

BIOPROSPECCIÓN DE PLANTAS EN COLOMBIA

**Identificación por GC-MS y LC-MS de metabolitos secundarios aislados de *Medinilla myriantha* (Melastomataceae) y evaluación de su actividad antioxidante**

**Luis Miguel Díaz Sánchez**

**Trabajo de grado presentado para obtener el título de Químico**

**Directora:**

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

**Co-directores:**

**Jairo R. Martínez, Ph.D. en Química.**

**Jesica J. Mejía, Química.**

**Universidad Industrial de Santander**

**Facultad de Ciencias**

**Escuela de Química**

**Bucaramanga**

**2017**

## Dedicatoria

*A mis padres Piedad y William, porque en ellos siempre he encontrado palabras de cariño, ayuda y comprensión; gracias, por ser mi faro de luz, en este camino que es la vida.*

## Agradecimientos

A mis padres, por su dedicación y por enseñarme con el paso del tiempo, que la felicidad se encuentra en esas pequeñas cosas.

A mi hermano Andrés, con quien tengo la dicha de compartir y reír.

A la profesora Marvel, por su entrega en la formación de generaciones de niños, gracias por enseñarme que el conocimiento trasciende desde las vocales, hasta la ayuda a otras personas.

A los profesores Elena Stashenko y Jairo Martínez, por su ayuda en el transcurso de esta investigación y, por formarme profesionalmente.

A Jesica y Lady, instructoras y amigas, gracias por ayudarme, no solo en el transcurso de la investigación, sino también, por las experiencias compartidas.

A todos mis amigos, que estuvieron presentes en el transcurso de este proceso, muchas gracias.

A la Universidad Industrial de Santander.

A COLCIENCIAS y al SENA, por el apoyo financiero para esta investigación.

**Tabla de Contenido**

Introducción .....	19
3. Marco Referencial .....	21
3.1 Marco Teórico .....	21
3.1.1. Fragancia de las flores.....	23
3.1.2. Polifenoles.....	28
3.1.3. Técnicas de extracción. ....	34
3.1.4. Evaluación de la capacidad antioxidante y contenido total de fenoles. ....	41
3.1.5. Caracterización química.....	45
3.2. Antecedentes .....	48
4. Materiales y Métodos .....	50
4.1. Materiales y reactivos .....	50
4.2. Identificación botánica .....	52
4.3. Tratamiento del material vegetal.....	53
4.4. Métodos de extracción .....	53
4.4.1. Monitoreo de volátiles por HS-SPME. ....	53
4.4.2. Extracción sólido-líquido.....	54
4.4.3. Extracción por dispersión de la matriz en fase sólida. ....	54
4.5. Análisis cromatográfico .....	55
4.5.1. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.....	55
4.5.2. Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas. ....	56
4.6. Capacidad de absorción del radical de oxígeno .....	58
4.7. Contenido de polifenoles totales .....	60
5. Resultados y Análisis .....	61
5.1. Identificación botánica .....	61
5.2. Rendimientos de extracción con solvente y por MSPD.....	61

BIOPROSPECCIÓN DE PLANTAS EN COLOMBIA

5.3. Caracterización química por GC-MS de la fracción volátil de las flores de <i>M. myriantha</i> , aislada por microextracción en fase sólida. ....	63
5.4. Determinación de las mejores condiciones para el análisis por LC- ESI(+)-TOF-MS de un patrón certificado de una antocianina .....	76
5.5. Identificación y cuantificación por LC-ESI(+)-TOF-MS de flavonoides presentes en extractos obtenidos con solventes o por MSPD de hojas, flores, tallos y frutos de <i>M. myriantha</i> .....	83
5.5.1. Identificación y cuantificación de los flavonoides presentes en los extractos obtenidos con solventes de diferentes partes de <i>M. myriantha</i> . ....	83
5.5.2. Identificación y cuantificación de flavonoides presentes en los extractos obtenidos por MSPD de hojas, flores, tallos y frutos de <i>M. myriantha</i> . ....	87
5.6. Determinación de la capacidad antioxidante y el contenido de fenoles totales en extractos de <i>M. myriantha</i> . ....	97
6. Conclusiones .....	102
7. Recomendaciones.....	105
Referencias Bibliográficas .....	107
Anexos.....	127

**Lista de Tablas**

<b>Tabla 1.</b> Recubrimientos de líquidos iónicos poliméricos sobre las fibras de SPME.	38
<b>Tabla 2.</b> Reactivos, materiales y equipos de laboratorio usados en la investigación.	50
<b>Tabla 3.</b> Variables evaluadas para el análisis por LC-ESI(+)-TOF-MS.	57
<b>Tabla 4.</b> Identificación botánica de la planta <i>M. myriantha</i> .	61
<b>Tabla 5.</b> Compuestos identificados en la fragancia monitoreada a las 6:00 a.m., de las flores de <i>M. myriantha</i> con cuatro de los recubrimientos en las fibra de SPME.	65
<b>Tabla 6.</b> Compuestos aislados de las flores de <i>M. myriantha</i> a las 6:00 a.m., 12:00 m. y 6:00 p.m. por HS-SPME/GC-MS con el recubrimiento CAR-PDMS/DVB en la fibra.	70
<b>Tabla 7.</b> Identificación de los compuestos presentes en los extractos hidroalcohólicos de hojas, flores, tallos y frutos de <i>M. myriantha</i> por LC-ESI(+)-MS-TOF.	86
<b>Tabla 8.</b> Cuantificación de los metabolitos secundarios aislados con extracciones hidroalcohólicas de hojas, flores, tallos y frutos de <i>M. myriantha</i> por LC-ESI(+)-MS-TOF.	86
<b>Tabla 9.</b> Identificación de los compuestos presentes en los extractos obtenidos por MSPD de hojas, flores, tallos y frutos de <i>M. myriantha</i> por LC-ESI(+)-MS-TOF.	89
<b>Tabla 10.</b> Cuantificación de los metabolitos secundarios aislados por MSPD de hojas, flores, tallos y frutos de <i>M. myriantha</i> por LC-ESI(+)-MS-TOF.	89

## BIOPROSPECCIÓN DE PLANTAS EN COLOMBIA

- Tabla 11.** Compuestos mayoritarios identificados por LC-MS o por GC-MS, en los extractos y fracciones volátiles de hojas, flores, tallos o frutos de *M. myriantha*. 97
- Tabla 12.** Actividad antioxidante y contenido de fenoles totales en los extractos obtenidos con solventes o por MSPD de hojas, flores, tallos y frutos de *M. myriantha* y de las sustancias de referencia. 98

### Lista de Figuras

<b>Figura 1.</b> Planta <i>M. myriantha</i> . Fotos tomadas por el autor en el CENIVAM, UIS, 11 de septiembre de 2015. A. Aspecto general de la planta en florecimiento. B. Flor de la planta con visitante floral. C. Frutos de la planta.	22
<b>Figura 2.</b> Estructura química del isopreno (C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> ).	24
<b>Figura 3.</b> Esquema para la biosíntesis de terpenos.	26
<b>Figura 4.</b> Estructura básica de los flavonoides y su clasificación.	29
<b>Figura 5.</b> Ruta general para la biosíntesis de flavonoides.	31
<b>Figura 6.</b> Estructura básica de las antocianidinas.	32
<b>Figura 7.</b> Cambios en la estructura de las antocianidinas con el pH.	33
<b>Figura 8.</b> Esquema del montaje para muestreo de la fase vapor por SPME.	36
<b>Figura 9.</b> Monómeros de A. Polidimetilsiloxano, PDMS, y B. Divinilbenceno, DVB.	37
<b>Figura 10.</b> Esquema para la descomposición térmica del AAPH, compuesto azo, generador de radicales.	42
<b>Figura 11.</b> Mecanismo propuesto para la oxidación de la fluoresceína en presencia de los radicales peroxilo.	44
<b>Figura 12.</b> Esquema de reacción entre los compuestos fenólicos y el reactivo de Folin-Ciocalteu.	45
<b>Figura 13.</b> Publicaciones científicas en el periodo 2005-2017. Fecha de búsqueda: 25 de agosto de 2017. Fuente: <i>Scopus (Elsevier)</i> . Ecuación de búsqueda: TITLE ABS-KEY (" <i>Medinilla</i> ").	48

## BIOPROSPECCIÓN DE PLANTAS EN COLOMBIA

**Figura 14.** Rendimientos de los extractos hidroalcohólicos y los obtenidos por MSPD de hojas, flores, tallos y frutos de *M. myriantha*. 62

**Figura 15.** Cantidad de compuestos aislados por HS-SPME y detectados por GC-MS (>0.3%), a diferentes horas del día, usando diferentes recubrimientos poliméricos de la fibra SPME. 63

**Figura 16.** Perfiles cromatográficos de las fragancias de las flores de *M. myriantha*, obtenidos a las 6:00 a.m. por HS-SPME/GC-MS, usando diferentes recubrimientos poliméricos de la fibra, i.e., ViC<sub>16</sub>Im-NTf<sub>2</sub>(ViBzIm)<sub>2</sub>C<sub>12</sub>-2NTf<sub>2</sub>, ViC<sub>6</sub>Im-Cl/(Vilm)<sub>2</sub>Cl<sub>12</sub>-2Br, ViC<sub>16</sub>Im-NTf<sub>2</sub>/(Vilm)<sub>2</sub>C<sub>12</sub>-2NTf<sub>2</sub>, CAR-PDMS, CAR-PDMS/DVB, y el blanco de la fibra. Modo de inyección splitless, columna DB-WAX (J&W Scientific, Folsom, CA, EE.UU.), de 60 m (L) x 0.25 mm (I.D.) x 0.25 (d<sub>f</sub>), detector selectivo de masas (EI, 70 eV). 64

**Figura 17.** Relaciones  $\sum A_{total} / A_{std}$  obtenidas en el aislamiento de la fracción volátil de las flores de *M. myriantha* por HS-SPME/GC-MS, usando fibras con diferentes recubrimientos poliméricos (CAR-PDMS/DVB, CAR-PDMS, ViC<sub>16</sub>Im-NTf<sub>2</sub> (ViBzIm)<sub>2</sub>C<sub>12</sub>-2NTf<sub>2</sub>, ViC<sub>6</sub>Im-Cl/(Vilm)<sub>2</sub>Cl<sub>12</sub>-2Br, ViC<sub>16</sub>Im-NTf<sub>2</sub>/(Vilm)<sub>2</sub>C<sub>12</sub>-2NTf<sub>2</sub>). 67

**Figura 18.** Diagrama de dispersión para los resultados obtenidos en el análisis de la fracción volátil de las flores de *M. myriantha*, aislada por HS-SPME con los diferentes recubrimientos poliméricos de las fibras. 69

**Figura 19.** Perfil cromatográfico de la fracción volátil de las flores de *M. myriantha* aislada por HS-SPME, usando el recubrimiento CAR-PDMS/DVB en la fibra, a las 6:00 a.m. Modo de inyección *splitless*, columna DB-WAX de 60 m (L) 70

## BIOPROSPECCIÓN DE PLANTAS EN COLOMBIA

x 0.25 mm (I.D.) x 0.25 (d<sub>f</sub>), detector selectivo de masas (EI, 70 eV).

**Figura 20.** Relaciones  $\sum A_{total} / A_{ista}$  obtenidas para cada familia de compuestos presentes en la fracción volátil de las flores de *M. myriantha* a las 6:00 a.m., 12 m. y 6:00 p.m. obtenida por HS-SPME/GC-MS, usando la fibra de SPME con el recubrimiento CAR-PDMS/DVB. 72

**Figura 21.** Formación de bases de Schiff. 73

**Figura 22.** Espectro de masas experimental del oct-1-en-3-ol, obtenido por GC-MS y su ruta de fragmentación. Impacto de electrón (EI, 70 eV). 75

**Figura 23.** Áreas cromatográficas obtenidas para el ion  $m/z$  449.1083,  $[M]^+$  a diferentes voltajes de fragmentador y de capilar, con la fase móvil: A ácido fórmico 0.2% en agua y B ácido fórmico 0.2% en acetonitrilo (n=2). 76

**Figura 24.** Áreas cromatográficas obtenidas para el ion  $m/z$  449.1083  $[M]^+$  a diferentes voltajes de fragmentador y de capilar con la fase móvil: A-ácido fórmico 0.2% en agua y B-ácido fórmico 0.2% en metanol (n=2). 77

**Figura 25.** Áreas cromatográficas obtenidas para el ion  $m/z$  287.0555  $[M\text{-azúcar}]^+$  a diferentes voltajes de fragmentador y de capilar con la fase móvil A-ácido fórmico 0.2% en agua y B-ácido fórmico 0.2% en acetonitrilo (n=2). 78

**Figura 26.** Áreas cromatográficas obtenidas para el ion  $m/z$  287.0555  $[M\text{-azúcar}]^+$  a diferentes voltajes de fragmentador y de capilar con la fase móvil: A-ácido fórmico 0.2% en agua y B-ácido fórmico 0.2% en metanol (n=2). 78

**Figura 27.** Áreas cromatográficas obtenidas para el ion  $[M]^+=449.1083$  con  $V_{frag}=200$  V, y diferentes valores de voltaje de capilar, para la fase móvil: A-ácido fórmico al 0.2% en agua y B-ácido fórmico al 0.2% en acetonitrilo, ACN, o en 79

## BIOPROSPECCIÓN DE PLANTAS EN COLOMBIA

metanol, MeOH.

**Figura 28.** Relación Y, en porcentajes de la formación del ion molecular ( $m/z$  449.1087) y su respectivo ion fragmento ( $m/z$  287.0555) a diferentes valores de  $V_{cap}$  y  $V_{frag}$  en fase móvil: A-ácido fórmico al 0.2% en agua y B-ácido fórmico al 0.2% en acetonitrilo o metanol.

**Figura 29.** Relación señal/ruido, S/N, para el ion  $m/z$  449.1078  $[M]^+$  a 200 V de voltaje de fragmentador y diferentes valores de voltajes de capilar en fase móvil: A-ácido fórmico al 0.2% en agua y B-ácido fórmico al 0.2% en acetonitrilo o metanol.

**Figura 30.** Pinocembrina ( $C_{15}H_{12}O_4$ )  $[M+H]^+ = 257.0808$ , estándar interno usado para el análisis por LC-ESI(+)-TOF-MS de los extractos hidroalcohólicos y los obtenidos por MSPD de hojas, flores, tallos y frutos de *M. myriantha*.

**Figura 31.** Corrientes iónicas extraídas en el análisis por LC-ESI(+)-MS-TOF de los extractos hidroalcohólicos de hojas, flores, tallos y frutos de *M. myriantha*.

**Figura 32.** Corrientes iónicas extraídas en el análisis por LC-ESI(+)-MS-TOF de los extractos obtenidos por MSPD de hojas, flores, tallos y frutos de *M. myriantha*.

**Figura 33.** Espectros de masas de los compuestos cianidina-3-glucósido y kaempferol-3-glucósido, obtenidos por LC-ESI(+)-TOF-MS.

**Figura 34.** Espectros de masas de los isómeros de posición luteolina y kaempferol, obtenidos por LC-ESI(+)-TOF-MS.

**Figura 35.** Espectro de masas del flavonoide kaempferol-3-rutinósido, obtenido por LC-ESI(+)-TOF-MS.

**Abreviaturas y Acrónimos**

AAPH	Hydrocloruro de 2,2'-azo-bis-(2-amidinopropano)
ABC	Área bajo la curva
AT	<i>Agilent Technologies</i>
BHT	Butylated hydroxytoluene (2,6-di- <i>terc</i> -Butil-4-metilfenol)
CAR-PDMS	<i>Carboxen</i> <sup>®</sup> / <i>Poly(dimethylsiloxane) Fiber</i> [Fibra de Carboxeno <sup>®</sup> /Poli(dimetilsiloxano)]
CAR-PDMS/DVB	<i>Carboxen</i> <sup>®</sup> / <i>Poly(dimethylsiloxane)/Divinylbenzene Fiber</i> [Fibra de Carboxeno <sup>®</sup> /Poli(dimetilsiloxano)/Divinilbenceno]
CENIVAM	Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas Medicinales Topicales
CIBIMOL	Centro de Investigación en Biomoléculas
CROM-MASS	Centro de Cromatografía y Espectrometría de Masas
$d_f$	Grosor de la fase estacionaria ( $\mu\text{m}$ )
D.I.	Diámetro interno de la columna cromatográfica (mm)
DMAPP	Difosfato de dimetilalilo
EE.UU.	Estados Unidos
<i>e.g.</i>	<i>Exempli Gratia</i> (Por ejemplo)
EI	<i>Electron Ionization</i> (Ionización con electrones)
ESI	<i>Electrospray Ionization</i> (Ionización por electronebulización)
FL	Fluoresceína
FPP	Difosfato de farnesilo

## BIOPROSPECCIÓN DE PLANTAS EN COLOMBIA

GC	<i>Gas Chromatography</i> (Cromatografía de gases)
GPP	Difosfato de geranilo
GGPP	Difosfato de geranilo geranilo
<i>i.e.</i>	<i>Id Est</i> (Es decir)
IPP	Difosfato de isopentilo
IRL	Índice de retención lineal
LC	<i>Liquid Chromatography</i> (Cromatografía líquida)
MEP	Fosfato de metileritrilo
MS	<i>Mass Spectrometry</i> (Espectrometría de masas)
MSPD	<i>Matrix Solid-Phase Dispersion</i> (Dispersión de la matriz en fase sólida)
<i>m/z</i>	Relación masa/carga
ORAC	<i>Oxygen Radical Absorbance Capacity</i> (Capacidad de absorción de radicales de oxígeno)
PAL	Enzima fenilalanina amonio liasa
PCA	Análisis de componentes principales
ROO <sup>·</sup>	Radical peróxido
SE	<i>Solvent Extraction</i> (Extracción con solvente)
SPE	<i>Solid-Phase Extraction</i> (Extracción en fase sólida)
SPME	<i>Solid-Phase Microextraction</i> (Microextracción en fase sólida)
TIC	<i>Total Ion Current</i> (Corriente iónica total)
TOF	<i>Time-of-Flight</i> (Tiempo de vuelo)
t <sub>R</sub>	Tiempo de retención

## BIOPROSPECCIÓN DE PLANTAS EN COLOMBIA

Trolox<sup>®</sup>                      *6-Hidroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid* (Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico)

## Resumen

**Título:** Identificación por GC-MS y LC-MS de metabolitos secundarios aislados de *Medinilla myriantha* (Melastomataceae) y evaluación de su actividad antioxidante\*

**Autor:** Luis Miguel Díaz Sánchez\*\*

**Palabras clave:** *Medinilla myriantha*, HS-SPME, MSPD, ORAC, Folin-Ciocalteu, GC-MS, LC-MS.

### Descripción:

La planta *Medinilla myriantha*, familia Melastomataceae, es originaria de Filipinas y se usa como frontera de arbustos.

El objetivo de este trabajo fue caracterizar los metabolitos secundarios presentes en la fracción volátil de flores, en extractos hidroalcohólicos y en extractos obtenidos por MSPD de hojas, flores, tallos y frutos de *M. myriantha* y evaluar su actividad antioxidante.

La extracción de los compuestos volátiles y semi-volátiles se realizó por HS-SPME, de flores en fresco; las fracciones volátiles, caracterizadas por GC-MS, se colectaron a las 6:00 a.m., 12:00 m. y 6:00 p.m., por triplicado, usando cinco recubrimientos diferentes de la fibra de microextracción en fase sólida (SPME, por sus siglas en inglés). Los extractos hidroalcohólicos y los extractos obtenidos por MSPD se analizaron por LC-MS. Se determinó la actividad antioxidante por el método ORAC y, los fenoles totales, por el método de Folin-Ciocalteu, en los extractos. El rendimiento de extracción por MSPD (30-45%) fue menor que el obtenido con solución hidroalcohólica (47-60%) para hojas, flores, tallos y frutos de *M. myriantha*. En la fragancia de las flores, la mayor área cromatográfica total correspondió al muestreo a las 6:00 a.m., usando el recubrimiento polimérico CAR-PDMS/DVB. Los compuestos mayoritarios fueron oct-1-en-3-ol, *n*-nonanal y nonanol. El análisis PCA mostró que los recubrimientos de líquidos iónicos presentan mayor afinidad por compuestos oxigenados alifáticos. Para encontrar las mejores condiciones del análisis por LC-ESI(+)-TOF-MS, se estudiaron las siguientes variables: fase móvil, voltajes de fragmentador y de capilar. En los extractos hidroalcohólicos y en los obtenidos por MSPD se identificaron y cuantificaron flavonoides derivados de kaempferol y cianidina-3-glucósido. Los extractos de hojas, flores, tallos y frutos de *M. myriantha*, presentaron valores ORAC y de fenoles totales mayores que las sustancias de referencia  $\alpha$ -tocoferol y BHT.

---

\*Proyecto de grado

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

Co-directores: Jairo R. Martínez, Químico Ph.D. y Jesica J. Mejía, Química.

### Abstract

**Title:** Identification by GC-MS and LC-MS of secondary metabolites isolated of *Medinilla myriantha* (Melastomataceae) and evaluation of its antioxidant activity\*

**Author:** Luis Miguel Díaz Sánchez\*\*

**Key words:** *Medinilla myriantha*, HS-SPME, MSPD, ORAC, Folin-Ciocalteu, GC-MS, LC-MS.

### Description:

*Medinilla myriantha*, family Melastomataceae, is a plant that has small flowers with pink hue and pearly appearance, its fruits are in the shape of a berry and grow in pendulous clusters. This plant is native to the Philippines and is used as a border of shrubs.

The objective of this work was to characterize the secondary metabolites present in the volatile fraction of flowers, in hydroalcoholic extracts and in extracts obtained by MSPD from leaves, flowers, stems and fruits of *M. myriantha* and to evaluate their antioxidant activity.

The extraction of the volatile and semi-volatile compounds was carried out by HS-SPME, of fresh flowers; volatile fractions, characterized by GC-MS, were collected at 6:00 a.m., 12:00 m. and 6:00 p.m., in triplicate, using five different coatings of the solid-phase microextraction fiber (SPME, for its acronym in English). Hydroalcoholic extracts and extracts obtained by MSPD were analyzed by LC-MS. The antioxidant activity was determined by the ORAC method and, the total phenols, by the Folin-Ciocalteu method. The yield of extraction by MSPD (30-45%) was lower than that obtained with hydroalcoholic solution (47-60%) for leaves, flowers, stems and fruits of *M. myriantha*. In the fragrance of flowers, the largest total chromatographic area corresponded to sampling at 6:00 a.m., using the polymer coating CAR-PDMS/DVB. The major compounds were oct-1-en-3-ol, n-nonanal and nonanol. The PCA analysis showed that ionic liquid coatings have a higher affinity for aliphatic oxygenated compounds. To find the best conditions of the analysis by LC-ESI(+)-TOF-MS, the following variables were studied: mobile phase, fragmenter and capillary voltages. In the hydroalcoholic extracts and those obtained by MSPD, flavonoids derived from kaempferol and cyanidin-3-glucoside were identified and quantified. The extracts of leaves, flowers, stems and fruits of *M. myriantha*, presented values ORAC and total phenols higher than the reference substances  $\alpha$ -tocopherol and BHT.

---

\*Undergraduate final proyect

\*\*Science Faculty, Chemistry School, Director: Elena E. Stashenko, Chemist, Ph.D.

Co-directors: Jairo R. Martínez, Chemist, Ph.D. and Jesica J. Mejía, Chemist.

## Introducción

La familia Melastomataceae es la séptima más grande de plantas con flores, posee alrededor de 200 géneros y hasta 4500 especies, extendidas en las regiones tropicales del mundo. En Suramérica, se encuentran cerca de 166 géneros (Renner, 1993). Estas especies suelen crecer en sitios húmedos y boscosos de las cordilleras, muchas veces sobre suelos ácidos, ricos en aluminio o materia orgánica (Quiñones, 2001 y Isaza *et al.*, 2007).

Esta familia ha sido poco estudiada desde el punto de vista fitoquímico y quimiotaxonómico. Solo unas pocas especies han sido estudiadas con alguna profundidad. Los metabolitos secundarios mayoritarios de esta familia son compuestos polifenólicos, algunos flavonoides y antocianinas (Isaza *et al.*, 2007 y Isaza *et al.*, 2004). La familia Melastomataceae está compuesta por árboles, arbustos o hierbas, generalmente terrestres, a veces trepadoras, con hojas opuestas, simples, enteras o dentadas, flores dispuestas en cimas terminales o laterales, perfectas, frutos en forma de bayas con semillas pequeñas y numerosas. A esta familia, pertenecen los géneros *Miconia*, *Meriania*, *Loreya*, *Medinilla*, entre otros (Fontana y Rhynchanthera, 1991).

El género *Medinilla* comprende cerca de 200 especies (Mabberly, 2008, p.1021) de arbustos y trepadoras epífitas terrestres, que crecen desde el Sur Este de África hasta la India, el Sur de China, Taiwan, Nueva Guinea y el Norte de Australia (Fernando y Belete, 2013).

En este trabajo, se estudió la planta *Medinilla myriantha*, originaria de Filipinas (Fernando y Belete, 2013), que posee hojas perennes grandes y verdes. Es una planta que puede alcanzar hasta 1.6 m de altura y 1.5 m en amplitud, con baja tolerancia a las sequías, por lo que, normalmente, se encuentra en suelos húmedos y ácidos. Presenta flores pequeñas con tonalidad

## BIOPROSPECCIÓN DE PLANTAS EN COLOMBIA

rosa y apariencia perlada, que crecen en racimos pendulares. Las flores son de 1 cm de diámetro, aproximadamente, y los frutos tienen forma de bayas, con diámetro de *ca.* 0.6 cm, son de color rosado y violeta, cuando están totalmente maduros (Jarrett, 2003, p.74).

*M. myriantha* se usa comúnmente con fines ornamentales y como frontera de arbustos (Jarrett, 2003); no obstante, según su composición química, se le pueden asignar otras aplicaciones, *e.g.* en cosmética puede ser utilizada como materia prima para obtener pigmentos naturales u otros ingredientes naturales bioactivos (Botterweck *et al.*, 2000 y Lenaerts, 2006).

En este trabajo, se estudió la fracción volátil de las flores de *M. myriantha* por la técnica de microextracción en fase sólida (SPME, por sus siglas en inglés), con fibras de diferentes recubrimientos poliméricos; así como extractos hidroalcohólicos y extractos obtenidos por dispersión de la matriz en fase sólida (MSPD, por sus siglas en inglés) de las diferentes partes de la planta.

Se identificaron los polifenoles presentes en flores, tallos, hojas y frutos de la planta, y se evaluó la capacidad antioxidante de los extractos.

Para la identificación de los compuestos volátiles emitidos por las flores de *M. myriantha*, se empleó cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS); para la separación, identificación y cuantificación de los compuestos obtenidos por extracción sólido-líquido y MSPD, se usó cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS); para la evaluación de la capacidad antioxidante, se utilizó el ensayo ORAC (capacidad de absorción de radicales de oxígeno) y, finalmente, el contenido de fenoles totales se determinó por el método de Folín-Ciocalteu.

## BIOPROSPECCIÓN DE PLANTAS EN COLOMBIA

Este proyecto contribuye al estudio de los extractos de la especie *M. myriantha*, identificación en ellos de compuestos con actividad biológica, para, de esta manera, propiciar futuras aplicaciones de la planta como fuente de ingredientes naturales en diferentes productos de consumo humano. Esta investigación hace parte del proyecto de Joven Investigador de Pregrado, Convocatoria 738 de Colciencias, financiado por Colciencias-SENA, y ha sido desarrollado en el Centro de Investigación en Biomoléculas, CIBIMOL, de la Universidad Industrial de Santander.

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

### 3. Marco Referencial

#### 3.1 Marco Teórico

*M. myriantha*, familia Melastomataceae, es una planta originaria de Filipinas (Jarrett, 2003, p.74), alcanza hasta 1.6 m de altura, posee pequeñas flores perfectas de aproximadamente 2 cm de diámetro con una masa promedio de 0.1 g; las flores se caracterizan por su color rosa y su apariencia perlada o brillante; se producen en grandes panículas en tallos colgantes. Las hojas de *M. myriantha* son verdes y pueden alcanzar hasta los 20 cm de longitud y 13 cm de diámetro (Véase **Figura 1**); los frutos tienen forma de bayas, de 0.6 cm de diámetro, aproximadamente,

## BIOPROSPECCIÓN DE PLANTAS EN COLOMBIA

son de color rosado o violeta, cuando están totalmente maduros (Fernando y Belete, 2013 y Jarrett, 2003, p.74).



**Figura 1.** Planta *M. myriantha*. Fotos tomadas por el autor en el CENIVAM, UIS, 11 de septiembre de 2015. A. Aspecto general de la planta en florecimiento. B. Flor de la planta con visitante floral. C. Frutos de la planta.

Las flores (Véase **Figura 1 B**), pueden llegar a alcanzar hasta 2 cm de diámetro y estar unidas al racimo durante 2 días; en las noches, las flores se cierran para abrirse nuevamente al día siguiente y permitir su polinización.

El desarrollo del racimo (Véase **Figura 1**) puede tardar hasta 2 meses, desde el inicio de la formación hasta la obtención de frutos con tonalidad violeta. El tiempo de vida del racimo puede llegar a los 5 meses, hasta que cada uno de los frutos haya madurado por completo, es decir, presente una tonalidad mucho más oscura. Aunque externamente los frutos son de color violeta, su interior es claro, carnosos y contiene pequeñas semillas esféricas.

## BIOPROSPECCIÓN DE PLANTAS EN COLOMBIA

La identificación taxonómica de la planta se muestra a continuación (Colecciones científicas, 2017):

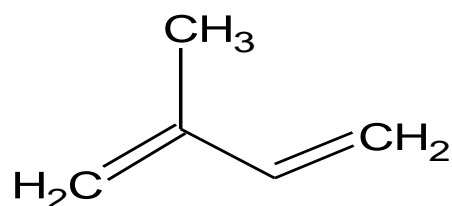
<b>REINO</b>	<b>PLANTAE</b>
<b>Phylum</b>	Embryophyta
<b>Clase</b>	Spermatopsida
<b>Orden</b>	Myrtales
<b>Familia</b>	Melastomataceae
<b>Género</b>	<i>Medinilla</i>
<b>Especie</b>	<i>myriantha</i>

**3.1.1. Fragancia de las flores.** Las plantas son organismos vivos que deben adaptarse al medio en que se encuentran, es por esto que han desarrollado diversos mecanismos que les permiten interactuar con el ambiente; por ejemplo, liberar compuestos orgánicos volátiles (VOC), llamados metabolitos secundarios, por parte de hojas, flores, tallos y frutos. En la actualidad, se han reportado más de 1700 de estos compuestos, en más de 90 familias de plantas (Knudsen y Gershenzon, 2006, p. 27-52), pero esta cifra solo es, aproximadamente, el 1% de todos los metabolitos secundarios de las plantas conocidas, los cuales están constituidos principalmente por fenilpropanoides/bencenoides y terpenoides, cuya concentración puede variar de pg a µg por kg de material vegetal (Dudareva et al., 2004).

Los conjugados de fenilpropanoides con aminos, se incorporan a la pared celular para aumentar su rigidez y reducir su digestibilidad por parte de herbívoros e insectos (Ávalos y Pérez, 2009). Los terpenoides, entre los cuales se encuentran hormonas, aceites esenciales y pigmentos, son el grupo más grande de los metabolitos secundarios; estos compuestos se derivan del isopreno (Véase *Figura 2*).

## BIOPROSPECCIÓN DE PLANTAS EN COLOMBIA

Los terpenos se clasifican, según las unidades de isopreno que tenga su estructura. Así, los terpenos de  $C_{10}$  son monoterpenos, los  $C_{15}$  son sesquiterpenos,  $C_{20}$  son diterpenos, los  $C_{30}$  son triterpenos, los  $C_{40}$  son tetraterpenos, y se hace referencia como politerpenos a las moléculas con más de ocho unidades de isopreno. Estas moléculas, conformadas por unidades de isopreno, podrían funcionar como protectores contra el daño causado por el ozono; protegen a la planta del daño causado por las temperaturas altas, quizás, por su interacción con las membranas de los tilacoides (Ávalos y Pérez, 2009; Sepúlveda *et al.*, 2003 y Logan *et al.*, 2000).



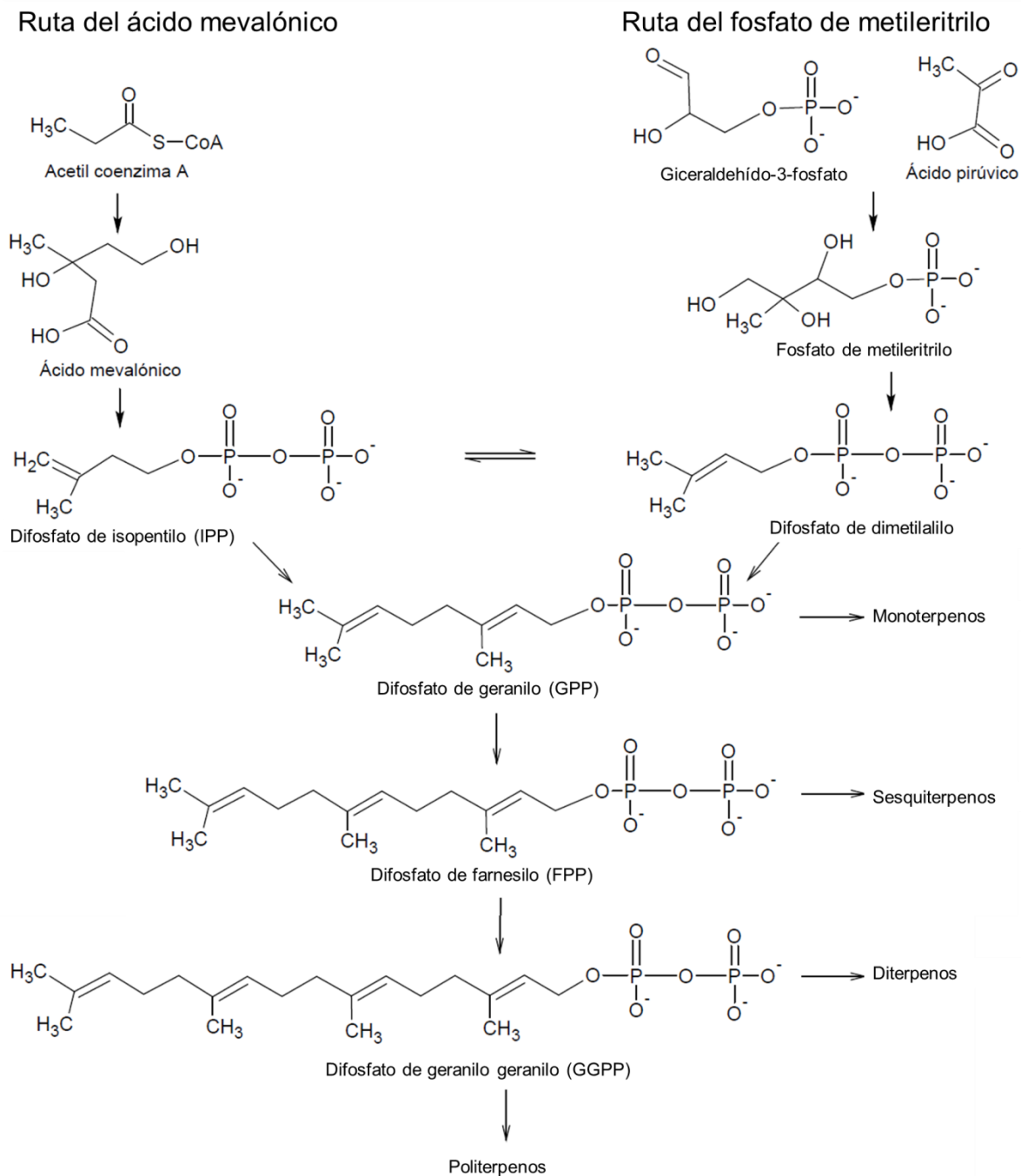
**Figura 2.** Estructura química del isopreno ( $C_5H_8$ ).

Los terpenos se sintetizan por dos rutas metabólicas, a partir de metabolitos primarios, a saber: Ruta del ácido mevalónico, cuando tres moléculas de acetil-coenzima A forman el ácido mevalónico, el cual es fosforilado en el grupo hidroxilo del alcohol primario, luego, es descarboxilado y deshidratado, con formación del difosfato de isopentenilo (IPP,  $C_5$ ), unidad básica de cinco carbonos de los terpenos. El IPP se convierte enzimáticamente a su isómero, difosfato de dimetilalilo (DMAPP), se establece un equilibrio entre ambos. Estos son los precursores en la biosíntesis de terpenos. La segunda ruta del fosfato de metileritrilo (MEP), que se realiza en los cloroplastos, cuando el DMAPP se sintetiza por una reducción del

## BIOPROSPECCIÓN DE PLANTAS EN COLOMBIA

gliceraldehído-3-fosfato y un derivado del piruvato (ácido pirúvico) (Véase *Figura 3*) (Taiz y Zeiger, 2000, p. 534-538).

El IPP (“cabeza”) y el DMAPP (“cola”), producen uniones del tipo “cabeza-cola” para formar el difosfato de geranilo (GPP, C<sub>10</sub>), que puede unirse nuevamente a un IPP para formar el difosfato de farnesilo (FPP, C<sub>15</sub>), precursor de casi todos los sesquiterpenos. De la misma manera, se puede formar el difosfato de geranilo geranilo (GGPP, C<sub>20</sub>), precursor de los diterpenos; cuando se dimerizan estas moléculas, forman triterpenos y tetraterpenos, respectivamente (Taiz y Zeiger, 2000, p. 534-538).



**Figura 3.** Esquema general de la biosíntesis de terpenos.

La fragancia de las flores, en muchas ocasiones, se percibe como agradable, gracias al conjunto complejo de moléculas volátiles y semivolátiles presentes. Entre las funciones biológicas de la fragancia, figura la defensa de la planta de peligros presentes en el entorno,

## BIOPROSPECCIÓN DE PLANTAS EN COLOMBIA

repelencia directa de invasores o atracción de depredadores naturales que ataquen a estos herbívoros. Esta forma de interacción de las plantas, por medio de compuestos volátiles, no solo les ayuda a defenderse de un ataque de herbivoría, también, permite que las demás plantas preparen su defensa antes de ser atacadas. Los volátiles se usan como una ventaja reproductiva frente a otras plantas, ayudan a promover la polinización cruzada, que es un proceso vital en el ciclo de vida de la mayoría de las plantas (Reinhard *et al.*, 2004; De Moraes *et al.*, 2001; Vancanneyt *et al.*, 2001; Stashenko *et al.*, 2013; Mercke *et al.*, 2004 y Kessler *et al.*, 2001).

La fragancia de las plantas es una señal para que los polinizadores las puedan diferenciar o reconocer (Knudsen y Tollsten, 1993). La cantidad de compuestos volátiles sintetizados y emitidos por la planta puede variar. Esto depende tanto de factores intrínsecos de la especie, como de factores extrínsecos: las condiciones adversas en las que se encuentre, el estado de polinización de sus flores, temperatura, luz, humedad, tipo de suelo, ataque por herbívoros o microorganismos, *e.g.* bacterias y hongos [Sepúlveda *et al.*, 2003; Kessler *et al.*, 2001; Henderson, 1986).

Los compuestos volátiles cumplen diferentes funciones en la interacción de la planta con su entorno, y es por esto que su análisis suscita mucho interés científico, dando como resultado, el desarrollo de técnicas cada vez más sensibles para detectar estas moléculas (D'Alessandro y Turlings, 2006). Para su extracción existen métodos de colección estáticos y dinámicos en materiales adsorbentes, seguidos por una desorción térmica o desorción con solvente, y posteriormente una separación cromatográfica e identificación usando un espectrómetro de masas (Tholl *et al.*, 2006).

**3.1.2. Polifenoles.** En las plantas existen polifenoles, que poseen en sus estructuras varios grupos hidroxilo en anillos bencénicos. Se ha demostrado (Kawsar *et al.*, 2008) que estas moléculas tienen una alta capacidad antioxidante y se encargan de mantener el estado de óxido-reducción de la célula, por su facilidad de ceder un átomo de hidrógeno. Estos compuestos pueden clasificarse en varios grupos, entre ellos, taninos, ligninas, cumarinas, estilbenos, ácidos fenólicos, flavonoides; los dos últimos grupos son los más abundantes.

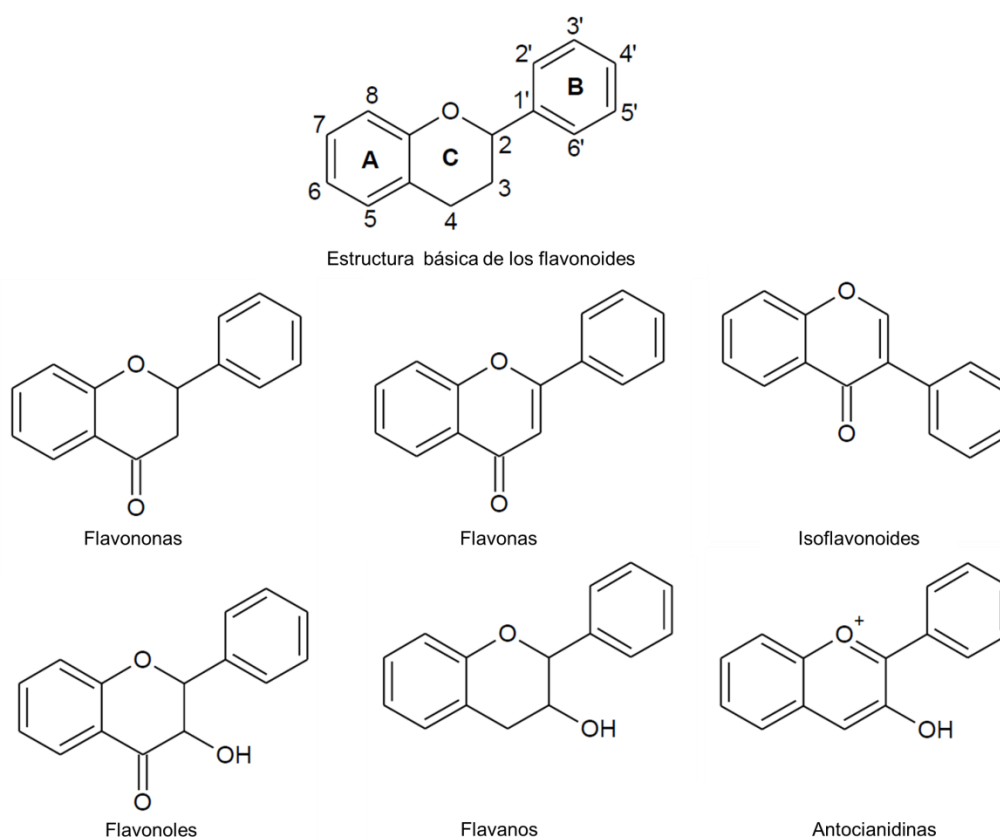
Los ácidos fenólicos son compuestos orgánicos que poseen en su estructura un anillo fenólico y un grupo carboxílico. Se clasifican dependiendo del número de grupos hidroxilo presentes, como, mono-, di- o trihidroxibenzoicos, pueden encontrarse en su forma libre, como ésteres, glucósidos o formando complejos que cumplen roles de resistencia a patógenos y herbívoros (Kawsar *et al.*, 2008). Por otra parte, los flavonoides muestran importancia biológica y fisiológica, e influyen también en la salud humana y animal (Kawsar *et al.*, 2008 y Rijke *et al.*, 2006). Los flavonoides se almacenan en vacuolas de la célula debido a su solubilidad alta en agua (Edwards y Gatehouse, 1999); así mismo, su incorporación a la pared celular, aumenta su rigidez y reduce su digestibilidad por parte de herbívoros e insectos (Pearce *et al.*, 1998).

Los primeros flavonoides se aislaron e identificaron en 1936 por el doctor Albert Szent-Györgyi, bioquímico húngaro, quien ganó el Premio Nobel por descubrir la vitamina C; demostró que los flavonoides mejoran la función de esta vitamina, protegiéndola de la oxidación (Flavonoids, 2016 y Berkoff, 2017). El término “flavonoide” representa un grupo bastante amplio de compuestos que pertenecen a los polifenoles; estas moléculas están ampliamente distribuidas en el reino vegetal y se encuentran en las plantas vasculares, en forma libre o en forma de glucósidos. Actúan como señales químicas que sirven para guiar a aves, abejas y otros insectos polinizadores hacia el néctar, lo que facilita, indirectamente, la polinización de la planta.

## BIOPROSPECCIÓN DE PLANTAS EN COLOMBIA

También, se ha reportado (Wilson y Greenberg, 1993) una relación directa entre la resistencia a la radiación UV-B y la concentración de flavonoides, por ejemplo, en la planta *Brassica napus* L.

Los flavonoides presentan una estructura de anillos, formada por 15 carbonos, con dos anillos aromáticos (A y B), unidos por un anillo heterocíclico C de tres carbonos, que generalmente contienen grupos hidroxilo en las posiciones 3, 3', 4, 5, 5' o 7 (Véase **Figura 4**). Estos compuestos se clasifican en flavononas, flavonas, isoflavonoides, flavonoles, flavanos y antocianidinas (Cartaya y Reynaldo, 2001).



**Figura 4.** Estructura básica de los flavonoides y su clasificación.

Compuestos de este tipo se utilizan como saborizantes naturales. Un ejemplo de esto, es una mezcla de varios flavonoides de cebolla, manzana y té, que se usan como sustitutos para la sal de

## BIOPROSPECCIÓN DE PLANTAS EN COLOMBIA

cocina. Esta mezcla, además de ser un saborizante, tiene una alta capacidad antioxidante (Ochoa y Ayala, 2004).

Los flavonoides se sintetizan por la ruta del ácido shikímico. Es cuando carbohidratos simples, derivados de la glicólisis, se transforman en ácidos orgánicos. En la biosíntesis, el *p*-cumaroil-CoA obtenido a partir de la L-fenilalanina se somete a una reacción de condensación con tres moléculas de malonil-CoA formando un intermediario chalcona, que es el precursor de la antocianina, por medio de hidroxilación y dos deshidrataciones; al final, la molécula se estabiliza por la sustitución de un hidrógeno del hidroxilo presente en la posición 3 de la antocianidina, por un azúcar, tal como se muestra en la **Figura 5**. La enzima fenilalanina amonio liasa (PAL) juega un papel importante, pues dirige la biosíntesis hacia la producción de flavonoides; se ha encontrado una correlación directa entre el estado de maduración de frutos de fresa y la actividad de PAL (Harborne y Mabry, 1982, p. 641-679). La concentración de antocianinas se incrementa con la maduración, por eso, estos compuestos son indicadores del estado de maduración.

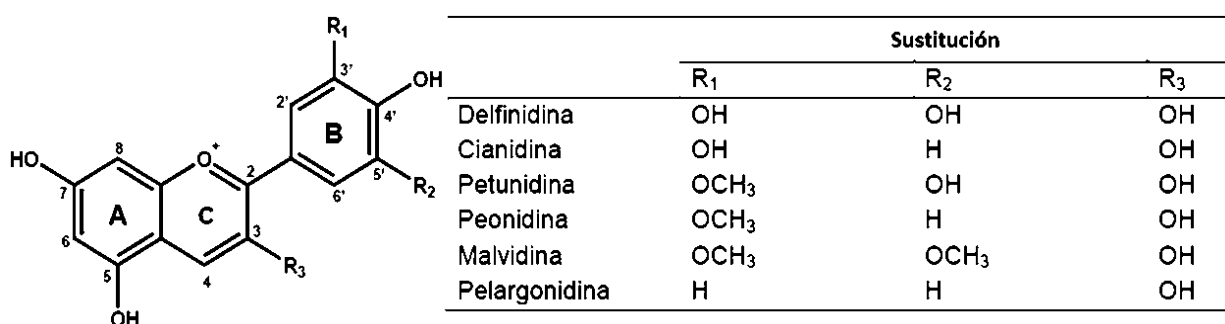


## BIOPROSPECCIÓN DE PLANTAS EN COLOMBIA

Las antocianinas, productos de la ruta de síntesis mostrada en la **Figura 5**, están formadas por dos anillos aromáticos unidos por una unidad de tres carbonos.

La aglicona o antocianidina raramente existe libre en las plantas; es más común encontrarla en su forma glucosilada. Los nombres de las antocianinas se derivan de la fuente de donde fueron extraídas por primera vez; la combinación de las antocianidinas con diferentes azúcares da lugar a cerca de 150 antocianinas (Aguilera *et al.* 2011). El azúcar en la molécula mejora su solubilidad en agua; suele unirse en la posición 3 del anillo fenólico, aunque también puede hacerlo en las posiciones 5 y 7. Los carbohidratos más comunes son glucosa, ramnosa y arabinosa (Aguilera *et al.* 2011).

El color de las antocianinas y antocianidinas está relacionado con varios factores, tales como los sustituyentes que posean y la posición de cada uno de éstos en la molécula (Aguilera *et al.* 2011; López *et al.*, 2007). Así, las antocianidinas se diferencian dependiendo del grupo sustituyente  $R_1$  y  $R_2$ , como se muestra en la **Figura 6**.

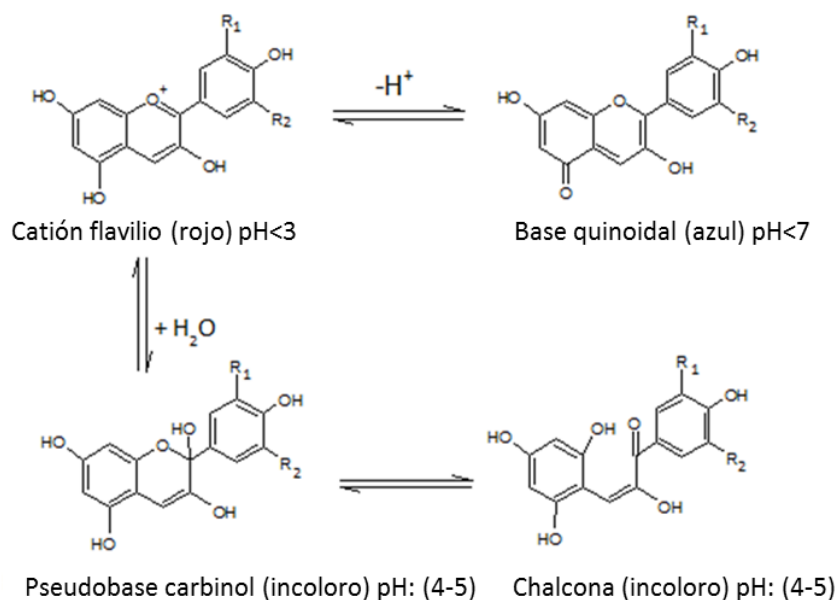


**Figura 6.** Estructura básica de las antocianidinas.

## BIOPROSPECCIÓN DE PLANTAS EN COLOMBIA

Por ejemplo, si se aumentan los grupos metoxilo en el anillo fenólico B, se intensifica la tonalidad roja, mientras que si se cambian estos grupos metoxilo por grupos hidroxilo, la tonalidad pasa a ser azul (Aguilera *et al.* 2011; Badui, 2006, p. 379-428).

Las antocianinas son sensibles a las variaciones de pH (Véase **Figura 7**). En general, presentan tonalidad roja en medio ácido. Pauling en 1939 explicó la tonalidad de estas moléculas (Gould *et al.*, 2009, p. 85-87): propuso que la estructura resonante del ion flavilio era la responsable de su intensidad. Son termolábiles, presentan pérdida de color con la temperatura, debido a que se degradan. El carácter polar de estas moléculas permite su solubilidad en diferentes solventes, como acetona, alcoholes y agua. Por otra parte, la estructura de las antocianinas no se modifica por el cambio de presión, ni por el estrés mecánico que pueda sufrir la planta (Ewald *et al.*, 1999; Frank *et al.*, 2012, Rodríguez *et al.*, 1999).



**Figura 7.** Cambios en la estructura de las antocianidinas con el pH.

## BIOPROSPECCIÓN DE PLANTAS EN COLOMBIA

Las reacciones de transferencia de protón compiten cinéticamente y termodinámicamente con la hidratación del catión flavilio, con una constante de equilibrio mayor que la constante de equilibrio de la hidratación (Brouillard y Delaporte, 1997) (Véase *Figura 7*). Mediante un equilibrio tautomérico la pseudobase carbinol da paso a la apertura del anillo intermedio y se transforma a chalcona. Entre dos formas *cis*-chalcona y *trans*-chalcona existe un equilibrio que se alcanza lentamente (Timberlake y Bridle, 1997). Algunos resultados de degradación de antocianinas demuestran que estas moléculas son estables a  $\text{pH} < 4$ , aunque este valor está relacionado con la temperatura, que debe ser menor de  $45\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Kirca *et al.*, 2007; Xang y Xu, 2007 y Hutchings, 1999, p. 550-551).

Las antocianinas se utilizan como pigmentos biodegradables y solubles en agua; tienen propiedades antioxidantes y citotóxicas, pueden ser apropiadas como agentes antisolares, por su alta absorbancia de la radiación UV (Garzón, 2008; Cooke *et al.*, 2005; Kong *et al.*, 2003).

### 3.1.3. Técnicas de extracción.

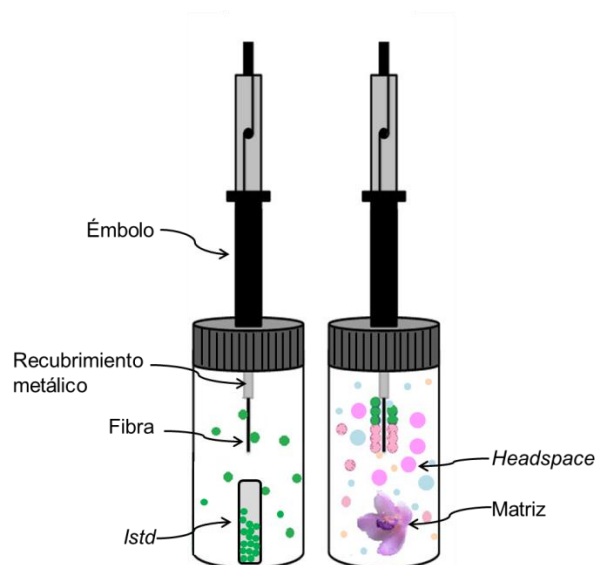
**3.1.3.1. Microextracción en fase sólida.** Las extracciones convencionales de metabolitos secundarios volátiles y semi-volátiles a menudo requieren mucho tiempo y, en algunas ocasiones, la cantidad de extracto obtenida, puede no ser suficiente, por lo que se recurre al enriquecimiento de analitos con sucesivas extracciones, para obtener la cantidad de muestra suficiente. Ante la necesidad de una técnica de extracción rápida, tanto en el laboratorio como en el campo, y que, además, cuente con límites de detección bajos y sea de manejo fácil, Pawliszyn y Arthur desarrollaron en 1990 (Pawliszyn y Arthur, 1990; Pawliszyn, 2012, p. 7-44) la técnica de microextracción en fase sólida (SPME).

## BIOPROSPECCIÓN DE PLANTAS EN COLOMBIA

La SPME emplea una pequeña cantidad de un polímero o fase de extracción, que está soportado sobre una fibra de sílice fundida. Este polímero se expone a la muestra por un periodo de tiempo definido, que si es suficiente, permite establecer un equilibrio de concentración de analitos entre la matriz y la fase de extracción (Pawliszyn, 2000; Pawliszyn, 1995).

SPME es una técnica alternativa a la extracción en fase sólida (SPE, por sus siglas en inglés), que se lleva a cabo con la absorción de las sustancias de interés sobre un soporte sólido modificado, que se eluyen luego con un solvente. En la SPME, se usa una fibra, recubierta con un polímero de sílice fundida modificada químicamente, que puede actuar como fase de extracción adsorbente a la que se unen las moléculas a analizar, dependiendo de su afinidad química, para luego desorberse en un equipo cromatográfico; en SPME, se emplea desorción térmica, con lo que, se eliminan algunos pequeños inconvenientes que se presentan en SPE. Dichos inconvenientes se deben a que existe una variación considerable entre los productos ofrecidos por diferentes fabricantes, así como pequeñas variaciones entre lotes producidos; además, el material plástico usado en SPE, puede absorber el analito y aumentar las interferencias en el análisis. SPME conserva las ventajas de SPE, pero reduce o elimina el consumo de solventes de alta pureza y el tiempo de extracción (Pawliszyn, 2012).

Esta técnica se puede llevar a cabo en modos de extracción directa, extracción con membrana protectora y extracción en el *headspace*. Para este proyecto, fue de especial interés este último, donde el analito se traslada al espacio de cabeza debido al equilibrio dinámico y, una vez ahí, éste puede alcanzar el recubrimiento de la fibra (Véase **Figura 8**). De esta manera, se eliminan interferencias en el análisis, producidas por moléculas no volátiles presentes en la matriz (Pawliszyn y Arthur, 1990).

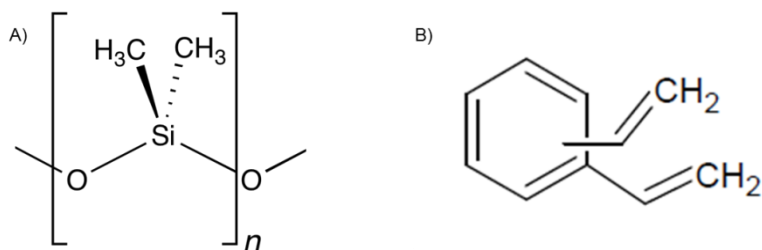


**Figura 8.** Esquema del montaje para muestreo de la fase vapor por SPME.

En este trabajo, los siguientes recubrimientos comerciales se usaron sobre la fibra de SPME, a saber: CAR-PDMS/DVB y CAR-PDMS y, también se utilizaron recubrimientos de líquidos iónicos sintetizados en el laboratorio del Prof. Dr. Jared L. Anderson (Ames, Iowa, EE.UU.):  $\text{ViC}_{16}\text{Im-NTf}_2/(\text{ViBzIm})_2\text{C}_{12}\text{-2NTf}_2$ ,  $\text{ViC}_6\text{Im-Cl}/(\text{Vilm})_2\text{Cl}_{12}\text{-2Br}$  y  $\text{ViC}_{16}\text{Im-NTf}_2/(\text{Vilm})_2\text{C}_{12}\text{-2NTf}_2$ .

Carboxeno (CAR), es un tamiz molecular de carbono poroso, adsorbente (Características del Carboxeno<sup>®</sup>, 2017). Poli(dimetilsiloxano) (PDMS) es un polímero, en que ocurre absorción y, el divinilbenceno, es un monómero insaturado que actúa como entrecruzador (Características del divinilbenceno<sup>®</sup>, 2017) (Véase **Figura 9**).

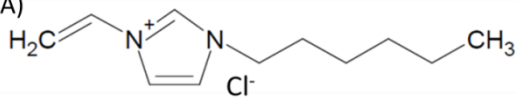
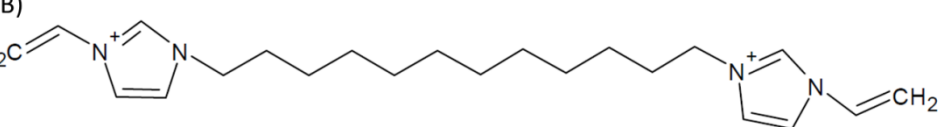
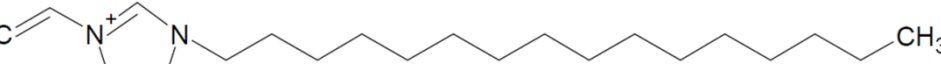
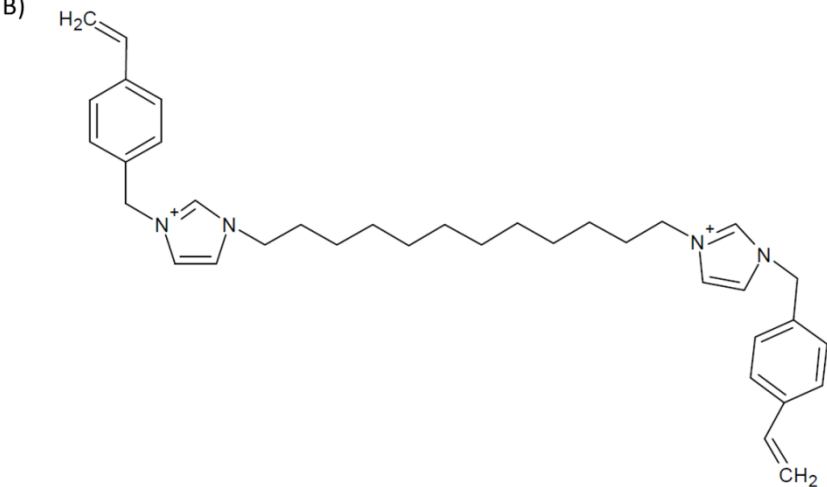
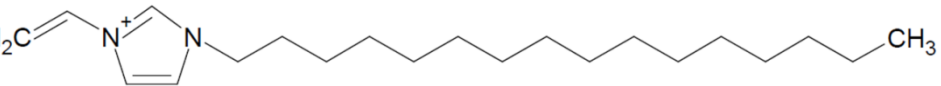
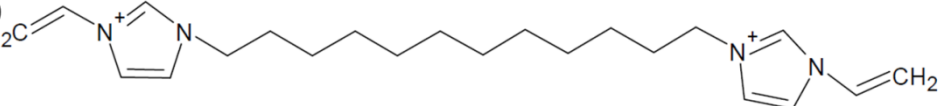
## BIOPROSPECCIÓN DE PLANTAS EN COLOMBIA



**Figura 9.** Monómeros de A. Polidimetilsiloxano, PDMS; B. Divinilbenceno, DVB.

Los monómeros que conforman los recubrimientos de líquidos iónicos poliméricos sobre las fibras de SPME, están constituidos por un anillo imidazol, con una ramificación de C<sub>6</sub> o C<sub>12</sub> en el nitrógeno de la posición 3 del anillo; cada recubrimiento usa un entrecruzador, que le permite formar el líquido iónico polimérico, como se muestra en la **Tabla 1**.

**Tabla 1.***Recubrimientos de líquidos iónicos poliméricos sobre las fibras de SPME.*

Fibra	Estructuras
ViC <sub>6</sub> Im-Cl/(Vilm) <sub>2</sub> Cl <sub>12</sub> -2Br	<p>A) </p> <p>B) </p>
ViC <sub>16</sub> Im-NTf <sub>2</sub> /(ViBzIm) <sub>2</sub> C <sub>12</sub> -2NTf <sub>2</sub>	<p>A) </p> <p>B) </p>
ViC <sub>16</sub> Im-NTf <sub>2</sub> /(Vilm) <sub>2</sub> C <sub>12</sub> -2NTf <sub>2</sub>	<p>A) </p> <p>B) </p>

*Nota:* A. Monómero; B. Entrecruzador.

## BIOPROSPECCIÓN DE PLANTAS EN COLOMBIA

Los recubrimientos de líquidos iónicos poliméricos sobre las fibras de SPME pueden obtenerse usando una relación 1:1 entre los entrecruzadores y los monómeros, que aparecen en la **Tabla 1**; además, del compuesto darocur 1173 (3%), una cetona aromática, con fórmula molecular  $C_{10}H_{12}O_2$ , que actúa como iniciador para la fotopolimerización.

Se han reportado (Ariza *et al.*, 2007) diferentes estudios de las aplicaciones de SPME en las industrias de perfumes, cosmética, sabores y fragancias, y en el análisis de metabolitos secundarios en plantas, análisis de aldehídos y carboxilos volátiles por medio de derivatización (Stashenko y Martínez, 2007; Stashenko *et al.*, 2002), entre muchos otros.

Zhao *et al.* (2008), determinaron que los recubrimientos de líquidos iónicos sobre las fibras de SPME muestran valores de porcentajes de recuperación más altos (70.2%) comparados con los valores obtenidos con una fibra de poli(dimetilsiloxano) comercial (61.9%), en muestras de vinos tinto y vinos blancos.

**3.1.3.2. Extracción con solventes.** La extracción con solventes es una extracción sólido-líquido, para separar unos componentes de interés, que hacen parte de la muestra. El solvente debe ser seleccionado dependiendo del tipo de sustancias a extraer. Con el fin de aumentar la transferencia de masa desde la matriz hacia el solvente, se pueden modificar las variables que intervienen en este proceso, *i.e.*, temperatura, agitación, presión, tipo de solvente, tiempo de extracción, sonicación, entre otros (Gao y Liu, 2005; Vinatoru, 2001).

Las extracciones presentan una gran importancia en el desarrollo de investigación científica; es por esto que se buscan métodos más eficientes para su realización. Una alternativa más económica y fácil de manejar, en comparación con los métodos tradicionales de extracción (*e.g.*,

## BIOPROSPECCIÓN DE PLANTAS EN COLOMBIA

extracción por método *Soxhlet*), es la extracción asistida por ultrasonido, que utiliza sonidos de alta frecuencia que hacen vibrar los analitos de interés y acelerar su paso al solvente, dándose el fenómeno de cavitación, *i.e.*, la formación de pequeñas burbujas de gas, dentro del líquido, las cuales facilitan la transferencia de masa de la matriz al solvente. Las variables que se pueden cambiar y estandarizar usando extracción asistida por ultrasonido, son temperatura, tipo de solvente, volumen de solvente, tiempo de extracción, potencia del ultrasonido y duración del ciclo (Vinatoru, 2001; Rostagno *et al.*, 2003 y Cabredo *et al.*, 2006).

Existen diferentes estudios (Azuola y Vargas, 2007; Rojas *et al.*, 2014) de aplicaciones de las extracciones con solvente en el análisis de metabolitos secundarios en plantas, separación de mezclas, productos de síntesis, entre otros.

**3.1.3.3. Extracción por dispersión de la matriz en fase sólida.** La extracción por medio de dispersión de la matriz en fase sólida (MSPD, por sus siglas en inglés) se usa para la extracción de sustancias polares, semivolátiles y no volátiles. La cantidad de muestra requerida no es una limitante para esta técnica de extracción, se puede usar ca. 0.2 g. MSPD incluye un soporte sólido, un agente dispersante y un solvente para la elución. La sílice unida a cadenas de C<sub>18</sub> es una fase sólida ampliamente utilizada, por lo que, en este caso, la homogeneización de la muestra y la extracción de los compuestos, se da en un solo paso. Como agente dispersante se usa un solvente orgánico volátil y, como solvente de elución, una mezcla de alcoholes. Estas condiciones se emplean para la extracción de compuestos orgánicos, fármacos y pesticidas. Los extractos obtenidos pueden ser analizados por cromatografía de gases o líquida (Rijke *et al.*, 2006; Barker, 2000; Capriotti *et al.*, 2013).

## BIOPROSPECCIÓN DE PLANTAS EN COLOMBIA

MSPD requiere poca cantidad de muestra y de solventes; se realiza a temperatura ambiente y a presión atmosférica, lo que la hace, una técnica práctica y de manejo fácil (Barker, 2000).

Entre las aplicaciones de la extracción con MSPD figuran el análisis de fármacos, pesticidas, metabolitos secundarios en plantas, entre otros (Rijke *et al.*, 2006; Barker, 2000; Capriotti *et al.*, 2013).

**3.1.4. Evaluación de la capacidad antioxidante y contenido total de fenoles.** La oxidación de metabolitos secundarios en plantas puede producirse por radicales, que son especies neutras con electrón(es) desapareado(s), lo que las hace altamente reactivas con los componentes de la membrana celular (Wanasundara y Shahidi, 2005). Existen moléculas, como algunos polifenoles, que actúan como agentes antioxidantes, *i.e.*, se oxidan primero que los ácidos grasos que hacen parte de la célula (*e.g.*, bicapa lipídica de la membrana celular), protegiéndola del daño de los radicales libres (Wanasundara y Shahidi, 2005).

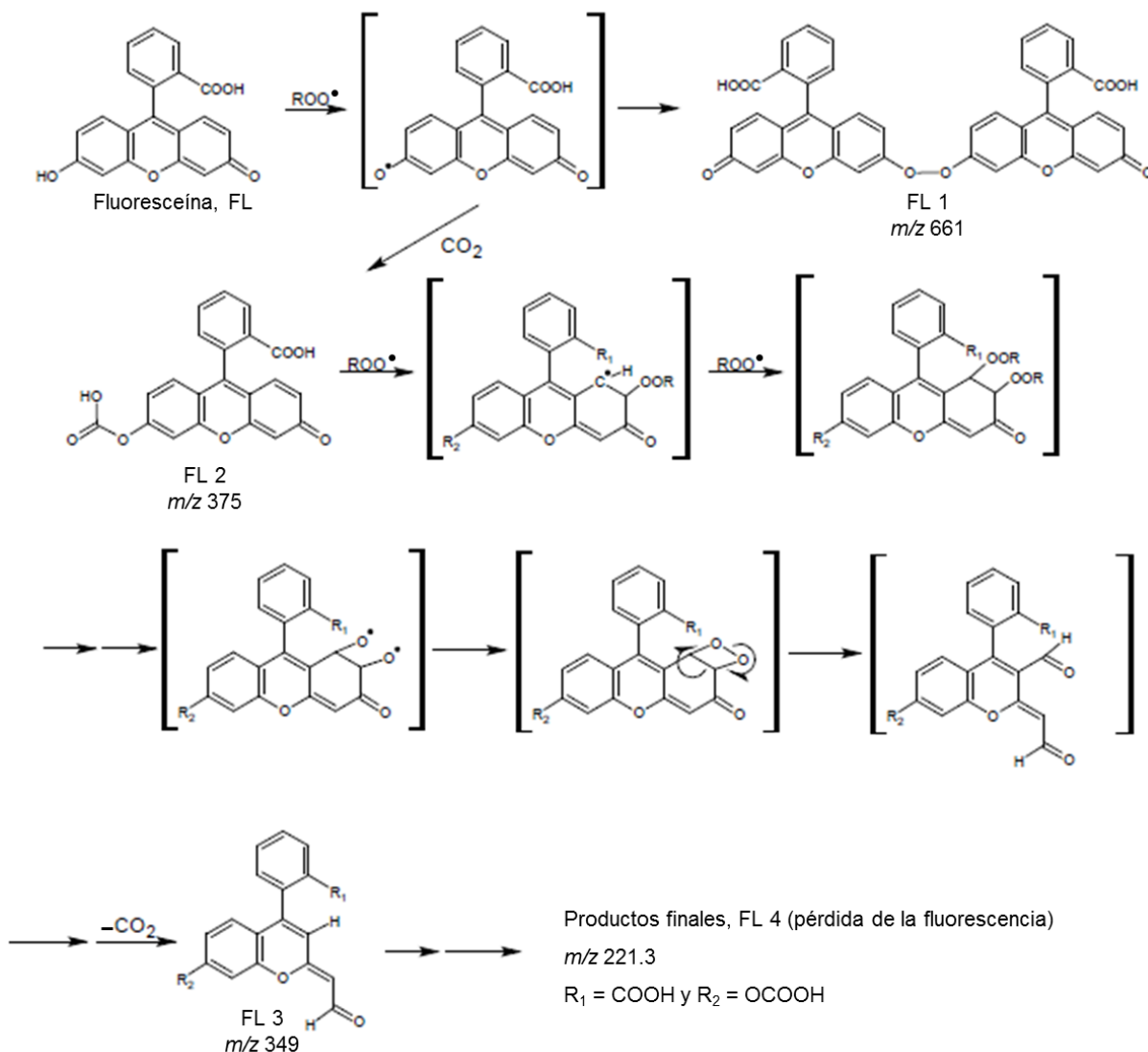
Los antioxidantes más conocidos son las vitaminas C, E ( $\alpha$ -tocoferol) y carotenoides. Se ha demostrado, que los flavonoides dependiendo de sus estructuras presentan capacidad antioxidante alta, en algunas ocasiones, hasta 50 veces mayor que la de la vitamina E (Berkoff, 2017; Hogan *et al.*, 2010).

**3.1.4.1. Capacidad de absorción de radicales de oxígeno.** El método de la capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC, por sus siglas en inglés) se emplea para determinar la capacidad antioxidante de sustancias puras o mezclas de compuestos, como extractos,



## BIOPROSPECCIÓN DE PLANTAS EN COLOMBIA

radicales peroxilo también pueden reaccionar con los enlaces dobles de FL2, produciendo un intermediario endoperóxido, que forma FL3 ( $m/z$  349), al descomponerse. Si se continúa la oxidación, se forma FL4 ( $m/z$  221), producto mayoritario sin emisión a  $\lambda= 515$  nm [75] (rango de emisión de FL). La capacidad antioxidante se relaciona con la diferencia entre el área bajo la curva (ABC) de fluorescencia de cada muestra y el ABC del blanco. La diferencia de área obtenida se utiliza para calcular los  $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}$ /g de extracto, teniendo previamente una curva de calibración con Trolox<sup>®</sup> (Ou *et al.*, 2001; Prior *et al.*, 2005; Ou *et al.*, 2002).

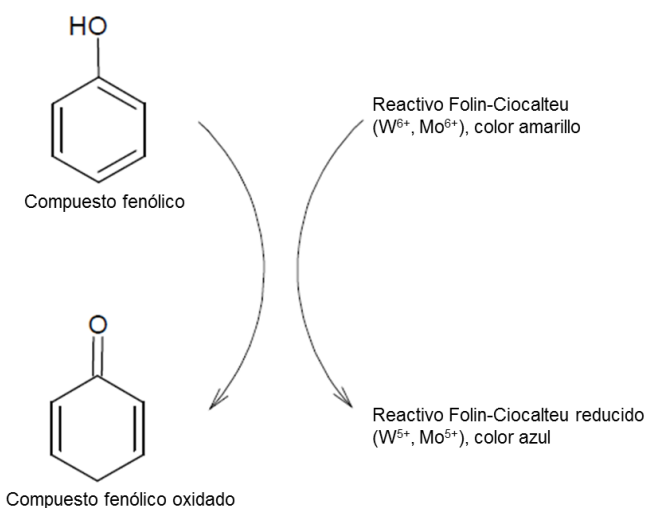


**Figura 11.** Mecanismo propuesto para la oxidación de la fluoresceína en presencia de los radicales peroxilo.

**3.1.4.2. Contenido de polifenoles totales.** Para cuantificar fenoles totales en extractos y alimentos se usa el ensayo de Folin-Ciocalteu. En la determinación, como reactivo se utiliza una mezcla de ácido fosfowolfrámico,  $\text{H}_3\text{P}(\text{W}_3\text{O}_{10})_4$ , y ácido fosfomolibdico,  $\text{H}_3\text{P}(\text{Mo}_3\text{O}_{10})_4$ , la cual, en medio básico, se reduce, al oxidar los compuestos fenólicos, y produce óxidos coloreados de

## BIOPROSPECCIÓN DE PLANTAS EN COLOMBIA

wolframio y molibdeno ( $W_8O_{23}$  y  $Mo_8O_{23}$ , respectivamente) como se observa en la Figura 12 (Singleton *et al.*, 1999). Se mide absorbancia (de los óxidos formados) a  $\lambda = 750$  nm. Previamente, se realiza una curva de calibración con ácido gálico; los resultados se expresan como mg de ácido gálico/g de extracto.



**Figura 12.** Esquema de reacción entre los compuestos fenólicos y el reactivo de Folin-Ciocalteu.

El ensayo Folin-Ciocalteu se utiliza ampliamente en investigaciones sobre metabolitos secundarios fenólicos en plantas, debido a su facilidad y reproducibilidad (Singleton *et al.*, 1999).

### 3.1.5. Caracterización química

**3.1.5.1. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.** La cromatografía es una técnica de separación de los componentes presentes en una mezcla. Los compuestos se distribuyen entre dos fases, una estacionaria, que puede ser sólida, líquida o gel (en este caso,

## BIOPROSPECCIÓN DE PLANTAS EN COLOMBIA

empacada en un columna), que se encuentra en reposo, y otra, se halla en movimiento, puede ser gas, líquido o fluido supercrítico.

En la técnica de cromatografía de gases (GC) los componentes que hacen parte de la matriz interactúan con la fase estacionaria, la cual puede ser de carácter polar o no polar; sin embargo, no interactúan físico-químicamente con la fase móvil, que es un gas de arrastre (*e.g.*, He, N<sub>2</sub> o H<sub>2</sub>), que cumple la función de empujar las moléculas a través de la columna cromatográfica. La capacidad para separar los componentes está relacionada con la temperatura, la longitud de la columna (L), el diámetro interno (I.D.), el grosor (d<sub>f</sub>), la naturaleza química de la fase estacionaria y el analito (Skoog, 1994, p. 674-730; Stashenko y Martínez, 2009).

La técnica permite determinar bajo condiciones establecidas, *i.e.*, temperatura del puerto de inyección, temperatura del horno, rampa de calentamiento, flujo del gas de arrastre, cuántos componentes se logran separar y en qué proporción ellos se encuentran (Stashenko y Martínez, 2010).

Para la identificación de las sustancias de interés, se emplean detectores espectroscópicos. El más usado, es el espectrómetro de masas (MS) (Stashenko y Martínez, 2009), que brinda información estructural sobre las moléculas analizadas (Stashenko y Martínez, 2011).

**3.1.5.2. Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas.** La técnica de cromatografía líquida (LC), al igual que GC, emplea dos fases, una estacionaria y la otra, móvil. A diferencia de CG, en LC, las sustancias de interés interactúan tanto con la fase estacionaria como con la fase móvil, siendo esta última un líquido (*i.e.*, un solvente o una mezcla de solventes), que hace mover las moléculas a través de la columna cromatográfica, por lo que, en este caso, la separación de los compuestos de interés, depende de la polaridad de ambas fases. La

## BIOPROSPECCIÓN DE PLANTAS EN COLOMBIA

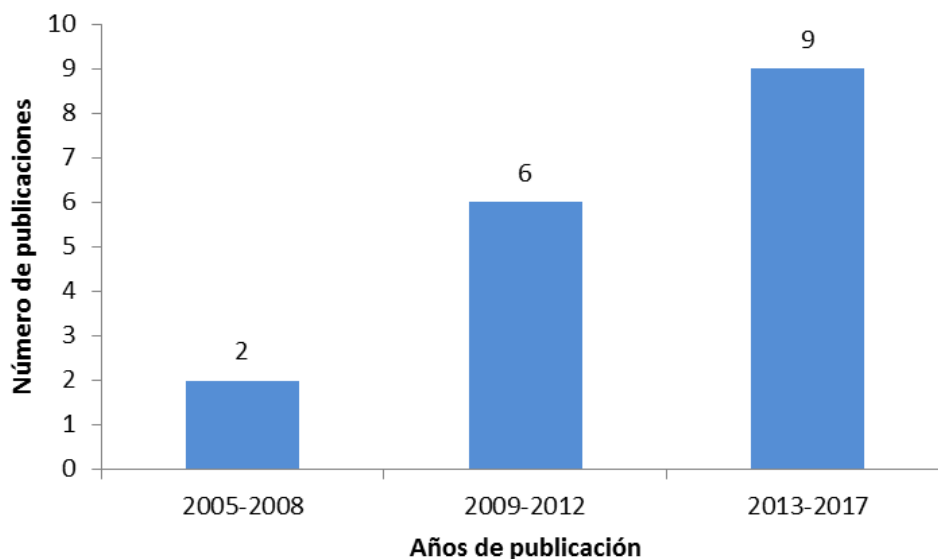
columna en LC es rellena y mucho más corta que la columna de la GC (Merken y Beecher, 2000).

En este trabajo, para la identificación de los analitos presentes en los extractos de *M. myriantha* se usó un detector de masas (MS) acoplado al cromatógrafo líquido.

**3.1.5.3. Espectrometría de masas.** La espectrometría de masas (MS) es una técnica instrumental, que permite el análisis de casi todo tipo de muestras, en forma de iones, ya sea pre-fabricados, antes de introducir la muestra, o fabricados luego de introducir la muestra neutra durante el proceso de ionización. Los iones se separan, según su relación masa-carga, se miden sus corrientes iónicas, que se reconstruyen en una señal gráfica. Esta herramienta es, posiblemente, la que tiene una aplicación más general y completa, porque proporciona información sobre la composición química, cualitativa, de sustancias de interés tanto orgánicas, como inorgánicas, y permite elucidar la estructura de muchos compuestos, así como las relaciones isotópicas entre los átomos presentes en las moléculas (Skoog, 1994, p. 674-730). El uso de espectrometría de masas de alta resolución ayuda a identificar polifenoles, por su masa exacta y sus patrones de fragmentación, a través de la observación de iones moleculares o cuasi-moleculares protonados o deprotonados, las pérdidas debidas a la presencia de azúcares en la estructura, entre otros fragmentos, dependiendo del tipo de ionización usada (Mazzuca *et al.*, 2005).

### 3.2. Antecedentes

En la **Figura 13**, se presenta el número de artículos científicos que se han publicado sobre el género *Medinilla*; se usó la base de datos *Scopus* (*Elsevier*) en un periodo de tiempo desde 2005 hasta 2017; se empleó la ecuación de búsqueda TITLE-ABS-KEY ("*Medinilla*").



**Figura 13.** Publicaciones científicas en el periodo 2005-2017. Fecha de búsqueda: 25 de agosto de 2017. Fuente: *Scopus* (*Elsevier*). Ecuación de búsqueda: TITLE ABS-KEY ("*Medinilla*").

En la **Figura 13**, se observa el número de artículos científicos, según los años de su publicación. Se han publicado un total de 17 artículos científicos, en los últimos 12 años, lo que muestra relativamente escaso estudio científico sobre el género *Medinilla*; en esta base de datos no se encontró ningún artículo de investigación sobre la especie *Medinilla myriantha*.

En la **Figura 13**, también se puede observar que el número de publicaciones es relativamente bajo, aunque hay un ascenso en su número en los últimos años; no se han reportado los compuestos en diferentes partes de la planta, por lo que, esta investigación amplia el

## BIOPROSPECCIÓN DE PLANTAS EN COLOMBIA

conocimiento relacionado con el género *Medinilla*, y, en particular, sobre la especie *M. myriantha*.

En la revisión bibliográfica, se encontraron diferentes artículos relacionados con el género *Medinilla*. Se hizo una identificación taxonómica de las diferentes especies del género, en Papúa Nueva Guinea, así como en Indonesia, y se encontraron diferentes especies, entre las cuales figuran *M. medinilliana*, *M. rubicunda*,

*M. brassii* Markgr, entre otras (Bodegom y Veldkamp, 2001; Takechi y Arifiani, 2010). Una nueva especie del género *Medinilla*, *M. dallciana*, fue encontrada en la isla de Luzón, Filipinas (Fernando y Belete, 2013).

El género *Medinilla* comprende alrededor de 3000 especies en el Neotrópico, es decir, en la gran extensión que conforman América del Sur, América Central, Caribe, Florida del Sur y zona Sur de México. Se han reportado alrededor de 1000 especies en Asia, 240, en África, y 230, en Madagascar (Renner, 2004). En el estudio de la fracción volátil de las flores de *M. arborícola*, realizado por HS-SPME/GC-MS, se identificaron 60 compuestos; limoneno (9.5%) fue el compuesto mayoritario (Zhang *et al.*, 2010).

Seal y Chaudhuri (2015), determinaron la actividad antioxidante de extractos obtenidos con solventes (benceno, cloroformo, acetona o metanol) de hojas de *M. erythrophylla*, obtenidas en Meghalaya, India; la determinación se realizó usando la actividad de barrido de radicales 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH). El valor de actividad antioxidante más alto se obtuvo para el extracto obtenido con acetona ( $IC_{50} = 0.020 \pm 0.001$  mg de material seco).

## BIOPROSPECCIÓN DE PLANTAS EN COLOMBIA

De acuerdo con la revisión bibliográfica realizada, el estudio de los metabolitos secundarios presentes en las diferentes partes de la planta *M. myriantha*, es nulo, a pesar de ser una planta con compuestos con posible actividad biológica.

#### 4. Materiales y Métodos

##### 4.1. Materiales y reactivos

En la **Tabla 2**, se reportan los reactivos, materiales y equipos de laboratorio que se utilizaron en la investigación, con sus respectivas especificaciones.

**Tabla 2.**

*Reactivos, materiales y equipos de laboratorio usados en la investigación.*

<b>Reactivos y solventes</b>	<b>Especificaciones</b>
<i>n</i> -Hexadecano	Pureza: 99%; <i>Sigma Aldrich</i> (Milwaukee, Wisconsin, EE.UU.).
Etanol	Pureza: 99.8%; <i>Mallinckrodt Baker Inc.</i> (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, EE. UU.).
Trolox® (ácido 6-hidroxí-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico)	Pureza: 97%; <i>Sigma-Aldrich</i> (St. Louis, MO, EE.UU.).
AAPH	Pureza: 98%; <i>Sigma-Aldrich</i> (St. Louis, MO, EE.UU.).
Fluoresceína	<i>Sigma-Aldrich</i> (St. Louis, EE.UU.).
Reactivo Folín-Ciocalteu	Concentración: 2N; <i>Merck</i> (Darmstadt, Alemania).
Hidróxido de sodio	Pureza: 99%; <i>Merck</i> (Darmstadt, Alemania).
Ácido gálico	Pureza: 99%; <i>Sigma-Aldrich</i> (St. Louis, EE.UU.).
Metanol	Pureza: 99%; <i>Merck</i> (Darmstadt, Alemania).

**Tabla 2.***Continuación*

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Pureza: 99.1%; (J.T. Baker, Phillisburg, NJ, EE. UU.).
Metanol	Pureza 99.8%; <i>Mallinckrodt Baker Inc.</i> (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, EE.UU.).
Acetonitrilo, grado LC-MS	Pureza: ≥99.9%; <i>Honeywell Burdick &amp; Jackson</i> (New Jersey, EE.UU.).
Ácido clorhídrico	Pureza: 37%; <i>Merck</i> (Darmstadt, Alemania).
Ácido fórmico	Pureza: 98%; <i>Merck</i> (Darmstadt, Alemania).
Cianidina-3-glucósido	Pureza: 99%; <i>PhytoLab</i> (Vestenbergsgreuth, Alemania).
Luteolina	Pureza: 99%; <i>PhytoLab</i> (Vestenbergsgreuth, Alemania).
Kaempferol-3-glucósido	Pureza: 99%; <i>PhytoLab</i> (Vestenbergsgreuth, Alemania).
Kaempferol	Pureza: 99%; <i>PhytoLab</i> (Vestenbergsgreuth, Alemania).
α-Tocoferol	Pureza: 97%; <i>Sigma-Aldrich</i> (St. Louis, MO, EE.UU.).
Butil hidroxitolueno (BHT)	Pureza: 99%; <i>Sigma-Aldrich</i> (St. Louis, MO, EE.UU.).
<b>Materiales de laboratorio</b>	
Balones aforados	1 mL; <i>Scott</i> (Texas, EE.UU.).
Balones aforados	5 mL; <i>Scott</i> (Texas, EE.UU.).
Balón aforado	1 L; <i>Brand</i> (Wertheim, Alemania).
Pipetas Pasteur	230 mm; <i>Brand GMBH Co.</i> (Wertheim, Alemania).
Viales para cromatografía	2 mL; <i>Agilent Technologies</i> (Santa Clara, California, EE.UU.).
Viales	15 mL; <i>Agilent Technologies</i> (Santa Clara, California, EE.UU.).
Vaso de precipitados	1 L; <i>Scott</i> (Texas, EE.UU.).
Vaso de precipitados	50 mL; <i>Scott</i> (Texas, EE.UU.).
Micropipetas	2–20, 25–250 y 100–1000 μL; <i>Brand</i> (Wertheim, Alemania).
<i>Transferpette</i> multicanal	10-200 μL; 8/12 <i>Electronic Brand</i> (Wertheim, Alemania).

**Tabla 2.***Continuación*

Filtros de membrana	Filtros de membrana PVDF de 0.22 $\mu\text{m}$ de <i>Millipore</i> (São Paulo, Brasil).
Microplacas	Microplacas negras y transparentes de poli(estireno) de 96 pozos <i>ThermoFisher Scientific</i> (Massachusetts, EE.UU.).
<b>Equipos de laboratorio</b>	
Recubrimientos sobre la fibra de SPME	CAR-PDMS de 75 $\mu\text{m}$ de grosor; <i>Supelco</i> (St. Louis, MO EE.UU.). CAR-PDMS/DVB de 95 $\mu\text{m}$ de grosor; <i>Supelco</i> (St. Louis, MO EE.UU.). ViC <sub>16</sub> Im-NTf <sub>2</sub> /(ViBzIm) <sub>2</sub> C <sub>12</sub> -2NTf <sub>2</sub> de 135 $\mu\text{m}$ de grosor (Iowa, EE.UU.). ViC <sub>6</sub> Im-Cl/(Vilm) <sub>2</sub> Cl <sub>12</sub> -2Br de 47 $\mu\text{m}$ de grosor (Iowa, EE.UU.). ViC <sub>16</sub> Im-NTf <sub>2</sub> /(Vilm) <sub>2</sub> C <sub>12</sub> -2NTf <sub>2</sub> de 20 $\mu\text{m}$ de grosor (Iowa, EE.UU.).
Balanza analítica	<i>Mettler Toledo</i> AL204 (Nänicon, Suiza).
pH-Metro	MPC227; <i>Mettler Toledo</i> (Schwezenbach, Suiza).
Baño de ultrasonido	<i>Elmasonic</i> E30H (Elma, Alemania).
Lector de microplacas	<i>Turner Biosystems Inc., Modulus™ II Microplate Multimode Reader</i> (Sunnyvale, CA, EE. UU.).
<i>MS2 Minishaker</i>	<i>IKA</i> (Wilmington, EE.UU.).
Centrífuga	<i>Compac II Centrifuge, Clay Adams</i> (Sparks, M.D. EE.UU.).
Plancha de calentamiento y agitación	<i>RC Velp Scientifica</i> (Usmate, Italy).

**4.2. Identificación botánica**

La *exsiccata* de la planta *M. myriantha* se envió al Herbario Nacional de Colombia (Bogotá), en donde se realizó su identificación botánica, que aparece en la **Sección 5.1**.

### 4.3. Tratamiento del material vegetal

El material vegetal se recolectó en el Centro de Investigación de Excelencia CENIVAM, en el *campus* principal de la Universidad Industrial de Santander, en la ciudad de Bucaramanga: Latitud: 7°07'31'' N, longitud: 73°07'11'' O y altitud sobre el nivel del mar: 993 m. Para la extracción por HS-SPME, se tomaron las flores, sin previo tratamiento. Para la extracción sólido-líquido y MSPD, hojas, flores, tallos y frutos, se secaron en un liofilizador de bandejas *Virtis Advance Plus (SP Scientific, New York, EE.UU.)*, de manera independiente, se molieron y tamizaron hasta un tamaño de partícula de 2 mm, se guardaron en frascos color ámbar con atmósfera de N<sub>2</sub>, hasta la extracción.

### 4.4. Métodos de extracción

**4.4.1. Monitoreo de volátiles por HS-SPME.** El monitoreo por HS-SPME se realizó siguiendo la metodología descrita por Stashenko *et al.* 2013. El material vegetal recolectado se utilizó en fresco; la flor de *M. myriantha*, *ca.* 1.5 g se depositó en un vial (15 mL) color ámbar, sellado, que se acondicionó durante 10 min a 60 °C. La extracción se llevó a cabo mediante la exposición de la fibra de SPME con recubrimientos comerciales, *i.e.*, CAR-PDMS, CAR-PDMS/DVB, o con los recubrimientos de líquidos iónicos poliméricos: ViC<sub>16</sub>Im-NTf<sub>2</sub>(ViBzIm)<sub>2</sub>C<sub>12</sub>-2NTf<sub>2</sub>, ViC<sub>6</sub>Im-Cl/(Vilm)<sub>2</sub>Cl<sub>12</sub>-2Br o ViC<sub>16</sub>Im-NTf<sub>2</sub>/(Vilm)<sub>2</sub>C<sub>12</sub>-2NTf<sub>2</sub>, en el espacio de cabeza del vial, durante 30 min, previa exposición de la fibra de SPME al patrón interno, *n*-hexadecano (*ca.* 2 mg), por 5 s a 60 °C. Las fibras recubiertas con líquidos iónicos poliméricos fueron suministradas por el Prof. Dr. Jared L. Anderson del Departamento de Química de la Universidad Estatal de Ciencia y Tecnología de Iowa (Ames, Iowa, EE.UU.). El

## BIOPROSPECCIÓN DE PLANTAS EN COLOMBIA

muestreo por HS-SPME se realizó a diferentes horas del día (6:00 a.m.; 12:00 m.; 6:00 p.m.), por triplicado.

**4.4.2. Extracción sólido-líquido.** La extracción con solventes se realizó siguiendo la metodología descrita por Borrás *et al.*, 2015, con algunas modificaciones; la obtención de los extractos se realizó en una relación material:solvente (1:20, g:mL), usando como solvente una mezcla de etanol-agua (1:1, v/v) acidificada con HCl (1%). Las extracciones se realizaron mediante sonicación (Baño de ultrasonido, Elmasonic S15H, Singen, Alemania) de 37 kHz de frecuencia y 35 W de potencia ultrasónica, durante 15 min, a 30 °C. El residuo se separó por filtración y se extrajo una vez más. Los extractos resultantes se filtraron, se rotoevaporaron para eliminar el etanol, se liofilizaron para eliminar el agua y se almacenaron bajo refrigeración, a 4 °C, para su posterior análisis (Antoniolli *et al.*, 2015).

**4.4.3. Extracción por dispersión de la matriz en fase sólida.** Las extracciones MSPD se realizaron siguiendo la metodología descrita por Tao *et al.*, 2014, con algunas modificaciones. Se usó una relación material:soporte sólido (1:2, p/p), como soporte sólido se utilizó sílice, modificada químicamente, con cadenas de hidrocarburo C<sub>18</sub>. La muestra, junto con el soporte, se mezcló en un mortero hasta su completa homogeneización. Luego, se transfirió a una columna corta. La columna se eluyó con 10 mL de una solución etanol:agua (1:1, v/v), el extracto obtenido se secó en un liofilizador de bandejas *Virtis Advance Plus (SP Scientific, New York, EE.UU.)*, luego, se almacenó a 4 °C, hasta su posterior análisis cromatográfico.

## 4.5. Análisis cromatográfico

**4.5.1. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.** La fracción volátil obtenida por HS-SPME, se analizó en un cromatógrafo de gases AT 7890, en una columna polar DB-WAX (*J&W Scientific*, Folsom, CA, EE.UU.), cubierta con poli(etilenglicol) de 60 m (L) x 0.25 mm (I.D.) x 0.25  $\mu\text{m}$  ( $d_f$ ); el gas de arrastre fue He (99.995%, 1 mL/min, flujo constante) con la programación de la temperatura del horno, así: 50 °C (5 min), luego, a 5 °C/min hasta 230 °C (30 min); el modo de inyección fue *splitless*. Se usó un detector selectivo de masas (MSD) AT 5975. Ionización fue con electrones (EI), de 70 eV de energía. La temperatura de la cámara de ionización y de la línea de transferencia fue de 230 °C. El tiempo de desorción de la fibra en el puerto de inyección fue 15 min y la temperatura del puerto de inyección se mantuvo a 180 °C en los ensayos con el recubrimiento  $\text{ViC}_6\text{lm-Cl}/(\text{Vilm})_2\text{Cl}_{12}\text{-2Br}$  y a 250 °C, en los ensayos con los recubrimientos CAR-PDMS, CAR-PDMS/DVB,  $\text{ViC}_{16}\text{lm-NTf}_2/(\text{ViBzlm})_2\text{C}_{12}\text{-2NTf}_2$  o  $\text{ViC}_{16}\text{lm-NTf}_2/(\text{Vilm})_2\text{C}_{12}\text{-2NTf}_2$ . Para la adquisición de la corriente iónica, se usó el rango de masas de  $m/z$  30-300 Da.

Se realizó una identificación tentativa, con base en los espectros de masas (coincidencia del espectro de masas con el de la base de espectros > 95%); se emplearon las bases de datos Adams, Wiley y NIST, y algunos artículos de otros autores (NIST Chemistry Web Book, 2017; Adams, 2004, p. 1-804).

El cálculo de los índices de retención lineales (IRL) se llevó a cabo, según la **Ecuación 1** (Dool y Kratz, 1963), así:

$$\text{IRL} = 100n + 100 \frac{t_{\text{Rx}} - t_{\text{Rn}}}{t_{\text{RN}} - t_{\text{Rn}}} \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde:

- IRL: Índice de retención líneal experimental del compuesto;
- n: Número de átomos de carbono del hidrocarburo que eluye antes del compuesto de interés;
- $t_{Rx}$ : Tiempo de retención del compuesto de interés;
- $t_{Rn}$ : Tiempo de retención del hidrocarburo que eluye antes del compuesto de interés;
- $t_{RN}$ : Tiempo de retención del hidrocarburo que eluye después del compuesto de interés.

**4.5.2. Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas.** Las antocianinas son compuestos reportados en muchas plantas (Gómez-Caravaca *et al.*, 2013; Merken y Beecher, 2000); en este trabajo, el patrón de una antocianina (cianidina-3-glucósido) se usó con el fin de encontrar las mejores condiciones para el análisis por LC-MS de los polifenoles aislados con solventes o por MSPD.

Las siguientes, fueron las variables evaluadas, a saber: voltaje de capilar ( $V_c$ ), voltaje del fragmentador ( $V_f$ ) y tipo de fase móvil; los valores para cada variable, se muestran en la **Tabla 3**, la fase móvil fue: A: ácido fórmico 0.2% en agua y B: ácido fórmico 0.2% en metanol (MeOH) o acetonitrilo (ACN).

**Tabla 3.**

*Variables evaluadas para el análisis por LC-ESI(+)-TOF-MS.*

Variables	
Voltaje de capilar, kV	1, 2, 3, 4, 5
Voltaje de fragmentador, V	100, 150, 200, 250
Fase móvil, solvente B	Acetonitrilo (ACN) o metanol (MeOH)

La concentración de cianidina-3-glucósido fue de 500 ppb y los observables fueron la relación señal:ruido y el área cromatográfica de la corriente iónica extraída (EIC), basada en la masa exacta del ion molecular y el ion fragmento [M-azúcar], *i.e.*  $[M]^+ = 449.1078$  ( $C_{21}H_{21}O_{11}$ ) y el ion fragmento  $[M-azúcar]^+ = 287.0555$ , el cual corresponde a la cianidina ( $C_{15}H_{11}O_6$ ). Para el observable, se hizo la relación entre el ion molecular y su fragmento; para esta investigación, se denominó relación Y, que se muestra en la **Ecuación 2**:

$$\text{Relación Y} = \frac{\text{Área del ion molecular } m/z \text{ 449.1078}}{\text{Área del ion fragmento } m/z \text{ 287.0555} + \text{Área del ion molecular } m/z \text{ 449.1078}} * 100$$

### **Ecuación 2**

El análisis se realizó en un cromatógrafo líquido HPLC (*AT 1200 Series*, Palo Alto, CA, EE.UU.), con ionización por electronebulización (ESI) operado en modo positivo, acoplado a un espectrómetro de masas con analizador de tiempo de vuelo (LC-ESI-TOF-MS) *AT TOF 6210* (Palo Alto, CA, EE.UU.), equipado con una bomba binaria *AT* de gradiente (G1312A), un inyector automático de muestras (G1367B), el gas de nitrógeno (Generador  $N_2$ , PEAK NM30LM-MS) con flujo de 7.0 L/min y temperatura de 350 °C, flujo de fase móvil: 0.22

## BIOPROSPECCIÓN DE PLANTAS EN COLOMBIA

mL/min, el voltaje de capilar varió entre 1 y 5 kV, el voltaje de fragmentador entre 100 y 250 V. Las siguientes fueron las condiciones cromatográficas, así: 1). Fase móvil A: ácido fórmico al 0.2%, en agua; 2). Fase móvil B: ácido fórmico al 0.2%, en acetonitrilo o metanol. La separación cromatográfica se llevó a cabo en una columna C<sub>18</sub> Kinetex (Phenomenex, Torrance, CA, EE.UU.) de 10 cm (L) × 4,6 mm (I.D.), 2.6 μm de tamaño de partícula. La condición inicial de gradiente fue de 95%, para A, y 5%, para B, cambiando linealmente hasta 10%, para B, en 3 min; luego, 20%, para B, en 5 min; y luego, 80%, para B, en 10 min, se mantuvo durante 5 min, cambió a 100% de B, en 5 min, y se mantuvo durante 5 min; el retorno a las condiciones iniciales se hizo en 15 min; el tiempo total de la corrida fue de 40 min. El flujo fue de 0.2 mL/min y el volumen de inyección, 4 μL. Los espectros de masas, se obtuvieron en el rango de *m/z* 100-990, a una velocidad de adquisición de dos espectros/s. Se realizó la corrección de la masa exacta usando una solución de purina (C<sub>5</sub>H<sub>4</sub>N<sub>4</sub> a *m/z* 121,0508) y hexaquis (1*H*, 1*H*, 3*H*-tetrafluoropentoxi)-fosfazeno (C<sub>18</sub>H<sub>18</sub>O<sub>6</sub>N<sub>3</sub>P<sub>3</sub>F<sub>24</sub> a *m/z* 922,0098). Los datos obtenidos se procesaron por medio del sistema de datos *AT MassHunter* (AT, Versión B.02.00-SP3). La identificación de los compuestos se confirmó con base en sus masas exactas, comparación de tiempos de retención con los de patrones certificados, y midiendo la exactitud Δppm.

#### 4.6. Capacidad de absorción del radical de oxígeno

La determinación de la capacidad de absorción de radicales de oxígeno por el método ORAC, se realizó siguiendo la metodología descrita por Ou *et al.* (2001), en un lector de microplacas de 96 pozos (*Turner Biosystems Inc., Modulus<sup>TM</sup> II Microplate Multimode Reader*, California, EE.UU.), en el módulo de fluorescencia, con filtros de λ de excitación= 490 nm y λ de emisión= 510 nm, durante 90 min a 37 °C. La capacidad antioxidante se determinó a partir del cálculo de

## BIOPROSPECCIÓN DE PLANTAS EN COLOMBIA

diferencia entre el área de fluorescencia bajo la curva (ABC), de cada muestra, y el ABC del blanco. Para calcular los  $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$  del extracto, se usó el área neta obtenida, previa la realización de una curva de calibración con material de referencia Trolox<sup>®</sup>. Cada medición se realizó por triplicado, y los resultados se expresaron como el valor promedio  $\pm$  la desviación estándar.

Para el ensayo, se pesaron 10 mg del extracto seco y se aforaron hasta 1 mL con metanol (haciendo una solución de 10000 mg/L), la mezcla se colocó por 30 min en un baño ultrasónico (Elmasonic S15H, Singen, Alemania) de 37 kHz de frecuencia y 35 W de potencia; luego, el extracto durante 20 s se colocó en un *shaker* IKA modelo MS1-S1 (Wilmington, EE.UU.); se centrifugó por 10 min, y se tomó el sobrenadante para el ensayo.

La metodología descrita por Ou *et al.* (2001) se modificó levemente, usándose una solución de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (17 mM) a pH 7.4, según Rodríguez *et al.* (1999) y una solución de fluoresceína  $8.16 \times 10^{-5}$  M. Se hizo un factor de dilución para cada muestra, entre 10 y 100 mg/L en los pozos de la microplaca, la mezcla de la muestra, disuelta en metanol, y la solución de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , se agitaron por cinco minutos.

Pasados los cinco minutos de agitación, se tomaron 25  $\mu\text{L}$  de la muestra diluida, a la cual se adicionaron 150  $\mu\text{L}$  de solución de fluoresceína y, se agregaron a cada pozo de una segunda microplaca; la solución se incubó a 37 °C por 20 min y, finalmente, se agregaron 25  $\mu\text{L}$  de solución del radical AAPH (153 mM), a cada pozo.

La actividad antioxidante se midió partiendo de la diferencia entre el área de fluorescencia bajo la curva (ABC) de cada muestra y el ABC del blanco (**Ecuaciones 3 y 4**). A partir del área neta, se calcularon los  $\mu\text{mol de Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$  extracto.

$$ABC_{neta} = ABC_{muestra} - ABC_{blanco} \quad \text{Ecuación 3.}$$

$$ABC = \sum \frac{f_i}{f_0} \quad \text{Ecuación 4.}$$

Donde:

$f_0$ : Fluorescencia inicial de la muestra;

$f_i$ : Fluorescencia medida en un tiempo  $i$ .

El ensayo también se realizó, por triplicado, para el BHT y para el  $\alpha$ -tocoferol, sustancias de referencia.

#### 4.7. Contenido de polifenoles totales

La determinación del contenido total de fenoles se realizó por el ensayo Folin-Ciocalteu, siguiendo la metodología de Cala *et al.* (2007), con algunas modificaciones; se usó un lector de microplacas de 96 pozos (*Turner Biosystems Inc., Modulus<sup>TM</sup> II Microplate Multimode Reader*, California, EE.UU.), en modo de absorbancia a  $\lambda = 750$  nm, a 25 °C, se utilizó reactivo de Folin-Ciocalteu (2 N) e hidróxido de sodio (0.35 M). Se pesaron 50 mg de extracto seco, que se aforó a 1 mL con etanol. En los pozos de la microplaca, se agregaron 50  $\mu$ L de muestra, 50  $\mu$ L de reactivo Folin-Ciocalteu y 100  $\mu$ L de solución de hidróxido de sodio. Como la intensidad de la absorción es proporcional a la concentración de los compuestos fenólicos, la absorbancia se graficó *versus* el tiempo de la medida. Como sustancia patrón se usó el ácido gálico. La concentración de compuestos fenólicos se expresó como mg de ácido gálico/g de extracto. Cada medición se hizo por triplicado, y los resultados se expresaron como el valor promedio  $\pm$  la desviación estándar.

## 5. Resultados y Análisis

### 5.1. Identificación botánica

La identificación botánica de la planta se realizó en el Herbario Nacional de Colombia (Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá) (Véase **Tabla 4**), por el parte del Dr. Carlos Alberto Parra, botánico encargado.

**Tabla 4.**

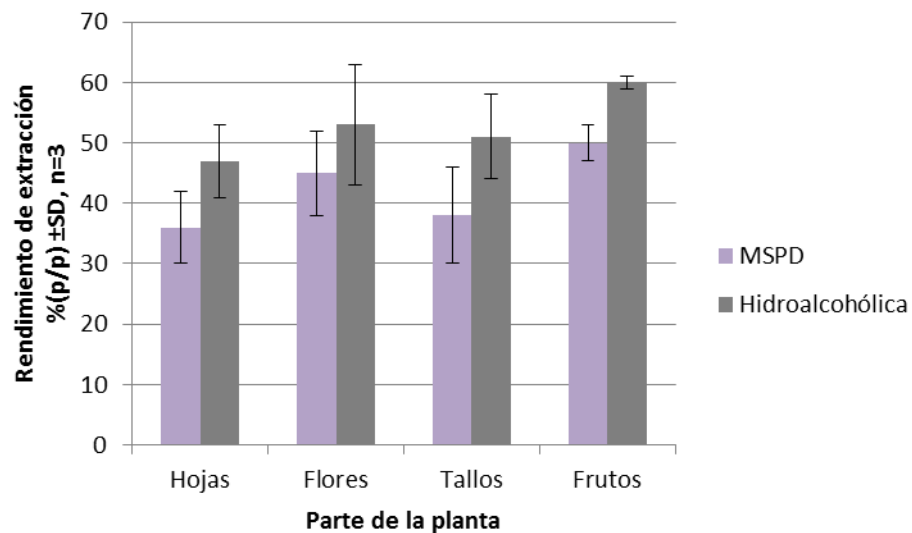
*Identificación botánica de la planta M. myriantha.*

Género	Especie	Familia	Voucher COL N°
<i>Medinilla</i>	<i>myriantha</i>	Melastomataceae	N° 583901

### 5.2. Rendimientos de extracción con solvente y por MSPD

En la **Figura 14** se muestran los rendimientos de las extracciones hidroalcohólicas y las realizadas por MSPD, de las diferentes partes de la planta *M. myriantha*, según los procedimientos experimentales descritos en las **Secciones 4.4.2 y 4.4.3**.

## BIOPROSPECCIÓN DE PLANTAS EN COLOMBIA



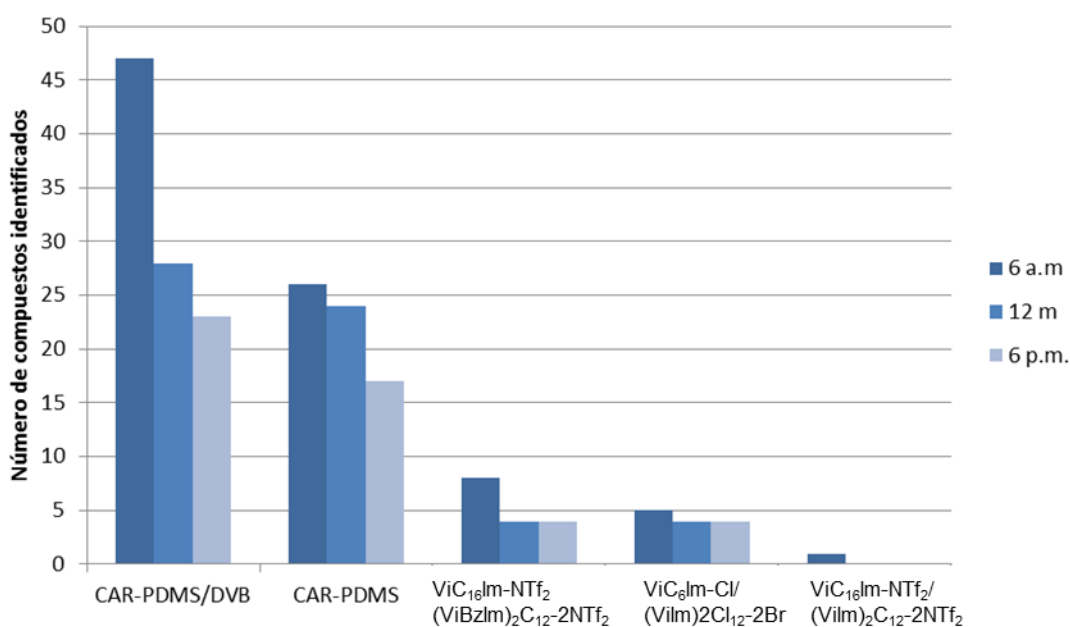
**Figura 14.** Rendimientos de los extractos obtenidos con solventes o por MSPD de hojas, flores, tallos y frutos de *M. myriantha*.

Los rendimientos más altos se obtuvieron en las extracciones hidroalcohólicas. La parte de la planta con rendimiento de extracción más alto, fueron los frutos: 50 y 60% (p/p) para los extractos obtenidos por MSPD y con mezcla hidroalcohólica, respectivamente. Las hojas presentaron rendimientos menores, *i.e.*, 36 y 47% (p/p) para los extractos obtenidos por MSPD e hidroalcohólicos, respectivamente.

A partir del rendimiento de extracción, no fue posible sugerir un método único de extracción, con el que se puedan aislar e identificar el mayor número de compuestos presentes, o en mayores concentraciones. MSPD tiene sus grandes ventajas como el uso de menor cantidad de solvente y tiempo de extracción más corto, comparado con la extracción hidroalcohólica.

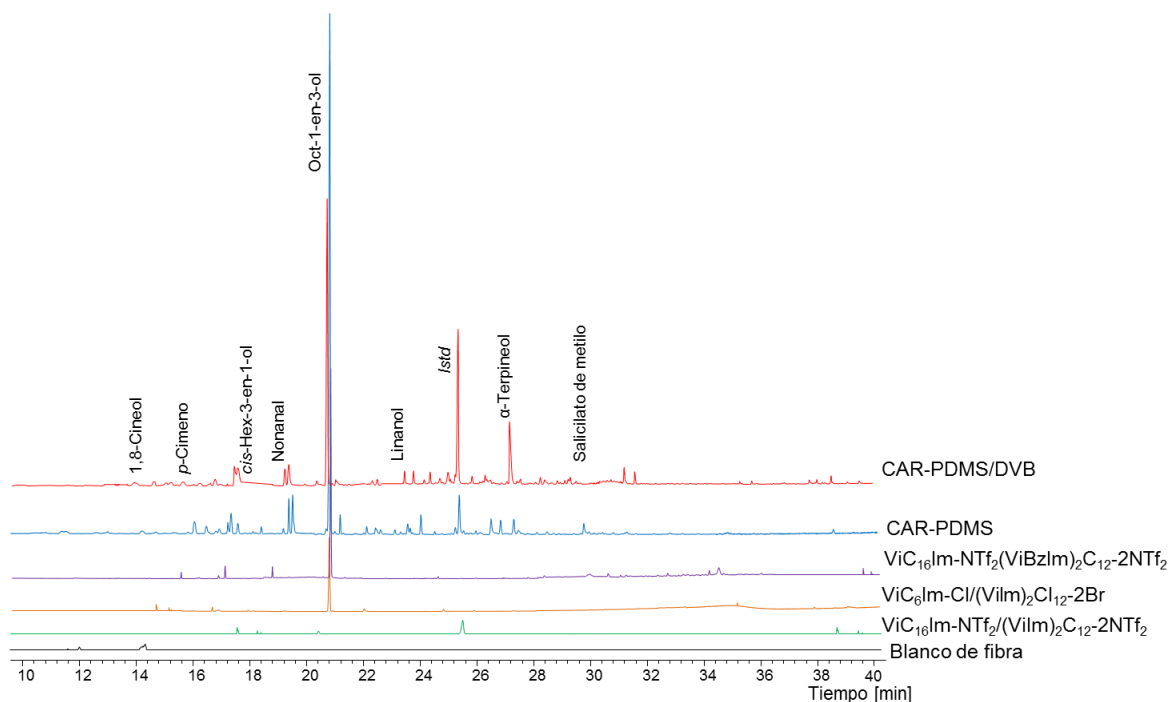
### 5.3. Caracterización química por GC-MS de la fracción volátil de las flores de *M. myriantha*, aislada por microextracción en fase sólida.

La fragancia de las flores de *M. myriantha* se aisló por HS-SPME, según se describió en la Sección 4.4.1; los compuestos aislados se identificaron por GC-MS, como se describe en la Sección 4.5.1. El número de compuestos identificados fue mayor a las 6:00 a.m., comparado con el de las fracciones aisladas a las 12:00 m. y 6:00 p.m., tal como se muestra en la **Figura 15**.



**Figura 15.** Número de compuestos aislados por HS-SPME y detectados por GC-MS (>0.3%), a diferentes horas del día, usando diferentes recubrimientos poliméricos de la fibra SPME.

En la **Figura 16**, se muestran los perfiles cromatográficos de las fracciones volátiles obtenidas con fibras de SPME con cinco diferentes recubrimientos. Los compuestos aislados e identificados a las 6:00 a.m. por HS-SPME/GC-MS aparecen en la **Tabla 5**.



**Figura 16.** Perfiles cromatográficos de las fragancias de las flores de *M. myriantha*, obtenidos a las 6:00 a.m. por HS-SPME/GC-MS, usando diferentes recubrimientos poliméricos de la fibra, *i.e.*,  $\text{ViC}_{16}\text{Im-NTf}_2(\text{ViBzIm})_2\text{C}_{12}\text{-2NTf}_2$ ,  $\text{ViC}_6\text{Im-Cl}/(\text{Vilm})_2\text{Cl}_{12}\text{-2Br}$ ,  $\text{ViC}_{16}\text{Im-NTf}_2/(\text{Vilm})_2\text{C}_{12}\text{-2NTf}_2$ , CAR-PDMS, CAR-PDMS/DVB, y el blanco de la fibra. Modo de inyección *splitless*, columna DB-WAX (*J&W Scientific*, Folsom, CA, EE.UU.), de 60 m (L) x 0.25 mm (I.D.) x 0.25 (d<sub>f</sub>), detector selectivo de masas (EI, 70 eV).

**Tabla 5.**

Compuestos identificados en la fragancia monitoreada a las 6:00 a.m., de las flores de *M. myriantha* con cuatro de los recubrimientos en las fibras de SPME.

Compuesto	IRL(DB-WAX)		GC Área relativa (%; valor $\pm$ SD, $n = 3$ )			
	Exp.	Lit.*	CAR-PDMS/DVB	CAR-PDMS	ViC <sub>16</sub> lm-NTf <sub>2</sub> (ViBzlm) <sub>2</sub> C <sub>12</sub> -2NTf <sub>2</sub>	ViC <sub>6</sub> lm-1/(Vilm) 2C112-2Br
Heptanal	1185	1181	-	1.1 $\pm$ 0.2	-	-
Limoneno	1191	1198	4.6 $\pm$ 0.2	-	-	-
1,8-Cineol	1205	1211	1.5 $\pm$ 0.1	-	-	-
Octan-3-ona	1254	1252	2 $\pm$ 1	3.2 $\pm$ 0.3	-	-
<i>p</i> -Cimeno	1260	1270	1.8 $\pm$ 0.2	-	-	-
Acetato de hexilo	1273	1269	-	1.9 $\pm$ 0.1	-	-
Octanal	1278	1287	0.5 $\pm$ 0.1	1.1 $\pm$ 0.2	-	-
Oct-1-en-3-ona	1301	1298	-	3 $\pm$ 1	-	-
Acetato de <i>cis</i> -hex-en-1-ilo	1296	1315	1.2 $\pm$ 0.3	-	-	-
<i>trans</i> -4,8-Dimetil-	1302	1302	-	4.2 $\pm$ 0.5	-	-
Acetato de <i>trans</i> -hex-3-en-1-ilo	1309	1312	-	1.2 $\pm$ 0.6	-	-
6-Metil-5-hepten-	1322	1336	4 $\pm$ 1	-	-	-
Hexan-1-ol	1336	1351	1.3 $\pm$ 0.8	0.9 $\pm$ 0.1	-	-
<i>cis</i> -Hex-3-en-1-ol	1364	1380	0.3 $\pm$ 0.1	0.6 $\pm$ 0.2	-	-
Octan-3-ol	1391	1386	4 $\pm$ 1	4.4 $\pm$ 0.1	-	-
Nonanal	1391	1392	4.3 $\pm$ 0.9	5 $\pm$ 1	4 $\pm$ 2	-
Tetradecano, C <sub>14</sub>	1400	1400	0.5 $\pm$ 0.2	-	-	-
<i>p</i> -Metil anisol	1432	1438	-	0.7 $\pm$ 0.1	-	-
Oct-1-en-3-ol	1444	1442	42 $\pm$ 2	59.3 $\pm$ 0.7	28 $\pm$ 11	2.1 $\pm$ 0.5
Furfural	1438	1460	0.3 $\pm$ 0.1	-	-	-
Heptan-1-ol	1449	1449	-	0.4 $\pm$ 0.1	-	-
Ácido acético	1455	1446	0.9 $\pm$ 0.6	-	13 $\pm$ 3	3 $\pm$ 1
Decanal	1489	1495	1.2 $\pm$ 0.1	-	-	-
$\alpha$ -Copaeno	1495	1491	1.0 $\pm$ 0.1	-	-	-
Italiceno	1517	1518	-	0.7 $\pm$ 0.1	-	-
Benzaldehído	1519	1525	-	0.3 $\pm$ 0.1	-	-
Linalol	1528	1543	1.6 $\pm$ 0.2	0.6 $\pm$ 0.1	-	-
Octan-1-ol	1540	1551	2.1 $\pm$ 0.6	2.3 $\pm$ 0.1	-	-
<i>iso</i> -Isopulegol	1556	1564	0.7 $\pm$ 0.1	-	-	-
<i>trans-p</i> -Menth-2en-1-ol	1564	1584	1.9 $\pm$ 0.4	-	-	-
$\beta$ -Copaeno	1578	1579	1.3 $\pm$ 0.1	-	-	-
<i>trans</i> - $\beta$ -Cariofileno	1589	1572	2.4 $\pm$ 0.2	-	-	-
$\beta$ -Cedreno	1592	1611	-	1.3 $\pm$ 0.3	-	-

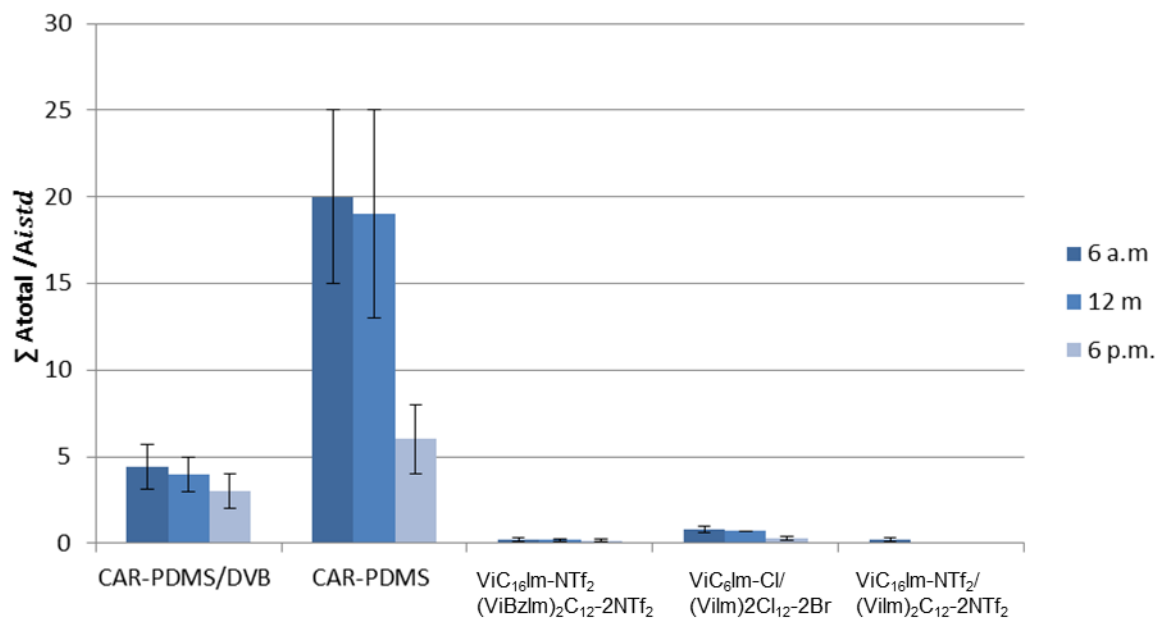
**Tabla 5.***Continuación*

Terpinen-4-ol	1593	1601	0.60 ± 0.03	-	-	-
Undecan-2-ona	1598	1588	-	0.7 ± 0.2	-	-
<i>cis</i> -Thujopseno	1622	1631	1.3 ± 0.1	2.6 ± 0.8	-	-
Aromadendreno	1637	1620	0.5 ± 0.1	-	-	-
Nonan-1-ol	1640	1655	1.2 ± 0.2	2.7 ± 0.7	3 ± 1	3 ± 1
α-Patchuleno	1642	1640	0.8 ± 0.1	-	-	-
<i>allo</i> -Aromadendreno	1647	1646	1.0 ± 0.1	-	-	-
α-Humuleno	1670	1666	0.5 ± 0.1	-	-	-
α-Terpineol	1683	1690	0.5 ± 0.1	-	-	-
β-Selineno	1715	1716	1.0 ± 0.1	-	-	-
1,4-Dimetoxibenceno	1720	1728	1.2 ± 0.1	-	-	-
<i>p</i> -Metoxianisol	1727	1611	-	0.5 ± 0.1	-	-
α-Farneseno	1737	1743	0.6 ± 0.1	-	-	-
Acetato de geranilo	1741	1751	0.3 ± 0.1	-	-	-
Citronelol	1747	1763	0.6 ± 0.1	-	-	-
δ-Cadineno	1754	1755	1.0 ± 0.1	-	-	-
Salicilato de metilo	1761	1767	0.5 ± 0.2	0.4 ± 0.1	-	-
Geraniol	1826	1839	1.6 ± 0.7	-	-	-
Nonadecano, C <sub>19</sub>	1900	1900	-	-	7 ± 1	-
<i>cis</i> -Nerolidol	2021	2027	0.6 ± 0.1	-	-	-
4-Metoxiacetofenona	2181	2164	1.3 ± 0.4	-	-	-
Hexadecanol	2358	2363	-	-	15 ± 4	-
Monoterpenos (MH)			6.4	-	-	-
Monoterpenos oxigenados (MO)			11.0	0.6	-	-
Sesquiterpenos (SH)			11.4	3.9	-	-
Sesquiterpenos oxigenados (SO)			0.6	-	-	-
Compuestos oxigenados alifáticos y otros			69.5	95.5	86.0	8.1

*Nota:* \*(Babushok *et al.*, 2011). Las tablas de composición de las fracciones volátiles, obtenidas de las flores de *M. myriantha*, en diferentes horas (6:00 a.m., 12 m. y 6:00 p.m.), usando cada una de las fibras, se encuentran en los **Anexos A, B y C**.

En la **Figura 17** se muestra la relación entre  $\sum A_{total}/A_{istd}$  para los metabolitos secundarios volátiles y semi-volátiles aislados de las flores de *M. myriantha* por HS-SPME, en las diferentes horas de muestreo.

## BIOPROSPECCIÓN DE PLANTAS EN COLOMBIA



**Figura 17.** Relaciones  $\Sigma A_{total} / A_{istd}$  obtenidas en el aislamiento de la fracción volátil de las flores de *M. myriantha* por HS-SPME/GC-MS, usando fibras con diferentes recubrimientos poliméricos (CAR-PDMS/DVB, CAR-PDMS, ViC<sub>16</sub>lm-NTf<sub>2</sub> (ViBzlm)<sub>2</sub>C<sub>12</sub>-2NTf<sub>2</sub>, ViC<sub>6</sub>lm-Cl/(Vilm)<sub>2</sub>Cl<sub>12</sub>-2Br, ViC<sub>16</sub>lm-NTf<sub>2</sub>/(Vilm)<sub>2</sub>C<sub>12</sub>-2NTf<sub>2</sub>), en función de la hora de muestreo.

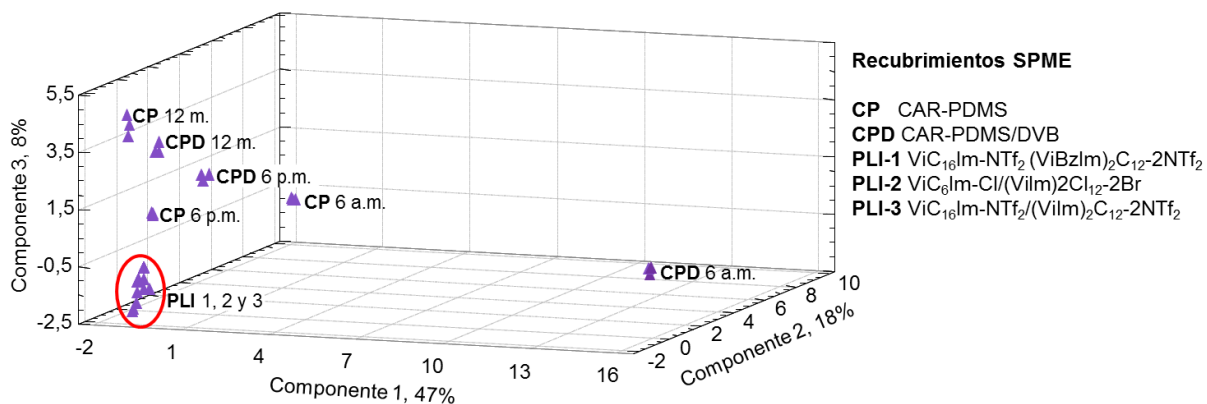
En la **Figura 17** se puede observar que, CAR-PMDS fue el recubrimiento con el que se obtuvo un valor de  $\Sigma A_{total} / A_{istd}$ , más alto, en comparación con los recubrimientos, CAR-PDMS/DVB, ViC<sub>16</sub>lm-NTf<sub>2</sub> (ViBzlm)<sub>2</sub>C<sub>12</sub>-2NTf<sub>2</sub>, ViC<sub>6</sub>lm-Cl/(Vilm)<sub>2</sub>Cl<sub>12</sub>-2Br y ViC<sub>16</sub>lm-NTf<sub>2</sub>/(Vilm)<sub>2</sub>C<sub>12</sub>-2NTf<sub>2</sub>. Entre los metabolitos secundarios identificados, se encuentran monoterpenos, limoneno y *p*-cimeno; monoterpenos oxigenados, 1,8-cineol, linalol y terpinen-4-ol; compuestos oxigenados alifáticos, octan-3-ona y decanal; sesquiterpenos,  $\alpha$ -copaeno y *trans*- $\beta$ -cariofileno; sesquiterpeno oxigenado, *cis*-nerodiol. CAR-PDMS/DVB fue el recubrimiento con el que se extrajo mayor número de compuestos (47).

## BIOPROSPECCIÓN DE PLANTAS EN COLOMBIA

El recubrimiento CAR-PDMS/DVB en la fibra de SPME, presentó más afinidad hacía compuestos de diferente naturaleza, que se identificaron a partir de 0.3% de su área relativa. Con la fibra con el recubrimiento CAR-PMDS, se aislaron monoterpenos oxigenados, sesquiterpenos y otros compuestos oxigenados. Los recubrimientos de líquidos iónicos extraen menos compuestos y presentan afinidad hacia sustancias oxigenadas (Véase **Tabla 5**).

En la fracción volátil de las flores de *M. myriantha* se identificaron en total 70 compuestos (porcentaje de área >0.3%) al usar los cinco recubrimientos poliméricos. Para comparar los resultados obtenidos en el análisis de las fracciones volátiles de las flores de *M. myriantha*, se realizó un análisis de componentes principales (PCA, por sus siglas en inglés). Se usó el *software Statgraphics Centurion* (Statpoint Technologies, Inc., Virginia, EE.UU., Versión XVII), donde, los datos usados fueron  $A/A_{ista}$  de los compuestos identificados, para los muestreos realizados a las 6 a.m., 12 m. y 6 p.m., por triplicado.

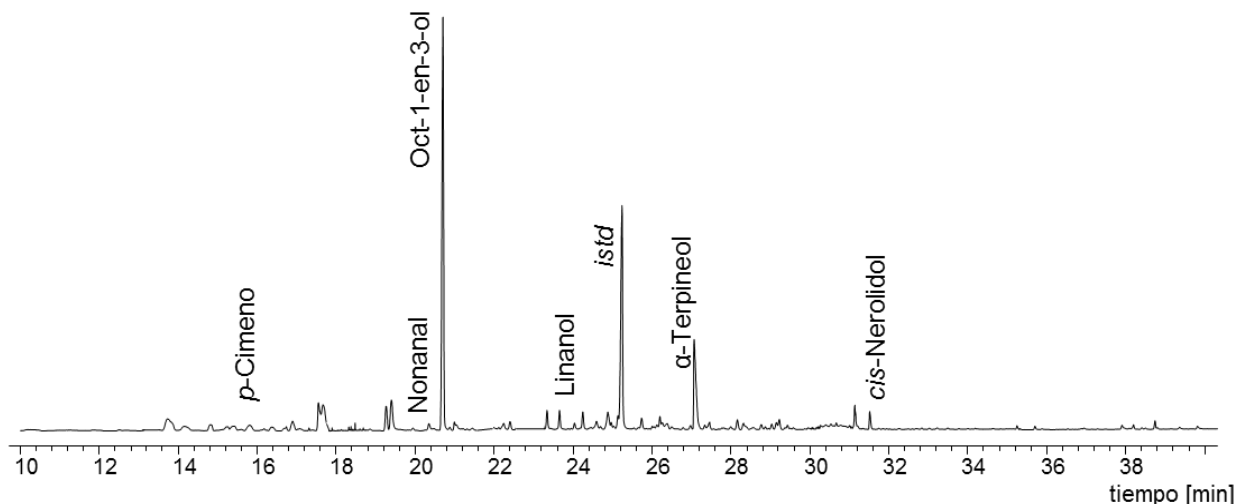
En el **Anexo D**, se muestran los valores de los componentes principales graficados con ayuda del *software Statgraphics Centurion*, para los PC 1, 2 y 3, que representan el porcentaje de la varianza más alto (72%), los componentes principales son una rotación de los ejes de coordenadas iniciales, que continúan siendo perpendiculares entre sí; el primer componente principal PC<sub>1</sub> se ubica en la dirección de variación máxima, así PC<sub>2</sub>, se ubica en la dirección de dispersión máxima residual que no ha explicado PC<sub>1</sub>, y por último, PC<sub>3</sub> se orienta de la misma manera que PC<sub>1</sub> y PC<sub>2</sub>. En la **Figura 18**, se muestra el diagrama de dispersión.



**Figura 18.** Diagrama de dispersión para los resultados obtenidos en el análisis de la fracción volátil de las flores de *M. myriantha*, aislada por HS-SPME con los diferentes recubrimientos poliméricos de las fibras SPME.

En el análisis de PCA (Véase **Figura 18**), se observan siete grupos de datos. Los resultados obtenidos con los recubrimientos CAR-PDMS y CAR-PDMS/DVB, están separados, a las 6 a.m., 12 m. y 6 p.m., respectivamente. Pero, las fibras con recubrimiento de líquidos iónicos, no se logran diferenciar entre sí, es decir, que los tres recubrimientos presentan afinidad por compuestos de la misma naturaleza. CAR-PDMS/DVB presentó afinidad por compuestos de diferentes familias, *i.e.*, monoterpenoides, sesquiterpenoides, compuestos oxigenados alifáticos y otros.

En la **Figura 19**, se muestra el perfil cromatográfico obtenido por GC-MS, de la fracción volátil de las flores de *M. myriantha*, extraída por HS-SPME con la fibra CAR-PDMS/DVB a las 6:00 a.m. Los compuestos identificados al usar este recubrimiento sobre la fibra de SPME, a las 6:00 a.m., 12:00 m. y 6:00 p.m., se encuentran en la **Tabla 6**.



**Figura 19.** Perfil cromatográfico de la fracción volátil de las flores de *M. myriantha* aislada por HS-SPME, usando el recubrimiento CAR-PDMS/DVB en la fibra, a las 6:00 a.m. Modo de inyección *splitless*, columna DB-WAX de 60 m (L) x 0.25 mm (I.D.) x 0.25 (d<sub>f</sub>), detector selectivo de masas (EI, 70 eV).

**Tabla 6.**

Compuestos aislados de las flores de *M. myriantha* a las 6:00 a.m., 12:00 m. y 6:00 p.m. por HS-SPME/GC-MS con el recubrimiento CAR-PDMS/DVB en la fibra.

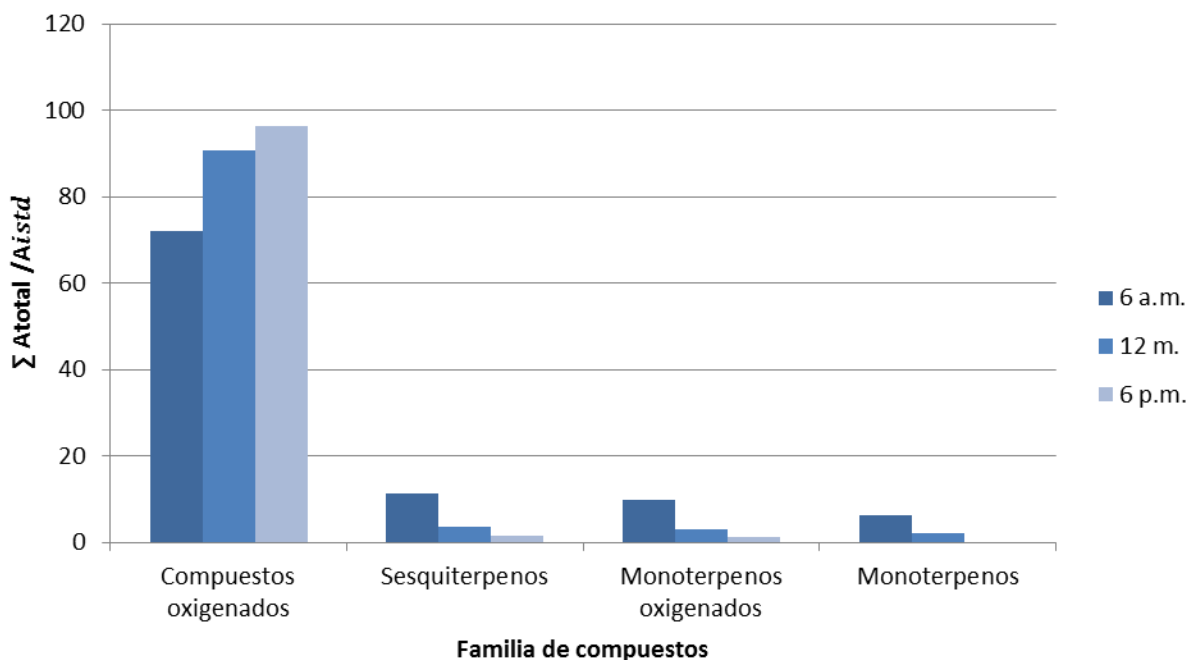
Compuesto	GC Área relativa (%; valor $\pm$ SD, $n = 3$ )		
	6 a.m.	12 m.	6 p.m.
Limoneno	4.6 $\pm$ 0.2	1.1 $\pm$ 0.9	-
1,8-Cineol	1.5 $\pm$ 0.1	-	-
Octan-3-ona	2 $\pm$ 1	2.3 $\pm$ 0.6	3 $\pm$ 1
<i>p</i> -Cimeno	1.8 $\pm$ 0.2	1.0 $\pm$ 0.3	-
Octanal	0.5 $\pm$ 0.1	3 $\pm$ 1	2.5 $\pm$ 0.6
1-Octen-3-ona	0.8 $\pm$ 0.1	0.8 $\pm$ 0.1	0.7 $\pm$ 0.1
Acetato de <i>cis</i> -hex-3-en-1-ilo	1.2 $\pm$ 0.3	3.5 $\pm$ 0.5	4 $\pm$ 1
6-Metil-5-hepten-2-ona	4 $\pm$ 1	0.8 $\pm$ 0.1	0.7 $\pm$ 0.1
Hexan-1-ol	1.3 $\pm$ 0.8	0.6 $\pm$ 0.1	1.6 $\pm$ 0.1
<i>cis</i> -Hex-3-en-1-ol	0.3 $\pm$ 0.1	-	-
Octan-3-ol	4 $\pm$ 1	3 $\pm$ 1	3.2 $\pm$ 0.3
Nonanal	4.3 $\pm$ 0.9	22 $\pm$ 9	25 $\pm$ 5

## BIOPROSPECCIÓN DE PLANTAS EN COLOMBIA

**Tabla 6.***Continuación*

Tetradecano, C <sub>14</sub>	0.5±0.2	-	-
Ácido acético	0.9±0.6	0.9±0.1	1.0±0.4
Oct-1-en-3-ol	45±2	37±4	28±3
Furfural	0.3±0.1	0.5±0.1	1.2±0.2
Óxido de nerol	-	0.6±0.3	0.3±0.1
Decanal	1.2±0.1	1.7±0.4	1.4±0.1
α-Copaeno	1.0±0.1	0.5±0.1	-
Linalol	1.6±0.2	1.7±0.7	1.1±0.2
Octan-1-ol	2.1±0.6	3.3±0.1	5.6±0.6
iso-Isopulegol	0.7±0.1	-	-
trans-p-Menth-2-en-1-ol	1.9±0.4	-	-
β-Copaeno	1.3±0.1	0.61±0.1	-
trans-β-Cariofileno	2.4±0.2	1.2±0.1	0.6±0.1
Terpinen-4-ol	0.6±0.1	-	-
Istd (Hexadecano, C <sub>14</sub> )	10±3	27±2	33±3
cis-Thujopseno	1.3±0.1	0.7±0.1	0.2±0.1
Aromadendreno	0.5±0.1	-	-
Nonanol	1.2±0.2	3.5±0.7	6±1
allo-Aromadendreno	1.0±0.1	-	-
α-Humuleno	0.5±0.1	-	-
α-Terpineol	0.5±0.1	0.7±0.4	-
β-Selineno	1.0±0.1	-	-
1,4-Dimetoxibenceno	1.2±0.1	0.5±0.1	-
α-Farneseno	0.6±0.1	0.5±0.1	0.6±0.1
Acetato de geraniol	0.3±0.1	-	-
Citronelol	0.6±0.1	-	-
Éter de octilo	1.3±0.5	0.6±0.1	0.4±0.1
δ-Cadineno	1.0±0.1	-	-
Salicilato de metilo	0.5±0.2	0.6±0.1	1.0±0.2
Geraniol	1.6±0.7	-	-
cis-Nerolidol	0.6±0.1	0.2±0.1	-
Timol	0.8±0.4	-	-
4-Metoxiacetofenona	1.3±0.4	-	-
Monoterpenos (MH)	6.4	2.1	-
Monoterpenos oxigenados (MO)	9.8	3.0	1.1
Sesquiterpenos (SH)	11.4	3.5	1.4
Compuestos oxigenados, otros	72.1	90.7	96.3

## BIOPROSPECCIÓN DE PLANTAS EN COLOMBIA



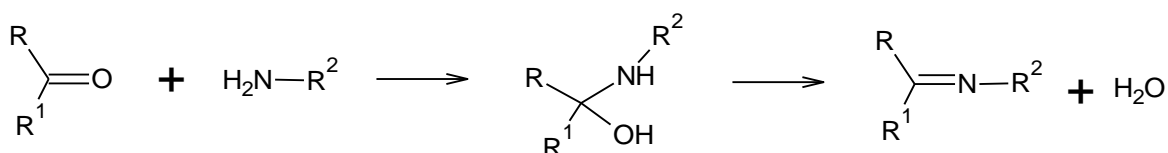
**Figura 20.** Relaciones  $\Sigma A_{total} / A_{istd}$  obtenidas para cada familia de compuestos presentes en las fracciones volátiles obtenidas por HS-SPME/GC-MS, de las flores de *M. myriantha* a las 6:00 a.m., 12 m. y 6:00 p.m., usando la fibra de SPME con el recubrimiento de CAR-PDMS/DVB.

La fragancia de las flores de *M. myriantha* es una mezcla compleja de compuestos orgánicos volátiles y semi-volátiles, que pertenecen a diferentes familias, con grupos funcionales, masa molecular, polaridad y concentración diferentes.

En la fragancia de las flores de *M. myriantha*, los compuestos identificados son, en su mayoría, oxigenados. Los monoterpenos y sesquiterpenos disminuyeron durante el día su emisión, mientras que la emisión de los compuestos oxigenados no terpénicos aumentó durante la tarde (Véase **Figura 20**).

## BIOPROSPECCIÓN DE PLANTAS EN COLOMBIA

Entre los metabolitos secundarios presentes en la fracción volátil, se encuentran alcoholes (oct-1-en-3-ol, 45±2%; nonanol, 1.2±0.2%) y aldehídos (nonanal, 4.3±0.9%; octanal, 0.5±0.1%) (Véase **Tabla 6**): son probablemente productos de respuesta al daño mecánico (Plant Physiology, 2017), realizado en el momento de cortar las flores; son derivados de ácidos grasos, sometidos a peroxidación lipídica y escisión de la cadena alifática; algunos de estos compuestos actúan como repelentes de insectos. Además, aldehídos y cetonas pueden reaccionar con aminas primarias que se hallan en proteínas, ciertos lípidos y ácidos nucleicos, para formar bases de Schiff, reacción en la que se producen enlaces dobles, carbono-nitrógeno (Soca, Bahr y Niño, 2004), como se muestra en la **Figura 21**.



**Figura 21.** Formación de bases de Schiff.

La formación de bases de Schiff está relacionada con una respuesta inflamatoria, que favorece la formación de placas lipídicas en la parte interior de las paredes de las arterias, *i.e.* aterosclerosis (Soca *et al.*, 2004).

Oct-1-en-3-ol (45±2%), limoneno (1.7±0.2%), octan-3-ol (4±1%) y nonanal (4.3±0.9%) fueron compuestos mayoritarios en la fracción volátil aislada de las flores de *M. myriantha*, a las 6:00 a.m. Limoneno presenta actividad antiparasitaria, es efectivo contra ataque de piojos (*Pedilucus humanus corporis* y *P. humanus capitatis*) (Oladimeji, Orafidiya, Ogunniyi y Adewunmi, 2000), es un compuesto muy común en cítricos como el limón (Oladimeji *et al.*,

## BIOPROSPECCIÓN DE PLANTAS EN COLOMBIA

2000) y en el orégano, posee propiedades antioxidante (Sun, 2007) y antimicrobiana (Milos, Mastelic y Jerkovic, 2000).

Entre los compuestos que se encontraron en menor proporción a las 6:00 a.m. figuran acetato de geranilo ( $0.3\pm 0.1\%$ ), citronelol ( $0.6\pm 0.1\%$ ),  $\beta$ -selineno ( $1.0\pm 0.1\%$ ) y 1,8-cineol ( $1.5\pm 0.1\%$ ); al 1,8-cineol, conocido también como eucaliptol, se le atribuye actividad larvicida en ensayos con *Aedes aegypti* (Aligiannis, Kalpoutzakis, Mitaku y Chinou, 2001 y Levya *et al.*, 2009).

Durante el monitoreo de volátiles, realizado a las 12:00 m., se identificaron principalmente oct-1-en-3-ol ( $40\pm 11\%$ ), nonanal ( $22\pm 9\%$ ) y octanal ( $3\pm 1\%$ ); en una proporción mayor, comparados con hexanol ( $0.6\pm 0.1\%$ ) y salicilato de metilo ( $0.6\pm 0.1\%$ ). A las 6:00 p.m., en la fracción volátil de las flores de *M. myriantha* se identificaron nonanol ( $6\pm 1\%$ ), nonanal ( $25\pm 5\%$ ) y oct-1-en-3-ol ( $39\pm 4\%$ ); en una proporción mayor, comparados con *cis*-thujopseno ( $0.2\pm 0.1\%$ ) y *trans*- $\beta$ -cariofileno ( $0.6\pm 0.1\%$ ), que se encontraron en menor proporción.

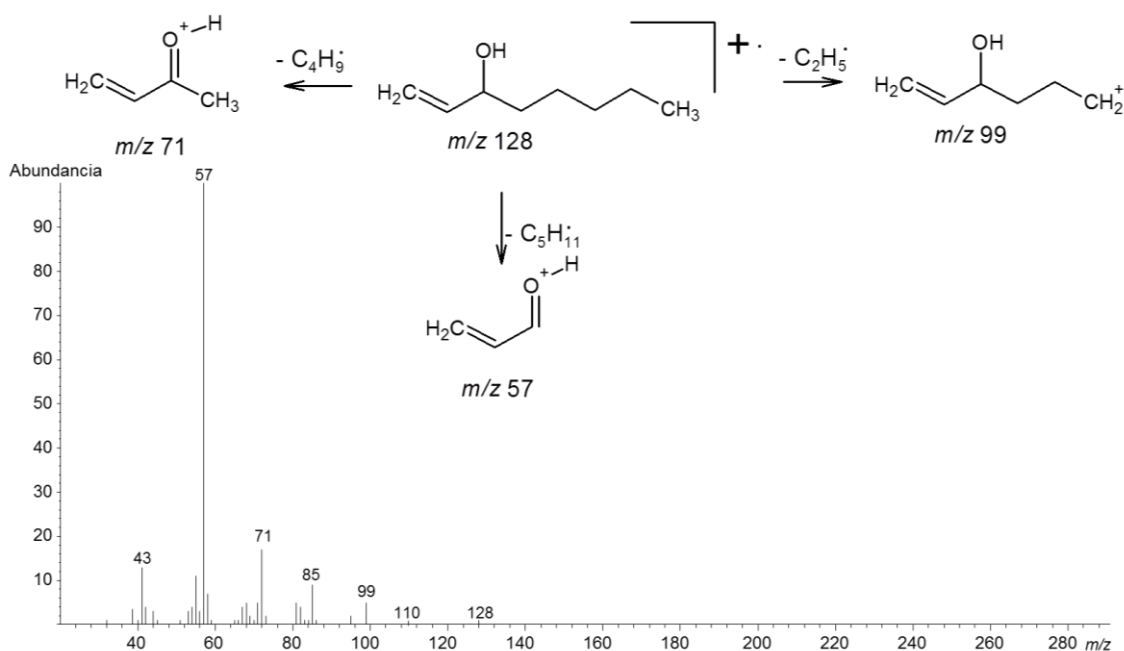
En la fracción volátil de las flores de *M. myriantha*, la emisión del *trans*- $\beta$ -cariofileno disminuye a las 6:00 p.m. ( $0.6\pm 0.1\%$ ) comparado con las 6:00 a.m. ( $2.4\pm 0.2\%$ ), este compuesto está presente comúnmente en aceites esenciales [Aguilera, Navarro, Tacoronte, Leyva, Marquetti, 2003; Acevedo *et al.*, 2007; Pino, Melendez y Stashenko, 2009 y Jaramillo, Duarte, Muñoz, Stashenko, 2010) y, se ha reportado que posee actividad contra la leishmaniasis (Soares *et al.*, 2013).

La emisión del oct-1-en-3-ol disminuye de  $45\pm 2\%$  en el día, hasta  $28\pm 3\%$  en horas de la noche, es el compuesto mayoritario en la fragancia de flores de *M. myriantha* y un buen atrayente de insectos (Takken y Kline, 1989), especialmente, para mosquitos de los géneros *Aedes*, *Anopheles*, *Coquilletidia*, *Psorophora* y *Mansonia* (Henderson, 1986), la disminución de

## BIOPROSPECCIÓN DE PLANTAS EN COLOMBIA

este compuesto durante el día, podría atribuirse a la polinización de la planta; la cual, en la mañana, emite mayor cantidad de volátiles, puesto que necesita estimular a visitantes florales para su polinización [Herman y Krzysztof, 2016; Xu, Zhu, Buss y Leal, 2015 y Okull, Beelman y Gourama, 2003).

En la **Figura 22**, se muestra la ruta de fragmentación del oct-1-en-3-ol (EI, 70 eV) y el espectro de masas experimental obtenido por GC-MS.



**Figura 22.** Espectro de masas experimental del oct-1-en-3-ol, obtenido por GC-MS y su ruta de fragmentación. Impacto de electrón (EI, 70 eV).

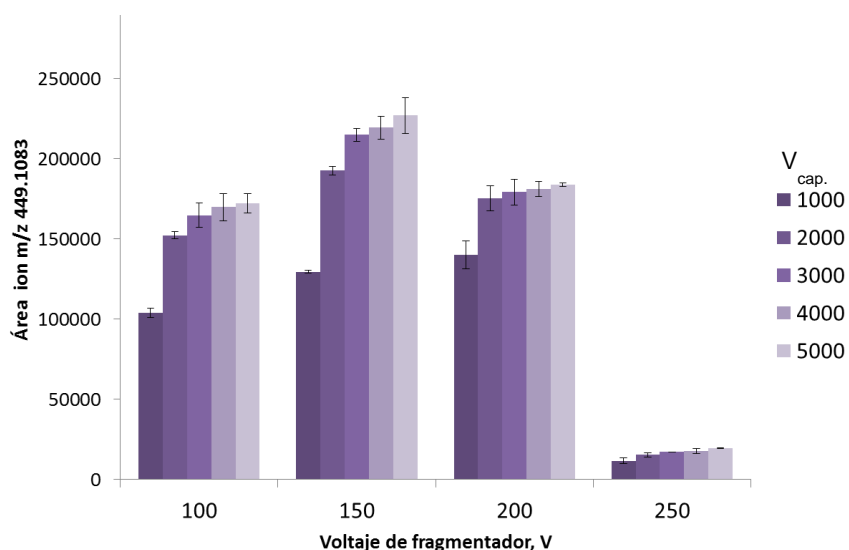
En el espectro de masas (Véase **Figura 22**), la intensidad del ion molecular,  $m/z$  128, es muy baja, debido a su poca estabilidad y una larga cadena hidrocarbonada. Además, se observa el ion característico,  $[M-H_2O]^+$ , proveniente de la deshidratación del ion molecular. La corriente iónica total, se encuentra representada casi en su totalidad por iones fragmento, generados por ruptura simple del ion molecular, el ion pico de base en  $m/z$  57, se origina por la pérdida ( $M-C_5H_{11}$ )

## BIOPROSPECCIÓN DE PLANTAS EN COLOMBIA

(ruptura  $\beta$  y ruptura alílica); este es el ion más estable, porque en él, se deslocaliza la carga positiva a través de la conjugación de enlaces dobles. También, se observa una serie homóloga de iones fragmentos en  $m/z$  43, 57, 71 y 85, típicos para hidrocarburos alifáticos.

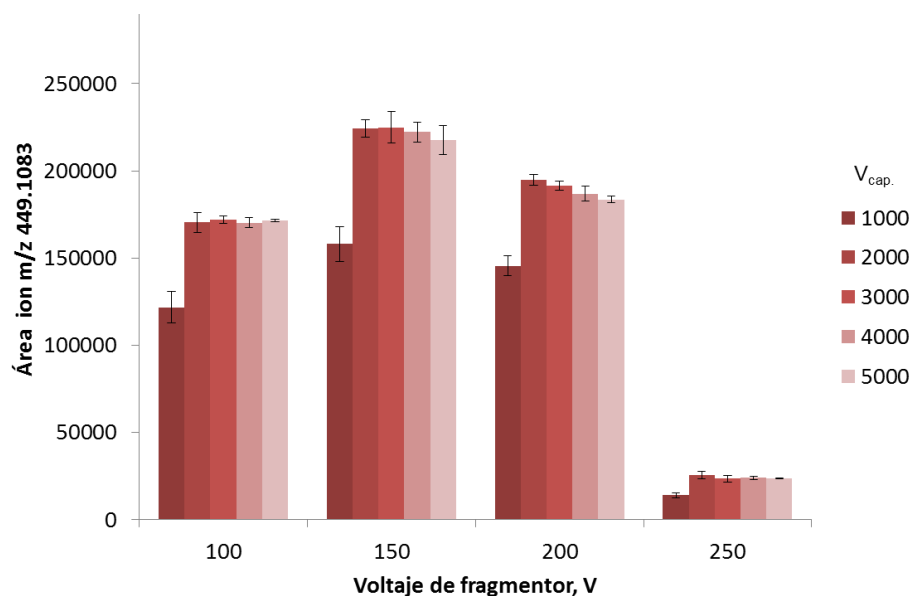
#### 5.4. Determinación de las mejores condiciones para el análisis por LC- ESI(+)-TOF-MS de un patrón certificado de una antocianina

El análisis para obtener las mejores condiciones por LC-ESI(+)-TOF-MS se realizó con la antocianina, cianidina-3-glucósido, como se describió en la **Sección 4.5.2**. En las **Figuras 23 y 24**, se muestran los resultados, de las áreas cromatográficas obtenidas, para el ion molecular  $[M]^+ = 449.1083$ , a diferentes valores de voltajes de capilar y de fragmentador, para dos fases móviles evaluadas, con el ácido fórmico al 0.2%, en acetonitrilo o en metanol.



**Figura 23.** Áreas cromatográficas obtenidas para el ion  $m/z$  449.1083  $[M]^+$ , a diferentes voltajes de fragmentador y de capilar, con la fase móvil: A-ácido fórmico 0.2% en agua y B-ácido fórmico 0.2% en acetonitrilo (n=2).

## BIOPROSPECCIÓN DE PLANTAS EN COLOMBIA

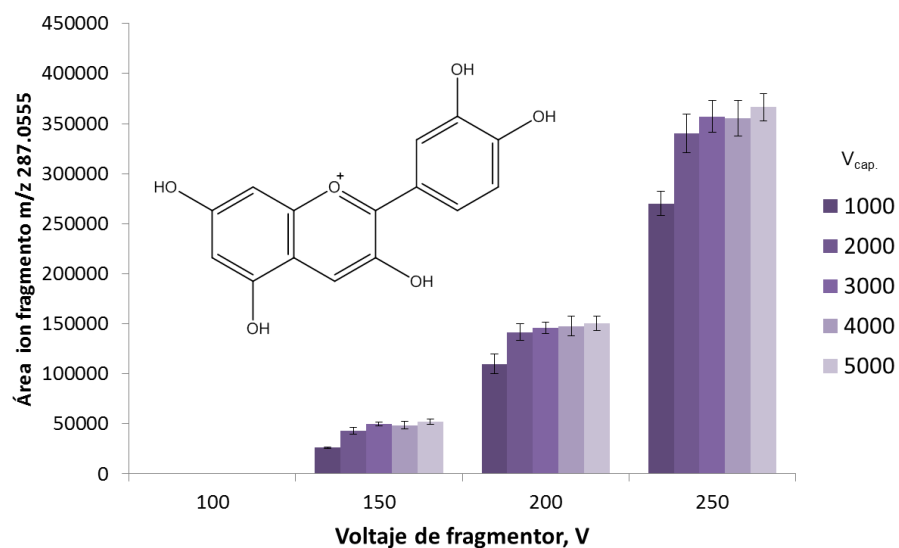


**Figura 24.** Áreas cromatográficas obtenidas para el ion  $m/z$  449.1083  $[M]^+$  a diferentes voltajes de fragmentador y de capilar con la fase móvil: A-ácido fórmico 0.2% en agua y B-ácido fórmico 0.2% en metanol ( $n=2$ ).

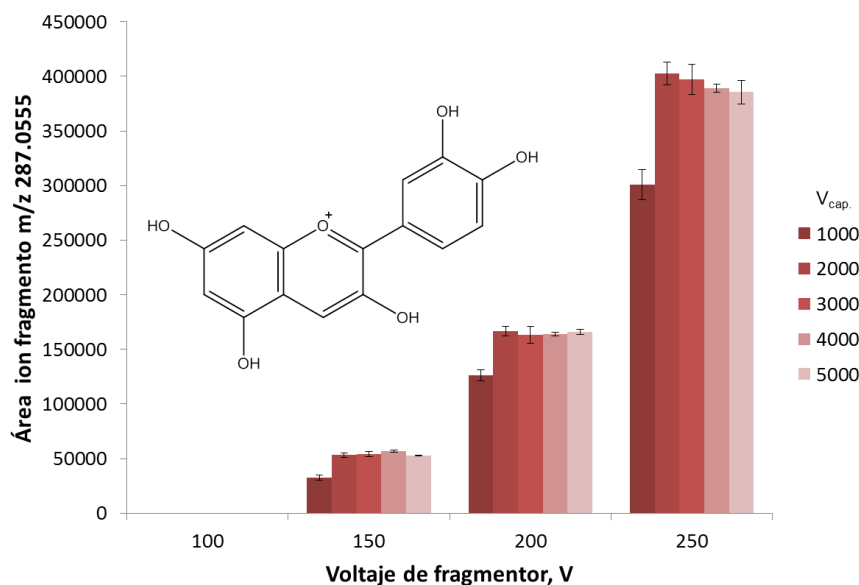
En las **Figuras 23** y **24**, se observa que los valores de las áreas cromatográficas para el ion  $[M]^+=449.1083$ , más altos, se obtuvieron con un voltaje de fragmentador  $V_{frag}$ , de 150 V, y las áreas cromatográficas, menores, se obtuvieron con un  $V_{frag}=250$  V; así mismo, el voltaje de capilar más alto favorece la formación de iones  $[M]^+$ .

Como la molécula cianidina-3-glucósido se fragmenta, perdiendo el azúcar unido a su estructura, en las **Figuras 25** y **26**, se muestran los resultados de graficar las áreas cromatográficas obtenidas para el ion fragmento, ion  $[M-azúcar]^+=287.0555$  a diferentes valores de voltajes de capilar y de fragmentador, para la fase móvil: A- ácido fórmico 0.2% en agua y B- ácido fórmico 0.2% en acetonitrilo, ACN, o en metanol, MeOH.

## BIOPROSPECCIÓN DE PLANTAS EN COLOMBIA



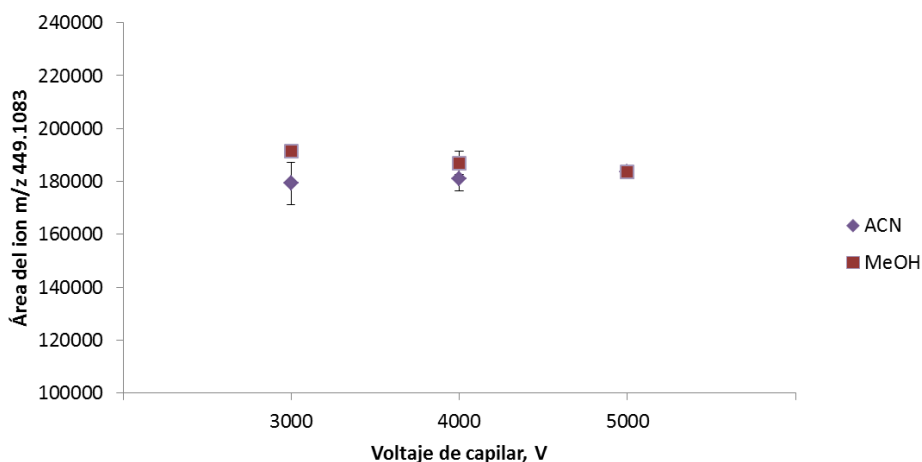
**Figura 25.** Áreas cromatográficas obtenidas para el ion  $m/z$  287.0555  $[M\text{-azúcar}]^+$  a diferentes voltajes de fragmentador y de capilar con la fase móvil A-ácido fórmico 0.2% en agua y B-ácido fórmico 0.2% en acetonitrilo ( $n=2$ ).



**Figura 26.** Áreas cromatográficas obtenidas para el ion  $m/z$  287.0555  $[M\text{-azúcar}]^+$  a diferentes voltajes de fragmentador y de capilar con la fase móvil: A-ácido fórmico 0.2% en agua y B-ácido fórmico 0.2% en metanol ( $n=2$ ).

BIOPROSPECCIÓN DE PLANTAS EN COLOMBIA

En las **Figuras 25** y **26** se puede observar que los valores de las áreas cromatográficas obtenidas para el ion  $[M\text{-azúcar}]^+=287.0555$ , más altos, se obtuvieron con un  $V_{\text{frag}}$  de 250 V y con voltajes de capilar más altos. En las gráficas, no se observan diferencias significativas entre los valores de las áreas cromatográficas obtenidas al usar metanol o acetonitrilo como solvente orgánico de la fase móvil. Comparando las áreas cromatográficas obtenidas al usar acetonitrilo o metanol, como solvente orgánico de la fase móvil, a diferentes valores de  $V_{\text{frag}}$  para los iones  $m/z$  449.1087 y  $m/z$  287.0555, el valor de  $V_{\text{frag}}$ , con el que se obtienen áreas cromatográficas mayores, es de 200 V (Véanse las **Figuras 23, 24, 25** y **26**). En la **Figura 27**, se muestran las áreas cromatográficas obtenidas para el ion  $m/z$  449.1083  $[M]^+$  a  $V_{\text{frag}}=200$  V, con fase móvil: A-ácido fórmico al 0.2% en agua y B-ácido fórmico al 0.2% en acetonitrilo o metanol.

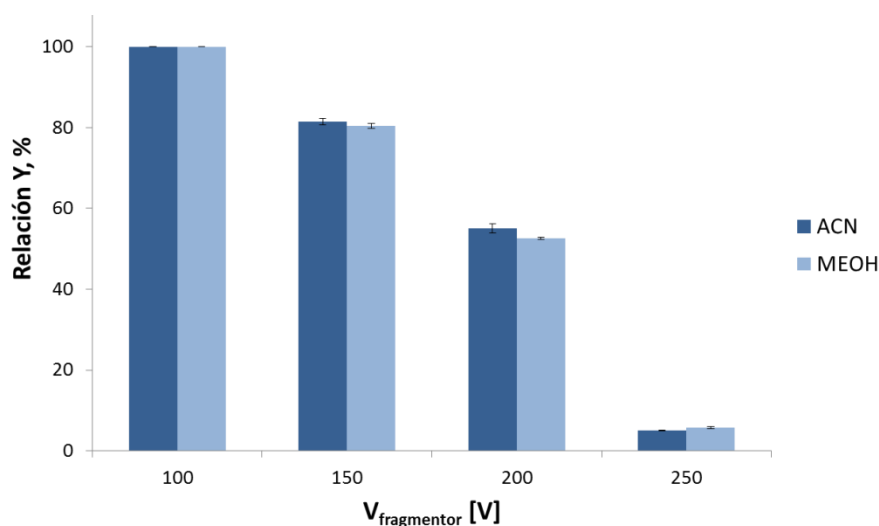


**Figura 27.** Áreas cromatográficas obtenidas para el ion  $[M]^+=449.1083$  con  $V_{\text{frag}}=200$  V, y diferentes valores de voltaje de capilar, para la fase móvil: A-ácido fórmico al 0.2% en agua y B-ácido fórmico al 0.2% en acetonitrilo, ACN, o en metanol, MeOH.

## BIOPROSPECCIÓN DE PLANTAS EN COLOMBIA

En la **Figura 27** no se observa una diferencia significativa para la formación del ion  $m/z$  449.1083  $[M]^+$  usando un  $V_{\text{frag}}$  de 200 V, y valores de  $V_{\text{cap}}$  de 4000 o 5000 V, las áreas cromatográficas obtenidas a partir de las corrientes iónicas extraídas (EIC), no se ven influenciadas significativamente por la fase móvil.

En las **Figuras 25 y 26**, se observa que los valores de áreas cromatográficas para el ion fragmento  $m/z$  287.0555  $[M\text{-azúcar}]^+$ , más altos, se obtienen al usar  $V_{\text{cap}}$  de 3000-5000 V, y  $V_{\text{frag}}$ : 250 V, pero, al aplicar este voltaje de fragmentador, se generan muchos iones fragmento, y disminuyen iones moleculares. Lo que se desea, es obtener aproximadamente 50% de iones-fragmento y 50% de iones moleculares; en la **Figura 28** se observa la gráfica obtenida para la relación Y, según lo descrito en la **Ecuación 2** (Véase **Sección 4.5.2**).



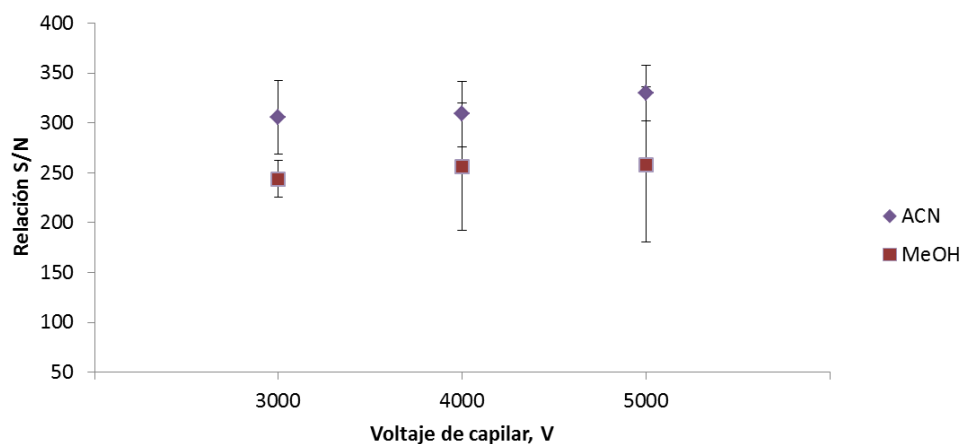
**Figura 28.** Relación Y, en porcentajes de la formación del ion molecular ( $m/z$  449.1087) y su respectivo ion fragmento ( $m/z$  287.0555) a diferentes valores de  $V_{\text{cap}}$  y  $V_{\text{frag}}$  en fase móvil: A-ácido fórmico al 0.2% en agua y B-ácido fórmico al 0.2% en acetonitrilo o metanol.

## BIOPROSPECCIÓN DE PLANTAS EN COLOMBIA

En la **Figura 28**, se observa que al aplicar un  $V_{\text{frag}}$  de 200 V se obtiene aproximadamente una relación 50:50 para la formación de iones  $m/z$  449.1087  $[M]^+$  y  $m/z$  287.0555  $[M\text{-azúcar}]^+$ , de esta manera, se puede identificar, tanto un compuesto que tenga azúcar en su estructura (antocianina) o, un compuesto que no tenga azúcar unido a su estructura (antocianidina). Además, también se observa que al aplicar un  $V_{\text{frag}}$  de 100 V, la molécula en forma de ion molecular, no se fragmenta. El obtener solo ion molecular en el espectro de masas, dificulta la identificación y elucidación de la estructura del compuesto. Lo contrario pasa al aplicar un  $V_{\text{frag}}$  de 250 V; con este voltaje se obtienen muchos iones fragmentos y pocos iones moleculares, lo cual, también dificulta la identificación del compuesto. Ferrer *et al.* (2005), analizaron 15 pesticidas en frutos y vegetales, por LC-TOF-MS y también consideraron que la mejor relación entre ion molecular y iones-fragmento es 50:50, para obtener información estructural a partir de los fragmentos generados y el ion molecular.

A continuación, se muestran los resultados obtenidos al graficar la relación señal/ruido (S/N), a un voltaje de fragmentador de 200 V y diferentes valores de voltaje de capilar, para cada una de las fases móviles usadas.

## BIOPROSPECCIÓN DE PLANTAS EN COLOMBIA



**Figura 29.** Relación señal/ruido, S/N, para el ion  $m/z$  449.1078  $[M]^+$  a 200 V de voltaje de fragmentador y diferentes valores de voltajes de capilar en fase móvil: A-ácido fórmico al 0.2% en agua y B-ácido fórmico al 0.2% en acetonitrilo o metanol.

Los valores de relación S/N, más altos, se obtuvieron con la fase móvil de ácido fórmico al 0.2% en acetonitrilo, al aplicar un  $V_{cap}$  de 3000 V (Véase **Figura 29**). Sin embargo, al utilizar voltajes de capilar mayores, no se observa una diferencia significativa entre los valores de S/N.

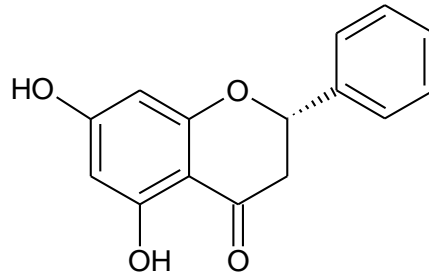
A partir de los análisis realizados, con las áreas cromatográficas obtenidas y los valores de la relación señal/ruido, se escogieron las condiciones experimentales con las que se obtiene la mayor respuesta del observable, correspondiente a voltaje capilar de 4000 V, voltaje de fragmentador de 200 V y el ácido fórmico 0.2% en acetonitrilo, como la fase móvil B. Con estos parámetros, se realizó el análisis de los extractos hidroalcohólicos y los obtenidos por MSPD, de hojas, flores, tallos y frutos de la planta *M. myriantha*.

**5.5. Identificación y cuantificación por LC-ESI(+)-TOF-MS de flavonoides presentes en extractos obtenidos con solventes o por MSPD de hojas, flores, tallos y frutos de *M. myriantha*.**

**5.5.1. Identificación y cuantificación de los flavonoides presentes en los extractos obtenidos con solventes de diferentes partes de *M. myriantha*.** La identificación y cuantificación de los metabolitos secundarios presentes en los extractos, se realizó por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas, siguiendo la metodología, que se describe en la Sección 4.5.2. La identificación de los compuestos se realizó a partir de las masas exactas calculadas usando el software de datos AT MassHunter (Versión B.06.00-SP3), la exactitud de las masas  $\Delta ppm$  (Ecuación 5) y la comparación de los tiempos de retención y la fragmentación con los de patrones certificados.

$$\Delta ppm = \frac{Masa_{calculada} - Masa_{experimental}}{Masa_{calculada}} \times 10^6 \quad \text{Ecuación 5}$$

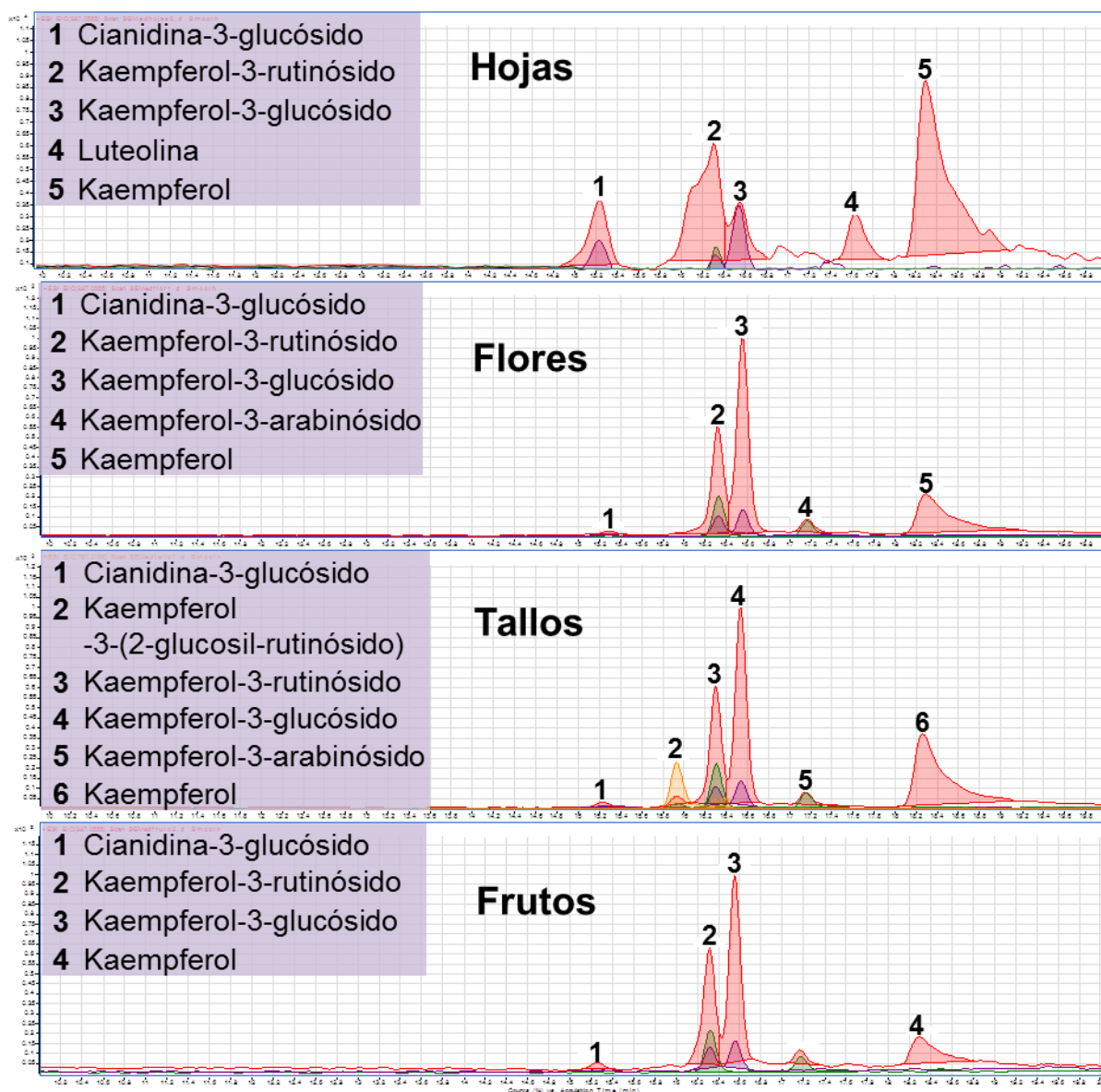
La cuantificación de los compuestos identificados en los extractos, se realizó por el método del estándar externo, se construyó una curva de calibración, para los patrones certificados, cianidina-3-glucósido, kaempferol-3-glucósido, kaempferol y luteolina, y para los demás compuestos identificados, la cuantificación se realizó por el método del estándar interno, para lo cual se usó el flavonoide de tipo flavonona, pinocembrina ( $C_{15}H_{12}O_4$ ) (Véase **Figura 30**), a una concentración de 200  $\mu g/L$  (Véase **Anexo E**).



**Figura 30.** Pinocembrina ( $C_{15}H_{12}O_4$ )  $[M+H]^+ = 257.0808$ , estándar interno usado para el análisis por LC-ESI(+)-TOF-MS de los extractos hidroalcohólicos y los obtenidos por MSPD de hojas, flores, tallos y frutos de *M. myriantha*.

En la **Figura 31** y en las **Tablas 7** y **8**, se muestran los compuestos identificados en los extractos hidroalcohólicos obtenidos de hojas, flores, tallos y frutos de *M. myriantha* y su cuantificación.

## BIOPROSPECCIÓN DE PLANTAS EN COLOMBIA



**Figura 31.** Corrientes iónicas extraídas en el análisis por LC-ESI(+)-MS-TOF de los extractos hidroalcohólicos obtenidos de hojas, flores, tallos y frutos de *M. myriantha*.

**Tabla 7.**

*Identificación de compuestos presentes en los extractos hidroalcohólicos obtenidos de hojas, flores, tallos y frutos de M. myriantha por LC-ESI(+)-MS-TOF.*

Compuesto	Fórmula	Masas		$\Delta$ ppm
		Calculada	Experimental	
Cianidina-3-glucósido*	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>11</sub>	449.1083	449.1080	0.79
Kaempferol-3-(2-glucosil-rutinósido)**	C <sub>33</sub> H <sub>41</sub> O <sub>20</sub>	757.2186	757.2210	0.05
Kaempferol-3-rutinósido**	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>15</sub>	595.1657	595.1660	0.46
Kaempferol-3-glucósido*	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>11</sub>	449.1083	449.1079	0.05
Kaempferol-3-arabinósido**	C <sub>20</sub> H <sub>19</sub> O <sub>10</sub>	419.0973	419.0953	0.15
Luteolina*	C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> O <sub>6</sub>	287.0555	287.0554	0.81
Kaempferol*	C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> O <sub>6</sub>	287.0555	287.0560	0.37

*Nota:* \*Identificación confirmatoria, por comparación de tiempos de retención con los de patrones certificados y la fragmentación del ion (Véase **Anexo E**).

\*\* Identificación tentativa, según la fragmentación de la molécula protonada [M+H]<sup>+</sup>.

**Tabla 8.**

*Cuantificación de los metabolitos secundarios aislados con extracciones hidroalcohólicas de hojas, flores, tallos y frutos de M. myriantha por LC-ESI(+)-MS-TOF.*

Compuesto	mg compuesto/ g de extracto ( $\pm$ SD, n=3)			
	Hojas	Flores	Tallos	Frutos
Cianidina-3-glucósido*	0.10 $\pm$ 0.05	0.006 $\pm$ 0.001	0.05 $\pm$ 0.01	0.0010 $\pm$ 0.0001
Kaempferol-3-(2-glucosil-rutinósido)**	-	-	0.06 $\pm$ 0.02	-
Kaempferol-3-rutinósido**	0.08 $\pm$ 0.01	0.37 $\pm$ 0.02	0.7 $\pm$ 0.1	0.14 $\pm$ 0.02
Kaempferol-3-glucósido*	0.07 $\pm$ 0.01	1.4 $\pm$ 0.1	2.6 $\pm$ 0.6	0.5 $\pm$ 0.1
Kaempferol-3-arabinósido**	-	0.05 $\pm$ 0.01	0.08 $\pm$ 0.01	-

**Tabla 8.***Continuación*

Luteolina*	0.11 ± 0.03	-	-	-
Kaempferol*	1.1 ± 0.1	2.1 ± 0.1	6 ± 1	0.5 ± 0.1

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

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

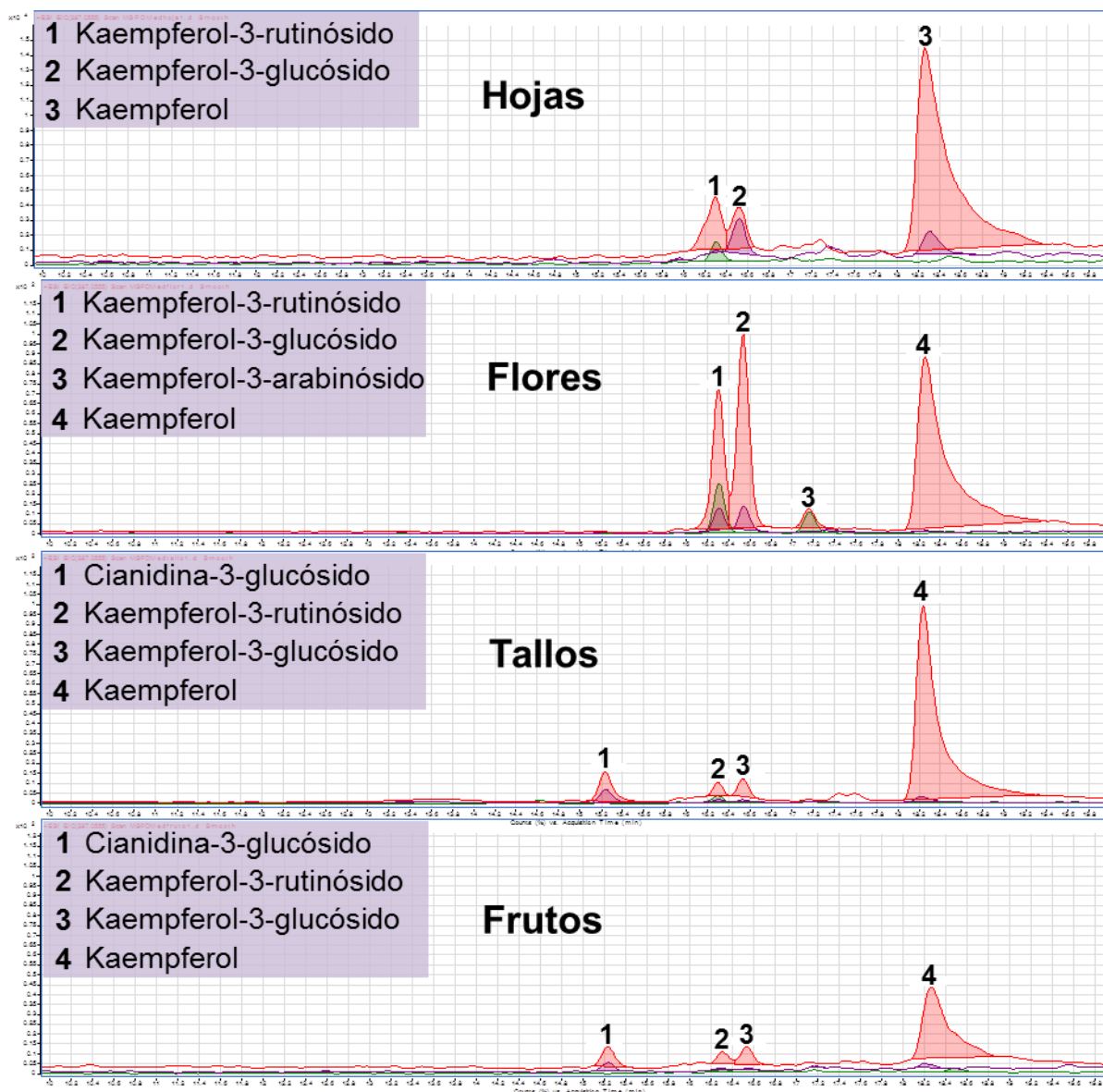
En los extractos hidroalcohólicos, se identificaron polifenoles, cinco flavonoides de tipo flavona, kaempferol-3-(2-glucosil-rutinósido), kaempferol-3-rutinósido, kaempferol-3-glucósido, kaempferol-3-arabinósido, luteolina, kaempferol y una antocianina, cianidina-3-glucósido.

**5.5.2. Identificación y cuantificación de flavonoides presentes en los extractos obtenidos por MSPD de hojas, flores, tallos y frutos de *M. myriantha*.** La caracterización de los metabolitos secundarios presentes en los extractos obtenidos por MSPD, se realizó por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas, siguiendo la metodología descrita en la Sección 4.5.2. La identificación de los compuestos se realizó a partir de las masas exactas calculadas usando el *software AT MassHunter* (Versión B.06.00-SP3), la exactitud de las masas  $\Delta$ ppm (Ecuación 5) y la comparación de los tiempos de retención y la fragmentación, con los de patrones certificados.

La cuantificación de los compuestos identificados, en los extractos obtenidos por MSPD, se realizó como se describe en la **Sección 5.5.1**.

En la **Figura 32** y en las **Tablas 9** y **10**, se muestran los compuestos identificados en los extractos obtenidos por MSPD de hojas, flores, tallos y frutos de *M. myriantha* y su respectiva cuantificación.

## BIOPROSPECCIÓN DE PLANTAS EN COLOMBIA



**Figura 32.** Corrientes iónicas extraídas en el análisis por LC-ESI(+)-MS-TOF de los extractos obtenidos por MSPD de hojas, flores, tallos y frutos de *M. myriantha*.

**Tabla 9.**

*Identificación de los compuestos presentes en los extractos obtenidos por MSPD de hojas, flores, tallos y frutos de M. myriantha por LC-ESI(+)-MS-TOF.*

Compuesto	Fórmula	Masas		$\Delta$ ppm
		Calculada	Experimental	
Cianidina-3-glucósido*	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>11</sub>	449.1083	449.1091	0.34
Kaempferol-3-rutinósido**	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>15</sub>	595.1657	595.1659	0.37
Kaempferol-3-glucósido*	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>11</sub>	449.1083	449.1081	0.16
Kaempferol-3-arabinósido**	C <sub>20</sub> H <sub>19</sub> O <sub>10</sub>	419.0973	419.0974	0.15
Kaempferol*	C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> O <sub>6</sub>	287.0555	287.0560	0.91

*Nota:* \*Identificación confirmatoria, por comparación de tiempos de retención con los de patrones certificados y la fragmentación del ion.

\*\* Identificación tentativa, según la fragmentación de la molécula protonada [M+H]<sup>+</sup>.

**Tabla 10.**

*Cuantificación de los metabolitos secundarios aislados por MSPD de hojas, flores, tallos y frutos de M. myriantha por LC-ESI(+)-MS-TOF.*

Compuesto	mg compuesto/ g de extracto ( $\pm$ SD, n=3)			
	Hojas	Flores	Tallos	Frutos
Cianidina-3-glucósido*	-	-	0.37 $\pm$ 0.03	0.025 $\pm$ 0.005
Kaempferol-3-rutinósido**	0.05 $\pm$ 0.01	0.25 $\pm$ 0.02	0.05 $\pm$ 0.01	0.008 $\pm$ 0.002
Kaempferol-3-glucósido*	0.10 $\pm$ 0.01	0.8 $\pm$ 0.1	0.20 $\pm$ 0.01	0.060 $\pm$ 0.004
Kaempferol-3-arabinósido**	-	0.035 $\pm$ 0.002	-	-
Kaempferol*	1.8 $\pm$ 0.2	4.7 $\pm$ 0.5	12 $\pm$ 3	0.6 $\pm$ 0.1

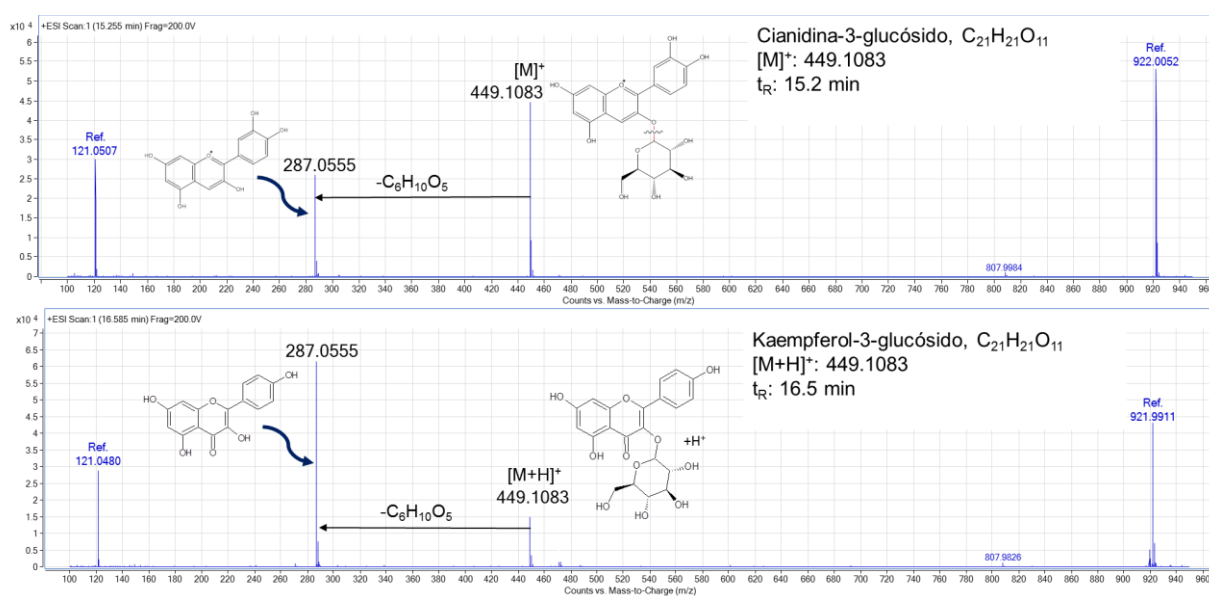
*Nota:* \*Cuantificación por el método del estándar externo, usando la curva de calibración para cada flavonoide (Véase **Sección 5.5.1**).

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

## BIOPROSPECCIÓN DE PLANTAS EN COLOMBIA

En los extractos obtenidos por MSPD, se identificaron polifenoles, cuatro flavonoides de tipo flavona, kaempferol-3-rutinósido, kaempferol-3-glucósido, kaempferol-3-arabinósido, kaempferol y una antocianina, cianidina-3-glucósido.

Para la identificación de los metabolitos secundarios aislados por extracción hidroalcohólica o por MSPD, se analizaron los espectros de masas obtenidos, como se muestra en las **Figuras 33, 34 y 35**.

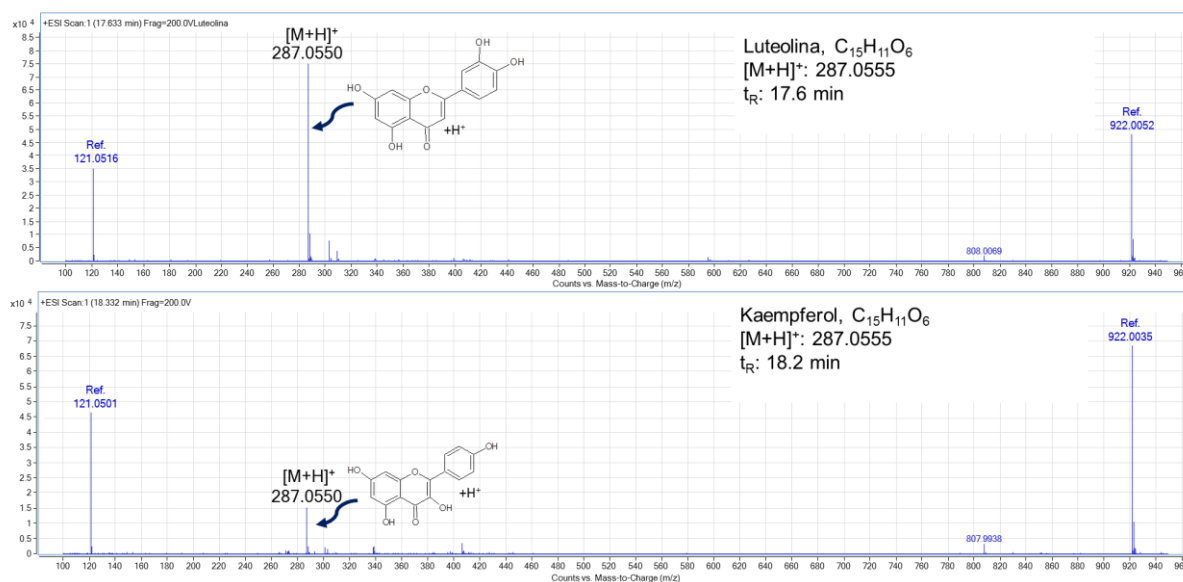


**Figura 33.** Espectros de masas de los compuestos cianidina-3-glucósido y kaempferol-3-glucósido, obtenidos por LC-ESI(+)-TOF-MS.

La identificación de los metabolitos secundarios mostrados en la **Figura 33** se realizó por la comparación de los tiempos de retención de los compuestos, comparados con los de los patrones certificados. La cianidina-3-glucósido y el kaempferol-3-glucósido, presentan la misma masa exacta. La presencia en sus estructuras del mismo azúcar como sustituyente (glucosa, C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>), se observa en sus espectros de masas; por esto, ambos compuestos presentan igual ion molecular y molécula protonada en  $m/z$  449.1083, e igual ion-fragmento en  $m/z$  287.0555, formado por la

## BIOPROSPECCIÓN DE PLANTAS EN COLOMBIA

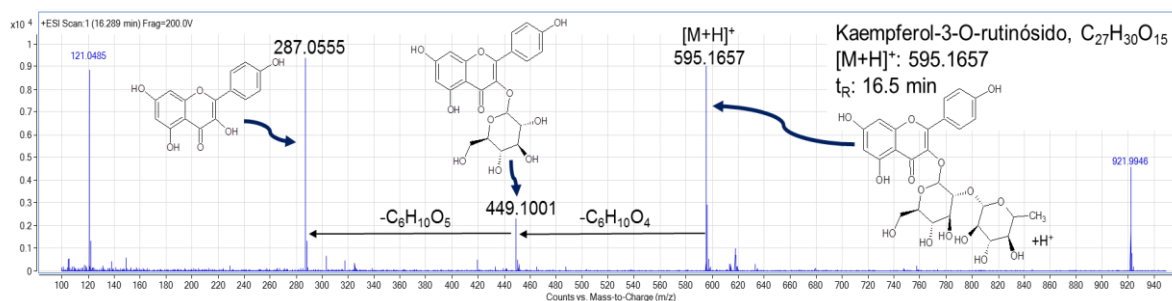
pérdida del azúcar como molécula neutra. La intensidad del ion se relaciona directamente con la estructura del compuesto y con su capacidad de estabilizar la carga positiva; el ion molecular de la cianidina-3-glucósido tiene una intensidad alta (>50%), mientras que la intensidad del kaempferol-3-glucósido protonado  $[M+H]^+$  es baja (<20%). La corriente iónica extraída total en el caso de la cianidina-3-glucósido se encuentra representada en su mayoría, por el ion molecular; caso contrario ocurre con el kaempferol-3-glucósido, donde el ion fragmento en  $m/z$  287.0555 es el ion predominante. En los espectros de masas se puede observar la presencia de los respectivos iones isotópicos para cada una de las señales, los cuales, son uno de los criterios para la calidad de un espectro de masas, así como pocas señales ajenas al compuesto identificado (*background*). Los iones en  $m/z$  121 y  $m/z$  922 son iones de referencia, provenientes de soluciones de purina ( $C_5H_4N_4$ ) y hexaquis (1*H*, 1*H*, 3*H*-tetrafluoropentoxi)-fosfazeno ( $C_{18}H_{18}O_6N_3P_3F_{24}$ ), respectivamente, empleados para la corrección en tiempo real de la masa.



**Figura 34.** Espectros de masas de los isómeros de posición luteolina y kaempferol, obtenidos por LC-ESI(+)-TOF-MS.

## BIOPROSPECCIÓN DE PLANTAS EN COLOMBIA

Aunque los compuestos luteolina y kaempferol presentan la misma masa exacta, se pueden diferenciar según sus tiempos de retención, debido a que cada uno interactúa de una manera diferente con la fase móvil y estacionaria de la columna cromatográfica. La luteolina protonada tiene una intensidad alta (>50%), mientras que la intensidad del kaempferol protonado es baja (<20%) (Véase **Figura 34**). También, se puede observar la presencia de los iones isotópicos en las señales de los iones moleculares y bajo *background*. Se observa, que luteolina, como kaempferol, no se fragmentan bajo las condiciones experimentales empleadas.



**Figura 35.** Espectro de masas del flavonoide kaempferol-3-rutinósido, obtenido por LC-ESI(+)-TOF-MS.

La identificación del flavonoide kaempferol-3-rutinósido (Véase **Figura 35**) se realizó tentativamente, según la fragmentación de la molécula protonada. La presencia en su estructura de un disacárido como sustituyente rutinosa (C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>10</sub>), la cual es formada por la unión de dos monosacáridos, glucosa y ramnosa, por un enlace glucosídico, se observa en los fragmentos obtenidos en su espectro de masas, el ion fragmento 1 en *m/z* 449.1001, formado por la pérdida del azúcar ramnosa, como molécula neutra. El fragmento 1, en *m/z* 449.1001, luego, puede seguir fragmentándose y perder el azúcar glucosa, también, como molécula neutra, generando el ion en

## BIOPROSPECCIÓN DE PLANTAS EN COLOMBIA

$m/z$  287.0555 (fragmento 2) correspondiente al kaempferol. Las intensidades de las señales del espectro de masas, se pueden relacionar con la estructura del kaempferol-3-rutinósido, la molécula protonada en  $m/z$  595.1657 tiene una intensidad alta, al igual que el fragmento 2 (>50%), mientras que la intensidad del fragmento 1 ( $m/z$  449.1001) es baja (<20%), la corriente iónica extraída total se encuentra representada en su mayoría, por el ion molecular y por el fragmento 2. También, se observan los respectivos iones isotópicos para cada una de las señales, los cuales, son uno de los criterios para la calidad de un espectro de masas, además, el *background* fue bajo. Con los iones en  $m/z$  121 y en  $m/z$  922 se realizó la corrección de masas en tiempo real.

Entre los compuestos identificados, se encuentran flavonoides de tipo flavona (luteolina, kaempferol y derivados de kaempferol) y una antocianina derivada de cianidina, lo que indica que las técnicas de extracción permitieron extraer diferentes clases de flavonoides.

En los extractos hidroalcohólicos se logró identificar mayor número de compuestos, en comparación con los extractos obtenidos por MSPD (Véanse las **Tablas 7 y 9**), pero, las concentraciones de los compuestos identificados fueron mayores en los extractos obtenidos por MSPD, comparados con los extractos hidroalcohólicos. Las concentraciones más altas de los compuestos aislados por MSPD, pueden deberse a que el movimiento mecánico durante la homogeneización de las muestras junto con la sílice, facilita la transferencia de masa desde la matriz hacia el solvente de elución. Esto concuerda con lo publicado por Martins, Ferreira, Varela y Teixeira (2006), quienes obtuvieron porcentajes de recuperación superiores al 85% con la extracción por MSPD de fenoles, de hojas de *Ficus carica*, y propusieron que los altos rendimientos obtenidos se debieron a una eficiente interrupción de la estructura de la muestra y a las interacciones entre los analitos no polares y el soporte C<sub>18</sub>.

## BIOPROSPECCIÓN DE PLANTAS EN COLOMBIA

Vande *et al.* (1981), reportaron la presencia de fenoles simples (19%), y flavonoides (5%), en extractos de tallos de *M. magnifica*. No obstante, ellos no reportaron la presencia de kaempferol o derivados de kaempferol en los extractos. En esta investigación, se identificó kaempferol en los extractos hidroalcohólicos y en los obtenidos por MSPD, de todas las partes de la planta *M. myriantha* (hojas, flores, tallos y frutos).

Susanti *et. al.* (2007), identificaron kaempferol y kaempferol-3-glucósido en extractos obtenidos con metanol o con acetato de etilo de flores de la planta *Melastoma malabathricum* L. (Fam. Melastomataceae), compuestos con las actividades antioxidantes y citotóxicas.

Claderon-Montano, Burgos-Moron, Perez-Guerrero y Lopez-Lazaro (2011), muestran un compendio de estudios epidemiológicos y correlacionan una dieta rica en alimentos derivados de plantas, con un efecto protector en la salud humana. Kaempferol y sus derivados, tales como kaempferol-3-rutinósido y kaempferol-3-arabinósido, se encuentran en muchas plantas comestibles, *e.g.*, té, brócoli, repollo, tomate, uvas y fresas; a ellos, se les atribuye una amplia gama de actividades farmacológicas, incluyendo antioxidante, antiinflamatoria y antimicrobiana.

Diferentes marcas de té, fueron analizadas por Matsubara y Rodriguez-Amaya (2006) por cromatografía líquida. Las muestras se compraron en el mercado local, (Campinas, SP); en el estudio, se determinaron los niveles de quercetina, miricetina y kaempferol. Quercetina (2.5-3.4 mg/g hojas secas) predominó en todas las muestras, seguida de kaempferol (1.0-2.0 mg/g hojas secas). Miricetina (1.9 mg/g hoja seca) fue el compuesto que más varió y, estuvo en menor concentración en el té negro; miricetina no se identificó en infusiones de frutas (manzana y fresa) o de hierbas. Al comparar los resultados de Matsubara y Rodriguez-Amaya (2006), con los obtenidos en esta investigación, en las hojas de *M. myriantha* no se identificó quercetina o

## BIOPROSPECCIÓN DE PLANTAS EN COLOMBIA

miricetina, pero, se encontró kaempferol, en concentraciones  $1.8\pm 0.2$  y  $1.1\pm 0.1$  mg/g de extracto, obtenido por MSPD o hidroalcohólico, respectivamente, valores semejantes a los reportados para las marcas de té.

Gordon, Schadow, Quijano y Marx (2011), estudiaron extractos de bayas de la planta *Clidemia rubra* (Aubl.) Mart. (Fam. Melastomataceae) y determinaron el perfil fenólico por HPLC-MS/MS, usaron también compuestos estándar. Entre los compuestos identificados, reportaron cianidina-3-glucósido ( $0.12\pm 0.01$  mg/g); en esta investigación, se identificó cianidina-3-glucósido ( $0.025\pm 0.005$  y  $0.0010\pm 0.0001$  mg/g de extracto, obtenido por MSPD o hidroalcohólico, respectivamente) en las bayas de *M. myriantha*. La concentración reportada por Gordon *et al.* (2011) en bayas de *C. rubra* es *ca.* cinco veces mayor que el obtenido en esta investigación para *M. myriantha*.

Cambie y Ferguson (2003), estudiaron el potencial funcional de alimentos tradicionales, entre los que se encuentran la batata o kumara (*Ipomoea batatas*), el taro (*Colocasia esculenta*) y la dracenia (*Cordyline terminalis*). Entre los compuestos identificados, se encontraron antocianinas derivadas de cianidina, como cianidina-3-glucósido y cianidina-3-ramnósido; compuestos a los cuales se les atribuyeron las propiedades antioxidantes y anti-inflamatorias. En esta investigación, se identificó cianidina-3-glucósido en los extractos hidroalcohólicos de hojas, flores, tallos y frutos de *M. myriantha*, de los cuales, la concentración más alta se obtuvo en hojas y tallos ( $0.10\pm 0.05$  y  $0.05\pm 0.01$  mg/g de extracto); también, se logró identificar cianidina-3-glucósido, en los extractos obtenidos por MSPD de tallos y frutos, en concentraciones de  $0.37\pm 0.03$  y  $0.025\pm 0.005$  mg/g de extracto, respectivamente.

## BIOPROSPECCIÓN DE PLANTAS EN COLOMBIA

Diferentes especies de *Huberia* (Fam. Melastomataceae), fueron estudiadas por Mimura, Salatino y Salatino (2004). Los autores reportaron un total de 17 compuestos, entre ellos, luteolina y derivados de kaempferol. Sugirieron una relación entre la distribución geográfica de la planta y el perfil de flavonoides obtenido. Su análisis multivariado indicó vínculos entre *H. carvalhoi*, *H. espirito-santensis* y *H. minor*. En esta investigación, se identificó la luteolina en los extractos hidroalcohólicos, de hojas de *M. myriantha*, en una concentración de  $0.11 \pm 0.03$  mg/g de extracto.

Lo anterior muestra que en los extractos obtenidos de hojas, flores, tallos y frutos de *M. myriantha* se encuentran compuestos de naturaleza fenólica, a los cuales se les ha atribuido alguna actividad biológica. Con base en estos resultados, la planta estudiada podría ser considerada como promisoría.

Los compuestos identificados por LC-MS, presentes en los extractos hidroalcohólicos o por MSPD de hojas, flores, tallos y frutos de *M. myriantha*, y en la fracción volátil de las flores de la planta, aislada con HS-SPME/GC-MS, se muestran en la **Tabla 11**.

**Tabla 11.**

*Compuestos mayoritarios identificados por LC-MS o por GC-MS, en los extractos y fracciones volátiles de hojas, flores, tallos o frutos de M. myriantha.*

Compuesto	Fórmula	Método de extracción			Clasificación
		EtOH:agua	MSPD	SPME	
Cianidina-3-glucósido	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>11</sub>	+	+	-	Antocianina
Kaempferol-3-(2-glucosil-rutinósido)	C <sub>33</sub> H <sub>41</sub> O <sub>20</sub>	+	-	-	Flavona
Kaempferol-3-rutinósido	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>15</sub>	+	+	-	Flavona
Kaempferol-3-glucósido	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>11</sub>	+	+	-	Flavona
Kaempferol-3-arabinósido	C <sub>20</sub> H <sub>19</sub> O <sub>10</sub>	+	-	-	Flavona
Luteolina	C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> O <sub>6</sub>	+	+	-	Flavona
Kaempferol	C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> O <sub>6</sub>	+	+	-	Flavona
Limoneno	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	-	-	+	MH
1,8-Cineol	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	-	-	+	MO
Octan-3-ona	C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> O	-	-	+	Compuesto oxigenado
<i>p</i> -Cimeno	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub>	-	-	+	MH
Oct-1-en-3-ol	C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> O	-	-	+	Compuesto oxigenado
Linalol	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	-	-	+	MO
Octan-1-ol	C <sub>8</sub> H <sub>18</sub> O	-	-	+	Compuesto oxigenado
<i>trans</i> -β-Cariofileno	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	-	-	+	SH
α-Terpineol	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	-	-	+	MO
<i>cis</i> -Nerodiol	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	-	-	+	SO

### 5.6. Determinación de la capacidad antioxidante y el contenido de fenoles totales en extractos de *M. myriantha*.

La capacidad antioxidante y el contenido de fenoles totales, se determinaron para los extractos hidroalcohólicos, los obtenidos por MSPD y para las sustancias de referencia (BHT y α-tocoferol); se usó la metodología descrita en las **Secciones 4.6** y **4.7**, respectivamente; los

## BIOPROSPECCIÓN DE PLANTAS EN COLOMBIA

extractos, se evaluaron a través de los ensayos ORAC y de Folin-Ciocalteu. Los resultados se expresaron en  $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$  de extracto y  $\text{mg AG}/\text{g}$  de extracto, respectivamente (Véase *Tabla 12*).

**Tabla 12.**

*Actividad antioxidante y contenido de fenoles totales en los extractos obtenidos con solventes o por MSPD de hojas, flores, tallos y frutos de M. myriantha y de las sustancias de referencia.*

Método	Parte de la planta	ORAC $\pm$ SD, n=3	Folin-Ciocalteu $\pm$ SD, n=3
		( $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$ de extracto)	(mg ácido gálico/g de extracto)
MSPD	Hojas	1470 $\pm$ 51	70 $\pm$ 5
	Flores	980 $\pm$ 66	50 $\pm$ 3
	Tallos	1380 $\pm$ 95	65 $\pm$ 6
	Frutos	1390 $\pm$ 10	70 $\pm$ 5
EtOH: agua	Hojas	1310 $\pm$ 17	73 $\pm$ 9
	Flores	980 $\pm$ 65	55 $\pm$ 8
	Tallos	2030 $\pm$ 79	120 $\pm$ 13
	Frutos	3200 $\pm$ 203	200 $\pm$ 24
BHT		520 $\pm$ 12	27.5 $\pm$ 0.2
$\alpha$ -Tocoferol		430 $\pm$ 5	16.7 $\pm$ 0.3

El ensayo ORAC, se basa en la transferencia de un átomo de hidrógeno por parte de la posible sustancia antioxidante o la fluoresceína, hacía el radical, formado por degradación térmica del AAPH, es decir, este ensayo evalúa la capacidad de un compuesto para retardar procesos oxidativos. Los compuestos identificados en los extractos hidroalcohólicos y obtenidos por MSPD fueron polifenoles (Véase *Tabla 11*), compuestos con varios grupos hidroxilo, que pueden ceder un átomo de hidrógeno (Tortosa *et al.*, 2001). Las antocianinas, hacen parte de los

## BIOPROSPECCIÓN DE PLANTAS EN COLOMBIA

flavonoides y también pueden ceder un átomo de hidrógeno al radical peroxilo, para retardar la oxidación.

Los valores ORAC, para los extractos hidroalcohólicos u obtenidos por MSPD fueron mayores, que los valores ORAC de los compuestos de referencia BHT ( $520 \pm 12 \mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$  de extracto) y  $\alpha$ -tocoferol ( $430 \pm 5 \mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$  de extracto).

Los extractos hidroalcohólicos de tallos y frutos de *M. myriantha*, presentaron valores ORAC  $2030 \pm 79 \mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$  de extracto (tallos),  $3200 \pm 203 \mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$  de extracto (frutos), superiores que los de extractos obtenidos por MSPD,  $1380 \pm 95 \mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$  de extracto (tallos),  $1390 \pm 10 \mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$  de extracto (frutos). Los extractos obtenidos por MSPD de hojas, mostraron valores de actividad antioxidante  $1470 \pm 51 \mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$  de extracto, mayores que los extractos hidroalcohólicos de hojas,  $1310 \pm 17 \mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$  de extracto. No se encontró diferencia significativa entre los valores ORAC de los extractos hidroalcohólicos o los obtenidos por MSPD de flores de *M. myriantha* ( $979 \pm 65$  y  $980 \pm 66 \mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$  de extracto).

Los extractos hidroalcohólicos, de los frutos de *M. myriantha*, presentaron la mayor actividad antioxidante,  $3200 \pm 203 \mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$  de extracto. En estos extractos, se logró identificar cianidina-3-glucósido ( $0.0010 \pm 0.0001 \text{ mg/g}$  de extracto), kaempferol-3-rutinósido ( $0.14 \pm 0.02 \text{ mg/g}$  de extracto), kaempferol-3-glucósido ( $0.5 \pm 0.1 \text{ mg/g}$  de extracto) y kaempferol ( $0.5 \pm 0.1 \text{ mg/g}$  de extracto), una antocianina y cuatro flavonas, con grupos hidroxilo en sus estructuras, con posibilidad de donar un átomo de hidrógeno.

Los valores más bajos de la actividad antioxidante, fueron para los extractos hidroalcohólicos de las flores de *M. myriantha*,  $980 \pm 65 \mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$  de extracto o con MSPD,  $980 \pm 66 \mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$  de extracto. Con las dos técnicas de extracción (hidroalcohólico y MSPD), se

## BIOPROSPECCIÓN DE PLANTAS EN COLOMBIA

identificaron kaempferol-3-rutinósido, kaempferol-3-glucósido, kaempferol-3-arabinósido y kaempferol; en diferentes concentraciones (Véase **Tabla 8**), pero, la cianidina-3-glucósido, se logró detectar solamente en los extractos hidroalcohólicos.

En extractos hidroalcohólicos, de los tallos de *M. myriantha*, se logró identificar el mayor número de compuestos, cianidina-3-glucósido ( $0.05 \pm 0.01$  mg/g de extracto), kaempferol-3-(2-glucosil-rutinósido) ( $0.06 \pm 0.02$  mg/g de extracto), kaempferol-3-rutinósido ( $0.7 \pm 0.1$  mg/g de extracto), kaempferol-3-glucósido ( $2.6 \pm 0.6$  mg/g de extracto), kaempferol-3-arabinósido ( $0.08 \pm 0.01$  mg/g de extracto) y kaempferol ( $6 \pm 1$  mg/g de extracto), los cuales, superan en número y en concentración, a los compuestos identificados en los extractos hidroalcohólicos, de los frutos de la planta.

Anggraini y Lewandowsky (2015), determinaron la actividad antioxidante de tres plantas provenientes de Indonesia, entre estas, *Melastoma malabathricum* (Fam. Melastomataceae). En sus análisis, reportaron un valor ORAC de  $1880 \mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$  de extracto. Los valores ORAC de los extractos hidroalcohólicos, de tallos ( $2031 \pm 79 \mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$  de extracto) y frutos ( $3210 \pm 203 \mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$  de extracto) de *M. myriantha*, fueron mayores que los reportados para *M. malabathricum*.

Con el ensayo de Folin-Ciocalteu, se mide la cantidad de compuestos fenólicos totales, presentes en la muestra. La medición se basa en una reacción de óxido-reducción, *i.e.*, en el paso de electrones de los compuestos fenólicos (sustancias oxidadas) hacia los ácidos fosfomolibdicos y fosfotúngstico (sustancias reducidas). Los extractos hidroalcohólicos y los obtenidos por MSPD, de hojas, flores, tallos y frutos de *M. myriantha*, presentaron valores de fenoles totales

## BIOPROSPECCIÓN DE PLANTAS EN COLOMBIA

superiores a los de las sustancias de referencia BHT y  $\alpha$ -tocoferol ( $27.5\pm 0.2$  y  $16.7\pm 0.3$  mg ácido gálico/g de extracto, respectivamente) (Véase **Tabla 12**).

Los extractos hidroalcohólicos de tallos y frutos de *M. myriantha*, presentaron valores de fenoles totales  $120\pm 13$  mg ácido gálico/g de extracto (tallos),  $200\pm 24$  mg ácido gálico/g de extracto (frutos) respectivamente, mayores que los extractos obtenidos por MSPD,  $65\pm 6$  mg ácido gálico/g de extracto (tallos),  $70\pm 5$  mg ácido gálico/g de extracto (frutos). Los valores de fenoles totales, para los extractos hidroalcohólicos, de hojas  $73\pm 9$  mg ácido gálico/g de extracto y flores  $55\pm 8$  mg ácido gálico/g de extracto, no presentaron diferencias significativas, con los valores de fenoles totales de los extractos obtenidos por MSPD de hojas,  $70\pm 5$  mg ácido gálico/g de extracto y flores,  $50\pm 3$  mg ácido gálico/g de extracto, respectivamente.

Los extractos hidroalcohólicos, de frutos de *M. myriantha*, fueron los que presentaron el contenido de fenoles totales más alto,  $200\pm 24$  mg ácido gálico/g de extracto, mientras que, los valores más bajos de fenoles totales, se consiguieron en los extractos hidroalcohólicos de flores de *M. myriantha*,  $55\pm 8$  mg ácido gálico/g de extracto o con MSPD,  $50\pm 3$  mg ácido gálico/g de extracto, respectivamente

Los valores de fenoles totales mantienen una relación directa con los valores de actividad antioxidante para los extractos hidroalcohólicos o los obtenidos por MSPD, de hojas, flores, tallos y frutos de *M. myriantha* (Véase **Tabla 12**). Los extractos hidroalcohólicos de frutos, fueron los que presentaron el contenido de fenoles totales más alto y, también fueron con el valor ORAC mayor.

Goyos, Mendes, Farias y Ligia (2011), determinaron el contenido de fenoles totales, de extractos obtenidos con cloroformo o con metanol, de las hojas secas de *Miconia albians* (Fam.

## BIOPROSPECCIÓN DE PLANTAS EN COLOMBIA

Melastomataceae). Reportaron un valor de  $70.04 \pm 0.12$  mg ácido gálico/g de extracto seco; este valor, es cercano a los valores de fenoles totales para los extractos hidroalcohólicos,  $73 \pm 9$  mg ácido gálico/g de extracto, o por MSPD,  $70 \pm 5$  mg ácido gálico/g de extracto, de hojas de *M. myriantha*.

Das y Coku (2013), establecieron la presencia de flavonoides, por ensayo colorimétrico y, determinaron el contenido de fenoles totales por el ensayo de Folin-Ciocalteu, en extractos obtenidos con etanol o con éter de petróleo de las hojas *Osbeckia stellata* (Fam. Melastomataceae). En los resultados reportados, los valores de fenoles totales para los extractos obtenidos con etanol,  $33 \pm 5$  mg ácido gálico/g de extracto, o con éter de petróleo,  $39 \pm 6$  mg ácido gálico/g de extracto, no presentaron diferencias significativas. Estos valores son menores, que los encontrados para los extractos hidroalcohólicos o los obtenidos por MSPD, de hojas de *M. myriantha*.

## 6. Conclusiones

La cantidad y el número de compuestos monitoreados por HS-SPME e identificados por GC-MS en las fracciones volátiles de las flores de *M. myriantha* disminuye durante el día.

CAR-PDMS/DVB fue el recubrimiento polimérico con el que se logró extraer un número más alto de compuestos volátiles y semi-volátiles; en comparación con los obtenidos, usando los recubrimientos CAR-PDMS, ViC<sub>16</sub>lm-NTf<sub>2</sub> (ViBzlm)<sub>2</sub>C<sub>12</sub>-2NTf<sub>2</sub>, ViC<sub>6</sub>lm-Cl/(Vilm)<sub>2</sub>C<sub>12</sub>-2Br o ViC<sub>16</sub>lm-NTf<sub>2</sub>/(Vilm)<sub>2</sub>C<sub>12</sub>-2NTf<sub>2</sub>.

## BIOPROSPECCIÓN DE PLANTAS EN COLOMBIA

En la fracción volátil de las flores de *M. myriantha* se identificaron en mayor proporción monoterpenos (limoneno y *p*-cimeno), monoterpenos oxigenados (1,8-cineol, linalol y terpinen-4-ol), compuestos oxigenados alifáticos (octan-3-ona y decanal), sesquiterpenos ( $\alpha$ -copaeno y *trans*- $\beta$ -cariofileno) y sesquiterpenos oxigenados (*cis*-nerodiol). La emisión del oct-1-en-3-ol, compuesto mayoritario, fue mayor en la mañana (6:00 a.m.), que en la tarde (6:00 p.m.).

Los recubrimientos de líquidos iónicos solo presentaron afinidad por compuestos oxigenados alifáticos (nonanal, oct-1-en-3-ol, nonanol), la diferencia con fibras comerciales, que se observó en el análisis de componentes principales.

Se encontraron las mejores condiciones para el análisis por LC-ESI(+)-TOF-MS, de antocianinas usando el patrón certificado de cianidina-3-glucósido. El observable fue el área cromatográfica (ion  $[M]^+$  en  $m/z$  449.1083 y su ion-fragmento  $[M\text{-azúcar}]^+$  en  $m/z$  287.0555) y la relación señal/ruido. Se encontró que el voltaje del capilar y el voltaje del fragmentador, tienen efectos sobre las áreas cromatográficas, tanto del ion molecular, como del ion fragmento. Con un voltaje de capilar 4000 V, voltaje de fragmentador 200 V y el ácido fórmico al 0.2% en acetonitrilo como fase móvil B, la respuesta del observable fue más alta.

En los extractos hidroalcohólicos o los obtenidos por MSPD de hojas, flores, tallos y frutos de *M. myriantha*, se aislaron compuestos fenólicos, *i.e.*, seis flavonas (kaempferol, kaempferol-3-glucósido, kaempferol-3-rutinósido, kaempferol-3-arabinósido, kaempferol-3-(2-glucosil-rutinósido) y luteolina) y una antocianina, cianidina-3-glucósido. También, se identificaron y cuantificaron derivados de kaempferol y cianidina, compuestos fenólicos, a los cuales se atribuye actividad antioxidante.

## BIOPROSPECCIÓN DE PLANTAS EN COLOMBIA

Los valores de actividad antioxidante, para los extractos hidroalcohólicos o los obtenidos por MSPD, fueron más altos, comparados con los de los compuestos de referencia BHT y  $\alpha$ -tocoferol.

Los extractos hidroalcohólicos, de los frutos de *M. myriantha*, presentaron los valores ORAC  $3210 \pm 203$   $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$  de extracto, más altos. En estos extractos, se identificaron cianidina-3-glucósido ( $0.0010 \pm 0.0001$  mg/g de extracto), kaempferol-3-rutinósido ( $0.14 \pm 0.02$  mg/g de extracto), kaempferol-3-glucósido ( $0.5 \pm 0.1$  mg/g de extracto) y kaempferol ( $0.5 \pm 0.1$  mg/g de extracto), una antocianina y tres flavonas, respectivamente, con grupos hidroxilo en sus estructuras, capaces de donar un átomo de hidrógeno.

En los extractos hidroalcohólicos, de los tallos de *M. myriantha*, se logró identificar el mayor número de compuestos, cianidina-3-glucósido ( $0.05 \pm 0.01$  mg/g de extracto), kaempferol-3-(2-glucosil-rutinósido) ( $0.06 \pm 0.02$  mg/g de extracto), kaempferol-3-rutinósido ( $0.7 \pm 0.1$  mg/g de extracto), kaempferol-3-glucósido ( $2.6 \pm 0.6$  mg/g de extracto), kaempferol-3-arabinósido ( $0.08 \pm 0.01$  mg/g de extracto) y kaempferol ( $6 \pm 1$  mg/g de extracto), los cuales, superan en número y en concentración, a los compuestos identificados en los extractos hidroalcohólicos, de los frutos de la planta.

Los extractos hidroalcohólicos, de frutos de *M. myriantha*, fueron los que presentaron el contenido de fenoles totales más alto ( $200 \pm 24$  mg ácido gálico/g de extracto), mientras que, los valores más bajos de fenoles totales, caracterizaron a los extractos hidroalcohólicos de flores de *M. myriantha*, ( $55 \pm 8$  mg ácido gálico/g de extracto) o por MSPD ( $50 \pm 3$  mg ácido gálico/g de extracto).

## BIOPROSPECCIÓN DE PLANTAS EN COLOMBIA

Los valores de fenoles totales mantienen una relación directamente proporcional con los valores de actividad antioxidante, medida por el ensayo ORAC, para los extractos hidroalcohólicos o los obtenidos por MSPD, de hojas, flores, tallos y frutos de *M. myriantha*. Los extractos hidroalcohólicos de frutos de la planta, presentaron el contenido de fenoles totales más alto y, también se caracterizaron por el valor ORAC más alto.

### 7. Recomendaciones

Los extractos hidroalcohólicos, fueron los que presentaron valores de actividad antioxidante, más altos. Se recomienda, monitorear la estabilidad de estos extractos, y establecer un tiempo de vida aproximado. Además, variar las relaciones y acidez de la solución de extracción usada, tiempos de extracción y la relación entre material vegetal-solución de extracción, para así, optimizar el proceso.

Los valores de actividad antioxidante, medidos por el ensayo ORAC, de los extractos hidroalcohólicos o los obtenidos por MSPD, fueron mayores, que los de los compuestos de referencia BHT y  $\alpha$ -tocoferol, por esto, se recomienda determinar la actividad antioxidante por otro u otros métodos, debido a que cada ensayo se basa en un mecanismo diferente.

En este trabajo, se determinó la actividad antioxidante por el método ORAC, basado en la transferencia de un átomo de hidrógeno. Se recomienda realizar un ensayo que sea por transferencia de electrón(es), como el ensayo del poder de reducción antioxidante del hierro (FRAP), donde se usa una solución que contiene TPTZ [2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazina] y  $\text{FeCl}_3$ . Luego de 60 min, al finalizar la reacción, el hierro férrico  $\text{Fe}^{3+}$ , pasa a su forma ferrosa  $\text{Fe}^{2+}$ , que

## BIOPROSPECCIÓN DE PLANTAS EN COLOMBIA

se monitorea a una longitud de onda  $\lambda=593$  nm, (los resultados se expresan en mg de ácido ascórbico/g muestra) (Mesa-Vanegas *et al.*, 2010).

**Referencias Bibliográficas**

- Acevedo, M., Castañeda, M., Cardenas, C., Reyes, J., Kouznetsov, V., Stashenko, E. (2007). Composición y capacidad antioxidante de especies aromáticas y medicinales con alto contenido de timol y carvacrol, *Scientia et Technica*, 33, 125-128.
- Adams, R. (2004), Identification of essential oil components by gas chromatography spectrometry, Editorial Allured Publishing Corporation, 4<sup>rd</sup> Ed, Illinois, EE.UU., 1-804, ISBN 1932633219.
- Aguilera, L., Navarro, A., Tacoronte, J., Leyva, M., Marquetti, M. (2003). Efecto letal de *Myrtaceas* cubanas sobre *Aedes aegypti*, *J. Cubana Med. Trop.*, 55, 100-104.
- Aguilera, M., Reza M., Chew, R., Meza, J. (2011). Propiedades funcionales de las antocianinas, *Rev. Cienc. Salud*, 13, 16-22.
- Aliyiannis, N., Kalpoutzakis, E., Mitaku, S., Chinou. I. (2001). Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 4168-4170.
- Anggraini, T., Lewandowsky, P. (2015). The Exotic Plants of Indonesia: Mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*), sikaduduak (*Melastoma malabathricum* Linn.) and mengkudu (*Morinda citrifolia*) as potent antioxidant sources, *Int. J. Advanced Sci. Eng. Inf. Tech.*, 5, 115-118.

- Antoniolli, A., Fontana, A., Piccoli, P., Bottini, R. (2015). Characterization of polyphenols and evaluation of antioxidant capacity in grape pomace of the cv. Malbec, *J. Food Chem.*, 178, 172-178.
- Ariza, O., Rueda, E., Archila, J., Martínez, J., Stashenko, E. (2007). Determinación mediante HS-SPME/GC-MS, de la composición química de la fragancia y el absoluto de las flores de *Posoqueria latifolia*, *Scientia et Technica*, 33, 59-61.
- Ávalos, A., Pérez, E. (2009). Metabolismo secundario de plantas, *Reduca (Biología) Serie Fisiología Vegetal*, 2, 119-145.
- Azuola, R., Vargas, P. (2007). Extracción de sustancias asistida por ultrasonido (EUA), *Tecnología en Marcha*, 20, 30-40.
- Babushok, V., Linstrom, P., Zenkevich, I. (2011). Retention indices for frequently reported compounds of plant essential oils, *J. Phys. Chem. Ref. Data*, 40, 1-47.
- Badui, D. (2006). Química de los alimentos, México, Pearson Education, 379-428.
- Barker, S. (2000). Matrix solid-phase dispersion, *J. Chromatogr. A*, 885, 115-127.
- Berkoff, N., Focus on Flavonoids, (18 de septiembre de 2017). Disponible en: [www.healthwell.com](http://www.healthwell.com).

- Bodegom, S., Veldkamp, J. (2001). Revision of the pseudo-stimulator species of *Medinilla* (Melastomataceae), *J. Plant Tax. Plant Geogr.*, *46*, 527-567.
- Borrás, I., Fernández, S., Arráez, D., Palmeros, P., Val, R., Andrade, I., Fernández, A., Gómez, J., Segura, A. (2015). Characterization of phenolic compounds, anthocyanidin, antioxidant and antimicrobial activity of 25 varieties of Mexican Roselle (*Hibiscus sabdariffa*), *Ind. Crops Prod.*, *69*, 385-394.
- Botterweck, A. Verhagen, H., Goldbohm, R., Kleinjans, J., Brandt, P., (2000). Intake of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene and stomach cancer risk: Results from analyses in the Netherlands cohort study, *Food Chem. Toxicol.*, *38*, 599-605.
- Brouillard, R.; Delaporte, B. (1997). Chemistry of anthocyanin pigments. 2. Kinetic and thermodynamic study of proton transfer, hydration, and tautomeric reactions of malvidin 3-glucoside, *J. Am. Chem. Soc.*, *99*, 8461-8468.
- Cabredo, S., Cedrón, T., Gonzáles, M., Puente, L., Sáenz, C. (2006). Ultrasound assisted extraction of volatile compounds from wine samples: Optimisation of the method, *Talanta*, *69*, 1123-1129.

## BIOPROSPECCIÓN DE PLANTAS EN COLOMBIA

Cala, M., Vásquez, Á., Martínez, J., Stashenko, E. (2007). Caracterización de compuestos fenólicos por electroforesis capilar de la especie *Phyllanthus acuminatus* (Euphorbiaceae) y estudio de su actividad antioxidante, *Scientia et Technica*, 1, 173-175.

Calderon-Montano M., Burgos-Moron, E., Perez-Guerrero, C., Lopez-Lazaro, M. (2011). A Review on the Dietary Flavonoid Kaempferol, *J. Medicinal Chem.*, 11, 298-344.

Cambie, R., Ferguson, L. (2003). Potential functional foods in the traditional Maori diet, *J. Fundamental Molec. Mechan. Mut.*, 523, 109-117.

Cao, G., Alessio, H., Cutler, R. (1993). Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidant, *Free Radic. Biol. Med.*, 14, 303-311.

Capriotti, A., Cavaliere, C., Laganá, A., Piovesana, R. (2013). Recent trends in matrix solid-phase dispersion, *Trends Anal. Chem.*, 43, 53-66.

Características del Carboxeno<sup>®</sup>. (19 de septiembre de 2017) Disponible en internet: [www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/analytical-products.html?TablePage=14540720](http://www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/analytical-products.html?TablePage=14540720).

Características del divinilbenceno<sup>®</sup>. (19 de septiembre de 2017) Disponible en internet, [www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/414565?lang=en&region=CO](http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/414565?lang=en&region=CO).

## BIOPROSPECCIÓN DE PLANTAS EN COLOMBIA

Cartaya, O., Reynaldo, I. (2001). Flavonoides: características químicas y aplicaciones, *Cultivos Tropicales*, 22, 5-14.

Colecciones científicas en línea. Herbario Nacional de Colombia. (18 de septiembre de 2017)  
Disponible en internet; [www.biovirtual.unal.edu.co/ICN](http://www.biovirtual.unal.edu.co/ICN).

Cooke D., Steward W., Gescher A., Marczylo T. (2005). Anthocyanins from fruits and vegetables— Does bright colour signal cancer chemopreventive activity, *Eur. J. Cancer*, 41, 1931–1940.

D'Alessandro, M., Turlings, T. (2006). Advances and challenges in the identification of volatiles that mediate interactions among plants and arthropods, *Analyst*, 131, 24–32.

Das, S., Coku, A. (2013). Antimicrobial and antioxidant activities of *Osbeckia stellate* Buch.-Ham. Ex D. Don (Melastomataceae) prevalent of Darjeeling Hills, *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.*, 5, 551-554.

De Moraes, C., Mescheer, M., Tumlinson, J. (2001). Caterpillar induced nocturnal plant volatiles repel nonspecific females, *Nature*, 410, 577–580.

Descomposición térmica del AAPH. (19 de septiembre de 2017). Disponible en internet: [www.caymanchem.com/product/82235](http://www.caymanchem.com/product/82235).

- Dool, H., Kratz, P. (1963). A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography, *J. Chromatogr. A*, *11*, 463-471.
- Dudareva, N., Pichersky, E., Gershenzon, J. (2004). Biochemistry of plant volatiles, *Plant Physiol*, *135*, 1893-1902.
- Edwards, R., Gatehouse, J. (1999). Secondary metabolism, *Plant Biochem. Mol. Biol.*, *384*, 193-218.
- Ewald, C., Fjelkner, S., Johansson, K., Sjöholm, I., Åkesson, B. (1999). Effect of processing on major flavonoids in processed onions, green beans, and peas, *Food Chem.*, *64*, 231-235.
- Fernando, E., Belete, D. (2013). *Medinilla dallciana* (Melastomataceae: Dissochaetae), a new species from Luzon Island, Philippines, *Philipp. J. Sci.*, *142*, 89-93.
- Ferrer, I., García-Reyes, J., Mezcuá, M., Thurman, M., Fernández-Alba, R. (2005). Multi-residue pesticide analysis in fruits and vegetables by liquid chromatography–time-of-flight mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, *1082*, 81-90.
- Flavonoids, (25 de abril de 2016). Disponible en internet en: [www.geocities.com/nutriflip/Supplements/Flavonoids.html](http://www.geocities.com/nutriflip/Supplements/Flavonoids.html).

- Fontana, J., Rhynchanthera D. (1991). Melastomataceae, un género nuevo para la Argentina, *Folia Bot. et Geobot. Corrent.*, 8, 1-4.
- Frank, K., Köhler, K., Petra, H. (2012). Stability of anthocyanins in high pressure homogenisation, *Food Chem.*, 130, 716-719.
- Gao, M., Liu, C. (2005). Comparison techniques for the extraction of flavonoides from cultures cells of *Saussurea medusa* Maxim, *World J. Microb. Biot.* 21, 1461-1463.
- Garzón, G. (2008). Anthocyanins as natural colorants and bioactive compounds, *Acta Biol. Col.* 13, 27-36.
- Gómez-Caravaca, A., Verardo, V., Toselli, M, Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A., Fiorenza, M. (2013). Determination of the major phenolic compounds in pomegranate juices by HPLC-DAD-ESI-MS, *J. Agric. Food Chem.*, 61, 5328-5337.
- Gordon, A., Schadow, B., Quijano, C., Marx, F. (2011). Chemical characterization and antioxidant capacity of berries from *Clidemia rubra* (Aubl.) Mart. (Melastomataceae), *J. Food Research Int.*, 44, 2120-2127.
- Gould K., Davies K., Winefield C. (2009), Anthocyanins Biosynthesis, Functions, and Applications. Springer, Wellington, New Zealand, 1<sup>st</sup> Ed, 85-87.

- Goyos, L., Mendes, F., Farias, V., Ligia, A. (2011). Antioxidant activity and total phenols from the methanolic extract of *Miconia albicans* (Sw.) triana leaves, *Molecules*, *16*, 9439-9450.
- Harborne, J., Mabry, T. (1982). The flavonoids: advances in research, Chapman & Hall, London, 641-679.
- Henderson, A. (1986). A review of pollination studies in the *Palmae*, *Bot. Rev.*, *52*, 221–259.
- Herman, A., Krzysztof, T. (2016). Linalool effects the antimicrobial efficacy of essential oils, *Current Microbiology*, *72*, 165-172.
- Hogan, S., Chung, H., Zhang, L., Li, J., Lee, Y., Dai, Y., Zhou, K. (2010). Antiproliferative and antioxidant properties of anthocyanin-rich extract from açai, *Food Chem.*, *118*, 208-214.
- Huang, D., Ou, B., Hampsch, M., Flanagan, J., Prior, R. (2002). High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format, *J. Agric. Food Chem.*, *50*, 4437-4444.
- Hutchings, J., (1999). Food color and appearance, Gaithersburg, Springer, EE.UU. 2<sup>d</sup> Ed, 550-551.

- Isaza, J., Ito, H., Yoshida, T. (2004). Oligomeric hydrolyzable tannins from *Monochaetum multiflorum*, *Phytochemistry*, 65, 359-367.
- Isaza, J., Orozco, L., Zuleta, L., Rivera, D., Tapias, L., Veloza, L., Ramírez, L. (2007). Perfiles cromatográficos preliminares por GC-MS de algunas especies de plantas Melastomataceae, *Scientia et Technica Año XIII*, 33, 359-362.
- Jaramillo, B., Duarte, E., Muñoz, K., Stashenko, E. (2010). Composición química volátil del aceite esencial de *Croton malambo* H. Karst. colombiano y determinación de su actividad antioxidante, *J. Cubana Med.*, 15, 133-142.
- Jarrett, A. (2003). Ornamental tropical shrubs, Sarasota, Florida, Pincapple Press. Inc., 1<sup>rd</sup> Ed, 74.
- Kawsar, S., Huq, E., Nahar, N., Ozequi, Y. (2008). Identification and quantification of phenolic acids in *Macrotyloma uniflorum* by reversed phase-HPLC, *Am. J. Plant. Physiol.*, 3, 165-172.
- Kessler, A., Baldwin, I. (2001). Defensive function of herbivore-induced plant volatile emissions in nature, *Science*, 291, 2142–2143.
- Kirca, A., Ozkan, M., Cemeroglu, B. (2007). Effects of temperature, solid content and pH on the stability of black carrot anthocyanins, *Food Chem.*, 101, 212-218.

- Knudsen, J., Gershenzon, J. (2006), The chemistry diversity of floral scent, *Biology of Floral Scent*, Boca Raton, EE.UU., Taylor & Francis, 27-52.
- Knudsen, J., Tollsten, L. (1993). Trends in floral scent chemistry in pollination syndromes: Floral scent composition in moth-pollinated taxa, *Bot. J. Linn. Soc.* 113, 263–284.
- Kong, J., Chia, L., Goh, N., Chia, T., Brouillard, R. (2003). Analysis and biological activities of anthocyanins, *Phytochemistry*, 64, 923-933.
- Lenaerts, M. (2006). Substances, relationships and the omnipresence of the body: an overview of Asháninka ethnomedicine (Western Amazonia), *J. Ethnobiol Ethnomed.*, 2, 1-18.
- Levy, M., Marquetti, M., Tacoronte, J., Scull, R., Tiomno, O., Mesa, A., Montada, D. (2009). Actividad larvica de aceites esenciales de plantas contra *Aedes aegypti* (L.), *J. Biomed.*, 20, 5-13.
- Logan, B., Monson, R., Potosnak, M. (2000). Biochemistry and physiology of foliar isoprene production, *Trends in Plant Science*, 5, 477-481.
- López, R., Quiñones, W., Echeverri, F. (2007). Perfil cromatográfico de las antocianinas presentes en algunos frutos colombianos, *Scientia et Technica año XIII*, 33, 275-276.

- Mabberly, D. (2008). *Mabberly's Plant Book: A portable dictionary of plants, their classification and uses*, Cambridge, England, Cambridge University Press, 3<sup>rd</sup> Ed., 1021.
- Martins, D., Ferreira, R., Varela, A., Teixeira, C. (2006). Comparison between sample disruption methods and solid-liquid extraction (SLE) to extract phenolic compounds from *Ficus carica* leaves, *J. Chromatogr. A*, *1103*, 22-28.
- Matsubara, S., Rodriguez-Amaya, D. (2006). Conteúdo de miricetina, quercetina e kaempferol em chás comercializados no Brasil, *J. Cienc. Tecnol. Aliment.*, *26*, 380-385.
- Mazzuca, P., Ferranti, P., Picariello, G., Chianese, L., Addeo, F. (2005). Mass spectrometry in the study of anthocyanins and their derivatives: differentiation of *Vitis vinifera* and hybrid grapes by liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry and tandem mass spectrometry, *J. Mass. Spectrom.*, *40*, 83-90.
- Mercke, P., Kappers, I., Verstappen, F., Vorst, O., Dicke, M., Bouwmeester, H. (2004). Combined transcript and metabolite analysis reveals genes involved in spider mite induced volatile formation in cucumber plants, *Plant Physiol.*, *135*, 2012–2024.
- Merken, H., Beecher, G. (2000). Measurement of food flavonoids by high performance liquid chromatography: a review, *J. Agric. Food Chem.*, *48*, 577-5799.

- Merken, H., Beecher, G. (2000). Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: A Review, *J. Agric. Food Chem.*, 48, 577-599.
- Mesa-Vanegas, A., Gaviria, C., Cardona, F., Sáez-Vega, j., Blair, S., Rojano, B. (2010). Actividad antioxidante y contenido de fenoles totales de algunas especies del género *Calophyllum*, *J. Cubana Plant. Med.*, 15, 13-26.
- Milos, M., Mastelic, J., Jerkovic, I. (2000). Chemical composition and antioxidant effect of glycosidically bound volatile compounds from oregano (*Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum*), *J. Food Chem.*, 71, 79-83.
- Mimura, M. Salatino, A., Salatino, M. (2004). Distribution of flavonoids and the taxonomy of *Huberia* (Melastomataceae), *J. Biochem. Syst. Ecology*, 32, 27-34.
- NIST Chemistry WebBook, base de datos, (19 de septiembre de 2017). Disponible en: [webbook.nist. /chemistry/](http://webbook.nist.gov/chemistry/).
- Ochoa, C., Ayala, A. (2004). Los flavonoides: apuntes generales y su aplicación en la industria de alimentos, *Ingeniería y Competitividad*, 6, 93-104.
- Okull, D., Beelman, R., Gourama, H. (2003). Antifungal activity of 10-oxo-*trans*-8-decenoic acid and oct-1-en-3-ol against *Penicillium expansum* in potato dextrose agar medium, *J. Food Prot.*, 66, 1503-1505.

- Oladimeji, F., Orafidiya O., Ogunniyi T., Adewunmi T. (2000). Pediculocidal and scabicial properties of *Lippia multiflora* essential oil., *J. Ethnopharmacol.*, 72, 305-311.
- Ou, B., Hampsch, M., Prior, R. (2001). Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe, *J. Agric. Food. Chem.*, 49, 4619-4626.
- Ou, B., Huang, D., Hampsch, M., Flanagan, J., Deemer, E. (2002). Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: A comparative study, *J. Agric. Food Chem.*, 50, 3122-3128.
- Pawliszyn, J. (1995). New directions in sample preparation for analysis of organic compounds, *TrAC, Trend Anal. Chem.*, 14, 113-122.
- Pawliszyn, J. (2000). Theory of solid-phase microextraction, *J. Chromatogr. Sci.* 38, 270-278.
- Pawliszyn, J. (2012). Handbook of solid-phase microextraction, Elsevier Inc. Waterloo, Canada, 7-44.
- Pawliszyn, J., Arthur, C. (1990). Solid-phase microextraction with thermal desorption using fused-silica optical fibers, *Anal. Chem.*, 62, 2145-2148.

- Pearce, G., Marchand, P., Griswold, J., Lewis, N., Ryan, C. (1998). Accumulation of feruloyltyramine and *p*-coumaroyltyramine in tomato leaves in response to wounding, *Phytochemistry*, 47, 659-664.
- Pino, N., Melendez, E., Stashenko, E., (2009). Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de hojas de *Piper lanceaefolium*, planta usada tradicionalmente en Colombia, *Boletín Latinoamericano y de Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 8, 301-304.
- Plant Physiology. (19 de septiembre de 2017). Disponible en internet: [www.tankonyvtar.hu](http://www.tankonyvtar.hu).
- Prior, R., Wu, X., Schaich, K. (2005). Standardization methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements, *J. Agric. Food Chem.*, 53, 4290-4302.
- Quiñones, L. (2001). Diversidad de la Familia Melastomataceae en la Orinoquia Colombiana. *Facultad de Ciencias, UN, Bogotá DC*, 15, 20-126.
- Reinhard, J., Srivivasan, M., Zhang, S. (2004). Scent-triggered navigation in honeybees, *Nature*, 427, 411.

## BIOPROSPECCIÓN DE PLANTAS EN COLOMBIA

- Renner, S. (1993). Phylogeny and Classification of the Melastomataceae and Memecylaceae. *Nord. J. Bot.*, 13, 519-593.
- Renner, S. (2004). Multiple Miocene Melastomataceae dispersal between Madagascar, Africa and India, *Phil. Trans. R. Soc. B.*, 359, 1485-1494.
- Rijke, E., Out, P., Niessen, W., Ariese, F., Gooijer, C., Brinkman, U. (2006). Analytical separation and detection methods for flavonoids, *J. Chromatogr. A*, 1112, 31-63.
- Rijke, E., Out, P., Niessen, W., Ariese, F., Gooijer, C., Brinkman, U., (2006). Analytical separation and detection methods for flavonoids, *J. Chromatogr. A*, 1112, 31-63.
- Rodríguez, L., Giusti, M., Wrolstad, R. (1999). Color and pigment stability of red radish and red-fleshed potato anthocyanins in juice model systems, *J. Food Sci.*, 64, 451-456.
- Rojas, J., Martínez, J., Stashenko, E. (2014). Contenido de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante de extractos de mora (*Rubus glaucus* Benth) obtenidos bajo diferentes condiciones, *Vitae*, 21, 218-227.
- Rostagno, M., Palma, M., Barroso, C. (2003). Ultrasound-assisted extraction of isoflavones, *J. Chromatogr. A*, 1012, 119-128.

- Seal, T., Chaudhuri, K. (2015). Antioxidant activities of some wild edible plants of Meghalaya state in India and effect of solvent extraction system, *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.*, 9, 446-450.
- Sepúlveda, G., Porta, H., Rocha, M. (2003). La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas, *Rev. Mex. Fitopato.*, 21, 355-363.
- Singleton, V., Orthofer, R., Lamuela-Raventós, R. (1999). Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent, *Phenolics and Flavonoids*, 299, 152-178.
- Skoog, D., Leary, J. (1994), Análisis Instrumental, McGraw-Hill, Madrid, España, 4<sup>rd</sup> Ed. 674-730.
- Soares, D., Portella, N., Freiman, M., Siani, A., Saravia, E., (2013). *trans*- $\beta$ -Cariofileno: un efectivo compuesto contra la leishmaniasis encontrado en el aceite esencial de *Copaifera* spp, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 1, 1-13.
- Soca, P., Bahr, A., Niño, S. (2004). Mecanismos moleculares del daño microvascular de la diabetes mellitus, *Correo Cient. Méd. de Holgín*, 8, 1-8.
- Stashenko, E., Martínez, J. (2007). Sampling volatile compounds from natural products with headspace/solid-phase micro-extraction, *J. Biochem. Biophys. Methods*, 70, 235-242.

Stashenko, E., Martínez, J. (2009). ¿Cuántos componentes hay en una mezcla? Respuesta cromatográfica, *Scientia Chromatographica*, 1, 23-33.

Stashenko, E., Martínez, J. (2009). Algunos aspectos de la detección en cromatografía de gases y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Selectividad e identificación, *Scientia Chromatographica*, 1, 29-45.

Stashenko, E., Martínez, J. (2010). Algunos aspectos prácticos para la identificación de analitos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, *Scientia Chromatographica*, 1, 29-47.

Stashenko, E., Martínez, J. (2013). Análisis de fragancias florales por GC-MS, *Scientia Chromatographica*, 5, 7-25.

Stashenko, E., Martínez, J., (2011). Preparación de la muestra: un paso crucial para el análisis por GC-MS, *Scientia Chromatographica*, 3, 25-48.

Stashenko, E., Martínez, J., Cárdenas, S., Saavedra, R., Durán, D. (2013). GC-MS study of compounds isolated from *Coffea arabica* flowers by different extraction techniques, *J. Sep. Sci.*, 36, 2901-2914.

- Stashenko, E., Puertas, M., Martínez, J. (2002). SPME determination of volatile aldehydes for evaluation of *in-vitro* antioxidant activity, *Anal. Bioanal. Chem.*, 373, 70-74.
- Sun, J. (2007). D-limonene: Safety and clinical applications: Review, *J. Alternative Med.*, 12, 259-264.
- Susanti, D., Sirat, H., Ahmad, F., Mat, R., Aimi, N., Kitajima, M. (2007). Antioxidant and cytotoxic flavonoids from the flowers of *Melastoma malabathricum* L., *J. Food Chem.*, 103, 710-716.
- Taiz, L., Zeiger, E. (2002). Fisiología Vegetal, Universidad de California, Los Ángeles, Volumen 1, Sinauer Associates, Inc, 3<sup>rd</sup> Ed., 534-538.
- Takechi, W., Arifiani, D. (2010). A synopsis of new plant distributional records from the Foja Mountains of Paupa Proince, Indonesia, *Harvard Papers in Botany*, 15, 41-50.
- Takken, W., Kline, D. (1989). Carbon dioxide and oct-1-en-3-ol as mosquito attractants, *J. Amer. Mosq. Control Assoc.*, 5, 311-136.
- Tao, Y., Zhu, F., Chen, D., Wei, H., Pan, Y., Wang, X., Liu, Z., Huang, L., Wang, Y., Yuan, Z. (2014). Evaluation of matrix solid-phase dispersion (MSPD) extraction for multi-phenolics determination in shrimp and fish by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry, *J. Food Chem.*, 150, 500-506.

- Tholl, D., Boland, W., Hansel, A., Loreto, F., Rose, U., Schnitzler, J. (2006). Practical approaches to plant volatile analysis, *Plant J.*, 45, 540–560.
- Timberlake, C., Bridle, P. (1997). Anthocyanins as natural food colours-selected aspects, *Food Chem.*, 58, 103-109.
- Tortosa, C., Andersen, Ø., Gardner, P., Morrice, P., Wood, S., Duthie, S., Collins, A., Duthie, G. (2001). Anthocyanin-rich extract decreases indices of lipid peroxidation and DNA damage in vitamin E-depleted rats, *Free Radical Biology & Medicine*, FRBM, 31, 1033-1037.
- Vancanneyt, G., Sanz, C., Farmaki, T. Paneque, M., Ortego, F., Castanera, P., Sánchez-Serrano, J., (2001). Hydroperoxide lyase depletion in transgenic potato plants leads to an increase in aphid performance, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 8139–8144.
- Vande, K., Dauw-Van, M., Debergh, P., Maene, L., Flamée, M., Van, C. (1981). The phenolics and a hydrolysable tannin polyphenol oxidase of *Medinilla magnifica*, *J. Phytochemistry*, 20, 1105-1112.
- Vinatoru, M. (2001). An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs, *Ultrason. Sonochem.*, 8, 303-313.

- Wanasundara, P., Shahidi F. (2005), (19 de septiembre de 2017) Antioxidants: Science, Technology, and Applications, John Willey & Sons, Inc., Disponible en internet: [onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/047167849X.bio002/full](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/047167849X.bio002/full).
- Wilson, M., Greenberg, B. (1993). Protection of the D1 photosystem II reaction center protein from degradation in ultraviolet radiation following adaptation of *Brassica napus* L. to growth in ultraviolet-B, *J. Photochem. Photobiol. B.*, 57, 556-563.
- Xang, W., Xu, S. (2007). Degradation kinetics of anthocyanins in blackberry juice and concentrate, *J. Food Engineering*, 82, 271-275.
- Xu, P., Zhu, F., Buss, G., Leal, W. (2015). Oct-1-en-3-ol the attractants that repels, *Faculty 1000 Research*, 18, 156.
- Zhang, J., Lui, J.; Yang, Y.; Yuan, K. (2010). Analysis the chemical constituents of volatile oils in *Medinilla arboricola* by SPME-GC-MS, *J. Chin. Med. Mater.*, 33, 225-229.
- Zhao, F., Meng, Y., Anderson, J. (2008). Polymeric ionic liquids as selective coating for the extraction of esters using solid-phase microextraction, *J. Chromatogr. A*, 1208, 1-9.

## Anexos

**Anexo A.** Composición química de las fracciones volátiles de las flores de *M. myriantha* aisladas por HS-SPME usando fibra recubierta con CAR/PDMS

No Compuesto	DB-WAX		GC Área relativa (%; valor $\pm$ SD, $n = 3$ )		
	LRI <sub>exp</sub>	LRI <sub>lit</sub> *	6 a.m.	12 m.	6 p.m.
1 Hexanal	1082	1082	-	2 $\pm$ 1	9 $\pm$ 1
2 Heptanal	1185	1181	1.1 $\pm$ 0.2	1.8 $\pm$ 0.4	3 $\pm$ 1
3 Octan-3-ona	1254	1252	3.2 $\pm$ 0.3	4.1 $\pm$ 0.8	3 $\pm$ 2
4 Acetato de hexilo	1273	1269	1.9 $\pm$ 0.1	1.5 $\pm$ 0.1	-
5 1,3,5-Trimetilbenceno	1283	1282	0.67 $\pm$ 0.01	0.42 $\pm$ 0.07	-
6 Octanal	1287	1286	1.1 $\pm$ 0.2	1.8 $\pm$ 0.2	2.9 - 0.1
7 Oct-1-en-3-ona	1301	1298	3 $\pm$ 1.1	-	4.5 $\pm$ 0.7
8 <i>trans</i> -4,8-Dimetilnona-1,3,7-trieno	1302	1302	4.2 $\pm$ 0.5	3.6 $\pm$ 0.4	-
9 Acetato de <i>trans</i> -hex-3-en-1-ilo	1309	1312	1.2 $\pm$ 0.6	1.1 $\pm$ 0.5	-
10 Hept-6-metil-5-en-	1336	1334	0.25 $\pm$ 0.07	0.6 $\pm$ 0.1	1.5 $\pm$ 0.1
11 Hexan-1-ol	1351	1346	0.92 $\pm$ 0.04	1.4 $\pm$ 0.2	3.9 $\pm$ 0.8
12 <i>cis</i> -Hex-3-en-1-ol	1380	1378	0.6 $\pm$ 0.2	1.0 $\pm$ 0.3	0.8 $\pm$ 0.3
13 Octan-3-ol	1391	1386	4.4 $\pm$ 0.12	3.3 $\pm$ 0.5	2.2 $\pm$ 0.6
14 Nonanal	1391	1392	5 $\pm$ 1	11 $\pm$ 2	21 $\pm$ 5
15 <i>p</i> -Metil anisol	1432	1438	0.73 $\pm$ 0.05	0.22 $\pm$ 0.05	0.5 $\pm$ 0.01
16 Oct-1-en-3-ol	1444	1442	59.3 $\pm$ 0.7	47 $\pm$ 5	32 $\pm$ 8
17 Heptan-1-ol	1449	1449	0.43 $\pm$ 0.03	0.8 $\pm$ 0.1	1.5 $\pm$ 0.2
18 Italiceno	1517	1518	0.65 $\pm$ 0.07	-	-
19 Benzaldehído	1519	1525	0.28 $\pm$ 0.09	0.7 $\pm$ 0.2	1.5 $\pm$ 0.6
20 Linanol	1543	1533	0.6 $\pm$ 0.1	0.60 $\pm$ 0.07	1.1 $\pm$ 0.1
21 Octan-1-ol	1551	1536	2.30 $\pm$ 0.03	3.1 $\pm$ 0.4	5.0 $\pm$ 0.1
22 $\beta$ -Cedreno	1592	1611	1.3 $\pm$ 0.3	0.3 $\pm$ 0.1	-
23 Undecan-2-ona	1598	1588	0.7 $\pm$ 0.2	0.2 $\pm$ 0.1	-
24 <i>cis</i> -Thujopseno	1631	1592	2.6 $\pm$ 0.8	-	-
25 Nonan-1-ol	1655	1597	2.7 $\pm$ 0.7	3.9 $\pm$ 0.4	7 $\pm$ 1
26 Non-3-en-1-ol	1679	1682	-	0.51 $\pm$ 0.06	-
27 <i>p</i> -Metoxianisol	1727	1611	0.5 $\pm$ 0.1	-	-
28 Salicilato de metilo	1768	1616	0.42 $\pm$ 0.09	0.56 $\pm$ 0.05	-

## BIOPROSPECCIÓN DE PLANTAS EN COLOMBIA

**Anexo B.** Composición química de las fracciones volátiles de las flores de *M. myriantha* aisladas por HS-SPME usando el recubrimiento de líquido iónico ViC<sub>6</sub>lm-Cl/(Vilm)<sub>2</sub>Cl<sub>12</sub>-2Br en la fibra.

No	Compuesto	DB-WAX		GC Área relativa (%; valor $\pm$ SD, $n=3$ )		
		LRI <sub>exp</sub>	LRI <sub>lit</sub> <sup>*</sup>	6 a.m.	12 m.	6 p.m.
1	Oct-1-en-3-ol	1452	1444	2.1 $\pm$ 0.5	10 $\pm$ 6	6 $\pm$ 4
2	Ácido acético	1455	1446	3 $\pm$ 1	16 $\pm$ 5	15 $\pm$ 5
3	<i>n</i> -Hexadecano	1600	1600	143 $\pm$ 45	1704 $\pm$ 65	965 $\pm$ 72

**Anexo C.** Composición química de las fracciones volátiles de las flores de *M. myriantha* aisladas por HS-SPME usando fibra recubierta con el recubrimiento ViC<sub>16</sub>lm-NTf<sub>2</sub>/(ViBzlm)<sub>2</sub>C<sub>12</sub>-2NTf<sub>2</sub>.

No	Compuesto	DB-WAX		GC Área relativa (%; valor $\pm$ SD, $n=3$ )		
		LRI <sub>exp</sub>	LRI <sub>lit</sub> <sup>*</sup>	6 a.m.	12 m.	6 p.m.
1	Nonanal	1381	1391	4 $\pm$ 2	20 $\pm$ 7	-
2	Ácido acético	1416	1446	13 $\pm$ 3	-	-
3	Oct-1-en-3-ol	1428	1443	20 $\pm$ 11	40 $\pm$ 15	59 $\pm$ 12
4	Nonanol	1637	1655	3 $\pm$ 1	-	-
5	Éter de octilo	1746	1761	16 $\pm$ 6	13 $\pm$ 3	8 $\pm$ 2
6	<i>trans</i> -Geranilacetona	1839	1840	-	-	9 $\pm$ 1
7	Nonadecano	1900	1900	7 $\pm$ 1	-	-
8	Eicosano	2100	2100	15 $\pm$ 1	-	-
10	Hexadecanol	2358	2363	15 $\pm$ 4	-	-

## BIOPROSPECCIÓN DE PLANTAS EN COLOMBIA

**Anexo D.** Valores de los componentes principales

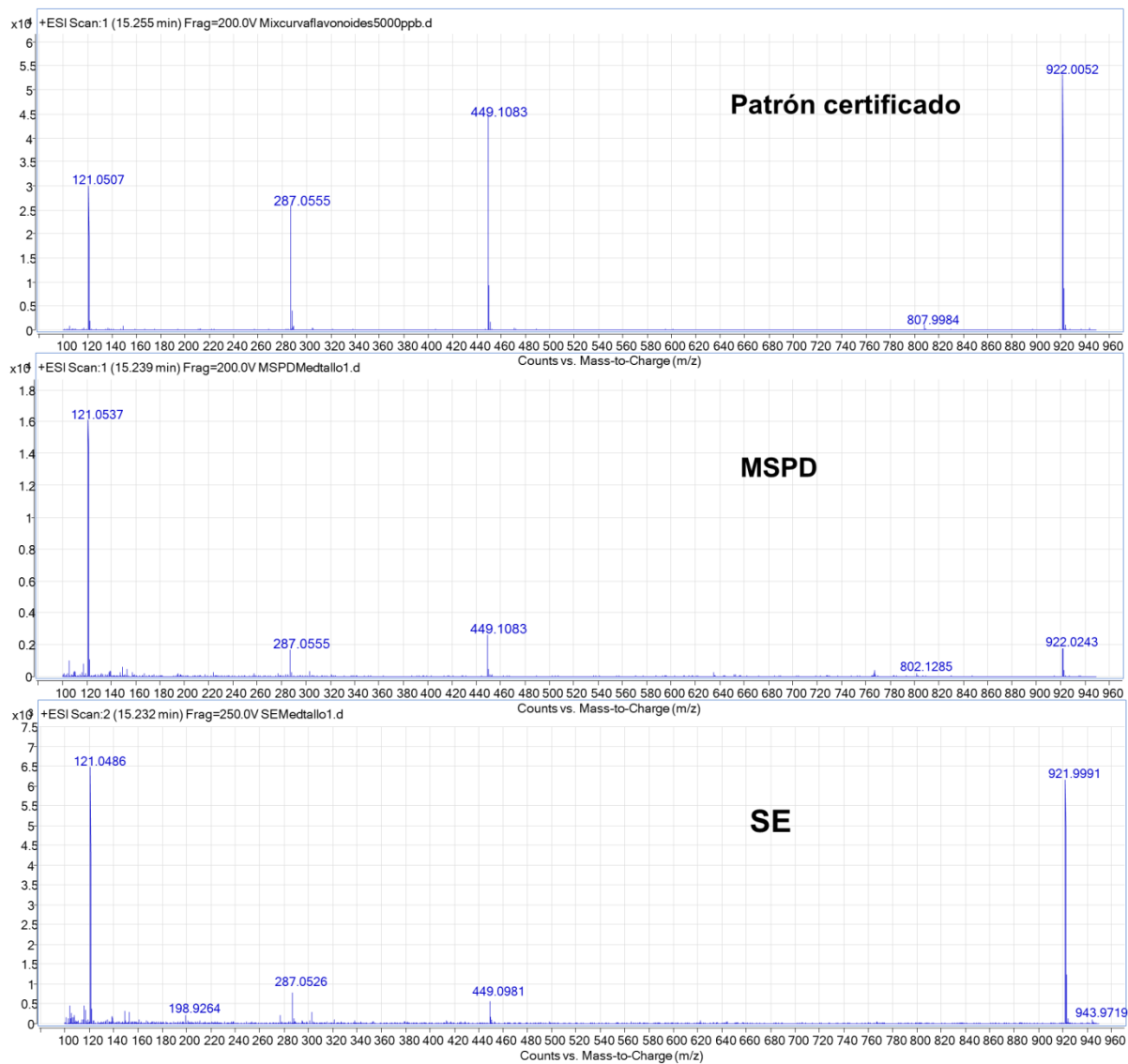
<b>N<sub>o</sub></b>	<b>Recubrimiento de la fibra de SPME</b>	<b>CP 1</b>	<b>CP 2</b>	<b>CP 3</b>
1	CAR-PDMS/DVB 6 a.m. R-1	15,74	0,42	1,78
2	CAR-PDMS/DVB 6 a.m. R-2	16,22	0,97	2,38
3	CAR-PDMS/DVB 6 a.m. R-3	15,86	1,30	1,66
4	CAR-PDMS/DVB 12 m. R-1	2,98	-1,20	-6,01
5	CAR-PDMS/DVB 12 m. R-2	1,57	-0,81	-3,78
6	CAR-PDMS/DVB 12 m. R-3	2,45	-1,14	-5,33
7	CAR-PDMS/DVB 6 p.m. R-1	0,43	-1,81	-5,27
8	CAR-PDMS/DVB 6 p.m. R-2	0,18	-1,62	-5,16
9	CAR-PDMS/DVB 6 p.m. R-3	0,41	-1,78	-5,40
10	CAR-PDMS 6 a.m. R-1	-1,88	-6,62	4,95
11	CAR-PDMS 6 a.m. R-2	-1,78	-7,41	6,09
12	CAR-PDMS 6 a.m. R-3	-1,76	-6,10	4,55
13	CAR-PDMS 12 m. R-1	-1,90	-4,34	1,69
14	CAR-PDMS 12 m. R-2	-1,79	-4,79	0,69
15	CAR-PDMS 12 m. R-3	-1,80	-4,91	0,97
16	CAR-PDMS 6 p.m. R-1	-1,80	-5,39	-1,96
17	CAR-PDMS 6 p.m. R-2	-1,73	-4,45	-1,86
18	CAR-PDMS 6 p.m. R-3	-1,82	-6,39	-2,20
19	ViC <sub>16</sub> Im-NTf <sub>2</sub> /(ViBzIm) <sub>2</sub> C <sub>12</sub> -2NTf <sub>2</sub> 6 a.m. R-1	-2,47	3,71	0,70
20	ViC <sub>16</sub> Im-NTf <sub>2</sub> /(ViBzIm) <sub>2</sub> C <sub>12</sub> -2NTf <sub>2</sub> 6 a.m. R-2	-2,47	3,86	0,83
21	ViC <sub>16</sub> Im-NTf <sub>2</sub> /(ViBzIm) <sub>2</sub> C <sub>12</sub> -2NTf <sub>2</sub> 6 a.m. R-3	-2,31	3,30	0,70
22	ViC <sub>16</sub> Im-NTf <sub>2</sub> /(ViBzIm) <sub>2</sub> C <sub>12</sub> -2NTf <sub>2</sub> 12 m. R-1	-2,14	2,76	0,16

## BIOPROSPECCIÓN DE PLANTAS EN COLOMBIA

**Anexo D.** Continuación

23	ViC <sub>16</sub> Im-NTf <sub>2</sub> /(ViBzIm) <sub>2</sub> C <sub>12</sub> -2NTf <sub>2</sub> 12 m. R-2	-2,13	2,68	0,10
24	ViC <sub>16</sub> Im-NTf <sub>2</sub> /(ViBzIm) <sub>2</sub> C <sub>12</sub> -2NTf <sub>2</sub> 12 m. R-3	-2,07	2,70	0,59
25	ViC <sub>16</sub> Im-NTf <sub>2</sub> /(ViBzIm) <sub>2</sub> C <sub>12</sub> -2NTf <sub>2</sub> 6 p.m. R-1	-2,14	2,95	0,84
26	ViC <sub>16</sub> Im-NTf <sub>2</sub> /(ViBzIm) <sub>2</sub> C <sub>12</sub> -2NTf <sub>2</sub> 6 p.m. R-2	-2,00	2,52	0,77
27	ViC <sub>16</sub> Im-NTf <sub>2</sub> /(ViBzIm) <sub>2</sub> C <sub>12</sub> -2NTf <sub>2</sub> 6 p.m. R-3	-2,10	2,79	0,82
28	ViC <sub>6</sub> Im-Cl/(Vilm) <sub>2</sub> Cl <sub>12</sub> -2Br 6 a.m. R-1	-2,05	2,77	0,56
29	ViC <sub>6</sub> Im-Cl/(Vilm) <sub>2</sub> Cl <sub>12</sub> -2Br 6 a.m. R-2	-2,07	2,80	0,58
30	ViC <sub>6</sub> Im-Cl/(Vilm) <sub>2</sub> Cl <sub>12</sub> -2Br 6 a.m. R-3	-2,05	2,74	0,56
31	ViC <sub>6</sub> Im-Cl/(Vilm) <sub>2</sub> Cl <sub>12</sub> -2Br 12 m. R-1	-2,39	3,75	0,99
32	ViC <sub>6</sub> Im-Cl/(Vilm) <sub>2</sub> Cl <sub>12</sub> -2Br 12 m. R-2	-2,29	3,48	0,85
33	ViC <sub>6</sub> Im-Cl/(Vilm) <sub>2</sub> Cl <sub>12</sub> -2Br 12 m. R-3	-2,23	3,29	0,79
34	ViC <sub>6</sub> Im-Cl/(Vilm) <sub>2</sub> Cl <sub>12</sub> -2Br 6 p.m. R-1	-2,27	3,42	0,84
35	ViC <sub>6</sub> Im-Cl/(Vilm) <sub>2</sub> Cl <sub>12</sub> -2Br 6 p.m. R-2	-2,14	3,04	0,68
36	ViC <sub>6</sub> Im-Cl/(Vilm) <sub>2</sub> Cl <sub>12</sub> -2Br 6 p.m. R-3	-2,30	3,52	0,87
37	ViC <sub>16</sub> Im-NTf <sub>2</sub> /(Vilm) <sub>2</sub> C <sub>12</sub> -2NTf <sub>2</sub> R-1	-2,03	2,76	0,57
38	ViC <sub>16</sub> Im-NTf <sub>2</sub> /(Vilm) <sub>2</sub> C <sub>12</sub> -2NTf <sub>2</sub> 6 a.m. R-2	-2,05	2,83	0,67
39	ViC <sub>16</sub> Im-NTf <sub>2</sub> /(Vilm) <sub>2</sub> C <sub>12</sub> -2NTf <sub>2</sub> 6 a.m. R-3	-2,06	2,72	0,50
40	ViC <sub>16</sub> Im-NTf <sub>2</sub> /(Vilm) <sub>2</sub> C <sub>12</sub> -2NTf <sub>2</sub> 12 m. R-1	-2,33	3,78	0,97
41	ViC <sub>16</sub> Im-NTf <sub>2</sub> /(Vilm) <sub>2</sub> C <sub>12</sub> -2NTf <sub>2</sub> 12 m. R-2	-2,22	3,45	0,79
42	ViC <sub>16</sub> Im-NTf <sub>2</sub> /(Vilm) <sub>2</sub> C <sub>12</sub> -2NTf <sub>2</sub> 12 m. R-3	-2,26	3,24	0,79
43	ViC <sub>16</sub> Im-NTf <sub>2</sub> /(Vilm) <sub>2</sub> C <sub>12</sub> -2NTf <sub>2</sub> 6 p.m. R-1	-2,28	3,52	0,84
44	ViC <sub>16</sub> Im-NTf <sub>2</sub> /(Vilm) <sub>2</sub> C <sub>12</sub> -2NTf <sub>2</sub> 6 p.m. R-2	-2,15	3,04	0,68
45	ViC <sub>16</sub> Im-NTf <sub>2</sub> /(Vilm) <sub>2</sub> C <sub>12</sub> -2NTf <sub>2</sub> 6 p.m. R-3	-2,33	3,42	0,87

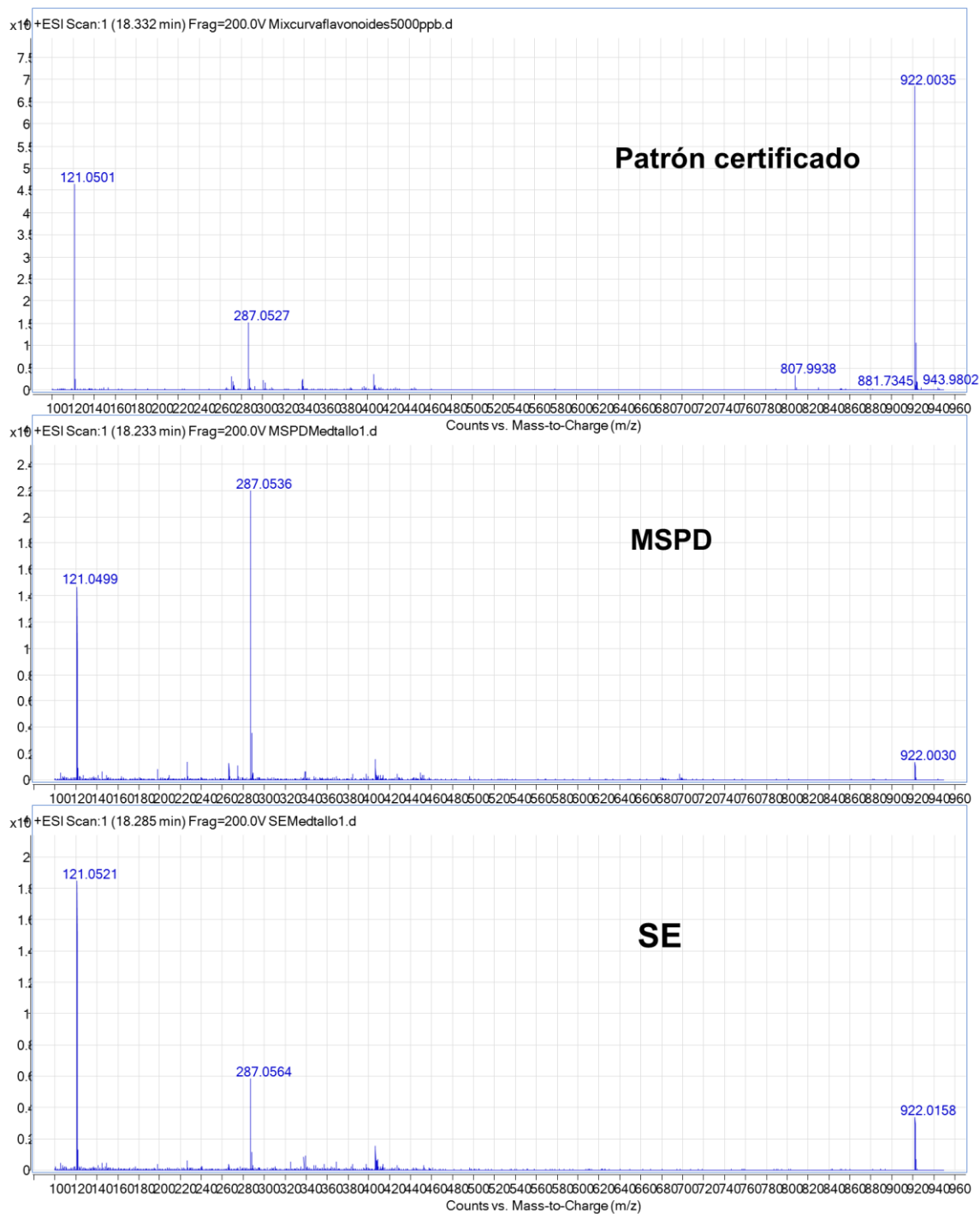
## BIOPROSPECCIÓN DE PLANTAS EN COLOMBIA

**Anexo E.** Espectros de masas de la cianidina-3-glucósido, obtenidos por LC-ESI(+)-TOF-MS.

## BIOPROSPECCIÓN DE PLANTAS EN COLOMBIA

## Anexo E. Continuación

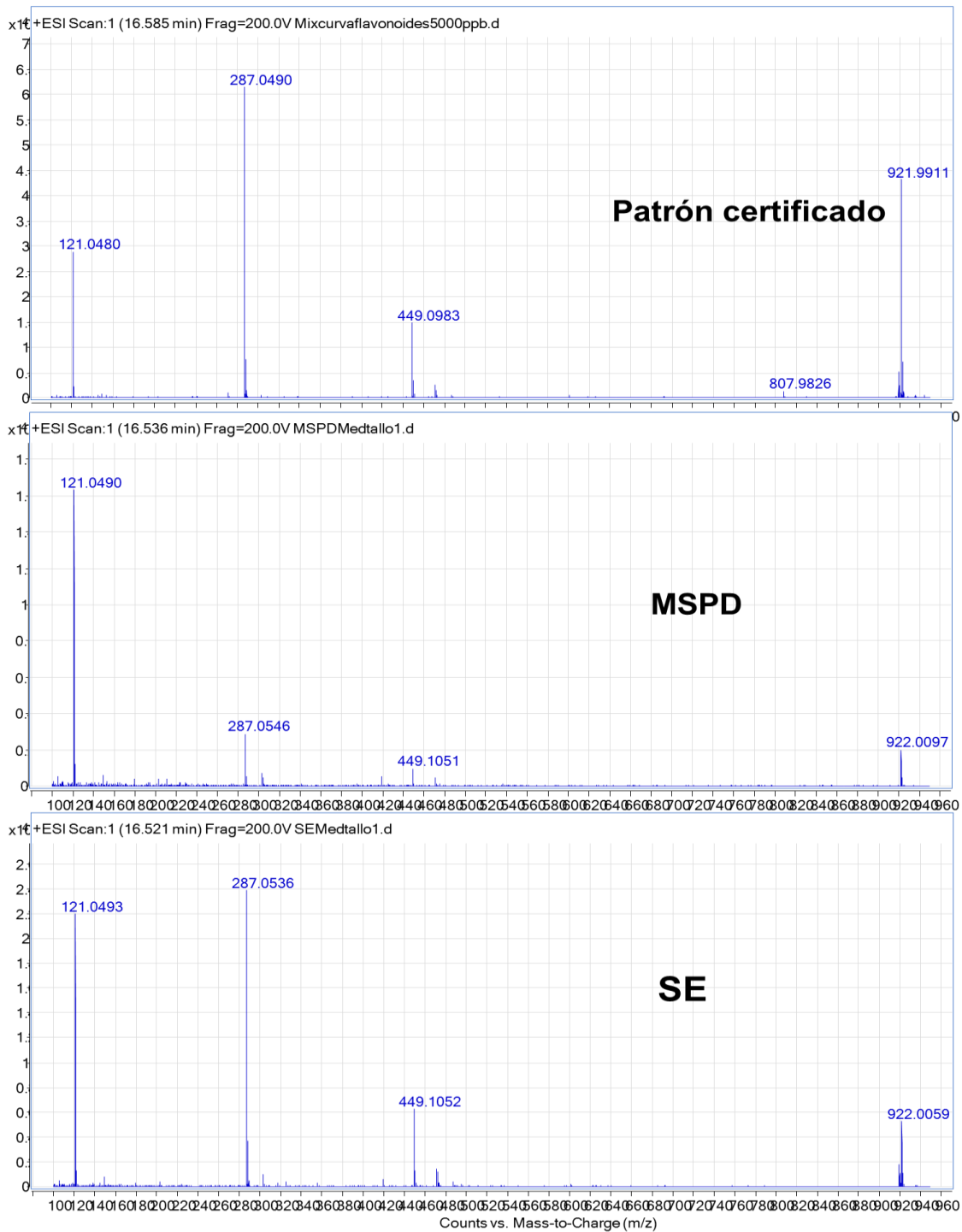
Espectros de masas del kaempferol, obtenidos por LC-ESI(+)-TOF-MS.



## BIOPROSPECCIÓN DE PLANTAS EN COLOMBIA

## Anexo E. Continuación

Espectros de masas del kaempferol-3-glucósido, obtenidos por LC-ESI(+)-TOF-MS.



## BIOPROSPECCIÓN DE PLANTAS EN COLOMBIA

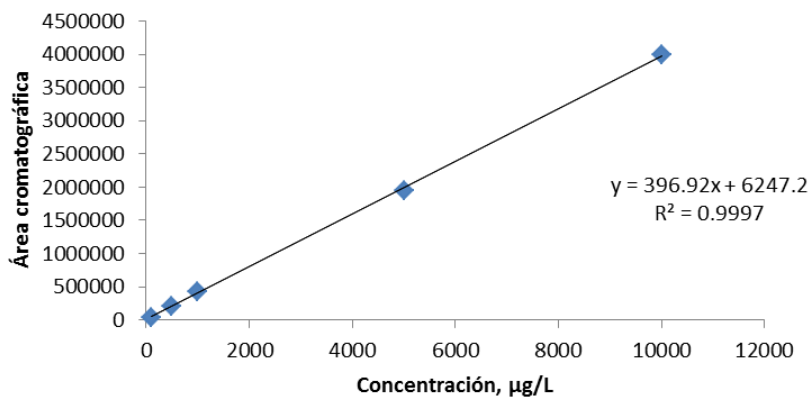
**Anexo E.** Continuación

Cuantificación de los flavonoides identificados en los extractos hidroalcohólicos y en los obtenidos por MSPD de hojas, flores, tallos y frutos de *M. myriantha*.

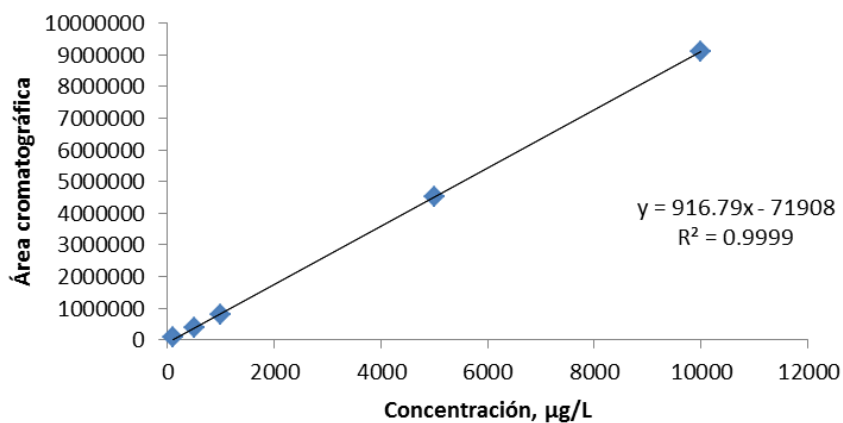
Curvas de calibración con algunos de los flavonoides identificados, para la cuantificación por el método del estándar externo

Compuesto	µg/L	Fórmula	Masas		Δppm	t <sub>R</sub> , min	Área, cuentas
			Cal.	Exp.			
Cianidina-3-glucósido	100	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>11</sub>	449.1083	449.1076	0.23	15.2	43496
	500						211351
	1000						426796
	5000						1940514
	10000						3997918
Luteolina	100	C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> O <sub>6</sub>	287.0555	287.0564	1.37	17.6	77024
	500						381945
	1000						788725
	5000						4508378
	10000						9103070
Kaempherol	100	C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> O <sub>6</sub>	287.0555	287.0564	1.47	18.2	11948
	500						58528
	1000						134815
	5000						741085
	10000						1389790
Kaempherol-3-glucósido	100	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>11</sub>	449.1083	449.1074	0.26	16.5	40002
	500						177819
	1000						375949
	5000						1984417
	10000						3922993

## Anexo E. Continuación

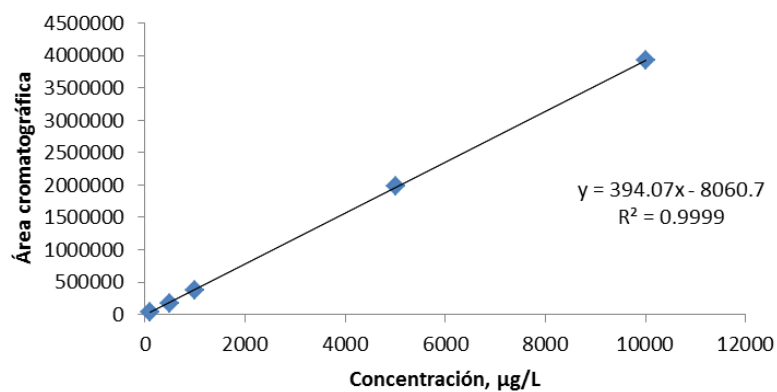


**Figura 5.1** Curva de calibración para la cuantificación de la antocianina cianidina-3-glucósido, ion  $[M]^+$  en  $m/z$  449.1083. LC-ESI(+)-TOF-MS.

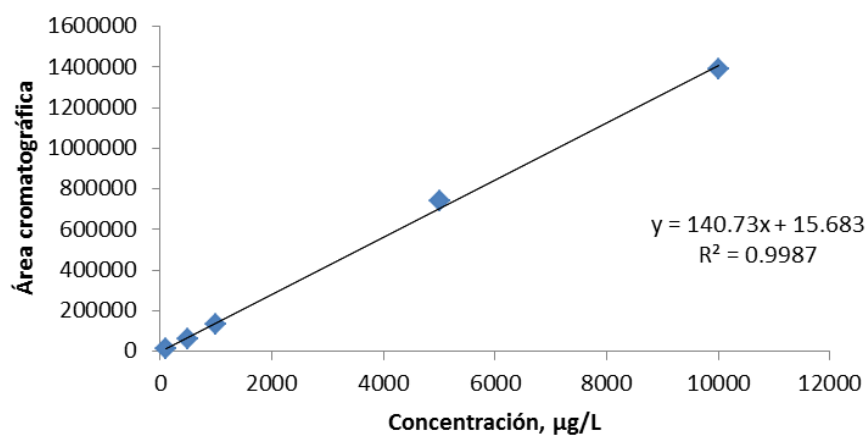


**Figura 5.2** Curva de calibración para la cuantificación del flavonoide luteolina, ion  $[M+H]^+$  en  $m/z$  287.0555. LC-ESI(+)-TOF-MS.

## BIOPROSPECCIÓN DE PLANTAS EN COLOMBIA



**Figura 5.3** Curva de calibración para la cuantificación del polifenol kaempferol-3-glucósido, ion  $[\text{M}+\text{H}]^+$  en  $m/z$  449.1083. LC-ESI(+)-TOF-MS.



**Figura 5.4** Curva de calibración para la cuantificación del kaempferol, ion  $[\text{M}+\text{H}]^+$  en  $m/z$  287.0555. LC-ESI(+)-TOF-MS.

**Anexo E.** Continuación**Tabla 5.1**

Áreas cromatográficas obtenidas para los compuestos identificados por LC-ESI(+)-TOF-MS presentes en los extractos obtenidos por MSPD de hojas, flores, tallos y frutos de *M. myriantha*,  $n=3$ .

Muestra	Compuesto	Área cromatográfica, cuentas	Área <sub>istd</sub> , cuentas
MSPD, Hojas	Kaempferol-3-rutinósido	38329	154969
		33088	170557
		39511	170699
	kempferol-3-glucósido	25995	154969
		21968	170557
		29015	170699
		292557	154969
	Kaempferol	213585	170557
		247905	170699
		257512	187341
MSPD, Flores	Kaempferol-3-rutinósido	198916	169529
		194761	169529
		357728	187341
	Kaempferol-3-glucósido	272942	169529
		271846	169529
		35560	187341
	Kaempferol-3-arabinosido	27942	169529
		27947	169529
		752729	187341
	Kaempferol	614696	169529
624696		169529	
139614		185156	
MSPD, Tallos	Cianidina-3-glucósido	156455	162960
		165361	172279
		42776	185156
	Kaempferol-3-rutinósido	36727	162960
		60236	172279
		64057	185156
	Kaempferol-3-glucósido	66068	162960
		74044	172279
		1514766	185156
	Kaempferol	1413251	162960
2187782		172279	

## BIOPROSPECCIÓN DE PLANTAS EN COLOMBIA

		17918	177581
	Cianidina-3-glucósido	13552	169588
		15639	175053
		9698	177581
	Kaempferol-3-rutinósido	5330	169588
		5017	175053
MSPD, Frutos		14261	177581
	Kaempferol-3-glucósido	15250	169588
		12020	175053
		121706	177581
	Kaempferol	73405	169588
		92429	175053

**Tabla 5.2**

Áreas cromatográficas obtenidas para los compuestos identificados por LC-ESI(+)-TOF-MS presentes en los extractos hidroalcohólicos de hojas, flores, tallos y frutos de *M. myriantha*,  $n=3$ .

Muestra	Compuesto	Área cromatográfica, cuentas	Área <sub>std</sub> , cuentas
		64417	213608
	Cianidina-3-glucósido	35851	175738
		22256	172712
		87991	213608
	Kaempferol-3-rutinósido	87365	175738
		59067	172712
		21458	213608
SE, Hojas	kempferol-3-glucósido	24693	175738
		15214	172712
		75947	213608
	Luteolina	20545	175738
		12253	172712
		167466	213608
	Kaempferol	151659	175738
		124828	172712

## BIOPROSPECCIÓN DE PLANTAS EN COLOMBIA

## Anexo E. Continuación

		9457	175077
	Cianidina-3-glucósido	8224	171150
		9075	177116
		303163	175077
	Kaempferol-3-rutinósido	323284	171150
		348795	177116
		504244	175077
SE, Flores	Kaempferol-3-glucósido	574526	171150
		627544	177116
		35760	175077
	Kaempferol-3-arabinósido	41416	171150
		52220	177116
		262461	175077
	Kaempferol	304094	171150
		301664	177116
		22182	163741
	Cianidina-3-glucósido	25699	161772
		29694	172036
		31766	163741
	Kaempferol-3-(2-glucosil-rutinósido)	52485	161772
		76510	172036
		440295	163741
	Kaempferol-3-rutinósido	684161	161772
		707794	172036
SE, Tallos		703443	163741
	Kaempferol-3-glucósido	1146588	161772
		1203313	172036
		48957	163741
	Kaempferol-3-arabinósido	76321	161772
		68162	172036
		667616	163741
	Kaempferol	891651	161772
		968838	172036
		6755	167069
	Cianidina-3-glucósido	6502	167868
		6557	160388
SE, Frutos		131660	167069
	Kaempferol-3-rutinósido	106139	167868
		131630	160388

	201540	167069
Kaempferol-3-glucósido	157527	167868
	195252	160388
	90577	167069
Kaempferol	48892	167868
	73419	160388

El cálculo de la concentración de cada uno de los flavonoides, se realizó con las ecuaciones que se muestran en las **Figuras 5.1-5.4**, reemplazando los valores de las áreas cromatográficas obtenidas (Véase **Tablas 5.1** y **5.2**); y el valor resultante se multiplicó por un factor de dilución de 1/1000.

Para los compuestos sin patrones certificados, la cuantificación se realizó como se muestra en la **Ecuación 5.1**; el resultado obtenido se multiplicó por un factor de dilución de 1/1000.

$$\text{Concentración del compuesto} = \frac{\text{Área del compuesto}}{\text{Área del patrón interno}} * 200 \mu\text{g/L} \quad \text{Ecuación 5.1}$$