

Tesis de Posgrado

Determinación de los metabolitos producidos por hidrólisis de la cocaína (benzoilecgonina, metilecgonina y ecgonina) en orina de ratas intoxicadas en forma aguda, para su aplicación en ciencias forenses

Paviolo, María J. Lourdes

1982

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Paviolo, María J. Lourdes. (1982). Determinación de los metabolitos producidos por hidrólisis de la cocaína (benzoilecgonina, metilecgonina y ecgonina) en orina de ratas intoxicadas en forma aguda, para su aplicación en ciencias forenses. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1703_Paviolo.pdf

Cita tipo Chicago:

Paviolo, María J. Lourdes. "Determinación de los metabolitos producidos por hidrólisis de la cocaína (benzoilecgonina, metilecgonina y ecgonina) en orina de ratas intoxicadas en forma aguda, para su aplicación en ciencias forenses". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1982.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1703_Paviolo.pdf

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

DETERMINACION DE LOS METABOLITOS PRODUCIDOS POR HIDROLISIS
DE LA COCAINA (BENZOILECGONINA, METILECGONINA Y ECGONINA)
EN ORINA DE RATAS INTOXICADAS EN FORMA AGUDA, PARA SU
APLICACION EN CIENCIAS FORENSES.

María J. Lourdes Paviolo.

Tesis presentada para optar al título de
Doctora en Ciencias Químicas

A mis hermanos.

A mis sobrinos.

Agradezco muy especialmente a la Dra. Rosa Susana Graells de Kempny Directora de esta Tesis y Consejera de Estudios, por la fé depositada en mí, para la realización y concreción del presente trabajo, por hacerme comprender con firme convicción, la importancia y proyección del tema elegido y por su guía y consejos durante la ejecución y escritura del mismo.

Agradezco también a todo el personal docente y no docente de la Cátedra de Toxicología y Química Legal de esta Facultad, por su constante apoyo y su permanente y entusiasta colaboración.

INDICE

A) <u>OBJETIVOS</u>	1.-
B) <u>INTRODUCCION</u>	5.-
I. Generalidades: Coca-Cocaína.....	5.-
II. Cocaína: Fármaco y droga de abuso.....	20.-
III. Farmacodinamia de la cocaína.....	23.-
C) <u>METABOLISMO DE LA COCAINA</u>	28.-
I. Naya y col.....	28.-
II. Stewart e Inaba.....	36.-
III. Inaba y Stewart.....	41.-
IV. Mulé y Misra.....	45.-
D) <u>TECNICAS ANALITICAS EXISTENTES</u>	51.-
I. Berry y Grove.....	52.-
II. Fish y Wilson.....	52.-
III. Dvorchik y col.....	53.-
IV. Blake y col.....	54.-
V. Mueller y col.....	55.-
VI. Kaistha y col.....	56.-
VII. Wallace y col.....	58.-

VIII.	Von Minden y D'Amato.....	59.-
IX.	Javaid y col.....	59.-
X.	Lewis J.H.....	60.-
XI.	Valentour y col.....	61.-
XII.	Bastos. Dokosky y Mulé.....	62.-
XIII.	Naya, Misra y Mulé.....	63.-
XIV.	Valanjú y col.....	64.-
XV.	Moore J.M.....	65.-
XVI.	Koontz y col.....	65.-
XVII.	Fish y Wilson.....	66.-
XVIII.	Moore J.M.....	67.-
XIX.	Grafeo y col.....	67.-
XX.	Jatlow y col.....	68.-
XXI.	Otros trabajos sobre el tema.....	69.-
E)	<u>PROPIEDADES FISICOQUIMICAS DE LAS DROGAS EN ESTUDIO...</u>	71.-
F)	<u>DROGAS, REACTIVOS E INSTRUMENTAL.....</u>	73.-
I.	Drogas y reactivos.....	73.-
II.	Instrumental.....	74.-
G)	<u>PARTE EXPERIMENTAL.....</u>	75.-

I.	Inconvenientes en la recolección de muestras de orina.....	75.-
II.	Obtención y purificación de ecgonina.....	80.-
III.	Técnicas ensayadas y modificaciones.....	89.-
IV.	Empleo del acetato de etilo como solvente de extracción de los metabolitos hidrosolubles.....	100.-
V.	Estudios tendientes al logro de solventes o mezclas para el aislamiento de la ecgonina.....	104.-
VI.	Ensayo de otras técnicas de purificación.....	114.-
VII.	Aislamiento y evaluación de metilecgonina.....	116.-
VIII.	Empleo de la cromatografía gas-líquido.....	123.-
IX.	Empleo de cromatografía líquido-líquido de alta presión.....	129.-
H)	<u>ESQUEMA OPERATIVO ADOPTADO</u>	136.-
I.	Tratamiento de los animales y recolección de las muestras.....	140.-
II.	Aislamiento y determinación de la cocaína.....	142.-
III.	Aislamiento y determinación de la metilecgonina.	149.-
IV.	Aislamiento de la ecgonina y benzoilecgonina....	154.-
V.	Evaluación de la ecgonina.....	154.-

VI. Evaluación de la benzoilecgonina.....	158.-
VII. Resultados obtenidos.....	162.-
I) <u>DISCUSION Y CONCLUSIONES</u>	166.-
I. Discusión y conclusiones.....	166.-
II. Recomendaciones.....	177.-
III. Razones que fundamentaron la elección del tema de trabajo.....	178.-
<u>BIBLIOGRAFIA</u>	181.-

ERITHROXYLON COCA



OBJETIVOS

La cocaína constituye en la actualidad una de las principales drogas de tráfico y consumo ilícito. Su identificación y determinación en material biológico, especialmente en orina, es de primordial importancia en casos legales. Sin embargo su reconocimiento es poco frecuente en análisis toxicológicos de rutina, debido sobre todo, a su rápida y manifiesta degradación metabólica en condiciones fisiológicas normales, consecuencia de un proceso hidrolítico que afecta primordialmente a determinadas funciones.

Autores como Bastos y Hoffman (4), Javaid y col.(36-37) Mule y Misra(65-66) citan que menos del 1% de la cocaína ingresada, aparece no degradada en su estructura original en orina, revelándose a la vez la existencia de diversos metabolitos entre los cuales cabe citar primordialmente a la benzoilecgonina y ecgonina.

Por su parte Valanjú y col. (90) señalaron que en 150 casos estudiados, solo revelaron la droga inalterada en el 1% del total de las muestras examinadas, consignándose

en cambio la existencia de benzoilecgonina, único metabolito investigado en sus experiencias.

Wallace y col(93,94), en un estudio estadístico realizado en pacientes a los que se les suministró cocaína como anestésico local, demostraron que después de las 8hs. de su aplicación prácticamente no se encuentra la droga tal cual en orina, revelándose la benzoilecgonina metabolito exclusivamente investigado.

En mérito a las consideraciones precedentes de carácter general y dado la trascendencia del tema, se decidió realizar el respectivo estudio de la analítica toxicológica, como una efectiva contribución, destinada al reconocimiento de los derivados metabólicos de la cocaína en muestras de orina vinculados con las areas de la drogadicción y el "doping".

Nuestro esfuerzo responde a la necesidad de implementar técnicas analíticas de efectivo e indiscutible rendimiento para su consulta e incorporación a la metodología convencional.

A tal efecto ha sido necesario idear un esquema ana-

lítico que involucrará la extracción, purificación, identificación y evaluación de los principales metabolitos de la cocaína en muestras de orina.

Debido a que la búsqueda de tóxicos hidrosolubles no está totalmente integrada a los análisis toxicológicos de rutina, se consideró de utilidad estructurar una metodología racional a fin de contemplar aspectos poco explorados en la materia.

Acorde con el concepto aceptado por la mayoría de los investigadores los principales metabolitos de la cocaína son la benzoilecgonina y la ecgonina con marcadas propiedades hidrofílicas y, por lo tanto, de difícil aislamiento a partir de material biológico con elevado contenido acuoso. Ante ello resultaba ineludible otorgar especial prioridad a una metodología adaptada a las investigaciones de rutina, de excelente e indiscutible rendimiento, brindando a la vez las condiciones óptimas para la identificación y evaluación de los metabolitos resultantes.

Como culminación de los propósitos que reclamara nuestro estudio, se ha realizado la evaluación de cocaína

no transformada y sus metabolitos mayores en muestras de orina obtenidas de ratas tratadas en forma aguda con la droga original (cocaína).

Este estudio permitió conocer los porcentajes de excreción de los derivados en estudio y la importancia que adquiere para el químico toxicólogo el integrar a su trabajo de rutina la investigación de drogas orgánicas hidrosolubles.

INTRODUCCION.

Generalidades: Coca-Cocaína.

La cocaína es un alcaloide extraído de las hojas del arbusto leñoso "coca", originario del Continente Americano, cuya clasificación taxonómica es la siguiente:(100)

Reino: Vegetal.

División: Angiosperma.

Clase: Dicotiledoneas.

Orden: Corolianos (Suborden Geraniales).

Familia: Erietroxiláceas.

Género: Eritroxylon.

Especie: Coca.

Variedades: Bolivianum Burn.

Novogratense Morris.

Denominación común: Eritroxylon Lamark.

Es de conocimiento general que en los ritos sagrados de todos los pueblos primitivos existen una o más plantas que juegan un papel importante en sus mitos y que tienen por virtud ya sea explicar el origen de su aparición o bien

de hacer resaltar alguna de sus propiedades más salientes. Por estas circunstancias las mismas disfrutaron, a través de los tiempos, de la consideración de "plantas sagradas". Esto, unido a sus propiedades y virtudes hizo que se arraigaran, florecieran y fructificaran en el fértil campo del mito y la leyenda sin desconocer por cierto que, en la observación del hombre primitivo hubo frecuentemente una coincidencia con lo que mucho más tarde sería establecido por la investigación científica.

Una de ellas es la "coca" considerada por el fundador de la dinastía de los Incas, Manco Capac (siglo XII) como "la planta sagrada, que consuela al afligido, calma la sed del sediento, sacia al hambriento y da fuerzas al cansado" y enseñó a sus integrantes a servirse de ella.

La "coca" nombre vulgar que ha trascendido hasta nosotros, deriva del Aimará "Khoka" que quiere decir "la planta por excelencia", "la primera entre todas".

El uso como masticatorio de sus hojas secas, es habitual entre los indígenas del altiplano argentino, Perú, Bolivia y ciertas tribus del sud de Colombia, en las fuentes del Madre

de Dios y del alto Amazonas. En Europa las primeras noticias sobre la "coca" o "hayo", como la denominan en Venezuela, se tuvieron en el año 1500, llevadas por la expedición que recorrió la costa norte de Sud América. Pocos años después, a raíz de la conquista del Imperio de los Incas por Pizarro, se tuvieron datos más precisos sobre el uso de las hojas de coca, como masticatorio habitual y de las características de la planta. Además con respecto a la forma de su utilización con el agregado de una sustancia alcalina (la "yista", "clukta" o "tokkra") como complemento indispensable.

Recien en 1750 llegaron a Europa las primeras muestras auténticas de la planta, que sirvieron de tipo para su clasificación definitiva.

El *Erythroxyton Coca Lamarck*, es un arbusto que puede alcanzar de uno a tres metros de altura con flores blancas, frutos ovales de color rojo y hojas enteras, cortamente pecioladas, ovales, de 2 a 7 cm de largo y 1,4 a 4 cm de ancho, con la nervadura central prominente y otras dos líneas curvas colenquimáticas a un tercio del borde a la nervadura central.

La hoja es la parte de la planta que contiene la mayor cantidad de principios activos, y es empleada tal cual para la extracción de su principal alcaloide, la cocaína. La coca se cultiva en todos los valles calientes de la cordillera andina, hasta una altitud de 2.200 m sobre el nivel del mar, desde Bolivia hasta Méjico. Desde fines del siglo XIX se ha establecido su cultivo en las comarcas septentrionales de Java y Ceilan. La variedad de Java es de hojas pequeñas muy rica en alcaloides totales, considerablemente superior al de la mejor coca Americana.(89)

Se la propaga a partir de semillas que se siembran inmediatamente de recogidas, en un suelo suelto y húmedo, en almácigos al abrigo del sol. La brotación se produce generalmente entre los 10 y 15 días. Al cabo de un año las plantas, ya de una altura de 40-50 cm, se transplantan a su sitio definitivo en el terreno que especialmente se ha preparado para formar el "cocal", el que frecuentemente ocupa el talud de una montaña y forma una serie de angostos escalones donde sólo se dispone una hilera de plantas, sostenidas por pequeños muros de piedra, algo más alto, los que no solo mantienen

la tierra o impiden su desecación, sino que también protegen las raíces y el cuello del arbusto de la acción directa de los rayos solares.

Otras veces el cocal se establece en un terreno llano, donde en surcos (*wachos*), trazados a cordel, separados por pequeños bordes de piedra y tierra bien apisonada (*umachas*), se plantan las hileras de arbustos. Al año y medio o dos años después, el cocal da su primera cosecha, producción que continúa por espacio de cuarenta años y aún más.

La recolección es anual; la primera cosecha se efectúa a expensas de las hojas inferiores, por cuya razón recibe el nombre de "Quita Calzón"; las siguientes, que son tres, excepcionalmente cuatro, se denominan "Mitas" y se efectúan en marzo (mita de Marzo), a fines de junio (mita de San Juan), y a fines de octubre o principio de noviembre (mita de los Santos).

Las hojas cuidadosamente recolectadas se desecan al abrigo del sol y luego son embaladas en sacos apropiados.

Las hojas de coca contienen alcaloides en proporción que varía de 0,5 a 1,5%.

Las hojas provenientes de cultivos de Java son más ricas en alcaloides totales que las variedades bolivianas, pero en cambio en éstas la cocaína, que es el principal alcaloide representa el 70-80% de los alcaloides totales mientras que en las de Java, sólo el 50%.

En el mercado circulan dos clases de hojas de coca; Coca Boliviana o de Huamico, del *Erythroxylon Coca* y la Coca Peruana o de Truxilio, del *Erythroxylon Truxilense*, esta última cultivada actualmente en Java.

Las hojas de coca contienen como principios activos alcaloides que corresponden a tres grupos principales (46).

A) Metil acil ecgonina.

1) Cocaína (Metil Benzoilecgonina).

2) Cinamoil-cocaína (Metil cinamoilecgonina).

3) y truxilinas (Metil ó truxiloilecgonina).

B) Tropeínas (esteres de la pseudotropina).

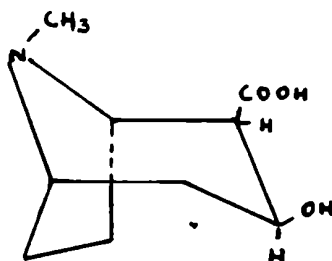
1) Tropococaína (benzoil pseudotropina).

C) Higrinas (derivados de la metil pirrolidina).

1) Higrina.

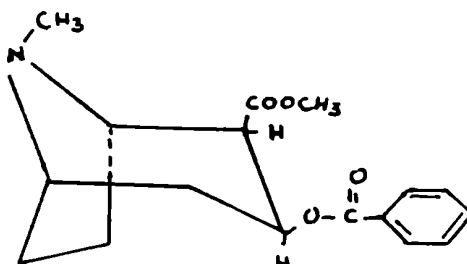
2) Cuzco higrina.

METIL-ACIL-ECGONINAS



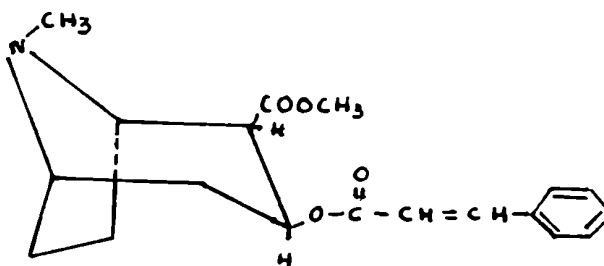
(a)

ecgonina



(b)

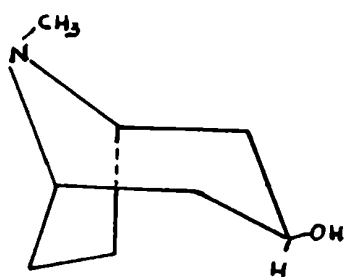
metil-benzoil-ecgonina
(cocaina)



(c)

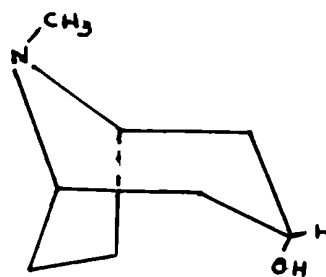
metil-cinamoil-ecgonina

TROPEINAS (ésteres de la pseudotropina)



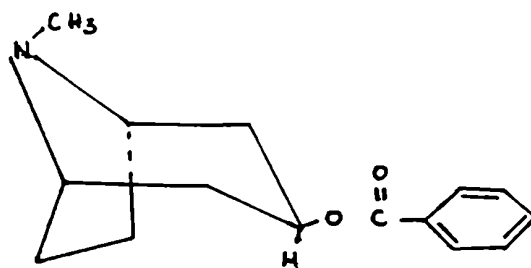
pseudotropina (cis)

(a)



tropina (trans)

(b)

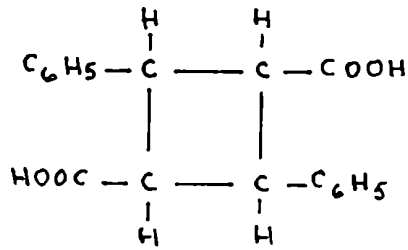


tropococaina

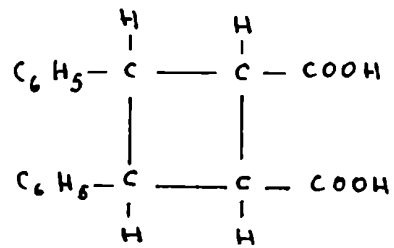
benzoil-pseudotropina

(c)

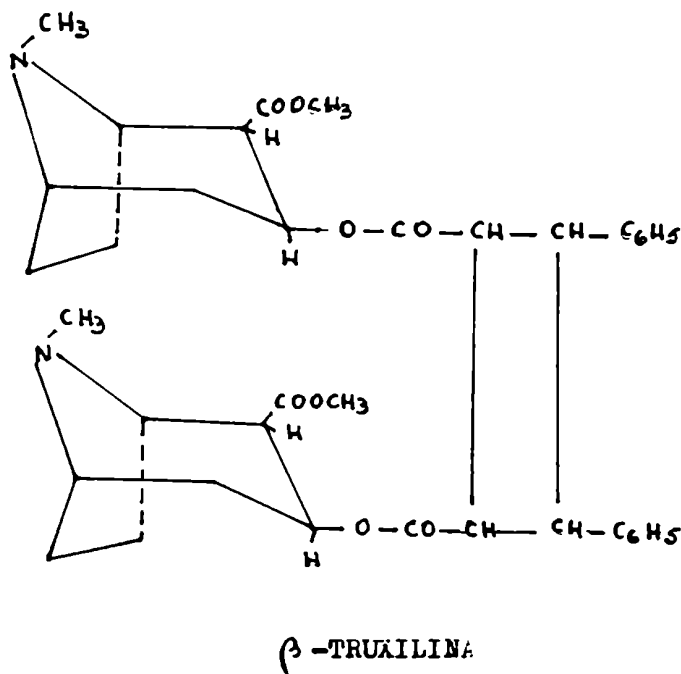
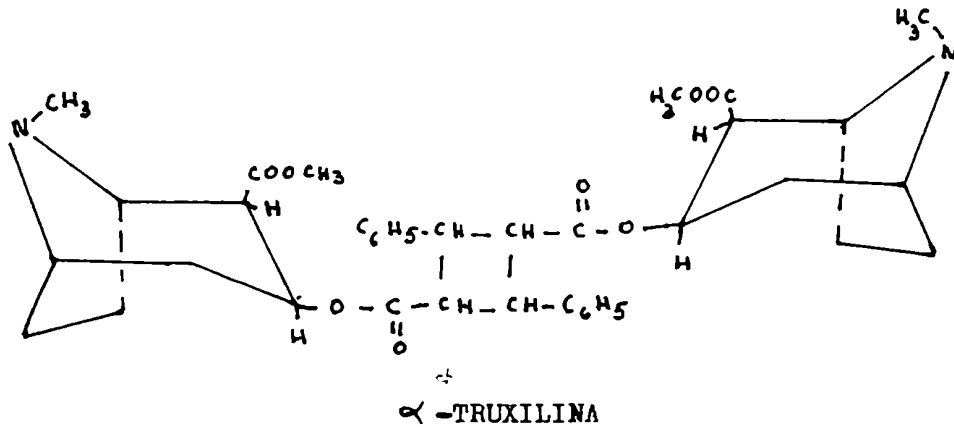
TRUXILINAS (ésteres del ácido truxílico)



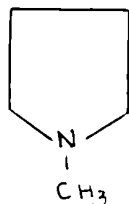
AC. α -TRUXILICO



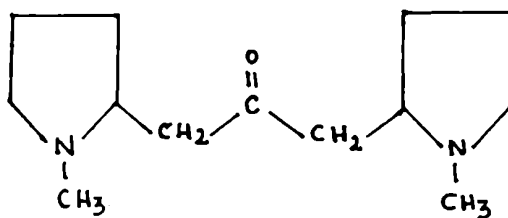
AC. β -TRUXILICO



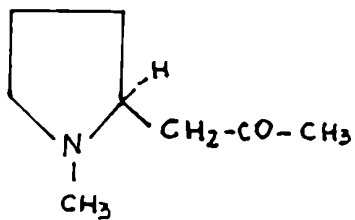
HIGRINAS (derivados de la metilpirrolidina)



METILPIRROLIDINA



CUZCOHIGRINA



β-HIGRINA

Hemos ya mencionado el empleo de la hoja de coca como masticatorio entre los pobladores de muchas de las regiones de cultivo en América del Sud, acto que recibe el nombre de "coquec".

Aunque existen autores que manifiestan que la masticación de las hojas de coca en dosis convenientes son beneficiosas para el mantenimiento de la vida en las grandes altitudes, otros entes internacionales expertos en salud, califican este acto como una toxicomanía y recomiendan medidas para erradicarlas en forma definitiva.

Los adictos al hábito del "coqueo" añaden al "acullico" (hojas de coca) que es introducido en la boca, una sustancia alcalina que tiene por objeto facilitar la extracción de la cocaína, la que una vez liberada es absorbida lentamente.

El investigador Montesinos, en un trabajo publicado en el año 1965 manifiesta "que si bien la cocaína aplicada por vía inyectable o aspiración nasal, produce efectos altamente estimulantes, éstos no son observados en las masticadores de hoja de coca, quienes por el contrario, se encuentran deprimidos y con marcadas deficiencias psicomotoras. El citado

autor observa que cuando la cocaína es ingerida por vía bucal toma lugar un completo proceso metabólico e hidrolítico. La "llipta" libera el alcaloide a su estado básico y este es transportado por la saliva siguiendo el curso del tracto gastrointestinal. La hidrólisis de la cocaína comienza en la boca por la acción de la "llipta" y de la saliva y continúa desdoblándose por el canal gástrico. Montesinos en su publicación cita datos obtenidos por García Parra con respecto a las proporciones en que es hidrolizada la cocaína, por los distintos componentes del sistema digestivo: (69)

20,38% por saliva obtenida artificialmente.

5,48% por jugo gástrico artificial.

26,39% por jugo pancreático natural de perro.

33,9 % por jugo pancreático y bilis naturales.

8,55% por jugo intestinal de perros.

71,71% por extracto de mucosa intestinal.

(No se mencionan tiempos, ni forma de realización de las experiencias).

De los datos consignados por el autor se observa que es un tracto intestinal, o mejor aún en la pared del mismo,

que la cocaína sobrelleva la más importante hidrólisis. Estos datos son coincidentes con el del toxicólogo francés Kohn Abrest (46).

Montesinos (61) hace referencia también a la acción del hígado sobre la cocaína, y considera este órgano como el que posee mayor capacidad para metabolizar o hidrolizar ésteres. Indica además, la presencia de un sistema enzimático específico descubierta por Heim (29): "la cocainaesterasa".

La "Comisión de Información sobre la Hoja de Coca", en estudios realizados sobre el hábito del coqueo manifiesta que los adictos consumen diariamente un promedio de 50 g de hojas de coca, repartidas en tres "tomas". Teniendo en cuenta que el contenido de cocaína en las hojas es de aproximadamente 0,7%, resulta una ingesta real del alcaloide de 350 mg, la que si fuera completamente absorbida por el torrente sanguíneo, produciría una estimulación similar a la observada cuando se administra por vía parenteral. La dosis mencionada excede la cocaína a través de aspiración nasal, llegando a ser muchas veces tóxica, pero como no se observan en los coqueros ni estimulación cortical apreciable, ni efectos tóxicos, es

lógico pensar que "algo le ocurra" a la cocaína ingerida.

Entre otros autores que se dedicaron al estudio sobre el "mascado de hojas de coca" se mencionan a Hanna y Hornich (27), quienes efectuaron una investigación sobre las perspectivas biológicas y sociales del "coqueo" entre los aborígenes del altiplano. Se transcriben algunos de los conceptos más notorios de la investigación de referencia: "Biológicamente el uso de "coca" parece reducir la pérdida de calor del cuerpo en ambientes fríos, incrementa la habilidad para el trabajo y es útil en el mantenimiento de su adaptación a las altas planicies".

Autores como Zapata Ortiz (1944)(99) Reisenberg(1944) (78), Chambochumbi(1949)(14), han observado que la estimulación fisiológica en "coqueros" después de 1 h del mascado es comparable con la estimulación producida por la cocaína, considerando por lo tanto al "coqueo" y la adición al alcaloide, como un mismo problema.

Sin embargo otros autores informan que los "mascadores" no presentan como los cocainómanos, deseo insaciable por la droga, paranoia, ni el deterioro mental, que caracteriza a

estos últimos. No se comprobaron modificaciones en el comportamiento y fisiología de los mascaradores. Monge (61) reporta que el hábito fué abandonado por indígenas, cuando se proveyó a los mismos alimento bien balanceado y manifiesta que el "coqueo" es parte de su adaptación a la vida en las alturas.

Se encontró relación entre la altitud y el consumo de "coca", y en este sentido hay autores que advierten la influencia de la proximidad a las plantaciones. Otros suponen que dicha costumbre se debe a las dificultades en la vida a dichas alturas.

Los nativos creen que la "coca" alivia el hambre, reduce la fatiga y provee calor. La consideran indispensable para llevar a cabo las funciones normales y su consumo es más intenso en las estaciones frías. Otra alternativa sería que los indios de las altas mesetas viven en un estado cultural aborígen dentro del cual, la coca desempeña un rol importante, mientras que en las ciudades occidentales a menor altitud no existe la tradición del mascado. Así el uso de la "coca", puede ser la continuación de una cultura tradicional entre los nativos de las alturas o bien la incorporación de dicha

planta en la dieta puede constituir una más eficiente adaptación al stress de la altura, hambre, fatiga y frío. Aunque los indígenas consideran a la "coca" como un alimento, el valor potencial nutritivo de la misma es desestimado por algunos investigadores. Sin embargo Baker y Mazess (1963)(7) encontraron que la "llipta" puede ser una importante fuente de calcio. Recientes trabajos de James A. Duke (16) han alterado el punto de vista nutricional, ya que después de un exhaustivo análisis comprobó que las hojas de coca de Bolivia poseen un significativo número de nutrientes esenciales.

COCAINA: FARMACO Y DROGA DE ABUSO.

El empleo terapéutico de la cocaína estuvo reservado a su uso como anestésico local, ya que produce un bloqueo en la conducción de las sensaciones dolorosas, provocando al mismo tiempo una marcada vasoconstricción que impide la absorción masiva de la droga, que de no ser así resultaría mortal. La cocaína en su uso como anestésico local ha sido reemplazada por drogas sintéticas exentas de toxicidad.

Las intoxicaciones fatales producidas por el uso de

cocaína se debe a su acción directa solo el miocardio (muerte súbita).

El consumo ilícito de este alcaloide como droga de abuso se acrecienta en forma alarmante debido a sus propiedades estimulantes más acorde al ritmo y exigencias de la vida moderna. La droga produce, siempre al comienzo, una sensación de bienestar, "cebo" irresistible para una intoxicación voluptuosa. Los caminos que conducen a las toxicomanías son siempre los mismos: miedo al dolor, ansias de placer o vía de escape a una realidad agobiante, condiciones estas entre otras que en la vida moderna, están dadas ampliamente.

El tiempo actual, dominado por la angustia y el temor, agudiza la necesidad de la evasión psíquica y en ciertos casos de personalidad psicopática, el individuo se siente impulsado a refugiarse en la droga, que le brinda seguridad, olvido, excitación o éxtasis.

Hasta hace pocos años se consideraban como características ligadas al uso de drogas el desarrollo de las dependencias psicofísicas **y de la tolerancia.**

Las escuelas más modernas "definen al abuso compulsivo

de Drogas" como un modelo de comportamiento frente al uso de una droga, caracterizado por un incontrolado empleo de la misma por la ansiedad para el logro de su provisión y por una alta tendencia a la recaída".

"Adicción" de este modo se refiere a la posición que ocupa la droga en la vida total del sujeto adicto y se evalúa esencialmente a nivel cuantitativo. En muchos casos no es posible establecer con precisión hasta que punto el uso compulsivo debe ser considerado como "adicción". Adicción en este sistema de coordenadas no puede ser usado intercambiablemente con dependencia física. Es posible un estado de dependencia física de drogas sin adicción, y ser adicto sin ser dependiente físico: lo que debe tomarse en cuenta es la importancia de la droga en la vida de un individuo, el que no puede desarrollar su vida normalmente sin administrarse una sustancia cualquiera, que no es necesaria para el mantenimiento de sus funciones vitales. El drogadicto encuentra en la cocaína estimulación de sus fuerzas, de su capacidad intelectual, de su sensibilidad emotiva, la que le incrementa la captación de estímulos placenteros; en resumen,

amplifica sus posibilidades psicofísicas, instalando en cambio un estado potente de agresividad, pérdida de las inhibiciones y exaltación de su propio valer.

Farmacodinamia de la cocaína.

La cocaína actúa a distintos niveles del organismo(13,22).

Estimula el S.N.C. en forma descendente, siendo la primera y principal acción sobre la corteza.(98).

En el hombre esta acción se manifiesta por verborragia, falta de descanso y excitación. Existe alguna evidencia que la resistencia mental sea incrementada.

También puede aumentarse la capacidad para el trabajo muscular, probablemente debido a la pérdida de la sensación de fatiga, características de otros estimulantes. En animales la acción cortical se manifiesta principalmente por incremento de la actividad motora. Después de pequeñas cantidades de cocaína, la actividad motora aparece bien coordinada, pero cuando las dosis se incrementan los centros inferiores están también afectados, lo que ocasiona temblores y movimientos convulsivos. Estos efectos de estimulación pueden ser

el resultado de la depresión de las neuronas inhibitoras del sistema nervioso central.

Existe, además, estimulación de los centros respiratorios vasomotores y del vómito.

La estimulación central es luego seguida por depresión. Los centros superiores son los primeros en deprimirse y esto puede ocurrir cuando las porciones más bajas del axis cerebroespinal están aún excitadas. En este caso la muerte se produce por depresión de los centros bulbares.

No hay evidencia que la cocaína incremente la fuerza de la contracción muscular, actuando directamente sobre el músculo esquelético. El alivio de la fatiga por cocaína, parece ser el resultado de la estimulación central, la que encubre la sensación de cansancio, como ocurre con otros estimulantes centrales.

La cocaína es marcadamente pirogénica (22) y se considera que son dos los factores que contribuyen a la elevación de la temperatura corpórea:

a) La actividad muscular incrementada que acompaña la gran estimulación inducida por la droga, aumenta la producción de calor.

b) La vaso constricción periférica, que impide la pérdida de calor por irradiación.

La evidencia que la cocaína tiene acción directa sobre los centros de la regulación térmica está dado por los estados febriles, que son comunes, y es uno de los principales síntomas de la intoxicación aguda.

La cocaína actúa también sobre el sistema nervioso autónomo, y tiene la propiedad de potenciar tanto las respuestas excitatorias como las inhibitorias de las fibras simpáticas post-ganglionares. Al respecto se pensó en un principio que la acción simpatico-mimética de la cocaína se debía a su propiedad de inhibir a la monoaminoxidasa intraneural, pero este argumento no resultó valedero ya que otras I.M.A.O. (inhibidores de la mono amino oxidasa) (22) más poderosos no producían tanta excitación.

Axelrod (22) demostró que sólo una pequeña parte del neurotransmisor liberado, es destruído por oxidación, y que la mayor parte es activamente reabsorbido por la terminal axonal que lo liberaría. La cocaína previene la "retoma" de las aminas biógenas desde el espacio sináptico, mecanismo

éste que se efectúa por transporte activo y difusión pasiva. El resultado es que el transmisor simpático liberado o inyectado persiste cerca de los receptores del órgano efector en altas concentraciones y por largo tiempo, produciendo de este modo fenómenos de exageradas respuestas. La cocaína es el único anestésico local que tiene esta propiedad, lo que explicaría su acción vasoconstrictora y midriática. Su acción dilatadora sobre la pupila no es por inhibición del músculo esfinteriano, sino que la midriasis es el resultado de la potenciación simpática del músculo radial del iris.

Los síntomas de la intoxicación aguda con cocaína están principalmente referidos al S.N.C. (sistema nervioso central). Los pacientes rápidamente se excitan, aparecen ansiosos, confundidos, con reflejos incrementados y cefaléa. El pulso se acelera, la respiración se torna irregular, y se produce hipertermia. Las pupilas están dilatadas. Aparecen a continuación náuseas, vómitos y dolor epigástrico: sensación de hormigueo en la piel, delirio con convulsiones. La muerte ocurre por paro respiratorio o depresión bulbar.

En otras ocasiones la intoxicación aguda por cocaína

curso en forma muy rápida (22), la muerte es casi instantánea. Los pacientes, a menudo colapsados y agonizantes, mueren antes de toda atención médica. Esta forma se debe a una absorción rápida y masiva de altas concentraciones de la droga que intoxica el músculo cardíaco en forma directa e irreversible.

METABOLISMO DE LA COCAINA.

El estudio del destino y metabolismo de la cocaína en hombres y animales, fue motivo de numerosas contribuciones y de entre ellas se seleccionaron algunas de las más recientes para su debida apreciación y comentarios.

I) Naya y col. (67, 68, 80) trabajando con (³H) cocaína, estudiaron el destino y biotransformación del alcaloide, intoxicando ratas en forma aguda y crónica.

Para su adecuado conocimiento se describen algunas de las experiencias realizadas sobre el particular y los resultados obtenidos.

a) Intoxicación de ratas en forma aguda por vía I.V.

Se inyecta la droga a razón de 8 mg/kg.

Se establece que el tiempo para lograr la concentración máxima en cerebro y plasma es de 15 min y su desaparición total en ambos medios requiere 6 hs. La vida media de cocaína registrada en cerebro fué de 15 min y en plasma de 20 min.

b) Intoxicación de ratas en forma aguda y crónica por vía subcutanea.

Se inyecta a razón de 20 mg/kg.

Se observa que el "pico" máximo de concentración en cerebro, plasma y otros tejidos se alcanza a las 4 hs. Las excepciones fueron: corazón que se alcanzó a los 30 min. y tejido graso a las 2 hs. Estas observaciones fueron similares para ambos grupos (agudos y crónicos).

La relación de concentraciones cerebro/plasma fué algo más alta en crónicos, lo que indica mayor afinidad de la droga por los tejidos.

Es notable observar que la cocaína no persiste en cerebro de ratas intoxicadas en forma aguda, en cantidades mensurables contrariamente a lo que ocurre con las tratadas en forma crónica en los que se puede detectar la droga en cerebro y otros tejidos, mucho después de su desaparición del plasma.

Se encontraron metabolitos de la cocaína en concentraciones significativas en ambos grupos (agudos y crónicos), tanto en cerebro como en plasma.

En cuanto a la excreción de cocaína libre y radioactividad total, se consignan los siguientes valores:

Excreción urinaria de cocaína libre en porcentaje de

la dosis inyectada (20 mg/kg vía s.c.) en un período de 7 días:

agudas 1,2%

crónicas 1,5%

Se consigna que el máximo de excreción se produjo en las primeras 24 hs.

Excreción urinaria y fecal de radioactividad total expresada como porcentaje de la dosis inyectada (20 mg/kg vía s.c.), en un período de 7 días.

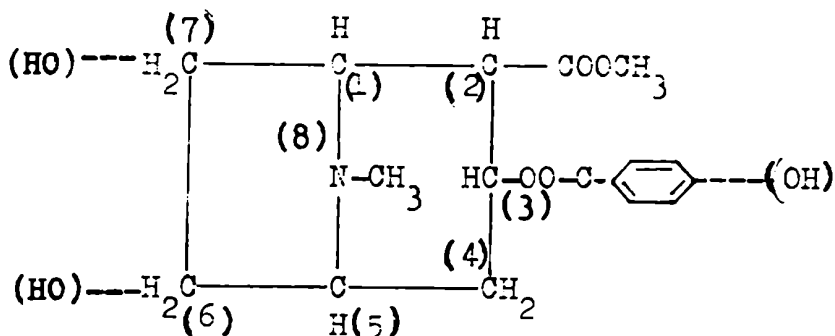
	agudos	crónicos
Urinaria	49,3%	51,6%
Fecal	22,1%	35,9%
Urinaria más fecal	71,4%	87,5%

En orina se evidenciaron, además de las pequeñas cantidades de cocaína los siguientes metabolitos: benzoilecgonina, benzoil norecgonina, metilecgonina, y ecgonina.

No se detectó la presencia de norcocaína ni norecgonina.

Los autores obtuvieron sugestiva evidencia de la pre-

sencia de un metabolito fenólico (por hidroxilación del anillo aromático) y de otros dos no fenólicos, hidroxilados en posición 6 y 7 con características polares (59).



Las observaciones experimentales de carácter enzimático efectuadas mediante la utilización de glucuronidas, sulfatasa y peptidasas, demostraron que los metabolitos hidroxilados no aparecen en forma conjugada (sulfo y glucurono conjugación), como es de comprobar en cambio en otros procesos metabólicos.

No descartar la posibilidad de que puedan además producirse algunos otros metabolitos aún no identificados.

c) Otras observaciones efectuadas.

El hecho de que los valores de cocaína ligadas a proteínas plasmática son muy bajas, y que la droga tiene marcadas características lipofílicas, hace suponer que sea

su unión a los tejidos la que induzca su biotransformación. Complementariamente determinaron la presencia de norcocaína en cerebro de ratas durante un ataque convulsivo, producido por la administración de una dosis de cocaína de 10 mg/kg por vía I.V. Este metabolito mostró ser farmacológicamente activo en cerebro. En el tejido cerebral, además, se originan benzoilecgonina, benzoilnorecgonina y ecgonina.

Ensayos efectuados "in vitro" demostraron que las enzimas microsomales hepáticas convirtieron las cocaínas en benzoilecgonina y benzoilnorecgonina.

Inyecciones intracisternales de norcocaína benzoilnorecgonina y benzoilecgonina en ratas produjeron una potente estimulación. Sin embargo los dos últimos metabolitos, de características polares, no produjeron efecto cuando se administraron por cualquier otra vía. Estos metabolitos, debido a su hidrosolubilidad, no muestran aptitud para atravesar la barrera hematoencefálica. Así mismo, ellos forman complejos moleculares con Ca^{2+} . Estos complejos moleculares, conjuntamente con la movilización del calcio unido a la membrana neuronal, pueden jugar un rol importante en la potente estimulación que se produce después de la

inyección intracisternal de los citados metabolitos.

Es sabido que la disminución de calcio aumenta la permeabilidad de la membrana al Na^+ y K^+ . Bajos niveles de Ca^{2+} llevan el umbral de excitabilidad cercano al potencial de reposo. Como la polaridad de la norbenzoilecgonina y benzoilecgonina, impide su paso a través de la barrera hematoencefálica en cantidades suficientes, es necesario entonces la transformación de cocaína y norcocaína en dichos metabolitos en el interior del tejido cerebral para lograr los niveles óptimos que posibiliten así sus efectos estimulantes.

La liposolubilidad y penetración a través de las membranas de la cocaína juega un rol importante en sus acciones farmacológicas. La movilización de la droga desde su sitio de aplicación subcutánea (en crónicos y agudos) es muy rápida, a pesar de la vasoconstricción local que pro-

No se observó un destino selectivo o persistencia de la droga en cerebro u otros tejidos, y el compuesto desaparece rápidamente de cerebro y plasma después de la inyec-

ción I.V. ó S.C. en animales tratados en forma aguda.

Un hallazgo significativo fué el importante depósito de la droga en tejido graso de los animales tratados crónicamente, en contraste con los agudos. La penetración de cocaína en tejido graso de intoxicados crónico puede producir una lenta y prolongada liberación tiempo después de su desaparición en plasma y de ese modo ser responsable de su prolongada persistencia en cerebro y tejidos de sujetos crónicamente intoxicados.

Se reconoció al hígado como el primer y principal lugar de detoxificación de la cocaína. Los estudios de Naya y col(67,68) ofrecen evidencia que la cocaína es metabolizada rápidamente y que solo pequeñas cantidades de la droga tal cual, no degradada, aparece en orina y heces. La excreción de los productos de degradación de la cocaína, expresada como una medida de la radioactividad que se elimina persiste por varios días.

Agrégase que la norcocaína, reconocida como metabolito farmacológicamente activo en cerebro de ratas, no ha sido eliminado por vía urinaria, muy posiblemente debido

a su transformación en benzoil-norecgonina. Consignase que la ecgonina no es metabólicamente degradada en la rata.

Se observó que "in vivo" no ocurre la N-demetilación de la benzoilecgonina ni ecgonina, probablemente debido a la polaridad de ambos metabolitos, propiedad que dificulta su paso a través de las membranas. Observaciones similares fueron también efectuadas "in vitro".

El modelo metabólico en intoxicados crónicos, fue cualitativamente similar al de los agudos, pero en los primeros, se observó excreción algo más elevada de benzoilecgonina, metilecgonina y ecgonina. Otras observaciones aportadas por los autores fué la interacción de la cocaína con los fosfolípidos de la membrana neuronal, a través de fuerzas electrostáticas y no polares. Este efecto produce alteraciones en la disposición y fluidificación de regiones no polares, que provocan marcada inhibición en el funcionamiento de la membrana, como sitio de cambio catiónico y en el desplazamiento de calcio de los lugares de la membrana, en los que participa en la génesis de la acción potencial.

Asimismo informaron sobre cambios en la respiración

y fosforilación oxidativa del cerebro, inducidas por la cocaína.

Por lo tanto es probable que la cocaína, principalmente debido a su propiedad lipofílica, interaccione sobre la membrana neuronal, hecho éste que, unido a su manifiesta acción de producir hipertermia, determinen un incremento de su toxicidad. Estas podrían ser las causas de la alteración de las funciones de la membrana, de su integridad estructural y del desequilibrio energético en el metabolismo del tejido nervioso.

Además la repetida administración de cocaína podría también conducir a la oxidación de norcocaína "in vivo" a su radical "nitróxido", altamente reactivo. $\left[\begin{array}{c} | \\ \text{N}-\text{O}^{\bullet} \\ | \end{array} \right]$ (57)

Este compuesto y el prolongado depósito en grasas (en intoxicados crónicos) puede jugar un importante rol en la toxicidad sistémica de la cocaína.

II) Stewart e Inaba en una colaboración publicada en 1980 (83), sobre el tema, comentan las observaciones y experiencias realizadas y las conclusiones obtenidas.

Consignan que la cocaína es excretada casi en su tota-

lidad en forma metabolizada, siendo sus principales productos de degradación benzoilecgonina y metilecgonina, ambos resultantes de la acción hidrolítica.

Observaron que las colinesterasas plasmáticas desplazan el grupo benzoico, para producir metilecgonina; en cambio no probaron la formación de benzoilecgonina por acción esterásica.(88).

Sus experiencias fueron realizadas sobre suero de cinco sujetos, que denominaron I, II, III, IV y V. Los llamados IV y V poseían estererasas "atípicas" con bajo número de dibucaína. Las estererasas atípicas, según una publicación de Van Dyke y col. (92), poseen baja actividad, y aparentemente muestran altos valores de la constante de Michaelis (K_m) ya que como se saben poseen poca afinidad hacia los sustratos.

Los sujetos denominados I, II y III poseían colinesterasas plasmáticas normales. En estos sujetos se determinó la velocidad máxima (V_m) de la enzima frente a norcocaína y cocaína, comprobándose valores consistentemente más altos para la primera.

Las Km estimadas fueron sin embargo similares para cocaína y norcocaína.

Se investigó además la acción de las colinesterasas sobre la benzoilecgonina. La experiencia se realizó sobre un rango de concentraciones del sustrato de 0,3 a 300 μM , observándose una actividad baja pero perceptible, la que fué completamente inhibida por eserina 10^{-4}M (indicando actividad colinesterásica).

La actividad estearásica del hígado mostró valores más altos de Km y Vm que los del suero.

Por otra parte se demostró que en solución fisiológica en condiciones normales (pH 7,4 y 37°C) y en el término de 24 horas se deegración el 42% de la cocaína a benzoilecgonina. En trabajos anteriores los autores habían demostrado que las colinesterasas plasmáticas hidrolizan la cocaína a metilecgonina, metabolito éste que, según apreciaciones constituye del 32% al 49% de los derivados totales excretados.

Considerando que un drogadieto aspire por via nasal, cocaína en una concentración que equivale aproximadamente a

1,5 mg/kg los niveles máximos de la droga en suero están sin embargo en el rango de 0,3 uM. El valor antes anotado hace suponer que con probabilidad, la cocaína sea hidrolizada en suero e hígado a niveles comparables.

Aunque la V_m para hidrólisis de la cocaína en suero es más baja, comparada con el hígado, la afinidad de la enzima por la droga es mucho más elevada.

Si se presume que suero e hígado tienen volúmenes semejantes en el organismo, puede concluirse que estos tejidos contribuyen en forma comparable a la hidrólisis de la cocaína. Se estima que la misma conclusión puede ser deducida para la hidrólisis de la norcocaína por estos tejidos. Una acotación de interés es la que hacen los autores y es la siguiente: La benzoilecgonina es considerada como el principal metabolito de la cocaína. Esto se basa en numerosos estudios entre los que se encuentran los de Fish y Wilson(19) (20), Kogan, etc.(45) quienes señalaron anteriormente que del 29% al 45% de la dosis de cocaína fué excretada por orina en forma de benzoilecgonina.

Si usando tejidos humanos (hígado y suero) se eviden-

ció la no formación enzimática de benzoilecgonina por esterasas ¿Cómo es posible el hallazgo de tales cantidades?

Como se expresó anteriormente a pH 7,4, en 24 hs y a 37°C, el 42% de la cocaína fué convertida en benzoilecgonina. Esto podría explicar en parte el hallazgo de dicho metabolito en la orina de intoxicados con cocaína. El hecho que la benzoilecgonina pueda ser hidrolizada por esterasas del plasma puede ayudar a explicar la presencia de pequeñas cantidades de ecgonina en orina humana. La benzoilecgonina fué identificada como metabolito presente en el suero humano. Alternativamente la ecgonina también podría producirse por degradación no enzimática de la metilecgonina (demetilación).

En ratas no se encontró actividad esterásica mensurable para la cocaína ni en plasma ni en hígado.

En cuanto a la producción de la norcocaína, se sabe que la N-demetilación de la cocaína se produce en el hígado en un 80%. Esta transformación ocurre en el hepatocito por el sistema mixto oxidante de drogas del sistema retículo endoplásmico liso de los microsomas hepáticos. Este mecanismo

de biodegradación es válido tanto para el hombre como la rata.

Es posible que la norcocaína cerebral sea transportada desde el hígado por la circulación. En el hombre por otra parte, la alta actividad colinesterásica de suero y plasma sobre la norcocaína, hace que sólo mínimas cantidades puedan ser transportadas del hígado al cerebro.

III) Los autores del trabajo anterior, en un publicación titulada "Metabolismo de cocaína en el hombre" (30), efectúan las siguientes experiencias y observaciones.

Dos sujetos sanos ingirieron cocaína "marcada" con ^{14}C en el grupo $\text{N-}^{14}\text{CH}_3$ en cantidad de 10 mg de la droga y 2,3 μCi efectuándose posteriormente la recolección de aire espirado, saliva, suero y orina.

Se consideró la producción de $^{14}\text{CO}_2$ como producto de la N-demetilación de la cocaína. La eliminación de dióxido de carbono activado ^{14}C por vía pulmonar en el término de 5 horas fué 2,4% y 6,2 de la dosis administrada, siendo la vida media de 2 h 20 min en el primer caso y 1 h 25 min en el segundo. El mayor porcentaje de N-demetilación, se encon-

tró en un sujeto con baja actividad colinesterásica plasmática.

El primer sujeto de prueba poseía una actividad colinesterásica de 340 U.E. y el segundo de 210 U.E.

Se observó que el "pico" máximo de $^{14}\text{CO}_2$ apareció a los 30 min en el sujeto 1, y a los 45 min en el 2.

Los estudios realizados mostraron que la N-demetilación de la cocaína tiene lugar después de la ingesta oral en el hombre. La norcocaína se encontró también en varias especies, incluyendo ratas, monos y perros.

La norcocaína mostró ser tan activa como la cocaína para inhibir la retoma de noradrenalina por los sinaptosomas cerebrales, y tener mayor poder anestésico local.(28)(42).

Como se dijo, el mecanismo de la N-demetilación involucra al sistema mixto de oxidación de drogas de los microsomas hepáticos. Después de la administración oral, la N-demetilación ocurre en hígado o pared intestinal, o en ambos, para producir formaldehído. Este compuesto es posteriormente metabolizado a CO_2 , el que es luego espirado.

Se encontró en la rata una conversión de formol a CO_2

superior al 80%. Es probable que el nivel de eliminación de CO_2 a partir de la N-demetilación de la cocaína se refleje en la desaparición de la droga del plasma.

Los resultados indican que sólo una pequeña fracción de cocaína es convertida en norcocaína en el hombre (2,6% a 6,3% de la dosis, vía oral). Por otra parte se consigna que las esterasas juegan un rol muy importante en el metabolismo humano.

En vista del extenso metabolismo de la cocaína por otras vías, distintas que la N-demetilación, surge el interrogante si es realmente la cocaína o algún metabolito el que es demetilado. Según las observaciones efectuadas, es más probable que sea la droga madre la que sobrelleva este proceso.

En un estudio reciente (84-85) con hepatocitos aislados (rata), los metabolitos fueron demetilados a velocidad mucho menor.

Pareciera que los metabolitos polares no tienen acceso a los sitios no polares del retículo endoplásmico donde se efectúa la N-demetilación.

Además como se señaló anteriormente la producción de $^{14}\text{CO}_2$ a partir de cocaína marcada, y que fué usada como medida de la N-demetilación tiene una vida media más corta (2 h 20' y 1 h 30') que la de la excreción urinaria de radioactividad total (cocaína más metabolitos), cuya vida media fué de 8 hs a 6 hs 25'.

La corta duración de la N-demetilación puede estar relacionada con la acción de las esterasas, pues como se dijo antes, el proceso ocurre con menor velocidad en los productos de hidrólisis de la cocaína.

La declinación de la producción total de $^{14}\text{CO}_2$ muestra dos fases. Podría especularse que la segunda, más lenta, pueda representar la N-demetilación de los metabolitos.

Van Dyke y col. (92) consignaron que la vida media de cocaína en plasma humano es de 2 h 30 min.

Por último los autores informan que la radioactividad total excretada por orina en el lapso de 0 a 28 hs después de la ingesta de cocaína marcada con ^{14}C en el ($\text{N-}^{14}\text{CH}_3$) alcanzó el valor de 65% y 75% de la dosis total ingerida.

La metilecgonina, producto obtenido por acción de las

colinesteras, fue identificado como el principal metabolito en ambos sujetos, representando el 32% y 49% de los metabolitos totales excretados por orina.

IV) Mulé y Mirsa(65,66) efectuaron un estudio sobre la distribución de cocaína (^3H) en distintos tejidos y fluídos, como así también de los metabolitos excretados en ratas y perros.

Las técnicas utilizadas para el aislamiento de las drogas fueron las mismas empleadas por Naya (68), las que se describirán en el parágrafo de técnicas analíticas.

Del análisis de los valores tabulados para ratas se extraen las siguientes conclusiones:

En animales intoxicados en forma aguda, los picos máximos de droga, en los tejidos examinados, fueron registrados a las 4 hs, con excepción del tejido cardíaco, en el que comenzó a declinar después de la primera hora. Una abrupta caída de la droga ocurre entre las 4 hs y 6 hs, con niveles más bajos en cerebro, testículos y plasma, llegando a cero a las 24 hs.

En los animales tratados en forma crónica, los picos máximos, se alcanzaron más tempranamente entre 1 h y 2 hs.

Es notable también, en este grupo, la permanencia de cocaína en cerebro y tejido graso, por un lapso de 4 semanas.

A continuación se transcriben los respectivos registros hasta un total de siete días respecto a la excreción urinaria y fecal de cocaína libre y radioactividad total de ratas intoxicadas en forma aguda y crónica, por inyección subcutánea de cocaína a razón de 20 mg/kg. Se expresa en porcentajes de las dosis inyectadas.

	Agudos		Crónicos	
	24 hs	7 días	24 hs	7 días
Cocaína libre orina.	0,8	0,9	0,5	0,6
Cocaína libre heces.	0,1	0,3	0,5	0,9
Radioactividad total orina.	41,6	49,3	41,3	51,6
Radioactividad total heces.	14,7	22,1	26,2	25,9

Con respecto a la excreción de los productos del metabolismo de la cocaína, los referidos autores informan haber revelado benzoilecgonina, benzoilnorecgonina, ecgonina y metilecgonina.

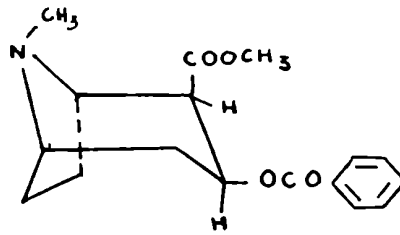
Hacen notar asimismo la ausencia de conjugación glucu-

rónida, sulfúrica o aminoácida.

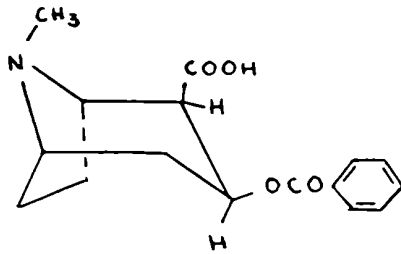
Metabolitos urinarios de ratas intoxicadas en forma aguda y crónica, excreción expresada como porcentaje de las dosis administradas.

	Agudos.	Crónicos.
	7 días	7 días
Benzoilecgonina	11,6	14,6
Ecgonina	2	1,4
Benzoilnorecgonina	0,7	0,4
Metilecgonina	0,6	8,7

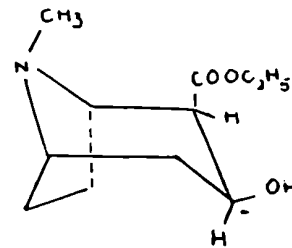
ESTRUCTURAS DE LA COCAINA Y SUS METABOLITOS



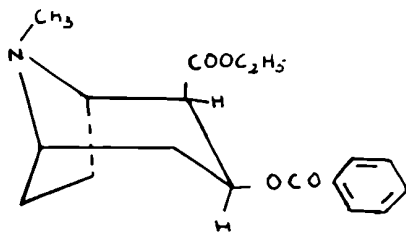
COCAINA



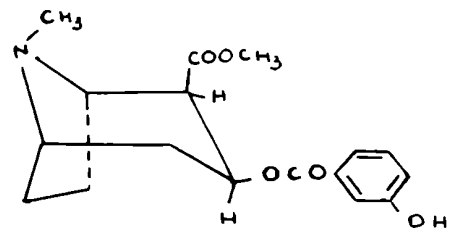
BENZOILECGONINA



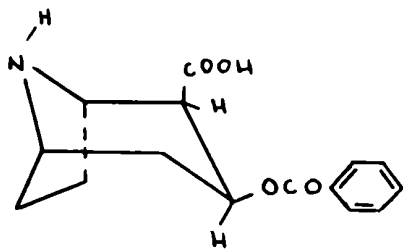
ETILECGONINA



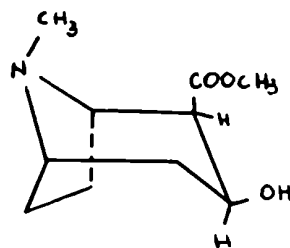
ETILCOCAINA



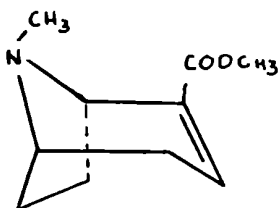
m-HIDROXICOCAINA



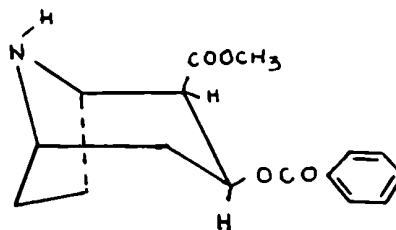
BENZOILNORECGONINA



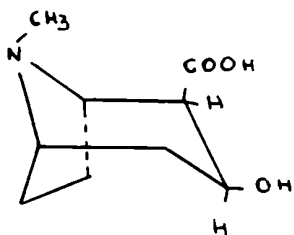
METILECGONINA



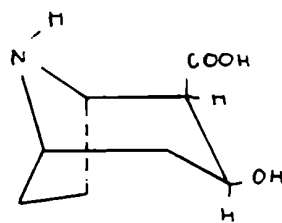
METILECGONIDINA



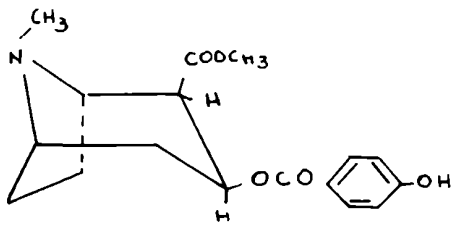
NORCOCAINA



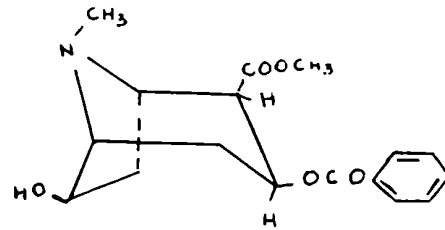
ECGONINA



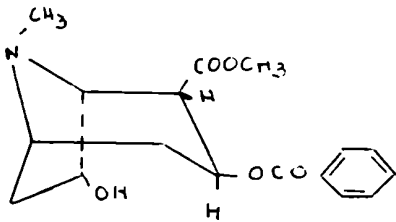
NORECGONINA



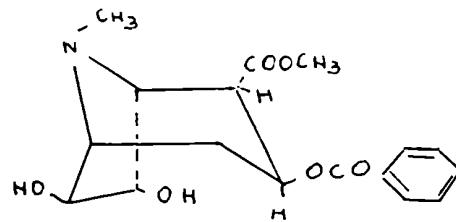
p-HIDROXICOCAINA



6-HIDROXICOCAINA



7-HIDROXICOCAINA



6,7-DIHIDROXICOCAINA

TECNICAS ANALITICAS EXISTENTES.

Debido al incremento del uso ilícito de la cocaína como droga de adicción en los últimos años fueron muchos los investigadores que se dedicaron al estudio de la metodología analítica para el aislamiento, identificación y evaluación de la droga y sus metabolitos.

Como es de conocimiento la droga inalterada se excreta en ínfimas cantidades y puede sobrellevar hidrólisis en su continente, cuando las condiciones le son propicias. Por lo tanto los métodos diseñados tendieron a asegurar el máximo de sensibilidad en lo concerniente a la determinación de la cocaína en su estructura original.

En cuanto a los metabolitos originados por mecanismos hidrolíticos, cabe destacar que algunos de ellos, entre los que se hallan la ecgonina y benzoilecgonina poseen propiedades altamente polares. Esta característica determina que ellos no sean solubles en solventes orgánicos lipofílicos, lo que imposibilita su aislamiento mediante el empleo de esos agentes extractivos.

Se describirán brevemente algunas de las técnicas de

aislamiento, identificación y evaluación que ofrece la bibliografía especializada.

I.- Berry y Grove (11) en un trabajo realizado para identificación de drogas de abuso en orina, efectúan el aislamiento de cocaína con cloroformo después de haber alcalinizado con amoníaco.

La identificación fué realizada: a) por cromatografía en placa delgada, empleando como solvente de resolución metanol-amoníaco 12 N (100: 1,5), y como agente de revelado iodoplatinato. b) por cromatografía en fase gas-líquido, usando como fase fija 2% de C.V. 225 sobre Chromosorb Q.

II.- Fisch y Wilson (19) efectuaron el aislamiento de cocaína a partir de orina con éter etílico. Previamente realizaron con el mismo solvente un lavado de la orina en medio ácido clorhídrico. Advirtieron la necesidad de la rapidez con que se debe realizar esta operación, pues el ácido clorhídrico actúa como agente hidrolítico de la cocaína. Después de separar la fase orgánica, la fase acuosa es alcalinizada con solución saturada de bicarbonato de sodio a pH 8, la cocaína es extraída con el solvente indicado.

La identificación y evaluación la realizaron por C.G.L.

III.- Dvorchik y col. (17) describen un método específico para la determinación de cocaína en sangre entera o plasma. Como agente extractivo utilizaron una mezcla constituida por benceno-isopropanol (9:1), alcalinizando con buffer carbonatado, con agregado de un estandar (etilmorfina). Después de agitación y consecutiva centrifugación para la separación nítida de ambas fases, se aisló la correspondiente fracción orgánica, a la que se incorporó solución acuosa clorhídrica para una nueva extracción. Completada la extracción de la manera usual, se ajustó el pH de la fase acuosa separada a 7 - 7,3 mediante el agregado de solución de hidróxido de sodio 10 N y buffer HEPES (pH 7,4). Es interesante destacar que en esta etapa del proceso las muestras pueden abandonarse a temperatura ambiente hasta cinco días, sin sufrir alteración alguna. La extracción se completó por adición de 100 ul de HONa 10 N y 8 ml de benceno-isopropanol(9 : 1.) Previa agitación y separación por centrifugación de la fase orgánica, se procedió a su concentración hasta sequedad en baño a 60°C en atmósfera inerte (Nitrógeno). El residuo obte-

nido, disuelto en acetona fué analizado por cromatografía en fase gaseosa.

La referida contribución consigna indicaciones sobre la conservación de líquidos biológicos o sus respectivos extractos destinados a su ulterior procesamiento.

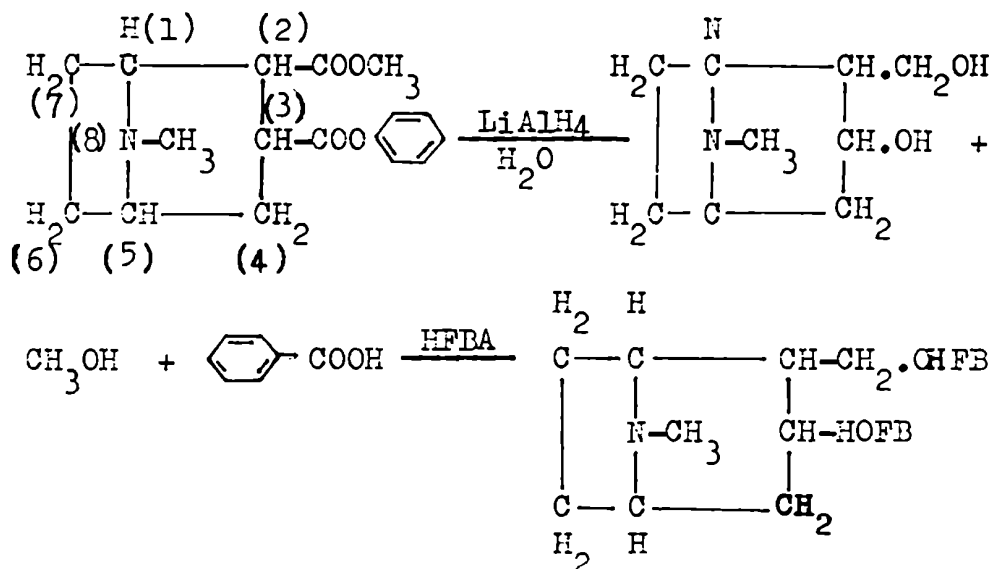
IV.- Blake J. M. y col.(12) determinan cocaína empleando cromatografía en fase gas-líquido, mediante un detector de captura electrónica para incrementar la sensibilidad. El método consiste en la obtención de un derivado o-acilado de la cocaína, el que se logra tratando la solución acuosa del alcaloide, con 1 ml de solución concentrada de tetraborato de sodio decahidratado, extrayendo a continuación con ciclohexano. Este extracto orgánico es tratado con LiAlH_4 (hidruro de aluminio y litio) en solución eterea para reducir a la cocaína, operación que se logra en tres minutos.

El grupo metil carboxilo del carbono 2 de la cocaína, es reducido a un grupo alcohólico primario y simultáneamente se hidroliza el grupo benzoico.

A continuación se agregan 50 ul de agua más 50 ul de anhídrido heptafluorobutírico o anhídrido pentafluor-pro-

piónico, abandonando por 3-5 minutos a temperatura ambiente.

Los 2 ml de ciclohexano que contienen la mitad reducida y derivatizada, se lavan con solución saturada de tetraborato; se separan ambas fases y la capa orgánica es destinada al análisis por C.G.L.



El compuesto formado es apto para empleo de un detector de captura de electrones.

V.- Mueller M. A. y col. (64) proponen un método por cromatografía en placa delgada para investigar benzoilecgonina en orina humana. El procedimiento consta de dos etapas que se pueden integrar en un programa de marcha rápida para casos de abusos de drogas.

La primera parte tiende a identificar una variedad de drogas incluyendo la benzoilecgonina y utiliza dos solventes para la resolución cromatográfica. La segunda es específica para benzoilecgonina y sirve para su confirmación con una sensibilidad de 3-4 ul/ml.

La técnica de aislamiento empleada para el metabolito, fué la del tratamiento por columna de Amberlite XAD-2, y metanol como agente de elución.

La purificación se efectuó, disolviendo el extracto metanólico (ya evaporado) en buffer carbonato-bicarbonato (pH 9) y extrayendo las drogas con cloroformo-isopropanol (13:7 v/v). El extracto orgánico evaporado se resolvió por cromatografía en placa delgada. La localización de la benzoilecgonina se efectuó por aspersion con iodoplatinato en una estrecha franja del cromatograma. El resto no revelado, de la zona correspondiente al metabolito fué separado y eluído con metanol. Este último extracto fué analizado nuevamente por T.L.C. y revelado nuevamente con iodoplatinato.

VI.- Kaistha K.K. y col. (43) propusieron tres técnicas para la extracción de la benzoilecgonina.

El procedimiento I consiste en la adsorción de la droga en un papel previamente impregnado en resina de intercambio catiónico SA-2-. La droga es eluída del papel con solución saturada de bicarbonato de sodio, y luego extraída de ésta con la mezcla cloroformo-isopropanolyl-2-dicloroetano (4,5: 0,9: 4,5). La fase orgánica es evaporada y analizada por cromatografía en placa delgada.

El procedimiento II es similar al I en lo que concierne al empleo del papel impregnado con resina de intercambio catiónico, con la ventaja de que éste es aplicable al aislamiento de una gran cantidad de drogas de abuso.

La diferencia consiste en eluir previamente las drogas no polares con un buffer de cloruro de amonio-hidróxido de amonio (pH 10,1), las que son extraídas de esta solución con cloroformo-isopropanol (5:2).

La fase acuosa conteniendo el papel impregnado con la resina, se trató con ácido clorhídrico concentrado hasta pH 1-2. A continuación dicha solución fué saturada con bicarbonato de sodio, aplicandose a continuación la metodología que se señala para la primera técnica.

VII.- Wallace J.E. y col. (93) informaron que la cocaína y su principal metabolito la benzoilecgonina, fueron determinadas por C.G.L. empleando como fase estacionaria, 3%-OV-17, como detector FLD.

El aislamiento a partir de la orina la efectuaron con la mezcla cloroformo-etanol (80:20).

La benzoilecgonina fué derivatizada para su análisis por C.G.L. Esta operación consistió en metilarla con metanol en ácido sulfúrico.

Indican los autores que los porcentajes de recuperación, con el solvente propuesto, son de 93% para la cocaína y 65% para la benzoilecgonina. En cuanto a la conversión del metabolito a cocaína por metilación produjo un rendimiento de 72%.

Otros detalles importantes señalado por los autores, fueron los rangos de pH óptimos para el aislamiento de la cocaína y las relaciones muestra-solvente más adecuadas. Presentan además una nómina de pacientes que recibieron 250mg de cocaína por topicación como anestésico local, y los datos sobre excreción en orina de cocaína y benzoilecgonina.

VIII.- Von Miden D. y D'Amato (56) realizaron la determinación simultánea de cocaína y benzoilecgonina en orina por C.G.L.. El método involucró la extracción de los dos compuestos en isopropanol-cloroformo (25 : 75) seguido por propilación del metabolito empleando una base orgánica y 1-iodo-propano.

El procedimiento de alquilación fué optimizado experimentalmente, mediante el uso de dos bases orgánicas (hidróxido de trimetilfenilamonio e hidróxido de tetrametil-amonio). El motivo del empleo simultáneo de ambas bases lo constituyó el hecho que la primera posee muy lenta velocidad de reacción, mientras que la segunda produce la hidrólisis de las drogas.

IX.- Javadi, J.I. y col (35,36) describen un método sensible para la determinación de cocaína y sus metabolitos polares por C.G.L., empleando un detector de captura de electrones. El método involucra la formación de un fluoroderivado con la mezcla hexafluoroisopropanol y anhídrido heptafluorobutírico en la relación 2:1. La cocaína y la benzoilecgonina deben ser previamente reducidas por el hidruro de aluminio

y litio (Li Al H_4).

Según los autores, aunque el método es rápido y confiable, sólo determina cocaína y no diferencia entre ecgonina y benzoilecgonina. La cocaína la determinan por el método de Blake y col (12), con una leve modificación en las condiciones cromatográficas. La ecgonina y benzoilecgonina se derivatizaron directamente con la mezcla hexafluoroisopropanol y anhídrido heptafluorobutírico, aunque para benzoil ecgonina puede aplicarse también la técnica de reducción, semejante a la empleada para cocaína, seguida de la derivatización.

Acotan los autores que la técnica puede también emplearse para cocaína, aislada de orina y plasma, con ciclohexano.

X.- Lewis J. H. (49) propone una técnica cualitativa para la identificación de benzoilecgonina en caso de doping de galgos mediante resolución por cromatografía en fase gas-líquido. El primer paso consiste en el aislamiento de la posible cocaína presente, mediante el empleo de cloroformo a pH 3-4 obtenido por acidificación con ácido acético, y su

posterior reconocimiento por T.L.C.

La segunda etapa, destinada al aislamiento de la benzoilecgonina, consiste en ajustar el pH a 9-10 con solución de bicarbonato de sodio saturada, y extracción con la mezcla cloroformo-isopropanol (95:5). Parte de este extracto se analizó por T.L.C. y el remanente se derivatizó con hidróxido de trimetilanilina sometiendo al ensayo por C.G.L.

XI.- Valentour y col. (91) proponen un método para la determinación simultánea de cocaína y benzoilecgonina en tejidos y fluidos biológicos. La extracción de ambas drogas la efectúan con una mezcla cloroformo-etanol (4:1). La purificación de este extracto la realizan, por tratamiento con ácido sulfúrico 0,5 N, el que solubiliza las drogas en estudio. Esta solución acuosa-ácida, se alcaliniza a pH 10,5-12, adicionándose en ese momento los reactivos derivatizantes: solución etanólica de cloruro de tetrahexilamonio, cloroformo conteniendo 15% de n-octanol y yoduro de etilo, en el orden establecido. Se agitó, centrifugó y separó la fase orgánica, la que se sometió a la resolución por C.G.L.

Proponen el empleo de tres fases fijas que pueden ser

usadas alternativamente y, como detector, el de ionización de llama.

La elección de la etilación de la benzoilecgonina frente a otros posibles alquil derivados se basa en que en las condiciones de operación produce picos fácilmente distinguibles de los de la cocaína.

Presentan además espectros de masa de la cocaína, etilbenzoilecgonina, cinamoil cocaína y etilcinamoil ecgonina.

XII.- Bastos M.L., Dokosky O. y Kule S. J. (6) proponen una técnica para el aislamiento de los metabolitos polares de la cocaína, benzoilecgonina y ecgonina, basada en el empleo de una mezcla de cloroformo-etanol (3:2). Después de agitar y centrifugar, la fase cloroformica fué separada, y la solución alcohólica de la orina saturada con carbonato de potasio. Se procedió nuevamente a agitar, centrifugar y separar la fase alcohólica superior, que contiene los metabolitos polares. El pH de esta última se ajustó a valores menores de 7 con ácido clorhídrico, y se butilaron los metabolitos por el agregado de n-butanol y ácido sulfúrico calentando a 120°-130° durante 30 minutos. Complementaria la "butilación" y una

vez fría la solución se efectuó un tratamiento con tolueno y agua.

Después de agitar el tolueno fué separado y desechado, y la fase acuosa remanente saturada con bicarbonato de sodio extrayendose los metabolitos butilados con ciclohexano. Estos derivados fueron identificados por resolución cromatográfica en placa delgada.

El motivo del diseño de esta técnica, según los autores, es que los metabolitos polares de la cocaína no pueden ser extraídos con solventes orgánicos ni tampoco fácilmente por resinas de intercambio iónico, o adsorbidos sobre copolímeros de estireno-divinilbenceno, como ser resina de Amberlite XAD-2,

Presentan además, una tabla de reactividad cruzada en los ensayos de EMIT para benzoilecgonina.

XIII.- Naya P.K., Misra A.L. y Mule S.J. (68) en un estudio sobre destino y biotransformación de (^3H) cocaína en ratas intoxicadas en forma aguda y crónica , proponen un esquema para el aislamiento de los respectivos metabolitos.

La cocaína sin transformar es extraída con ciclohexano

a pH 9.

Los metabolitos son extraídos por repetidos pasajes a través de una columna de Amberlite XAD-2. La columna se lava primero con agua, para eliminar los productos no adsorbidos, y esta solución se liofiliza para su posterior análisis. Según datos de los autores, en esta fracción se encuentran ecgonina y otros metabolitos no identificados.

La columna se eluye luego con metanol hasta que no se registra más radioactividad. Este extracto se concentra a presión reducida y se dispone para su análisis cromatográfico en placa delgada, empleando distintos sistemas de solventes. En esta fracción se encuentran cocaína, metilecgonina, ecgonina, benzoilecgonina, benzoilnorecgonina y otros metabolitos no identificados, que los autores presuponer sean derivados hidroxilados de la cocaína en las posiciones 6, 7 y 6-7 y otro para-hidroxilado en el núcleo bencénico.

XIV.- Valanjú M. M. y col. (90) proponen sistemas de solventes tendientes al aislamiento e identificación de cocaína y sus metabolitos a partir de orina.

El solvente de aislamiento empleado fué una mezcla de

cloroformo, isopropanol y 1-2-dicloroetano (8:1:3), siendo la relación solvente-muestra 5 a 1. Una vez separada la fase orgánica, se evapora y somete a T.L.C., empleando dos solventes de resolución en forma secuencial, y para el revelado proponen una modificación del reactivo de Dragendorff. Para la confirmación de la benzoilecgonina efectuaron microcristalización, T.L.C. e inmuno ensayo.

XV.- Moore J. M. (62) presentó una técnica para la detección de ecgonina y benzoilecgonina, en muestras de cocaína de tráfico ilícito por C.G.L.

Empleó como agente derivatizante de las drogas polares N.O. bis trimetilsililacetamida con el fin de obtener los correspondientes trimetilsilil derivados. Enuncia además condiciones óptimas de trabajo como así también los programas que deben desarrollarse en tal sentido.

XVI.- Koontz S. y col. (47) proponen un método para la identificación de benzoilecgonina a partir de orina por C.G.L.

El aislamiento de la droga se efectuó con etanol previa saturación de la muestra con mezcla de fosfatos mono y dipotásicos. Alternativamente puede procederse liofili-

zación del fluido y extracción a partir del material seco con metanol. La purificación de los extractos se realizó por T.L.C. preparativa, separando por raspado la silicagel y eluyendo la droga con agua a 80°C.

El extracto acuoso fué evaporado a sequedad y la droga derivatizada con dimetilformamida-dimetilacetal para su análisis por C.G.L. Se describe además un procedimiento de extracción y purificación por resina de intercambio iónico, débilmente básico.

XVII.- Fish F. y Wilson W.D.C. (20) efectúan el estudio de excreción de cocaína y sus metabolitos en hombres, empleando como técnica analítica la cromatografía en fase gas-líquido. Para el aislamiento de cocaína emplean éter etílico a pH 8, obtenido por adición de solución saturada de bicarbonato de sodio a la orina.

Para el aislamiento de benzoilecgonina emplean una técnica de extracción continua con cloroformo. La determinación la efectúan por C.G.L. previa derivatización de la droga con diazometano en medio **etero**. Las curvas de calibración las realizan por el agregado de cantidades conocidas de benzoil-

ecgonina a muestras normales de orina, las que son procesadas en igual forma.

XVIII.- Moore J. M. (63) propone un método de detección de ecgonina en orina, derivatizándola directamente en el citado fluido, obteniendo un producto extraíble, apto para ser empleado en C.G.L. provisto de detector de captura de electrones.

El agente derivatizante es tricloruro de boro-2-cloro-etanol, que forma el 2 clorometiléster con la función carboxílica de la ecgonina.

El hecho de poseer el derivado un halógeno en su molécula lo hacen apto para su empleo con detector de captura de electrones, dispositivo que incrementa la sensibilidad del procedimiento.

La técnica consiste en agregar agente derivatizante, a la orina en relación 10:1; calentar durante una hora en baño a 100°C, y luego proceder a su extracción con éter etílico.

XIX.- Graffeo M. P. y col. (24) analizan benzoilecgonina a partir de orina por cromatografía líquido-líquido de alta presión y cromatografía en fase gas líquido-espectrofotometría

de masa.

La H.P.L.C. es empleada como técnica de separación y purificación, obteniéndose un extracto apto para su análisis por G.C.-M.S. Para H.P.L.C. usan columna de fase reversa, siendo el eluyente una mezcla metanol-agua con programa de elución. El detector empleado fué de U.V. a 254 nm. La fracción que contiene la benzoilecgonina comienza a eluirse a los 17 min. y se colectan a partir de ese momento 4 ml. Esta fracción se eluye sin que se registre ninguna señal en el detector. La solución conteniendo el metabolito es evaporada en atmósfera inerte de nitrógeno y a baja temperatura; posteriormente es sililada con bistrimetilsililtrifluoacetamida y sometida a análisis por G.C.-M.S.

XX.- Jatlow P.I. y col. (38) determinan cocaína y benzoilecgonina en orina por H.P.L.C.

Utilizan columna de fase reversa y como solvente de elución acetonitrilo 17% en buffer de fosfato pH 2.7, el detector U.V. a 200 y 235 nm. La muestra conteniendo las drogas es sometida a una extracción previa con éter en medio sulfúrico diluído (5%). La fase orgánica se descarta y la

acuosa se alcaliniza por la adición de una cantidad determinada de una mezcla de carbonato-bicarbonato de sodio. A continuación se extrae con el doble de su volumen con la mezcla cloroformo-etanol 80:20. Se separa la fase orgánica y se evapora: el residuo se disuelve en metanol, para su procesamiento ulterior por vía cromatográfica de alta presión.

XXI.- Otros trabajos consultados relacionados con el tema, son los efectuados por los autores que a continuación se mencionan:

Akopayan, O. R. (2).

Roerig, D. L. y col. (79).

Decato, L. y col. (15).

Graas, J. E. y col. (23).

Hammer, R. H. y col. (25).

Jain, M. C. y col. (31) (32).

Jatlot, P. y col. (33) (34).

Jindal, S. P. y col. (39) (40).

Lewin, A. H. y col. (49).

Lindgren, J. (50).

Lowry W. T. y col. (51).

Misra, A. L. y col. (60).

Schmidt, H. L. y col. (81).

Street, H. V. y col. (86).

Wallace, J. E. y col. (95).

Werner, G. y col. (96).

Wheals, B. B. (97).

COCAINA Y SUS DERIVADOS

(Propiedades fisicoquímicas)

COCAINA Metil-benzoilecgonina

1 H.5 H-tropane-2 -carboxylic acid-3 -hidroximetil ester,benzoate ester

8 Azabicyclo(3.2.1)octane-2-carboxylic acid-3-hidro-8-metil

(Base): Punto de fusión: 98°C.

Alcohol, eter, cloroformo, benceno ciclohexano y otros solventes orgánicos (soluble)

Agua (poco soluble)

Ultravioleta: en etanol máximos: 233, 274, 281 nm.

mínimos: 217, 260, 279 nm.

en SO₄H₂ máximos: 233 nm.

mínimos: 275 nm.

(Clorhidrato): Punto de fusión 197°C

Agua, alcohol (soluble)

Eter, cloroformo, eter de petróleo (casi insoluble)

Ultravioleta: máximos: 233, 274 nm.

211, 261 nm.

BENZOILECGONINA

(Base): Punto de fusión: 195°C , con descomposición

Agua, soluciones ácidas y alcalinas (soluble)

Etanol, metanol, acetato de etilo, acetonitrilo, eter (debilmente soluble)

Cloroformo, eter de petróleo (insoluble)

ECCONINA

(clorhidrato), Punto de fusión: 246°C

Agua (soluble)

Etanol, metanol (debilmente soluble)

Eter, cloroformo, acetona (insoluble)

METILECCONINA

(clorhidrato monohidratado), Punto de fusión: 212°C

Forma cristales prismáticos de etanol

Agua (soluble)

Etanol, eter, benceno, eter de petróleo (poco soluble)

DROGAS, REACTIVOS E INSTRUMENTAL.....

I) Drogas y reactivos.....

Clorhidrato de Cocaína Merck.....

Clorhidrato de Benzoilecgonina Merck.....

Clorhidrato de Ecgonina Merck.....

Las drogas y solventes empleados fueron de grado analítico.....

Reactivo de Dragendorff: se prepara hirviendo 2,6 g.

de subnitrate de bismuto y 7g de ioduro de potasio, por pocos minutos, en 25ml de ácido acético glacial. Dejar durante una noche, filtrar para eliminar el acetato de potasio y agregar 80ml de acetato de etilo por cada

20ml de filtrado. La solución se almacena, protegiéndola de la luz. Antes de usar diluir 25ml de la solución anterior con 25ml de ácido acético glacial y 60ml de acetato de etilo (modificación introducida por la Cátedra de Toxicología y Química Legal F.C.E.yN. U.B.A.).

II) Instrumental:.....

Cromatógrafo en fase gaseosa Hewlett-Packard Modelo 5840A.

Cromatógrafo líquido-líquido de alta presión Varian
Modelo 5.000.....

Evaporador rotatorio al vacío Marca F.B.R.....

Agitador tipo Vortex Marca F.B.R.....

Espectrofotómetro Cary 118.....

Centrífuga Internacional Modelo H.....

Centrífuga refrigerada International I.E.C.....

I.- Incóvenientes en la recolección de muestras de orina.

Diseño de un dispositivo para la recolección de las
muestras.

El objetivo primordial del presente trabajo lo constituye el estudio del aislamiento, identificación y evaluación de los metabolitos producidos por degradación hidrolítica de la cocaína (benzoilecgonina, metilecgonina y ecgonina) a partir de orina de ratas intoxicadas en forma aguda.

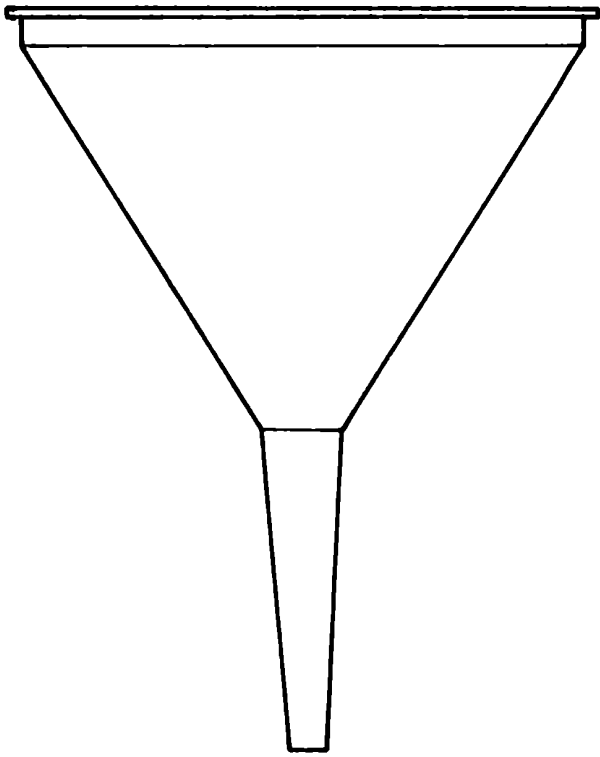
Para satisfacer esta exigencia básica fundamental, es requisito de primordial importancia adoptar una norma efectiva para la recolección de las muestras de orina, ajustada a los propósitos mencionados, a fin de obtener valores fidedignos y reproducibles.

Con el empleo de jaulas metabólicas comunes, o bien adicionándoles enrejados o filtros, se obtenían orinas altamente contaminadas con materia fecal, que producían la elevación de su pH a valores incompatibles con la estabilidad de la cocaína, benzoilecgonina y metilecgonina. En

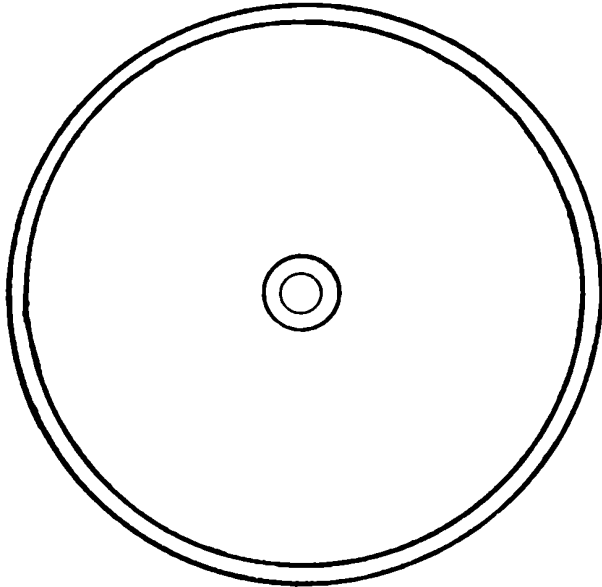
todos los casos las orinas recolectadas presentaban pH superiores a 11, condición altamente favorable para la hidrólisis de los componentes antes mencionados.

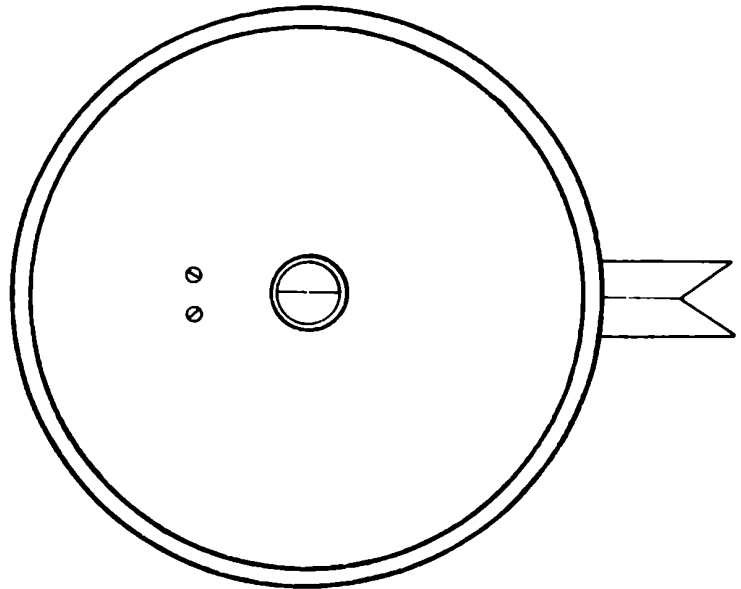
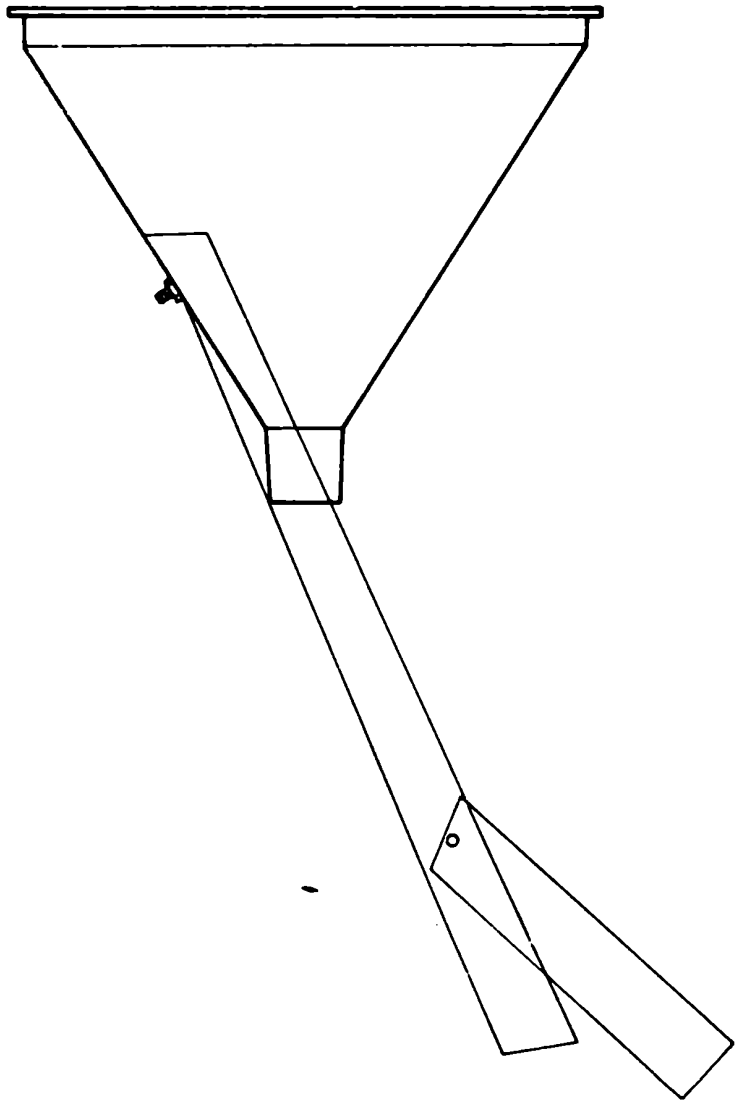
Valanjú y col. (90) en su trabajo "Detection of bio-transformed cocaine in urine from drug abusers" prepararon los testigos de ecgonina y benzoil--ecgonina para ser empleados en su técnica de aislamiento, adicionando cocaína a una muestra de orina a pH 8,5 a temperatura ambiente por 24-48 hs; considerando las circunstancias antes especificadas y dado que la degradación metabólica de la droga origina idénticos metabolitos, resultaría imposible distinguir si los mismos provienen de la transformación en el organismo, "in vivo" o bien por circunstancias extrañas.

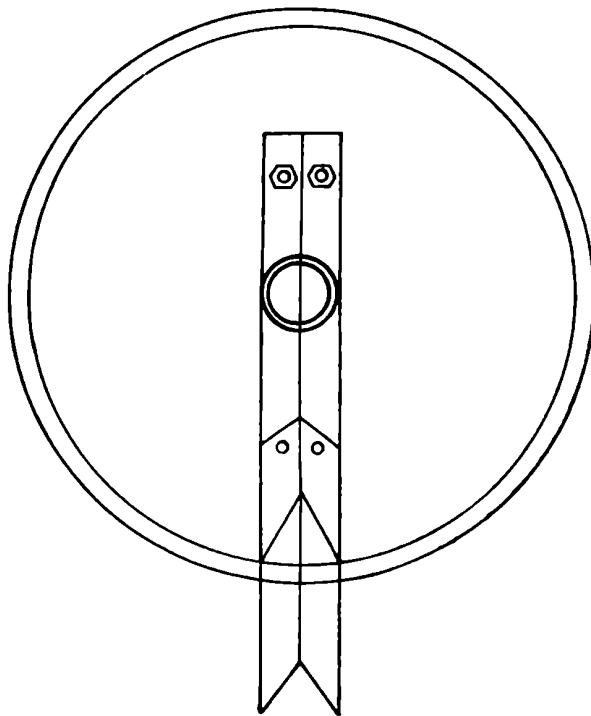
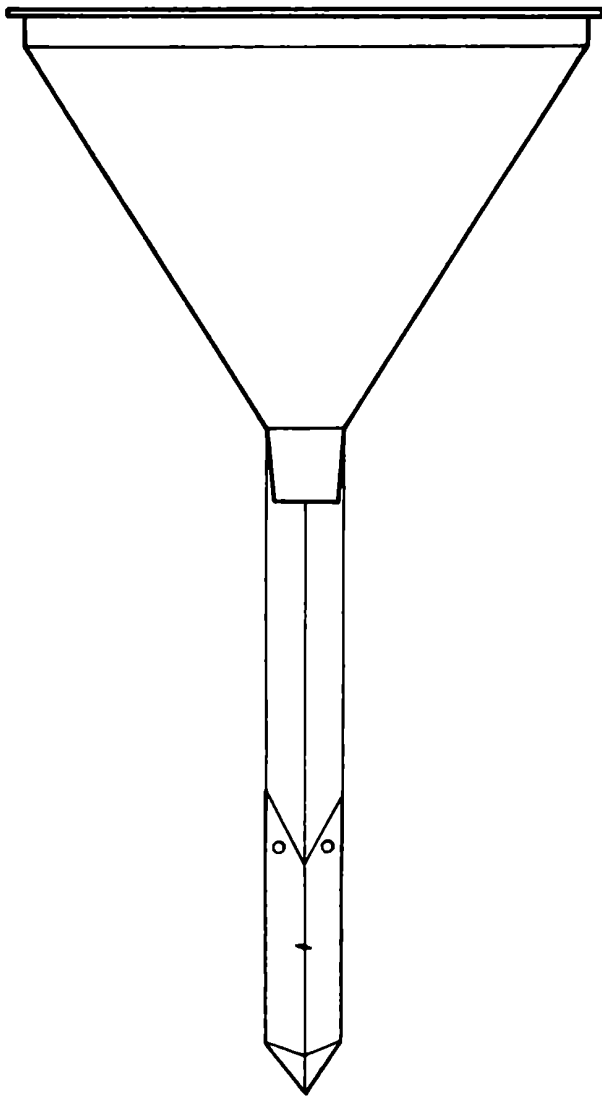
Por tal motivo se diseñó un dispositivo que permitiera la recolección de la orina, separándola de la materia fecal. Este implemento se acopló al embudo de las jaulas metabólicas, con lo cual fué posible recoger muestras de orina no contaminadas, que acusaron un pH comprendido entre 6,3 a 6,8. Con las modificaciones incorporadas, resultante de una exigencia de primerísima incidencia (muestras



.







puras, no contaminadas) y en cuya concepción ha participado también la licenciada Ana María Pinet, ha sido posible obtener material exento de todo componente extraño, apto para su ulterior procesamiento.

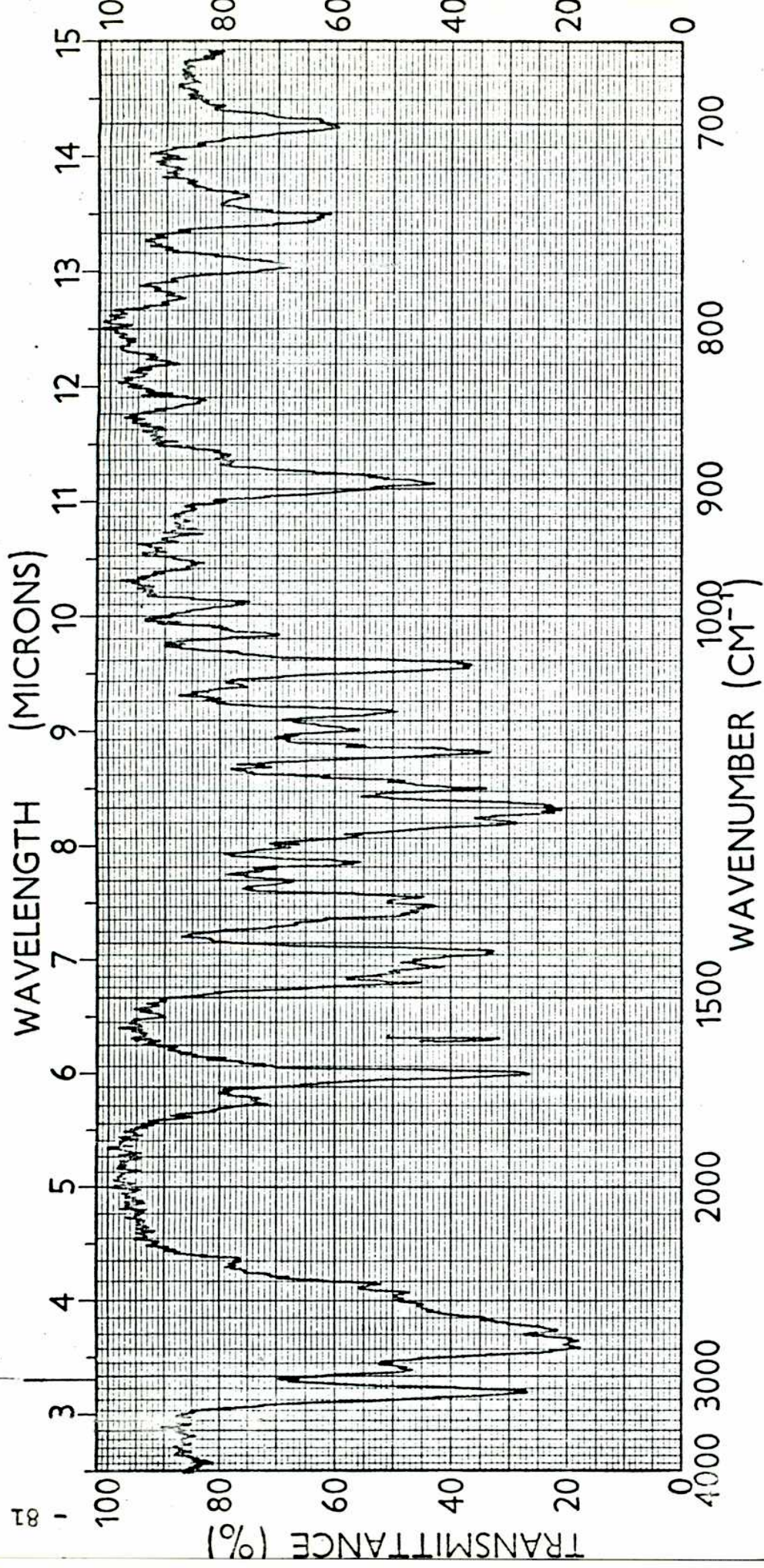
II.-Obtención y purificación de ecgonina.

El clorhidrato de ecgonina fué preparado en nuestro laboratorio por hidrólisis de cocaína en medio ácido clorhídrico, por la siguiente técnica:

a 250 mg de clorhidrato de cocaína se adicionan 50 ml de una solución de ClH 2 N y se calienta por un lapso de 36hs sobre una plancha regulable a 80°C. A medida que se produce la evaporación del agente hidrolizante, se repone éste.

Durante el período de calentamiento, se retiran pequeñas alícuotas de la solución, para comprobar la marcha de la hidrólisis, (mediante técnicas cromatográficas) la que se completó a las 36 hs.

En la última etapa no se repuso el ácido evaporado, sino que por el contrario, se permitió su concentración hasta un volumen de 5 ml. Una vez frío, se procedió a pre-



SAMPLE <u>Ecgonina</u>	PHASE <u>NUJOL</u>	SCAN SPEED <u>slow</u> SLIT <u>3</u>
	SOLVENT _____	OPERATOR <u>Russio</u> DATE <u>1-6-77</u>
ORIGIN <u>Toxicologia</u>	CONC. _____	REMARKS _____
	CELL PATH _____	REFERENCE <u>Ray, T.H. (K&E)</u>

precipitar el clorhidrato de ecgonina por el agregado de 25 ml de acetona. Se centrifugó, decantó el líquido sobrenadante y el precipitado fué repetidamente lavado con acetona y cloroformo. La sal de ecgonina fué secada a presión reducida.

A pesar de haber sido la ecgonina identificada por I.R. (en la Cátedra de Orgánica de ésta Facultad), la resolución espectrofotométrica en el ámbito del ultravioleta no permitió registrar las inflexiones especificadas en la bibliografía.

Uno de los primeros intentos fué realizar la purificación de la ecgonina por cromatografía en placa delgada preparativa, pero no se obtuvo rendimiento satisfactorio. Entre varias posibilidades se consideró recurrir a columnas de celulosa. Dado que en la bibliografía no se halló ninguna referencia sobre el particular se iniciaron las primeras experiencias trabajando con papel cromatográfico Watman 3 M.M., ensayándose distintas mezclas de elución hasta lograr la más eficiente para separar ecgonina de su supuesta impureza, benzoilecgonina.

Se ensayaron los solventes que se enumeran obtenién-

dose los siguientes valores Rf:

	Rf	
	E	BE
1) Metanol-cloroformo-amoníaco(50:50:0,5)	0,66	0,90
2) Cloroformo-amoníaco (99:1)	0,06	0,92
3) Metanol-amoníaco (99:1)	0,50	0,71
4) Cloroformo-metanol-amoníaco(50:50:5)	0,59	0,89
5) Cloroformo-metanol-amoníaco(80:20:3)	0,15	0,82

Los cromatogramas fueron revelados mediante aspersion con el reactivo de Dragendorff modificado, comprobándose que se obtenía una mejor separación con las mezclas 2 y 5, eligiéndose como eluyente la N° 5 por su mayor polaridad.

A continuación se utilizaron columnas de 18 cm de alto por 0,7 cm de diámetro interno, las que se llenaron hasta 11 cm con 1,7 g de celulosa, luego de obturar el fondo de ellas con lana de vidrio, sobre la celulosa se colocó un disco de papel de filtro Whatman N° 1.

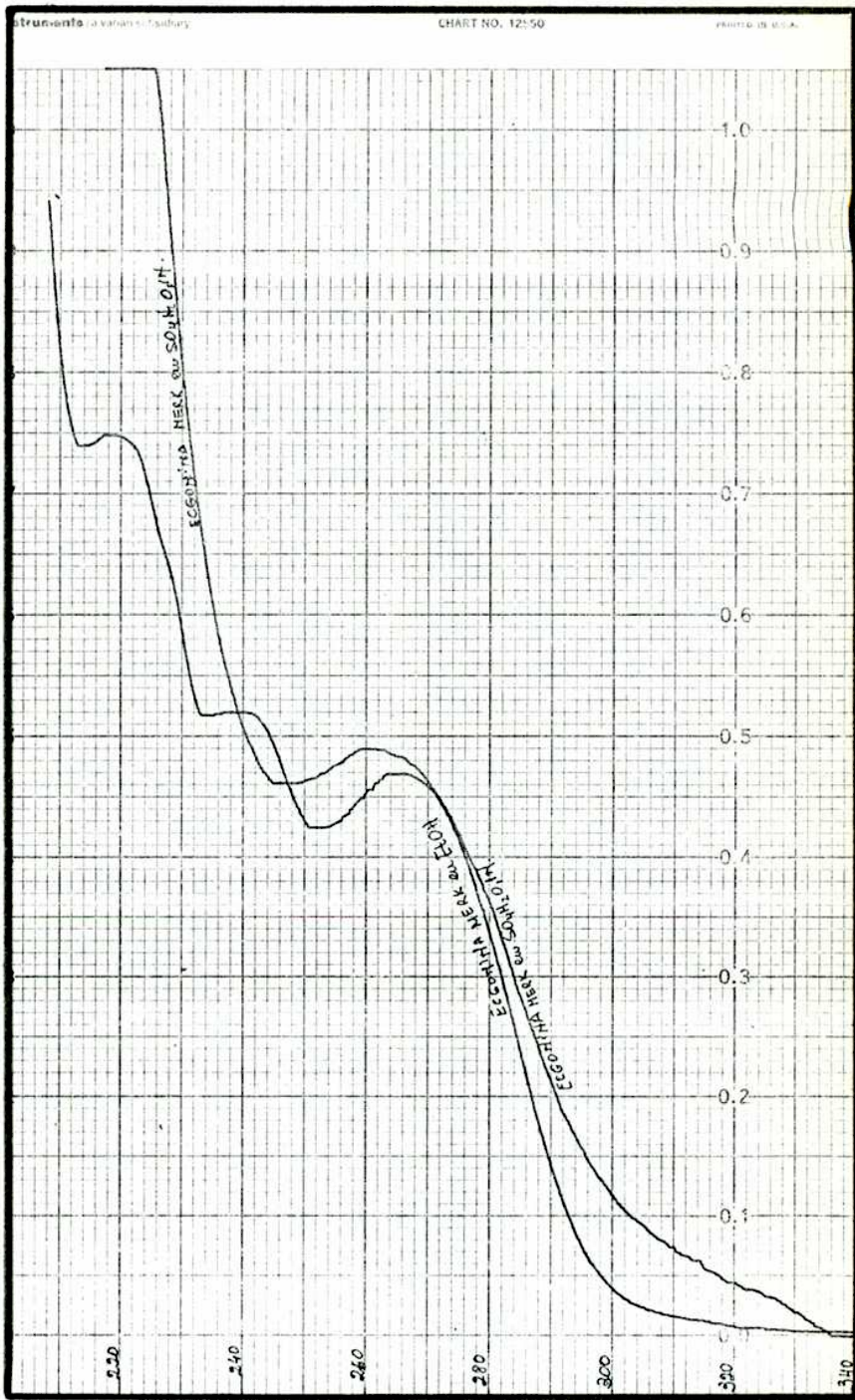
Las soluciones a cromatografiar se prepararon solubilizando 500 ug de ecgonina y benzoilecgonina en 0,5 ml de la mezcla eluyente. De ambas se sembraron 0,25 ml.

Las columnas se lavaron previamente con la mezcla eluyente y posteriormente se sembró la muestra, la que se dejó ingresar en la celulosa. A partir de ese momento, se comenzó a eluir con porciones de 1 ml de la mezcla cloroformo-metanol-amoniaco (80:20:3). La recolección de la muestra se comenzó en el momento de su introducción y se realizó colectando 20 fracciones de 1 ml cada una, las que fueron luego evaporadas en rotavapor.

A continuación todas las fracciones fueron cromatografiadas en placa delgada, observándose después del revelado, que en las fracciones 3-4-5 y 6 solo aparecía benzoilecgonina y en las 9-10-11-12-13 y 14 solamente ecgonina.

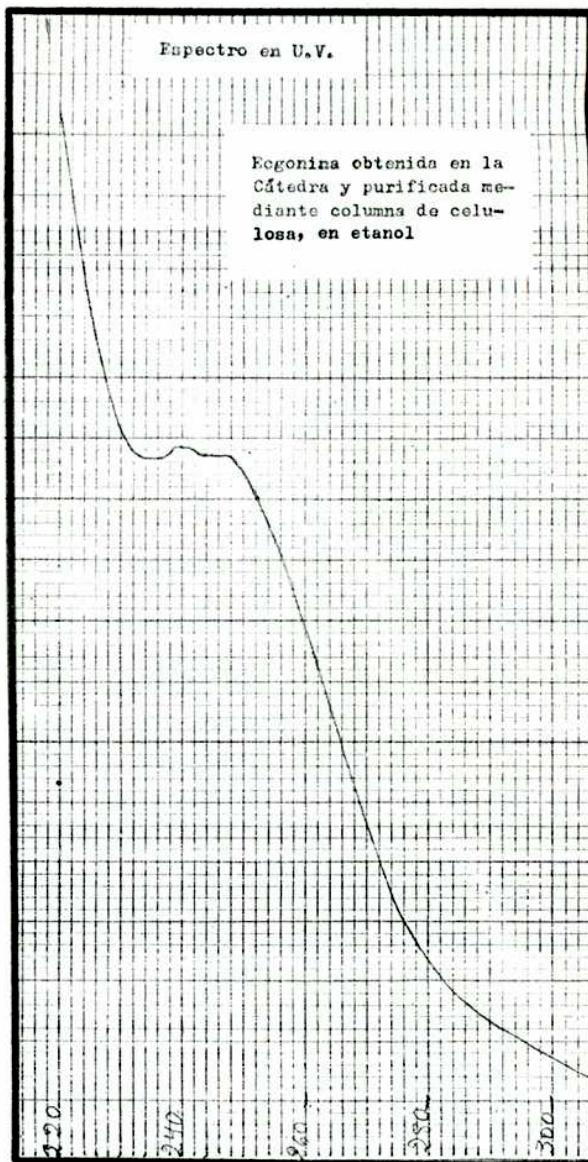
En mérito a los resultados obtenidos, se decidió efectuar la recolección de dos fracciones. La primera de 7,5 ml que contenía la benzoilecgonina y la segunda de 7,5 a 15 ml correspondiente a la ecgonina, las que se rotularon I y II respectivamente.

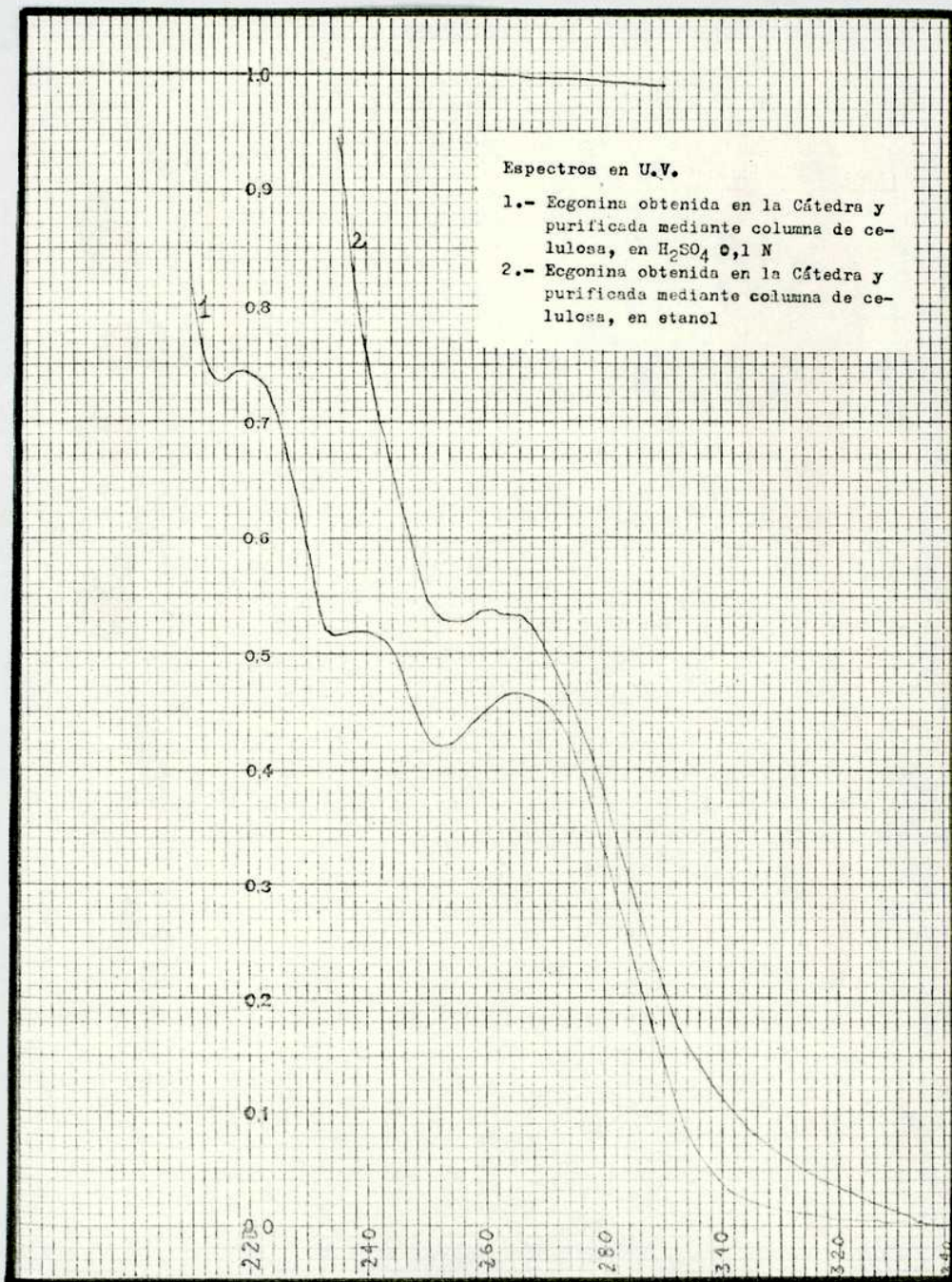
Ambas fracciones se evaporaron en rotavapor a sequedad y el residuo obtenido fué tratado con solución de ácido sulfúrico 0,1 N efectuando una resolución espectrofotométrica.

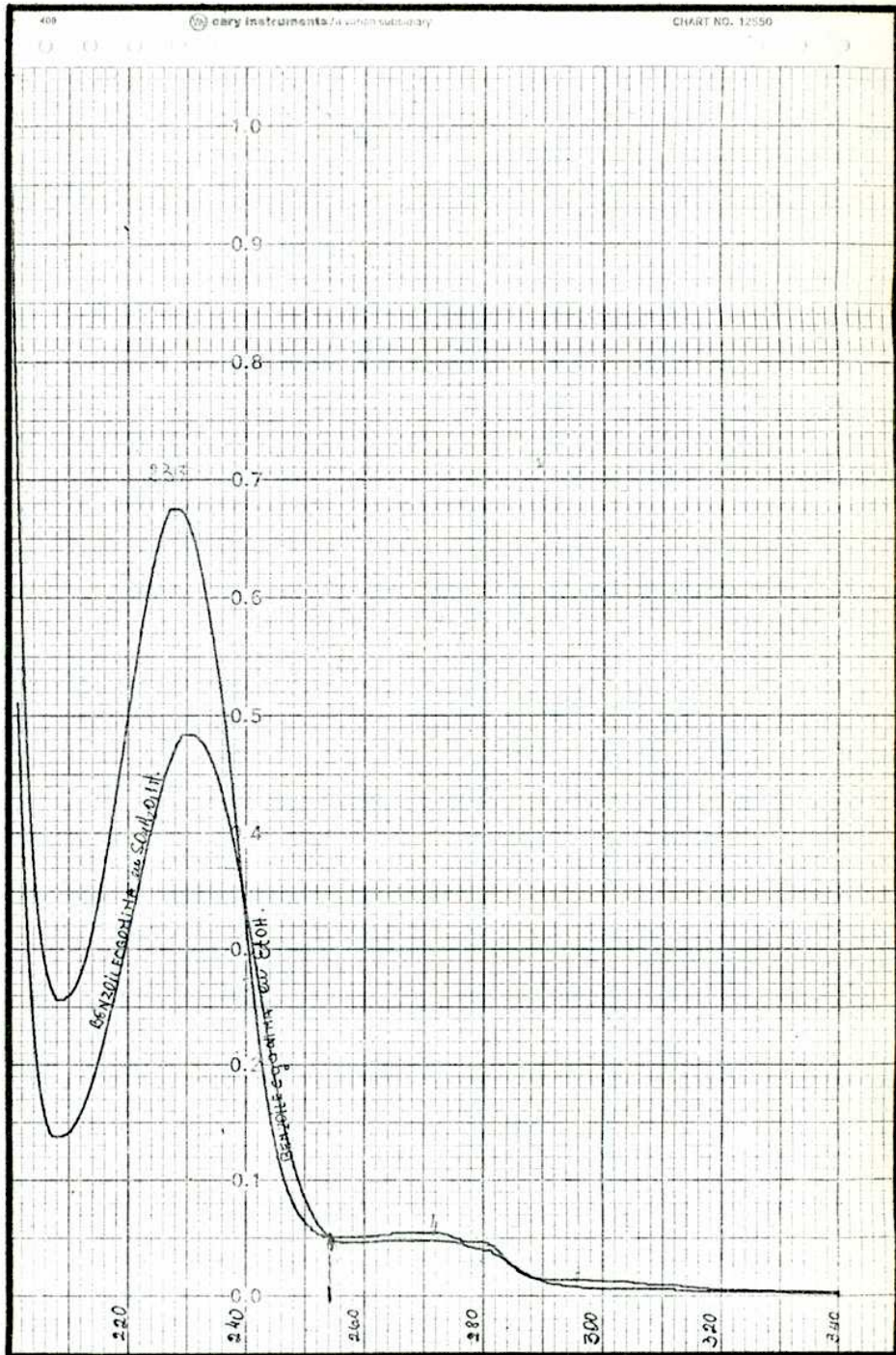


Espectro en U.V.

Ecgonina obtenida en la
Cátedra y purificada me-
diante columna de celu-
losa, en etanol







ca contra un blanco de reactivos, en un dispositivo Cary 118 con registrador automático. Se obtuvieron de esta manera las curvas correspondientes para la benzoilecgonina y la ecgonina. Para la benzoilecgonina se trabajó en un rango de 0 a 2, confirmándose la presencia del máximo característico a 232 nm y el de su coeficiente de extinción de aproximadamente 400.

Para la ecgonina se trabajó en un rango de sensibilidad de 0 a 0,1 confirmándose la presencia del "pico" máximo característico a 261 nm y determinándose aproximadamente su coeficiente de extinción ($E 1\%$, 1 cm 21) el que no se halló registrado en la bibliografía consultada.

III.-Técnicas ensayadas y modificaciones.

Se consultó la bibliografía especializada en busca de técnicas de aislamiento, identificación y evaluación de las sustancias en estudio.

En un primer intento y ya que en ese momento no se disponía del instrumental adecuado, se eligieron como ensayo las técnicas de Bastos y col. (6) y Valanjú y col (90)

para iniciar la parte experimental del presente trabajo.

Si bien el método propuesto por Bastos se comentó brevemente en el capítulo de técnicas analíticas, se describirá aquí con más detalles indicando la forma en que se llevó a cabo su ejecución.

Se trabajó con 10 ml de orina a la que se le adicionó 500 ug de cada una de las siguientes drogas: cocaína, benzoilecgonina y ecgonina. Se alcalinizó con 250 mg de carbonato de sodio a fin de obtener un pH entre 8 y 9. A continuación se agregó 5 ml de la mezcla cloroformo-etanol 3:2. Se agitó en Vortex, se centrifugó y se separó por aspiración la capa clorofórmica que contenía la cocaína y otras bases extraíbles, en caso de estar presentes. La fase acuosa-etanólica se saturó con carbonato de potasio anhidro, se agitó en Vortex; se centrifugó y separó la fase etanólica superior que contiene los metabolitos conjuntamente con gran cantidad de impurezas de la orina.

Hasta aquí se realizó la técnica ajustándose a lo indicado por los autores, quienes a partir de los extractos etanólicos proceden a derivatizar a los metabolitos a fin

de convertirlos en sus esteres butílicos correspondientes.

Llegada a esta etapa y con el solo efecto de comprobar la efectiva extracción de la benzoilecgonina y ecgonina, se intentó emplear el extracto etanólico para la realización de una cromatografía en placa delgada. Se eligió una técnica cromatográfica que utiliza dos solventes de "corrimiento" en forma secuencial. El primero que desplaza la cocaína con un R_f resultante de 0,90, fué el constituido por la mezcla acetato de etilo-metanol (170:20) en cámara saturada de amoníaco de la manera usual. En este sistema los metabolitos y las impurezas de la orina permanecen en el punto de siembra.

Una vez desplazado el líquido resolutivo hasta una altura de 11 cm se retiró la placa, se secó al aire y a continuación se introdujo en otra cuba conteniendo el segundo solvente de desarrollo:cloroformo-metanol (50:50), también saturada con amoníaco. Cuando el solvente hubo alcanzado una altura de 7 cm se retiró la placa y una vez seca se reveló con reactivo de Dragendorff modificado. En la placa pudo observarse a la cocaína aislada en el extracto cloro-

fórmico, con su Rf correspondiente (0,90) coincidente con el de su respectivo testigo, en cambio los metabolitos no pudieron ser identificados por estar completamente enmascarados u ocultos por productos de coextracción de la orina los que se colorean con el mismo reactivo cromogénico (Placa 1).

Se intentó, con extractos obtenidos en forma análoga, ensayar otros solventes resolutivos, pero en todos los casos los resultados fueron deficientes.

Se intentó entonces realizar el aislamiento de las drogas en estudio, empleando la técnica propuesta por Valanjú y col. (90) que consiste en utilizar 25 ml de orina, cuyo pH es ajustado a 8,5, por el agregado de hidróxido de sodio 10 N y buffer bicarbonato de pH 8,5.

La orina así preparada, conteniendo 500 ug de cocaína, de benzoilecgonina y de ecgonina respectivamente se extrajo dos veces por agitación vigorosa con 75 ml cada vez, de la mezcla cloroformo-isopropanol.1-2 dicloroetano(8:1:3).

Las fases orgánicas reunidas, son evaporadas y empleadas para cromatografía en placa delgada, la que fue desa-

rrollada con el sistema secuencial indicado anteriormente. (Placa 2) Los resultados obtenidos indicaron que si bien los extractos presentaban menor pigmentación, el rendimiento de extracción de los metabolitos era muy pobre, ya que resultaba casi imposible visualizarlos en el cromatograma. Para la cocaína se obtuvo en cambio, muy buen rendimiento.

En vista de lo anteriormente expuesto y lo antieconómico del método, después de varios intentos se decidió descartar la técnica descrita. Se retornó entonces al método de Bastos y col. realizándose el aislamiento de las drogas tal como, se había efectuado anteriormente. La operación de derivatización se llevó a cabo siguiendo las indicaciones propuestas por los autores.

A la fase etanólica proveniente del "salting out" se le adicionó ácido clorhídrico 6 N hasta un valor de pH inferior a 7.

Para realizar la butilación se adicionó a la fase antes citada, 2 ml de 1-butanol y 0, 1 ml de ácido sulfúrico concentrado, dejándose reaccionar por espacio de 30' en un baño de silicona a temperatura entre 120° - 130°.

Transcurrido el tiempo señalado el tubo fué retirado del baño, permitiendo su enfriamiento a temperatura ambiente. Se adicionó a continuación 5 ml de tolueno y la mezcla fué trasvasada a un tubo limpio. El primer tubo fué lavado con 5 ml de agua destilada que se unió luego a la mezcla butanol-tolueno. El contenido del segundo tubo fué agitado en Vortex; centrifugado y la fase tolueno descartada. La solución acuosa remanente fué saturada con bicarbonato de sodio sólido y extraída con 10 ml de ciclohexano. Este extracto orgánico una vez separado y evaporado, se sometió a un análisis cromatográfico en capa delgada en el sistema metanol-amoniaco (99-1), revelándose con iodoplatinato.(Placa 3).

A pesar de haberse desarrollado la técnica ajustándose estrictamente a lo indicado por los autores en lo concierne a reactivos, metodología, volúmenes, tiempos temperaturas, etc., no se obtuvieron resultados satisfactorios.

Los inconvenientes más notables encontrados fueron la carbonización del extracto y la aparición en los cromatogramas, aún en los testigos, de manchas espúreas que indicaron alguna modificación en las moléculas de ergonina y

benzoilecgonina (posible formación de dobles ligaduras y arrastre de importante cantidad de impurezas.

Se supuso que estos inconvenientes se debían a la evaporación de los solventes que producían una mayor concentración del ácido sulfúrico. Para tratar de superar en cierta medida estos problemas se incrementaron los volúmenes de etanol y butanol y se adicionó en la boca del tubo de reacción un pequeño condensador de aproximadamente 20cm de alto con adaptación esmerilada. Este último fué diseñado con un estrechamiento a fin de permitir la colocación de un "manchón" de agua fría, el que se renovaba frecuentemente. (Placa 4).

Estas modificaciones mejoraron los resultados lo que pudo apreciarse en la placa cromatográfica respectiva la que se procesó en forma similar a la Placa 3 variando sólo la temperatura, ya que esta última se desarrolló en heladera a 4°C. Con el fin de poder realizar la evaluación de las drogas en estudio, se intentaron resoluciones espectrofotométricas al U.V. de los correspondientes derivados butilados empleando como solventes etanol y ácido sulfúrico 0,1N.

Las resoluciones se realizaron empleando como blanco, orinas exentas de drogas y procesadas en idéntica forma. Los resultados obtenidos no fueron efectivos ya que las sustancias de coextracción impidieron tener datos coherentes.

Un dato importante de la metodología aplicada, teniendo en cuenta, que se trabajó con blancos y testigos, fué que el etanol empleando "salting out" extrae las drogas, a partir de soluciones acuosas, con muy buen rendimiento.

Esta observación sirvió de punto de partida para que a continuación se intentara purificar los extractos etanólicos por tratamiento a través de columnas.

En primer lugar se resolvió ensayar la purificación por pasaje a través de columnas conteniendo Celite.

Se preparó una pequeña columna con 1 g de Celite 545.

El extracto etanólico provenientes del "salting out" fué disuelto en 1 ml de la mezcla cloroformo-isopropanol-1-2 de cloroetano (8:1:3) y la solución fué colocada en el tope de la columna de Celite. Una vez introducida completamente la muestra, comenzó a eluirse con pequeñas porciones de la mezcla antes citada colectándose 3 fracciones de 5ml

cada una, las que fueron evaporadas en rotavapor.

Se tomó cada una con 50 ul de metanol y se sometió a la cromatografía en placa delgada. El mayor porcentaje de los metabolitos apareció en las dos primeras fracciones y muy poco en la última.

El resultado obtenido debe considerarse altamente satisfactorio, puesto que fué posible eliminar impurezas y obtener los respectivos valores Rf de los metabolitos en total coincidencia con los testigos; pero en oposición es de destacar un reducido rendimiento.

Se desea aclarar que la elección del solvente cloroformo-isopropanol-1-2, dicloroetano (8:1:3) fué realizado luego de haber ensayado un gran número de otros solventes y mezcla de los mismos con muy malos resultados.

Se efectuaron a continuación varios ensayos, tendientes a verificar los límites de sensibilidad de la técnica descripta ya que en las pruebas precedentes se empleaban concentraciones de 100 ug/ml de benzoilecgonina y ecgonina.

Se observó que en concentraciones de 25 ug/ml de cada una de las citadas drogas, no se revelaban éstas considerán-

dose este límite muy elevado para su aplicación en casos legales.

Se ensayaron entonces otros solventes de elución tales como metanol, que producía extractos muy impuros; mezclas de metanol-cloroformo a distintas proporciones; pero en todos los casos se eluían junto con las drogas sustancias interferentes cuyos valores R_f coincidían con los de los metabolitos en examen.

Se intentó a continuación el empleo de aislamiento por columna de amberlite XAD₂.

En uno de los trabajos comentados en el apartado titulado "Generalidades sobre técnicas analíticas" e identificado con el N° XIII, los autores Naya, Nisra y Mulé (68), mencionan haber realizado el aislamiento de los metabolitos de la (³H) cocaína de orina y otros productos biológicos de ratas previamente intoxicadas con dicho alcaloide, mediante el empleo de resina de Amberlite XAD₂. Se intentó reproducir dicha técnica a pesar de que Mulé, uno de los coautores, manifestó en un trabajo publicado un año antes al citado (65) la casi imposibilidad de aislar los metabo-

litos hidrosolubles de la cocaína empleando dicha resina. A su vez Koontz (47) observó que los productos de biotransformación de la cocaína pueden ser aislados por resina XAD₂ a partir de soluciones de baja fuerza iónica, pero no a partir de orina. Previamente aislaron la cocaína de la orina con ciclohexano, destinándose luego el remanente de la muestra para la extracción de los metabolitos hidrosolubles.

La orina fué filtrada a través de lana de vidrio y repetidamente pasada por una columna de Amberlite XAD₂ de 300 mm por 25 mm, lavándose a continuación con 100 ml de agua. El extracto acuoso se concentró a presión reducida y baja temperatura, siendo denominada fracción N° 1.

Los metabolitos absorbidos sobre la columna fueron eluidos con metanol, hasta la desaparición de la radioactividad.

Como el presente trabajo no se realizó con droga marcada no se dispuso de ese parámetro de referencia, por lo que se colectaron dos fracciones de 100 ml de cada una, que se evaporaron en rotavapor y fueron sometidas a la cromatografía en placa delgada. Placas 5 y 6.

En vista de no haberse obtenido ningún resultado y

atento a lo expuesto por Koontz (47) respecto a la imposibilidad de aislar los metabolitos hidrosolubles directamente de la orina, se intentó efectuar dicha experiencia primero sobre el extracto etanólico proveniente del "salting out", y segundo, a partir de un extracto metanólico de las orinas previamente secadas a presión reducida. En ambos casos los solventes fueron evaporados y los extractos reconstituídos con agua. Las muestras, así procesadas, se sometieron al pasaje por la columna de Amberlite XAD₂, procediéndose en forma análoga a la descrita anteriormente. En este caso se obtuvieron resultados igualmente negativos.

IV.- Empleo del acetato de etilo como solvente de extracción de los metabolitos hidrosolubles.

De acuerdo con la tabla de solubilidades de los metabolitos de la cocaína, la ecgonina base es soluble en acetato de etilo en la proporción de 1 en 75.

Ante esta referencia se utilizó el mencionado solvente como agente para las respectivas extracciones.

Debido a que en los exámenes de rutina, se procesan los metabolitos hidrosolubles en forma simultánea, en este

caso también se aplicó el mismo solvente para el aislamiento de ecgonina y benzoilecgonina.

Se introdujeron 200 ug de cada una de las drogas antes mencionadas en tubos separados agregándose 2 ml de agua destilada y cantidad suficiente de amoníaco hasta pH 9. A continuación se efectuó un agotamiento en Vortex durante 2 min. con 3 ml de acetato de etilo. Después del centrifugado, las fases orgánicas fueron separadas, evaporadas en rotavapor y aplicadas a una placa para cromatografía con soporte de silicagel G. El solvente de corrimiento propuesto fué cloroformo-metanol (75; 25) siendo la cuba saturada con amoníaco de la manera habitual. Una vez alcanzado el solvente una altura conveniente, se retiró la placa y una vez seca fué revelada con el reactivo de Dragendorff modificado, apareciendo en la misma, solamente las manchas correspondientes a los testigos (placa 7). Ante este resultado se repitió el ensayo con la variante de la saturación de la fase acuosa con sulfato de amonio sólido. Se procedió en forma similar a la técnica precedente pero después del agregado de los 3 ml de acetato de etilo la fase acuosa fue saturada

con sulfato de amonio. Una vez lograda la saturación se procedió a agitar, en Vortex, centrifugar, separar y evaporar las fases orgánicas, las que fueron luego sometidas a la cromatografía en placa delgada. Esta variante analítica permitió comprobar que la benzoilecgonina se extraía con muy buen rendimiento; en cambio la ecgonina no fué detectada.

En vista de los resultados obtenidos se decidió cambiar el agente saturante, empleándose en este caso carbonato de potasio anhidro, procediéndose en todo lo demás en forma análoga al ensayo anterior. En este caso se observó una mácula muy débil en la zona correspondiente al Rf de la ecgonina; mientras la benzoilecgonina incrementó su recuperación. (Placa 8).

Conforme al éxito obtenido para la benzoilecgonina, la que fué satisfactoriamente extraída a partir de agua, se trató de aplicar la misma técnica a muestras de orina a las que se les adicionó la droga en estudio.

Los ensayos se efectuaron en forma confrontativa utilizando una muestra de orina normal (B), orina adicionada de benzoilecgonina (M) y agua destilada conteniendo el

mismo compuesto (T). Los volúmenes fueron de 5 ml y la cantidad de droga agregada 100 ug que representaba una concentración de 20 ug/ml.

A cada tubo se le efectuaron 3 extracciones con 5 ml de acetato de etilo cada vez. Los extractos una vez evaporados se disolvieron con 50 ul de etanol y se cromatografiaron en placa delgada, empleándose como solvente resolutivo cloroformo-metanol (75: 25).

Como en el caso anterior los resultados fueron óptimos para el testigo pero en cuanto a la muestra, las sustancias de coextracción de la orina impidieron visualizar en forma neta la mácula correspondiente a la benzoilecgonina. Aunque la diferencia de intensidad con las manchas presentadas por el blanco eran bien notorias resultaba imposible predecir los problemas que se producirían con bajas concentraciones de benzoilecgonina.

El objetivo siguiente fué, entonces, el lograr un solvente de resolución que separará al metabolito de los productos de coextracción de la orina.

Después de efectuar varios ensayos se comprobó que

el sistema eluyente que ofrecía resultados satisfactorios era el constituido por la mezcla metanol-cloroformo (75:25) en atmósfera de amoníaco. (Placa 9).

V.- Estudios tendientes al logro de solventes o mezclas para el aislamiento de la ecgonina.

Ensayos previos indicaban que la ecgonina podía extraerse con muy buen rendimiento a partir de agua con etanol, empleando la técnica de "salting out" con carbonato de potasio, pero con orina los resultados era deficientes, por la cantidad de impurezas coextraídas. Unicamente mediante la butilación de los extractos pudo comprobarse la presencia del derivado de la ecgonina (6).

Los intentos originales realizados con la finalidad de aislar la ecgonina se han resumido en los esquemas que se detallan más adelante.

En todos los casos se trabajó con concentraciones de cocaína, ecgonina y benzoilecgonina de 20 ug/ml y los volúmenes de elección para las muestras fueron de 5ml de orina de ratas, no intoxicadas.

PLACAS CROMATOGRAFICAS (Referencias)

Abreviaturas

- C.- Cocaína
- B.- Benzoilecgonina
- E.- Ecgonina

Agentes revelantes

- (1).-Dragendorff modificado
- (2).-Iodoplatinato de potasio

Solventes de corrimiento

- I.- Acetato de etilo- metanol (170:20), cuba saturada con amoníaco.
- II.- Cloroformo-metanol (50:50), cuba saturada con amoníaco.
- III.-Metanol-amoníaco (99-1).
- IV.- Cloroformo- metanol (75:25), cuba saturada con amoníaco.
- V.- Cloroformo-metanol (25:75), cuba saturada con amoníaco.

Sustancias sembradas

- 1.-Blanco de orina
- 2.- Orina + C + B + E
- 3.- Agua + C + B + E
- 4.- Testigos de C, B y E
- 5.- Idem 1
- 6.- Orina + B + E
- 7.- Agua + B + E
- 8.- Testigo de B y E (sin butilación)
- 9.- Testigo de B
- 10.- Agua + E
- 11.- Testigo de E
- 12.- Orina + B
- 13.- Agua + B

PLACAS CROMATOGRÁFICAS PARA COMPROBAR LA EFICIENCIA DE

LOS MÉTODOS DE AISLAMIENTO

(ver referencias)



Placa 1

Placa 2

- Placa 1: a) Extracción con cloroformo-etanol (3:2)
b) Se separa la fase clorofórmica que extrae C.
c) Después de saturar con K_2CO_3 , se separa el etanol que extrae B+E.

Solventes de resolución: (en forma secuencial)

I.- hasta 11cm

II.- hasta 7 cm

Agente revelante:(1)

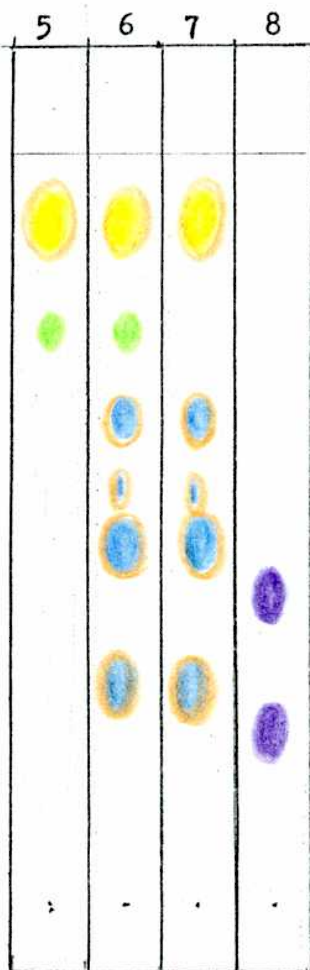
Placa 2: Extracción con mezcla:cloroformo-isopropanol-1-2dicloro-etano (8:1:3)

Solventes de resolución y agente revelante : idem placa 1

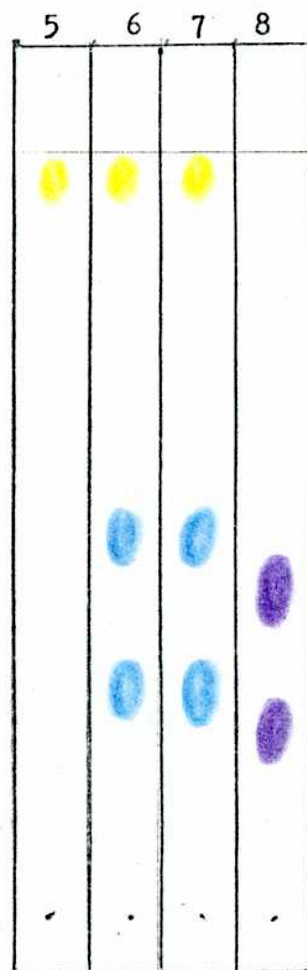
PLACAS CROMATOGRAFICAS PARA COMPROBAR LA EFICIENCIA DE

LOS METODOS DE AISLAMIENTO

(ver referencias)



Placa 3



Placa 4

Placa 3: Extracción de B + E con metanol, previa saturación con K_2CO_3 ,
Derivatización mediante butilación.

Solvente de resolución: III

Agente revelante: (2)

Placa 4: Idem placa 3, con las modificaciones introducidas para la
derivatización

Resolución efectuada a 4°C.

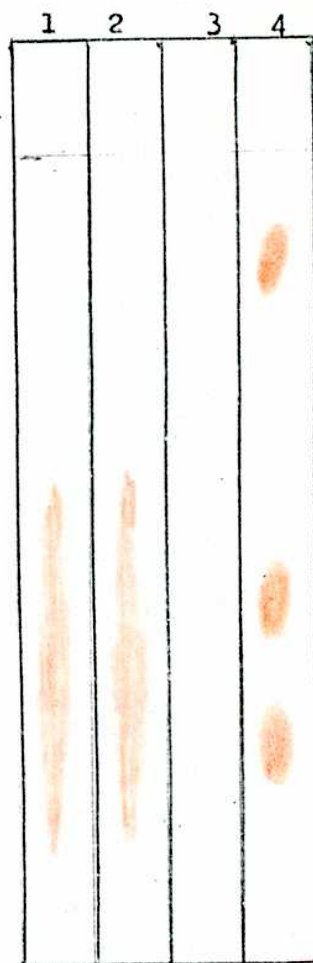
PLACAS CROMATOGRAFICAS PARA COMPROBAR LA EFICIENCIA DE

LOS METODOS DE AISLAMIENTO

(Ver referencias)



Placa 5



Placa 6

Placa 5: Extracción de C, B, E por empleo de la resina de amberlite XAD₂ (extracto acuoso)

Solventes de resolución: (en forma secuencial)

I.- hasta 11 cm

II.- hasta 7 cm

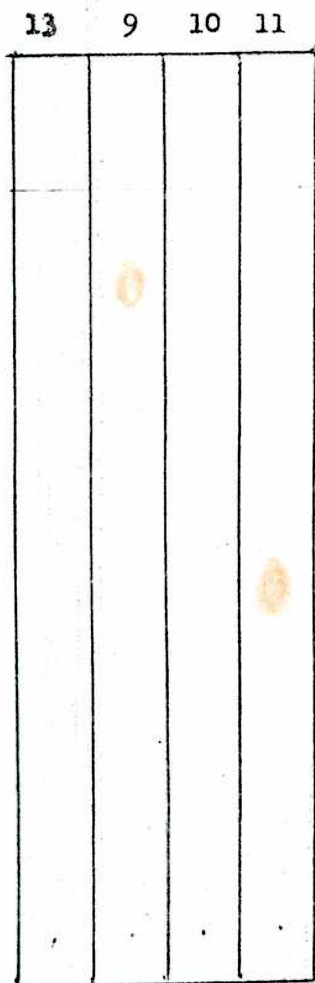
Agente revelante: (1)

Placa 6: Extractos metanólicos procedentes de la elución de la resina XAD₂.

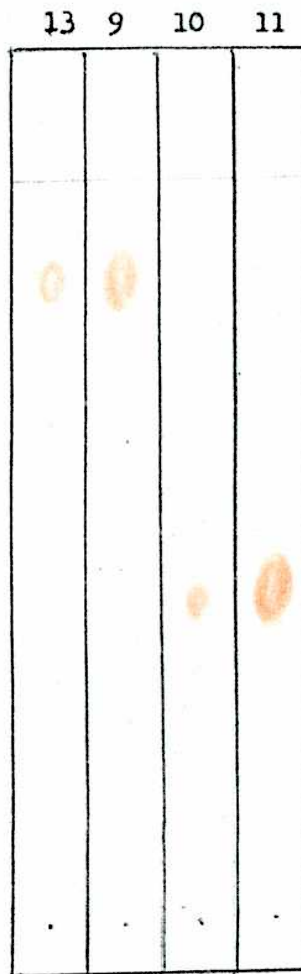
PLACAS CROMATOGRÁFICAS PARA COMPROBAR LA EFICIENCIA DE

LOS METODOS DE AISLAMIENTO

(Ver referencias)



Placa 7



Placa 8

Placa 7: Extracción de B y E con acetato de etilo a partir de soluciones acuosas

Solvente de resolución: IV

Agente revelante: (1)

Temperatura ambiente

Placa 8: Extracciones de B y E con acetato de etilo previa saturación con K_2CO_3

Solvente de resolución: IV

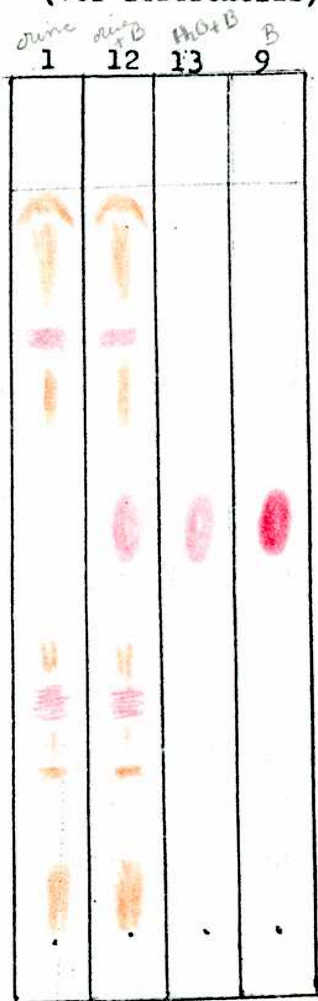
Agente revelante: (1)

Temperatura ambiente.

PLACAS CROMATOGRAFICAS PARA COMPROBAR LA EFICIENCIA DE

LOS METODOS DE AISLAMIENTO

(Ver referencias)



Placa 9

Placa 9: Extracción de B con acetato de etilo previa saturación con CO_3K_2

Solvente de resolución: V

Agente revelante: (1) y (2) en forma secuencial

Temperatura ambiente

Los ensayos en forma paralela fueron realizados con blanco de orina (B), con orina adicionada de las drogas (M) y testigos de agua destilada conteniendo los metabolitos en estudio (T). El análisis de los extractos por cromatografía en placa delgada permitió obtener conclusiones respecto de los resultados logrados.

Esquemas.

- A) 1) Extracción con ciclohexano, ajustando el pH a 8 con solución de hidróxido de amonio al 20%. Se logra aislar la cocaína con un rendimiento cercano al 95%.
- 2) Saturación de la fase acuosa con carbonato de potasio anhidro y extracción con acetato de etilo con lo que se consigue aislar la benzoilecgonina.
- 3) La fase acuosa remanente ya saturada, se trata con isopropanol.

El empleo de este solvente produjo extractos más puros que el etanol, pero aún persistían sustancias propias de la orina que interferían en la identificación de la ecgonina. Se ensayaron numerosos sol-

ventes de resolución, para lograr la separación de las interferencias y la droga, pero no se obtuvieron resultados satisfactorios.

B) En este ensayo los pasos 1 y 2 se efectuaron en forma análoga al esquema A.

1) En este ítem, se propone el cambio del agente de extracción. Para tal fin se preparó una mezcla de acetato de etilo-isopropanol (1:1). Si bien este recurso permitió disponer de un extracto más depurado, persistía aún apreciable material contaminante.

C) 1) La cocaína es extraída nuevamente con ciclohexano manteniendo las condiciones explicitadas en A.

2) La benzoilecgonina es extraída igualmente con acetato de etilo, previa saturación con carbonato de potasio. La saturación se efectuó en forma lenta y sumergiendo los tubos en baño de hielo, a fin de neutralizar el incremento de temperatura producido por el agregado de carbonato de potasio, condición que podría inducir la descomposición hidrolítica del mencionado metabolito.

3) La mezcla de solventes destinada a la extracción de la ecgonina fué nuevamente modificada, llevándola a las siguientes proporciones: acetato de etilo-isopropanol (3:1). Esta mezcla extrajo con buen rendimiento, pero los extractos aunque aparentaban estar bastante puros como para lograr la identificación de la ecgonina por cromatografía en placa delgada, dieron lugar a la aparición de falsas máculas coincidentes con el Rf de la droga, en catorce sistemas de resolución empleados.

Pese a los resultados obtenidos, resultaba innegable que la técnica de extracción empleada para la ecgonina era apropiada requiriéndose a continuación una buena técnica de purificación.

Se pensó obviar el paso de aislamiento de la benzoil-ecgonina y realizarlo en forma conjunta mediante el empleo de la mezcla acetato de etilo-isopropanol (3:1).

Simultáneamente se propuso aplicar una técnica de "clean up" a fin de lograr extractos de mayor pureza.

Se ha hecho referencia al empleo de la columna de ce-

lite, como así también los motivos por los cuales desistiose de su empleo.

Otra alternativa la constituyó el empleo de carbón previamente tratado, tal como lo indica Meola (54). Este autor manifiesta realizar la extracción de drogas a partir de orina, incluyendo la cocaína y sus metabolitos, benzoil-ecgonina y ecgonina. Probada la técnica indicada, resultó imposible eluir del carbon los metabolitos con los eluyentes propuestos por el autor: eter etílico y cloroformo-isopropanol(50 : 10). Esta técnica emplea carbón tratado con carbonato de sodio y es factible que los metabolitos polares con grupos carboxílicos libres, queden adosados a la base y no puedan ser recuperados libres de las impurezas de la orina, en el caso de usar solventes más polares.

VI.-Ensayos de otras técnicas de purificación.

Se prosiguieron los intentos para lograr un sistema de purificación con cualidades tales que proporcionara extractos puros y buena recuperación.

Con tal motivo se probaron columnas rellenas con distintos "lechos" tales como Florisil, LH 10, LH20, resinas

de intercambio, Silicagel, Tierras de Fuller (8)(11)(87)(82)(1) conjuntamente con eluyentes varios.

El que aparentemente cumplía los objetivos previstos era el sistema Silicagel como soporte y metanol como eluyente.

A fin de establecer las óptimas condiciones operativas se prepararon columnas de variadas longitudes, comprobándose que con una altura de 5 cm se lograba una buena purificación.

Se prepararon tres columnas de 5 cm de altura por 0.7cm de diámetro interno, destinándose una de ellas para el blanco de orina, otra para la ecgonina y la restante para la benzoilecgonina. Tanto las drogas puras como el blanco de orina, se disolvieron en metanol y a continuación se realizó el tratamiento de las soluciones por las columnas, eluyéndolas con el mismo solvente. Se colectaron veinte fracciones de 1 ml cada una.

Efectuada la cromatografía en placa delgada de las fracciones obtenidas, pudo comprobarse que las drogas comenzaban a eluirse a partir de la segunda fracción y continua-

ban hasta los 8 ml. La mayor cantidad de impurezas se eluyó en el primer mililitro y algo en la segunda fracción.

Con un criterio similar y colectando para las segundas fracciones, volúmenes de 0,2 ml, pudo comprobarse que la benzoilecgonina comenzaba a eluirse a 1,2 ml y la ecgonina a partir de 1,6 ml.

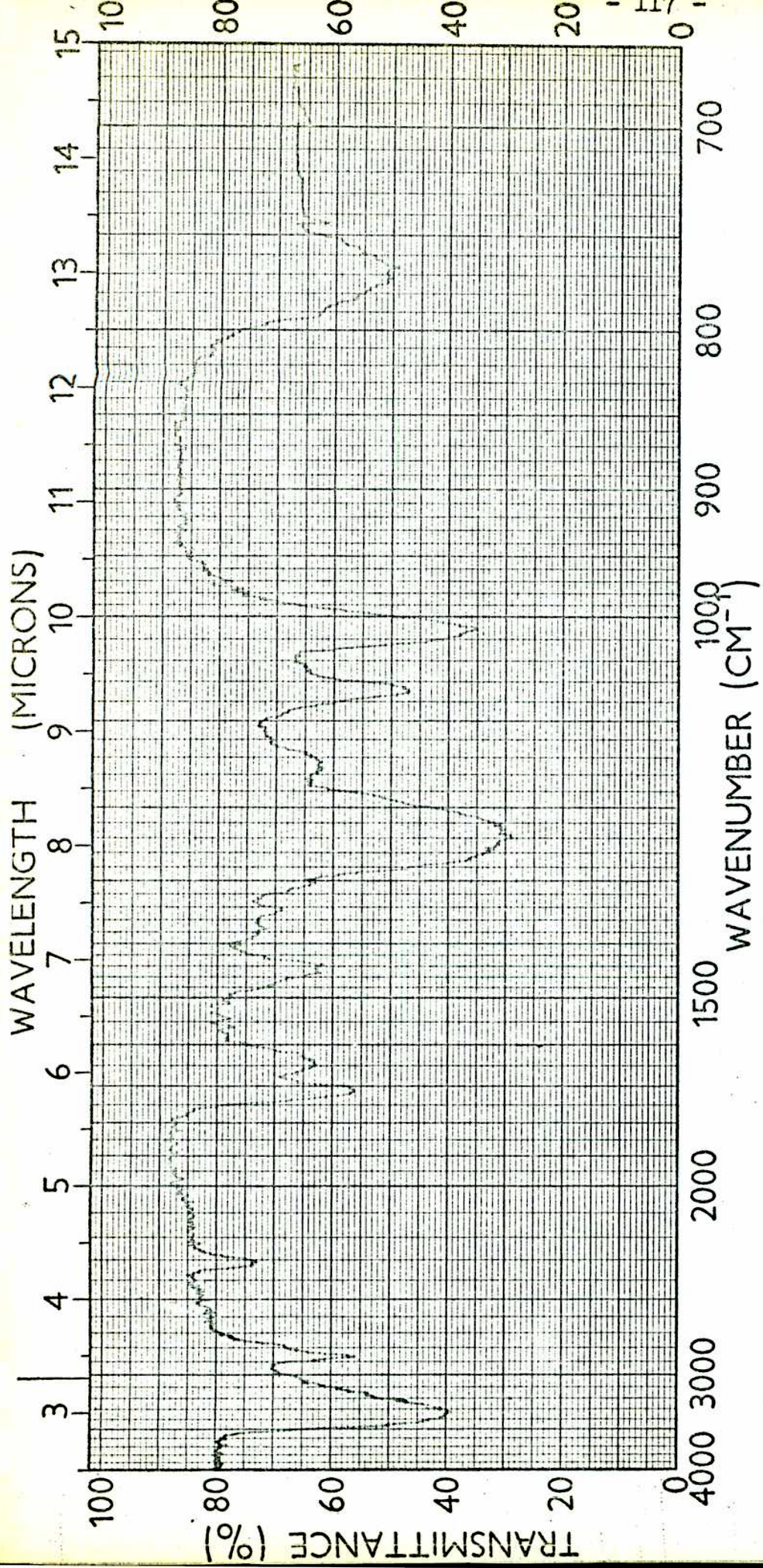
Esta técnica mejoró mucho la pureza de los extractos pero aún aparecían en los cromatogramas débiles manchas en los blancos que podían ser confundidas con las drogas en estudio en especial para muy bajas concentraciones

VII.- Aislamiento y evaluación de metilecgonina.

Se realizaron ensayos tendientes al aislamiento de la metilecgonina, metabolito producido por la hidrólisis del ácido benzoico en la molécula de cocaína.

Efectuado el rastreo bibliográfico tendiente a la obtención de las propiedades fisicoquímicas de dicha droga, a fin de proyectar un esquema para su aislamiento, no pudo lograrse ningún aporte significativo (53)(55)(9)(26)(41).

El hecho de estar bloqueado el grupo carboxilo de la molécula de ecgonina, indica la menor polaridad de la metil-



SAMPLE <i>HETZL BECONIJA</i> ORIGIN _____	PHASE <i>Film</i> SOLVENT _____ CONC. _____ CELL PATH _____ REFERENCE <i>Acetone (Perkin-Film)</i>	SCAN SPEED <i>2000</i> SLIT <i>2.5</i> OPERATOR <i>A.R.</i> DATE <i>15.11.79</i> REMARKS _____
--	--	--

NO. 360

ecgonina respecto de la ecgonina, razón por la cual se intentó el aislamiento de la misma con solventes menos polares.

En un primer intento se trató de aislarla en forma conjunta con la cocaína mediante el empleo de ciclohexano, pero los resultados fueron negativos.

También fracasó el empleo de cloroformo y eter etílico.

En vista que para el posterior aislamiento de los metabolitos hidrosolubles, debía procederse a la saturación de la fase acuosa con carbonato de potasio, se pensó que esta operación podría favorecer la extracción de la metilecgonina.

Se probaron entonces los agentes extractivos antes citados, después de haber saturado, comprobándose la efectividad del eter etílico, que extrae la droga con buen rendimiento, pero conjuntamente con algunos productos normales de la orina.

Después de haber fijado los parámetros operativos para CGL, mediante el pasaje de la metilecgonina base testigo, se efectuaron las corridas cromatográficas correspondientes a los extractos del blanco de orina y orina más droga,

comprobándose, la presencia de un pico interferente, con un TR muy próximo al del metabolito.

Se intentó entonces la purificación de los extractos mediante tratamiento por columna de silicagel.

Como en casos anteriores, las primeras tentativas se hicieron en placa con soporte de silicagel HF, pues, aunque se determinó la no absorbancia de la metilecgonina, a baja longitud de onda, la localización de las interferencias por observación al U.V. podían darnos luego la evidencia cuando se revelara la placa con reactivos cromogénicos adecuados, de las distancias entre la droga y las impurezas.

Se efectuaron varios ensayos comprobándose que el sistema eluyente acetato de etilo-cloroformo-metanol-amoníaco (70: 20: 10: 1) era el más apropiado, (76) para separar la metilecgonina de las interferencias. (Placas 10 al 14).

El eluyente mencionado fué empleado para la purificación de los extractos conteniendo la metilecgonina, después de su aislamiento con eter mediante "salting out".

El extracto etereo es evaporado a sequedad procediéndose a continuación en la forma en que se indica.

Se preparan columnas de silicagel de 6 cm de altura y 0,7 cm de diámetro interno, las que son embebidas con el solvente de elución adoptado: acetato de etilo, cloroformo metanol-amoniaco (70: 20: 10:,1). Una vez que el mismo ha escurrido completamente se siembra el extracto conteniendo la metilecgonina, el que previamente se solubilizó con 0,25 ml de metanol.

Cuando la muestra hubo ingresado completamente, se comienza a eluir con el solvente citado.

La recolección del eluido se inicia en el momento de introducir la muestra, descartándose el primer mililitro y colectándose los tres mililitros siguientes que contienen la metilecgonina. Las impurezas coloreadas presentes en el extracto son claramente visualizadas en la parte superior de la columna.

La fracción escogida se evapora en rotavapor y se la disuelve en 50 ul de metanol para su posterior evaluación por cromatografía en fase gaseosa.

Hasta ese momento los resultados fueron obtenidos por el empleo de cromatografía en placa delgada, excepto para la

PLACAS CROMATOGRAFICAS PARA LA PURIFICACION DE METILECGONINA

(Referencias)

Substancias sembradas

- (1).- Blanco de orina
- (2).- Metilecgonina testigo
- (3).- Metilecgonina extraída de orina

Agentes revelantes

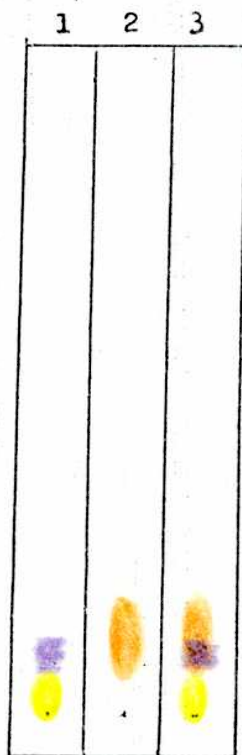
- A.- Luz ultravioleta
- B.- Dragendorff modificado

Solventes de corrimiento

- I.- Cloroformo
- II.- Acetato de etilo
- III.- Acetato de etilo-cloroformo- metanol (70:30:2,5)
- IV.- Acetato de etilo-cloroformo-metanol (50:50:2,5)
- V.- Acetato de etilo-cloroformo-metanol-amoníaco (70:15:15:1)
- VI.-Acetato de etilo-cloroformo-metanol-amoníaco (70:20:10:1) (*)

(*) Solvente de corrimiento elegido.

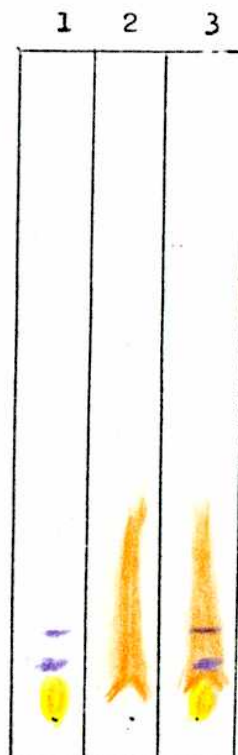
PLACAS CROMATOGRAFICAS PARA LA PURIFICACION DE METILECGONINA



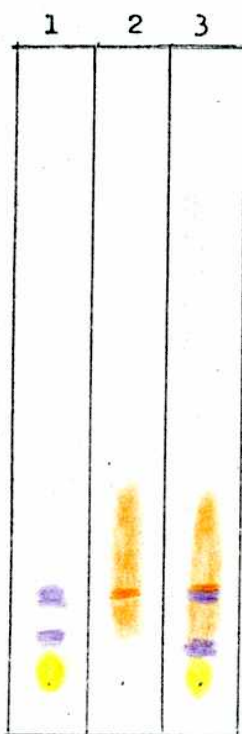
I



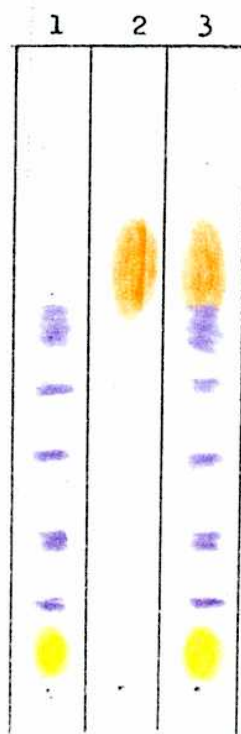
II



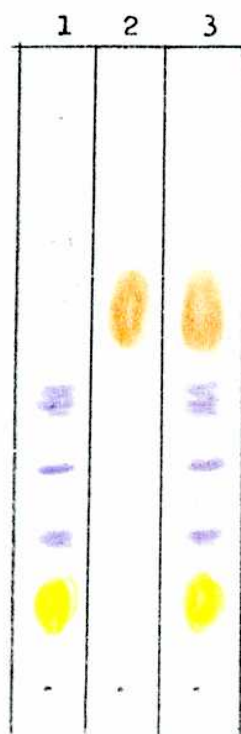
III



IV



V



VI

Aclaración : I, II, III, IV, V, VI indican los solventes de corrimiento (ver referencias)

metilecgonina, pero teniendo en cuenta la efectividad de las técnicas de aislamiento y purificación, se decidió también ensayar métodos analíticos instrumentales para la identificación y evaluación de las demás drogas en estudio.

VIII.- Empleo de la cromatografía gas-líquido.

Consignase que la aplicación de esta técnica resolutive imponía ineludiblemente un previo plan de tareas que incluía entre otras, los conocimientos teóricos y prácticos necesarios, relacionados con el implemento antes mencionado.

A) El análisis cualitativo, fundamental en C.G.L. permitió extraer información valiosa sobre concentraciones relativas de los componentes investigados y tiempos de retención. De acuerdo al tipo de material del presente trabajo y con la finalidad de lograr el óptimo de eficacia, el objetivo se centró sobre los siguientes puntos:

a) Elección de los rellenos de las columnas (soporte más fase fija) y longitud de las mismas.

Consultada la bibliografía especializada sobre las propiedades de los rellenos y dimensiones convenientes

tes de las columnas, se decidió ensayar las siguientes:

- 1) 10% O.V. 101 sobre Chromosorb W-HP- 100-120 mesh
columna de vidrio 1.200 mm por 4 mm.
- 2) 3% O.V. 25 sobre Chromosorb Q 100-120 mesh; columna de vidrio de 1.800 mm por 4 mm.
- 3) 5% O.V. 17 sobre Chromosorb W-HP 100-120 mesh; columna de vidrio de 1.800 mm por 4 mm.
- 4) 2% O.V. 101 sobre Chromosorb W-HP 100-120 mesh,
columna de vidrio de 1.800 mm por 4 mm.

Los rellenos y el llenado de las columnas se prepararon de acuerdo con las instrucciones del manual del equipo.

b) Elección de las temperaturas.

De todos los factores que intervienen en los tiempos de retención, es sin lugar a dudas el de la temperatura de las columnas, el más crítico sobre todo cuando se trabaja con programas de temperatura.

Debido a que las drogas aisladas de la orina pudieron ser separadas unas de otras, se prefirió trabajar con

cada una de ellas en forma isotérmica. Esto se realizó debido a que los programas resultaban muy extensos y a medida que se incrementaba la temperatura, la línea de base se desplazaba impidiendo visualizar los picos con nitidez.

En otros casos fué necesario disminuir la temperatura de la columna debido a la gran volatilidad de la droga (caso de la metilecgonina).

c) Elección del detector y gas vector.

Como las cantidades de las drogas que se esperaba registrar en las muestras, estaban en el orden de los μg , se decidió usar un detector de ionización de llama y, como gas vector nitrógeno, que por sus características resultó muy eficiente.

d) Elección de la temperatura en el block de inyección.

Se conoce la importancia de la temperatura de vaporización de las sustancias a analizar, ya que de la misma depende la eficiencia del sistema y la forma de los picos.

Así bajas temperaturas producen picos anchos (baja eficiencia) y aparición de colas aún con el uso de columnas adecuadas. Altas temperaturas producen fraccionamiento pirolítico de las sustancias con la consiguiente aparición de picos pertenecientes a los nuevos productos formados (fantasmas) o desaparición de las drogas en estudio.

e) Elección de la temperatura del block de detección.

De acuerdo a las propiedades de las muestras en estudio se seleccionó la temperatura adecuada para evitar condensaciones y obtener buenos resultados.

Después de haber optimizado las condiciones de trabajo para el análisis cualitativo, siendo la meta buscada la evaluación en la orina de ratas intoxicadas con cocaína, tanto de la droga original, como de los productos de su biotransformación, se impuso la realización del análisis cuantitativo.

En cromatografía gas-líquido, el análisis cuantitativo representa un problema tan complejo como el cualitativo.

La respuesta de un aparato es función de muchos factores y no es siempre fácil lograr la señal registrada en relación con la cantidad de muestra que ha pasado por el detector. De todas maneras, para que una estandarización sea posible, la respuesta del detector debe ser rigurosamente lineal en el ámbito de medida donde se lo usará, resultando más conveniente la tarea cuanto mayor sea ese ámbito.

Los detectores diferenciales responden a las variaciones de concentración de los elutos en la vena gaseosa que los atraviesa.

Las áreas que ellos determinan están ligadas a la cantidad de sustancia eluída según la siguiente relación.

$$M_i = K_i \cdot A_i$$

Siendo M_i : masa de las sustancias que atravesó el detector.

K_i : factor de proporcionalidad que tiene en cuenta la sensibilidad propia del detector hacia esa sustancia y la sensibilidad del registrador.

Ai: área del pico que le corresponde

El problema del análisis cuantitativo se basa en la determinación del área del trazado y un factor de proporcionalidad relativo al mismo.

En el presente trabajo la identificación y evaluación de las drogas no polares (cocaína y metilecgonina) fué de fácil resolución por C.G.L.; en cambio la benzoilecgonina y ecgonina debido a su alta polaridad, debieron ser sometidas a tratamientos de derivatización. Se empleó para esta operación el reactivo N.O. Bis-trimetil-silil-acetamida por sus cualidades altamente reactivas. (62).

Operando en las condiciones que se detallan en el apartado denominado "Esquema Operativo", se identificó y evaluó el trimetilsilil derivado de la ecgonina en forma satisfactoria; en cambio con el derivado de la benzoilecgonina no se obtuvieron respuestas reproducibles.

Se supuso que los problemas que presentaba la determinación de la benzoilecgonina se debían al hecho de que al ser eluída de la columna de silicagel empleada para su purificación, se coextraían sustancias inactivantes del

reactivo derivatizante. El agente trimetilsililante empleado es inestable frente a dadores de protones, agua y alcoholes, que lo transforman en hexametildisiloxano compuesto este completamente inerte. Era lógico suponer entonces que alguna sustancia con propiedades tales estuviese presente en el extracto conjuntamente con la benzoilecgonina inhibiendo en forma desigual la formación de los trimetilsilil derivados.

IX.- Empleo de cromatografía líquido-líquido de alta presión.

Ante lo expuesto precedentemente, se decidió adoptar otra técnica instrumental, para la evaluación de la benzoilecgonina.

Los extractos obtenidos, no eran aptos para ser análisis por espectrofotometría U.V. ya que los productos de coextracción de la orina interferían manifiestamente, dada la imposibilidad de su total eliminación.

Se intentó entonces el empleo de cromatografía líquido-líquido de alta presión.

Consultada la bibliografía especializada se consideraron tres trabajos (24) (18) (38).

El primero, empleaba dicha técnica instrumental como método de extracción y purificación para ser luego determinada por Gas-Masa. Los otros dos, empleaban la cromatografía líquido-líquido de alta presión, para su determinación.

En todos los casos las columnas de elección eran de fase reversa, variando la composición de las mezclas eluyentes.

El equipo utilizado en el presente trabajo, opera en condiciones isocráticas y está provisto de un detector de U.V. a 280 y 254 nm de longitud de onda.

Se trabajó con una columna de fase reversa rellena con partículas de silicagel de 10 μ de diámetro, ligadas a grupos octadecilo (Micropak MCH 10, de 30 cm de longitud por 0,4 cm de diámetro interno), complementandose además de una precolumna VYDAC s.c., de fase reversa de 4 x 0,4 cm.

La resolución de una columna se expresa en función de tres factores:

$$R = \left(\frac{\sqrt{N}}{4} \right) \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k'}{1 + k'} \right)$$

eficiencia / selectividad / capacidad

Es posible optimizar la resolución, variando cualquiera de estos términos.

k' es función de la relación de volumen de la fase móvil y la estacionaria de la columna

$$k' = K \frac{V_s}{V_m} \quad (1)$$

V_s : volumen de la fase estacionaria.
 V_m : volumen de la fase móvil intersticial y vol. "muerto" del instrumental.

$$\text{Se define } V_R = V_m + K \cdot V_s \quad (2)$$

El V_R (vol. de retención) de un componente es igual al volumen de retención de un componente no retenido (V_m) más el volumen adicional de fase móvil requerido para eluir el componente ($K \cdot V_s$).

De (1) y (2) y teniendo en cuenta que

$$V_R = t_R \times \text{caudal} \quad k' = \frac{t'_R}{t_m} \quad \text{y da idea}$$

del tiempo de retención.

t_m = tiempo de retención de un compuesto no retenido.

α - es una medida de la distancia de separación de los picos.

$$\alpha = \frac{t_{R_2} - t_m}{t_{R_1} - t_m} = \frac{t'_{R_2}}{t'_{R_1}} \quad \text{cuyo valor óptimo es} \\ > 1,2$$

Teniendo en cuenta el trabajo de Graffeo y col. (24) la composición de la fase móvil elegida fué metanol-agua (1 + 1). Las otras condiciones de trabajo fueron:

Caudal : 1,5 ml / min.

Temperatura : ambiente.

Programación : isocrática.

Detector: U.V. a 254 nm.

Con soluciones estandarizadas de benzoilecgonina se determinó la sensibilidad del detector, trabajando con una atenuación de 0.08 y se comprobó que a concentraciones de 0,3ug/ml se producían respuestas que permitían su identificación y pertinente evaluación.

Este valor se eligió por considerarse adecuado a la concentración de la droga presente en los extractos de orina de ratas tratadas.

El t_R de benzoilecgonina fue 6,4 minutos. Al efectuar una "corrida" con el extracto de un blanco de orina, se comprobó que coincidente con el mismo t_R de la droga se elu-

ían sustancias de coextracción.

$$k' = \frac{t_R}{t_m} = \frac{t_R - t_m}{t_m} \approx 3.$$

Para aumentar el t_R de la benzoilecgonina, (o sea obtener un $k' > 3$) se incrementó la proporción de agua .

El agua tiene mayor viscosidad que el metanol por lo tanto al aumentar la proporción de la primera, disminuye la velocidad de transporte de masa entre las fases y aumenta el tiempo de retención.

A pesar de ensayarse varias mezclas con cantidades crecientes de agua, no se logró una resolución satisfactoria.

Se probaron entonces los eluyentes propuestos por Jatow y col. (38) que consistían en 17% de acetomitrilo en buffer de fosfatos pH 2,7 y la de Evans y col. (18) formada por: agua - acetonitrilo - metanol (8 : 1 : 1), 1% de ácido acético y EDTA 0.3 M, pero en ninguno de los casos fue posible identificar el pico de la benzoilecgonina libre de las sustancias propias de la orina.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos con las

mezclas metanol-agua, se decidió incorporar un tercer solvente: acetonitrilo. Se ensayaron varias mezclas ternarias con estas sustancias en distintas proporciones, resultando la más adecuada la constituida por agua - acetonitrilo - metanol (80 : 15 ; 5). El acetonitrilo tiene menor viscosidad que el metanol. Comparando dos mezclas binarias agua - metanol y agua - acetonitrilo, conteniendo la misma cantidad de agua se comprobó que con la segunda se incrementaba la eficiencia de la columna y disminuía el tiempo de retención (t_R).

Con la mezcla ternaria seleccionada para el trabajo se obtuvo para la benzoilecgonina un $t_{RBE} = 9,4$ min.

Los componentes de la orina más polares se eluyeron antes y se logró separar el componente que interfería durante la elución.

$$\alpha = \frac{t'_{Rx}}{t'_{RBE}} = \frac{12}{9,4} \approx 1,3$$

El caudal se mantuvo en 1,5 ml/min del que resultó una presión de operación de 170 atmósferas. El trabajo se realizó a temperatura ambiente. Se empleó detector U.V. el

que operó a una longitud de onda de 254 nm y con una atenuación de 0.08.

Todos los solventes y reactivos utilizados fueron de calidad grado analítico Merck. Los eluyentes fueron filtrados a través de membrana filtrante Millipore de 0,5 u de diámetro de poro.

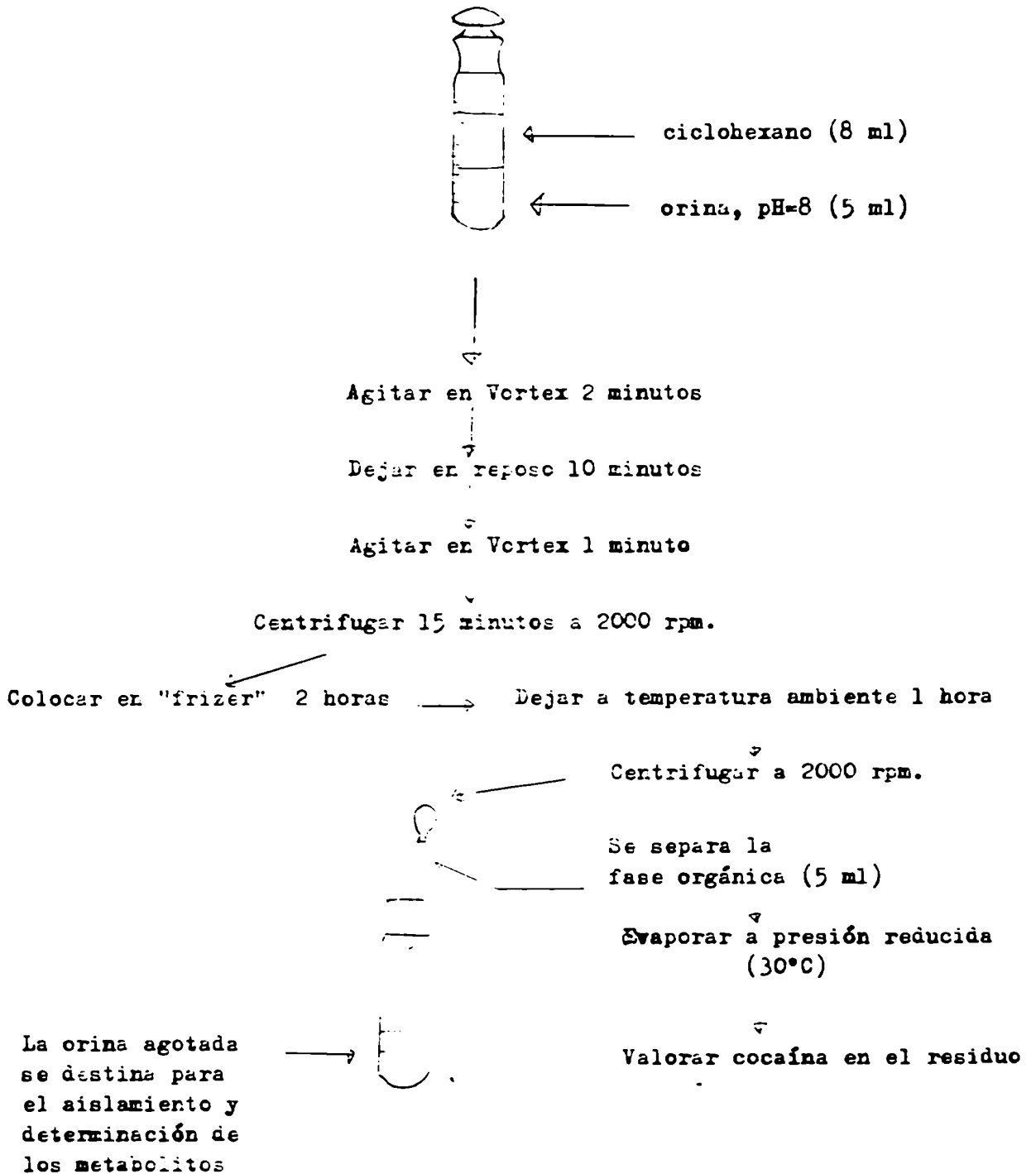
ESQUEMA OPERATIVO ADOPTADO.

La técnica definitivamente adoptada para la realización del trabajo consta de los siguientes pasos que se transcriben a continuación:

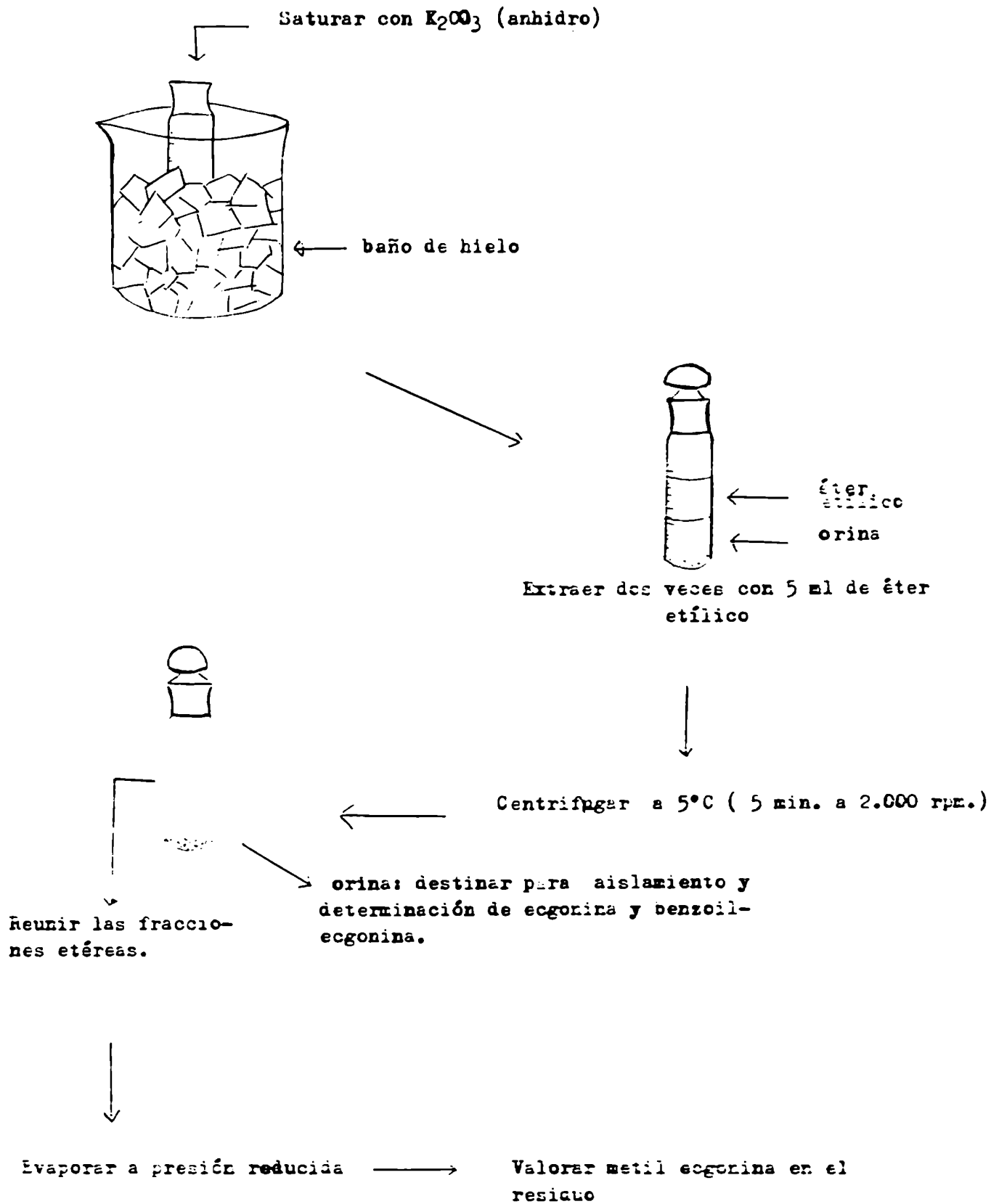
- I) Tratamiento de los animales y recolección de las muestras.
- II) Aislamiento y determinación de la cocaína.
- III) Aislamiento y determinación de la metilecgonina.
- IV) Aislamiento de la ecgonina y benzoilecgonina.
- V) Evaluación de la ecgonina.
- VI) Evaluación de la benzoilecgonina.

ESQUEMA DE LOS PASOS SEGUIDOS PARA EL AISLAMIENTO
DE LAS DROGAS EN ESTUDIO

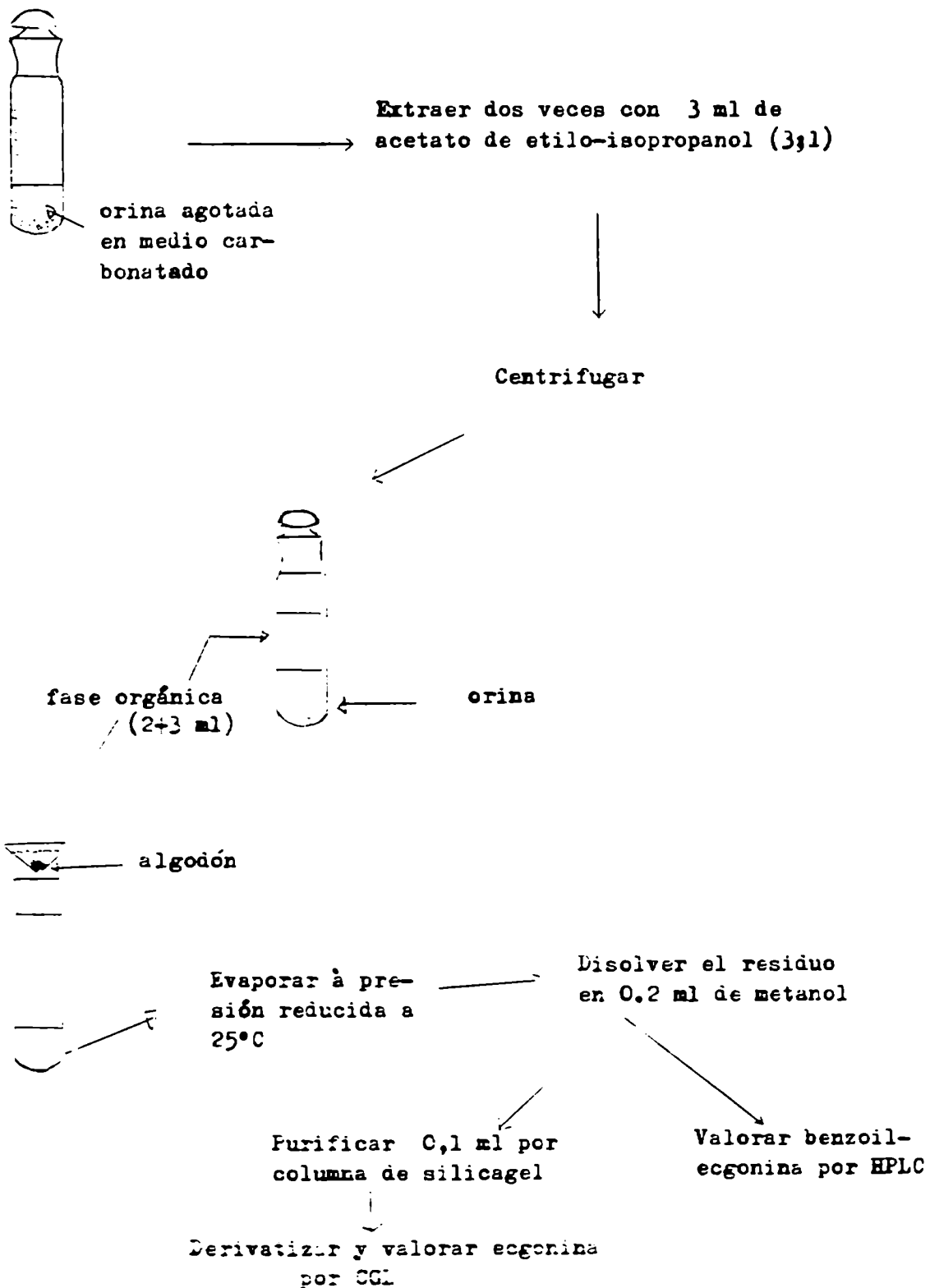
(Aislamiento de la cocaína)



(Aislamiento de la metilecgonina)



(Aislamiento de la benzoilecgonina y la ecgonina)



I.- Tratamiento de los animales y recolección de las muestras.

En todas las experiencias se usaron ratas hembras Wistar de 160 a 220 gramos de peso. Las ratas fueron inyectadas por vía intraperitoneal con clorhidrato de cocaína en solución fisiológica, a razón de 20 mg por kg de peso expresado como cocaína base.

Durante las 24 horas subsiguientes reservadas a la recolección de las muestras, se las privó de todo alimento, dispensándoles abundante agua.

Las ratas "control", recibieron cantidades equivalentes de solución fisiológica por la misma vía.

La recolección de la orina se efectuó en envases cilíndricos de plástico de 7 cm de altura por 2,8 cm de diámetro.

El pH de las orinas, tanto de las ratas inyectadas, como de los controles, acusó variantes comprendidas entre 6,3 y 6,8. En cuanto a la diuresis en uno y otro grupo, mostró oscilaciones comprendidas entre 4,6 a 13,2 ml para el lapso antes señalado. Consígnase que se ha procesado un volumen mínimo de 5,0 ml cuando los volúmenes superaban este va-

lor, utilizándose en cambio, la cantidad total recogida cuando era inferior a la expresada.

El bioterio en el que se realizaban las experiencias fué climatizado entre 21°C y 23°C y provisto además de un implemento destinado a dispensar luz artificial por el término de 12 horas.

Complementariamente se efectuaron comprobaciones destinadas a establecer el grado de hidrólisis de las sustancias en estudio durante el lapso de recolección antes indicado, incorporándose al efecto cantidades conocidas de clorhidrato de cocaína, benzoilecgonina y metilecgonina en recipientes de iguales características a los utilizados en la recolección de las muestras, conteniendo 5,0 ml de orina proveniente de animales no tratados.

Estas observaciones analíticas permitieron comprobar que de los compuestos incorporados, sólo la cocaína, mostraba alteración de carácter hidrolítico en las condiciones del ensayo, en una proporción aproximada al 10% de la cantidad incorporada a la muestra de orina de referencia.

Agrégase que las muestras de orina provenientes de ra-

tas tratadas y del respectivo lote de testigos, fueron analizadas de inmediato en algunos casos, mientras que, en otros, se estabilizaron a muy baja temperatura (-20°C) para su ulterior procesamiento.

II.- Aislamiento y determinación de la cocaína.

En tubos de vidrio Pyrex de 25 ml de capacidad con cierre esmerilado, se colocan 5,0 ml de orina y se ajusta el pH a 8, por agregado de c.s. de solución de hidróxido de amonio al 5% v/v.

Para el aislamiento de cocaína se incorpora a continuación 8 ml de ciclohexano exactamente medidos, se agita en Vortex por 2 min y se deja en reposo durante 10 min. Transcurrido este lapso se agita nuevamente durante un minuto, observándose que el contenido del tubo aparece emulsionado.

Se centrifugó durante 15 min a 2.000 rpm. A pesar de este tratamiento es frecuente comprobar que ambas fases no se han separado nítida y completamente, apareciendo parte del contenido emulsionado.

Queda proscrito el agregado de cualquier sustancia o

compuesto susceptible de anular la formación o persistencia de emulsiones, reconociéndose únicamente cualquier recurso físico atento a las exigencias que impone la metodología extractiva. Por tal motivo los tubos se colocaron a -20°C por espacio de 2 horas. Al retirar los tubos del "frizer" el contenido aparecía totalmente solidificado. Se dejó en reposo a temperatura ambiente durante una hora, comprobándose al cabo de ese tiempo la separación nítida de ambas fases.

Se centrifugó nuevamente y separó la fase orgánica superior mediante una pipeta tipo Pasteur provista de una pequeña pera de goma. El ciclohexano se transvasó a un tubo de ensayo provisto de un embudo conteniendo en su vástago una pequeña columna de algodón a manera de elemento filtrante .

Del volumen total del solvente colectado se miden exactamente 5,0 ml que se transvasan a un tubo con adaptación esmerilada, evaporándose en rotavapor a presión reducida y a 30°C de temperatura.

Este extracto se encuentra en condiciones de ser sometido a la evaluación de la cocaína que se realiza por cro-

matografía en fase gas líquido.

El extracto evaporado se toma con 50 ul de cloroformo y de esta solución se inyecta en el cromatógrafo una alícuota de 4 ul.

Las condiciones de operación son las que se detallan a continuación:

Columna: de vidrio de 1200 mm por 4 mm.

Fase estacionaria: 2% C.V. 101 sobre Chromosorb π -HP 100-120 Mesh.

Gas vector: nitrógeno 60 ml/min.

Detector: ionización de llama.

Aire: 300 ml/min.

Hidrógeno: 40 ml/min.

Temperatura de la columna: 200°C.

Temperatura del inyector: 250°C.

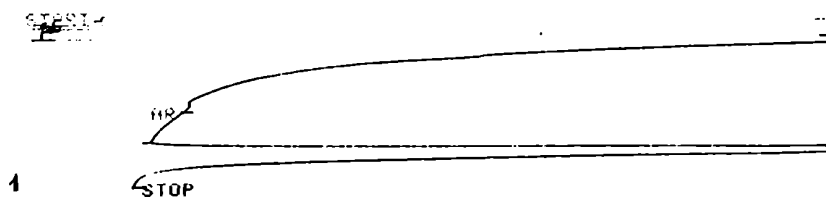
Temperatura del detector: 275°C.

Sensibilidad: $3 \cdot 10^3$ a.f.r.

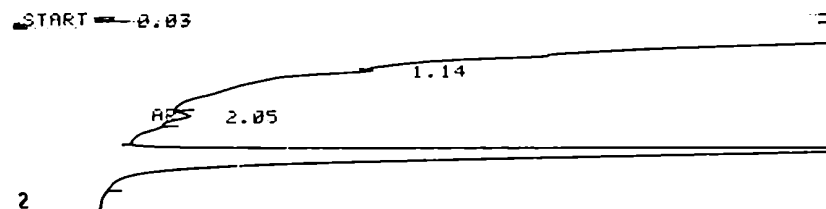
Velocidad papel: 1 cm/min.

Tiempo de retención: 2,90 - 2,93.

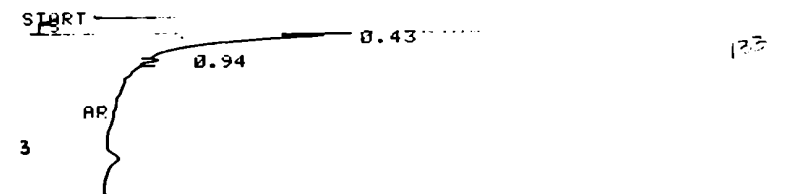
(Figuras N° 1 y 2)



HP RUN #
 AREA %
 RT
 2.98
 DIL FACTOR:



HP RUN # 6 APR/30/81
 AREA %
 RT AREA AREA %
 2.98 1015000 100.000
 DIL FACTOR: 1.0000 E+ 0



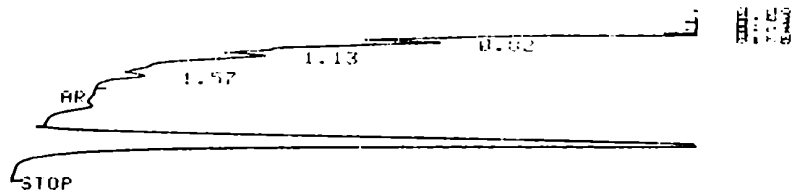
HP RUN # 5
 APENS?

Cromatograma 1: standard de cocaína 10 g/ml
 Cromatograma 2: standard de cocaína 10 g/ml, extraído de orina
 Cromatograma 3: blanco de orina

COCAINA

START

1



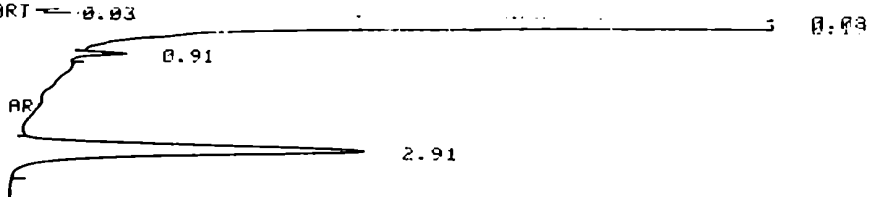
HP RUN #
AREA %

RT	AREA	AREA %
2.90	972600	100.000

DIL FACTOR: 1.0000 E+ 0

START ← 0.03

2



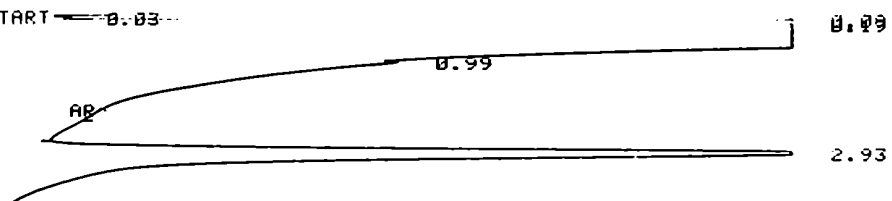
HP RUN # 10 APR/30/81
AREA %

RT	AREA	AREA %
2.91	452700	100.000

DIL FACTOR: 1.0000 E+ 0

START ← 0.03

3



HP RUN # 5 APR/30/81
AREA %

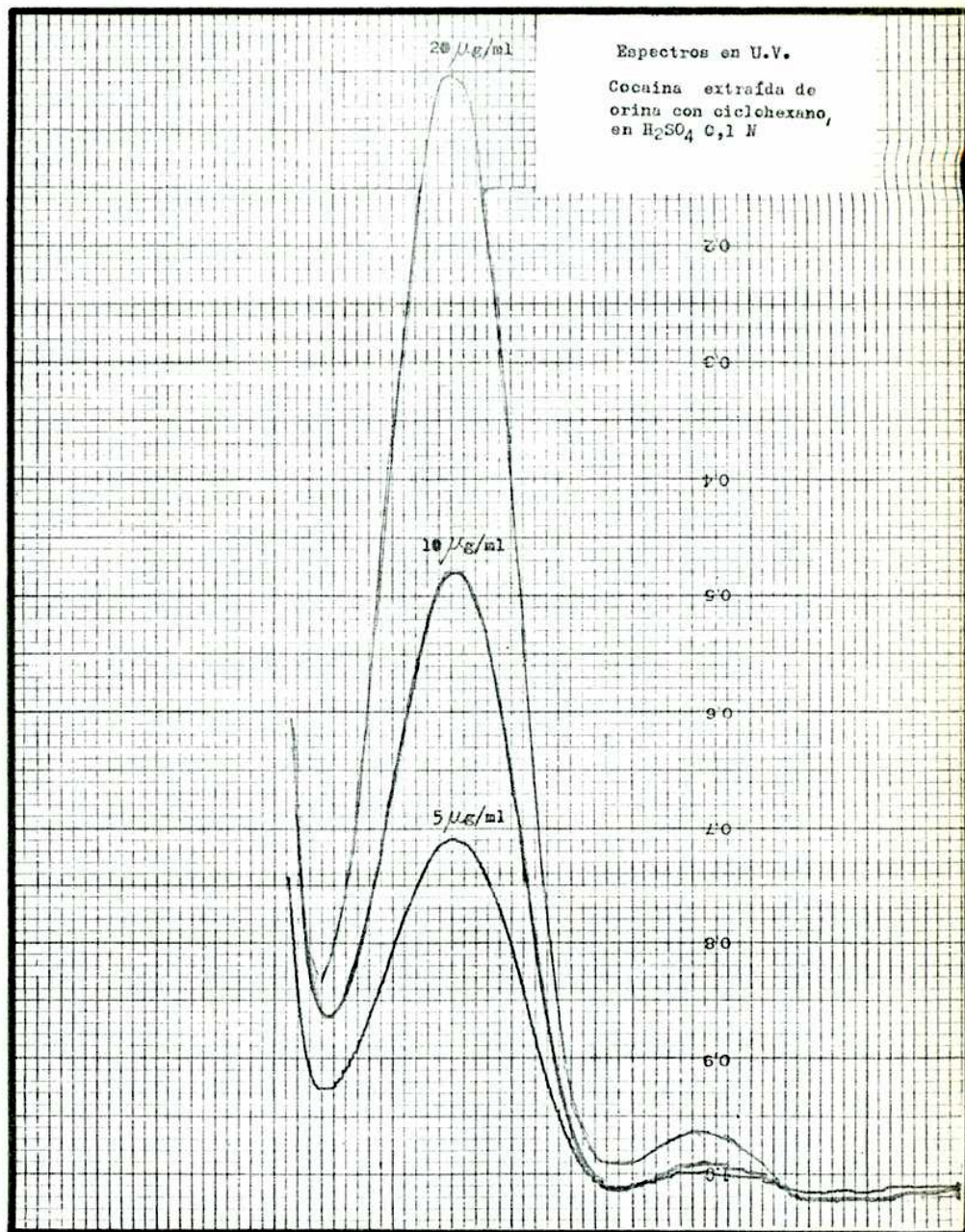
RT	AREA	AREA %
2.93	1237000	100.000

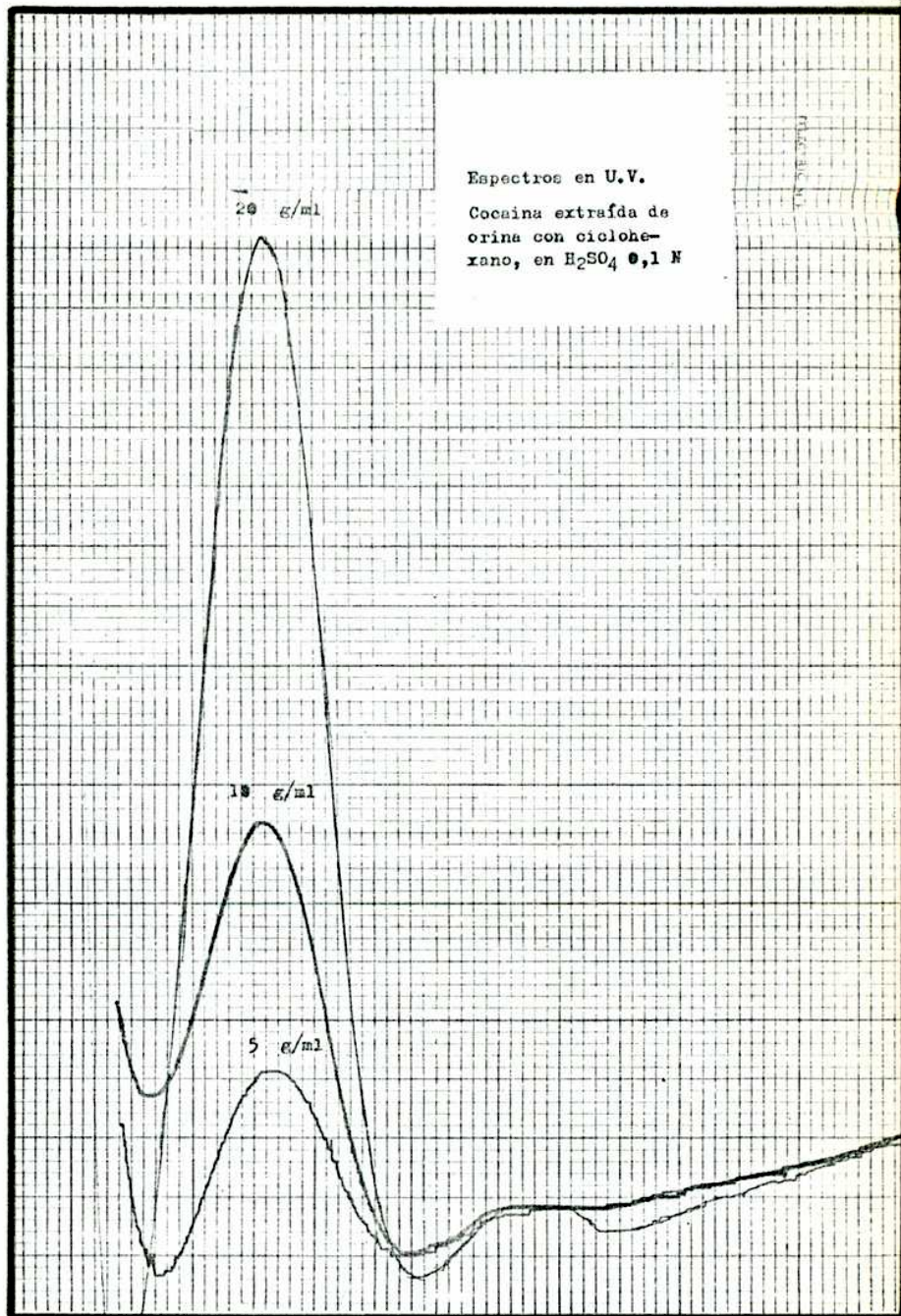
DIL FACTOR: 1.0000 E+ 0

Cromatograma 1: cocaína extraída de orina de rata inyectada con cocaína

Cromatograma 2: idem 1

Cromatograma 3: idem 1





III.- Aislamiento y determinación de la metilecgonina.

Los tubos conteniendo la orina, después de la completa eliminación del ciclohexano, se introducen en un baño de hielo y se saturan en forma lenta con carbonato de potasio purísimo. A continuación se realizan dos extracciones con 5,0ml de eter cada uno, con el objeto de aislar la metilecgonina. Para facilitar la separación de las fases, se centrifuga en dispositivo refrigerado a una temperatura de 5°C por espacio de 5 min a 2.000 r.p.m.

Las capas etéreas provenientes de cada una de las extracciones se reúnen en un tubo con adaptación esmerilada y se evaporan en rotavapor a presión reducida y baja temperatura.

Estos extractos se disuelven en 0,25 ml de metanol y posteriormente se tratan por pasaje a través de una columna de silicagel de 6 cm de altura y 0,7 cm de diámetro interno. El solvente de elución utilizado es: acetato de etilo-cloroforno-metanol-amoniaco (70: 20: 10: 1). Se descarta el primer mililitro de los eluidos, y se colecta los 2 ml siguientes que contienen la metilecgonina libre de sustancias interfe-

rentes. Estas fracciones se evaporan a sequedad en rotavapor.

Los extractos quedan así listos para la evaluación de la metilecgonina que se realiza por cromatografía en fase gas-líquido. Para su procesamiento se disuelven los extractos en 50 ul de metanol, inyectándose 4 ul en el cromatógrafo.

Las condiciones de trabajo son las siguientes:

Columna de vidrio de 1.200 mm por 4 mm.

Fase estacionaria: 2% O.V. 101 sobre Chromosorb W-HP 100-120 Mesh.

Gas vector: nitrógeno 60 ml/min.

Detector: ionización de llama.

Aire: 300 ml/min.

Hidrógeno: 40 ml/min.

Temperatura de la columna: 130°C.

Temperatura del inyector: 250°C.

Temperatura del detector: 275°C.

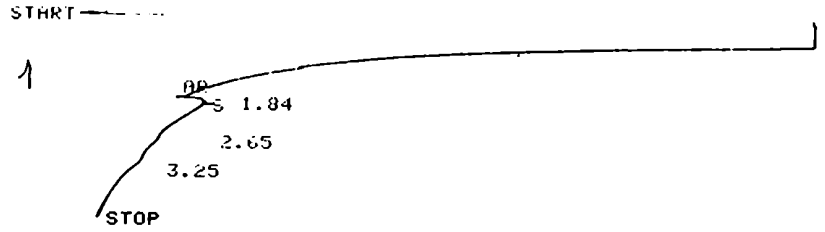
Sensibilidad: $3 \cdot 10^{-9}$ a.f.s.

Velocidad del papel: 1 cm/min.

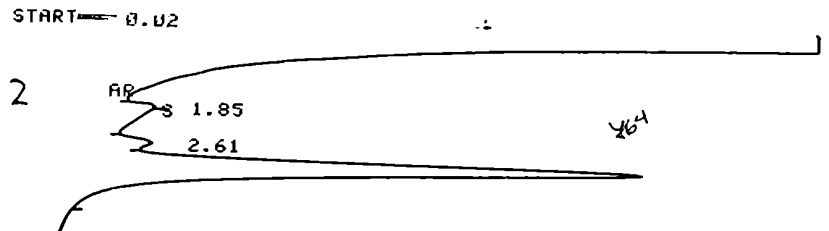
Tiempo de retención: 284 - 288.

(Figuras N° 3, 4 y 5)

METILECGONINA



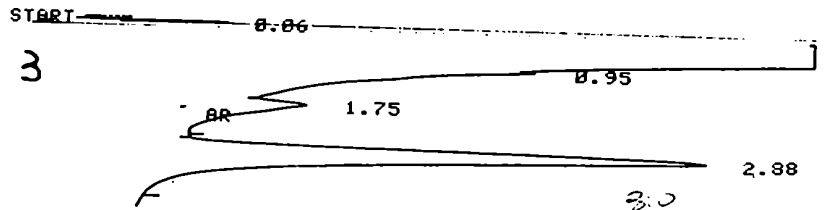
HP RUN # 7
AREAS?



HP RUN # 22 DEC/11/81
AREA %

RT	AREA	AREA %
2.88	985400	100.000

DIL FACTOR: 1.0000 E+ 0



HP RUN # DEC/11/81 TIME 17:13:49
AREA %

RT	AREA	AREA %
2.88	807000	100.000

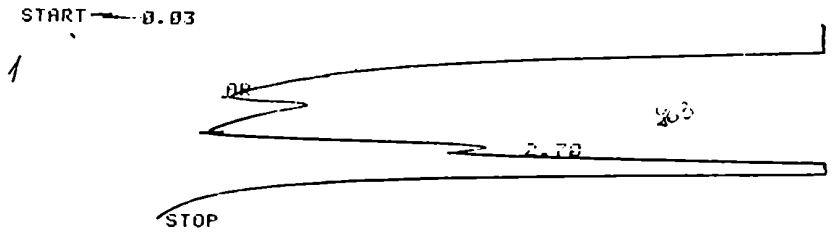
DIL FACTOR: 1.0000 E+ 0

Cromatograma 1: blanco de orina

Cromatograma 2: standard de metilecgonina 10 g/ml

Cromatograma 3: standard de metilecgonina 10 g/ml, extraido de orina

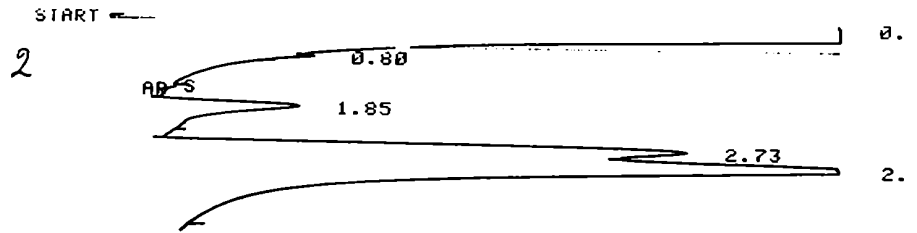
METILECCONINA



S HP RUN # 21 DEC/11/81

RT	AREA	AREA %
1.84	142200	5.845
2.70	352600	14.494
2.88	1938000	79.661

DIL FACTOR: 1.0000 E+ 0



HP RUN # 2

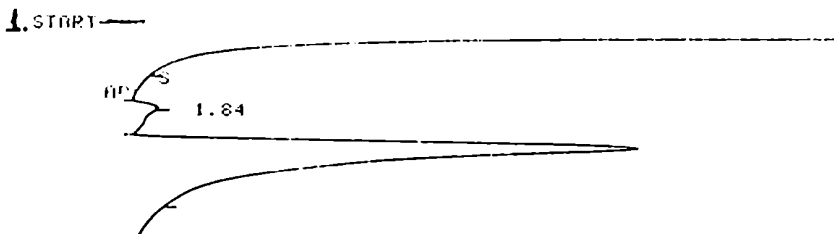
RT	AREA	AREA %
1.85	188500	7.086
2.73	710600	26.713
2.96	1761000	66.201

DIL FACTOR: 1.0000 E+ 0

Cromatograma 1: metilecgonina extraída de orina de rata, insectada con cocaína, antes de efectuar la purificación

Cromatograma 2: idem 1

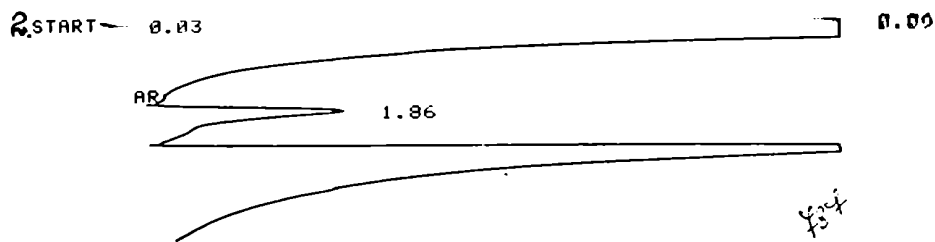
METILECÓNINA



HP RUN #
AREA %

RT	AREA	AREA %
2.85	1327000	100.000

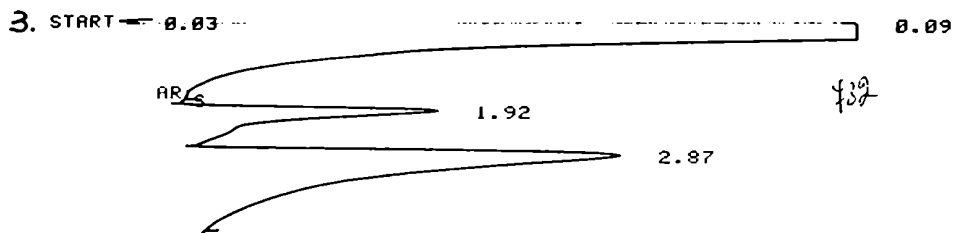
DIL FACTOR: 1.0000 E+ 0



S HP RUN # 11
AREA %

RT	AREA	AREA %
1.86	301900	11.207
2.84	2392000	88.793

DIL FACTOR: 1.0000 E+ 0



HP RUN # 6
AREA %

RT	AREA
1.92	438000
2.87	1400000

DIL FACTOR: 1.0000 E+ 0

Cromatograma de metilecónina extraída de orina de rata, inyectada con cocaína, después efectuar la purificación

IV.- Aislamiento de la ecgonina y benzoilecgonina.

La orina remanente, ya saturada con carbonato de potasio, es extraída dos veces con una mezcla de acetato de etilo-isopropanol (3:1) empleándose en ambos casos volúmenes de 3 ml.

La extracción se realiza por agitación en Vortex durante 2 min, seguida por centrifugación y separación de la fase orgánica, la que se filtra a través de una pequeña columna de algodón colocada en el vástago de un erlenmeyer.

En la primera extracción se colectan 2 ml y en la segunda 3 ml, en un mismo tubo con adaptación esmerilada. El solvente se evapora en rotavapor a presión reducida y a temperatura de 25°C.

El residuo se toma con 0,2 ml de metanol purísimo y la solución se divide en dos fracciones iguales, denominándose las :

E (ecgonina).

EE (benzoilecgonina)

V.- Evaluación de la ecgonina. (Figuras N° 6 y 7)

Sobre la fracción E se procede a la investigación de

la ecgonina por cromatografía en fase gas líquido.

Esta determinación requiere previamente una purificación del extracto por tratamiento de éste a través de una columna de Silicagel, empleándose metanol como solvente de elución.

La columna usada para este fin es de vidrio, de 10 cm de altura por 0,7 cm de diámetro interno, conteniendo hasta una altura de 5,0 cm, silicagel para cromatografía en columna 60-200 Mesh.

La fracción colectada (de 1,6 ml a 5 ml) en tubo con cierre esmerilado, se evapora en rotavapor y se transvasa luego a un tubo especial para ser "derivatizado". El agente empleado para este fin es la N.O.bis trimetilsilil acetanida y la sililación se efectúa a 80°C durante 20 min.

Las condiciones operativas para la evaluación de la ecgonina por cromatografía gas líquido, son las siguientes:

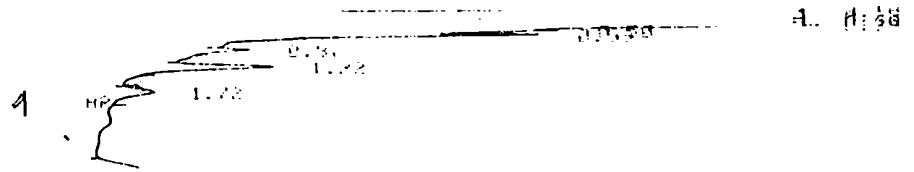
Columna de vidrio: 1200 mm por 4 mm.

Fase estacionaria: 2% O.V. 101 sobre Chromosorb 100-130 Mesh.

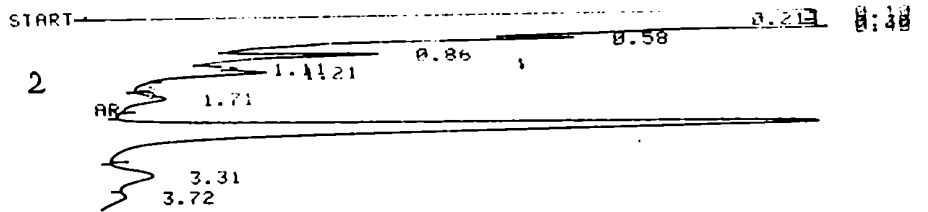
Gas vector: nitrógeno 60 ml/min.

Detector: ionización de llama.

ECGONINA



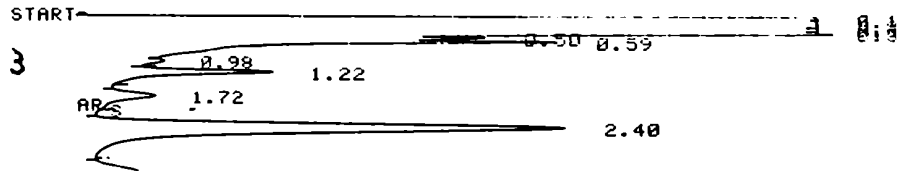
HP RUN # 2
AREA %



HP RUN # 6 SEP/10/80
AREA %

RT	AREA	AREA %
2.38	823600	91.566
3.31	75960	8.434

DIL FACTOR: 1.0000 E+ 0



HP RUN # 6
AREA %

RT
2.40

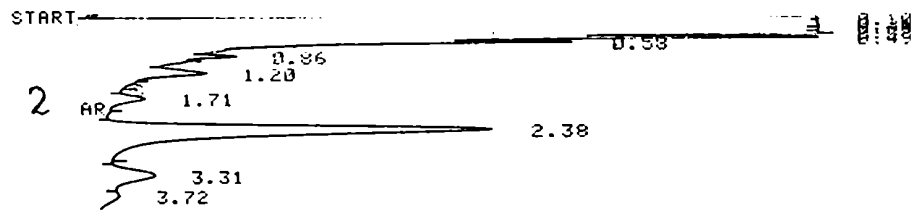
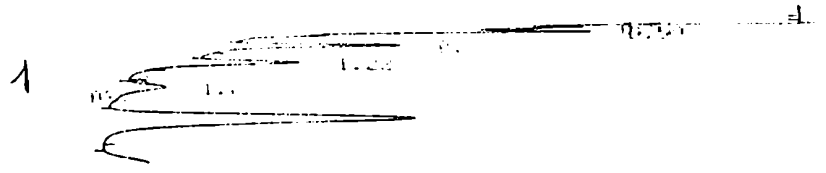
DIL FACTOR:

Cromatograma 1: blanco de orina

Cromatograma 2: standard de ecgonina 10 g/ml, extraído de orina

Cromatograma 3: standard de ecgonina 10 g/ml, extraído de orina

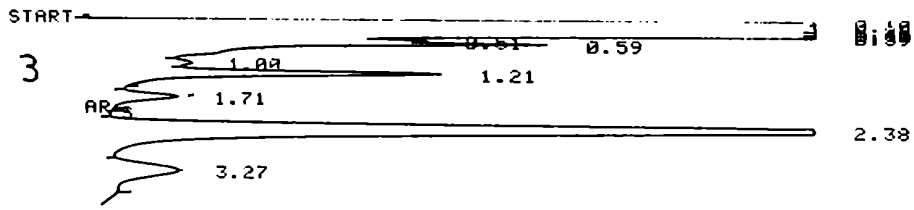
ECCONINA



HP RUN # 8 TIME 14:53:54

RT	AREA	AREA %
2.38	479800	83.634
3.31	70860	12.352
3.72	23030	4.014

DIL FACTOR: 1.0000 E+ 0



HP RUN # 5 SEP/10/88

RT	AREA	AREA %
2.38	1032000	90.709
3.27	105700	9.291

DIL FACTOR: 1.0000 E+ 0

Cromatograma 1: ecgonina extraída de orina de rata inyectada con cocaína

Cromatograma 2: idem 1

Cromatograma 3: idem 1

Aire: 300 ml/min.

Hidrógeno: 40 ml/min.

Temperatura columna: 150°C.

Temperatura inyector: 250°C.

Temperatura detector: 275°C.

Sensibilidad: $3 \cdot 10^{-9}$

Velocidad del papel: 1 cm/min.

Tiempo de retención: 2,38-2,40.

Volumen de inyección: 4 ul.

VI.- Evaluación de la benzocleogonina. (Figuras N° 8 y 9)

La fracción denominada EE se destina a la evaluación de benzocleogonina por la técnica instrumental de H.F.L.C. en un aparato marca Varian N° 5030.

Las condiciones de trabajo son las siguientes:

Columna: Micropor MCE 10.

Solvente: agua-acetonitrilo-etanol (80 + 15 + 5)

Flujo: 1,5 ml/min.

Presión: 170 atm.

Temperatura: ambiente.

Fig. N°8

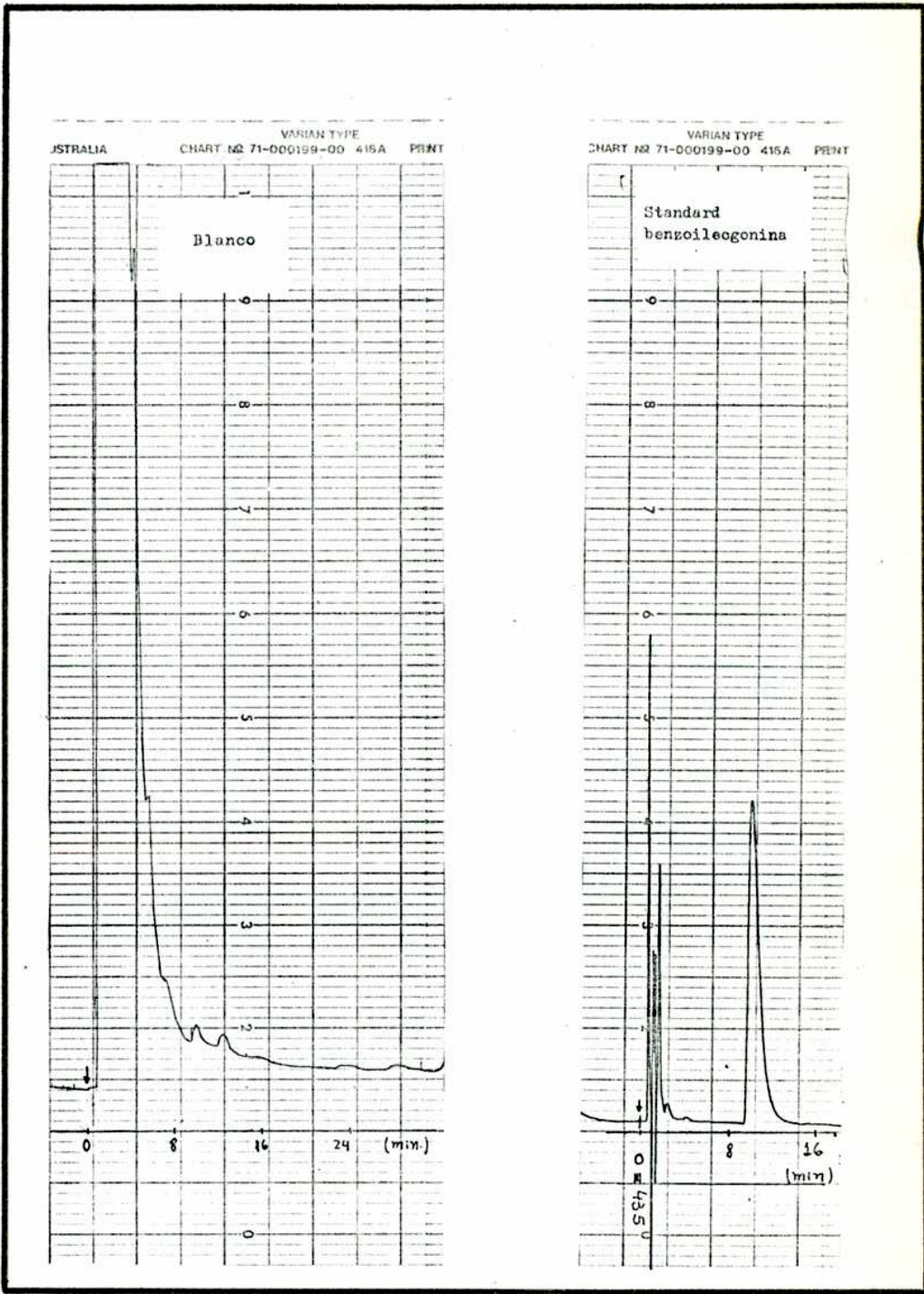
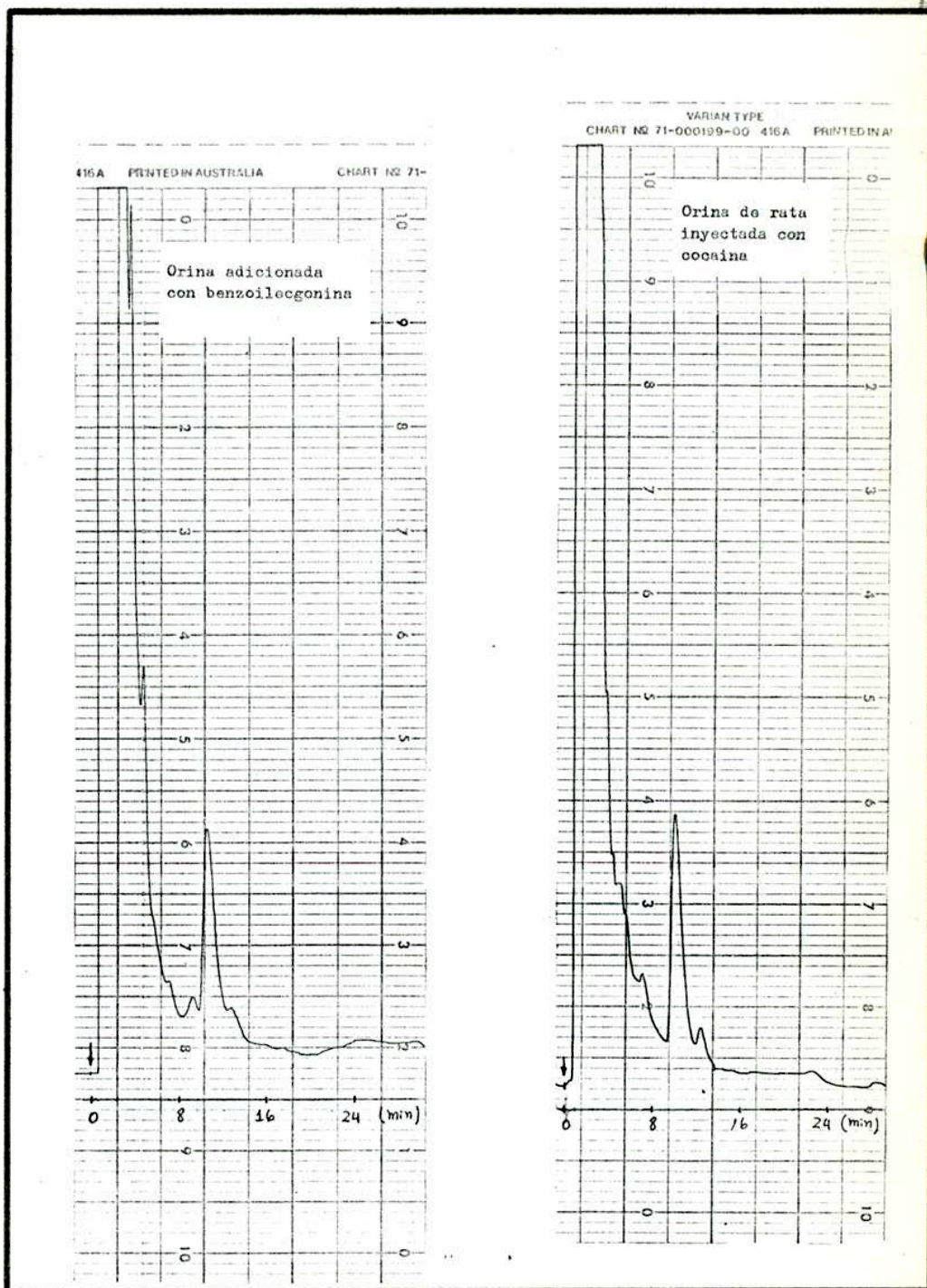


Fig. N°9



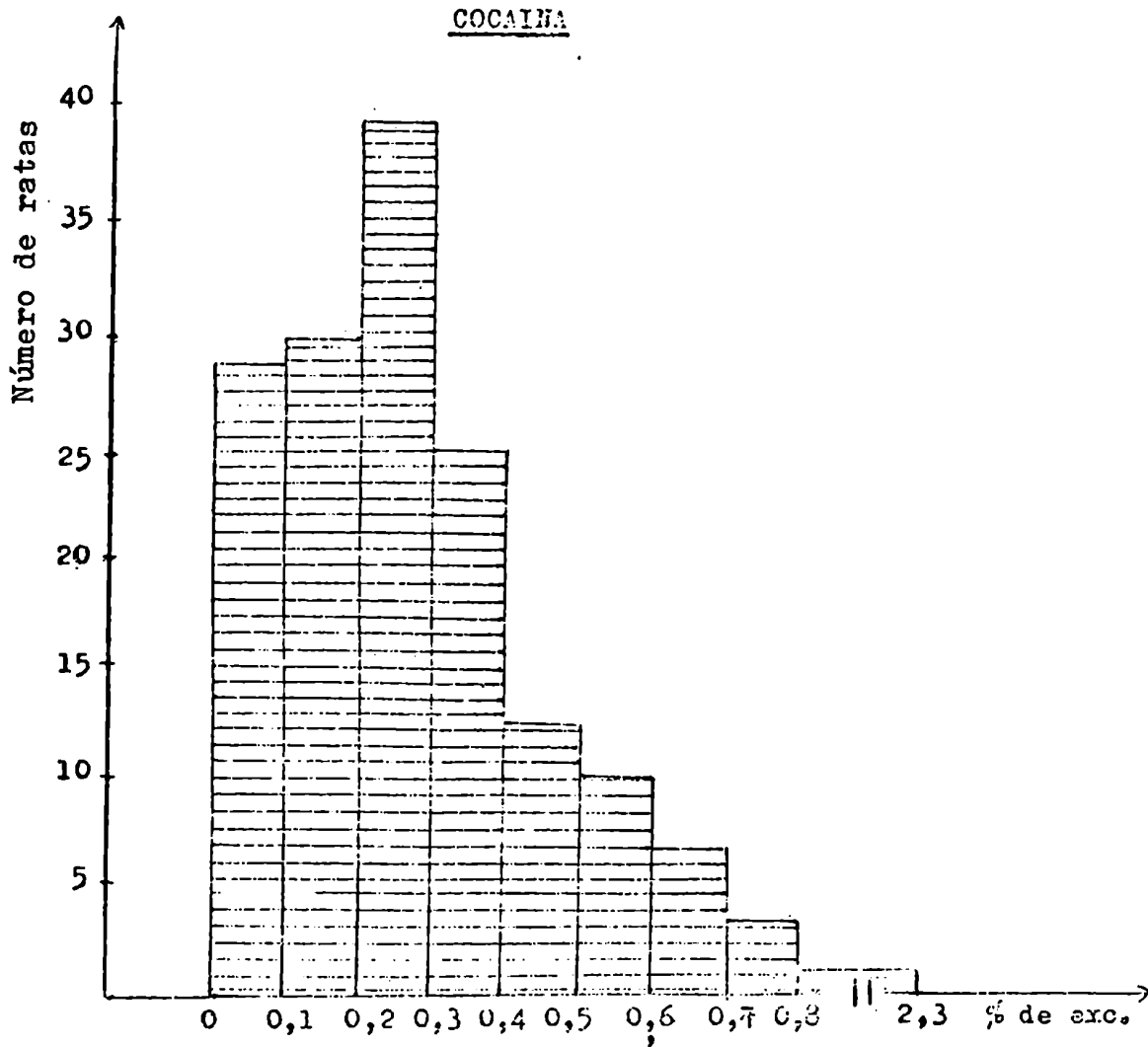
Detector: de absorción U.V. a 254 nm.

Atenuación: 0.08

Volumen de muestra inyectada: 10 ul.

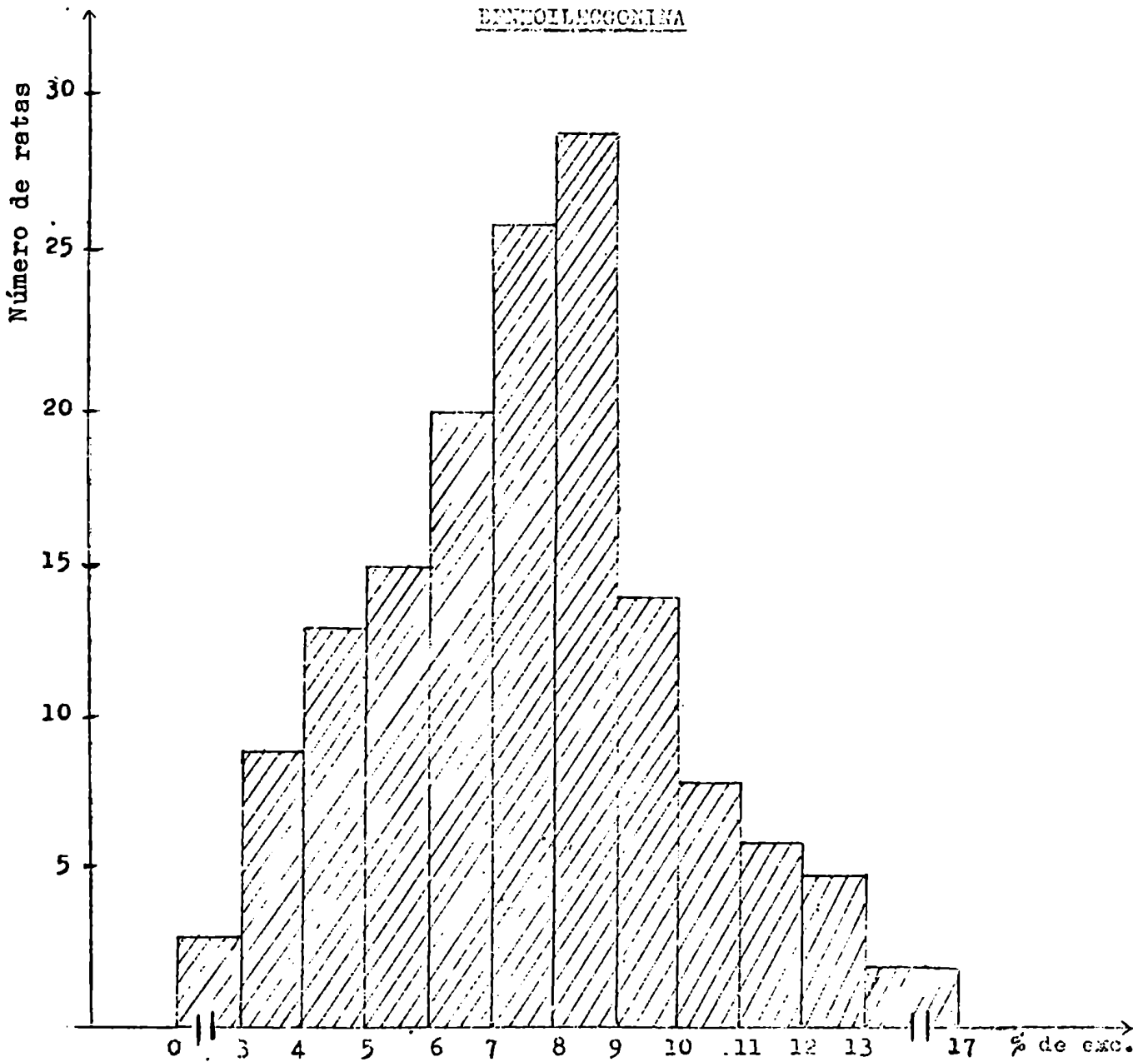
Tiempo de retención: 9,4.

Los testigos empleados como referencia, para la evaluación de las drogas en estudio, se prepararon adicionando cantidades establecidas de las mismas, a orinas normales, que luego se procesaron con similar metodología.



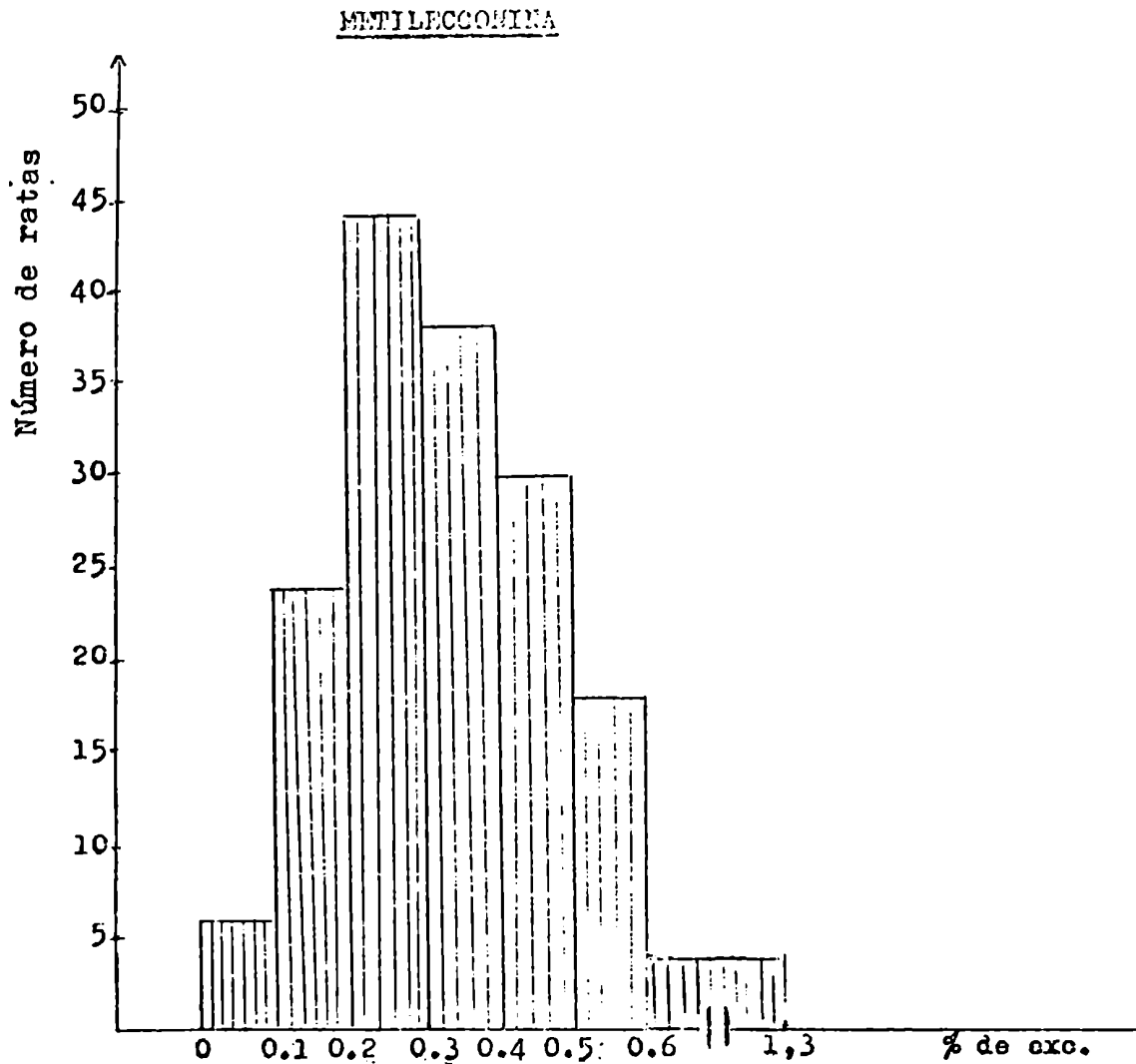
Valores porcentuales de excreción en ratas intoxicadas,
en forma aguda, con cocaína (20 mg/kg de peso)

GRAFICO N° 1



Valores porcentuales de excreción en ratas intoxicadas,
en forma aguda, con cocaína (20 mg/kg de peso), expresados
como cocaína

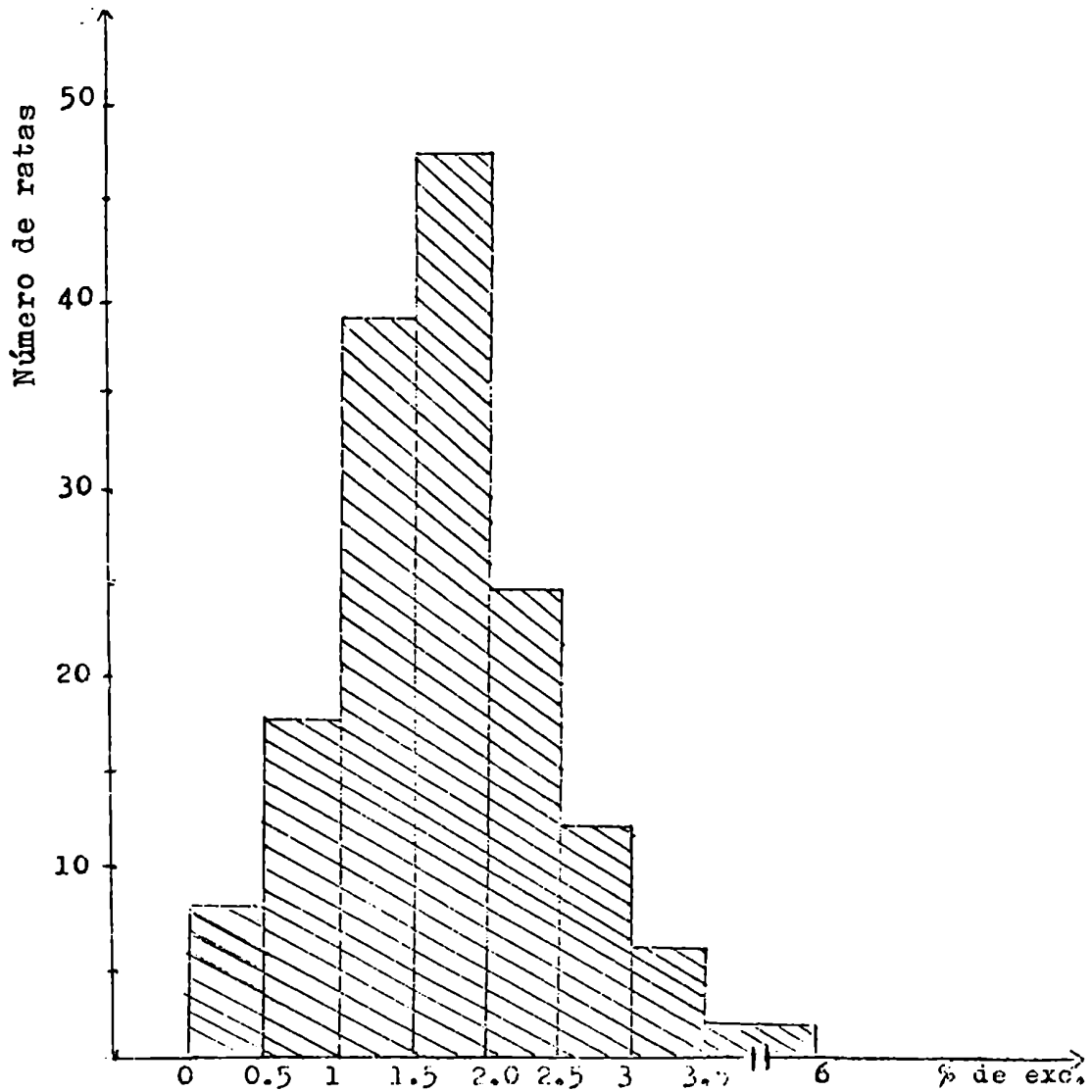
GRAFICO N° 2



Valores porcentuales de excreción en ratas intoxicadas , en forma aguda, con cocaína (20 mg/kg de peso), expresados como cocaína.

GRAFICO N° 3

ECCONTIA



Valores porcentuales de excreción en ratas intoxicadas, en forma aguda, con cocaína (20 mg/kg de peso), expresados como cocaína.

GRAFICO N° 4

RESULTADOS OBTENIDOS

Valores promedio de excreción urinaria, expresados como porcentaje de las dosis de cocaína inyectada (20 mg/Kg vía intraperitoneal) en ratas intoxicadas en forma aguda. (*)

COCAINA	0.2 - 0.3 %	Graf. N° 1
BENZOLEGGONINA	8 - 9 %	Graf. N° 2
METILEGGONINA	0.2 - 0.3 %	Graf. N° 3
EGGONINA	1.5 - 2 %	Graf. N° 4

(*) Tales valores corresponden a orina colectada durante 24 horas

DISCUSION Y CONCLUSIONES

I.- El consumo de estupefacientes, constituye una amenaza de primera magnitud contra la humanidad, ya que al no tener fronteras, ni respetar escalas sociales ni edades, la hace más vulnerable, provocando su lenta pero inevitable decadencia.

La droga se instala como un terrible flagelo, llegando furtivamente, destruyendo el cuerpo y la mente de quienes caen víctima de sus garras. Se pierde la fé en Dios y en los semejantes, produciéndose un estado de soledad, incomunicación y fracaso.

La cocaína es una de las drogas que en la actualidad va ganando terreno a pasos agigantados y a pesar de producir exclusivamente dependencia psíquica, su empleo configura extrema peligrosidad. Es factor desencadenante de gran impulsividad, e induce actos delictivos manifestándose sus efectos tóxicos por actitudes injustificadas y desproporcionadas y pérdida absoluta de cualquier tipo de control.

Por tales motivos se consideró de importancia la in-

investigación de la droga en seres vivos, aunque es necesario tener en cuenta que el alcaloide, sufre una extensa biotransformación y que la detección de los metabolitos resultantes, es otro problema de interés a considerar y en general de especial significación, ante la ausencia de la droga original.

Como es de conocimiento la investigación de la droga en su estructura original, en muestras de orina de sujetos sometidos a jurisdicción criminal, resulta reiteradamente negativa.

Esta información analítica es insuficiente en estos casos, atento como ya se ha expresado, que la degradación por vía metabólica, conduce a derivados que ordinariamente no se investigan ante la falta de una metodología técnicamente viable.

El hecho de no encontrar cocaína en un análisis de rutina, no excluye su administración en forma absoluta, si no se investigan sus derivados metabólicos. La cocaína es sensible a las condiciones del medio y a la acción hidrolítica de ciertos sistemas enzimáticos, por lo tanto en su-

sencia de la droga original, la investigación de los metabolitos resulta pericialmente ineludible.

Varios fueron los grupos de trabajo que en los últimos años, se dedicaron al estudio de este tema y se presentaron con tal motivo variados métodos analíticos, para la investigación de cocaína y sus metabolitos.

La absorción, distribución tisular y la biotransformación fueron también objeto de variados estudios.

Algunos autores ya mencionados, consideran que el principal metabolito en el hombre y animales es la benzoilecgonina, y en menor proporción la ecgonina, productos ambos con marcadas propiedades hidrofílicas.

Otros autores se refieren a la metilecgonina, como el principal producto de biotransformación en el hombre, resultado de la acción de las colinesterasas presentes en suero e hígado.

Se menciona también una vía metabólica que implica la N-demetilación, por acción de las enzimas microsomales hepáticas de los sistemas mixtos de oxidación de drogas, siendo el primer estadio la norcocaína, dando lugar posterior-

mente a la norbenzoilecgonina y norecgonina. Se postularon además como metabolitos menores N-hidroxicocaína, metilecgonidina, etilecgonina, p-hidroxicocaína, 6-hidroxicocaína, 7 hidroxicocaína y 6-7 dihidroxicocaína.

Tanto en el área asistencial, como en el ámbito forense deben satisfacerse a menudo, como ya se expresara, requerimientos analíticos, tendientes a comprobar o excluir la presencia de cocaína o derivados, en muestras de orina.

La degradación metabólica provoca como es de conocimiento, escisiones en la configuración de la droga original que impiden su reconocimiento como tal con la metodología corriente. Resulta en extremo difícil, atento a la labilidad de la cocaína, frente a los sistemas hidrolíticos naturales, identificarla categórica e inexcusablemente, como lo exige la prueba pericial o lo demanda el servicio asistencial en casos de urgencia.

Es de importancia volver a resaltar que, después de absorbida, la cocaína es extensivamente degradada y que en excreción por vía urinaria es ínfima o nula.

En el área forense la búsqueda de cocaína en muestras

biológicas data de varias décadas. Las primeras técnicas empleadas para su detección fueron colorimétricas(3,21) y cristalográficas (61) que como indica nuestra experiencia resultan engorrosas de aplicar sobre los extractos provenientes de material biológico.

Con el advenimiento de las técnicas cromatográficas (52) en papel/y placa delgada (72)(44) se posibilitó en mayor grado la identificación de la droga, ya que empleando solventes de distinto poder resolutivo pudimos en este trabajo asegurar su presencia con mayor exactitud analítica.

La espectrofotometría U.V. (71) (61), contribuyó notoria y fehacientemente en la identificación y cuantificación de la cocaína, ya que posee una buena absorbancia e inflexiones características, como puede observarse en nuestros gráficos.

La cromatografía en fase gaseosa (1)(89)(56), empleando distintos tipos de fases estacionarias, permitió su identificación y cuantificación, llegando en algunos casos, con detectores como el N-FID (45)(ionización de llama sensible a los compuestos nitrogenados) y de captura de elec-

trones (35)(36), a establecer su presencia en cantidades de nanogramos.

Asimismo la "derivatización" con agentes especiales (62)(47) nos permitió ampliar el uso de la cromatografía gaseosa, para la determinación de la cocaína y sus productos de degradación o biotransformación.

El advenimiento de la cromatografía líquido-líquido de alta presión, (24)(18)(38) constituyó también un valioso aporte para la evaluación de la cocaína y alguno de sus metabolitos, siendo utilizado por nosotros especialmente para la benzoilecgonina.

Las posibilidades técnicas que aún puede brindar el uso de variadas fases fijas y detectores son muy amplias y prometedoras.

El empleo de cromatografía gaseosa, acoplada a espectrometría de masa (40), constituye sin lugar a dudas el método más confiable para la determinación de cocaína y sus metabolitos, pero esta técnica instrumental, por su elevado costo no está al alcance de todos los laboratorios toxicológicos y forenses.

En vista de lo expuesto en los párrafos anteriores y de los resultados obtenidos en las investigaciones experimentales realizadas, cabe efectuar algunas consideraciones.

A) La cocaína como tal es excretada en mínimas proporciones, por ser muy extenso su proceso de biotransformación que sumado en algunos casos a una mala conservación de la muestra, podría inducir al error de considerar negativa la existencia de la droga. Por ello sin excluir su búsqueda, resulta muy recomendable la investigación de algunos de sus metabolitos mayores como la benzoilecgonina o la ecgnina.

Según los datos obtenidos en nuestras investigaciones, la cocaína tal cual, sin degradar, se excreta en un porcentaje de aproximadamente 0,2% a 0,3% de la dosis inyectada (20 mg/kg) dato este obtenido, manteniendo óptimas condiciones de almacenaje para evitar cualquier deterioro de la misma. Estas precauciones no son tomadas en cuenta rutinariamente, cuando se envía la orina del intoxicado al laboratorio, razón por la que en la mayoría de los casos su búsqueda resulta infructuosa.

Si bien, es de uso frecuente, la técnica de aislamien-

to por extracción directa, no es común el agente extractivo empleado, ciclohexano, debido a lo engorroso de su manipuleo, cuando se trabaja directamente sobre flúidos biológicos.

La fase operativa completamente implementada para este trabajo, constituye un aporte, ya que el ciclohexano extrae la droga con un óptimo rendimiento (95%) y con gran pureza de los extractos.

En cuanto a la evaluación, realizada por C.G.L. las condiciones operativas fueron escogidas por nosotros, después de numerosos ensayos para la concreción del presente trabajo.

B) Según pudimos apreciar, un buen porcentaje (del 8% al 9%) de la cocaína inyectada, es excretada como benzoilecgonina (expresada como cocaína).

La forma en que se realizó su aislamiento, con una recuperación de un 90% del metabolito presente en la orina, empleando la técnica de saturación salina, tiene la ventaja de haber sido realizada con un solvente extractivo que brindó la posibilidad de evaluar la benzoilecgonina por H.P.L.C. sin tratamiento previo.

El hallazgo tanto del agente utilizado para el aislamiento como del solvente de elución, para la técnica instrumental mencionada constituyó un esfuerzo que brindó satisfacciones.

C) Las técnicas implementadas para el aislamiento y evaluación de la ecgonina, fueron también fruto de arduos y laboriosos ensayos.

Como se ha visto ya en capítulos anteriores y según registra la bibliografía, los trabajos tendientes a la investigación de la ecgonina son muy escasos.

Las propiedades altamente hidrofílicas de este metabolito constituyen sin lugar a dudas uno de los mayores problemas que encuentra el analista para proceder a su extracción de flúidos biológicos con alto contenido acuoso.

La implementación de la técnica de saturación salina con carbonato de potasio y el uso de la mezcla acetato de etilo-isopropanol (3-1) nos brindó la posibilidad de recuperar el metabolito en un 70%.

La purificación de los extractos como ya se mencionó, mediante tratamiento por columna de Silicagel, empleando como

solvente de elución metanol, fué elaborado con miras a la obtención de un material apto para su posterior evaluación mediante G.L.C.

Como ya está sobreentendido, una sustancia tan polar como la ecgonina, debe ser derivatizada para ser determinada por C.G.L. Para el presente caso, de entre varios ensayos, realizados se escogió como agente de derivatización la NO-bis-trimetilsililacetamida que proporcionó una trimetilsilil-ecgonina, que respondió en forma satisfactoria a los fines propuestos, habiéndose obtenido valores promedio de excreción del mismo de 1,5 a 2,0% de la dosis de cocaína inyectada (expresado como cocaína).

En cuanto a la metilecgonina, droga menos polar que los metabolitos antes citados, logramos extraerla con buen rendimiento (80%) empleando la técnica de "saltingout" saturando con carbonato de potasio y utilizando como agente extractivo eter etílico.

El extracto así obtenido no fue apto para su determinación por C.G.L., razón por la que se debió concebir una forma de purificación. Como ya se explicó en capítulos anteriores

y después de varios ensayos, se comprobó que el tratamiento por columna de Silicagel, empleando como agente de elución una mezcla formada por acetato de etilo-cloroformo-metanol-amoniaco (70: 20: 10:1) producía extractos que permitieron su determinación en forma indubitable.

El valor promedio de excreción determinado de este metabolito fué de 0,20% a 0,30% de la dosis de cocaína inyectada (expresado como cocaína).

RECOMENDACIONES

II.- Por lo tanto según nuestra experiencia proponemos, que ante la ausencia de cocaína en la muestra, si la misma a) posee un pH inferior a 7, b) es de recolección reciente, c) y si se la conservó a bajas temperaturas, la benzoilecgonina debe ser sin lugar a dudas, el metabolito de elección para ser investigado.

Si estas condiciones no se cumplen y la orina acusa reacción alcalina y no ha sido convenientemente refrigerada el metabolito elegido para su investigación debe ser la ecgonina.

Se propone asimismo, ya que este último metabolito de la cadena hidrolítica no sufre posteriores modificaciones en orina, efectuar un tratamiento alcalino a fin de transformar en ecgonina, a los metabolitos intermedios que pudieran coexistir en la muestra.

RAZONES QUE FUNDAMENTARON LA ELECCION DEL TEMA DE TRABAJO.

III.- El ejercicio durante años, de una tarea analítica-pericial y analítica- asistencial (emergencias toxicológicas) nos ha permitido comprobar las limitaciones que ofrece la aplicación de la metodología usual como aporte a la prueba exigida, en sede judicial, para la certificación del delito de consumo de cocaína, previsto en las leyes penales vigentes.

Asimismo, la falta de una información positiva, aún en casos clínicamente comprobados, al margen de toda información accesoria (por referencias policiales o de allegados) y en los cuales, es evidente, se aguarda una certificación analítica por vía del laboratorio, señala, incuestionablemente, la necesidad improrrogable de disponer de una técnica efectiva para el reconocimiento de los metabolitos.

En todos los casos, el médico actuante espera confirmar o excluir un diagnóstico presuntivo a través de la información analítica, y un resultado negativo, como es usual en nuestro caso en que se investiga únicamente cocaína en su forma original, no degradada, podría inducir dudas o confusiones con re-

percusiones sobre la conducta terapéutica a seguir, o la personalidad a aplicar, más aún si la sintomatología acusada por el usuario de la droga coincide o presenta características comunes con las producidas por otras drogas excitantes o estimulantes centrales.

Si es de nuestro conocimiento que existen limitadas posibilidades de identificar la cocaína tal cual en muestras de orina y que, en cambio, es posible establecer o deducir su presencia a través de sus principales metabolitos, debemos agotar toda providencia analítica para satisfacer la confianza que el médico, especializado o no, y el jurista, depositan en nuestra capacidad y responsabilidad profesional, para un mejor accionar específico.

Esta contribución tiende pues, a ofrecer una técnica analítica veraz para la identificación de los principales derivados metabólicos de la cocaína, y es el resultado de un exhaustivo trabajo investigativo en el cual ha sido necesario repetir numerosos ensayos, a fin de lograr un método eficaz y reproducible.

Como resultado de este paciente esfuerzo ofrecemos a

nuestros colegas, en especial a quienes deben afrontar este problema de continuo, una metodología fidedigna y segura para satisfacer una exigencia analítica que, hasta la fecha, resultaba en nuestro medio, inconclusa e inaccesible.

Su incorporación al trabajo diario de laboratorio permitirá emitir una información segura e indiscutible y de profunda significación clínica y médico-legal.

Dr. Steupny
Al Paníolo

BIBLIOGRAFIA.

- 1) Achari, B. and Newcombe, E. (Gas Chromatography of tropane alkaloids. (SE-30 fase est.) Anal Abstracts 22 (2) 1102 (1972).
- 2) Akopayan, O.A.; Redko, O.M. Detecting ecgoninun: A metabolite of cocainun in a decomposed body. Sud. Med. Ekspert (1974) Vol. 14, 47-48 (URSS).
- 3) Alliston, C.V.; Bartlett, A.F.F.; Faubert maunder, M.J.; Phillips, G.F. An improved test for cocaine, methaqualone and methadone with a modified cobalt (II) thiocyanate reagent. Analyst, April 1972, Vol. 97 p.p. 263-265 .
- 4) Bastos, M.L.; Hoffman. Comparison of methods for detection of amphetamines cocaine and metabolites. Journal of chromatographic science, Vol. 12, May. 1974, 268-280.
- 5) Bastos, M.L.; Hoffman, D.B. Detection and identification of cocaine, its metabolites and its derivatives. In S.J. Mule (ed., cocaine: Chemical, Biological, Clinical Social and Treatment Aspects, CRC Press, Cleveland, Ohio, 1976, p.p. 35-58.

- 6) Bastos, M.L.; Jukofky, D.; Mule J.S. Routine identification of cocaine metabolites in human urine. *Journal of Chromatography* 89 (1974) 335-342.
- 7) Baker, F.T.; Mazess, R. Calcium: unusual sources in the highland peruvian diet. *Science* 142: 1466-1467, 1963.
- 8) Batlle, A.M. del C. Cromatografía con tamices moleculares. *Ciencia e Investigación*. Junio 1968, T.24-V.6, pag.242-261.
- 9) Beilsteins Handbuch Der Organischen Chemie.
- 10) Bergdoll M.S.; Doty, D.M. Chromatography in the separation and determination of the basic amino acids. *Industrial and Engineering Chemistry* Vol. 18 Nº10 (1946).
- 11) Berry, J.; Grove, J. Improved Chromatographic Techniques and their interpretation for the screening of urine from drugs-dependent subjects. *Journal of Chromatography*. 61 (1971) 111-123.
- 12) Blake, J.W.; Ray, R.S.; Noonan, J.S.; Murdick, F.W. Rapid Sensitive Gas-Liquid chromatographic screening procedure for cocaine. *Analytical Chemistry*, Vol. 48 Nº 2, February 1974, 210-211.

- 13) Bowman, W.C.; Rand, M.J.; West, G.B. Farmacología Editorial Jims- Barcelona, 1970.
- 14) Chambochumbi, M.N., Efectos de la coca sobre el metabolismo basal en sujetos no habituados. Revista de Farmacología y Medicina Experimental 2: 94-113, 1949.
- 15) Decato, L. (Chi-Tan-Liu); Adler, F.L. Immunologic studies on drug addiction: III antibodies reactive with cocaine metabolites and their use for drug detection. Journal of Immunological Methods 18 (1977) 201-213.
- 16) Duke, J.A. Nutritional value of coca (erythroxylum coca lam).Unpublished.
- 17) Dvorchik, B.H.; Miller, S.H.; Grahan, W.P. Gas chromatographic determination of cocaine in whole blood and plasma using a nitrogen-sensitive flame ionization detector. Journal of Chromatography 135 (1977) 141-148.
- 18) Evans, M.A.; Morarity, T. Analysis of cocaine and cocaine metabolites by high pressure liquid chromatography. Journal of Analytical Toxicology, 4 (1980), 19-22.

- 19) Fish, F.; Wilson, W.D.C. Gas Chromatographic determination of morfina and cocaine in urine. *Journal Chromatography* 40 (1969) 164-168.
- 20) Fish, F.; Wilson, W.D.C. Excretion of cocaine and its metabolites in man. *J. Pharm. Phamac.* 1969, 21, Suppl. 1355-1365.
- 21) Gettler, A.O.; Sunshine, I. Colorimetric Determination of alkaloids in tissues by means of metil orange. *Analytical Chemistry* 23 (1951) 779-781.
- 22) Goodman, I.S.; Gilman, A. *The pharmacological basis of therapeutics*. 5^{ta}. Ed. 1975.
- 23) Graas, J.E.; Watson, E. The G.C./M.S. determination of Benzoilecgonine in urine following an extractive alkylation technique. *Journal of analytical toxicology*, 2 (1978) 80-82.
- 25) Hammer, R.H.; Templeton, J.L.; Panzk, H.L. Definitive G.L.C. Method of indentifying. Cocaine. *Journal of Pharmaceutical sciences* Vol. 63 N° 12, December 1974, 1963, 1965.
- 26) *Handbook of Chemistry and Physcs. Forty-ninth Edition 1968-*
1969. Published by Chemical Rubber Co.

- 27) Hanna, J.M.; Hornick, C.A. Use of coca leaf in Southern Peru. Adaptation or addiction. Bulletin on narcotics Vol. XXIX No 1 1977 (63-74).
- 28) Hawks, R.L.; Kopin, I.J.; Colburn, R.W.; Thoa, N.B. Norcocaine: A pharmacologically active metabolite of cocaine found in brain. Life Sciences, 15 (1974) 2189-2195.
- 29) Heim, F.; Haas, A. Degradation by brain kidney liver and muscle. Arch. Exp. Path. and Pharmacol., 211, 458-61 (1950).
- 30) Inaba, T.; Stewart, D.J.; Kalow, W. Metabolism of cocaine in man. Chem. Pharmacol. Ther. 23 (5) 1978, 547-552.
- 31) Jain, N.C.; Chinn, D.M. ; Budd, R.D.; Sneatz, T.S.; Leung, W.J. Simultaneous determination of cocaine and benzoil ecgonine in urine by gas chromatography with on column alkylation. Journal of Forensic Sciences. July 1976.
- 32) Jain, N.C.; Leung, W.J.; Budd, R.D.; Sneath, T.C. Thin-layer chromatographic screening and confirmation of basic drugs of abuse in urine. Journal of Chromatography 115 (1975) 519-526.
- 33) Jatlow, P. Analysis of cocaine and its metabolites in

biological, clinical, social and treatment aspects CRC Press.

- 34) Jatlow, P.I.; Bailey, D.N. Gas-chromatographic analysis of cocaine in human plasma with use of a nitrogen detector. *Clinical Chemistry*, 21 (1975) 1918-1921.
- 35) Javaid, J.I.; Dekirmenjian, H.; Brunngraber, E.G.; Davis, J.M. Quantitative determination of cocaine and its metabolites benzoilecgonine and ecgonine by gas-liquid chromatography, 110 (1975) 141-149.
- 36) Javaid, J.I.; Dekirmenjian, H.; Davis, J.M.; Schuster, C.R. Determination of cocaine in human urine, plasma and red blood cells by gas-liquid chromatography. *Journal of Chromatography*. 152 (1978) 105-111.
- 37) Javaid, J.I.; Fischman, M.W.; Schuster, C.R.; Dekirmenjian, H.; Davis, J.M. Cocaine plasma concentration: relation to physiological and subjective effects in humans. *Science*, Vol. 202. 13 October 1978, 227-228.
- 38) Jatlow, P.J.; Van Dike, C.; Barash, P.; Robert, B. Measurement of benzoilecgonine and cocaine in urine, separation of various cocaine metabolites using reversed-phase high performance

- liquid chromatography. Journal of chromatography, 152 (1978) 115-121.
- 39) Jindal, S.P.; Lutz, T.; Vestergaard, P. Mass spectrometric determination of cocaine and its biological active metabolite, nor-cocaine, in human urine. Biomedical mass spectrometry, 5 (1978) 658-663.
- 40) Jindal, S.P.; Vestergaard, D. Quantitation of cocaine and its principal metabolite, benzoilecgonine by GLC-mass spectrometry using stable isotope labeled analogs as internal standards. Journal of pharmaceutical sciences, Vol. 67, No 6, June 1978.
- 41) Jong, A.W. Some properties of the ecgonines and their esters VI. Rec. Trav. Chim., 61, 55 (1942).
- 42) Just, W.W.; Hoyer, J. The local anesthetic potency the norcocaine, a metabolite of cocaine. Experientia, 33 (1977) 70-71.
- 43) Kaistha, K.K.; Tadrus, R. Single and two-step extraction and thin-layer detection procedures for benzoilecgonine (cocaine metabolite) alone or in combination with a wide variety of commonly abused drugs in urine screening programs.

- Journal of chromatography 135 (1977) 385-393.
- 44) Kempny, R.G. de; Paviolo, M.J.L.; De Simone, B.D. Identificación de feniletilamina en extractos de visceras. *Anales Asoc. Quím. Argentina*, 57, 61-64 (1969).
- 45) Kogan, M.J.; Verebey, K.G.; Depace, A.C.; Resnick, R.B.; Mule, S.J. Quantitative determination of benzoylecgonine and cocaine in human biofluids by gas liquid chromatography. *Analytical Chemistry*, Vol. 49 N° 13 (1977) 1985-1990.
- 46) Kohn -Abrest. *Precis de Toxicologie*. (1934).
- 47) Koontz, S.; Besemer, D.; Mackey, N.; Phillis, R. Detection of benzoilecgonine (cocaine metabolite) in urine by gas chromatography. *Journal of Chromatography*. 85, 1973 (75-79).
- 48) Lewin, A.H.; Parker, S.R.; Carroll, F.L. Positive identification and quantitation of isomeric cocaines by high performance liquid chromatography. *Journal of chromatography*. 193 (1980) 371-380.
- 49) Lewis, J.H. Qualitative screening procedure for the detection of benzoylecgonine in the urine of greyhounds. *Journal of chromatography*. 196 (1980) 337-341.

- 50) Lindgren, J. Guide to the analysis of cocaine and its metabolites in biological material. *Journal of Ethnopharmacology* 3 (1981) 337-351.
- 51) Lowry, W.T.; Lomonte, J.N.; Hatchett, D.; Garriott, J.C. Identification of two novel cocaine metabolites in bile by gas chromatography and gas chromatography/mass spectrometry in a case of acute intravenous cocaine overdose. *Journal of Analytical Toxicology*, Vol. 3, May/June, 1979.
- 52) Maylát, P.; Bayer, I. Separation of cocaine benzoylecgonine and ecgonine by paper chromatography. *Journal chromatography* 20 (1965) 187.
- 53) Manske, R.H.F.; Holmes, H.L. *The alkaloids Chemistry and Physiology*.
- 54) Meola, J.M.; Vanko, M. Use of charcoal to concentrate drugs from urine before drug analysis. *Clinical Chemistry*, Vol. 20, N° 2, 1974.
- 55) *Merck Index of Chemicals and Drugs*.
- 56) Minden, D.L.; D'Amato, N. Simultaneous determination of cocaine and benzoylecgonine in urine by gas liquid

chromatography analytical chemistry. Vol. 49 N° 13

November, 1977.

- 57) Misra, A.L.; Nayak, P.K.; Bloch, R.; Mulé, S.J. Estimation and disposition of ^3H benzoilecgonine and pharmacological activity of some cocaine metabolites. Journal of pharmacy and pharmacology, 27 (1975) 784-786.
- 58) Misra, A.L.; Pontani, R.B.; Vadlaman, N.L. Metabolism of norcoxenobiotics, 9 (1979) 189-199.
- 59) Misra, A.L.; Pontani, R.B.; Mule, S.J. Separation of cocaine, some its metabolites and congeners on glass fibre sheets. Journal of Chromatography. 81 (1973) 167-169.
- 60) Misra, A.L.; Pontani, R.B. Disposition and metabolism of cocaine (dextro cocaine) in the rat. Drug metabolism and disposition. Vol. 5 N° 6, 1977.
- 61) Montesinos, F. Metabolism of cocaine. Bulletin of narcotics Vol. XVII N° 2, 1965, 11-16.
- 62) Moore, J.M. Gas chromatographic detection of ecgonine and benzoylecgonine in cocaine. Journal of chromatography, 101 (1974) 215-218.

- 63) Moore, J.M. Detection of ecgonine in urine. *Clinical Chemistry*.
Vol. 21 N° 10 (1975) 1538-1540.
- 64) Mueller, M.A.; Adams, S.M.; Lewand, D.L.; Wang, R.I.H.
Detection of benzoylecgonine in human urine. *Journal of
chromatography* 144 (1977) 101-107.
- 65) Mulé, S.J.; Misra, A.L. Cocaine: Distribution and metabolism
in animals. Office of drug abuse services (1976).
- 66) Mule, S.D. Cocaine: Chemical biological, clinical, social
and treatment aspects. CRC Press Uniscience, 1976.
- 67) Naya, P.K.; Misra, A.L.; Patel, M.N.; Mulé, S.J. Preparation
of radiochemically pure randomly labeled and ring labeled
³H -cocaine. *Radiochem, Radioanal. Letters*. 16/4/167-171.
- 68) Naya, P.K.; Misra, A.L.; Mulé, S.J. Physiological disposition
and biotransformacion of ³H cocaine in acutely and
chronically treated rats. *The Journal Pharmacology and experimen-
tal therapeuics*. Vol. 196, N° 2, 1976, 556-569.
- 69) Parra, G.M. Acción in vitro de los jugos digestivos sobre
la cocaína. Thesis Fac. Farm. Bioquím. Lima, Perú (1956).

- 70) Paviolo, M.L.; Pinet, A.M.; Aguirre, E.N.; Curt, E. Aislamiento de la benzoilecgonina mediante técnica de salting-out, empleando como solvente de extracción acetato de etilo. Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana Vol. XIV, N° 4, 1980.
- 71) Paviolo, M.L.; De Simoni, B.D.; Negro, E.N. Determinación cuantitativa de cocaína en presencia de novocaina. Bioquímica Clínica Vol. V. N° IV, 1971 (318-323).
- 72) Paviolo, M.L.; De Simoni, B.D.; Negro, E.N. Investigación de cocaína en presencia de sus adulterantes mas comunes. Actas Primer Congreso Toxicológico Argentino, Tomo III, 1971.
- 73) Paviolo, M.L.; Pinet, A.M.; Kempny, R.S. G. de . Investigación en orina de ecgonina metabolito de la cocaína por cromatografía en placa delgada. Expuesto en las II Jornadas Químicas Bonaerenses. Diciembre 1980.
- 74) Paviolo, M.L.; Pinet, A.M.; Elordi, I.; Kempny, R.S.G. de. Determinación de ecgonina por CGL. Presentado en las I Jornadas Argentinas de Toxicología S.A.T. 24-25-26 de septiembre 1981.
- 75) Paviolo, M.L.; Mecca, M. M. de; Oneto, M.L.; Kempny, R.S.G.de.

- Análisis de benzoilecgonina en orina por cromatografía líquida de alta presión. Para ser presentado en El Congreso del "TIAFT" a realizarse en Sevilla(España) en Septiembre de 1982.
- 76) Paviolo, M.L.; Núñez, G.C.; Faletti, A.; Kempny, R.S.G. de. Determinación de metilecgonina por CGL. Para ser presentado en el I° Congreso y 2° Jornadas Argentinas de la S.A.T. 4 al 7 de Agosto 1982, Rosario (Sta. Fé).
- 77) Paviolo, M.L.; Finet, A.M.; Kempny, R.S.G. de. An improved technique for investigation in urine of ecgonine a cocaine metabolite. Aceptada para ser publicado en el Journal of The Forensic Science Society. N. Yorkshire-England. Abril 1982.
- 78) Risemberg, M.F. Acción de la coca y la cocaína en sujetos habituados. Revista de Medicina Experimental 3: 317-328 (1944).
- 79) Rderig, D.L.; Lewand, D.; Mueller, M.; Wang, R.J.H. Methods of Identification and Confirmation of abusive drugs in human urine. Jorunal of Chromatography, 110 (1975) 349-359.
- 80) Schmidt, H.L. and Werner, C. Synthetische eimbau von ¹⁴C in (-) cocain (-) ekgonin und derivate. Radioaktive markierung

- von tropan-alkaloiden 1962, Bol. 653, 184-194.
- 81) Schmidt, H.L.; Werner, C. Darstellung von ^3H -atropine und ^3H -nor-cocain, 1962 Bol. 656, 149-158.
- 82) Sohn, D. Preparatory procedures in screening for drugs of abuse "clean-up" methods in current use. Journal of chromatographic science. Vol. 10 (1972) 294-296.
- 83) Stewart, D.J.; Inaba, T.; Lucasser, M.; Kalow, W. Cocaine metabolism: cocaine and norcocaine hydrolysis by liver and serum esterases. Clin. Pharmacol. Ther. Vol. 25 No 4 (April 1979) 464-468.
- 84) Stewart, D.J.; Inaba, T.; Tang, B.F.; Kalow, W. Hydrolysis of cocaine in human plasma by cholinesterase. Life Sciences, 20 (1977) 1557-1564.
- 85) Stewart, D.J.; Inaba, T.; Kalow, W. N-demethylation of cocaine in the rat and in isolated rat hepatocytes: comparison with aminopyrine demethylation. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 207 (1978) 171-177.
- 86) Street, H.V.; Vycudilik, W.; Machta, G. Gas liquid chromatography of submicrogram amounts of drugs V. Journal

- of Chromatography, 168 (1979) 117-124.
- 87) Sunshine, J. Methodology for analytical Toxicology. CRC Press, 1975.
- 88) Tapia Freses, A.; Gaviria, M.; Galvan, G. Influencia de la cocaina sobre la actividad enzimática. La demostración histológica de acetilcolinesterasa obserbaciones en tejidos de rata albina. Boletin de la Sociedad Química del Perú, 1964.
- 89) Turner, C.E.; Ma, Ch. Y.; Elschly, M.A. Constituents in erythroxyllum coca I: gas chromatographic analysis of cocaine from three locations in Peru. Bulletin on Narcotics Vol. XXXI. N° 1, 1979.
- 90) Valanjú, N.N.; Baden, M.M.; Valanjú, S.N.; Mulligan, D.; Verma, S.K. Detection of biotransformed cocaine in urine from drug abusers. Journal of Chromatography. 81 (1973) 170-173.
- 91) Valentour, J.C.; Aggarwal, V.; McGee, M.P.; Goza, S.W. Cocaine and benzoylecgonine determinations in postmortem samples by gas chromatography. Journal of Analytical Toxicology, 2, July-August, 1978.

- 92) Van Dike, C.; Barash, P.G.; Jatlow, P.; Byck, R. Cocaine: plasma concentrations after intranasal application in man. *Science*, 191 (1976) 859-861.
- 93) Wallace, J.E.; Hamilton, H.E.; King, D.E.; Bason, D.J.; Schweriner, H.A.; Harris, S.C. Gas-liquid chromatographic determination of cocaine and benzoilecgonine in urine. *Analytical Chemistry*. Vol. 48, N° 1 January 1978.
- 94) Wallace, J.E.; Hamilton, H.E.; Schwertner, H.; King, D.E.; McNay, J.I.; Blum, K. Thin-layer chromatographic analysis of cocaine and benzoilecgonine in urine. *Journal of chromatography*, 114 (1975) 433-441.
- 95) Wallace, J.E.; Hamilton, H.E.; Christenson, J.G.; Shimek, E.L., Jr.; Land, P.; Harris, S.C. An evaluation of selected methods for determining cocaine and benzoilecgonine in urine. *Journal of Analytical Toxicology*, 1 (1977) 20-26.
- 96) Werner, G.; Hackel, R.; Mohammad, N.; Seiler, N.; Udn Störr, K. Oxidation von tropan alkaloiden mit kalium mpermanganat. *Zur Chemie von Tropan Derivaten* Bd. 708, 1967, 210-217.
- 97) Wheals, B.B. Forensic aspects of high-pressure liquid

- chromatography. Journal of Chromatography 122 (1976) 85-105.
- 98) Willians, N.; Clonet, D.H.; Misra, A.L.; Mulé, S. Cocaine and metabolites: relationship between pharmacological activity and inhibitory action on dopamine uptake into striatal synaptosomes. Prog. Neuro-psychopharmac. Vol. 1, 1977 265-269.
- 99) Zapata Ortiz, B. Modificaciones psicológicas y fisiológicas producidas por la coca y la cocaína en los coqueros. Revista de Medicina Experimental 5: 132-162, 1944.
- 100) Youngke, H. W. Tratado de Farmacognosia, pag. 628, 1951.