

Estudio de los metabolitos secundarios volátiles y alcaloides de flores de *Erythroxylum novogranatense*, usando las técnicas HS-SPME-GC/MS y MSPD-LC/MS

Deisy Corina Bernal Bello

Trabajo de grado para optar por el título de Química

Directora

Elena Stashenko

Química, PhD

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Química

Bucaramanga

2022

Agradecimientos

A todo el equipo científico de CENIVAM, liderado por la profesora Elena, que a lo largo de los años formaron parte de esta investigación.

Tabla de Contenido

1. Marco Teórico	14
1.1. Erythroxyllum novogranatense	14
1.2. Metabolitos secundarios	15
1.3. Técnicas de extracción	16
1.3.1. <i>Dispersión de la matriz en fase sólida (MSPD)</i>	16
1.3.2. Microextracción en fase sólida (SPME)	16
1.4. Análisis Instrumental.....	17
1.4.1. <i>Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas</i>	17
1.4.2. <i>Cromatografía líquida de alta eficiencia LC-ESI-MS</i>	17
2. Cienciometría.....	19
3. Objetivos.....	23
3.1. Objetivo general	23
3.2. Objetivos específicos.....	23
4. Justificación.....	24
5. Desarrollo experimental	25
5.1. Material vegetal.....	26
5.2. Obtención de volátiles emitidos por las flores de <i>Erythroxyllum novogranatense</i> por microextracción en fase sólida con muestreo en la fase gaseosa (HS-SPME).....	27

5.3. Análisis de fracciones volátiles de flores de <i>Erythroxyllum novogranatense</i> por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.....	28
5.4. Irradiación de flores en cámara UV	29
5.5. Extracción de alcaloides por MSPD de las flores	29
5.6. Análisis de extractos por LC-ESI+-TOF-MS	31
6. Resultados y discusión.....	33
6.1. Análisis por HS-SPME-GC/MS de la fracción volátil de <i>Erythroxyllum novogranatense</i>	33
6.1.1. Análisis de la fracción volátil <i>ex vivo</i> de las flores a diferentes horas del día	33
6.1.2 Análisis por HS-SPME-GC/MS de flores irradiadas	35
7. Conclusiones.....	41
8. Recomendaciones	42
9. Referencias Bibliográficas.....	43

Tabla de Figuras

Figura 1. Unidad de isopreno.....	15
Figura 2. Relación de publicaciones por año. Periodo de observación 2003-2022	19
Figura 3. Relación del número de publicaciones según el área de estudio. Periodo de observación 2003-2022	20
Figura 4. Esquema general del trabajo realizado	26
Figura 5. Esquema de los pasos principales del procedimiento de extracción por dispersión en fase sólida de la matriz.....	30
Figura 6. Perfil cromatográfico.....	34
Figura 7. Perfil cromatográfico.....	35
Figura 8. Comparación de los perfiles cromatográficos obtenidos en flores con y sin irradiación UV-A.....	36
Figura 9. Geometrías moleculares optimizadas correspondientes de los isómeros del bovólido. 38	
Figura 10. Perfil característico del extracto por MSPD de flores de coca por LC-MS	39
Figura 11. Variación en contenido de cocaína y cinamoilcocaína en flores de de E. novogranatense durante dos días de su floración.....	40

Lista de Tablas

Tabla 1. Clasificación de los terpenos. 15

Resumen

Título: Estudio de los metabolitos secundarios volátiles y alcaloides de flores de *Erythroxyllum novogranatense*, usando las técnicas HS-SPME-GC/MS y MSPD-LC/MS*

Autor: Deisy Corina Bernal Bello**†

Palabras clave: Flores, volátiles, SPME, GC-MS, LC-MS, *Erythroxyllum novogranatense*

Descripción: *Erythroxyllum novogranatense* var. *novogranatense* (D.Morris) Hieron de la familia Erythroxylaceae, conocida como coca, es originaria de América del Sur. La floración ocurre dos veces al año, cada flor (0,06 g) dura un día; la planta florece 3-4 días. Las plantas cultivadas en el complejo piloto CENIVAM fueron debidamente identificadas (Comprobante COL N° 578.356, O. Rivera-Díaz); Los volátiles se obtuvieron por HS-SPME a las 7 a.m. y 7 p.m. durante tres días consecutivos, dos veces al año, y analizados por GC-MS. Su identificación se basó en el LRI, espectros de masas (EI, 70 eV) y uso de sustancias patrón. La cantidad de volátiles fue 15 veces mayor en la mañana que en la tarde. Los compuestos volátiles incluyeron monoterpenos (ocimeno, linalol), derivados del ácido benzoico y salicílico y compuestos nitrogenados (nitrilos, pirroles). Los alcaloides fueron aislados de flores liofilizadas por MSPD y analizados por QC-QqQ, y LC/MS con interfaz ESI en modo positivo. A diferencia de las hojas de coca, sus flores contenían más cinamato de cocaína (isómeros *cis* y *trans*) que cocaína; el contenido de alcaloides fue mayor en la mañana que en la tarde. Se detectó bovolide (2,3-dimetil-2,4-dien nona-4-olide) entre los volátiles emitidos por la mañana, pero estuvo ausente en las emisiones florales de la tarde. En las flores de coca, irradiadas con UV-A, aparecieron los dos isómeros bovolide (*cis* y *trans*); su asignación cromatográfica (MS eran prácticamente idénticas) se basó en cálculos de mecánica cuántica, determinando momentos dipolares (*cis*-bovolida, $\mu = 4,64$ D; *trans*-bovolida, $\mu = 5,27$ D) y calores de formación (*cis*-bovolida, $\Delta H_f^\circ 298 = -339$ kJ mol⁻¹, *trans*-bovolida, $\Delta H_f^\circ 298 = -324$ kJ mol⁻¹). El isómero *cis* apareció en las flores no irradiadas (*t*R = 40,92 min), mientras que el isómero *trans* se formó bajo el efecto de los rayos UV-A, es menos "estable" y eluyó en la columna polar (DB-WAX, 60 m) después de la *cis*-isómero *t*R = 44,13 min, ya que su momento dipolar es mayor.

* Trabajo de grado.

**Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Director: Elena Stashenko, Química, PhD.

Abstract

Title: Study of the volatile secondary metabolites and alkaloids of *Erythroxylum novogranatense* flowers, using the HS-SPME-GC/MS and MSPD-LC/MS techniques.*

Author: Deisy Corina Bernal Bello**†

Key Words: Flowers, volatile, SPME, GC-MS, LC-MS, *Erythroxylum novogranatense*

Description: *Erythroxylum novogranatense* var. *novogranatense* (D.Morris) Hieron of the *Erythroxylaceae* family, known as coca, is native to South America. Flowering occurs twice a year, each flower (0.06 g) lasts a day; the plant blooms 3-4 days. Plants grown in the CENIVAM pilot complex were properly identified (COL Voucher No. 578,356, O. Rivera-Diaz); Volatiles were obtained by HS-SPME at 7 a.m. and 7 p.m. during three consecutive days, twice a year, and analyzed by GC-MS. Their identification was based on the LRI, mass spectra (EI, 70 eV) and use of standard substances. The amount of volatiles was 15 times greater in the morning than in the afternoon. Volatile compounds included monoterpenes (ocimenes, linalool), benzoic and salicylic acid derivatives, and nitrogenated compounds (nitriles, pyrroles). The alkaloids were isolated from lyophilized flowers by MSPD and analyzed by QC-QqQ, and LC / MS with ESI interface in positive mode. Unlike coca leaves, their flowers contained more cocaine cinnamate (*cis*- and *trans*-isomers) than cocaine; alkaloid content was higher in the morning than in the afternoon. Bovolide (2,3-dimethyl-2,4-dien nona-4-olide) was detected among the volatiles emitted in the morning, but was absent in afternoon floral emissions. In the flowers of coca, irradiated by UV-A, they both bovolide isomers (*cis* and *trans*) appeared; its chromatographic assignment (MS were virtually identical) was based on quantum mechanical calculations, determining dipole moments (*cis*-bovolide, $\mu = 4.64$ D; *trans*-bovolide, $\mu = 5.27$ D) and heats of formation (*cis*-bovolide, $\Delta H_f^\circ 298 = -339$ kJ mol⁻¹; *trans*-bovolide, $\Delta H_f^\circ 298 = -324$ kJ mol⁻¹). *Cis*- isomer appeared in unirradiated flowers ($t_R = 40.92$ min), while the *trans* isomer was formed under the effect of UV-A, is less "stable" and eluted in the polar column (DB-WAX, 60 m) after the *cis*- isomer $t_R = 44.13$ min, as its dipole moment is larger.

* Trabajo de grado.

** Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Director: Elena Stashenko, Química, PhD.

Introducción

Las flores -a lo largo de la historia de la civilización- han ocupado un lugar muy especial, privilegiado, acompañando al ser humano en sus celebraciones (nacimientos, bodas, jubileos), dolores (muerte, sepelio) y en la vida cotidiana. Ello, por su belleza, colores y formas, por su impacto estético y por el simbolismo con el cual se asocian según cada cultura. Las flores han sido objeto de adoración y deleite en pinturas, obras gráficas y religiosas, en trabajos arquitectónicos y en la escultura, han sido parte de mitos y leyendas en muchas culturas antiguas y en tradiciones modernas. Es difícil encontrar lugar en la ciudad o en una casa o un apartamento en donde no haya flores o pinturas o adornos con flores.

La tapicería, los ornamentos, los textiles y la joyería también han tenido como su objeto representativo a las flores o arreglos florales, tan típicos, particularmente, en los mosaicos, arabescos y ornamentos en las culturas islámica y asiática. Sin embargo, las flores no solamente son objeto de veneración y admiración estética, parte de rituales y de nuestra vida cotidiana, son un centro muy importante de investigación científica en botánica, fisiología de plantas, bioquímica, ecología y ... en química analítica, nuestro campo de estudio.

Las flores son un órgano sumamente importante en plantas conocidas como *Angiospermae* o *Magnoliophyta*, uno de los más diversos grupos de plantas en el planeta, compuestos por 64 órdenes, 416 familias, aproximadamente 13000 géneros y más de 300000 especies conocidas. Las angiospermas producen semilla y con su distribución y germinación garantizan la continuación de su existencia en el planeta. Desde el punto de vista fisiológico, la flor es un órgano de mucha “responsabilidad” e importancia en la planta; en ella, nace y continúa la nueva vida. Las flores participan en la polinización, que perpetuará incontinenti en la formación

de un fruto, cuya semilla llevará los programas genéticos a nuevas generaciones de plantas. La polinización es un proceso complejo, puede ocurrir, por ejemplo, en poáceas (gramíneas) o en la mayoría de los cereales (arroz, trigo, centeno, avena), por medio del viento, que lleva el polen de una planta a la otra; pero -en la mayoría de las plantas- sucede con la participación de animales, mayoritariamente, de insectos, pero también, de caracoles, murciélagos o pájaros. La polinización manual se ha practicado en cultivos industriales de vainilla. Durante su evolución, las flores de angiospermas (que no se polinizan con el viento) “elaboraron” varias estrategias para atraer a los polinizadores. Entre ellas, figuran muy diversas formas de pétalos y cálices (por ejemplo, orquídeas, *Stapellia spp*, *Aristolochia spp*, *Passiflora spp*, otras), llamativos y exuberantes colores y texturas, el uso de las “recompensas” como el néctar (en glándulas nectarias) y, por supuesto, las fragancias, las sustancias odoríferas que emanan y atraen a los polinizadores y que, por lo general, poseen un olor agradable para los humanos; algunas de estas sustancias pueden ser feromonas de insectos.

En el estudio de la “química” de la flor entra el análisis químico instrumental a jugar un papel importante en la investigación del metabolismo de sustancias volátiles biosintetizadas en flores, su emisión y su dependencia de distintos factores ambientales (temperatura, luz, estación del año, humedad, presencia de determinados polinizadores y otras plantas, etc.). Los perfiles composicionales de volátiles son importantes para conocer a fondo la interacción “planta-planta” y “planta-insecto”, la génesis de volátiles y procesos bioquímicos subyacentes, y, en general, los aspectos tanto fisiológicos como ecológicos de adaptación de plantas y sus estrategias evolutivas. Se han descrito más de 800 sustancias emanadas por las flores, que pertenecen a diversos grupos de sustancias químicas, alcoholes, aldehídos, cetonas, aminas, fenoles y terpenos (monoterpenos, C10, y sesquiterpenos, C15 y sus análogos oxigenados).

Muchos perfiles de sustancias volátiles florales han inspirado a los perfumistas para crear sus mezclas fragantes en perfumes, lociones, *eau de toilette*, jabones y otros productos. Las esencias florales son populares en medicina homeopática. En la culinaria asiática se utilizan los pétalos de distintas flores en platos típicos y hay un auge del uso de flores en la comida tipo fusión. Pero el aspecto quizás más interesante en el estudio de las composiciones de volátiles florales es para entender su papel ecológico en la interacción con polinizadores y en la protección de plantas, particularmente, de los herbívoros.

En los resultados plasmados en el presente trabajo, se estudiaron los volátiles producidos por las flores de *Erythroxylum novogranatense* (familia Erythroxylaceae), planta comúnmente conocida como coca. La coca, a pesar de ser una planta sagrada para varios pueblos indígenas de Colombia, Ecuador, Perú y Bolivia, una fuente de energía y de nutrientes (K, P y Ca, aminoácidos, vitaminas), ha sido profundamente vituperada y satanizada debido a su uso como fuente de la cocaína, un alcaloide apetecido por civilizaciones occidentales por sus efectos estimulantes del sistema nervioso central.

La ilegalidad y la prohibición de la cocaína impuesta en los años veinte del siglo pasado (*Harrison Narcotics Tax Act*, 1914), primero en los Estados Unidos y luego en Europa, condujo al aumento exorbitante de su precio; la alta demanda del alcaloide y las condiciones “favorables” de su cultivo en Colombia, sumergieron al país en una prolongada y sangrienta guerra y una permanente tragedia humana -el narcotráfico- que se apoderó de muchas esferas de la vida colombiana, produjo numerosas víctimas y, sobre todo, ha impuesto una cultura de dinero fácil y el deterioro de valores civiles y culturales (todo es posible cuando hay plata, todo se compra).

La planta ancestral *Erythroxylum novogranatense* vive hoy en día su viacrucis, su estudio

ha sido enfocado básicamente en la caracterización botánica, hibridaciones y cruces, variedades y sus orígenes, y en la descripción química de alcaloides tropánicos en la planta en función de su cultivo y extracción. Poco se sabe sobre la polinización de esta especie, sobre sus polinizadores y sobre los metabolitos volátiles que producen las flores de coca para atraerlos.

Una dificultad adicional es que la flor dura en la planta escasamente uno o dos días. El olor de la flor es tenue y muy agradable, con un toque floral-oriental. Después de su polinización, las flores, desvanecidas, caen al suelo dando origen a la formación de un fruto que, en un mes y medio, se torna de color rojo carmesí y es comido por algunos pájaros y es fácilmente distribuido a lugares distantes de la planta madre. La especie de *Erythroxylum novogranatense* es procedente del Norte de Colombia, mientras la de *Erythroxylum coca* se origina en Perú y Bolivia. Ambas especies tienen variedades y cruces, pero solamente estas dos poseen cantidades apreciables de alcaloides tropánicos.

Las sustancias volátiles generadas por las flores de *Erythroxylum novogranatense* fueron el objeto de la investigación que aquí se plasma; para su extracción se utilizaron la técnica de la microextracción en fase sólida (SPME), los metabolitos secundarios volátiles se muestrearon ex vivo, los volátiles de flores, inmediatamente después de su recolección, se recolectaron sobre la fibra de SPME desde el espacio de cabeza (HS), y se analizaron luego por cromatografía de gases (GC) acoplada a espectrometría de masas (MS) con ionización con electrones (EI, 70 eV).

Para la identificación de sustancias volátiles de flores de coca, se usaron patrones de compuestos de referencia disponibles, se calcularon los índices de retención lineales (LRI) para las dos columnas cromatográficas GC, con fases estacionarias (f.e.) polar y apolar, se estudiaron los patrones de fragmentación de sustancias volátiles extraídas, cuyos espectros de

masas se compararon también con los de las bases de datos NIST, WILEY, Adams y con los de los compuestos de referencia disponibles.

La extracción de volátiles de flores se hizo durante dos períodos de florecimiento anuales, a lo largo de tres días, es cuando se pueden encontrar flores en la planta. Las extracciones se hicieron en horas tempranas de la mañana y después del ocaso del sol. Para complementar el estudio se compararon los alcaloides tropánicos encontrados en la flor con los presentes en las hojas, su aislamiento se llevó a cabo por la técnica de dispersión de la matriz en fase sólida (MSPD, por sus siglas en inglés) y su análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) acoplada a espectrometría de masas (MS) de alta resolución (HR), con analizadores de tiempo de vuelo (TOF).

1. Marco Teórico

1.1. *Erythroxylum novogranatense*

La especie estudiada tiene la siguiente descripción taxonómica:

División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Sub. Clase:	Rosidae
Orden:	Linales
Familia:	Erythroxylaceae
Género:	Erythroxylum
Especie:	Erythroxylum novogranatense (D. Morris) Hieron.
Nombre común:	Coca

La coca (*E. novogranatense*), es un arbusto de aproximadamente 4 m de altura, posee hojas membranosas, color verde intenso, formas elípticas y con ápice agudo. Las flores son de 5 mm de largo, los pétalos de color blanco crema. Los frutos son drupas de color rojo de 10 mm de largo por 4 de ancho [1].

El uso de la coca en la medicina tradicional data desde los Incas quienes la llamaban "hoja sagrada" por sus efectos curativos. La hoja de coca contiene cocaína, un alcaloide que tiene propiedades terapéuticas y tóxicas; tiene efectos antidepresivo y anestésico. Según un estudio realizado por Weil (1978) [2], la hoja de coca posee propiedades nutritivas por su contenido de vitamina A, complejo B y vitamina E.

1.2. Metabolitos secundarios

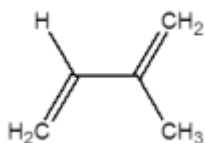
Son moléculas con un relativo bajo peso molecular, los cuales son empleados como parte de la defensa química contra el daño causado a las plantas. Estos compuestos, extraídos de las plantas se pueden dividir en tres grandes grupos: terpenos, alcaloides y compuestos fenólicos.

- **Terpenos**

Los terpenos o terpenoides, son compuestos formados por unidades de isopreno, C5 (ver figura 1).

Figura 1.

Unidad de isopreno



Nota: Elaboración propia.

Los terpenos se clasifican según el número de unidades de isopreno presentes en su estructura, como se presentan en la tabla 1.

Tabla 1.

Clasificación de los terpenos.

Número de unidades de isopreno, C5	Nombre	Ejemplo
1	Hemiterpeno	Isopreno, ácido valérico
2	Monoterpeno	Linalool, mirceno
3	Sesquiterpeno	Humuleno, cariofileno
4	Diterpeno	Ácido carnósico, retinol

5	Sesterterpeno	Hirtiosal
6	Triterpenos	Faradiol
8	Tetraterpenos	Capsantina
>8	Politerpenos	Caucho

- Alcaliodes

Son compuestos que poseen uno o más átomos de nitrógeno en su estructura, en algunos casos puede ser oxígeno, azufre y, rara vez, bromo y fósforo. Los alcaloides se pueden encontrar en animales, pero es más común hallarlos en las plantas. Estos compuestos poseen actividad biológica diversa. Una de las más estudiadas es la acción euforizante que presentan algunos como la cocaína.

1.3. Técnicas de extracción

1.3.1. *Dispersión de la matriz en fase sólida (MSPD)*

La técnica llamada microextracción en fase sólida fue desarrollada por el profesor Janusz Pawliszyn a mediados de los 90. Esta técnica atendió la necesidad de preparar rápido las muestras tanto en el laboratorio como en el sitio de monitoreo. Esta técnica permite el aislamiento y extracción gracias al uso de adsorbentes, dispersantes y solventes de elución; en una misma tarea, se llevan a cabo la dispersión, extracción y limpieza de la muestra. Este método ha sido ampliamente usado para el análisis de contaminantes, pesticidas y compuestos antioxidantes [4]

1.3.2. **Microextracción en fase sólida (SPME)**

La SPME fue una técnica innovadora al combinar la extracción y la concentración de analitos-target. En esta técnica, una pequeña cantidad del polímero o fase extractor está soportada en un sólido que se expone a la muestra por un período de tiempo definido. La microextracción en fase sólida (SPME), es una técnica de absorción/desorción que elimina la necesidad de usar solventes.

Existen modificaciones que aprovechan sus mismos principios. Es así como se encuentran fibras, partículas suspendidas, barra de agitación, disco/membranas y vasos con paredes recubiertas. El análisis de compuestos volátiles o semi-volátiles orgánicos medio ambientales, de sabor o fragancia y otras muestras, usa inicialmente la concentración de los analitos mediante diferentes técnicas como la extracción líquido-líquido, purga y trampa, o *headspace*. Estos procesos requieren mucho tiempo, equipos especializados y solvente orgánicos.

Los principales modos de operación en SPME son: (1) HS-SPME, (2) microextracción directa sumergiendo la fibra en la matriz y (3) extracción con protección de membrana.

1.4. Análisis Instrumental

1.4.1. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

La espectrometría de masas es una técnica que se combina con otros métodos analíticos instrumentales para conocer la masa molecular y la estructura de los analitos. Si se dispone de alta resolución es posible establecer la composición elemental. La separación de las mezclas por GC/MS ocurre en una columna capilar.

El mecanismo de operación de la espectrometría de masas se basa en la generación de iones cargados positivamente y sus fragmentos, a partir de moléculas provenientes de la columna cromatográfica. Los iones entran al analizador de masas donde se separan de acuerdo con su relación masa/carga (m/z). La detección de las corrientes iónicas la efectúa un electromultiplicador. Su señal permite calcular la corriente iónica total, cuya representación en función del tiempo constituye el perfil cromatográfico.

1.4.2. Cromatografía líquida de alta eficiencia LC-ESI-MS

La cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC, por sus siglas en inglés), es una técnica que se emplea para separar los compuestos poco volátiles y polares presentes en mezclas

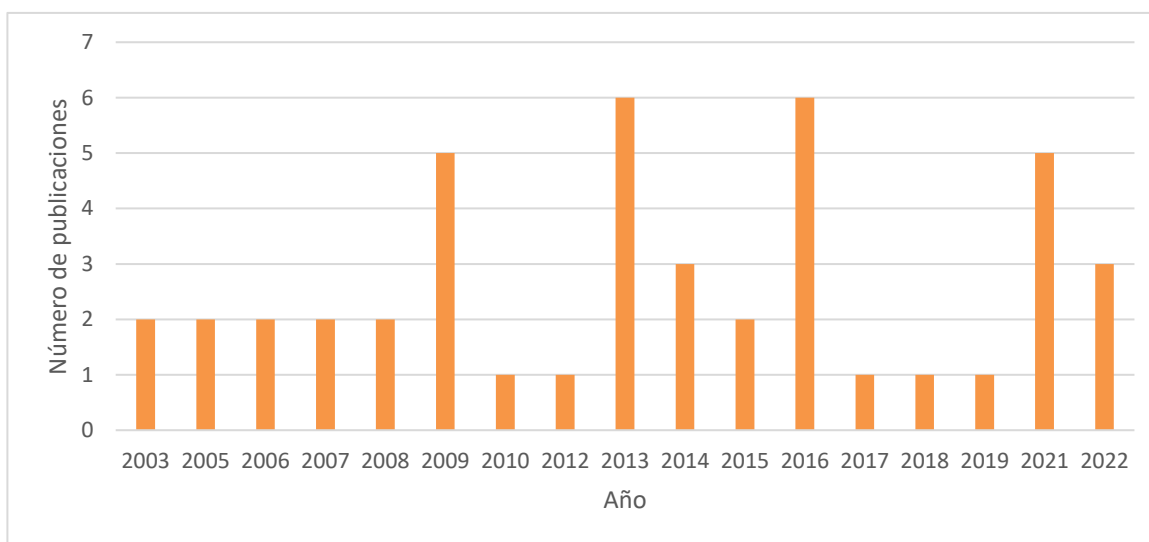
complejas. Los compuestos que se pueden separar por esta técnica pueden ser más pesados (> 500 Da), no ser volátiles y ser termolábiles [8]. Este método combina la resolución de la separación por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con la alta precisión de masas del espectrómetro de masas. Por lo tanto, se utiliza para la determinación de la masa proteica intacta o para el análisis en profundidad de mezclas de proteínas o péptidos. A través del acoplamiento con HPLC, las características detectadas pueden cuantificarse mediante luz ultravioleta o intensidad de señal de MS.

2. Cienciometría

La Figura 2 presenta la variación en el número de publicaciones sobre *E. novogranatense*, según la base de datos Scopus (Elsevier). Como ecuación de búsqueda se utilizó TITLE-ABS-KEY (*erythroxyllum novogranatense*) AND PUBYEAR > 2003. En este intervalo de tiempo se han publicado 45 investigaciones, la mayoría en áreas de medicina, farmacología y toxicología.

Figura 2.

Relación de publicaciones por año. Periodo de observación 2003-2022.

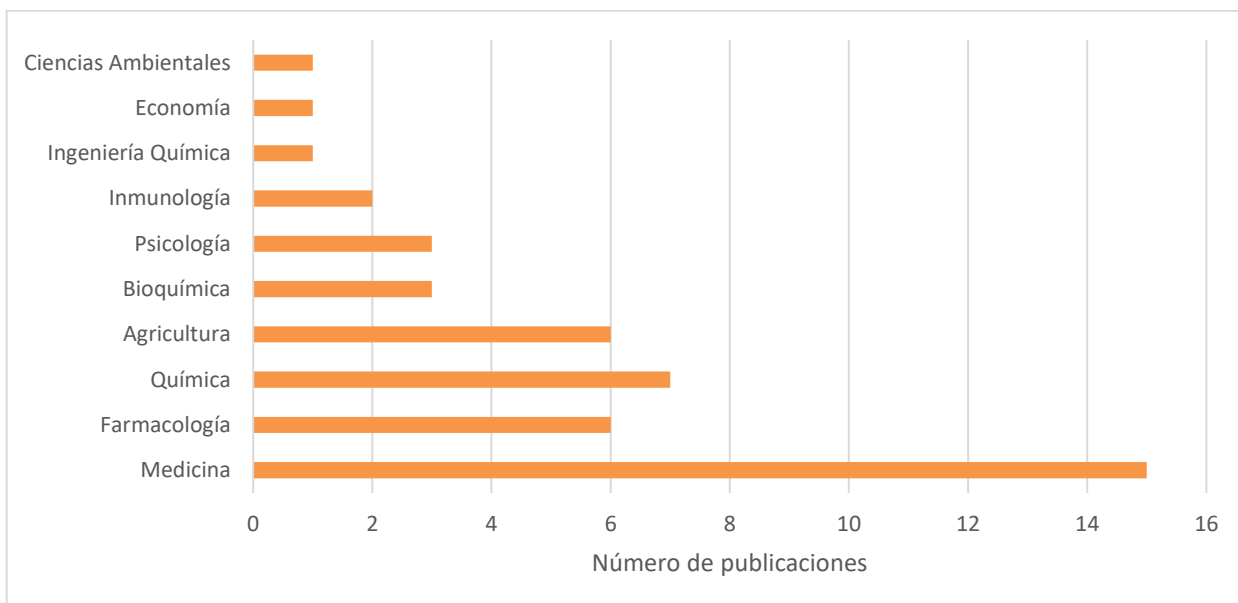


Nota: Tomado de Scopus (Elsevier), elaboración propia.

En la Figura 3 se muestra la relación entre el número de publicaciones y las diferentes áreas en las cuales se estudia la planta.

Figura 3.

Relación del número de publicaciones según el área de estudio. Periodo de observación 2003-2022



Nota: Tomado de Scopus (Elsevier). Elaboración propia.

Dentro de las investigaciones encontradas se pueden destacar:

La investigación realizada por Brock y col. (2005) analiza la biosíntesis de alcaloides tropanos presentes en hojas secas en diferentes especies de *Erythroxylum*. Johnson y col. (2005) evaluaron la estructura de la diversidad genética entre diferentes especies de *Erythroxylum*. Encontraron diferencias significativas, existiendo una estructura genética heterogénea entre las especies.

Se analizó el impacto del uso del glifosato sobre otros cultivos en la guerra contra el narcotráfico en Putumayo (Colombia), dando como resultado cultivos afectados de manera adversa por esta práctica. Un trabajo realizado por Casale y Lydon (2007), mostró resultados de análisis de alcaloides presentes en hojas de coca de América del Sur en cultivos tratados y no tratados con glifosato. La conclusión a la que llegaron los investigadores sugiere que la aplicación de glifosato a las plantas de coca puede afectar drásticamente la cantidad y calidad de los

alcaloides. Un resumen publicado en 2008 por Potterat y Hamburger presenta un panorama sobre los esfuerzos en el desarrollo de medicamentos con base en productos naturales.

En 2009, Lydon y col, publicaron un artículo con resultados de la irradiación UV de diferentes especies de *Erythroxyllum*. Como conclusión, los autores apoyaron la hipótesis de que la radiación UV está implicada en la formación de cinnamoilcocaína. Oliveira y col. realizaron una revisión donde presentaron la caracterización taxonómica de las plantas del género *Erythroxyllum*. Presentaron 186 alcaloides tropánicos en 35 especies de *Erythroxyllum* y una compilación de datos espectrales de RMN-13C. Otro estudio evaluó la evolución de 36 especies del género *Erythroxyllum* en un marco filogenético. Compararon las especies estudiadas para encontrar sus similitudes por medio de polimorfismo en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP por sus siglas en inglés).

Un artículo publicado por Casele y col., identificó 15 nuevas especies de *Erythroxyllum* en Colombia y se compararon los perfiles de los alcaloides de cada una con las tres especies nativas cultivadas históricamente en el país para la producción de cocaína. En el 2016, Casale y Mallette desarrollaron un estudio del perfil de alcaloides e isótopos de la coca ilícita en Chiapas, México.

Se destacan los siguientes compuestos (comparados con la cocaína extraída en Sudamérica): 21.3% de 1- hidroxitropacocaína y 24.2% de cinnamoil cocaína. Vida y col. desarrollaron un método de inmunoensayo rápido ligado a partículas magnéticas de base enzimática (mpEIA, por sus siglas en inglés) para la determinación de cocaína (COC) en muestras de saliva y orina. Mallette y col. publicaron un estudio relacionado con los cambios en el procesamiento de clorhidrato de cocaína ilícita a través de análisis de cromatografía y espectrometría de masas de diferentes lotes confiscados en Nariño, Colombia, y en el pacífico oriental.

Las publicaciones realizadas entre los años 2021-2022 comprenden: un caso clínico de vasculitis asociada con cocaína adulterada con levamisol presentado por Calpena-Martínez (2022).

Otro tipo de artículo que se encontró al realizar la búsqueda es un *Commentary* realizado por Laposchan y col. (2021) sobre las impurezas, adulterantes y agentes de corte en la cocaína. La idea de los autores es presentar una revisión de las impurezas y adulterantes comunes que se encuentran en la cocaína ya que podrían ofrecer información sobre la historia de una incautación y su posible conexión con otras muestras.

3. Objetivos

3.1. Objetivo general

Usando la técnica de microextracción en fase sólida (HS-SPME), determinar por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS) los volátiles que emiten las flores de *Erythroxylum novogranatense*, en diferentes horas del día.

3.2. Objetivos específicos

Los objetivos específicos del trabajo se centraron en: (1) el tipo de recubrimiento de la fibra SPME que permita aislar un mayor número y una alta cantidad de compuestos volátiles emitidos por las flores de *Erythroxylum novogranatense*; (2) monitorear la emisión de compuestos volátiles de las flores de *Erythroxylum novogranatense* en diferentes horas del día, i.e., inmediatamente después del amanecer y después de ocaso del sol; encontrar las posibles diferencias cualitativas o cuantitativas en sus composiciones químicas, así como después de su irradiación en una cámara de luz ultravioleta; (3) empleando la técnica GC/MS, el uso de algunos compuestos estándar, los índices de retención lineales (LRI) y el estudio patrones de fragmentación, establecer la naturaleza química de sustancias volátiles que emiten las flores de *Erythroxylum novogranatense*; (4) Observar y detectar los posibles cambios en los compuestos volátiles y alcaloides tropánicos en flores de *Erythroxylum novogranatense* a diferentes horas del día.

4. Justificación

El estudio que se realizó en el presente trabajo se enmarca en el área de ciencias básicas, porque permitió obtener un nuevo conocimiento sobre los metabolitos secundarios volátiles de *Erythroxylum novogranatense*, una planta -hoy en día- controversial como fuente de la cocaína y estudiada solo por el lado de sus alcaloides tropánicos y variedades botánicas y genéticas.

Sin embargo, el estudio de sus metabolitos volátiles puede verter luces sobre los procesos muy importantes de interacción planta- insecto y planta-planta y de su adaptación al medio (aspectos ecológicos), ya que *Erythroxylum novogranatense* es polinizada o al menos visitada durante su florecimiento por múltiples y muy diversos insectos. ¿Qué los atrae? ¿Por qué? ¿Qué ventajas (recompensas) ofrece la planta a los insectos visitantes y polinizadores? ¿Cuáles son las sustancias o su combinación que atraen? ¿Hay transferencia de sustancias de la planta al insecto? ¿Cuáles? Muchas preguntas que requieren una investigación transversal y de conocimientos complementarios de botánicos, fisiólogos de plantas, químicos y bioquímicos, ecólogos y entomólogos.

Empero, conocer los compuestos volátiles emitidos por las flores de coca podría ser un primer e importante paso en este tipo de estudios, que podrían ser acompañados de investigación relacionada con la génesis de estas sustancias y rutas bioquímicas conducentes a su aparición en la flor. Debido a una muy particular fragancia de flores de *Erythroxylum novogranatense*, agradable y floral, con un toque oriental, su estudio y la descripción del perfil químico podrían ser útiles y de interés - ¿por qué no? - en la industria de perfumes, sabores y fragancias, que permanentemente busca nuevas combinaciones odoríferas para sorprender a sus clientes y consumidores con nuevas notas olfativas.

5. Desarrollo experimental

La marcha analítica para analizar una muestra de material vegetal comprende diferentes pasos que incluyen: muestreo, preparación de la muestra, separación de los analitos de interés, identificación, cuantificación, evaluación estadística y toma de decisiones. El tratamiento de la muestra juega un papel crucial en todo el estudio analítico.

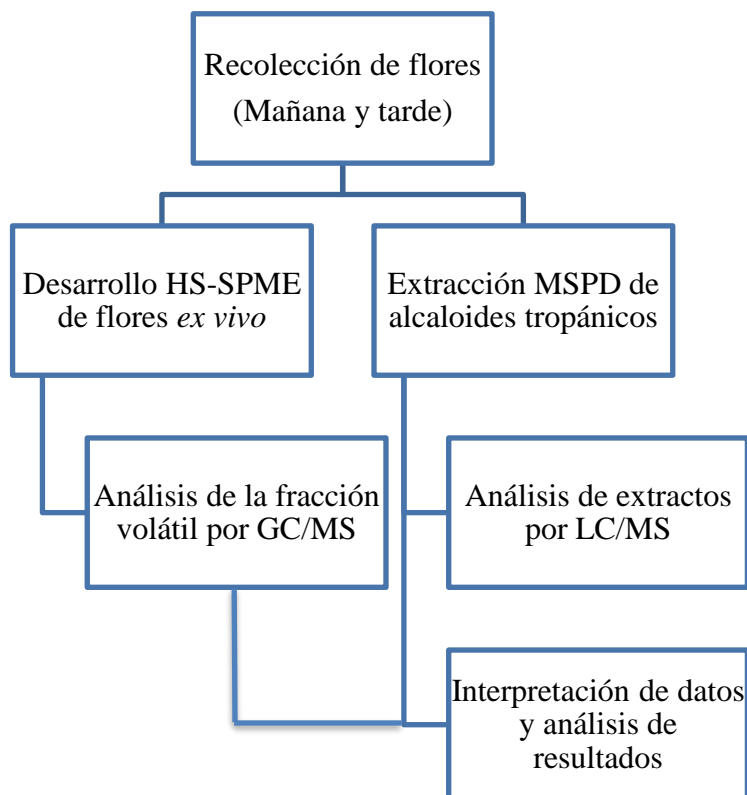
Las nuevas tendencias en el desarrollo de cadenas analíticas comprenden los siguientes términos:

- Miniaturización
- Integración de varios procesos y su automatización
- Acoplamiento de técnicas de preparación con diferentes métodos de separación y detección, por ejemplo, HS-SPME-GC/MS.
- Implementación de métodos de extracción basados en la filosofía de preparación de muestra QuEChERS y de química verde.

En la figura 4 se muestra el esquema general de la metodología empleada para el desarrollo de la investigación:

Figura 4.

Esquema general del trabajo realizado



Nota: Elaboración propia.

5.1. Material vegetal

Las plantas de *Erythroxylum novogranatense* crecieron bajo las condiciones agronómicas controladas en la parcela experimental del Complejo Agroindustrial Piloto de CENIVAM en el campus principal de la UIS. La identificación botánica del material vegetal se realizó en el Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Colombia en Bogotá, D.C.

El respectivo *exsiccatum* de la planta se depositó en el Herbario Nacional del mencionado instituto, en donde se obtuvo su respectivo número de *voucher* (COL *Voucher* No. 578356, O. Rivera-Díaz 06/10/2014). Normalmente, la planta florece dos veces al año. El florecimiento de *Erythroxylum novogranatense* es corto, las flores duran de uno a dos días en la planta, a los tres-

cuatro días ya termina la floración, durante la cual múltiples insectos, entre visitantes y polinizadores, llegan a las flores (polillas, mariposas, abejas, avispas y otros bichos). Las flores se recolectaron con pinzas. Las extracciones se harán inmediatamente después de la recolección del material vegetal. La recolección de las flores se realizó en la mañana, apenas nascía el sol y por la tarde, después de su ocaso.

5.2. Obtención de volátiles emitidos por las flores de *Erythroxylum novogranatense* por microextracción en fase sólida con muestreo en la fase gaseosa (HS-SPME)

La extracción por HS-SPME de flores *ex vivo* se realizó, según la metodología descrita por Stashenko et al. [23,24]. El material vegetal recién cortado (1 g), se depositó en un recipiente de vidrio (15 mL) y se acondicionó (10 min) a 60 °C. El estándar interno (Istd), *n*-tetradecano (ca. 2 mg), se incorporó al recubrimiento de la fibra SPME, por su exposición al hidrocarburo a 60 °C durante 5 s. Después de ello, la fibra SPME se expuso durante 30 min al interior del recipiente con las flores de *Erythroxylum novogranatense*.

La desorción de analitos se realizó en el puerto de inyección de un GC-MS. Se probaron tres tipos de recubrimientos de la fibra, a saber: poli(dimetilsiloxano), PDMS (100 µm), Carboxen® disperso en PDMS, CAR/PDMS (75 µm), y PDMS reticulado con divinilbenceno, PDMS/DVB (65 µm), con la intención de encontrar uno que permita extraer mayor número y la cantidad más alta de sustancias volátiles, lo que se verificó midiendo las áreas de los volátiles extraídos en sus respectivos cromatogramas.

La fibra que presentó una relación más alta de A_{total}/A_{istd} , fue seleccionada para los siguientes experimentos. El muestreo se realizó a diferentes horas del día en la mañana y en la tarde con material vegetal recién obtenido de la planta.

5.3. Análisis de fracciones volátiles de flores de *Erythroxyllum novogranatense* por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

La fracción volátil de las flores de *Erythroxyllum novogranatense*, obtenida por HS-SPME, se analizó en un cromatógrafo de gases, GC 6890 Plus (Agilent Technologies, AT, Palo Alto, California, EE. UU.), equipado con un detector selectivo de masas MS 5973 Network (AT, Palo Alto, CA, EE. UU.), con ionización con electrones (EI, 70 eV). Se utilizó helio (99.995%, gas AP, Messer, Bogotá, Colombia) como gas de arrastre, con presión de entrada en la cabeza de la columna de 16.47 psi, y una velocidad volumétrica de flujo constante de 1 mL/min. El modo de inyección será *split* (30:1), con temperatura del inyector de 250 °C.

La separación se llevó a cabo en dos columnas capilares, una con fase estacionaria (f.e.) polar de poli(etilenglicol), PEG, (DB-WAX, J & W *Scientific*, Folsom, CA, EE. UU.) de 60 m x 0.25 mm (D.I.) x 0.25 µm (df) y otra con fase estacionaria (f.e.) apolar de 5%-fenil-poli(metilsiloxano), 5%-Ph-PDMS, (DB- 5MS, J & W *Scientific*, Folsom, CA, EE. UU.). La programación del horno cromatográfico usada fue de 50 °C (5 min) a 150 °C (2 min) a 5 °C/min, luego, hasta 230 °C (10 min) a 5 °C/min. En la columna DB-5MS, se adicionó un calentamiento hasta 275 °C (15 min), a 10°C/min. Las temperaturas de la cámara de ionización y del cuadrupolo se mantendrán a 230 °C y 150 °C, respectivamente. El rango de masas para barrido completo (*full scan*) será de m/z 45-450, con velocidad de adquisición de radiofrecuencia de 3.58 *scan/s*.

Los datos se procesaron con el software MSD *ChemStation* G1701DA (AT, Palo Alto, CA, EE. UU.). La identificación de compuestos se realizó con base en sus espectros de masas, patrones de fragmentación y los índices de retención lineales (LRI, por sus siglas en inglés), que se calcularon a partir del tiempo de retención del compuesto de interés y de sustancias de referencia certificadas de n- parafinas C5-C25 (Sigma-Aldrich), según esta fórmula:

$$LRI = (100 \times n) + 100 \times \left[\frac{(t_{Rx} - t_{Rn})}{(t_{RN} - t_{Rn})} \right]$$

Donde:

LRI - Índice de retención lineal del compuesto de interés

n y N - Números de átomos de carbono de alcanos, que eluyen antes (n) y después del compuesto de interés (N)

tRx - Tiempo de retención del compuesto de interés (x)

tRN y - Tiempos de retención de alcanos que eluyen antes (n) y después (N) del

tRn compuesto x.

Los espectros de masas experimentales de cada compuesto se compararon con los de bases de datos espectrales Adams, NIST y Wiley.

5.4. Irradiación de flores en cámara UV

Para la irradiación del material vegetal se empleó una cámara de irradiación *Irradiation Chamber* BSL-01, Opsytec Dr. Grobel (Ettlingen, Germany) equipada con lámpara de 365 nm, radiación UV-A, e irradiancia máxima de 40 mW/cm².

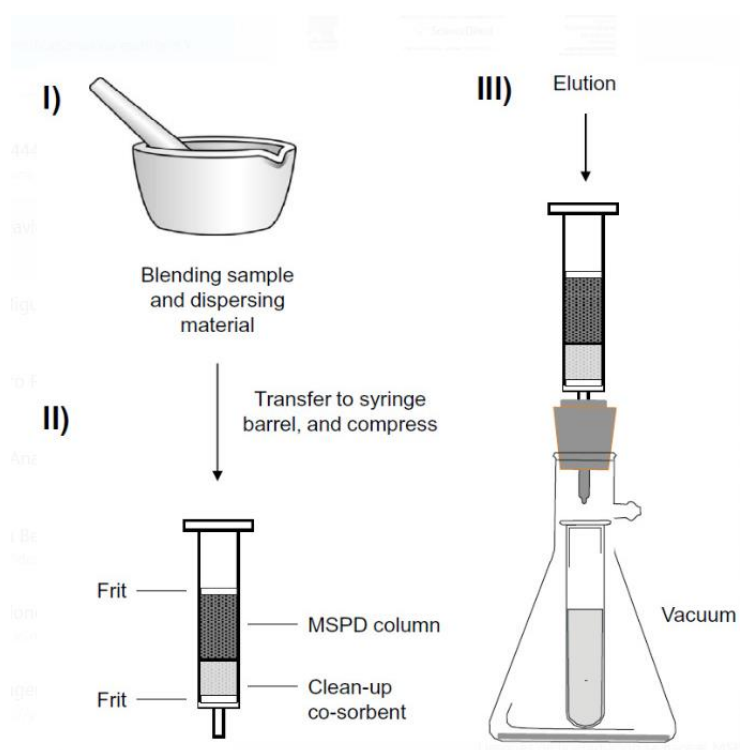
5.5. Extracción de alcaloides por MSPD de las flores

Los alcaloides tropánicos se obtuvieron de flores, recolectadas de *Erythroxylum novogranatense* por extracción de la matriz en fase sólida (MSPD). El material vegetal (70-100 mg) se mezcló con gel de sílice-C18 (400 mg), se colocó en un mortero con adición de 2-propanol (0,5 mL), se maceró hasta obtener una mezcla homogénea y se colocó en una jeringa de 5 mL con un algodón absorbente comprimido en el fondo como filtro. Los alcaloides tropánicos

se eluyeron con diclorometano (5 mL). Una alícuota (10-100 μ L) se evaporó a sequedad bajo un flujo de N_2 y se disolvieron en una mezcla agua: acetonitrilo, 9:1 v/v, con 0.2% de ácido fórmico. Las mezclas se filtraron (0,22 μ m– PTFE) y se analizaron por LC/TOF-MS.

Figura 5.

Esquema de los pasos principales del procedimiento de extracción por dispersión en fase sólida de la matriz.



Nota: I) la muestra se mezcla con el material dispersante en un mortero con pistilo; II) el polvo homogeneizado se transfiere a un cartucho de extracción en fase sólida y se comprime; III) la elución con un disolvente o una mezcla de disolventes adecuados se realiza con la ayuda de una bomba de vacío. Tomado de Capriotti, *et al*, (2010).

5.6. Análisis de extractos por LC-ESI+-TOF-MS

El análisis de extractos obtenidos por MSPD de flores de *Erythroxyllum novogranatense* se realizó en un cromatógrafo de líquidos de alta eficiencia, HPLC 1200 Series (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EE. UU.), equipado con una unidad de desgasificación de disolvente al vacío (G1379B), una bomba binaria de gradiente (G1312A), un inyector automático de muestras (G1367B) y una unidad termostada para la columna (G1316A). La separación cromatográfica se llevó a cabo en una columna C18 Kinetex (Phenomenex, Torrance, CA, EE. UU.; 100 × 4,6 mm d.i., 2.6 µm de tamaño de partícula) a 35°C.

Las mejores condiciones de análisis de los alcaloides en el LC/TOF-MS se evaluaron con el patrón de cocaína (10 ng/mL, Sigma-Aldrich). La fase móvil es una solución acuosa de ácido fórmico (A) y acetonitrilo o metanol con ácido fórmico (B). La condición inicial del gradiente fue de 95% de A y 5% de B cambiando linealmente hasta 10% de B en 3 min, luego 20% de B en 5 min, y 80% de B en 10 min, se mantuvo durante 5 min, cambiando 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, de 4 mL. El cromatógrafo líquido se conectó a un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo (TOF-MS, 6210 Series; AT, Palo Alto, CA, EE. UU.) a través de una interfaz de electronebulización (ESI), que operó en modo positivo. Se usó nitrógeno como gas secante (350 °C, 7 L/min) y gas nebulizador (40 psi).

El voltaje del capilar se cambió entre 1, 2, 3 y 4 kV, y el de fragmentador, entre 100, 150, 200 y 250 V, skimmer 65 V y el voltaje del octopolo 1 fue de 250 V. Los espectros de masas se adquirieron en el rango de m/z 100 a 900, con una velocidad de adquisición de 2 espectros/s. Se realizó corrección de la masa en tiempo real utilizando una solución que incluye purina (C₅H₄N₄

a m/z 121,05087) y hexaquis (1H, 1H, 3H-tetrafluoropentoxi)-fosfazeno (C₁₈H₁₈O₆N₃P₃F₂₄ a
m/z 922,00980).

6. Resultados y discusión

6.1. Análisis por HS-SPME-GC/MS de la fracción volátil de *Erythroxyllum novogranatense*

6.1.1. Análisis de la fracción volátil *ex vivo* de las flores a diferentes horas del día

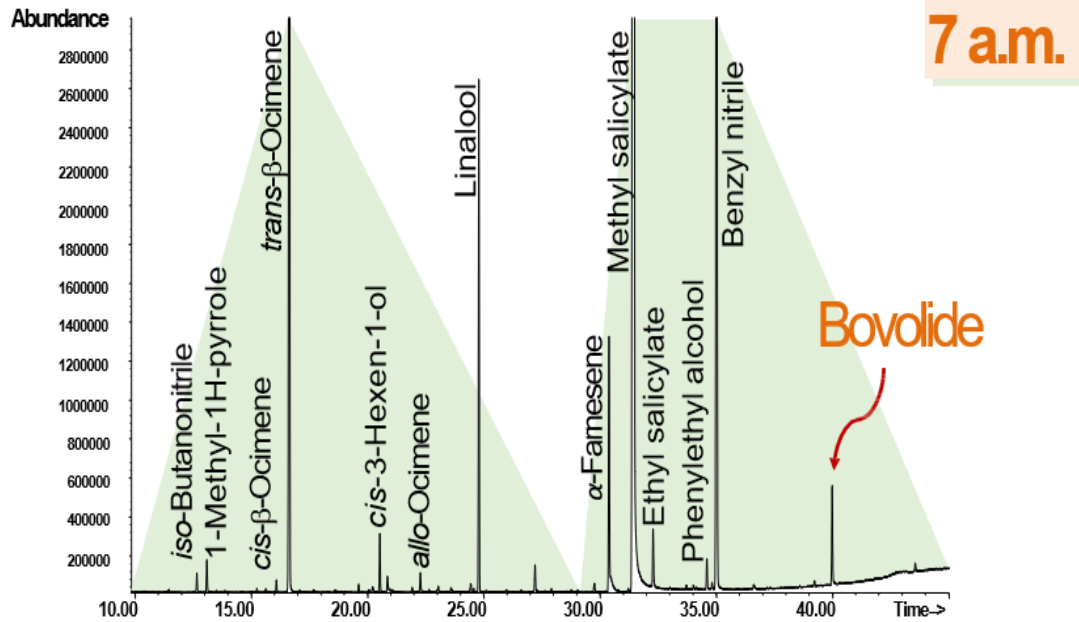
El análisis de la fracción volátil de *Erythroxyllum novogranatense*, se llevó a cabo bajo las condiciones descritas en la Sección 5.2. La identificación tentativa se realizó comparando los espectros de masas experimentales con los reportados en las bases de datos espectrales Adams, NIST y Wiley, con una coincidencia mayor de 90%, también se usaron los índices de retención lineales.

Para seleccionar las mejores condiciones de saturación y extracción, se realizaron varias pruebas variando las temperaturas de exposición y la polaridad de la fibra. Como resultado se utilizó fibra Carboxen/PDMS, con polaridad intermedia, durante 20 minutos a 60 °C en horario de mañana y tarde. El análisis de los metabolitos se realizó en un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas utilizando una columna DB-Wax y DB-5MS de 60 m, modo de inyección *splitless* y un *liner* SPME de 78,5 mm x 0,75 mm DI x 6,5 mm O.D.

Los principales componentes de la fragancia de las flores por la mañana fueron *trans*- β -ocimeno, linalol, *cis*- β -ocimeno, salicilato de metilo, α -farneseno y bovólido. Por la tarde se encontraron los mismos componentes, pero no se encontraron el salicilato de metilo y bovólido y se incrementó el salicilato de etilo. La sustancia que tiene un olor fuerte que recuerda al apio y se presenta en una cantidad de alrededor de 0,5 mg/kg de mantequilla, se denominó "bovólido".

Figura 6.

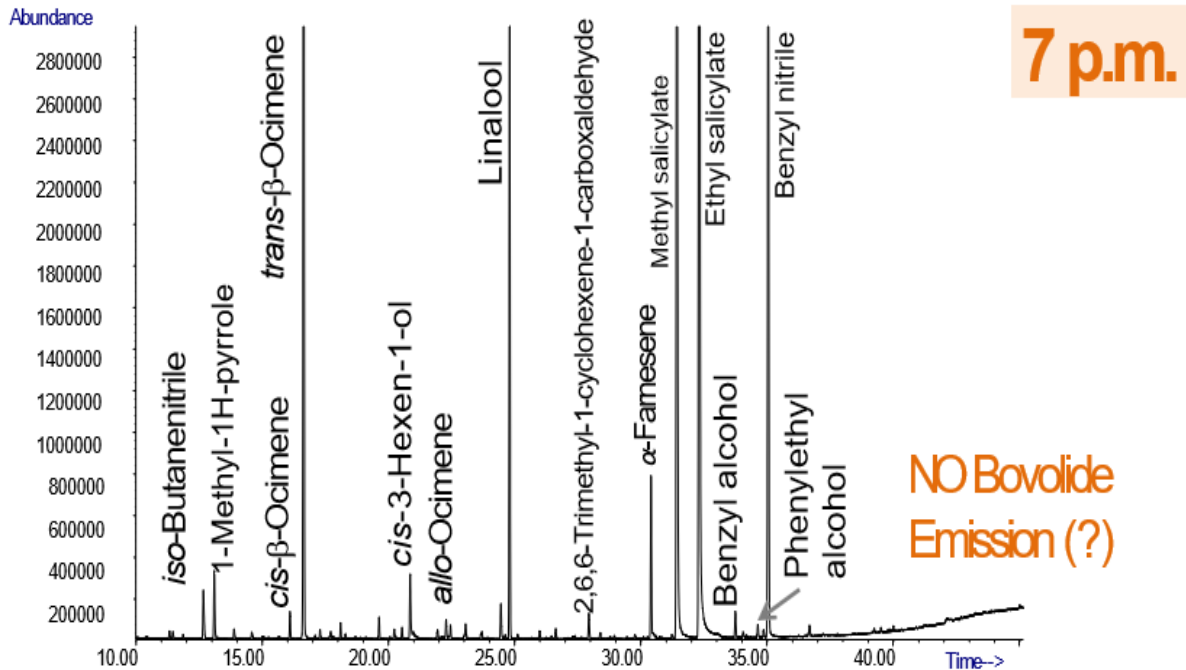
Perfil cromatográfico.



Nota: Tomado de HS-SPME-GC/MS de la fracción volátil de flores de *Erythroxylum novogranatense* empleando fibra de CAR/PDMS a las 7 a.m. Cromatograma presentado en el V Congreso Iberoamericano de Productos Naturales, XIII Congreso Colombiano de Fitoquímica, VIII Congreso Colombiano de Cromatografía (2016).

Figura 7.

Perfil cromatográfico.



Nota: Tomado de HS-SPME-GC/MS de la fracción volátil de flores de *Erythroxylum novogranatense* empleando fibra de CAR/PDMS a las 7 p.m. Cromatograma presentado en el V Congreso Iberoamericano de Productos Naturales, -XIII Congreso Colombiano de Fitoquímica, VIII Congreso Colombiano de Cromatografía (2016)

De acuerdo con los resultados obtenidos, podemos concluir que la emisión del aroma de las flores fue mucho más intensa por la mañana que durante la puesta del sol. Un compuesto muy inusual, bovólido, se detectó solo en la emisión de la mañana.

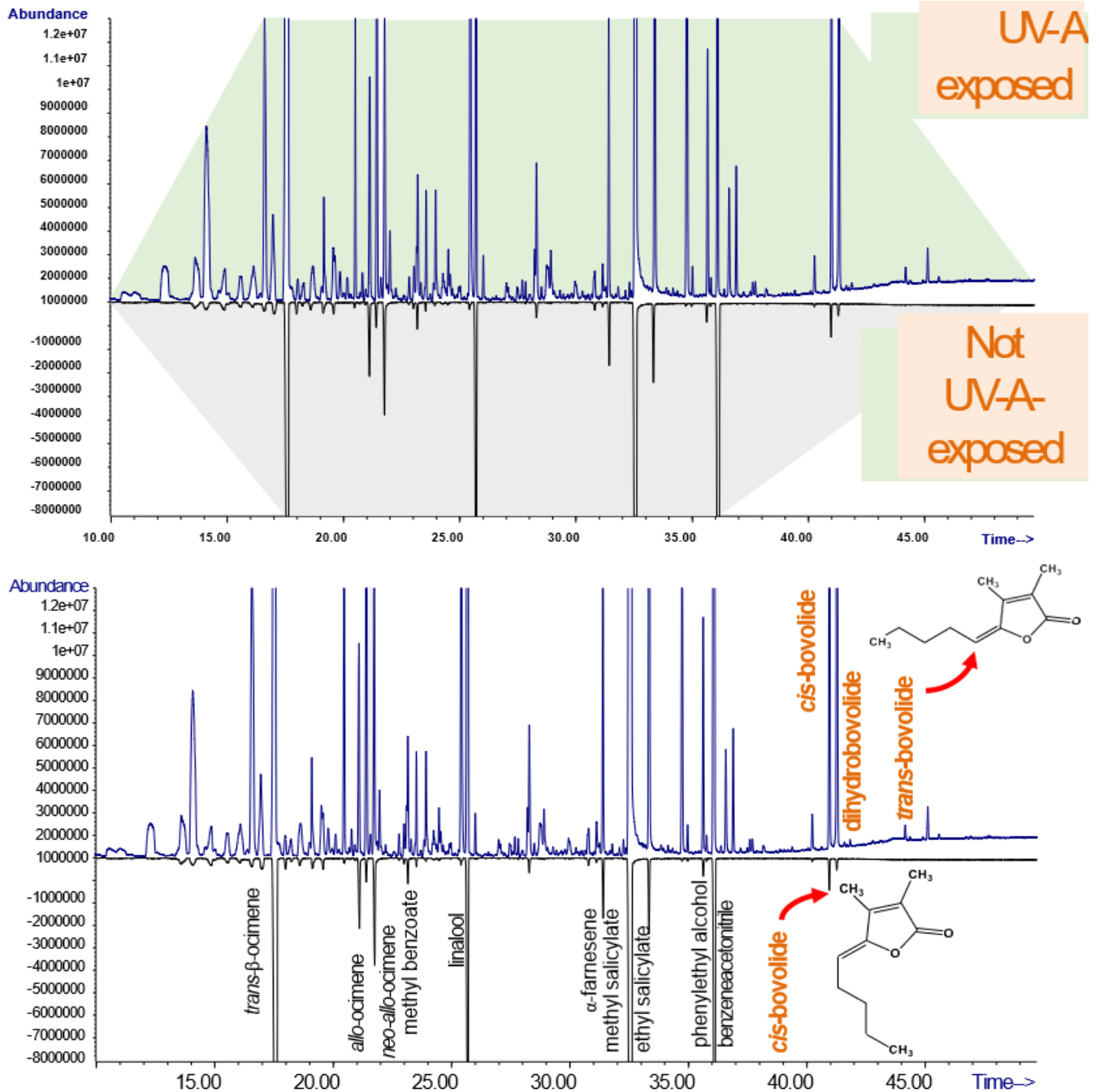
6.1.2 Análisis por HS-SPME-GC/MS de flores irradiadas

Se tomaron muestras de flores de coca, por separado en caja Petri, se colocaron en el equipo de irradiación Opsytec Dr. Gröbel a una longitud de onda de 365 nm (UV-A), se irradiaron con una energía de 36 Joule por 4 horas. En la figura 8 se aprecia la comparación entre los perfiles y

cromatográficos de flores irradiadas y no irradiadas.

Figura 8.

Comparación de los perfiles cromatográficos obtenidos en flores con y sin irradiación UV-A.



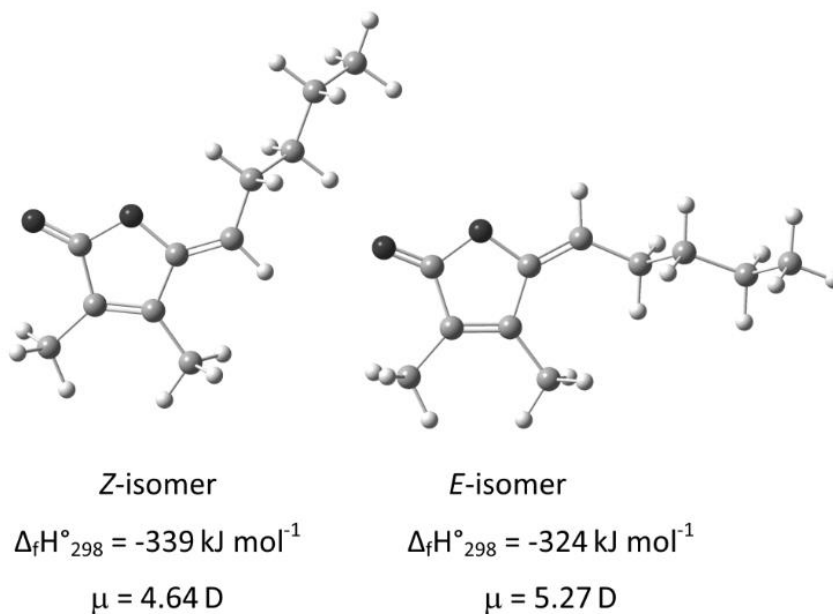
Nota: Tomado de Cromatogramas presentados en The 44th International Symposium on
Capillary Chromatography (2016).

Se pudo evidenciar que al irradiar las flores con luz UV-A se incrementa la presencia de algunos compuestos como lo son el benzoato de metilo, α -farneseno, salicilato de metilo y salicilato de etilo. De igual manera, podemos ver la aparición de los isómeros *cis*-, *trans*- de la molécula bovólido; es muy interesante encontrar este compuesto en la fragancia de las flores, pues por primera vez se encontró en la mantequilla y la leche [26].

El bovólido (2,3-dimetil-2,4-nonadien-4-olide) se detectó entre los volátiles emitidos por la mañana, pero estuvo ausente en las emisiones florales de la tarde. En las flores de coca, irradiadas con UV-A, aparecieron ambos isómeros de bovólido (*cis*- y *trans*-); su asignación cromatográfica (MS son virtualmente idénticos) se basó en cálculos mecánicos cuánticos, determinando momentos dipolares (*cis*- bovólido, $\mu=4.64$ D y *trans*- bovólido, $\mu=5.27$ D y los calores de formación (*cis*-bovólido olide, $\Delta H_f^\circ 298 = -339$ kJ mol⁻¹ y *trans*-bovólido, $\Delta H_f^\circ 298 = -324$ kJ mol⁻¹). El isómero *cis*- aparece en las flores no irradiadas en ($t_R = 40.92$ min), mientras que el isómero *trans*- fue formado bajo el efecto de la luz UV-A, es menos "estable" y eluye en la columna polar (DB-WAX, 60 m) después del isómero *cis* ($t_R = 44,13$ min), ya que su momento dipolar es mayor.

Figura 9.

Geometrías moleculares optimizadas correspondientes de los isómeros del bovólido.



Nota: Cálculos computacionales realizados por Eduardo A. Solano en Gaussian.

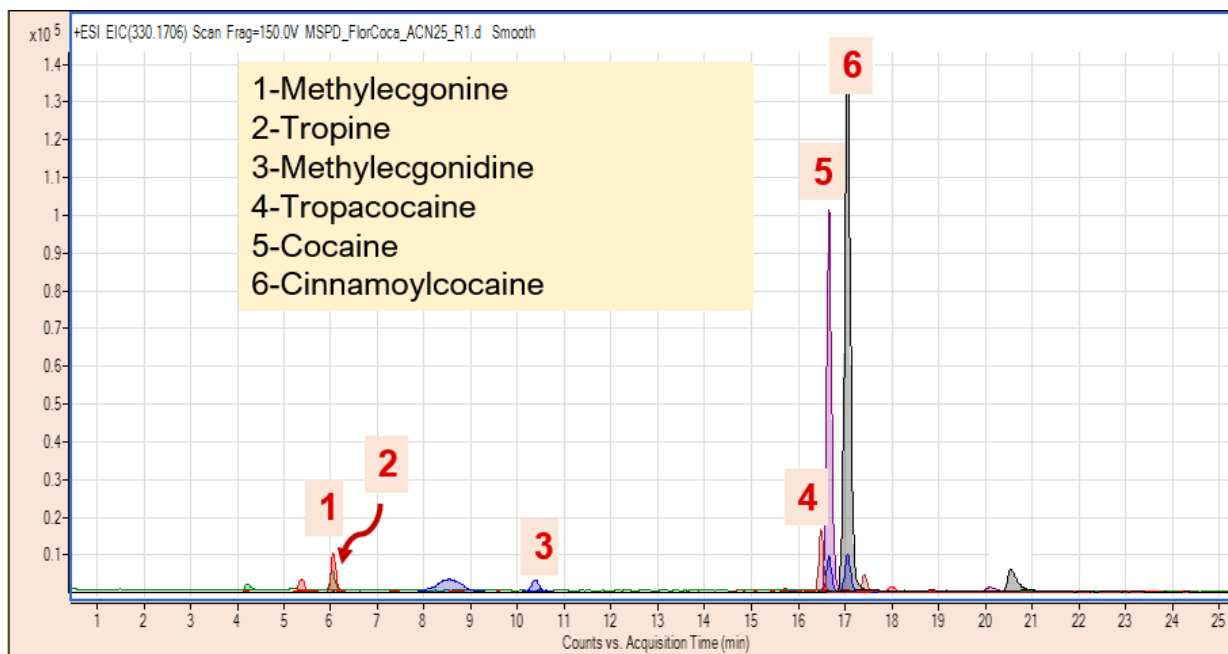
6.2 Análisis de alcaloides aislados por MSPD de flores de coca por LC-E-SI+-TOF-MS.

Se tomaron flores frescas de *Erythroxylum novogranatense* en horas de la mañana y de la tarde. Cada muestreo se hizo por duplicado. La extracción de la cocaína y cinamoilcocaína se realizó usando MSPD. Una muestra (0,25 g) de flores de *E. novogranatense* frescas se colocaron en un mortero, se adicionó carbonato de potasio (0,3 g), sílica gel (0,8 g) e *iso*-propanol (1 mL). La mezcla se maceró con el pistilo durante 10 min hasta obtener homogenización completa. Todo el homogenizado se transfirió a una jeringa de 10 mL que contenía una capa de algodón en el fondo.

Los analitos se eluyeron con diclorometano (5 mL). Para completar la elusión se hizo presión con el embolo de la jeringa. Se tomó una alícuota (20 μL) y se llevó a sequedad completa con flujo de nitrógeno. El residuo se reconstituyó en la fase móvil (1 mL de una mezcla 50:50 de ACN con 0,5% de ácido fórmico y agua con 0,5% de ácido fórmico). La Solución se filtró a través de una membrana PVDF de 0,22 μm y se inyectó al equipo LC-ESI-MS.

Figura 10.

Perfil característico del extracto por MSPD de flores de coca por LC-MS.



Nota: Cromatograma presentado en el Congreso Iberoamericano de Productos Naturales,

XIII Congreso Colombiano de Fitoquímica, VIII Congreso Colombiano de

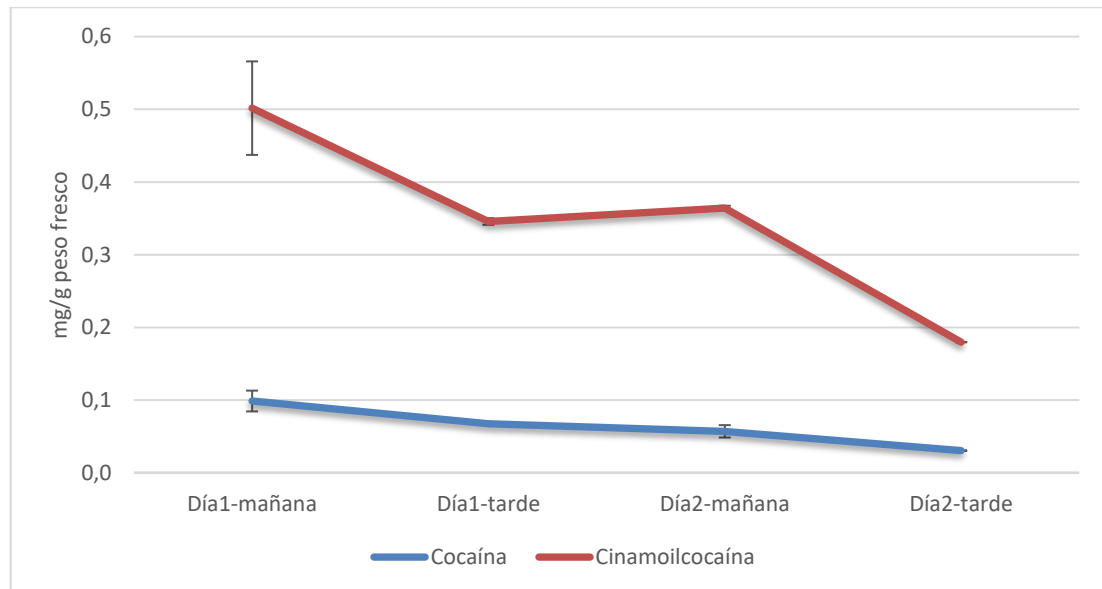
Cromatografía (2016).

El análisis se realizó para extractos obtenidos de flores recolectadas en diferentes horas del día, en los cuales se pudo observar que la cantidad de cocaína y cinamoilcocaína fue más alta en la mañana que en la tarde. En donde, en horas de la mañana el contenido de cocaína fue de 0,078 mg/g y el de cinamoilcocaína fue de 0,355 mg/g; para las horas de la tarde, el contenido de cocaína fue de 0,049 mg/g y el de cinamoilcocaína fue de 0.214 mg/g.

Por otro lado, se observó que la cantidad de cocaína y cinamoilcocaína disminuyó durante el tiempo que se hizo el muestreo. No es seguro si es el comportamiento generalizado de contenido de alcaloides después de que inicia la floración o se presentó por alguna condición específica del medioambiente en los días de evaluación.

Figura 11.

Variación en contenido de cocaína y cinamoilcocaína en flores de de E. novogranatense durante dos días de su floración.



Nota: Elaboración propia.

7. Conclusiones

La cantidad de volátiles fue 15 veces mayor por la mañana que por la tarde. Entre los volátiles figuran monoterpenos (ocimeno, linalol), derivados de ácidos benzoico y salicílico, y compuestos nitrogenados (nitrilos, pirroles). Entre los volátiles emitidos por la mañana, se detectó bovólido, que no apareció en emisiones florales por la tarde. En flores de cocas irradiadas por UV-A, aparecieron ambos isómeros de bovólido (*cis*- y *trans*-); su asignación cromatográfica (los MS eran prácticamente idénticos) se fundamentó en cálculos mecano-cuánticos, determinando momentos dipolares (*cis*-bovólido, $\mu = 4,64$ D; *trans*-bovólido, $\mu = 5,27$ D) y calores de formación (*cis*-bovólido, $\Delta H_f^{\circ 298} = -339$ kJ mol⁻¹; *trans*-bovólido, $\Delta H_f^{\circ 298} = -324$ kJ mol⁻¹). El isómero *cis*- aparece en flores no irradiadas ($t_R = 40,92$ min), mientras el isómero *trans*- se formó bajo el efecto de UV-A, es menos “estable” y eluye en la columna polar (DB-WAX, 60 m) después del isómero *cis*-, con $t_R = 44,13$ min, ya que su momento dipolar es mayor.

8. Recomendaciones

Continuar con el estudio sobre la química de floración y polinización de las plantas y de los volátiles florales, que atraen insectos; ya que esta atracción es la que genera la reproducción de las plantas y culmina en la formación de un fruto, alimento de los seres vivos.

9. Referencias Bibliográficas

- Brock, A., Bieri, S., Christen, P., Dräger, B. Calystegines in wild and cultivated *Erythroxylum* species. *Phytochemistry*, 66, 1231-1240 (2005).
- Calpena, S., et al. Toxics and atypical manifestations. Vasculitis associated with levamisole-adulterated cocaine. A case report. *Revista Colombiana de Reumatología* (2022)
- Capriotti, A. L., Cavaliere, C., Giansanti, P., Gubbiotti, R., Samperi, R., & Laganà, A. Recent developments in matrix solid-phase dispersion extraction. *Journal of chromatography A*, 1217(16), 2521-2532 (2010).
- Casale, J., Lydon, J., Apparent effects of glyphosate on alkaloid production in coca plants grown in Colombia. *J. Forensic Sci.* 52 (3), 573-578 (2007).
- Casale, J.F., Mallette, Illicit coca grown in Mexico: An alkaloid and isotope profile unlike coca grown in South America. *Forensic Chem.* 1-5 (2016).
- Casale, J.F., Mallette, J.R., Jones, L.M., Chemosystematic identification of fifteen new cocaine-bearing *Erythroxylum* cultigens grown in Colombia for illicit cocaine production. *Forensic Sci. Int.* 237, 30-39 (2014).
- Dudareva, N., Pichersky, E., *Biology of floral scent.* CRC Press (2006).
- Emche, S.D., Zhang, D., Islam, M.B., Bailey, B.A., Meinhardt, L.W. AFLP Phylogeny of *Erythroxylum* species. *Tropical Plant Biology.* 4 (2), 126-133 (2011).
- Johnson, E. L., Zhang, D., Emche, S.D. Inter- and infra-specific variation among five

Erythroxylum

- Laposchan, S., Kranenburg, R. and Arian C. van Asten. "Impurities, adulterants and cutting agents in cocaine as potential candidates for retrospective mining of GC-MS data." *Science & Justice* 62.1 60-75 (2022).
- Lardelli, G., et al. "A new γ -lactone found in butter." *Recueil des Travaux Chimiques des Pays Bas* 85.1: 43-55 (1966).
- Lydon, J., Casale, J.F., Kong, H., Sullivan, J.H., Daughtry, C.S.T., Bailey, B. The effects of ambient solar UV radiation on alkaloid production by *Erythroxylum novogranatense* var. *novogranatense*. *Photochem. Photobiol.* 85 (5), 1156-1161 (2009).
- Mallete J.R., Casale J.F., Colley V. L., Morello D.R., Jordan J. Changes in illicit cocaine hydrochloride processing identified and revealed through multivariate analysis of cocaine signature data. *Science & Justice.* 90-97 (2018).
- Messina, J.P., Delamater, P.L. Defoliation and the war on drugs in Putumayo, Colombia. *Int. J. Remote Sens.* 27 (1), 121-128 (2006).
- Nollet, L. M., & Toñdrá, F. (Eds.), *Food analysis by HPLC.*, Florida EE.UU., CRC Press, 3 edition, 726-738, (2012)
- Oliveira, S.L., Da Silva, M.S., Tavares, J.F., Sena-Filho, J.G., Luena, H.F.S., Romero, M.A.V., Barbosa-Filho, J.M., Tropane alkaloids from *Erythroxylum* genus: distribution and compilation of ¹³C- NMR spectral data. *Chem. Biodivers.* 7 (2), 302-326 (2010).
- Pawliszyn, J., Handbook of solid phase microextraction. *Elsevier* (1), 13-31 (2012).
- Plowman, T., The identification of coca (*Erythroxylum* species): 1860-1910. *Bot. J. Linn. Soc.*

84,329-353 (1982).

Potterat, O., Hamburger, M. Drug Discovery and development with plant-derived compounds.

Prog Drug Res. 65, 46-118 (2008).

Rijke, E., Out, P., Niessen, W. M., Ariese, F., Gooijer, C. & Udo, A. T. Analytical separation and detection methods for flavonoids. *Jornual of chromatography a*, 1112 (1-2), 31-63 (2006).

Stashenko, E., Martínez, J., Cárdenas, S., Saavedra, R., Durán, D. GC-MS study of compounds isolated from *Coffea arabica* flowers by different extraction techniques. *Journal of Separation Science*, 2013, 36(17) 2901-2914. DOI: <https://doi.org/10.1002/jssc.201300458>

Stashenko, E., Martínez, J., Durán, D., Córdoba, Y., Caballero, D. Estudio comparativo de la composición química y la actividad antioxidante de los aceites esenciales de algunas plantas del género *Lippia* (Verbenaceae) cultivadas en Colombia. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias*, 2014, Vol. XXXVIII (Supl.) 89-105. <https://doi.org/10.18257/raccefyn.156>

Stashenko, E., Martínez, J.R. Preparación de la muestra: un paso crucial para el análisis por GC-MS. *Scientia Chromatographica*. 3 (1), 25-48 (2011).

Stashenko, E., Martínez, J.R. Separar, fragmentar e integrar: la rutina de un análisis por GC MS. *Patrones de fragmentación de moléculas orgánicas. Scientia Chromatographica*. 2 (2), 5-12 (2010).

Vida J.C., Bertolín J.R., Bonel L., Asturisa L., Arcos-Martínez J., Castillo J.R., Rapid determination of recent cocaine use with magnetic particles-based enzyme immunoassays

in serum, saliva, and urine fluids. *J. Pharm. And Biomedical Analysis*. 54-61 (2016).

Weil, A. Coca leaf as a therapeutic agent. *Am. J. Drug Alcohol Abuse*. 5 (1), 75-86 (1978).