



---

**Universidad de Valladolid**

Facultad de Ciencias



---

TRABAJO FÍN DE MÁSTER  
Máster en Técnicas Avanzadas en Química

---

“Estudio y puesta a punto de procedimientos para la determinación de harmina mediante cromatografía HPLC con detector UV/Visible y cromatografía de gases con detector de ionización de llama”



23 DE JUNIO DE 2017

AUTOR: SUANY PAMELA MALDONADO SEVILLA

TUTOR: Dr. LUIS DEBAN MIGUEL

# Tabla de contenido

<b>I. RESUMEN</b>	<b>5</b>
<b>II. INTRODUCCIÓN</b>	<b>6</b>
<b>2.1 DESCRIPCIÓN, CARACTERÍSTICAS Y FUENTES DE LA HARMINA</b>	<b>6</b>
<b>2.2 ACTIVIDADES FARMACOLÓGICAS</b>	<b>8</b>
<b>2.3 ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS</b>	<b>11</b>
<b>2.4 DESCRIPCIÓN DE ANALITOS SELECCIONADOS</b>	<b>19</b>
2.4.1 ÁCIDO ASCÓRBICO	19
2.4.2 ÁCIDO ACETILSALICÍLICO	19
2.4.3 ÁCIDO SALICÍLICO	20
2.4.5 IBUPROFENO	21
2.4.6 PARACETAMOL	21
2.4.7 TEOBROMINA	22
2.4.8 TEOFILINA	22
2.4.9 QUININA	22
<b>III. OBJETIVO</b>	<b>23</b>
<b>IV. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL Y RESULTADOS</b>	<b>23</b>
<b>4.1 MATERIAL</b>	<b>23</b>
<b>4.2 EQUIPOS</b>	<b>23</b>
<b>4.3 REACTIVOS</b>	<b>24</b>
<b>4.4 PREPARACIÓN DE MUESTRAS</b>	<b>24</b>
4.4.1 PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES ESTÁNDAR DE HARMINA	24
4.4.2 PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES ESTÁNDAR DE CAFEÍNA, TEOBROMINA, ÁCIDO ASCÓRBICO, ÁCIDO ACETILSALICÍLICO, ÁCIDO SALICÍLICO, TEOFILINA, IBUPROFENO Y PARACETAMOL.	24
4.4.3 PREPARACIÓN DE PATRÓN MIXTO	25
4.4.4 EXTRACCIÓN SOXHLET	25
<b>4.5 ESTUDIO DE ABSORCIÓN POR ESPECTROSCOPÍA UV/VIS</b>	<b>27</b>
4.5.1 PREPARACIÓN DE LÍNEAS DE CALIBRADO	28
<b>4.6 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA CON DETECTOR UV/VIS (HPLC-UV/VIS)</b>	<b>29</b>

<b>4.7 ESTUDIO DE LA LUMINISCENCIA POR ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA</b>	<b>35</b>
4.7.1 CONDICIONES DE TRABAJO	35
4.7.2 PREPARACIÓN DE LÍNEAS DE CALIBRADO	35
<b>4.8 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA CON DETECTOR DE FLUORESCENCIA (HPLC/FL)</b>	<b>37</b>
4.8.1 CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS	37
4.8.2 ANÁLISIS EN CONJUNTO CON QUININA	38
<b>4.9 CROMATOGRAFÍA DE GASES CON DETECTOR DE IONIZACIÓN DE LLAMA (CG-FID)</b>	<b>39</b>
4.9.1 EXPERIMENTACIÓN CON PATRÓN MIXTO	42
<b>V. CONCLUSIONES</b>	<b>45</b>
<b>VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>46</b>
<b>VII. LISTA DE TABLAS Y FIGURAS</b>	<b>49</b>
<b>7.1 LISTA DE TABLAS</b>	<b>50</b>
<b>7.2 LISTA DE FIGURAS</b>	<b>50</b>
<b>VIII. ANEXOS</b>	<b>51</b>
<b>8.1 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA CON DETECTOR UV/VIS (HPLC-UV/VIS)</b>	<b>51</b>
8.1.1 CROMATÓGRAMAS, ESTUDIOS DE HARMINA A DISTINTAS FASES MÓVILES	52
8.1.2 CROMATÓGRAMAS, ESTUDIOS DE LOS DIFERENTES COMPUESTOS EN MODO GRADIENTE	53
<b>8.2 ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA</b>	<b>54</b>

## Lista de Abreviaturas

- ADN: Ácido desoxirribonucleico
- CDK: Quinasa dependiente de ciclinas
- DL<sub>50</sub>: Dosis letal al 50%.
- GC: Cromatografía de gases
- GC-MS: Cromatografía de gases con detector de masas
- DPV: Voltamperometría diferencial de impulsos
- DYRK1A: Doble especificidad Yak1 relacionados con quinasa /Dual specificity Yak1- Related Kinase
- FID: Detector de ionización de llama
- HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución
- HPLC- ESI-MS/MS: Cromatografía líquida de alta resolución/espectrometría de masas en tándem de ionización por electrospray
- HPLC-PO-CL: Cromatografía líquida de alta resolución con detección de quimioluminiscencia de peroxoxalato
- HPLC-PDA-UV: Cromatografía líquida de alta resolución con detector fotodiodo array y ultravioleta
- IUPAC: Unión Internacional de Química Pura y Aplicada
- HPTLC: Cromatografía en capa fina de alto rendimiento
- LC-MS: Cromatografía de líquidos con detector de masas
- LC-ESI-MS: Cromatografía de líquidos con detector
- LOD: Límite de detección
- LOQ: Límite de cuantificación.
- MAO: Monoamino oxidasa
- ODS: Sílice de octadecilo
- PPAR $\gamma$ : Receptor activado por proliferador de peroxisoma gamma
- RP-HPLC: Cromatografía de fase reversa
- SNC: Sistema nervioso central
- T<sub>R</sub>: Tiempo de retención
- UPLC: Cromatografía líquida de ultra-alta resolución
- UV-VISIBLE: Radiación ultravioleta visible
- VIH: Virus de inmunodeficiencia humana

## I. Resumen

En este trabajo se establecen las características analíticas para la puesta a punto de métodos cromatográficos para el estudio y determinación de harmina en presencia de diferentes compuestos como posibles interferentes. Este alcaloide está siendo objeto de estudio en muchas investigaciones debido a sus características farmacológicas para tratar enfermedades como el cáncer, la diabetes, párkinson y alzhéimer, además, se le atribuyen efectos alucinógenos y forma parte del contenido principal en la bebida tradicional y ritual Ayahuasca consumida en diferentes tribus amazónicas de Suramérica.

Tras la previa preparación de las muestras por los procedimientos correspondientes, fueron analizadas mediante cromatografía de líquidos HPLC con detector UV/Visible y cromatografía de gases con detector de ionización de llama (FID). Además, se hizo un breve análisis por cromatografía de líquidos HPLC con detector de fluorescencia.

## I. Summary

This work establishes the analytical characteristics for the development of chromatographic methods for the study and determination of harmine in the presence of different compounds as potential interferents. This alkaloid is being studied in many studies because of its pharmacological characteristics to treat diseases such as cancer, diabetes, parkinson and alzheimer, in addition, it is attributed hallucinogenic effects and is part of the main content in the traditional drink and consumed Ayahuasca ritual In different Amazonian tribes of South America.

After the previous preparation of the samples by the corresponding procedures, they were analyzed by HPLC liquid chromatography with UV/Visible detector and gas chromatography with flame ionization detector (FID). In addition, a brief analysis was performed by HPLC liquid chromatography with fluorescence detector.

## II. Introducción

En la actualidad se conocen más de 12,000 alcaloides, estos son compuestos orgánicos cíclicos que contienen nitrógeno, algunos de ellos se encuentran en productos naturales, otros son producidos por diferentes organismos como animales, hongos y bacterias<sup>1</sup>. Los alcaloides son considerados uno de los grupos de compuestos naturales más importantes, debido al papel que desempeñan en los diferentes organismos en los que son sintetizados. Algunas de sus aplicaciones más relevantes se encuentran en el campo farmacológico, veterinario y médico<sup>2</sup>. Su estudio hoy en día representa un tema de interés sobre todo en la industria farmacéutica, ya que cada vez se hace imprescindible la elaboración de nuevos fármacos que contrarresten las enfermedades que atacan a la población mundial.

### 2.1 Descripción, características y fuentes de la Harmina

Las  $\beta$ -carbolinas constituyen una familia de alcaloides aromáticos de origen natural y sintético, se encuentran en tejidos humanos y en fluidos corporales, así como también en ciertos alimentos y animales (como mamíferos, insectos, especies marinas etc.), presentan diversas actividades biológicas, y propiedades farmacológicas incluyendo propiedades antimicrobianas, antiparasitarias y anti VIH.<sup>2</sup> En los últimos años el estudio de las  $\beta$ -carbolinas se ha visto incrementado debido a que muchas investigaciones la señalan como una base importante en el diseño y síntesis de nuevos fármacos antitumorales.

Cabe destacar que las  $\beta$ -carbolinas tienen un alto potencial para inhibir las MAO lo que hace que aumente la cantidad de neurotransmisores, por lo que pueden ser empleados como antidepresivos dado que este trastorno se asocia a la poca presencia de estos. Estos compuestos también están vinculados a la inhibición de enzimas CDK, evitando así la proliferación anormal de células que se consideran cancerígenas. Las  $\beta$ -carbolinas pueden además intercalarse con el ADN, y tienen gran afinidad de interaccionar con receptores de benzodiazepina, dopamina, imidazolina y receptores de 5-hidroxi-serotonina (5-HT).<sup>3</sup>

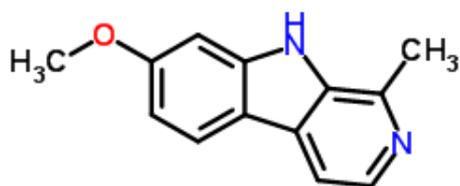
La planta *Peganum harmala*, o ruda siria es una fuente natural rica en compuestos  $\beta$ -carbolinas como harmalina, harmalol y harmina, a los que se les llama colectivamente

alcaloides harmala.<sup>4</sup> Es nativa del continente asiático, específicamente del norte de la India, aunque también se puede encontrar en diferentes partes de América, África y Oriente Medio. Sus semillas se han utilizado tradicionalmente por sus propiedades antihipertensivas, antiespasmódicas, eméticas, antitumorales, expectorantes, antimicrobianas, antipiréticas, antidiabéticas, antiinflamatorias, anti parkinsonianas, analgésicas, ansiolíticas, antidepresivas entre otras, así mismo son empleadas en distintos rituales.<sup>5</sup> Los extractos de la planta también se utilizan como estimulantes del sistema nervioso central (SNC).<sup>6</sup>

Últimamente su uso se ha extendido por los efectos psicofarmacológicos que presenta, sin embargo, la ingesta en exceso de las semillas de esta planta provoca efectos severos en el individuo como ser; vómitos, parálisis, convulsiones, náuseas y alucinaciones.<sup>6</sup> En ratas se ha determinado un DL<sub>50</sub> de 2g/kg al experimentar administraciones orales de extractos acuoso de semillas de *Perganum harmala*.<sup>7</sup>

La harmina se aisló por primera vez de esta planta en el año de 1847<sup>8</sup> su estructura molecular se compone de un núcleo indol y un anillo piridinico.

**Figura 1.** Estructura química de la Harmina (7-MeO-1-Me-9H-pirido[3,4-b]-indol)



En un estudio realizado sobre la determinación de los componentes de *Peganum harmala*, se encontró que la harmina constituye uno de los alcaloides principales en semillas (4.3% p/p), mientras que en las raíces de la planta es el componente mayoritario (2.0% p/p).<sup>6,9</sup>

Además de encontrarse en la ruda siria, la harmina se encuentra en la *Passiflora incarnata*, otra planta medicinal que pertenece a la familia Passifloraceae conocida comúnmente como la flor de la pasión, cuya composición química está basada

principalmente en ovonoides (0.25%), mientras que los alcaloides harmala representan el (0.1%). La flor de la pasión se ha usado desde la antigüedad para tratar la ansiedad y el insomnio.<sup>10,11</sup>

La liana *Banisteriopsis caapi*, representa otra fuente potencial de harmina, dado que sus tallos son ricos en este alcaloide. La *Banisteriopsis caapi* es muy utilizada en toda la cuenca del Amazona en Sur América, y constituye uno de los ingredientes principales en la preparación de la bebida medicinal y ceremonial Ayahuasca<sup>12</sup> de la que se hablará posteriormente.

## **2.2 Actividades Farmacológicas**

El uso de harmina representa un futuro prometedor en el campo farmacológico, varios de los efectos terapéuticos de la ruda siria mencionados anteriormente se le atribuyen a este compuesto que está presente en cantidades considerables en la raíz y semillas de la planta.

Recientes estudios preclínicos sugieren que la harmina actúa como un neuroprotector al reducir el estrés oxidativo, excitotoxicidad y la inflamación, por lo que su valor farmacológico para poder tratar las enfermedades como el Parkinson y el Alzheimer es alto.<sup>6,13</sup> No obstante, se considera que sus efectos neuroprotectores y cognitivos en humanos deben ser mayormente estudiados en investigaciones preclínicas.<sup>12</sup>

Se ha estudiado el impacto de la harmina en animales, sobre todo en roedores; las experimentaciones han demostrado mejoras notables de memoria y aprendizaje en estos al administrarse el compuesto; se considera que los resultados obtenidos se deben a que la harmina puede inhibir reversiblemente la monoaminoxidasa (MAO) y la acetilcolinesterasa, razón que además lo hacen sumamente importante como antidepresivo.<sup>12,14,15</sup>

El compuesto se vincula, además, a la inhibición de la actividad de la quinasa DYRK1A que al presentarse en cantidad excesiva, afecta la transmisión de neuronas provocando deficiencia de memoria y aprendizaje en enfermedades como el Parkinson y Alzheimer.<sup>9</sup>

Otras investigaciones indican que la harmina impide las respuestas contráctiles en el músculo liso en cobayos, provocados por la acetilcoina y ouabaína, lo que incrementa el interés de examinar los posibles efectos espasmolíticos en el músculo liso de las vías respiratorias in vitro.<sup>16</sup>

Así mismo, se ha identificado que la harmina es una molécula adipogénica que actúa como ente regulador del receptor activado por proliferador de peroxisoma gamma (PPAR $\gamma$ ) en los adipocitos, esto se ha correlacionado con acciones antidiabéticas en vivo. Este descubrimiento contribuyó a la mejora de la tolerancia de glucosa en ratones diabéticos, representando así una nueva alternativa para el desarrollo de nuevos fármacos metabólicos.<sup>17</sup>

Derivados N-9-sustituidos de la harmina se han estudiados para evaluar su actividad anticancerígena, los resultados que se obtuvieron fueron satisfactorios.<sup>18</sup>

Son conocidas otras características de la harmina vinculadas a sus propiedades como alucinógeno. La ayahuasca coloquialmente conocida como vid de las almas, es una bebida psicoactiva tradicional entre muchos pueblos indígenas de América del sur, su preparación es a base de plantas como *Psychotria viridis* que contiene dimetiltriptamina (DMT) y *Banisteriopsis caapi* rica en alcaloides  $\beta$ -carbolinas (harmina, tetrahidroharmina, harmal)<sup>19</sup>, por lo que este brebaje es un potente alucinógeno, y su consumo no se recomienda fuera de las prácticas ceremoniales establecidas dado que la bebida puede inducir a severas reacciones psicológicas adversas.<sup>7</sup>

Hoy en día su uso se ha extendido en Norteamérica y a diferentes países de Europa y se le considera un agente facilitador a la introspección y al autoconocimiento.<sup>20</sup>

Esta bebida produce diversos efectos tanto psicodélicos como estimulantes. A medida se aumenta la dosis ingerida van incrementando las emociones de felicidad, tristeza, asombro, temor, y la noción del tiempo se ve profundamente afectada.<sup>7</sup> Los efectos subjetivos de la bebida comienzan entre los 35-40 minutos después de la ingesta, alcanzando máxima intensidad a partir de los 90-120 minutos, dichos efectos suelen desaparecer después de 4 horas.<sup>14</sup>

Uno de los componentes principales de la Ayahuasca es la harmina; alcaloide alucinógeno, que produce efectos simpaticomiméticos cuya intensidad varia y que se ven reflejados en taquicardia, euforia y estimulación psicomotora. Los alucinógenos se adaptan muy bien a la fisiología humana y producen efectos muy intensos sobre la mente, no se les consideran drogas de adicción ya que no se suelen consumir de forma compulsivas.<sup>19</sup> Se ha demostrado que este compuesto es inactivo al administrarlo de forma oral hasta una dosis de 960 mg y de forma subcutánea hasta 70 mg.

Otra característica importante del compuesto es que puede intercalarse con el ácido desoxirribonucleico (ADN), por lo que sus posibles uniones con oligonucleótidos específicos de ADN están siendo estudiadas a través de diferentes técnicas biofísicas (acoplamiento nuclear, fluorescencia y técnicas de absorción). Estos estudios tienen como fin la creación de nuevos compuestos que presenten mejores propiedades biológicas.<sup>21</sup>

En la siguiente tabla se recoge un resumen de lo expuesto anteriormente.

**Tabla 1.** Actividades farmacológicas de la Harmina.

<b>Efectos neurofarmacológicos</b>	<b>Actividad antitumoral</b>	<b>Actividad antiparasitaria</b>
Alucinógeno	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Exposición citotoxicidad contra varios tumores humanos.</li> <li>-Líneas celulares incluyendo 1A9, KB, SaOS-2, A549,</li> <li>-SK-MEL-2, células U-87-MG y MCF-7</li> <li>-Las citotoxicidades de exposición contra PLA-801, HepG2, Bel-7402, BGC-823, HeLa.</li> <li>-Exposición de actividades antitumorales en ratones con carcinoma de pulmón de Lewis y sarcoma.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Inhibe las formas mastigotas extracelulares flageladas como las amastigotas intracelulares de Leishmania.</li> <li>-Inhibe las actividades del Tripanosoma cruzi in vitro.</li> </ul>

## 2.3 Antecedentes bibliográficos

Entre los métodos analíticos principales para determinar alcaloides  $\beta$ -carbonilos en muestras biológicas, se incluye cromatografía en capa fina de alto rendimiento (HPTLC), cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) con detección UV, detección electroquímica y detección de fluorescencia, cromatografía de gases-masa Espectrometría (GC-MS) y cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-MS).<sup>13</sup>

Se ha realizado una revisión bibliográfica de los trabajos efectuados sobre la determinación de harmina en distintos tipos de muestras, a fin de planificar el procedimiento más adecuado para determinar este compuesto en diferentes supuestos prácticos. Como resumen de todas las consultas llevadas a cabo, en la *tabla 2* se detallan algunos de estos:

**Tabla 2** Revisión de trabajos para la determinación de Harmina utilizando diferentes métodos analíticos.

Referencia	Muestra	Condiciones del método	Técnica de análisis
Herraiz, T.; González, D.; Ancín-Azpilicueta, C.; Arán, V. J.; Guillén, H. <sup>6</sup>	Planta <i>Peganum harmala</i> <b>Tratamiento:</b> Se tomaron diferentes partes de la planta: hojas, tallos, flores, raíces, y frutos (cápsulas). Se separaron, trituraron y homogeneizado.  Se prepararon alícuotas (0.2-0.5 g) en 20 ml de	<b>Columna:</b> C <sub>18</sub> (150 mm de 3,9 mm de diámetro y 4 ml (Waters, Milford, MA, EE.UU.). <b>Fase móvil:</b> Tampón de fosfato amónico 50 mM (pH 3) (tampón A) y 20% de A en acetonitrilo (tampón B). El gradiente se programó de 0% (100% A) a 32% B en 8 min, y 90% B a 15 min. <b>Flujo:</b> 1 ml / min <b>Temperatura de la columna:</b> 40 °C <b>Volumen de inyección:</b> 20 L <b>Longitud de onda:</b> 254 nm	RP- HPLC con matriz de diodos UV y detección de fluorescencia

**Tabla 2.** Continuación

Referencia	Muestra	Condiciones del método	Técnica de análisis
		La identificación se llevó a cabo por UV, fluorescencia y espectrometría de masas.	
Zhang, L.; Teng, L.; Gong, C.; Liu, W.; Cheng, X.; Gu, S.; Deng, Z.; Wang, Z.; Wang, C. <i>J</i> <sup>13</sup>	<p>Plasma de perros Beagle</p> <p><b>Tratamiento</b></p> <p>Se tomó 100L de muestra de plasma con 10L de solución de hidrocloreuro de 9-aminoacridina y 390 L de acetonitrilo, se mezclaron en vórtex durante 2 min y se centrifugaron a 15.000 xg durante 15 min a una temperatura de 4°C. El sobrenadante se transfirió a otro tubo limpio y después se evaporó hasta sequedad bajo nitrógeno a una temperatura de 37°C. El residuo seco se reconstituyó en 100L de acetonitrilo al 10% y se mezcló durante 2 min antes del análisis.</p>	<p>1) Cromatografía líquida</p> <p><b>Fase móvil:</b> Ácido fórmico acuoso (0.1%) Acetonitrilo</p> <p><b>Columna:</b> ACQUITY UPLC BEH C18 <b>Sistema:</b> por elución de gradiente <b>Temperatura de la columna:</b> 35° C <b>Temperatura del auto amplificador:</b> 4 ° C. <b>Flujo:</b> 0.4 ml / min.</p> <p>2) Cromatografía de masas</p> <p><b>Espectrómetro de masas:</b> cuadrupolo equipado con ionización por electrospray (ESI) en el modo de ionización positiva. <b>Voltaje capilar:</b> 2.5 Kv <b>Tensión de la colisión:</b> 25V <b>Voltaje del cono:</b> 50V <b>Voltaje del extractor:</b> 2.0 V <b>Temperatura de la fuente:</b> 120°C <b>Temperatura de desolvatación:</b> 400°C <b>Desolvatación flujo de gas:</b> 700L / h; <b>Caudal de gas de cono:</b> 75L / h. <b>Tiempo de retención:</b> 1.31 minutos</p>	UPLC-ESI-MS/ MS

**Tabla 2.** Continuación

Referencia	Muestra	Condiciones del método	Técnica de análisis
<p>Kartal, M.; Altun, M. .; Kurucu, S. <i>J. Pharm. Biome</i> <sup>22</sup></p>	<p>Semillas secas (2) de <i>Perganum harmala</i>.</p> <p><b>Tratamiento:</b> Las semillas se trataron con 50 ml de metanol a una temperatura de 50°C, en un baño de agua durante una hora. El extracto obtenido se disolvió con 50 ml de HCl (2%) y posteriormente se filtró dos veces con 20 ml de éter de petróleo. La capa ácida acuosa se basificó y se extrajo cuatro veces con 50 ml de cloroformo. La capa de cloroformo se combinó y se evaporó a sequedad, después se disolvieron los residuos en 25 ml de metanol.</p>	<p><b>Fase móvil:</b> Alcohol isopropílico, Acetonitrilo, Agua, Acido fórmico.</p> <p><b>Proporciones:</b> 100: 100: 300: 0.3</p> <p><b>pH:</b> 8.6 ajustado con trietilamina.</p> <p><b>Longitud de onda para detección espectrofotométrica:</b> 330nm</p> <p><b>Tipo de Columna:</b> Metasil ODS</p> <p>Sistema: por elución isocrática.</p> <p><b>Flujo:</b> 1.5 ml / min.</p> <p><b>Tiempo de retención:</b> 3.539 minutos</p>	<p>HPLC con detección UV</p>

**Tabla 2.** Continuación

Referencia	Muestra	Condiciones del método	Técnica de análisis
<p>Stanković, D.;                      Mehmeti, E.; Svorc,                      L.; Kalcher, K.  <i>Microchem. J</i> <sup>23</sup></p>	<p>1) Muestras de orina de dos individuos.  <b>Tratamiento:</b>                      Dilución de las muestras de orina en 10ml de solución tampón Britton-Robinson con un pH de 6.                      2) <i>Banisteriopsis caapi</i>  <b>Tratamiento:</b>                      Las semillas se trataron con 50 ml de metanol a una temperatura de 50°C, en un baño de agua durante una hora. El extracto obtenido se disolvió con 50 ml de HCl (2%) y posteriormente se filtró dos veces con 20 ml de éter de petróleo. La capa ácida acuosa se basificó y se extrajo cuatro veces con 50 ml de cloroformo. La capa de cloroformo se combinó y se evaporó a sequedad, después se</p>	<p><b>Composición de la célula:</b> (10 ml)                      Formada por un sistema de tres electrodos:                      -Electrodo de trabajo de carbón vítreo                      -Electrodo de referencia Ag /AgCl (KCl saturado)                      - Contraelectrodo Pt.  <b>pH:</b> 6.0  <b>Velocidad de barrido:</b> 25 mV/s  <b>Corriente de pico:</b> 40 ms</p>	<p>Voltametría diferencial de pulso. (DPV)</p>

**Tabla 2.** Continuación

Referencia	Muestra	Condiciones del método	Técnica de análisis
	disolvieron los residuos en 25 ml de metanol. <b>Interferentes:</b> -Ácido ascórbico (AA) -Dopamina (DA) -Ácido úrico (UA)		
Cepas, J.; Silva, M.; Prez-bendito, D. J. <sup>24</sup>	Insecto: Mariposa <i>Heliconiini</i> <b>Tratamiento:</b> el espécimen se secó a 40°C, se pesaron muestra de 50 y 70 mg, extrayéndose con metanol durante 5 minutos. En baja presión el extracto se evapora a sequedad en 50°C y el residuo se disolvió en 3,0 ml de HCl (1,2 M) y se filtró.	<b>Fase móvil:</b> Metanol 55:45 (v/v) Trietilamina 0,01% (m/v) En forma de gradiente. <b>Flujo:</b> 0.7 ml / min <b>pH:</b> 8 ajustándose con Na(OH) <b>Tipo de columna:</b> Minicolumna C <sub>18</sub>	HPLC-PO- CL Quimioluminiscencia de peroxoxalato
Grice, I. D.; Ferreira, L. A.; Griffiths, L. R. J. <sup>25</sup>	<i>Passiflora incarnata</i> . <b>Tratamiento:</b> Las muestras se maceraron hasta obtener un polvo fino, que se extrajo empleando el método soxhlet, utilizando como	<b>Fase móvil:</b> Agua Metanol Ácido acético 5% <b>Relación inicial de disolventes:</b> 60:30:10 <b>Flujo:</b> 1,0 ml/minuto <b>1)Proporciones rampa lineal</b> 45:45:10 <b>Tiempo:</b> 10 minutos	HPLC PDA-UV y Detección de Fluorescencia.

**Tabla 2.** Continuación

Referencia	Muestra	Condiciones del método	Técnica de análisis
	<p>solvente 100ml de metanol durante 6 horas. El extracto resultante se evaporó a sequedad, luego de resuspensión del residuo en 6,0 ml de metanol.</p> <p>Se tomó una alícuota de 100 µl en un cartucho C18 maxilimpio de 300 mg, y se eliminó el metanol pasando gas nitrógeno sobre este cartucho. Posteriormente se pasaron 10 ml de metanol y agua en las proporciones 85:15 respectivamente, para eluir los constituyentes de interés. Antes de inyectar el eluyente obtenido en la columna, este se filtró en un filtro de 0.22 µm.</p>	<p><b>2)Proporciones rampa lineal</b> 0: 95: 5 <b>Tiempo:</b> 30 minutos <b>Flujo:</b> 1.3 ml / minutos</p> <p><b>3)Proporciones rampa lineal</b> 0: 100: 0 <b>Flujo:</b> 1.3 ml / minutos <b>Tiempo:</b> 2 minutos</p> <p>Retención de 5 minutos, seguido de un retorno a las condiciones iniciales de más de 10 Minutos.</p> <p><b>Columna:</b> Waters® Novapak C18 (150 x 4 mm, 4 µm). <u>Detección PDA- UV</u> <b>Longitud de onda:</b> 254 nm <u>Fluorescencia</u> <b>Longitud de onda:</b> Excitación 254 nm Emisión 414 nm</p>	
<p>Kikura-Hanajiri, R.; Hayashi, M.; Saisho, K.; Goda, Y.<sup>26</sup></p>	<p>a) Materiales secos de plantas/hongo</p> <p><b>Tratamiento:</b> Las muestras se prepararon con 2 ml de metanol por</p>	<p><b>1) GC-MS</b></p> <p><b>Tipo de columna:</b> Capilar de sílice fundida (DB-5MS, 30mx 0.25mm i.d., espesor de película de 0.25m)</p>	<p>GC-MS y LC-ESI-MS</p>

**Tabla 2.** Continuación

Referencia	Muestra	Condiciones del método	Técnica de análisis
	<p>ultrasonicación durante 10 minutos.</p> <p>b) Muestras líquidas</p> <p><b>Tratamiento:</b> Cada solución de 200 L se diluyó a 2ml con metanol.</p> <p>Para los análisis cuantitativos, cada solución de metanol se añadió con 50 L de la solución de IS (0,2 mg / ml). Después de la centrifugación (5 min a 3000 rpm), las soluciones se filtraron mediante un dispositivo de filtro centrífugo antes de la inyección. Si era necesario, cada solución se diluyó con metanol a la concentración adecuada. En la medida de lo posible, todos los procedimientos de extracción se realizaron bajo protección contra la luz diurna y se utilizaron utensilios de vidrio.</p>	<p><b>Modo:</b> Impacto de electrones (EI) Energía de electrones: 70 eV</p> <p><b>Gas portador:</b> Helio</p> <p><b>Flujo:</b> 1ml/min</p> <p><b>Temperatura del inyector:</b> 200°C</p> <p><b>Temperatura del horno:</b> inicio 120°C (mantenida durante 1.0 minutos), seguida de una rampa de 2.5 °C/minutos a 190°C (mantenida durante 20 minutos) y una segunda rampa de 15°C/minutos a 280°C durante 5 minutos.</p> <p><b>Temperatura del detector:</b> 280°C</p> <p><b>Tiempo de retención:</b> 56.4 minutos</p> <p><b>2) LC-ESI-MS</b></p> <p><b>Tipo de columna:</b> ODS</p> <p><b>Modo:</b> Gradiente lineal</p> <p><b>Fase móvil:</b> A (formiato de amonio 10 mM (pH 3,5) / acetonitrilo (95: 5, v / v)) y una fase móvil B (acetonitrilo / metanol, (7: 3, v / v)) suministrado a 0,3 ml / min; A: B 100: 0 (0 min) - 95: 5 (15 min) - 90: 10 (35 min) - 73:27 (52 min) - 30:70 (60 min).</p>	

**Tabla 2.** Continuación

Referencia	Muestra	Condiciones del método	Técnica de análisis
<p>Zheng, W.; Wang, S.; Barnes, L. F.; Guan, Y.; Louis, E. D. <sup>27</sup></p>	<p>Sangre humana y de rata</p> <p><b>Tratamiento:</b></p> <p>Se tomó un volumen 9-12 ml de cada muestra y se mezclaron con 5-6 ml de NaOH 1M (2:1) en un tubo cónico de Sarstedt de 50ml.</p> <p>Luego se mezclaron en un vortex por 30 segundos, posteriormente continuaron agitando en un rotador horizontal a temperatura ambiente durante un tiempo de 30 minutos, con el fin de destruir las células sanguíneas y solubilizar los componentes proteicos. Para la extracción se utilizó acetato de etilo y metil-t-butyl éter (2:98), esta se repitió dos veces. La fase orgánica se combinó y se evaporó en nitrógeno a sequedad.</p>	<p><b>Fase móvil:</b> Solución tampón de fosfato potásico 17.5 Mm (pH 6.5) Metanol (30:70) <b>Columna:</b> C18 de fase inversa (ODS2, 5m,250,4.6mm) <b>Flujo:</b> 1.0 ml/minuto</p> <p><math>\lambda</math> <b>excitación:</b> 300 nm</p> <p><math>\lambda</math> <b>emisión:</b> 435 nm</p> <p><b>Tiempo retención:</b> 10-11 minutos</p>	<p>HPLC con detector de fluorescencia</p>

**Tabla 2.** Continuación

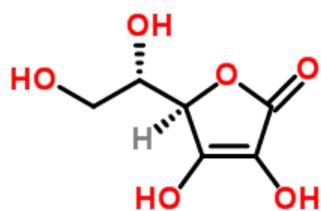
Referencia	Muestra	Condiciones del método	Técnica de análisis
	Las muestras se reconstruyeron en 0.25 ml de metanol y se congelaron durante 2 semanas.		

## 2.4 Descripción de analitos seleccionados

Para el estudio, se seleccionaron ocho compuestos, que en determinadas muestras pudieran acompañar a nuestro analito objetivo.

### 2.4.1 Ácido ascórbico

La vitamina C contiene altas propiedades antioxidantes y reductoras en contra de las infecciones del tipo bacterianas, además se le considera un agente antiviral muy eficaz.<sup>28</sup>



**Figura 2**

#### Propiedades químicas

Solubilidad

Agua: 0.33g/ml a 20°C

Etanol: 0.2g/ml

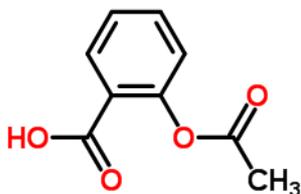
$\lambda_{\text{abs}} = 243 \text{ nm}$

Peso molecular: 176.12 g/mol

Punto de ebullición: 552 °C

### 2.4.2 Ácido Acetilsalicílico

Analgésico que se administra por vía oral y es utilizado para el tratamiento de dolores leves a moderados. Se caracteriza por actuar como un agente inhibidor de la ciclooxigenasa, dando como resultado la inhibición de la biosíntesis de prostaglandinas, además posee propiedades antiinflamatorias y antipiréticas.<sup>29</sup>



**Figura 3**

**Propiedades químicas:**

Solubilidad

Agua: 10 mg/ml a 37°C

Etanol: 50 mg/ml

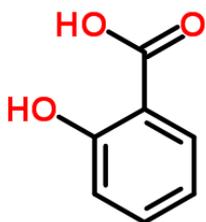
$\lambda_{\text{abs}} = 278 \text{ nm}$

Peso molecular: 180.16 g/mol

Punto de ebullición: 140 °C

### 2.4.3 Ácido Salicílico

Es un ácido de origen natural, con propiedades antiinflamatorias y antibacterianas. Es un sólido blanco y soluble en agua. Se utiliza ampliamente en la elaboración de productos para el cuidado de la piel, además de emplearse en el tratamiento del acné.<sup>30</sup>



**Figura 4**

**Propiedades químicas:**

Solubilidad

Agua: 1.8mg/mL a 20°C

Etanol: 50mg/ml

$\lambda_{\text{abs}} = 298 \text{ nm}$

Peso molecular: 138.12 g/mol

Punto de ebullición: 484 °C

### 2.4.4 Cafeína

Es un alcaloide con efectos estimulantes en el sistema nervioso central, produciendo agitación y aumentando el estado de alerta, otros de sus efectos es la relajación del músculo liso y estimulación del músculo cardíaco. También se le atribuyen efectos antiinflamatorios, y se considera que este alcaloide puede utilizarse en el tratamiento de algunos tipos de dolores de cabeza.<sup>31</sup>

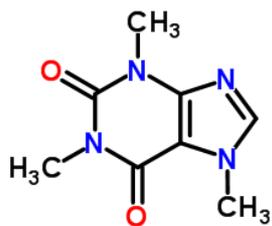


Figura 5

**Propiedades químicas:**

Solubilidad

Agua: 15mg/ml

Etanol: Ligeramente soluble

$\lambda_{abs}$ = 273 nm

Peso molecular: 194.19 g/mol

Punto de ebullición: 178 °C

**2.4.5 Ibuprofeno**

Fármaco de uso común como agente antiinflamatorio con propiedades analgésicas para el tratamiento de la artritis y el reumatismo.<sup>32</sup>

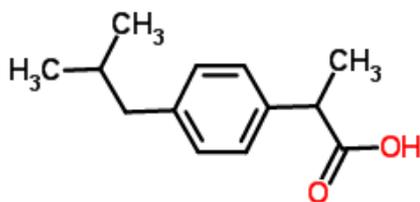


Figura 6

**Propiedades químicas:**

Solubilidad

Agua: Prácticamente insoluble

Etanol: Muy soluble

$\lambda_{abs}$ = 264 nm

Peso molecular: 206.29 g/mol

Punto de ebullición: 319.6 °C

**2.4.6 Paracetamol**

Es un derivado de p-aminofenol, que posee propiedades analgésicas y antipiréticas. Puede causar lesiones hepáticas agudas si se ingiere a dosis elevadas.<sup>33</sup>

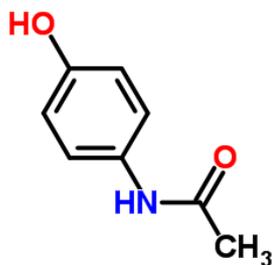


Figura 7

**Propiedades químicas:**

Solubilidad

Agua: 100mg/ml

Etanol: Soluble

$\lambda_{abs}$ = 245 nm

Peso molecular: 151.17g/mol

Punto de ebullición: >500 °C

### 2.4.7 Teobromina

Alcaloide principal de *Theobroma cacao*, es altamente empleado como broncodilatador y vasodilatador. Se estima que sus efectos son similares a los producidos por la cafeína.<sup>34</sup>

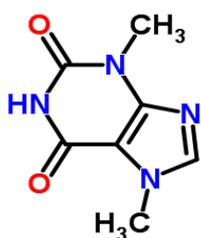


Figura 8

#### Propiedades químicas:

Solubilidad

Agua: Ligeramente soluble

Etanol: Ligeramente soluble

$\lambda_{abs}$  = 272 nm

Peso molecular: 180.16 g/mol

Punto de ebullición: 290°C

### 2.4.8 Teofilina

Se deriva de metil xantina del té con diurético, se considera estimulante del sistema nervioso central (SNC) así como también relajante muscular y estimulante cardíaco. Es ampliamente utilizado en el tratamiento del asma y broncoespasmo.<sup>35</sup>

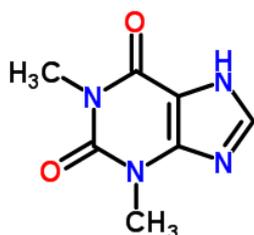


Figura 9

#### Propiedades químicas:

Solubilidad

Agua: Ligeramente soluble 8.3mg/ml

Etanol: Moderadamente soluble

$\lambda_{abs}$  = 270 nm

Peso molecular: 180.16 g/mol

### 2.4.9 Quinina

Alcaloide fluorescente que se encuentra en la corteza del árbol *Cinchona officinalis rubiaceae*, este árbol es originario de Perú y se ha utilizado desde la antigüedad por

sus propiedades terapéuticas como antimalárico, además se utiliza como aditivo en bebidas tónicas refrescantes como aromatizante.<sup>36</sup>

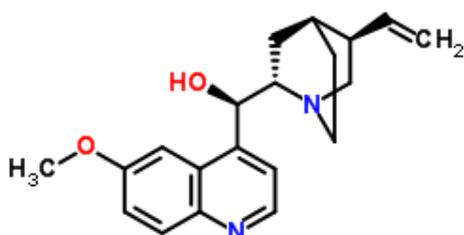


Figura 10

#### Propiedades químicas:

Solubilidad

Agua: 1g/ 1900ml

Peso molecular: 324.42 g/mol

### **III. Objetivo**

- El objetivo, es la puesta a punto de métodos de análisis cromatográficos mediante HPLC y GC, para la determinación de harmina, así como también la determinación de este alcaloide en presencia de otros principios activos como: cafeína, teobromina, teofilina, ácido ascórbico, ácido acetil salicílico, ácido salicílico, ibuprofeno y paracetamol.

### **IV. Procedimiento Experimental y Resultados**

#### **4.1 Material**

- Vasos de precipitado
- Matraces volumétricos
- Equipo de extracción Soxhlet
- Pipeta
- Botes de plástico

#### **4.2 Equipos**

Los equipos empleados para el desarrollo de ese estudio se encuentran en el departamento de química analítica de la Universidad de Valladolid, los cuales son:

- Cromatógrafo de gases con detector de ionización de llama (FID) Agilent® Technologies 6890N
- Cromatógrafo de líquidos de alta resolución HPLC con detector ultravioleta visible Agilent® Technologies 1200 series
- Espectrofotómetro de fluorescencia HITACHI® F-3000
- Espectrofotómetro de UV-Visible Marca HP Hewlett Packard
- Cromatógrafo de líquidos de alta resolución HPLC con detector de fluorescencia Agilent® 1100 series
- Balanza Analítica de precisión 0,0001g

### 4.3 Reactivos

- Harmina (Aldrich harmine 98%)
- Etanol absoluto PA
- Metanol de calidad de HPLC
- Acetonitrilo de calidad de HPLC
- Ácido acético 0.1 M
- Ácido ascórbico (Sigma-Aldrich)
- Ácido Acetilsalicílico (Sigma-Aldrich)
- Ácido Salicílico (Sigma-Aldrich)
- Cafeína Reagent Plus ® (Sigma-Aldrich)
- Ibuprofeno
- Paracetamol
- Teobromina >98% (Sigma-Aldrich)
- Teofilina >99% (Sigma-Aldrich)
- Estándar de Sulfato de Quinina ( $C_{20}H_{24}N_2O_2$ ) $_2$ .H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O Pm: 782,97g/mol Scharlau®
- Agua Nanopure suministrada por un Sistema Mini-Q de Milipore

### 4.4 Preparación de muestras

#### 4.4.1 Preparación de las soluciones estándar de harmina

Se prepara una disolución madre, para lo cual se pesó 14.2 mg de harmina al 98%, se disuelve en etanol, se lleva a un matraz de un litro y se enrasa con etanol.

A partir de esta disolución y del modo conveniente se prepararon patrones de concentraciones comprendidas entre 0.1-10 mg/L.

#### 4.4.2 Preparación de las soluciones estándar de cafeína, teobromina, ácido ascórbico, ácido acetilsalicílico, ácido salicílico, teofilina, ibuprofeno y paracetamol.

En la *tabla 3* se muestran las concentraciones y cantidades pesadas de cada compuesto utilizado en la preparación de soluciones estándar de cada uno de ellos. Las disoluciones se prepararon en etanol y se llevaron a 25 mL en matraz aforado.

**Tabla 3.** Peso y concentración de compuestos para la preparación de soluciones patrones.

Compuesto	Peso mg	Concentración ppm
		(mg/L)
Ácido ascórbico	2.62	105
Ácido acetil salicílico	2.63	105
Ácido salicílico	2.48	99
Cafeína	2.47	99
Ibuprofeno	2.67	107
Paracetamol	2.73	109
Teobromina	2.52	101
Teofilina	2.59	104

A continuación, se prepararon sucesivos patrones de diferente concentración, tomando alícuotas de 0.5, 1,2 y 2.5 ml de cada una de las disoluciones madre preparadas anteriormente y se aforó con etanol hasta 25 ml.

#### **4.4.3 Preparación de patrón mixto**

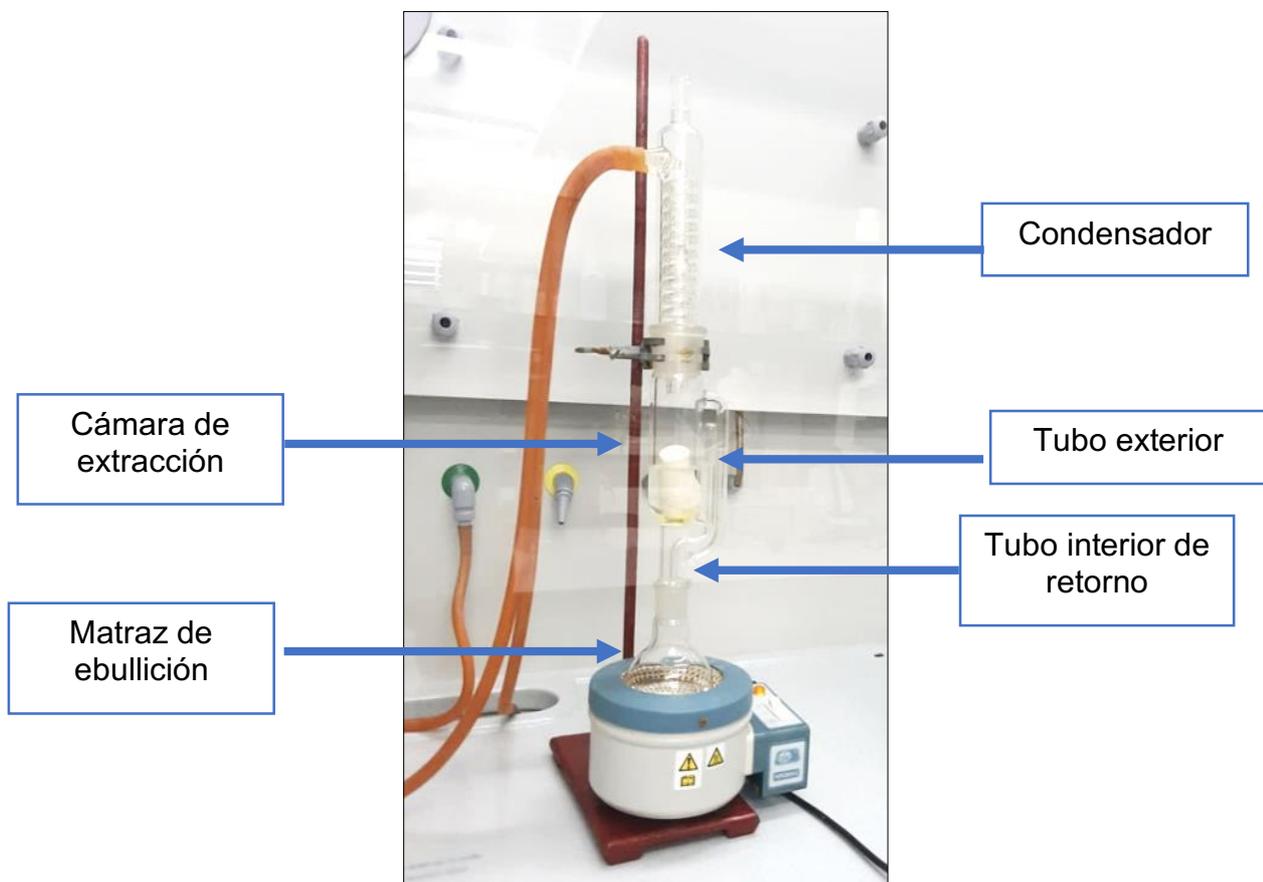
Para la preparación del patrón mixto se midieron alícuotas de 1 ml de los patrones del orden de 100mg/L aproximadamente de todos los compuestos mencionados anteriormente. Se transfirió a un matraz de 25 ml y se enraso con etanol. La solución preparada se almacenó para su posterior análisis.

#### **4.4.4 Extracción Soxhlet**

El método Soxhlet es un tipo de extracción convencional ampliamente utilizado para efectuar extracciones del tipo sólido-líquido, y así poder ser empleados luego en diferentes procedimientos, entre ellos los cromatográficos.<sup>37</sup> El método consiste en tratar repetidamente una muestra, de la que se quiere extraer alguno de sus componentes, con un disolvente que permita llevar a cabo la disolución y extracción de dicho componente de forma cuantitativa.

En nuestro caso, se pesaron 5.302 g de una muestra comercial de pasiflora de herbolario, previamente pulverizada, y se colocó en un cartucho fabricado con papel de filtro, posteriormente se introdujo en la cámara de extracción del equipo Soxhlet (*figura 11*). Se agregaron 150 ml de etanol, como disolvente extractante en el matraz y se procede al calentamiento externo del mismo, hasta ebullición, mediante una manta eléctrica. El tiempo de extracción fue de aproximadamente 4 horas completándose 10 ciclos (22 minutos por cada ciclo).

**Figura 11.** Montaje de equipo de extracción Soxhlet



Una vez realizada la extracción se llevó la muestra a un matraz de 250 mL y se enrasó con etanol.

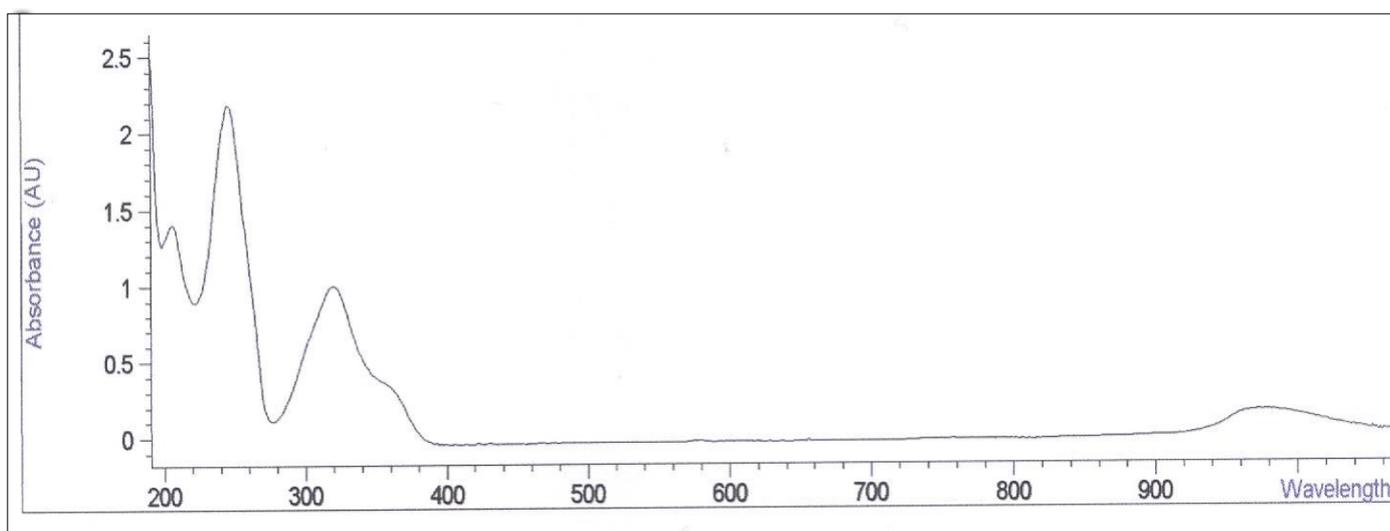
#### 4.5 Estudio de absorción por espectroscopía UV/VIS

Se procedió a realizar, un estudio por espectroscopia ultravioleta visible para determinar la longitud de onda de máxima absorción de la harmina a fin de establecer las condiciones óptimas de análisis por HPLC con detector UV/Visible.

Se toma un patrón de harmina en etanol y se procede a realizar un análisis de barrido entre 200-800 nm.

El espectro obtenido se muestra en la *figura 12*

**Figura 12.** Espectro de absorción UV/Visible de la Harmina, concentración 8.12 ppm



En el espectro de absorción UV/Visible del compuesto se observan tres bandas perfectamente definidas que representan los valores de máxima absorbancia a las longitudes de onda de: 211 nm, 241nm y 321nm considerándose la más apropiada para nuestro estudio la longitud de onda de 241nm y 321nm.

#### 4.5.1 Preparación de líneas de calibrado

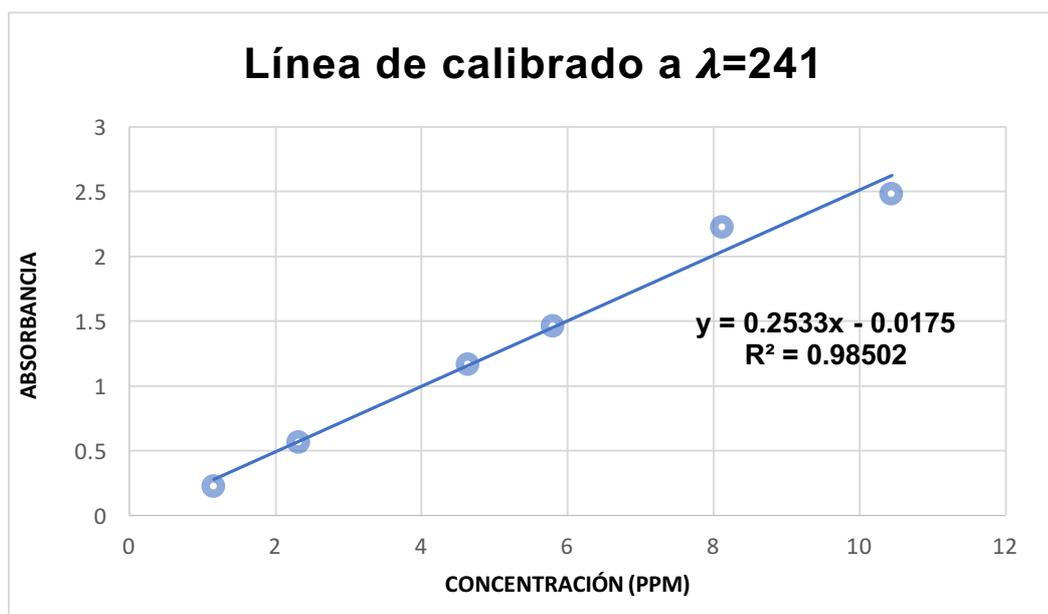
Se prepararon líneas de calibrado con patrones de harmina en concentraciones comprendidas entre 1- 10 mg/L para conocer la relación lineal entre la absorbancia y la concentración de dicho compuesto.

Se midieron los valores de absorbancia a las longitudes de onda de 241 y 321nm donde se representan las máximas absorciones.

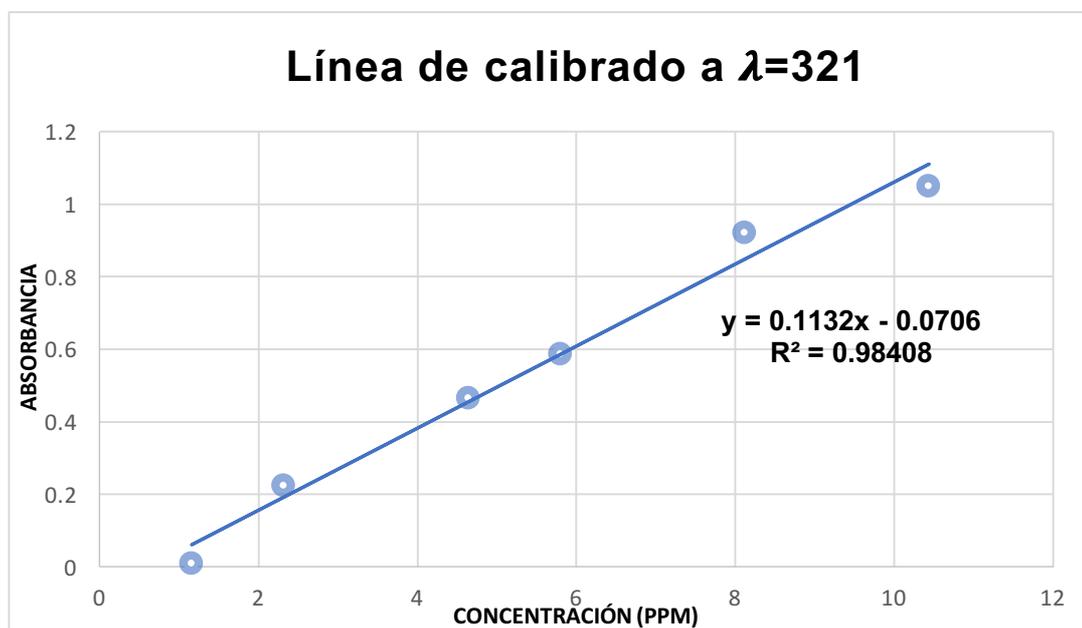
**Tabla 4.** Valores de absorbancia de la harmina a 241 y 321 nm.

Concentración (mg/L)	Absorbancia	
	$\lambda=241$	$\lambda=321$
1.16	0.226	0.0089
2.32	0.563	0.2233
4.64	1.164	0.4645
5.8	1.463	0.5865
8.12	2.226	0.9199
10.44	2.479	1.0496

**Figura 13.** Gráfico de línea de calibrado, valores de absorbancia de la harmina a una longitud de onda de 241 nm.



**Figura 14.** Gráfico de línea de calibrado, valores de absorbancia de la harmina a una longitud de onda de 321 nm.



A partir de las pendientes se obtiene el valor de la absortividad,  $a=0.2533 \text{ ppm}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  para  $\lambda=241$  y  $a= 0.1132 \text{ ppm}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  para  $\lambda=321$  que corresponden a una absortividad molar de  $\epsilon= 5.12 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  y  $\epsilon= 2.03 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  respectivamente.

#### **4.6 Cromatografía líquida de alta eficacia con detector UV/Vis (HPLC-UV/Vis)**

La cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC) es una técnica altamente usada debido a la gran sensibilidad que presenta lo que permite determinaciones cuantitativas muy exactas de las sustancias de interés.

Según la bibliografía consultada (*tabla 2*) la cromatográfica HPLC, es la técnica más empleada para la determinación de este compuesto. Para nuestro estudio se emplearon patrones de harmina entre 0.1 y 10 mg/L

Se llevaron a cabo varias pruebas usando el modo isocrático, con el fin de seleccionar las condiciones óptimas de trabajo y la fase móvil para lograr la separación deseada, algunas de ellas se muestran en los anexos apartado 8.1.1

Los eluyentes de la fase móvil fueron metanol, acetonitrilo de calidad HPLC, agua Nanopure suministrada por un Sistema Mini-Q de Milipore, y ácido acético al 0.1M.

En la *tabla 5* se recogen los distintos porcentajes seleccionados en los ensayos previos de los eluyentes que conforman la fase móvil.

**Tabla 5.** Porcentajes en ensayos previos de eluyentes de la fase móvil

Eluyentes %			
Agua	Metanol	Acetonitrilo	Ácido acético
0	86	14	0
0	75	25	0
0	45	40	15
0	50	50	0
5	80	15	0
25	60	15	0
80	0	15	5
0	80	15	5
10	70	15	5

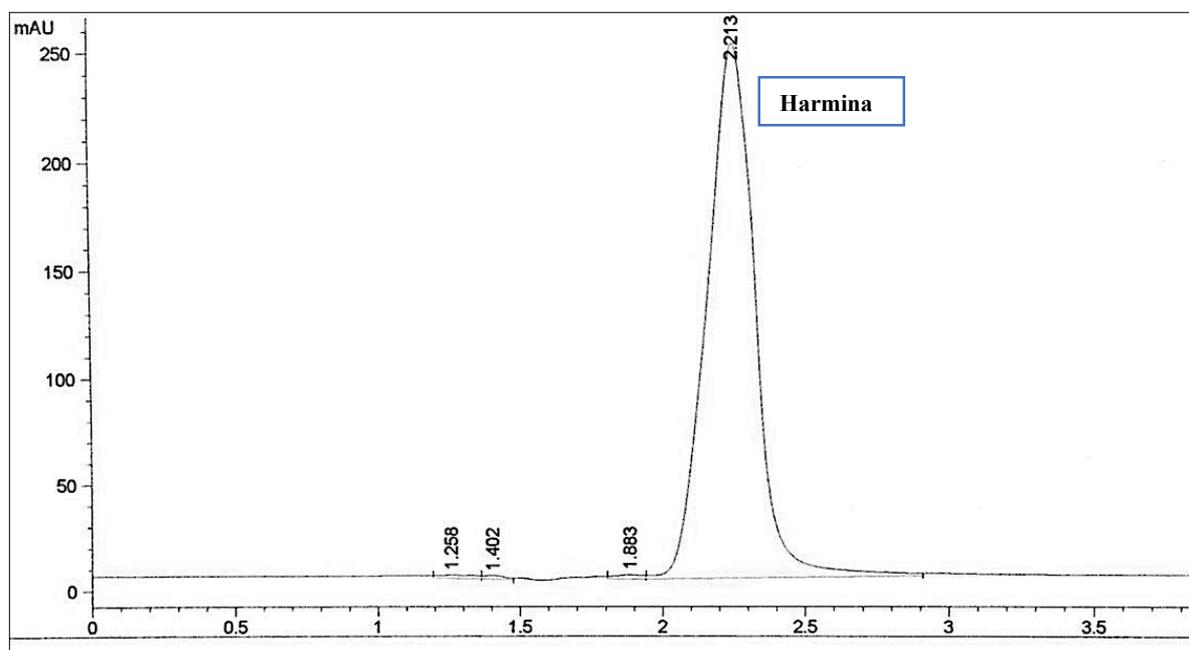
#### 4.6.1 Condiciones de trabajo cromatográficas

La separación se llevó a cabo en una columna de gel de sílice de fase invertida Kromaphase C18 con un poro de 0.5  $\mu\text{m}$ , cuyas dimensiones son 150 x 4.6 mm y un volumen de inyección de 0.5  $\mu\text{l}$ .

La fase móvil seleccionada después de diversos ensayos previos fue: agua (10%), metanol (70%), acetonitrilo (15%) y ácido acético (5%) a una temperatura de 25 °C y presión de 60 bar con una tasa de flujo de 1 ml/minuto, el detector empleado fue de UV/Visible a una longitud de onda de 241nm.

Bajo estas condiciones se obtuvo un pico bien definido de la harmina a 2.21 minutos, como se muestra en la *figura 15*.

**Figura 15.** Cromatograma de harmina, concentración 10 ppm,  $T_R$  2.21 minutos

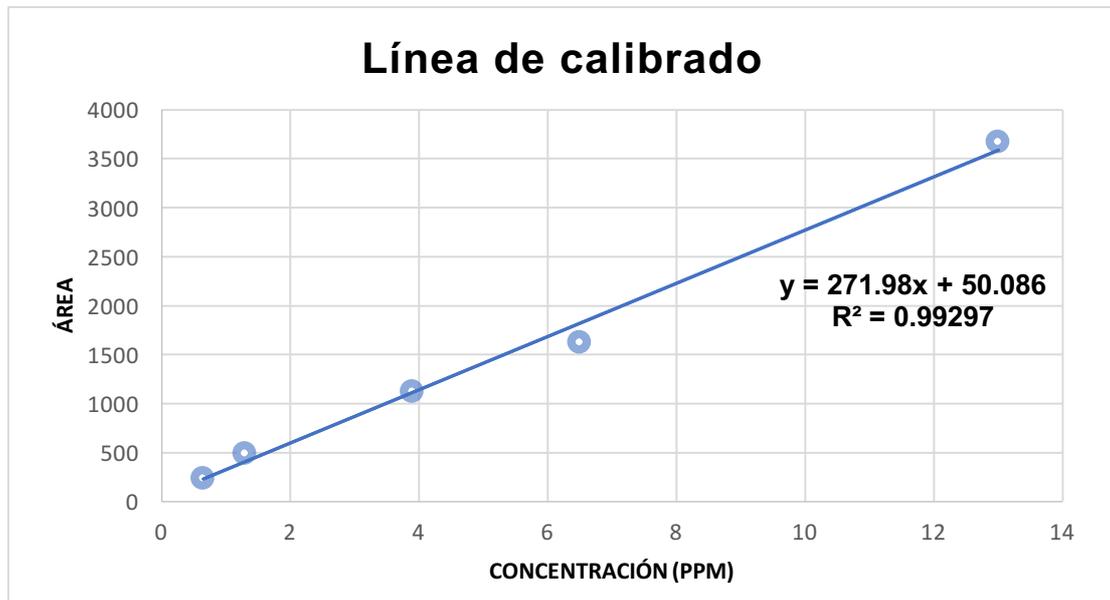


Se preparó una línea de calibrado con los patrones del compuesto que se reflejan en la *tabla 6*.

**Tabla 6.** Valores de área de la harmina y tiempos de retención a distintas concentraciones

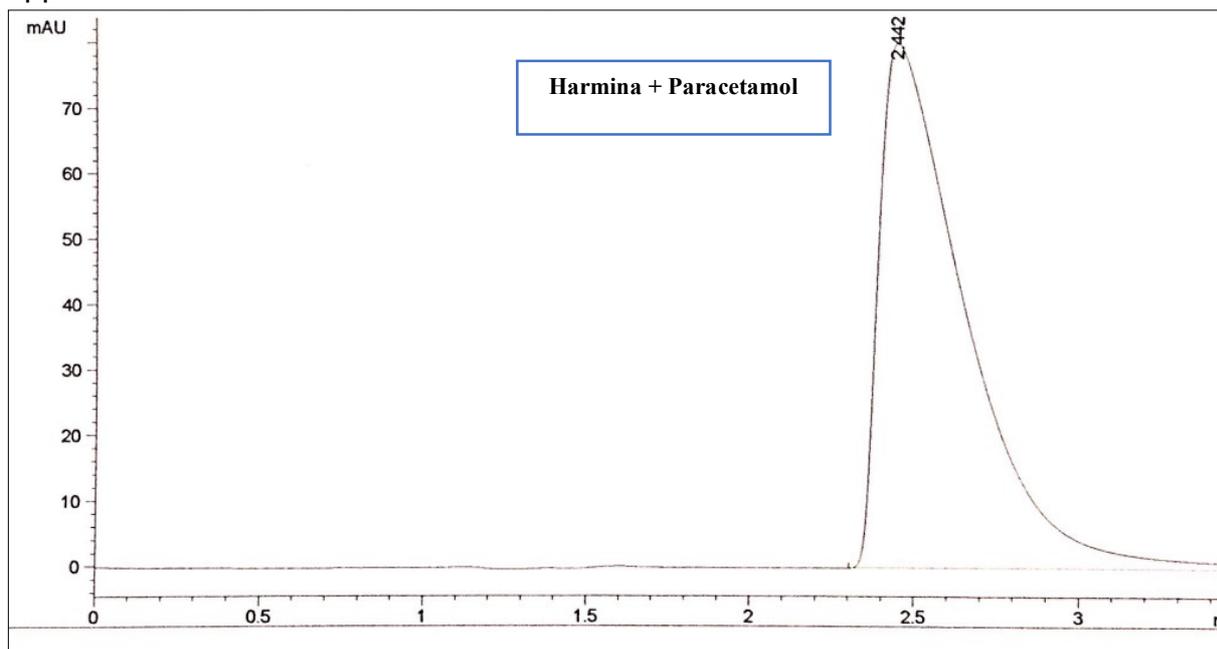
Concentración mg/L	Áreas	Tiempo de retención (minutos)
0.65	236.94	2.266
1.3	489.55	2.258
3.9	1125.42	2.244
6.5	1623.72	2.242
13	3669.41	2.239

**Figura 16.** Gráfico de línea de calibrado, áreas de pico de la harmina a distintas concentraciones.



A continuación se procede a realizar un estudio para la separación de la harmina en presencia de cafeína, ácido ascórbico, ácido salicílico, ácido acetilsalicílico, teobromina, teofilina, paracetamol e ibuprofeno, en primer lugar se realizó un estudio de forma individual para cada compuesto en las mismas condiciones con las que se realizó la determinación de la harmina, sin embargo los resultados no fueron satisfactorios, pues se origina un solapamiento en los tiempos de separación, como se puede apreciar en la *figura 17* tal es el caso de harmina en presencia de paracetamol.

**Figura 17.** Cromatograma de separación de la harmina 3.25 ppm y paracetamol 2.4 ppm.



Se procedió a realizar otras experiencias con diferentes fases móviles a fin de obtener la separación en modo isocrático, el mejor resultado se obtuvo con la siguiente fase: Agua (80%), acetonitrilo (15%) y ácido acético (5%). La *tabla 7* recoge los tiempos de retención obtenidos de manera individual para cada analito, como se puede observar, se produce un solapamiento completo entre paracetamol y teofilina y parcial con ibuprofeno.

**Tabla 7.** Tiempos de retención de los 6 compuestos estudiados individualmente, en modo isocrático.

Compuesto	Tiempo de retención
	( $T_R$ ) Minutos
Ácido ascórbico	1.37
Teobromina	2.07
Paracetamol	2.4
Teofilina	2.48
Ibuprofeno	2.8
Cafeína	3.69

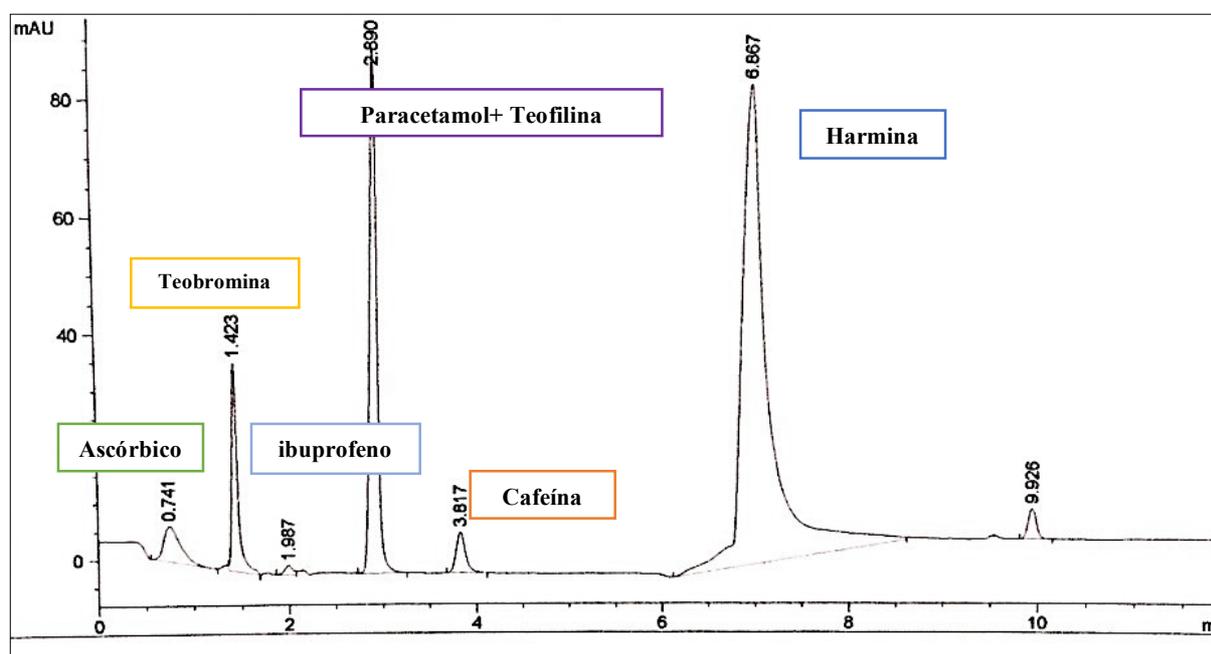
Dadas las dificultades para realizar la separación de forma isocrática, se procede a realizar un estudio en gradiente, después de diferentes experiencias, algunas se exponen en los anexos 8.1.2, se encontró que las condiciones idóneas para separar la mayor parte de ellos en presencia de harmina fueron las siguientes:

- Tiempo: Entre 0-5 minutos, fase móvil agua (80%) y acetonitrilo (20%)
- Tiempo: Entre 5-11 minutos, fase móvil agua (30%), acetonitrilo (60%) y ácido acético 0.1M (10%).

Para realizar el análisis de todos los compuestos se utilizó un patrón mixto en medio etanol, que contenía todos los analitos a una concentración del orden 2 ppm.

A continuación, se muestra en la *figura 18* el cromatograma obtenido, donde se puede apreciar perfectamente la separación de los distintos compuestos de la harmina a excepción del paracetamol de la teofilina en un tiempo no superior a 8 minutos.

**Figura 18.** Cromatograma separación e identificación de los compuestos en mezcla estándar a una concentración de 2 ppm.



Se puede observar un pico a un tiempo de retención de 9.92 minutos, el cual según nuestro estudio no correspondía a ninguno de los compuestos analizados, por lo que se asumió que posiblemente sea harmalol un compuesto derivado de una posible degradación de harmina

## **4.7 Estudio de la luminiscencia por espectroscopía de fluorescencia**

Como resultado de la revisión bibliográfica, se encontró que la harmina es un compuesto fluorescente por lo que su estudio por métodos espectrofluorimétricos se considera relevante. Para este estudio se utilizó el espectrofotómetro de fluorescencia marca HITACHI® F-3000.

### **4.7.1 Condiciones de trabajo**

Las condiciones óptimas en las que se llevó a cabo el análisis espectrofluorimétrico son:

Tamaño de rendija de excitación y emisión: 1.5 nm,

Medio de disolución: etanol

Lámpara: arco de xenón

Celdas: cuarzo de camino óptico 1cm.

Se efectuó un barrido entre 200nm y 800nm para obtener los espectros de excitación y de emisión del compuesto.

Se encontró que la longitud de onda de excitación de la harmina a la que el compuesto emite mayor fluorescencia corresponde a 322nm y la de emisión a 416nm, los correspondientes espectros se recogen en los anexos 8.2

### **4.7.2 Preparación de líneas de calibrado**

Para comprobar la viabilidad de la determinación cuantitativa directa mediante esta técnica, se efectuó una línea de calibrado con patrones de harmina entre 1-10 mg/L, el resultado obtenido mostró que a dichas concentraciones el comportamiento no se ajustaba a una línea recta lo que se puede justificar por procesos de desactivación por conversión externas. A la vista de los anteriores resultados se procedió a preparar los patrones en concentraciones entre 0.1 y 1.2 ppm.

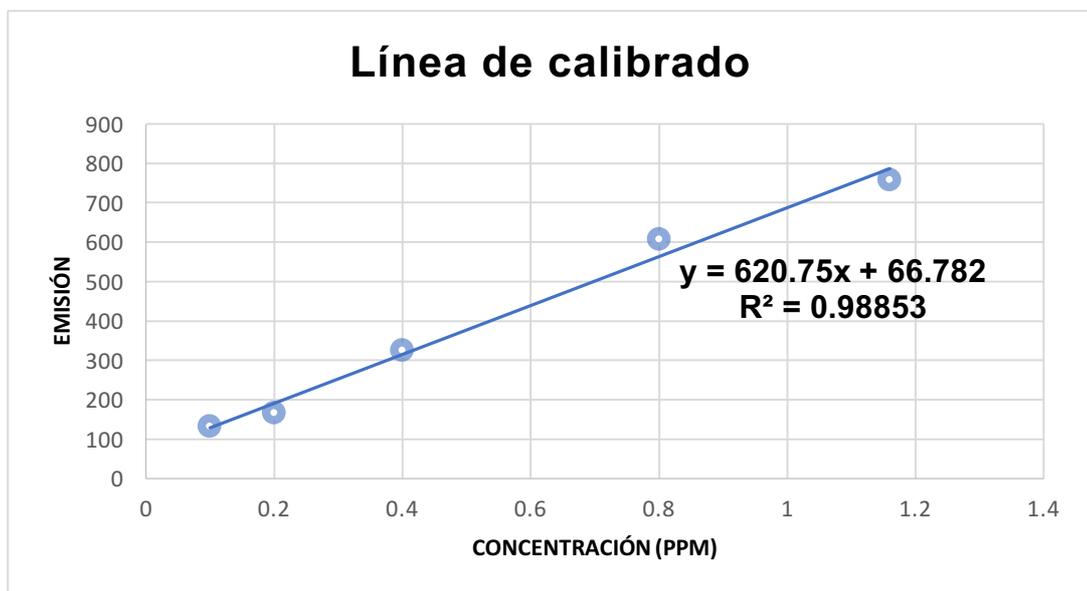
En la *figura 19*, se muestra la línea de calibrado obtenida para patrones de harmina en etanol, en intervalos de concentración señalados en la *tabla 8*. En experimentos previos se determinaron los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ),

siguiendo el criterio de la IUPAC, los cuales resultaron ser de 2 ppb y 7 ppb respectivamente.

**Tabla 8.** Valores de intensidad de la harmina a distintas concentraciones.

Concentración (mg/L)	Intensidad
0.1	130.9
0.2	165.3
0.4	323.9
0.8	607.1
1.16	757.9

**Figura 19.** Gráfico de línea de calibrado de la harmina en etanol por espectroscopía de fluorescencia.



## 4.8 Cromatografía líquida de alta eficacia con detector de fluorescencia (HPLC/FL)

Por sus propiedades luminiscentes se realizó un estudio breve de la harmina empleando la técnica de cromatografía de alta eficacia con detector de fluorescencia, para el cual se empleó el equipo de HPLC marca Agilent® 1100, utilizando una columna Kromaphase C18 con un poro de 0.5  $\mu\text{m}$ , con dimensiones 150 x 4.6 mm.

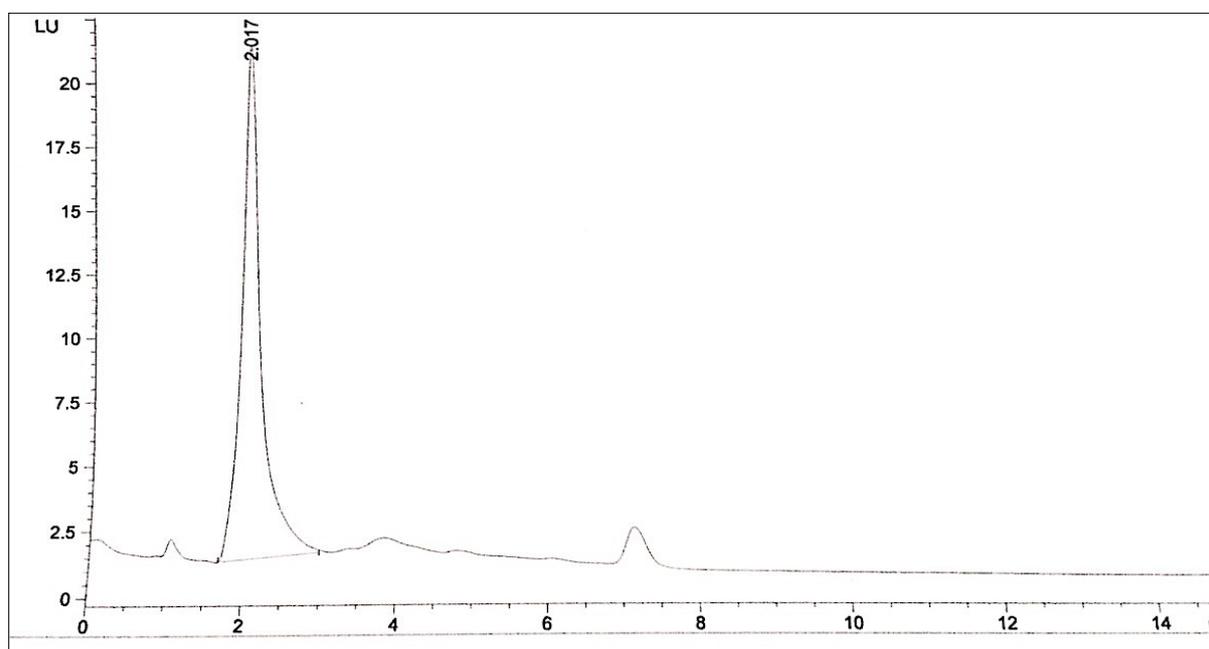
### 4.8.1 Condiciones cromatográficas

El estudio previo del compuesto mediante esta técnica se realizó empleando como fase móvil agua y metanol (30:70), se pretendía únicamente observar la capacidad de respuesta, con un flujo de 1.0 mL/minuto.

A una longitud de onda de excitación a 322 nm y de emisión a 416 nm.

Bajo estas condiciones se logró la separación de la harmina a un tiempo de retención de 2.017 minutos como se muestra en la *figura 20*.

**Figura 20.** Cromatograma de la harmina 24 ppb  $T_R$  2.017 minutos



#### 4.8.2 Análisis en conjunto con quinina

Se planteó la idea de elaborar un estudio conciso de harmina junto con la quinina, sustancia que también presenta propiedades farmacológicas y con fuentes naturales ubicadas en zonas geográficas próximas.

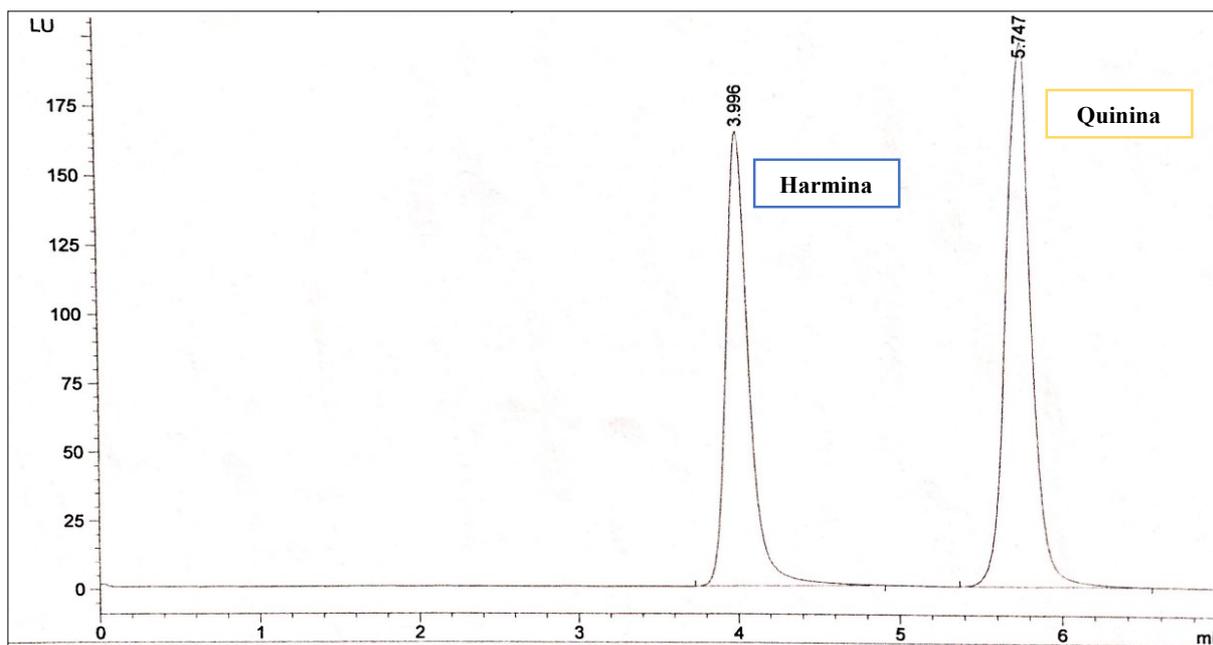
Para el análisis se prepararon diferentes disoluciones patrón de harmina y quinina en etanol del orden de las 0.2 ppm procediéndose a realizar el análisis por HPLC/FL en diferentes condiciones.

A continuación, se procede a inyectar un patrón conjunto en etanol de quinina y harmina, después de diferentes ensayos con respecto a longitud de onda óptima de absorción y emisión para ambos compuestos y de fases móviles de diferente composición, ver anexos 8.3, se logran separar los dos compuestos en las condiciones cromatográficas que se indican a continuación:

Fase móvil metanol, acetonitrilo y acetato de amonio 0.1M (45:15:40) a un flujo: 1mL/min. Longitudes de onda de excitación y de emisión seleccionadas fueron a 325nm y 375nm.

Se logra separar ambos compuestos empleando un tiempo de análisis no superior a 6 minutos, siendo 3.99 minutos el tiempo de retención de la harmina y 5.74 minutos el de la quinina, resultado que se aprecia en la figura 21.

**Figura 21.** Cromatograma de la separación e identificación de harmina y quinina.



## 4.9 Cromatografía de gases con detector de ionización de llama (CG-FID)

Se hizo un estudio de la harmina usando cromatografía de gases por su alta capacidad de separación y su sensibilización al analizar compuestos volátiles, no hemos encontrado estudios previos en la revisión bibliográfica que utilizara detector FID mediante esta técnica para la determinación de harmina.

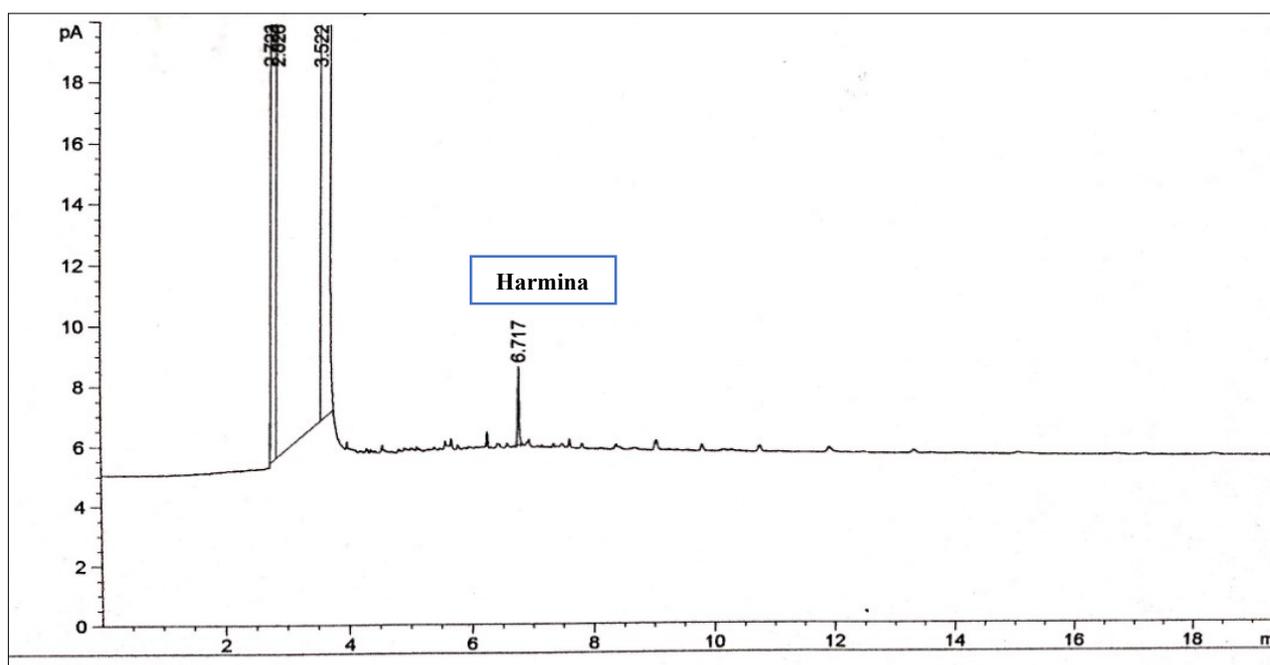
Como primera instancia se determinaron las condiciones cromatográficas de trabajo las cuales fueron:

- Temperatura del inyector: 220°C
- Temperatura del horno: inicial 150°C (durante 1 minuto) y rampa 295°C (durante 15 minutos)
- Temperatura del detector: 300°C
- Gases portadores: nitrógeno.

La columna utilizada para este estudio es de tipo capilar, La columna utilizada para este estudio es de tipo capilar, GC capillary colum BPx1.6mx 0.53mmx 2.650m.

Se prosiguió a realizar el análisis de la Harmina mediante este método, bajo estas condiciones, se obtuvo un pico bien definido a un tiempo de retención de 6.7 minutos.

**Figura 22.** Cromatograma de la Harmina de concentración 2 ppm  $T_R$  6.7 minutos

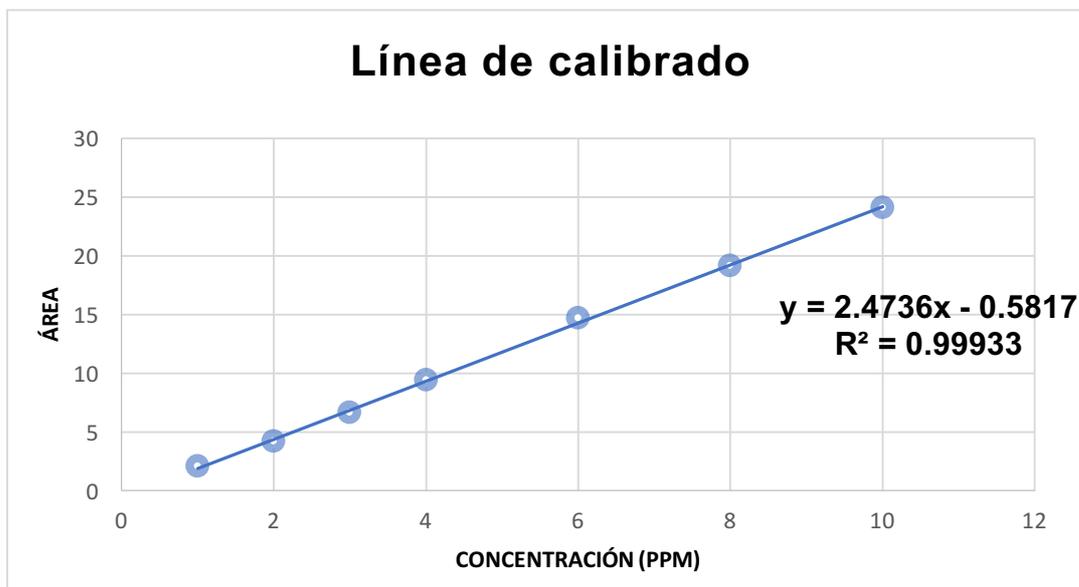


A continuación, se llevó la determinación de diferentes patrones de harmina entre 2 y 10 ppm para establecer la correspondiente línea de calibrado.

**Tabla 9.** Valores de área de la harmina a distintas concentraciones.

Concentración mg/L	Áreas de pico
1	2.048
2	4.173
3	6.625
4	9.364
6	14.634
8	19.121
10	24.065

**Figura 23.** Gráfico de línea de calibrado, áreas de pico a diferentes concentraciones de harmina.



Límite de detección 0.25 mg/L

De los resultados obtenidos se deduce la posibilidad de determinar harmina con alta precisión en el intervalo de medida seleccionado.

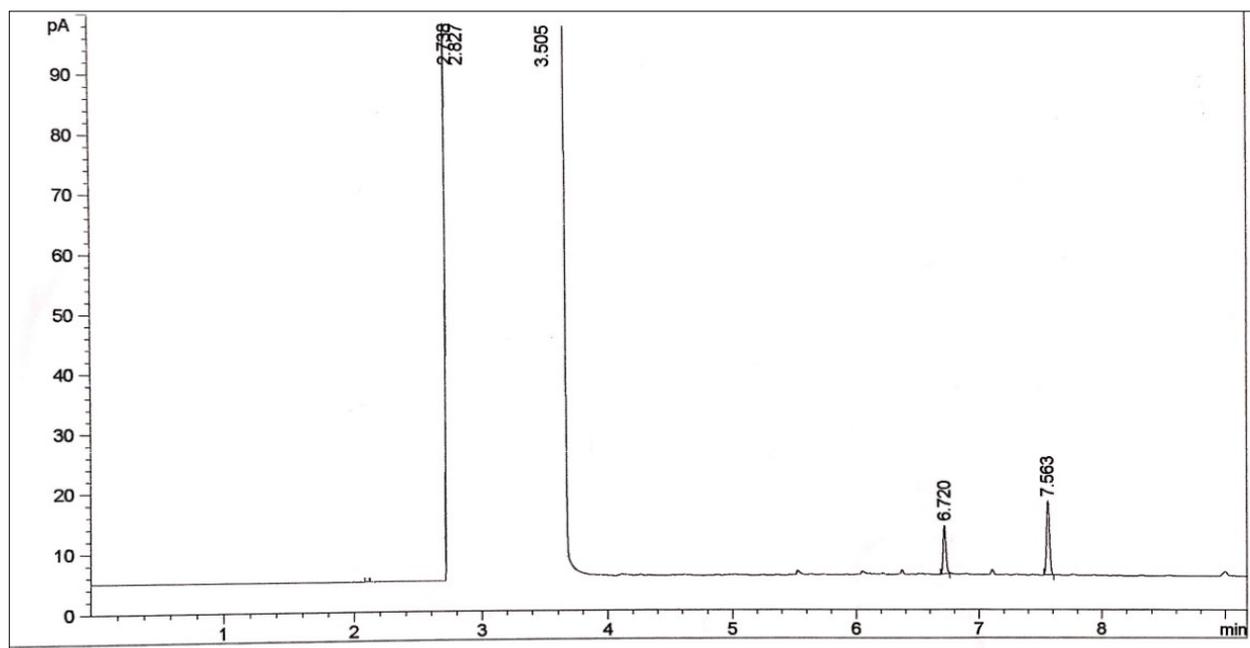
A continuación, se procedió a analizar el extracto de una muestra comercial de pasiflora adquirida en un herbolario en la forma indicada en el apartado 4.4.4

En las condiciones cromatográficas anteriormente mencionadas, no se obtuvo la banda de la harmina, sí aparecían otros picos en el intervalo de 20 minutos de duración del análisis, por lo que se deduce la poca presencia o inexistencia del compuesto en la muestra extraída de pasiflora, o bien un desplazamiento del pico.

No obstante, con el fin de comprobar si el procedimiento se podía ver afectado por alguno de los compuestos presentes en la muestra, la mayor parte de ellos desconocidos, vinculados a hojas y ramaje triturado, procedimos a diferentes adiciones de harmina de 10 ppm, sobre diferentes cantidades de dicha muestra, dejándolo secar y procediendo al cabo de 24 horas a su extracción por el método de Soxhlet con etanol y su posterior determinación por CG en las condiciones anteriormente indicadas.

El cromatograma que se muestra a continuación, en un tiempo de análisis de 10 minutos, refleja la aparición de dos picos uno de ellos correspondiente a la harmina a 6.720 minutos, que se incrementa en función de la cantidad de patrón añadido, y otro que también aparecía en el extracto original a 7.56 min.

**Figura 24.** Cromatograma de la determinación de harmina en muestra de pasiflora



#### 4.9.1 Experimentación con patrón mixto

Como en el caso de la determinación por HPLC, procedimos a realizar un estudio sobre la posibilidad de identificación de este compuesto en presencia de otros posibles componentes, relacionados con fármacos, ácido ascórbico, ácido acetilsalicílico, ácido salicílico, ibuprofeno y paracetamol o presentes en productos utilizados en infusiones, cafeína, teofilina y teobromina

Se realizaron análisis independientes de cada compuesto con patrones de concentración del orden de 2-10 ppm, bajo las condiciones de trabajo seleccionadas para la harmina, anexos 8.4.

A continuación, se muestra la *tabla 10* que recoge los tiempos de retención obtenidos para cada compuesto.

**Tabla 10.** Tiempos de retención de analitos.

Compuesto	Tiempo de retención ( $T_R$ ) minutos
Ácido ascórbico	No da respuesta
Ácido acetilsalicílico	No da respuesta
Ácido salicílico	No da respuesta
Ibuprofeno	4.62
Paracetamol	4.85
Cafeína	5.38
Teobromina	5.44
Teofilina	5.74

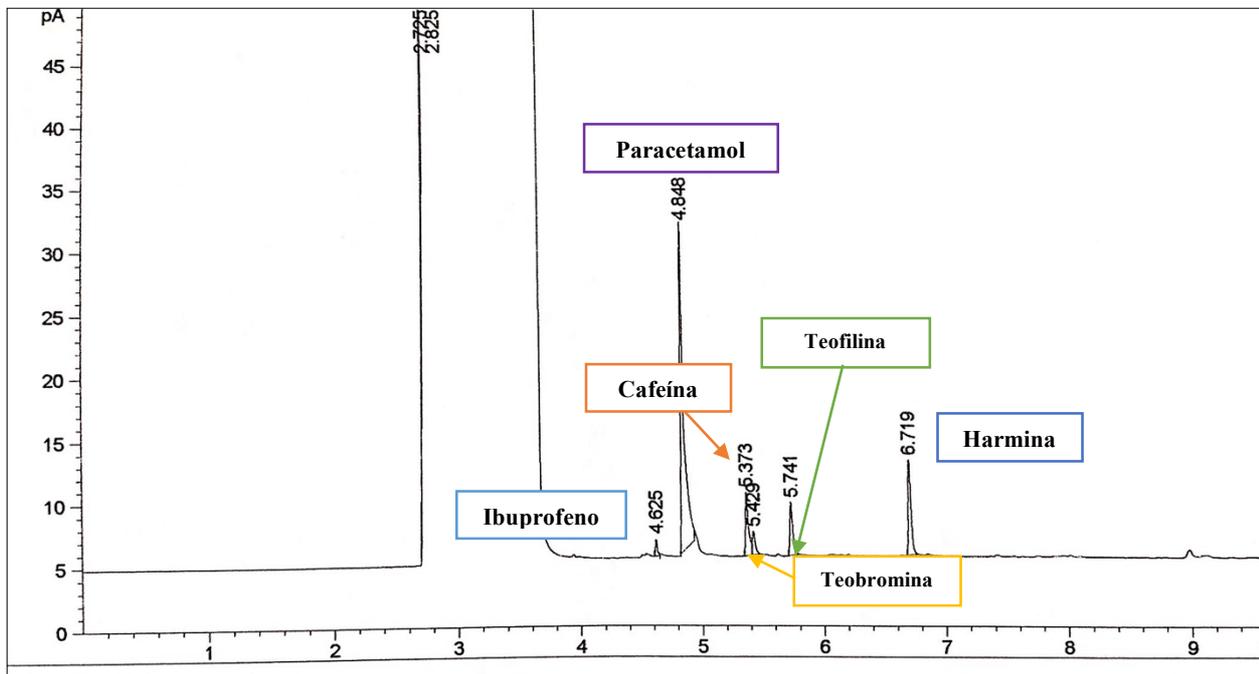
Se observó que, en los análisis individuales, el ácido ascórbico, ácido acetilsalicílico y ácido salicílico no dan respuesta, esto posiblemente se deba a que la generación de iones de estos compuestos haya sido poca o prácticamente ninguna por lo tanto no pudo ser percibida por el detector de ionización de llama (FID).

Además, con los resultados obtenidos se puede predecir un posible solapamiento de los picos que corresponden a la cafeína y teobromina al formar parte de una misma muestra.

El análisis en conjunto de todos los compuestos incluyendo harmina se llevó a cabo a través del patrón mixto preparado anteriormente en el cual se excluyó al ácido ascórbico, acetilsalicílico y salicílico por su falta de respuesta.

La separación de cada uno de los compuestos se observa en la *figura 25*.

**Figura 25.** Cromatograma separación e identificación de los compuestos de mezcla estándar a una concentración de 2 ppm.



## V. Conclusiones

Partiendo de los resultados obtenidos en este trabajo se concluye que,

- Se ha puesto a punto dos métodos para la determinación de harmina mediante cromatografía de HPLC con detector UV/VIS y CG con detector de ionización de llama (FID), con un límite de detección de 0.08 y 0.25 ppm respectivamente.
- A través del empleo de estos métodos se ha logrado la separación de la harmina en presencia de diferentes compuestos de posible presencia en medicamentos o en muestras de parafarmacias en tiempos de análisis no superiores a 10 minutos.
- Se inició un estudio para la determinación de harmina mediante HPLC con detector fluorescente dada las propiedades luminiscentes de este compuesto, de las experiencias realizadas se puede deducir sus posibilidades de determinación frente a otros compuestos de parecidas características como es el caso de la quinina.

## VI. Referencias Bibliográficas

- (1) Kakhia, T. I. *Alkaloids & Alkaloids plants*; 2003.
- (2) Bouayad, N.; Rharrabe, K.; Lamhamdi, M.; Nourouti, N. G.; Sayah, F. *Saudi J. Biol. Sci.* **2012**, *19* (1), 73–80.
- (3) Cao, R.; Peng, W.; Wang, Z.; Xu, A. *Curr. Med. Chem.* **2007**, *14* (4), 479–500.
- (4) Frison, G.; Favretto, D.; Zancanaro, F.; Fazzin, G.; Ferrara, S. D. *A case of  $\beta$ -carboline alkaloid intoxication following ingestion of Peganum harmala seed extract*; 2008; Vol. 179.
- (5) Grice, I. D.; Ferreira, L. A.; Griffiths, L. R. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2001**, *24* (16), 2513–2523.
- (6) Herraiz, T.; González, D.; Ancín-Azpilicueta, C.; Arán, V. J.; Guillén, H. *Food Chem. Toxicol.* **2010**, *48* (3), 839–845.
- (7) Gable, R. S. *Addiction*. 2007, pp 24–34.
- (8) Patel, K.; Gadewar, M.; Tripathi, R.; Prasad, S. K.; Patel, D. K. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* **2012**, *2* (8), 660–664.
- (9) Sasse, F.; Hammer, J.; Berlin, J. *J. Chromatogr. A* **1980**, *194* (2), 234–238.
- (10) Bairi Raju, C. Vijaya, a. R. *Int. J. Phytopharm.* **2011**, *2* (July 2008), 1–6.
- (11) Patel, S.; Mohamed Saleem, T.; Ravi, V.; Shrestha, B.; Verma, N.; Gauthaman, K. *Int. J. Green Pharm.* **2009**, *3* (4), 277.
- (12) dos Santos, R. G.; Hallak, J. E. C. *J. Psychoactive Drugs* **2016**, *49* (1), 1–10.
- (13) Zhang, L.; Teng, L.; Gong, C.; Liu, W.; Cheng, X.; Gu, S.; Deng, Z.; Wang, Z.; Wang, C. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2013**, *85*, 162–168.
- (14) Osório, F. D. L.; Ribeiro, L.; Macedo, H. De; Quevedo, J.; Alexandre, J.; Crippa, D. S. *Ethnopharmacol. Ayahuasca* **2011**, *661* (2), 75–85.
- (15) Heshmati, P.; Nasehi, M.; Zarrindast, M. R. **2014**, *5* (1), 99–104.
- (16) Shi, C. C.; Liao, J. F.; Chen, C. F. *Pharmacol. Toxicol.* **2001**, *89* (5), 259–264.
- (17) Waki, H.; Park, K. W.; Mitro, N.; Pei, L.; Damoiseaux, R.; Wilpitz, D. C.; Reue, K.; Saez, E.; Tontonoz, P. *Cell Metab.* **2007**, *5* (5), 357–370.
- (18) Du, H.; Tian, S.; Chen, J.; Gu, H.; Li, N.; Wang, J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2016**, *26* (16), 4015–4019.
- (19) Escobar Cornejo, G. S. *Liberabit*; Universidad de San Martín de Porres, Lima, 2015; Vol. 21.
- (20) Riba, J.; Rodríguez-Fornells, A.; Urbano, G.; Morte, A.; Antonijoan, R.;

- Montero, M.; Callaway, J. C.; Barbanoj, M. J. *Psychopharmacology (Berl)*. **2001**, *154* (1), 85–95.
- (21) Sharma, S.; Yadav, M.; Gupta, S. P.; Pandav, K.; Kumar, S. *Chem. Biol. Interact.* **2016**, *260*, 256–262.
- (22) Kartal, M.; Altun, M. .; Kurucu, S. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2003**, *31* (2), 263–269.
- (23) Stanković, D.; Mehmeti, E.; Svorc, L.; Kalcher, K. *Microchem. J.* **2015**, *118*, 95–100.
- (24) Cepas, J.; Silva, M.; Prez-bendito, D. *J. Chromatogr.* **1996**, *749*, 73–80.
- (25) Grice, I. D.; Ferreira, L. A.; Griffiths, L. R. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2001**, *24* (16), 2513–2523.
- (26) Kikura-Hanajiri, R.; Hayashi, M.; Saisho, K.; Goda, Y. En *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*; 2005; Vol. 825, pp 29–37.
- (27) Zheng, W.; Wang, S.; Barnes, L. F.; Guan, Y.; Louis, E. D. *Anal. Biochem.* **2000**, *279* (2), 125–129.
- (28) National Center for Biotechnology information. Ascorbic Acid  
[https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/ascorbic\\_acid#section=Top](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/ascorbic_acid#section=Top)  
(accessed may 14, 2017).
- (29) National Center for Biotechnology information. Aspirin  
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2244#section=Top> (accessed may 14, 2017).
- (30) National Center for Biotechnology information. Salicylic acid  
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/338#section=Top> (accessed may 14, 2017).
- (31) National Center for Biotechnology information. Caffeine  
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2519> (accessed may 14, 2017).
- (32) National Center for Biotechnology information. Ibuprofeno  
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3672> (accessed may 14, 2017).
- (33) National Center for Biotechnology information. Acetaminophen  
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1983> (accessed may 14, 2017).
- (34) National Center for Biotechnology information. Theobromine  
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5429> (accessed may 14, 2017).
- (35) National Center for Biotechnology information. Theophylline

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3055767#section=Top> (accessed may 14, 2017).

- (36) Reyes, A. B. G.; De La Torre, A. H.; Fernández, Á. J. G.; Armendáriz, C. R.; Tejera, I. F.; Gironés, C. R. *Nutr. Hosp.* **2015**, 32 (6), 2880–2886.
- (37) Muy, R.; Tandazo, L. *El Escorial* **2012**, 34,56.

FIGURA	TÍTULO
1	Estructura de la harmina tomada de www.chemspider.com
2	Estructura del ácido ascórbico tomada de www.chemspider.com
3	Estructura del ácido acetilsalicílico tomada de www.chemspider.com
4	Estructura del ácido salicílico tomada de www.chemspider.com
5	Estructura de la cafeína tomada de www.chemspider.com
6	Estructura del ibuprofeno tomada de www.chemspider.com
7	Estructura del paracetamol tomada de www.chemspider.com
8	Estructura de la teobromina tomada de www.chemspider.com
9	Estructura de la teofilina tomada de www.chemspider.com
10	Estructura de la quinina tomada de www.chemspider.com
11	Montaje de equipo de extracción Soxhlet
12	Espectro de absorción UV-Visible de la Harmina, concentración 8.12ppm
13	Gráfico de línea de calibrado, valores de absorbancia de la harmina a una longitud de onda de 241 nm.
14	Gráfico de línea de calibrado, valores de absorbancia de la harmina a una longitud de onda de 321 nm.
15	Cromatograma de harmina 10 ppm, $T_R$ 2.21 minutos
16	Gráfico de línea de calibrado, áreas de pico de la harmina a distintas concentraciones.
17	Cromatograma de separación de la harmina 3.25 ppm y paracetamol 2.4 ppm
18	Cromatograma separación e identificación de los compuestos en mezcla estándar a una concentración de 2 ppm.
19	Gráfico de línea de calibrado de la harmina en etanol por espectroscopía de fluorescencia.
20	Cromatograma de la harmina 24 ppb $T_R$ 2.017 minutos
21	Cromatograma de la separación e identificación de harmina y quinina.
22	Cromatograma de la Harmina de concentración 2 ppm $T_R$ 6.7 minutos

<b>23</b>	Gráfico de línea de calibrado, áreas de pico a diferentes concentraciones de harmina.
<b>24</b>	Cromatograma de la determinación de harmina en muestra de pasiflora.
<b>25</b>	Cromatograma separación e identificación de los compuestos de mezcla estándar a una concentración de 2 ppm.

## **VII. Lista de tablas y figuras**

### **7.1 Lista de tablas**

<b>TABLA</b>	<b>TÍTULO</b>
<b>1</b>	Propiedades farmacológicas de la harmina
<b>2</b>	Recopilación de métodos analíticos para el estudio de la determinación de harmina.
<b>3</b>	Pesos y concentración de diferentes compuestos para la preparación de soluciones patrón.
<b>4</b>	Valores de absorbancia a 241 y 301 nm.
<b>5</b>	Porcentajes en ensayos previos de eluyentes de la fase móvil
<b>6</b>	Valores de área de la harmina y tiempos de retención a distintas concentraciones
<b>7</b>	Tiempos de retención de los 6 compuestos estudiados individualmente, en modo isocrático utilizando HPLC.
<b>8</b>	Valores de área de harmina y tiempos de retención a distintas concentraciones.
<b>9</b>	Valores de área de la harmina a distintas concentraciones.
<b>10</b>	Tiempos de retención de analitos, utilizando CG-FID

### **7.2 Lista de figuras**

## **VIII. ANEXOS**

### **8.1 Cromatografía líquida de alta eficacia con detector UV/VIS (HPLC-UV/VIS)**

### **8.1.1 Cromatogramas, estudios de harmina a distintas fases móviles**

## **8.1.2 Cromatogramas, estudios de los diferentes compuestos en modo gradiente**

## **8.2 Espectroscopía de fluorescencia**

### **8.3 Cromatografía líquida de alta eficacia con detector de fluorescencia (HPLC-FL)**

## **8.4 Cromatografía de gases con detector de ionización de llama (FID)**