

Contribución al estudio fitoquímico de algunas especies de coca cultivadas en Colombia

AHMED M. SALAMA*
JORGE ENRIQUE CALDERÓN S.
NANCY BEATRIZ SÁNCHEZ M.

RESUMEN

Se realizó un análisis químico, y se determinó el contenido de alcaloides por medio de cromatografía en capa delgada y titulación colorimétrica del extracto alcohólico de cinco plantas del género *Erythroxylum*, de los cuales la cocaína y cinamilcocaína fueron aisladas e identificadas por métodos espectroscópicos.

SUMMARY

In the present investigation chemical analysis was carried out for 5 plants of the genus *Erythroxylum*. Some alkaloids were identified using thin layer chromatography. Cocaine and cinnamyl cocaine were isolated and identified using spectroscopic methods.

INTRODUCCION

Los estudios fitoquímicos efectuados en diversas especies del género *Erythroxylum* dan como resultado la presencia de una serie de alcaloides como: cocaína, cinamilcocaína, - y β -truxilina, tropacocaína, benzoil ecgonina, y β -higrina, cuscohigrina (1,2) y otras sustancias como los ácidos, β , y -truxílico y los ésteres del ácido L-norecgonina, mono-, sesqui-, di- y triterpenos (3,4,5), taninos (1,2,6), azúcares (1,7), aceites esenciales (8), minerales (6,9), vitaminas (8,9), ácidos grasos, ceras y derivados del fenilpropano (2).

* Universidad Nacional, Facultad de Ciencia, Departamento de Farmacia, Santafé de Bogotá, Colombia.

PARTE EXPERIMENTAL

Materiales y métodos

Espectros IR: Fueron registrados en película, usando un espectrofotómetro de infrarrojo Perkin Elmer Modelo 467.

Espectros de masas: Fueron registrados en un espectrómetro de alta resolución Jeal JMS-01SG-2, con un sistema de inyección directa.

Espectros RMN-¹H: Se determinaron en un espectrómetro Perkin Elmer Modelo R12A a 60 MHz en Cloroformo deuterado.

Materia vegetal

El material objeto de este estudio se recolectó en cercanías de San José de Guaviare y en la Sierra Nevada de Santa Marta y fue determinada por el Doctor Jesús M. Hidrobo, en el Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia como: *Erythroxylum amazonicum*, *E. novogranatense* var. *novogranatense*, *E. Coca* var. *coca* "Pajarita", *E. coca* var. *ipadú* "Amarga" y *E. coca* var. *coca* "Peruana".

Una parte de las hojas frescas de cada planta fue conservada en una solución de formol al 10% en etanol al 50% con el fin de realizar posteriormente su examen histológico, mientras que el resto del material vegetal fue secado a temperatura de 50°C en una estufa de aire circulante. Luego fue molido y almacenado en recipientes adecuados para su posterior utilización en el estudio fitoquímico. Se tuvieron las precauciones necesarias para evitar la mezcla de las muestras.

ESTUDIO FITOQUIMICO

Análisis preliminar

50 gramos del material vegetal pulverizado de cada muestra fueron sometidos a un estudio preliminar por el método descrito en las notas de análisis fitoquímico (10).

Determinación cuantitativa de alcaloides totales

10 gramos de cada muestra de material vegetal pulverizado se humedecieron con una mezcla de 8 ml. de NH_4OH , 10 ml. de etanol y 20 ml. de éter etílico y se dejó en maceración durante 24 horas. Luego se procedió a extraer con éter etílico en un Soxhlet hasta prueba negativa para alcaloides efectuada con el reactivo de Dragendorff. Se transfirió el extracto etéreo a un embudo de separación y se extrajeron los alcaloides con varios volúmenes de 20 ml. de H_2SO_4 0.5N hasta prueba negativa para alcaloides. Los extractos ácidos fueron reunidos y filtrados con el fin de eliminar clorofilas y residuos no alcaloidales insolubles en ácido. Luego se lavaron con 10 ml. de éter para quitar el resto de las clorofilas y otras sustancias de naturaleza no alcaloidal. La solución ácida se alcalinizó con NH_4OH al 25% hasta pH: 11 y se extrajo con varios volúmenes de 20 ml. de cloroformo hasta prueba negativa para alcaloides. Los extractos clorofórmicos reunidos se lavaron con 2 volúmenes de 20 ml. de agua, el cloroformo se evaporó al vacío y el residuo se transfirió empleando pequeños volúmenes de H_2SO_4 0.02N, previamente valorado, a un balón aforado de 25 ml. Y se completó a volumen; alicuotas de 5 ml. fueron tituladas por retrovaloración con una solución de NaOH 0.02N previamente estandarizada en presencia de rojo de metilo como indicador. El viraje de rojo a amarillo indica el punto final de la valoración. Del volumen de NaOH gastado en la retrovaloración se deduce el contenido de alcaloides totales presentes en las hojas de cada muestra analizada equivalente a cocaína base por medio de la siguiente ecuación:

$$A = \frac{(N \text{ ácido} \times V \text{ ácido}) - (N \text{ base} \times V \text{ base}) \times F \times 25 \times 100}{P \times 5}$$

A = % de alcaloides totales expresados como cocaína

N ácido = Normalidad del ácido sulfúrico

V ácido = Volumen en ml. de H_2SO_4

N base = Normalidad de NaOH

V base = Volumen en ml. de NaOH consumido

F = Factor de conversión 303.35 mg./miliequivalente de cocaína

P = Peso del Material vegetal seco en mg.

El análisis fue realizado por duplicado y los resultados en cada caso son el promedio de las dos valoraciones.

DETECCION Y AISLAMIENTO DE ALGUNOS ALCALOIDES POR CROMATOGRAFIA EN CAPA DELGADA

Detección de cocaína y tropacocaína

Siguiendo el método de extracción y purificación de los alcaloides totales anteriormente mencionados, se tomaron 10 gm. de cada muestra y se sometieron a extracción. El contenido

de los dos alcaloides en cada capa clorofórmica (forma de base) se analizó por cromatografía en capa delgada en sílica gel G60 de 0.25 mm. de espesor, contra muestras de los patrones de cocaína y tropococaína (únicos disponibles). Las cromatografías se desarrollaron en ciclohexano: dietilamina (10:1, 5 recorridos) que mostró la mejor separación de alcaloides. Los solventes fueron evaporados totalmente de las placas, y fueron reveladas con el reactivo de Dragendorff modificado. Los valores de R_f de las manchas se compararon con las de los patrones, además se observó el cambio de color de las mismas con el tiempo.

Aislamiento de cocaína y cinamilcocaína

Debido a que se observó en todas las muestras estudiadas excepto en las hojas de *E. amazonicum* la aparición de dos manchas intensas con mayores R_f (0.78, 0.70) en el sistema ciclohexano:dietilamina (10:1, 4 recorridos), la sustancia menos polar de ellas con R_f 0.78 y un color anaranjado con el reactivo de Dragendorff es idéntica al patrón de cocaína. Para la identificación de ambos compuestos se decidió obtenerlos en forma pura por medio de cromatografía en capa delgada preparativa e identificarlos plenamente por métodos espectroscópicos, siguiendo el método de extracción y purificación empleado en la determinación de los alcaloides totales.

El residuo de la capa clorofórmica se aplicó en placas de sílica gel G254 de 0.5 mm. de espesor. Los cromatogramas se desarrollaron en ciclohexano:dietilamina (10:1, 5 recorridos). Se evaporaron los solventes y los cromatogramas se observaron al UV para detectar la aparición de bandas de alcaloides separados. Se marcaron las dos bandas que presentaron mayor intensidad en la cromatografía en capa delgada, las dos bandas se rasparon por aparte de una forma cuidadosa y se realizaron varias extracciones con cloroformo, se filtró y evaporó al vacío el solvente. El residuo obtenido de cada banda fue analizado contra patrones de cocaína y tropacocaína por cromatografía en capa delgada en sílica gel G60 de 0.25 mm. de espesor, desarrollando los cromatogramas en ciclohexano:dietilamina (10:1, 5 recorridos) y revelando con el reactivo de Dragendorff modificado.

Identificación de cocaína

R_f 0.78, ciclohexano:dietilamina (10:1, 5 recorridos).

Espectro IR ν_{max} (película): 3090, 3075, 3030 (C-H, estiramiento aromático), 1618, 1595, 1497, 1482 (C=C, estiramiento aromático), 778, 715 (C-H, deformaciones de anillo aromático monosustituído), 1750, 1232 (grupo carbonilo de $-\text{COOCH}_3$), 1720, 1280 (grupo carbonilo de $\text{OCO}-\text{C}_6\text{H}_5$) cm^{-1} .

Espectro EM, m/z (Int. relativa %): M^+ , 15.7), 288 (M^+ - CH_3 , 3.3), 272 (M^+ - OCH_3 , 6.2), 182 (M^+ - $OCO-C_6H_5$, 55.1), 168 (13.2), 122 (33.2), 105 (47.8), 82 (100.0).

Identificación de cinamilcocaína

Rf 0.70 ciclohexano:dietilamina (10:1, 5 recorridos).

Espectro IR ν_{max} . (película): 3105, 3095, 3080, 3030 (C-H, estiramiento aromático y alqueno), 1755 (grupo carbonilo $-COOCH_3$), 1715 (grupo carbonilo de $-OCO-CH=CH-C_6H_5$), 1640 (C=C estiramiento) 1605, 1580, 1495, 1475 (C=C estiramiento aromático), 770 ($-CH=CH$ -cis, deformación) cm^{-1} .

Espectro RMN¹H (CDCl₃, 60 MHz): 7.83 (1H, d, j=7Hz), 7.56 (1H, d, j=7Hz), 7.35 (s), 3.82 (s), 3.80 (t), 2.30 (s), 1.35 (s).

Espectro EM, m/z (Int. relativa %): 329 (M^+ , 3.5), 314 (M^+ - CH_3 , 1.3), 298 (M^+ - OCH_3 , 3.4), 238 (M^+ - $C_6H_5-CH_2$, 9.7), 182 (M^+ - $OCO-CH=CH-C_6H_5$, 57.6), 168 (11.4), 147 (6.3), 131 (25.5), 96 (52.8), 94 (24.0), 83 (62.2), 82 (100.0).

RESULTADOS Y DISCUSION

E STUDIO FITOQUÍMICO

Análisis preliminar

Los resultados del análisis químico preliminar demostraron la presencia de alcaloides en todas las hojas estudiadas a excepción del *E. amazonicum*. Además se encontró en todas las hojas taninos, compuestos terpénicos y esteroides. Los flavonoides mostraron su presencia en todas excepto *E. coca* var. *coca*, "pajarita". En *E. coca* var. *ipadú* y *E. coca* var. *coca* peruana se detectaron sesquiterpenlactonas.

Análisis cuantitativo y detección de alcaloides

La determinación cuantitativa de los alcaloides totales calculados como cocaína fue realizada siguiendo al procedimiento descrito en la parte experimental. De acuerdo con los resultados obtenidos *E. novogranatense* var. *novogranatense* contiene el más alto porcentaje (1.60%) seguido por *E. coca* var. *coca* "pajarita" (0.70%), *E. coca* var. *ipadú* (0.59%) y *E. coca* var. *coca* peruana (0.54%). En *E. amazonicum* no se encontraron alcaloides. Los resultados del presente trabajo están de acuerdo y/o se encuentran dentro del límite reportado para el contenido de los alcaloides en estas plantas (6, 11, 12 y 13).

Al comparar cromatográficamente los extractos con los patrones cocaína y tropococaína en el sistema ciclohexano:dietilamina (10:1, 5 recorridos) y revelando con

dragendorff modificado, se observó la presencia de cocaína Rf 0.78 y cinamilcocaína Rf 0.70, que fueron aislados e identificados posteriormente, ambas las únicos que se encuentran en un alto porcentaje en todas las plantas estudiadas, excepto *E. amazonicum*. Además se detectó la presencia de tropococaína Rf 0.74, en las mismas plantas, en un mínimo porcentaje.

Aislamiento e identificación de alcaloides

Con el fin de identificar plenamente los dos alcaloides que se presentan en mayor porcentaje, se procedió a aislarlos empleando cromatografía en capa delgada preparativa en ciclohexano: dietilamina (10:1, 5 recorridos) y observando a la luz ultravioleta para detectar las bandas. La pureza de los alcaloides aislados se confirmó por cromatografía en capa delgada utilizando al mismo sistema de disolvente mencionado anteriormente.

Identificación de cocaína

El primer alcaloide aislado tiene un Rf y color idénticos a los de la cocaína. El espectro de infrarrojo muestra bandas a 3090, 3075 y 3030 cm^{-1} para C-H estiramiento aromático y dos bandas a 778 y 715 cm^{-1} para un anillo aromático monosustituido. Además muestra bandas a 1750 y 1232 cm^{-1} para un grupo carbonilo de un ester alifático ($-COOCH_3$) y a 1720 y 1200 cm^{-1} para otro grupo carbonilo de un ester aromático ($-COOC_6H_5$). El espectro de masas muestra el pico de M^+ a m/z 303 para $C_{17}H_{21}O_4N$ y otros picos significativos a m/z 288 (M^+ - OCH_3), 182 (M^+ - $COOC_6H_5$), 168, 105 y 82.

Con base en los anteriores datos y en que los espectros de IR y EM son idénticos a los espectros tomados a una muestra patrón de cocaína y con los datos espectroscópicos reportados para una muestra auténtica (14), el alcaloide aislado se identificó como cocaína encontrando que se presenta como uno de los dos alcaloides de mayor concentración en las hojas examinadas de *E. novogranatense* var. *novogranatense*, *E. coca* var. *coca* "pajarita", *E. coca* var. *ipadú* y *E. coca* var. *coca* peruana.

Identificación de cinamilcocaína

El segundo compuesto aislado por cromatografía en capa delgada preparativa tiene un Rf de 0.70 (ciclohexano:dietilamina, 10:1, 4 recorridos) siendo más polar que la cocaína (Rf 0.78) y tropococaína (Rf 0.74). El compuesto da prueba positiva para alcaloides con el reactivo de Dragendorff. El espectro de masas de alta resolución presenta el pico del ión molecular a m/z 329 que sugiere una fórmula química de $C_{19}H_{23}O_4N$, indicando que el compuesto se trata de un alcaloide con únicamente un átomo de nitrógeno. El espectro de IR muestra bandas a 3105, 3095, 3080 y 3030 cm^{-1} para C-H estiramiento aromático y bandas a 1605, 1580, 1495 y 1475

cm⁻¹ para C=C estiramiento aromático, lo cual se confirma con una señal singlete a 7.35 para protones aromáticos en el espectro de RMN-H y en el pico a m/z 238 y 131 en el espectro de masas. El espectro IR muestra unas bandas a 1640 y 770 cm⁻¹ para -CH=CH-cis que se confirma por dos señales doblete a 7.83 y 7.56 ppm para dos protones con una constante de acoplamiento de 7Hz en el espectro de RMN y por los picos de m/z 182, 168 y 131 en el espectro de masas, indicando que el alcaloide es un ester del ácido cinámico. Esto puede confirmarse por la presencia de una banda en el espectro de IR a 1715 cm⁻¹ para un grupo carbonilo de un ester aromático (OCO-CH=CH-C₆H₅) y el pico de m/z 131 en el espectro de masas. Además, el espectro de IR muestra una banda a 1755 cm⁻¹ para otro grupo carbonilo de un ester alifático (-COOCH₃) que puede confirmarse por los picos a m/z 298 y 108 en el espectro de masas y una señal singlete a 3.82 para 3 protones de un grupo metoxi. También el espectro de masas muestra un pico a m/z 314 por pérdida de un grupo metilo, un pico a m/z 298 por la pérdida de -OCH₃ y un pico a m/z 238 por la pérdida de C₆H₅-CH₂. Con base en lo anterior, el alcaloide se identificó como cinamilcocaína. El espectro de masas está de acuerdo con lo reportado para una muestra patrón de cinamilcocaína (14). La cromatografía en capa delgada muestra que la cocaína, junto con la cinamilcocaína, son los dos alcaloides que se encuentran en un alto porcentaje en las hojas estudiadas de *E. novogranatense* var. *novogranatense*, *E. coca* var. *coca* "pajarita", *E. coca* var. *ipadú* y *E. coca* var. *coca* peruana.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan sus agradecimientos al Doctor J. M. Hidrobo del Instituto de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, por la recolección y clasificación del material vegetal, al Doctor Edgar Moreno, del Laboratorio de Investigaciones del Café por la ayuda en la obtención de los espectros de masa.

BIBLIOGRAFIA

1. SAN MARTÍN, R., *Farmacognosia descriptiva*, Editorial científica médica, Barcelona, 1957, pág. 281.
2. EVANS, W. C., *Journal of Ethnopharmacology*, **3**, 265, (1981).
3. SOMAN, R., DEV., S., MISRA, A. AND PANDEY, R. C., *Tetrahedron Letters*, **49**, 3767, (1964).
4. MARTIN, A., MURRAY, R. D. H., *J. Chem. Soc.*, **20**, 2529, (1968).
5. CONNOLLY, J. D., HARDING, A. E., *J. Chem. Soc.*, **16**, 1996, (1972).
6. BEZAUGER, L., BEAUQUESHE, G. N. AND DEVECH, D., *Pharm. Franc.*, **23**, 377, (1965).
7. CAMPOS, M. T., CAMPOS A.D., *Bol. Esc. Farm.*, **27**, 67, (1967).
8. PLOWMAN, T., *Actas del seminario interamericano sobre aspectos médicos y sociológicos de la coca y cocaína*, Lima, Peru, 101, 117, (1980).
9. JAMES, D., AULIK, A. D. AND PLOWMAN, T., *Bot. Mus. Leaf., Harv. Univ.*, **24**, 113, (1975).
10. SANABRIA GALINDO, A., *Análisis fitoquímico preliminar*, Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia, Bogotá, Colombia, 1983.
11. PLOWMAN, T. AND RIVIER, L., *Ann. Bot. (London)*, **51**, 641, (1983).
12. EL-IMAN, Y. M. A., EVANS, W. C. AND PLOWMAN, T., *Phytochemistry*, **24**, 2285, (1985).
13. TREASE, G.E. AND EVANS, W.C., *Pharmacognosy*, 11a. edición, Bailliere Tindall, London, 1978, pág. 52.
14. RIVIER, L., *J. Ethnopharmacol.*, **3**, 313, (1981).