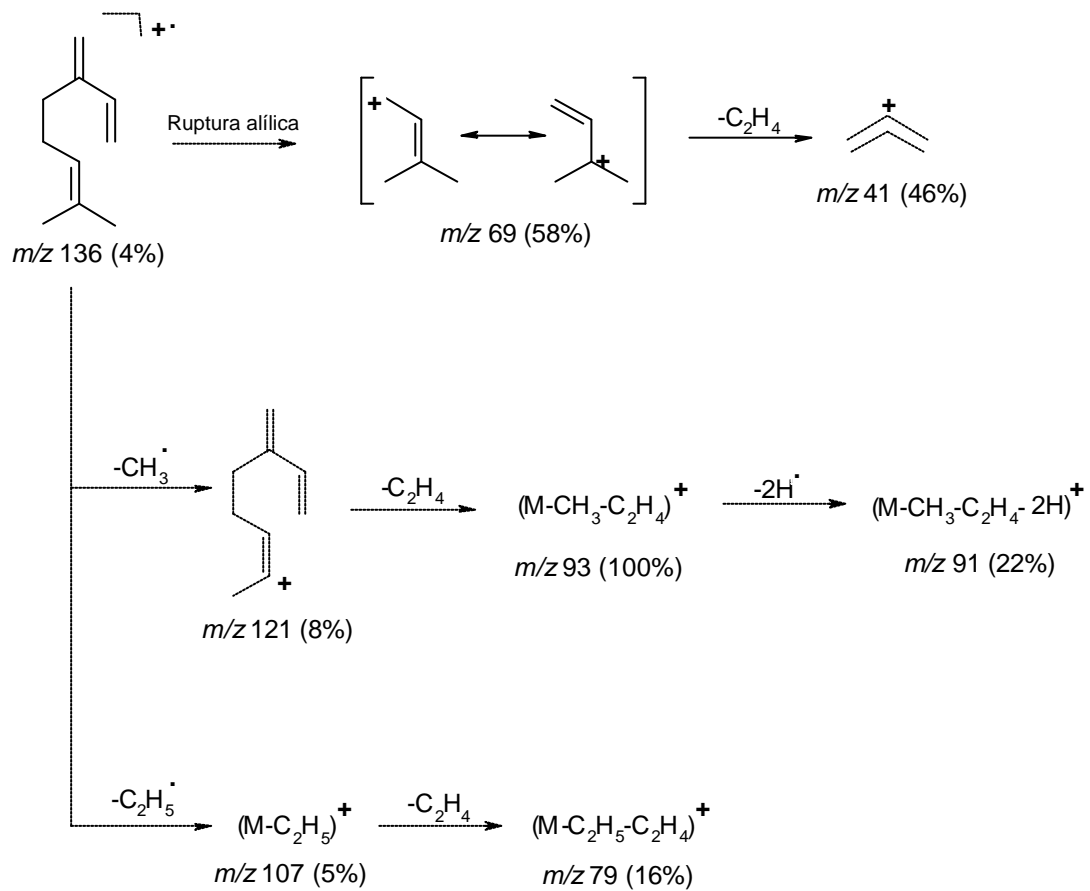
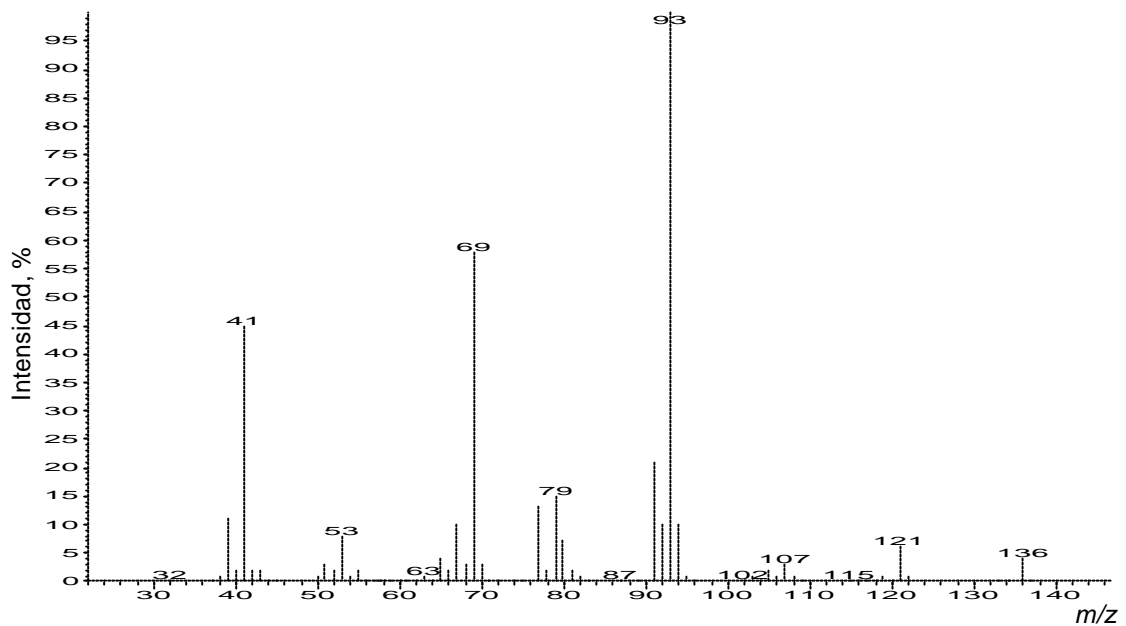


### 3.3 IDENTIFICACIÓN POR GC-MS DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS VOLÁTILES DE LA FRAGANCIA

La identificación de los metabolitos secundarios volátiles presentes en la fragancia de las flores de *B. suaveolens* para 24 horas, fue realizada con base en los índices de Kováts y la comparación de los espectros de masas experimentales con los de las bibliotecas del GC-MS, así como estudiando los patrones de fragmentación de cada compuesto. A continuación, se presentan algunos ejemplos de fragmentación para monoterpenoides, ésteres, alcoholes e indol, presentes en la fragancia.

**3.3.1  $\beta$ -Mirceno.** En la **Figura 21**, aparece el espectro de masas del  $\beta$ -mirceno y su patrón de fragmentación. Su fragmentación es típica para la gran mayoría de los monoterpenos. El ion molecular  $M^+$  en  $m/z$  136 corresponde a la fórmula  $C_{10}H_{16}$  y posee una intensidad baja (4%). Su fragmentación conduce a la formación de iones característicos para monoterpenos, a saber:  $(M-CH_3)^+$  en  $m/z$  121,  $(M-CH_3-C_2H_4)^+$  en  $m/z$  93 como el pico de base, y el fragmento  $(M-CH_3-C_2H_4-2H)^+$  en  $m/z$  91. La presencia de enlaces dobles en la molécula condiciona la generación del fragmento en  $m/z$  69 como resultado de la ruptura alílica en el  $M^+$ , seguida de la eliminación de la molécula de etileno, para formar el ion alilo en  $m/z$  41. Los fragmentos de intensidad baja en  $m/z$  121 y 107, provienen de la eliminación del  $M^+$  de los radicales  $CH_3\cdot$  y  $C_2H_5\cdot$ , respectivamente.

Figura 21. Espectro de masas y patrón de fragmentación del  $\beta$ -mirceno.



**3.3.2 Geraniol.** En el espectro de masas del geraniol, no se registra la señal del  $M^+$  en  $m/z$  154, debido a su gran inestabilidad y rápida fragmentación en diferentes iones fragmento. Los fragmentos  $(M-CH_3)^+$ ,  $(M-H_2O)^+$  y  $(M-H_2O-CH_3)^+$  en  $m/z$  139, 136 y 121, respectivamente, confirman la presencia de los grupos  $CH_3$  y  $OH$  en la molécula. El ion en  $m/z$  93 (20%), típico para la mayoría de monoterpenoides, se genera del fragmento  $(M-H_2O)^+$ , por la pérdida del radical  $C_3H_7$ . El pico de base, se forma por la ruptura alílica en el  $M^+$ , con la formación del fragmento en  $m/z$  69 (100%), seguido de la eliminación de una molécula de etileno para formar el pico en  $m/z$  41 (47%), confirmando la presencia de enlaces dobles en la molécula, como se muestra en la **Figura 22**.

**3.3.3 Benzoato de bencilo.** El  $M^+$  de esta molécula, mediante un reordenamiento y posterior pérdida de una molécula de agua, genera el fragmento  $(M-H_2O)^+$ , en  $m/z$  194 (18%), de intensidad media. La ruptura  $\alpha$  en el  $M^+$ , produce el fragmento de intensidad alta en  $m/z$  105, ion característico para la mayoría de los ésteres aromáticos, seguida de la pérdida de  $CO$ , para formar el ion en  $m/z$  77 (24%). La señal en  $m/z$  91, se debe a la ruptura bencílica del  $M^+$ , con la formación del ion tropilio, el cual elimina acetileno para formar el fragmento en  $m/z$  65, confirmando así, la presencia del radical bencilo en la molécula. El espectro de masas y ruta de fragmentación del benzoato de bencilo, se muestran en la **Figura 23**.

Figura 22. Espectro de masas y patrón de fragmentación del geraniol.

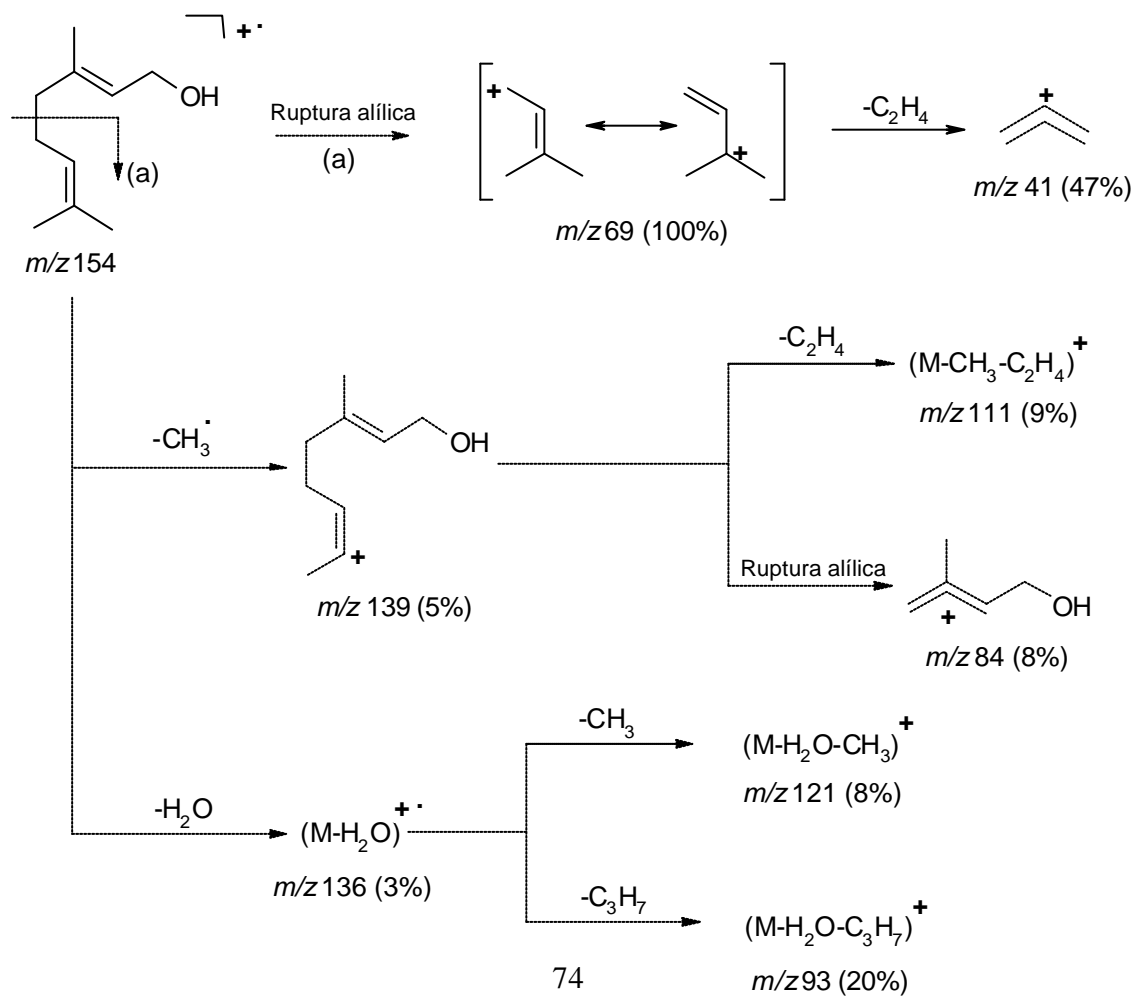
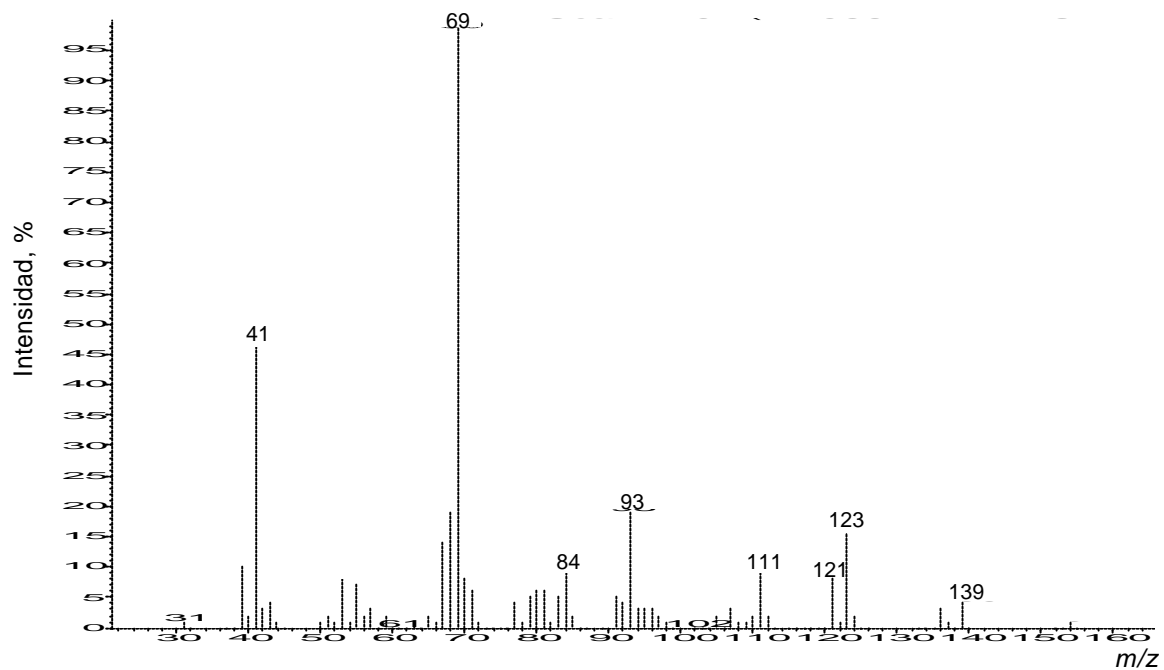
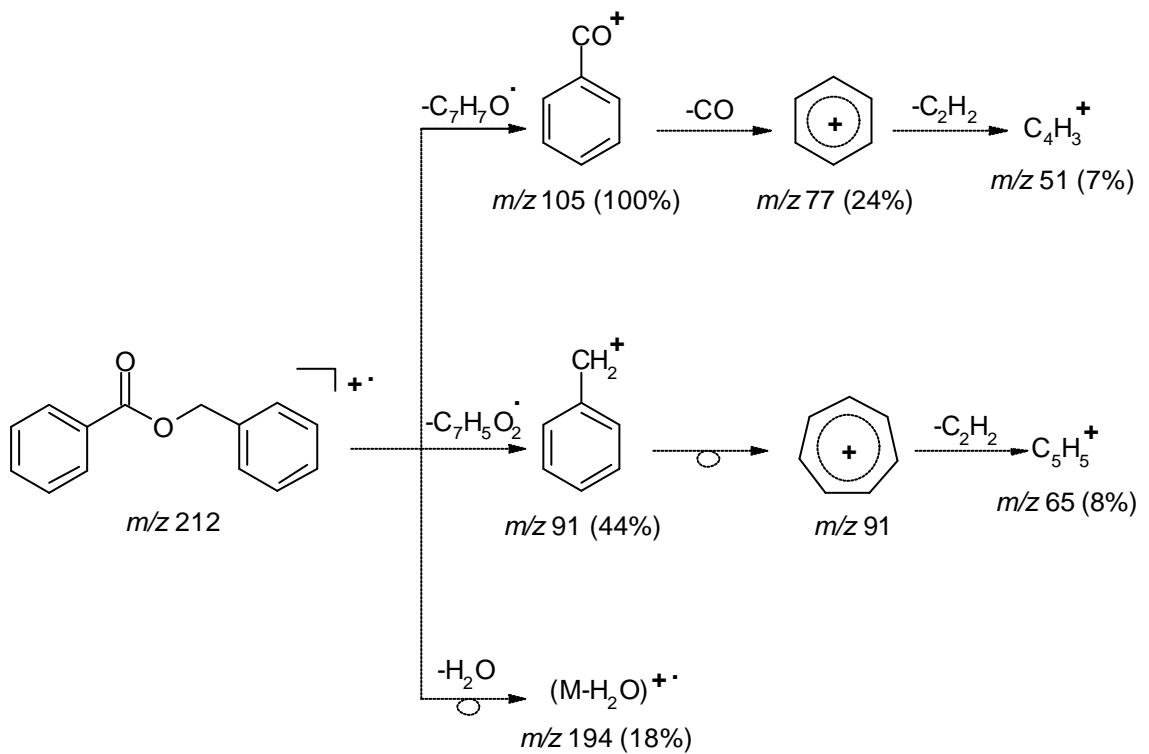
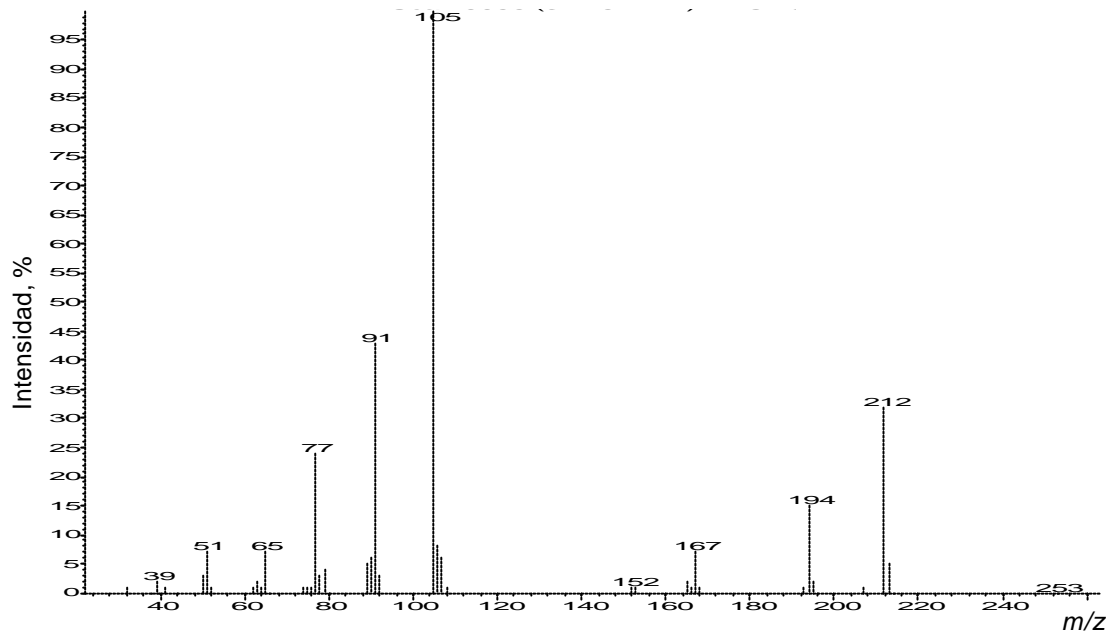


Figura 23. Espectro de masas y patrón de fragmentación del benzoato de bencilo.



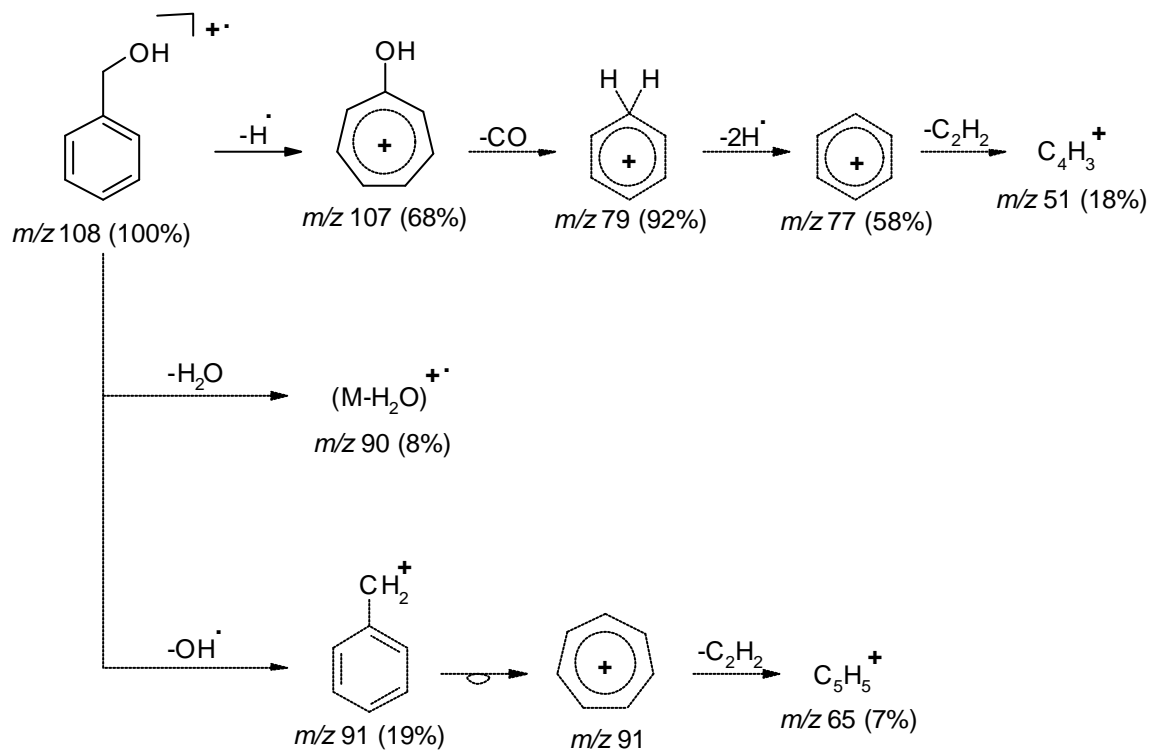
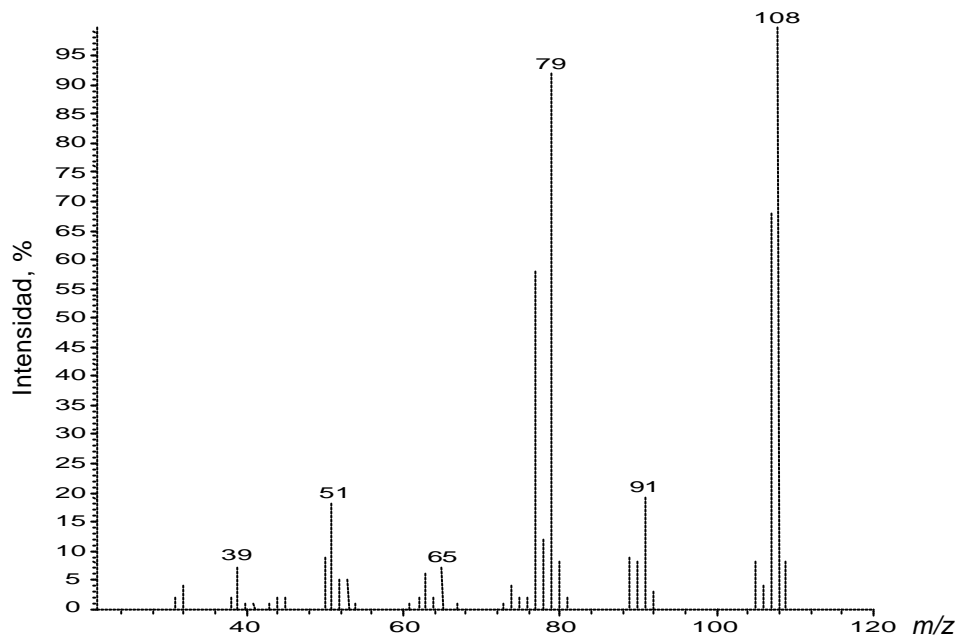
**3.3.4 Alcohol bencílico.** La señal del  $M^+$  en  $m/z$  108, es la de mayor intensidad en el espectro de masas. Un pico  $(M-OH)^+$  con la intensidad media en  $m/z$  91 (19%), se debe a la ruptura bencílica en el  $M^+$ , acompañada de la eliminación de acetileno y formación del fragmento en  $m/z$  65 (7%).

El ion molecular se fragmenta, eliminando un H para generar  $(M-H)^+$  en  $m/z$  107 (68%), el cual libera una molécula de CO y, luego, consecutivamente dos átomos de hidrógeno, produciendo el fragmento  $C_6H_5^+$  en  $m/z$  77 (58%). Este último, pierde una molécula de acetileno, formando el fragmento en  $m/z$  51 (18%).

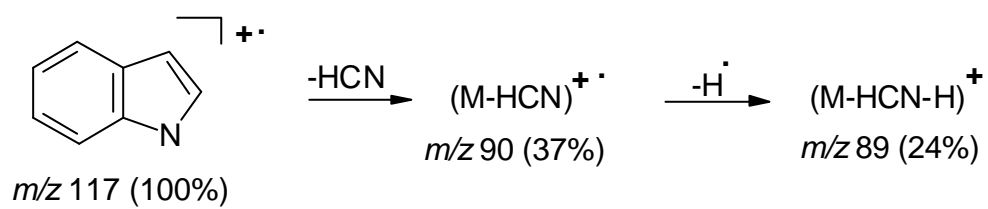
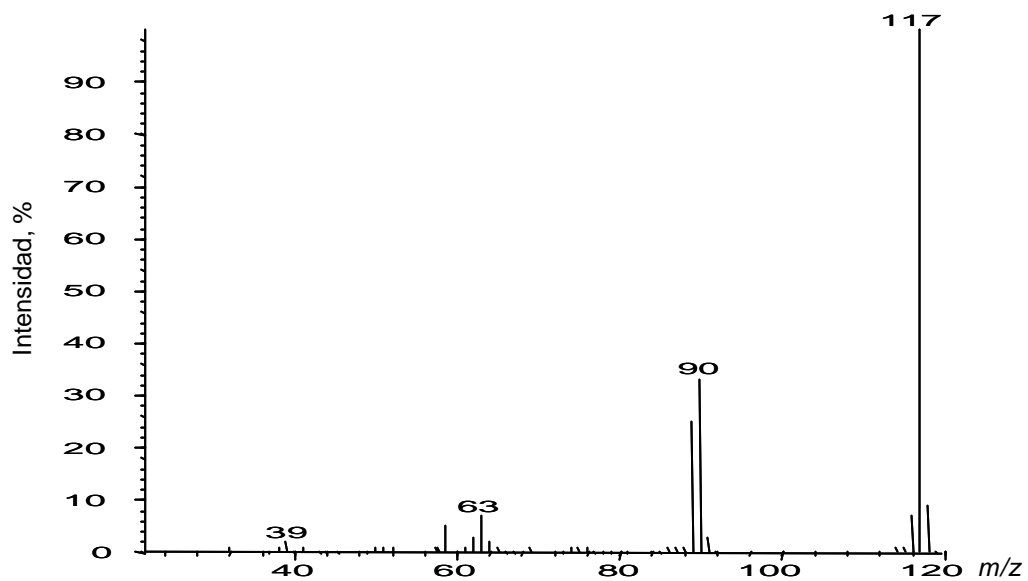
Aunque, la intensidad del ion tropilio en  $m/z$  91 fue mediana, su formación a causa de la ruptura bencílica y la pérdida del radical hidroxilo, confirmaron la presencia de estos grupos en la molécula. El fragmento  $(M-H_2O)^+$  en  $m/z$  90 (8%) confirma, que la molécula es un alcohol.

**3.3.5 Indol.** En el espectro de masas del indol (ver **Figura 25**) el ión molecular aparece en  $m/z$  117 (100%), y es el fragmento de mayor intensidad. El rompimiento del enlace carbono-heteroátomo, seguido de la eliminación de HCN, conduce a la aparición del fragmento  $(M-HCN)^+$  en  $m/z$  90. La estabilidad muy alta del ion molecular, su masa impar y la pérdida de una molécula de ácido cianhídrico, confirman la naturaleza heteroaromática nitrogenada de la molécula.

Figura 24. Espectro de masas y patrón de fragmentación del alcohol bencílico.



**Figura 25.** Espectro de masas y patrón de fragmentación del indol.



### 3.4 MUESTREO POR HS-SPME-GC-MS *IN VIVO* DE LA FRAGANCIA DE LAS FLORES DE *B. suaveolens*

En la **Tabla 12**, se registra la composición química de la fragancia de las flores, obtenida por HS-SPME, *in vivo*. En la **Figura 26**, aparecen los cromatogramas típicos obtenidos por HS-SPME-GC-MS, de la fragancia de las flores vivas y recolectadas; muestreo realizado a las 9 p.m.

La composición química de la fragancia obtenida *in vivo*, fue similar a la de la flor recolectada y cortada en pequeñas partes, de acuerdo con el número de los componentes registrados. La discrepancia radicó en las diferencias de la cantidad relativa (%), que fue mayor para algunos componentes volátiles obtenidos *in vivo*, e.g. citronelal (7%),  $\alpha$ -terpineol (10%), citronelol (9%), geranial (10%), geraniol (13%), benzoato de bencilo (ca.1%), farnesol (1%) y farnesal (0,5%). Sin embargo, se presentó una disminución en la cantidad relativa del sabineno,  $\beta$ -mirceno e indol (véase también la **Tabla 10**).

Es importante resaltar, que para este tipo de muestreo, la familia de compuestos en mayor proporción, correspondió a los monoterpenos oxigenados (60,9%), comparado con el 32,2% para el muestreo a las 9 p.m., donde las flores eran cortadas en pequeñas partes. Los hidrocarburos monoterpénicos estuvieron en un porcentaje inferior (16%) inclusive más bajo que bencenoides (20,2%).

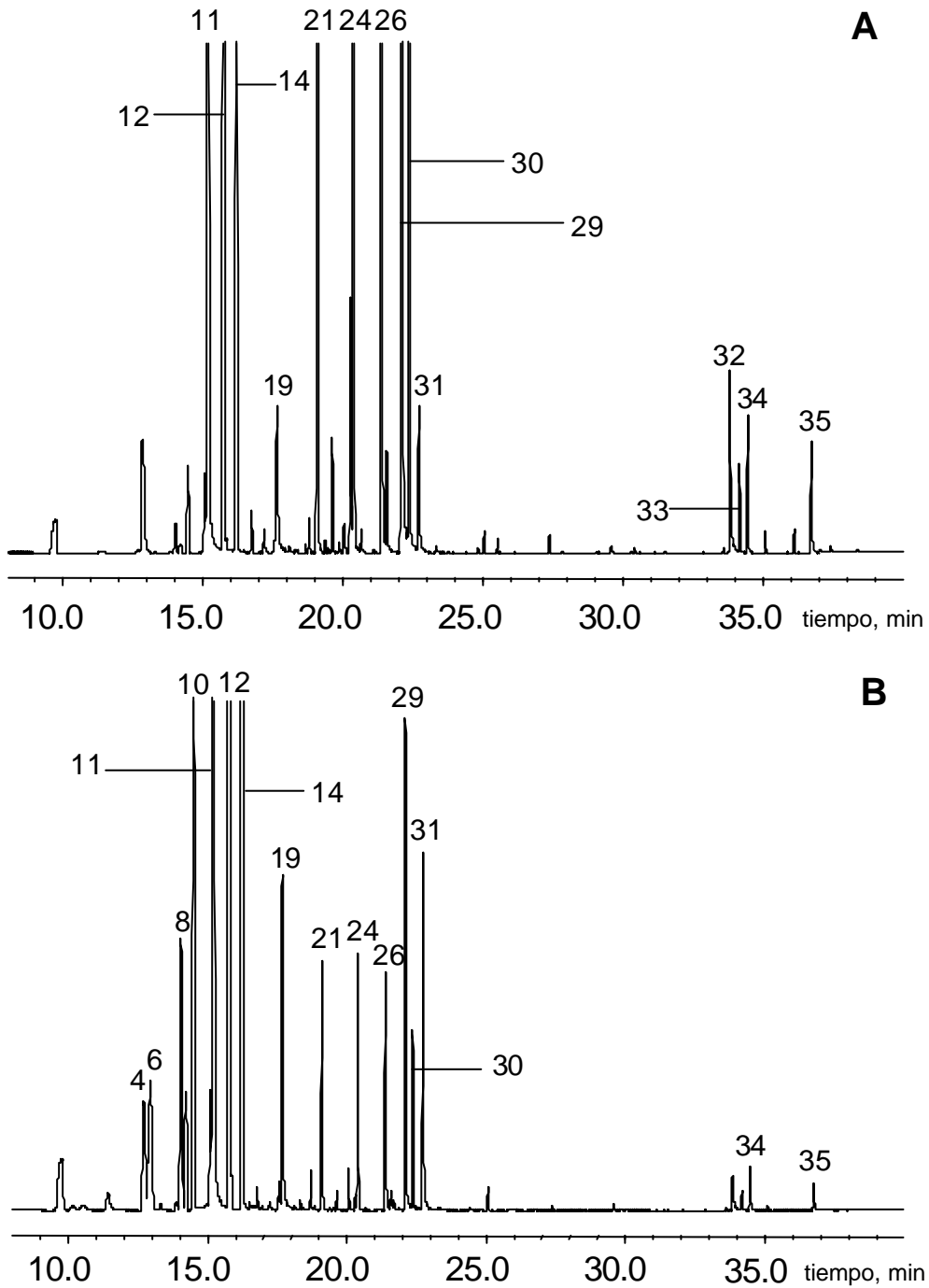
La diferencia en los resultados obtenidos entre los dos muestreos fue producida, posiblemente, por dos razones: (1) los cambios en la composición de la fragancia durante el proceso de recolección, cortado y envasado, pueden conducir a la pérdida de algunos volátiles y/o (2) a la diferencia en el volumen del *headspace* del recipiente empleado para el material vegetal en ambos tipos de muestreos, como variable en la cantidad extraída por la fibra.

**Tabla 12.** Composición química de la fragancia *in vivo* de flores de la *B. suaveolens*, obtenida por HS-SPME-GC-MS a las 9 p.m.

Pico N <sup>o</sup> a	Compuesto	Cantidad relativa, %	Pico N <sup>o</sup> a	Compuesto	Cantidad relativa, %
2	(z)-3-Hexen-1-ol	-	19	Alcohol β-feniletílico	1,0
3	Hexanol	-	20	<i>allo</i> -Ocimeno	0,1
4	α-Tuyeno	0,07	21	Citronelal	6,7
5	Benzaldehído	1,9	22	Terpinen-4-ol	0,7
6	α-Pineno	0,2	23	Salicilato de metilo	1,6
7	6-Metil-5-hepten-2-ona	<i>tr</i>	24	α-Terpineol	10,0
8	Sabineno	0,4	25	Decanal	0,2
9	β-Pineno	0,2	26	Citronelol	9,3
10	β-Mirceno	1,0	27	4-Metoxi benzaldehído	<i>tr</i>
11	Alcohol bencílico	13,9	28	Neral	<i>tr</i>
12	Eucaliptol	10,1	29	Geraniol	13,6
13	<i>cis</i> -β-Ocimeno	0,2	30	Geranial	10,2
14	<i>trans</i> -β-Ocimeno	13,8	31	Indol	1,1
15	<i>trans</i> -Sabineno hidrato	0,3	32	Farnesol	1,3
16	Benzoato de metilo	0,2	33	Farnesal	0,5
17	Terpinoleno	<i>tr</i>	34	Benzoato de bencilo	0,8
18	Nonanal	<i>tr</i>	35	Salicilato de bencilo	0,7

\* Porcentajes calculados (promedio de tres mediciones), con base en los % de áreas de los picos cromatográficos. *tr*: Trazas y a : N<sup>o</sup> de pico cromatográfico en la **Figura 26A**.

**Figura 26.** Cromatogramas típicos obtenidos por HS-SPME, de las fragancias de flores de *B. suaveolens*: A. Muestreo *in vivo* y B. Muestreo de la flor recolectada y cortada en pedazos. Hora de muestreo: 9 p.m.



### 3.5 DERIVATIZACIÓN DE LOS COMPUESTOS CARBONÍlicos PRESENTES EN LA FRAGANCIA DE LAS FLORES DE *B. suaveolens*

En la **Figura 27**, aparecen los perfiles cromatográficos obtenidos por GC-ECD, para los derivados (hidrazonas) de aldehídos alifáticos patrón y aquellos, presentes en la fragancia de las flores de *B. suaveolens*; hora de muestreo: 9 p.m.

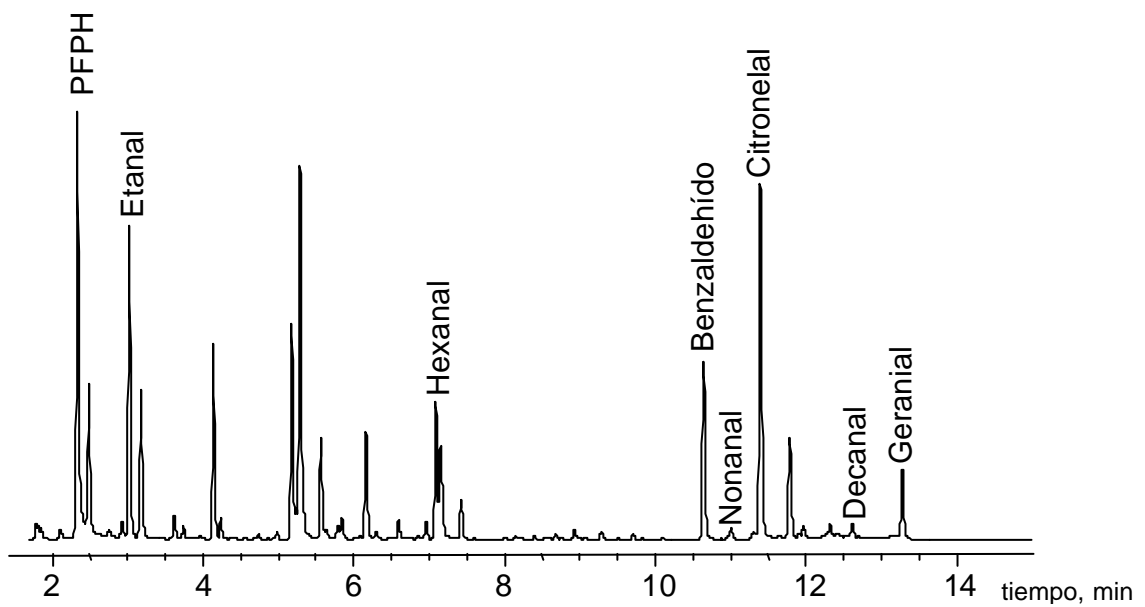
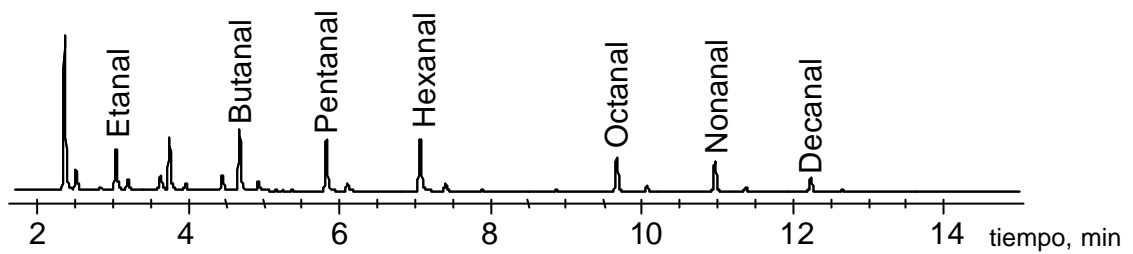
Mediante la derivatización con PFPH de la fragancia, se confirmó la presencia de los aldehídos alifáticos lineales, *i.e.* hexanal, nonanal y decanal, extraídos también por HS-SPME sin derivatización. De igual forma, fue detectada la respectiva hidrazona del etanal, presente en concentración tan baja, que no fue registrado por HS-SPME-GC-MS, sin derivatización.

Los demás compuestos identificados por GC-ECD, mediante la comparación de sus tiempos de retención con los de patrones certificados, analizados bajo las mismas condiciones operacionales, también se registraron en HS-SPME-GC-MS sin derivatización, éstos son benzaldehído, citronelal y geranial.

Las composiciones de las fragancias fueron similares, tanto para la derivatización realizada al *headspace* de flores cortadas en pequeños pedazos, como para flores vivas. La diferencia estuvo en la intensidad en los picos cromatográficos, la cual fue mayor en el muestreo realizado directamente sobre la flor viva, estimando una

mayor concentración de compuestos carbonílicos, cuando se hace este tipo de muestreo.

**Figura 27.** Perfiles cromatográficos de los derivados (hidrazonas): A. Patrones de aldehídos alifáticos y B. Fragancia de flores de *B. suaveolens*.



### 3.6 EXTRACCIÓN CON FLUIDO SUPERCRÍTICO DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS EN LA FLOR DE *B. suaveolens*

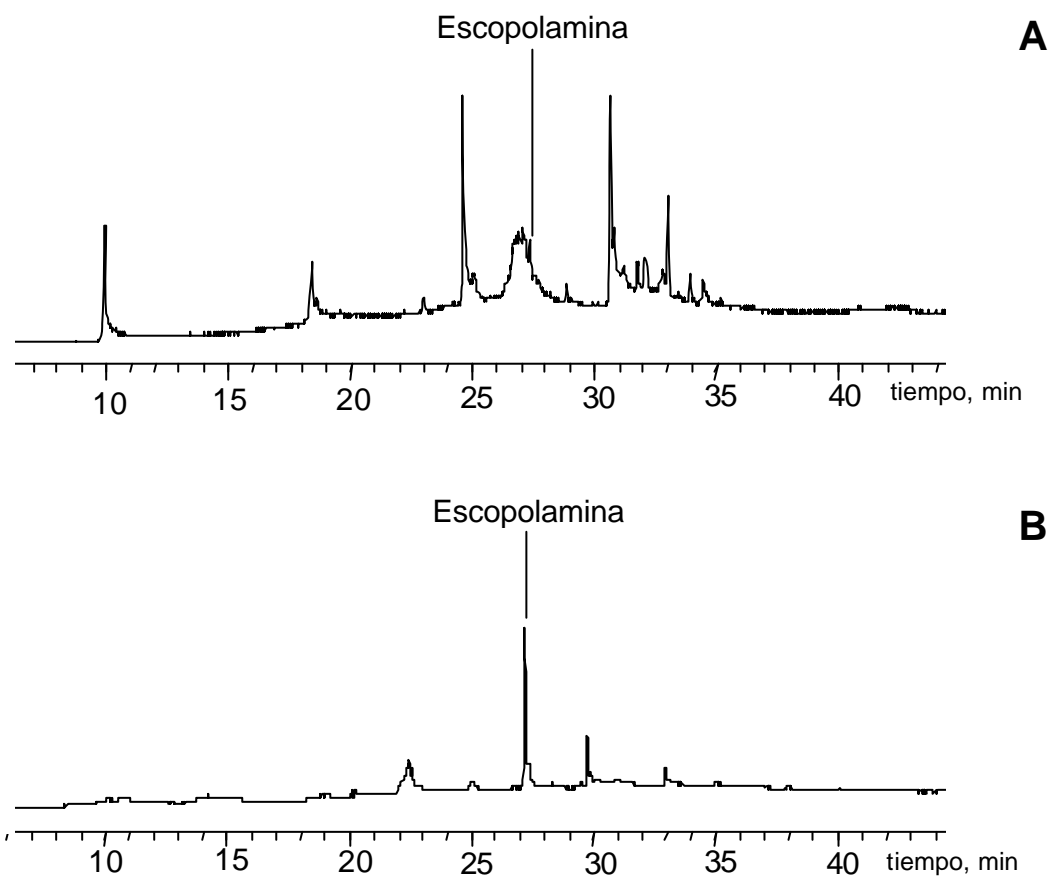
En la SFE de las flores de *B. suaveolens*, no se observó la presencia de volátiles, obtenidos por HS-SPME. Un aumento en la línea base del cromatograma (**Figura 28A**), sugiere la presencia en el extracto de compuestos no volátiles, tales como pigmentos de la flor o algunas grasas (membranas celulares).

Estos resultados (pérdida de volátiles) pueden ser explicados con base en el método de extracción empleado. El extractor *Soxhlet* de alta presión utilizado en la investigación, tiene la desventaja durante la despresurización, de expulsar al exterior parte de los componentes muy volátiles, junto con el dióxido de carbono, obteniendo un extracto final, enriquecido en compuestos semi-volátiles o no volátiles, arrastrados por el CO<sub>2</sub> supercrítico del material vegetal durante el proceso de extracción.

Con base en lo anterior y, conociendo de la literatura [1,4,5,9-16] acerca de la presencia de alcaloides tipo tropano en las plantas del género *Brugmansia*, se procedió a la búsqueda de éstos en el extracto. El análisis cromatográfico desarrollado en el modo de detección *full scan*, reveló la presencia de escopolamina en una cantidad y resolución muy bajas, así como se muestra en la **Figura 28A**, motivo por el cual se realizó el análisis cromatográfico en el modo SIM (Monitoreo de iones seleccionados), para la escopolamina, donde su

detección se redujo a la búsqueda de los compuestos con los iones característicos en  $m/z$  94, 138 y 303, típicos para este alcaloide tropanico. En la **Figura 28B**, aparece el perfil cromatográfico, correspondiente a la escopolamina, donde se aprecia una mayor “resolución” y sensibilidad alcanzada en el modo SIM, comparado con el de *full scan*.

**Figura 28.** Perfiles cromatográficos de los extractos aislados por SFE de flores de *B. suaveolens*: A. Modo de detección *full scan* y, B. Modo de detección SIM ( $m/z$ , 94, 138, 303).



### 3.7 IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LA ESCOPOLAMINA EN LAS FLORES Y HOJAS DE *B. suaveolens*

En la **Figura 29**, se observan los cromatogramas de los extractos de la corola, cáliz y hojas de *B. suaveolens*, obtenidos por la técnica LLE-B, según está descrito en la parte experimental. En éstos, aparece el pico cromatográfico correspondiente a la cocaína, utilizada como patrón interno (Istd), para la cuantificación de la escopolamina. La identificación de cada uno de los alcaloides se realizó con base en sus espectros de masas (ver **Figura 30**).

La concentración de la escopolamina en los extractos orgánicos, se determinó mediante el método de adición del patrón interno, usando la siguiente fórmula:

$$C_x = \frac{C_{\text{istd}} \times A_x}{A_{\text{istd}}}$$

$C_x$ : Concentración de escopolamina en el extracto, ppm;

$C_{\text{istd}}$ : Concentración de cocaína (Istd) en el extracto, ppm;

$A_x$ : Área de la señal cromatográfica (cuentas) de la escopolamina;

$A_{\text{istd}}$ : Área de la señal cromatográfica (cuentas) de la cocaína (Istd).

**Figura 29.** Perfiles cromatográficos de los extractos obtenidos por LLE-B, de diferentes partes de la planta *B. suaveolens*.

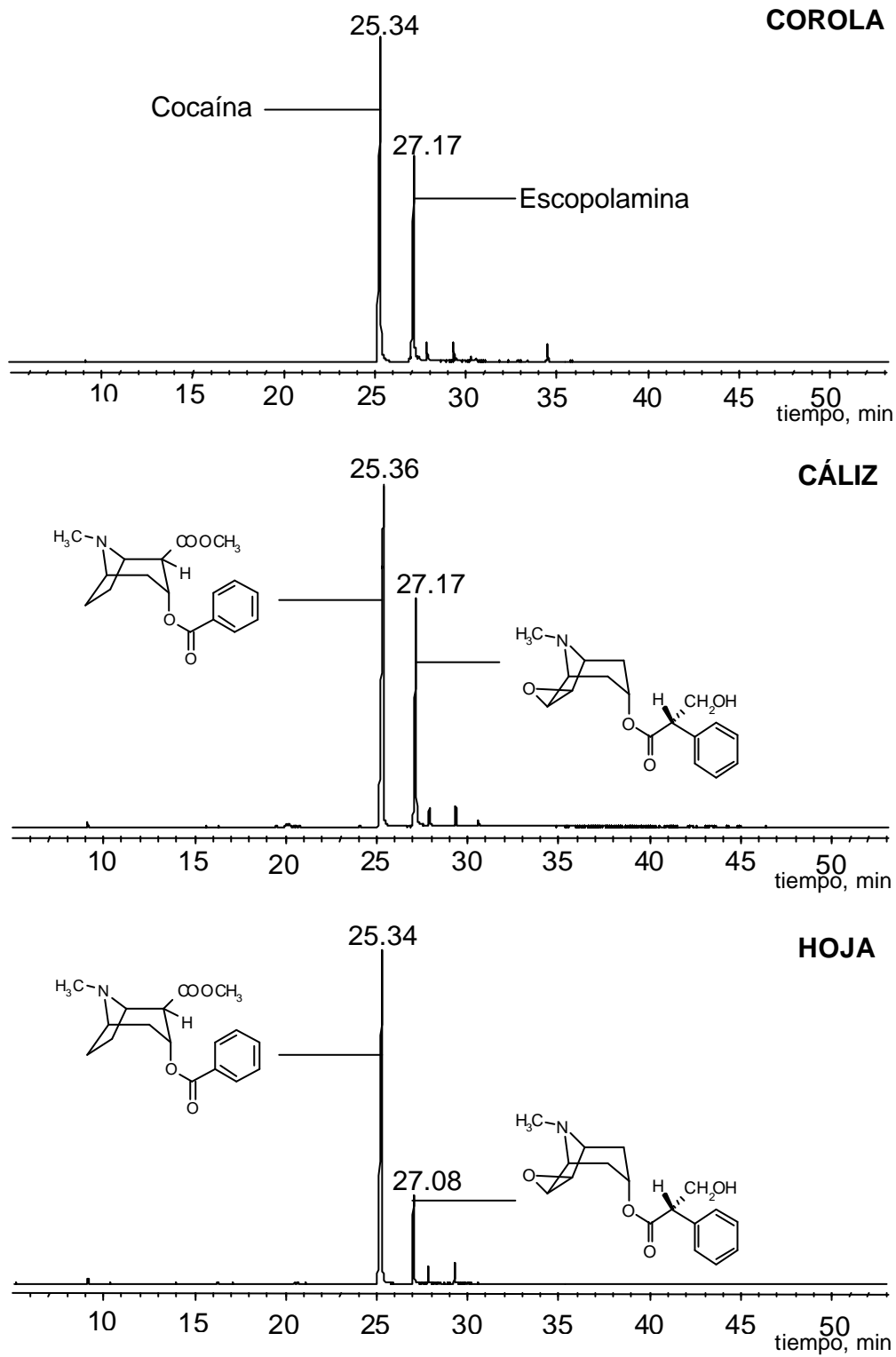
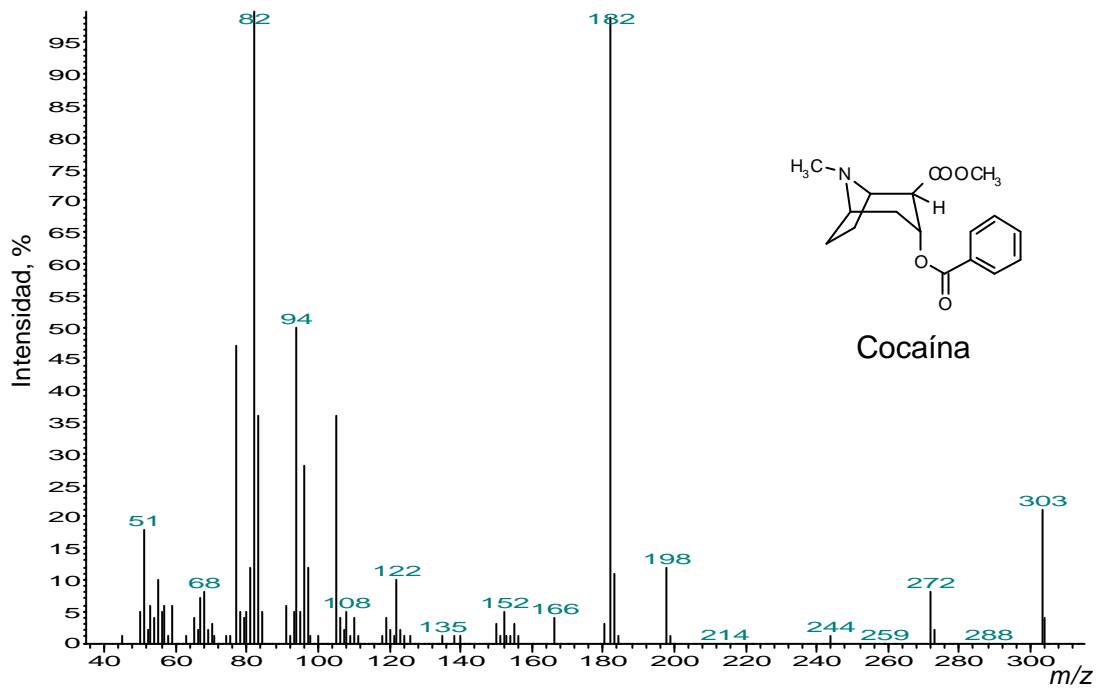
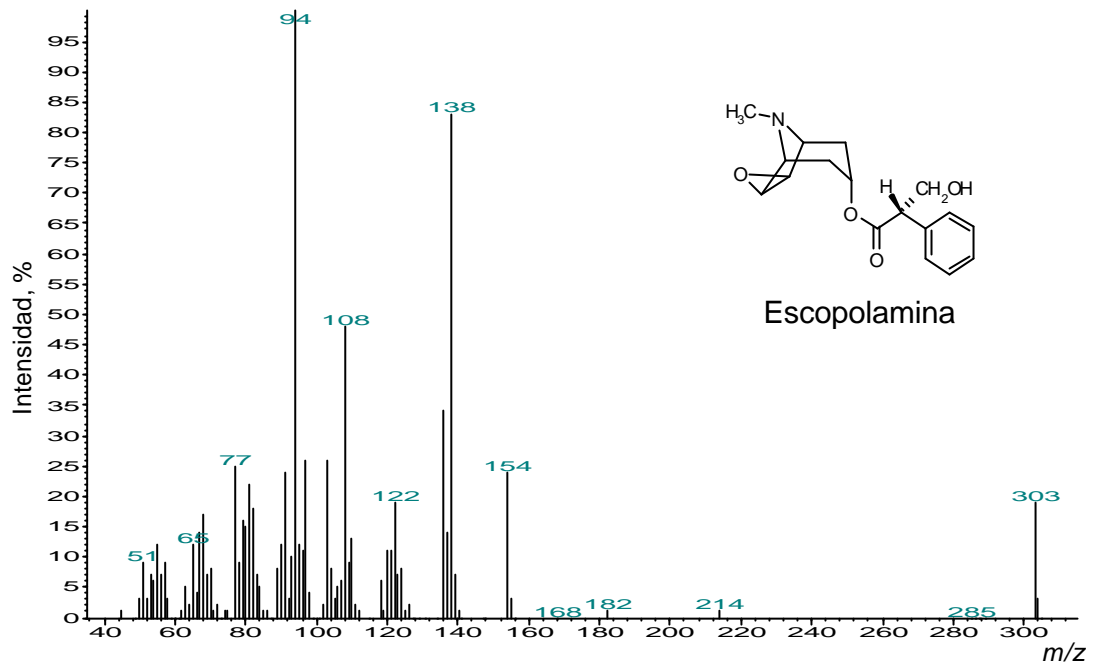


Figura 30. Espectros de masas de la escopolamina y la cocaína.



En el espectro de masas de la cocaína, aparece el ión molecular  $M^+$  en  $m/z$  303 (23%), el cual se disocia, eliminando el radical  $C_6H_5CO_2^{\cdot}$  para formar el fragmento en  $m/z$  182. El ion de mayor intensidad en  $m/z$  82, se produce como resultado de una doble ruptura  $\beta$  de los enlaces adyacentes al nitrógeno.

Otros fragmentos característicos en el espectro de masas de la cocaína, corresponden al ion en  $m/z$  272, formado por la eliminación del radical  $CH_3O^{\cdot}$ , y a los picos complementarios en  $m/z$  105 y 198, debido a la ruptura  $\alpha$  del  $M^+$ .

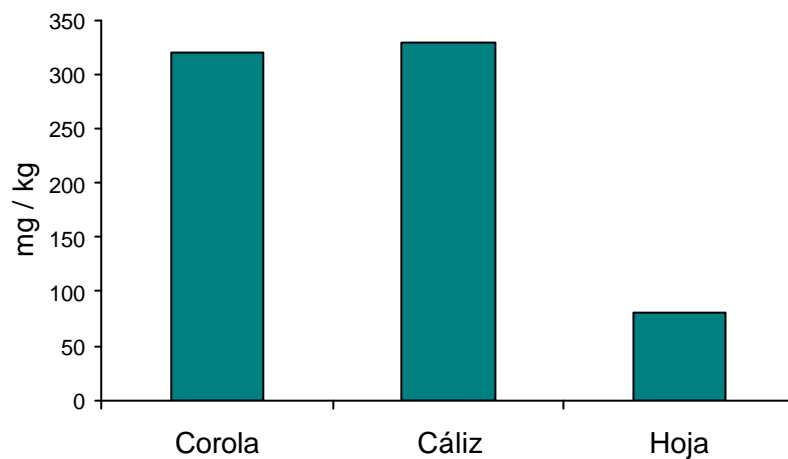
La escopolamina también presenta el  $M^+$  en  $m/z$  303 (24%), con similar intensidad a la de la cocaína. La pérdida de agua del  $M^+$  genera un fragmento de muy baja intensidad en  $m/z$  285, y la ruptura bencílica origina el ion en  $m/z$  122.

El ion pico de base en el espectro,  $m/z$  94, proviene de la doble ruptura  $\beta$  de los enlaces adyacentes al nitrógeno del sistema tropano. Otros fragmentos de intensidad alta o media, corresponden a los iones en  $m/z$  138 (83%) y 154 (24%), y son producidos por la ruptura  $\alpha$  del enlace éster, con la localización de la carga, en ambos casos, sobre el fragmento nitrogenado.

Determinada la cantidad de escopolamina, en cada uno de los extractos orgánicos, se procedió a calcular la cantidad en miligramos (mg), del alcaloide presente por kilogramo de material vegetal fresco.

La escopolamina se encontró principalmente, en la corola (320 mg/kg material vegetal) y en cáliz (330 mg/kg); seguido en las hojas, con un contenido inferior al 80 mg/kg, así como se muestra en la **Figura 31**.

**Figura 31.** Cantidad de la escopolamina (mg alcaloide/kg material vegetal) encontrada en diferentes partes de la *B. suaveolens*.



La cantidad de la escopolamina en cada una de las partes de la planta, concuerda con los datos encontrados en estudios realizados para diferentes especies [1,4,12,15], donde el alcaloide ha sido encontrado principalmente en la flor y, en menor cantidad, en sus hojas. Cabe resaltar, la ausencia de atropina o su enantiómero hiosciamina, en los extractos obtenidos de *B. suaveolens*; estos alcaloides también han sido reportados en varias especies de plantas de géneros *Brugmansia* o *Datura* [1,5,10,15].

#### 4. CONCLUSIONES

1. La técnica de HS-SPME, es un método práctico, rápido y sensible para la extracción de los componentes volátiles presentes en la fragancia de las flores de *B. suaveolens*. El recubrimiento de la fibra, PDMS-DVB, resultó ser más eficiente para la extracción de los volátiles, que la fibra PDMS.
2. Se detectaron un total de 35 compuestos en los diferentes extractos obtenidos por HS-SPME de la fragancia de las flores, a diferentes horas del día. Los componentes mayoritarios presentes en la fragancia de las flores de *B. suaveolens*, correspondieron a los monoterpenoides, *i.e.* *trans*- $\beta$ -ocimeno y 1,8-cineol (eucaliptol).
3. El estudio por HS-SPME-PDMS/DVB de la fragancia de las flores de *B. suaveolens*, determinó una fracción volátil rica en hidrocarburos monoterpénicos (47-56%), para todos los muestreos, seguido de los monoterpenos oxigenados (27-36%) y bencenoides (10-19%). En una cantidad relativamente más baja, estuvieron los compuestos oxigenados alifáticos (0,3-1,3%), *i.e.* hexanal, (Z)-3-hexen-1-ol, hexanol, nonanal y decanal.

4. La composición química y la intensidad de la fragancia de flores de *B. suaveolens*, depende de la hora de muestreo, posiblemente, por el cambio en el metabolismo, relacionado con la luz solar.

5. La fragancia intensa, con mayor número de volátiles y la presencia de indol, benzoato y salicilato de bencilo, fue encontrada durante la noche o en momentos cuando la intensidad solar era mínima (madrugada, amanecer), en comparación con la obtenida durante el día, cuando la composición de la fracción volátil de las flores era pobre en compuestos extraídos y también escasamente percible por el olfato humano.

6. La composición química de la fragancia de flores vivas fue similar a la del *headspace* de flores recolectadas y cortadas, sin embargo, algunos volátiles *i.e.* citronelol, geranial, benzoato y salicilato de bencilo, presentaron diferencias cuantitativas para los dos tipos de flores.

7. La derivatización con PFPH de componentes carbonílicos presentes en la fragancia de las flores de *B. suaveolens*, permitió registrar etanal, no detectado por HS-SPME-GC-MS sin derivación.

8. La SFE, usando Soxhlet de alta presión, resultó ser un método de extracción poco adecuado para el aislamiento de componentes volátiles, debido a su pérdida, durante la etapa de despresurización. Sin embargo, este método es adecuado para aislar componentes poco volátiles, tales como ácidos grasos, alcaloides y/o pigmentos.

9. La LLE-B (diclorometano) de los extractos acuosos de las diferentes partes de *B. suaveolens*, ofreció una mayor eficiencia en la extracción de la escopolamina en la flor, en comparación con la SFE. La cantidad de la escopolamina encontrada en la planta, fue mayor en la flor (cáliz y pétalo), 650 mg/kg y, en menor cantidad, en las hojas, 80 mg/kg.

10. Los resultados obtenidos en esta investigación muestran, que la especie *Brugmansia suaveolens*, son una fuente natural importante de alcaloides tropánicos (*i.e.* escopolamina), además de la fragancia agradable de sus flores constituidas principalmente, por hidrocarburos monoterpénicos y compuestos oxigenados, presentándose como una fuente interesante y novedosa para el desarrollo de nuevas fragancias y aromas para la industria de alimentos, perfumería y cosmética.

## 5. RECOMENDACIONES

Los muestreos de la fragancia por HS-SPME *in vitro*, se deben realizar con flores en buen estado, recién recolectadas del arbusto y no debe pasar un periodo muy largo desde la recolección hasta la extracción, para evitar la pérdida de los componentes muy volátiles o aquellos que pueden estar a niveles muy bajos o en trazas.

Para un estudio más completo acerca de la composición química de la fragancia, es recomendable utilizar otras técnicas para el análisis de volátiles, tales como S-HS, D-HS (purga & trampa) y SDE, teniendo presente la necesidad de contar con suficiente material vegetal, es decir, varios arbustos de la misma especie bajo condiciones ambientales muy similares, con el objetivo de evitar posibles alteraciones de la fragancia por agentes externos *i.e.* lluvia, temperatura, plagas, nutrientes del suelo, intensidad de la luz solar, entre otras.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. GARCÍA, H. Flora Medicinal de Colombia. 2ed. Bogotá: TERCER MUNDO EDITORES, 1992. p. 40, 74, 75.
2. Disponible en internet:  
<URL: [http://www.puc.cl/sw\\_educ/hortalizas/html/solanaceae.htm](http://www.puc.cl/sw_educ/hortalizas/html/solanaceae.htm)> [citado en 12 noviembre de 2003].
3. Disponible en internet: <URL: <http://www.rxmed.com/monographs/scopol.html> > [citado en 12 noviembre de 2003].
4. AVERY, Amos C.; SATINA, Sophie y RIETSEMA, Jacob. THE GENUS DATURA. New York: THE RONALD PRESS COMPANY, 1965. p. 3-15, 56.
5. EVANS, William. Farmacognosia. 13ed. México: Interamericana McGraw Hill, 1991. p. 3-4, 288-296, 312-318, 454-458.
6. Disponible en internet: <URL: <http://www.fepafem.org/guias/10.12.htm>> [citado en 12 noviembre de 2003].
7. Disponible en internet: <URL: <http://www.biopark.org/peru/toe.htm>> [citado en 12 noviembre de 2004].

8. GOODMAN, R. *et al.* Las bases farmacológicas de la terapéutica. 8ed. México: Editorial Médica Panamericana. 1991. p. 161-170
9. HARZ, I. y FUNK, W. Extraction and quantitative HPTLC-determination tropane alkaloids in *Datura* ssp. En: Proc. Int. Symp. High Perform. Thin Layer Chromatogr., 3erd 1985; p. 325-37. Original no consultado. Resumen en: CHEMICAL ABSTRACTS. Vol. 107 (6) (1987); 83971a.
10. ASHRAF, M.; ALAM, M. y DARA, M. Isolation and quantitative determination of atropine and scopolamine in *Datura* and *Hyoscyamus* seeds. En: J. Pharm. Vol. 6 (1985); p. 33-9. Original no consultado. Resumen en: CHEMICAL ABSTRACTS. Vol. 106 (1987); 162652y.
11. FERANDEZ, A. y PACHUCA, C. Rapid gas chromatographic analysis of tropane alkaloids. En: Ars. Pharm. Vol. 27 (1986); p. 325-33. Original no consultado. Resumen en: CHEMICAL ABSTRACTS. Vol. 107 (1987); 102733m.
12. ARTEAGA, L.; REGUERO, M.; BARRAGAN, Y. y ALMANZA, P. Constituents of *Brugmansia sanguinea* leaves. En: Fitoterapia. Vol. 64 (6) (1993); p. 554.
13. YEUSTRATOTA, K. y KUDRGASHOV, M. Analysis of scopolamine from *Datura indiana* seeds. En: Farmatsiya. Vol. 43(1) (1994); p. 37-44. Original no consultado. Resumen en: CHEMICAL ABSTRACTS. Vol. 122 (1995); 170326r.
14. SANGWAN, E. y BARBOTIN, J. Simultaneous determination of some tropane alkaloids by reversed-phase HPLC of *Datura innoxia* Mill. Plant material. En: Agro-Food-Ind. Hi-Tech. Vol. 5(3) (1994); p. 26-8. Original no consultado. Resumen en: CHEMICAL ABSTRACTS. Vol. 122 (1995); 182311v.

15. AFSHARYPUOR, S.; MOSTAJERAN, A. y MOKHTARY, R. Variation of scopolamine and atropine in different parts of *Datura metel* during development. En: *Planta Med.* Vol. 61(4) (1995); p. 383-384. Original no consultado. Resumen en: CHEMICAL ABSTRACTS. Vol. 130 (1999); 122304a.
16. BIAN, J.; CAI, D.; GU, M. y ZENG, H. Extracting scopolamine from *Datura metel* by CO<sub>2</sub> supercritical fluid extraction. En: *Zhongguo Yaoxue Zazhi.* Vol. 31 (10) (1996); p. 588-590. Original no consultado. Resumen en: CHEMICAL ABSTRACTS. Vol. 126 (21) (1999); 282615y.
17. CHOWDHURY, S.; JAHAN, K y TAHERA, F. GC-MS studies on volatile constituents of *Brugmansia suaveolens* leaves. En: *Bangladesh J. Sci. Ind. Res.* Vol. 30 (1995); p. 257-263. Original no consultado. Resumen en: CHEMICAL ABSTRACTS. Vol. 125 (9) (1996); 110299m.
18. KAWASHIMA, Y. y UENO, H. Analysis of volatile components of *Datura* flowers. Proceedings of 13<sup>th</sup> international congress of flavours, fragrances and essential oils, Estambul, Turquia, octubre 15-19 (1995).
19. KITE, G. y LEON C. Volatile compounds emitted from flowers and leaves of *Brugmansia x Candida* (Solanaceae). En: *Phytochemistry.* Vol. 40 (4) (1995); p. 1093-1095.
20. HARBORNE, J. *Phytochemical Methods.* 2ed. London: CHAPMAN AND HALL, 1984. p. 100-107, 116, 120-124, 129-131.
21. TAIZ , Lincoln. y ZEIGER, Eduardo. *Plant Physiology.* 3ed. Sunderland: Sinauer Associates, Inc., Publishers. 2002. p. 283-290.

22. GROS, E.; *et al.* INTRODUCCIÓN AL ESTUDIO DE LOS PRODUCTOS NATURALES. Washington: Secretaria General de la Organización de los Estados Americanos, 1985. p. 1-11, 79-100.
23. FLAMINI, G.; CIONI, P. y MORELLI, I. Use of solid-phase micro-extraction as a sampling technique in the determination of volatiles emitted by flowers, isolated flower parts and pollen. En: J. Chromatogr. A. Vol. 998 (2003); p. 229-233.
24. IKAN, Rápale. Natural Products: A Laboratory Guide. 2ed. San Diego: Academic Press, Inc. 1998. p. 168-181.
25. DEWICK, Paul M. Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach. 2ed. New York: John Wiley & Sons. 2002. p. 167-301.
26. Kaufman, P.; CSEKE, L; WARBER, S. y DUKE, J. Natural Products from Plants. Boca Ratón: CRC Press LLC. 1999. p. 1-37.
27. GRITSANAPAN, W. *Duboisia*: a major source of hyoscine. En: Warasan Phesatchasat. Vol. 22 (4) (1995); p. 178-190. Original no consultado. Resumen en: CHEMICAL ABSTRACTS. Vol. 127 (6) (1997); 85858z.
28. ROBINS, R.; WOOLLEY, J. y ANSARIN, M. Phenyllactic acid but not tropic acid is an intermediate in the biosynthesis of tropane alkaloids in *Datura* and *Brugmansia* transformed root cultures. En: Planta. Vol. 194 (1) (1994); p. 86-94.
29. ANSARIN, M. y WOOLLEY, J. The biosynthesis of tropic acid. Part 5. The rearrangement of phenyllactate in the biosynthesis of tropic acid. En: Phytochemistry. Vol. 35 (4) (1994); p. 935-9.

30. LEETE, Edward. Chemistry of the tropane alkaloids. 34. 1,2-Migration of hydrogen during the biosynthesis of tropic acid from phenylalanine. En: J. Am. Chem. Soc. Vol. 106 (23) (1984); p. 7271-2.
31. ABRAHAM, T. y LEETE, E. New intermediate in the biosynthesis of the tropane alkaloids in *Datura innoxia*. En: J. Am. Chem. Soc. Vol. 117 (31) (1995); p. 8100-5.
32. WATSON, A.; FREER, I. y ROBINS, D. Stereochemistry of the enzymic processes involved in the biosynthesis of scopolamine from hyoscyamine. En: J. Nat. Prod. Vol. 56 (8) (1993); 1234-8.
33. HANDLEY, Alan J. Extraction Methods in Organic Analysis. New York: CRC Press LLC, 1999. p. 1-4, 75-86.
34. SMITH, Roger. Before the injection-modern methods of sample preparation for separation techniques. En: J. Chromatogr. A. Vol. 1000 (2003); p. 3-27.
35. CHESTER, T.; PINKSTON, J. y RAYNIE, D. Supercritical Fluid Chromatography and Extraction. En: Anal. Chem. Vol. 70 (12) (1998); p. 301-39.
36. LUQUE, M.D.; VALCÁRCEL, M. y TENA, M.T. Analytical Supercritical Fluid Extraction. Berlin: Springer-Verlag. 1994. p. 1-60, 79-95, 110-115, 132-165, 297-304.
37. ARTHUR, C. y PAWLISZYN, J. Solid-phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. En: Anal. Chem. Vol. 62 (1990); p. 2145-8.

38. ARTHUR, C.; KILLAM, L.; BUCHHOLZ, K. y PAWLISZYN, J. Automation and optimization of Solid-Phase Microextraction. En: Anal. Chem. Vol. 64 (1992); p. 1960-6.
39. PAWLISZYN, J. Solid-Phase Microextraction: Theory and Practice. New York: Wiley-VCH, 1997. p. 1 -42, 146-188.
40. CHEN, J. y PAWLISZYN, J. Solid-Phase Microextraction coupled to High-Performance Liquid Chromatography. En: Anal. Chem. Vol. 67 (1995); p. 2530-3.
41. PAWLISZYN, J. Application of Solid-Phase Microextraction. Loughborough: Royal Society of Chemistry, 1999. p. 3-37.
42. ZHANG, Z. y PAWLISZYN, J. Headspace Solid-Phase Microextraction. En: Anal. Chem. Vol. 65 (1993); p. 1843-52.
43. BICCHI, C.; CORDERO, C. y RUBIOLO, P. A survey on high-concentration-capability headspace sampling techniques in the analysis of flavors and fragrances. En: J. Chromatogr. Sci. Vol. 42 (2004); p. 402-9.
44. MORA, A. L. Composición química del aceite de *Cymbopogon citratus* en función del método de extracción, época de cosecha y tiempo de secado de la planta. Bucaramanga, Tesis de Grado, 1997, UIS, p. 71.
45. PUERTAS, M. A. Obtención y análisis de los metabolitos secundarios volátiles de guaca (*Spilanthes americana*). Bucaramanga, Tesis de Grado, 1995, UIS, p. 54.

46. RAMIREZ, J. S. Estudio comparativo de los aceites esenciales de plantas de la familia Umbelliferae obtenidos por diferentes métodos de extracción. Bucaramanga, Tesis de Grado, 1997, UIS, p. 81.
47. SERRANO, M. Estudio de la variación del aroma de flores de Ylang-ylang en función del tiempo de su almacenamiento y hora de recolección, y de su posible actividad antioxidante "IN VITRO". Bucaramanga, Tesis de Grado, 1997, UIS, p. 99.
48. BICCHI, C.; DRIGO, S. y RUBIOLLO, P. Influence of fibre coating in headspace solid-phase microextraction-gas chromatographic analysis of aromatic and medicinal plants. En: J. Chromatogr. A. Vol. 892 (2000); p. 469-485.
49. CAI, Jibao.; LIU, Baizhan. y SU, Qingde. Comparison of simultaneous distillation extraction and solid-phase microextraction for the determination of volatile flavor components. En: J. Chromatogr. A. Vol. 930 (2001); p. 1-7.
50. SHANG, C.; HU, Y. y DENG, C. Rapid determination of volatile constituents of *Michelia alba* flowers by gas chromatography-mass spectrometry with solid-phase microextraction. En: J. Chromatogr. A. Vol. 942 (2002); p. 283-288.
51. YANG, S.; HUANG, C. y SMETENA, I. Optimization of headspace sampling using solid-phase microextraction for volatile components in tobacco. En: J. Chromatogr. A. Vol. 942 (2002); p. 33-9.
52. BLAU, K. y HALKET, J. Handbook of Derivatives for Chromatography. New York: John Wiley & Sons, 1993. p. 1-10.
53. DROZD, J. Chemical Derivatization in Gas Chromatography. Amsterdam: Elsevier Scientific Publishing Company, 1981. p. 1-22, 75-78.

54. STASHENKO, E. E. y MARTINEZ, J. R. Derivatization and solid-phase microextraction. En: Trends in Analytical Chemistry. Vol. 23 (8) (2004); p. 553-9.
55. STASHENKO, E. E.; PUERTAS, M. A.; SALGAR, W.; DELGADO, W. y MARTINEZ, J. R. Solid-phase microextraction with on-fibre derivatisation applied to the analysis of volatile carbonyl compounds. En: J. Chromatogr. A. Vol. 886 (2000); p. 175-181.
56. STASHENKO, E. E.; PUERTAS, M. A. y MARTINEZ, J. R. SPME determination of volatile aldehydes for evaluation of *in-vitro* antioxidant activity. En: Anal. Bioanal. Chem. Vol. 373 (2002); p. 70-74.
57. ETTRE, Leslie. y HINSHAW, John. Basic Relationships of Gas Chromatography. USA: ADVANSTAR, 1993. p. 1-17.
58. KARASEK, F. y CLEMENT, R. Basic Gas Chromatography-Mass Spectrometry. Amsterdam: ELSEVIER, 1988. p. 1 -7, 41, 79.