

Mejor tesis: Escuela Química Farmacéutica

## "Detección de metilecgonina etilecgonina y cocaetileno en fluidos biológicos como resultado del consumo simultaneo de cocaína y alcohol por el método de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas"

R. García<sup>1</sup>, M. Ovalle<sup>2</sup><sup>1</sup>Escuela de Química Farmacéutica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala (USAC)<sup>2</sup>Laboratorio Químico de Toxicología del Ministerio Público

### Resumen

Uno de los sistemas más confiables de detección de la presencia de cocaína y sus diferentes metabolitos en fluidos biológicos, es la cromatografía de gases (CG) acoplada a espectrometría de masas (MS). El presente trabajo enfoca esta búsqueda con el propósito de establecer si efectivamente el consumo simultáneo de cocaína, etilecgonina y cocaetileno como metabolitos específicos.

Para poder efectuar el trabajo se hizo necesario utilizar el procedimiento de extracción sólido/sólido, basado en el empleo de columnas de sílica suavizada; posteriormente y para poder llevar a cabo la separación de detección e identificación de los componentes del extracto se utilizó (CG/MS). A través de este instrumental, el extracto es introducido al cromatógrafo de gases en donde mediante el empleo de una columna capilar adecuada, un gas acarreador y temperaturas previamente establecidas en métodos estandarizados se obtiene la separación de los diferentes analitos. El empleo del espectrómetro de masas como detector permite la identificación de los compuestos separados mediante mecanismos fisicoquímicos que dan lugar a la fragmentación de las moléculas y con ello a la formación de diferentes iones, que a su vez origina espectros característicos aceptados internacionalmente y que son reconocidos mediante el uso del software específico del equipo.

La finalidad del presente trabajo es a nivel nacional llegar a establecer, descartar o dejar fundamentadas bases que permitan confirmar que los metabolitos metilecgonina, etilecgonina y cocaetileno son o no productos específicos del consumo simultáneo de alcohol y cocaína. Lo anterior utilizando metodologías e instrumental que anteriormente se mencionó.

A través del desarrollo del trabajo no se detectó alcohol, cocaína y sus metabolitos en ocho muestras; se detectó alcohol pero no cocaína y sus metabolitos en dieciocho muestras, no se detectó alcohol pero sí cocaína y los metabolitos metilecgonina en nueve muestras y benzoilecgonina en tres muestras; se detectó alcohol y la presencia de cocaína y los metabolitos metilecgonina y etilecgonina en cinco y siete muestras respectivamente; y no se encontró el metabolito cocaetileno en ninguna de las muestras analizadas.

### Introducción

El incremento constante del consumo de alcohol y de otras drogas (dentro de las que destaca la cocaína), en Guatemala se ha convertido en un problema de índole social, económico y legal; desde el ángulo que interesa. En el presente trabajo se pretendió apoyar la función legal que cumple el Químico Farmacéutico en los análisis que se realizan en el laboratorio de sustancias controladas del Ministerio Público; estableciendo, analíticamente en el campo químico, la presencia en mayor o menor escala de metabolitos que fueron resultado del consumo simultáneo de alcohol y cocaína.

El estudio toxicológico del alcohol etílico es de interés debido a que éste se encuentra en proporciones variables en bebidas que son extensamente consumidas por la población guatemalteca. Además, es un problema social en Guatemala (1).

El alcohol es considerado como droga de adicción, debido a que su consumo se manifiestan los siguientes síntomas: compulsión, tolerancia, dependencia psíquica, dependencia física, síndrome de abstinencia, así como efectos nocivos para el individuo (6).

La cocaína de estructura molecular  $C_{17}H_{21}NO_4$ , peso molecular 303.36 g/mol; es un alcaloide que se extrae de las hojas de *Eritroxylon coca* el cual afecta el sistema nervioso central, actuando como un estimulante (1,2,3,5).

La ecgonina cuya estructura molecular es  $C_9H_{15}NO_3$  y de peso molecular 185.23 g/mol es la parte principal de la molécula de la cocaína, la cual es obtenida por medio de hidrólisis, y es usada en terapéutica como anestésico tópico (12).

El cocaetileno es una sustancia homóloga de la cocaína, insoluble en agua, soluble en alcohol y éter; cuya estructura molecular es  $C_{18}H_{23}NO_4$  y con un peso molecular 317.38 g/mol el cual es usado en terapéutica como anestésico local. Según estudios realizados este metabolito se encuentra en el ser humano debido al consumo simultáneo de cocaína y alcohol (12).

En Guatemala, el consumo de la cocaína se ha incrementado y el consumo del alcohol es un problema social, razón por la cual se consideró importante realizar la búsqueda de los metabolitos metilecgonina, etilecgonina y cocaetileno; que hasta donde se sabe es producto del consumo simultáneo de estas dos drogas.

### Materiales y métodos

#### UNIVERSO DE TRABAJO

Las muestras de fluidos biológicos provenientes de personas con historia clínica documentada (fundamentalmente orina, sangre y humor vítreo), para detectar la presencia de los metabolitos metilecgonina, etilecgonina y cocaetileno del consumo simultáneo de cocaína y alcohol por medio de extracción sólido - sólido y su posterior detección por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

#### MEDIOS HUMANOS

AUTOR: Br. Rosa Marina García Meckler  
ASESORA: Licda. Miriam Dolores Ovalle  
Gutiérrez de Monroy

#### INSTALACIONES

Instalaciones del laboratorio químico de toxicología del Ministerio Público

#### INSTRUMENTAL Y TECNICO

Cromatógrafo de gases Hewlett-packard 6890 acoplado a un espectrómetro de masas Hewlett Packard 5973 y su software chemstation con biblioteca Nist. 98 L.  
Auto muestreador ALS  
Cristalería del laboratorio  
Columnas de extracción sílica suavizada  
Bomba de compresión  
Agitador eléctrico (vortex)

#### REACTIVOS:

Amortiguador de fosfato (pH 6)  
Acido acético 1 M  
Hexano  
Acetato de etilo  
Cloruro de metileno  
Metanol  
HCL  
Isopropanol  
NH<sub>4</sub>OH

#### PROCEDIMIENTO:

Reunir el número de muestras a analizar:

#### CONTROLES

(Solución Patrón):

Pesar 5.6 mg de la muestra control de cocaína/HCL, pesar por separado 6.25 mg de la muestra control de benzoilecgonina/tetrahidratada. Disolver cada una de las muestras y completar en matraces diferentes de 10 ml con metanol. Rotular los matraces.

(Solución de Trabajo):

Colocar 200ul del estándar de cocaína + 200ul del estándar de benzoilecgonina y completar en un matraz de 10 ml con agua destilada. Rotular el matraz.

(Solución de concentración conocida o estándar)-.

Colocar 500ul de la muestra de trabajo y añadirlo a un matraz de 10 ml y completar este con sangre diluida en un poco de agua destilada o agua salina. Rotular el matraz.

Preparación de la muestra:

A 1 ml de la muestra en un tubo de ensayo, añadir 4 ml de agua destilada, centrifugar por 10 minutos y descartar el precipitado colocando la solución en otro tubo de ensayo al cual se lo agrega 2 ml de buffer de fosfato pH 6.0, agitar y posteriormente tomarle el pH el cual debe estar entre un rango de 5.5 - 6.5 sino esta en este rango se debe ajustar ya sea con fosfato monobásico o fosfato dibásico de sodio.

Preparación de la columna (CSDAU 020)\*

Agregar 3 ml de metanol colocando primero 1 ml abrir las llaves para permitir que fluya y repetir la operación hasta haber colocado los 2 ml restantes, luego adicionar 1 ml más. Luego agregar 3 ml de agua destilada colocando primero 1 ml abrir las llaves para permitir que fluya y luego repetir la operación hasta haber colocado los 2 ml restantes, adicionar 1ml de buffer de fosfato 0.1 M pH 6 abrir las llaves para permitir que fluya. Cerrar las llaves para detener el flujo cuando aún quede 1/3 parte de la última porción de agua destilada para no dejar secar la columna.

\*CSDAU 020. Patente registrada de la columna de sílica gel suavizada y previamente preparada por la casa productora para detectar drogas de abuso ya sea ácidas o básicas.

Adición de la muestra a la columna:

Agregar la muestra en la columna, o a través de un filtro especial en caso de muestras muy grasosas o precipitados; hacerlo a una velocidad 1 - 2 ml/minuto

Lavado de la columna:

Agregar sobre la columna directamente 3 ml de agua destilada, colocando primero 1 ml; abrir las llaves para permitir que fluya y repetir la operación hasta haber colocado los 2 ml restantes. Luego agregar 3 ml de ácido acético 1 M, colocando primero 1 ml; abrir las llaves para permitir que fluya y repetir la operación hasta haber colocado los 2 ml restantes. (ajustando este valor con el monifold o caja de vacío).

Secar la columna de 2 - 5 minutos a un vacío de 10 pulgadas de mercurio.

Luego agregar 2 ml de hexano colocando primero 1 ml abrir las llaves para permitir que fluya y repetir la operación hasta haber colocado el ml restante.

**Elución de las drogas ácidas y neutras:**

Agregar 3 ml de la mezcla de hexano/acetato de etilo (50:50), colocando primero- 1 ml abrir las llaves para permitir que fluya y repetir la operación hasta haber colocado los 2 ml restantes.

El solvente debe pasar a través de la columna a una velocidad de 5 ml/min.

**Secar el solvente eluído:**

Evaporar a sequedad a una temperatura no mayor de 40°C.

Reconstituir con 100 ul de acetato de etilo.

Elución de las drogas básicas (dentro de este grupo está comprendida la cocaína y sus metabolitos).

Agregar 3 ml de solvente de cloruro de metileno/Isopropanol/NH<sub>4</sub>OH (78:20:2), coleccionar el solvente eluído a una velocidad de 1 - 2 ml/min.

Nota: Preparar los solventes de elución diariamente.

**Secar el solvente eluído:**

Evaporar a sequedad a no más de 40°C cuidando de no exceder esta temperatura.

Reconstituir con 100 ul de metanol.

**Inyección de las drogas básicas:**

inyectar 1 ul en el cromatógrafo de gases acoplado al espectrometría de masas.

**DISEÑO DE INVESTIGACION:****MUESTREO:**

Forma de Muestreo:

No probabilístico.

Tamaño de la Muestra:

Se analizaron 50 muestras de fluidos biológicos previamente identificadas en el laboratorio de sustancias controlas del Ministerio Público.

**Variables de Interés:**

Identificación de los siguientes metabolitos resultantes de la ingesta del consumo simultáneo de cocaína y alcohol:

Metilecgonina

Etilecgonina

Cocaetileno

**Resultados**

Se partió de un lote de 50 muestras de sangre las mismas se sometieron a análisis de presunción para presencia de drogas por medio de cromatografía en capa fina estandarizada (sistema de TOXILAB) y confirmatorio para alcohol (microdifusión y con cromatografía de gases).

Posteriormente se procedió a efectuar los análisis de confirmación de presencia de metabolitos de cocaína por medio de cromatografía de gases (GC) acoplada a espectrometría de masas (MS), para poder llegar a este paso se hizo necesario efectuar previamente un procedimiento de extracción con columnas específicas para drogas de abuso por el método sólido-sólido.

Del extracto final se inyectó al cromatógrafo de gases acoplado a espectrómetro de masas un microlitro (ul), cantidad que permite que dicho equipo separe, detecte y confirme la presencia de alguna de las sustancias buscadas. La confirmación se lleva a cabo mediante la comparación del espectro y masas obtenidos con el espectro de la droga pura.

Se estableció por medio de los espectros de masas, que de las 50 muestras electas los resultados fueron los siguientes:

**DESCRIPCIÓN CONDENSADA DE CORRELACION ENTRE ALCOHOL Y METABOLITO& DE LA COCAINA**

Muestra	Alcohol negativo metabolitos de la cocaína negativos	Alcohol Positivo metabolitos de la cocaína negativos	Alcohol negativo metilecgonina positivo	Alcohol Positivo metilecgonina positivo	Alcohol negativo etilecgonina positivo	Alcohol Positivo etilecgonina positivo	Alcohol Negativo benzoilecgonina positivo	Alcohol positivo benzoilecgonina positivo
Cantidad	8	18	9	5	0	7	3	0
Porcentajes	16%	36%	18%	10%	0%	14%	6%	0%

### Discusión de resultados

Según la bibliografía consultada (2, 3, 4 y 7) de la ingesta simultánea de alcohol y cocaína, no se ha podido establecer con certeza hasta la fecha, la formación de un metabolito específico. Sin embargo existen presunciones con bastante fundamento para considerar que cocaetileno sea efectivamente el metabolito producido por la ingesta simultánea de ambas drogas; también existen estudios que han efectuado y que aunque han planteado la hipótesis de considerar probable la formación de etilecgonina y metilecgonina como metabolitos resultantes de dicho consumo, no han podido ser concluyentes. Sin embargo, existen afirmaciones aceptadas a nivel de congresos científicos y diferentes autoridades en el área toxicológica, que reconocen que la benzoilecgonina es el resultado de la ingesta de la cocaína aislada del alcohol.

Los resultados obtenidos en el trabajo muestran la presencia de los metabolitos siguientes: (18% y 14%) de metilecgonina, (10%) de etilecgonina y (6%) de benzoilecgonina (ver cuadro No.2). También establecen que nunca fue detectado el metabolito cocaetileno en las muestras analizadas. Analizando detenidamente los resultados en mención; puede considerarse que la ausencia de éste último, pudo deberse entre otras causas a la utilización de procedimientos de extracción muy generalizados para cocaína y sus metabolitos más abundantes y por lo tanto poco específicos para cocaetileno. También se puede considerar la posibilidad de la no detección por falta de derivatización de los extractos, procedimiento que no se efectuó dado a que no se tenía estipulado como parte de la presente tesis en virtud de la dificultad de obtener los agentes derivatizantes necesarios en el mercado local. Así mismo, puede pensarse que el cocaetileno no estuviese presente en el bloque de muestras trabajadas.

Insistiendo en lo investigado en relación al consumo y posterior detección de cocaína y sus metabolitos, se conoce lo siguiente: Existen estudios efectuados tanto a nivel de extracción - procedimiento sólido/sólido- similar al empleado en el presente trabajo. Existen estudios efectuados sobre la fase de detección utilizando cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, equipo que se utilizó en el desarrollo de esta tesis.

Es importante mencionar que los estudios mencionados fueron realizados en laboratorios de Tampa, Miami, San Juan Puerto Rico y Canadá. Los mismos se realizaron sobre cantidades que no superan las cien muestras y se han efectuado en periodos que oscilan de seis a doce meses de duración; cabe destacar que en la mayoría de ellos si han utilizado la técnica de derivatización, que como ya se mencionó no fue posible utilizar en el presente trabajo.

Según los resultados obtenidos del análisis de cincuenta muestras de fluidos biológicos analizadas; podemos resumir lo siguiente:

18% de las muestras dio resultado negativo para presencia de alcohol y positivo para el metabolito de la cocaína metilecgonina, que se supone es originado por el consumo simultáneo de ambas drogas. Estos resultados llevan a suponer que el individuo haya metabolizado y excretado totalmente el alcohol, dado que el tiempo de eliminación de éste es de aproximadamente ocho horas; mientras que el de la cocaína, cuyo metabolito si fue detectado, es de aproximadamente setentidós horas. Estos individuos cuentan con antecedentes de consumo crónico de alcohol.

Los metabolitos etilecgonina y metilecgonina fueron encontrados en un 14% y 10%, respectivamente de las muestras analizadas dando resultado positivo para la presencia de alcohol y para cocaína. Este resultado lleva a pensar que los metabolitos anteriormente mencionados pudieron ser consecuencia directa del consumo simultáneo de ambas drogas y que la muerte del individuo se diera en el periodo de metabolización que abarca a ambas, es decir no más de ocho horas post-consumo. 6% de las muestras analizadas dio resultado negativo para alcohol y positivo para benzoilecgonina, no se conoce la causa de muerte de estos individuos, pero los mismos sí poseen antecedentes de consumo crónico de alcohol. Esto lleva a corroborar lo ya establecido por estudiosos de la materia, en el sentido de que la benzoilecgonina no es producto del consumo simultáneo de ambas drogas.

16% de las muestras analizadas dio resultado negativo para alcohol y para cualquiera de los metabolitos de la cocaína, resultado que lleva a pensar a que no hubo consumo de ninguna de estas drogas.

36% de las muestras analizadas dio resultado positivo para alcohol y negativo para los metabolitos de la cocaína.

### Conclusiones

Los metabolitos metilecgonina y benzoilecgonina fueron encontrados en las muestras que resultaron negativas para alcohol y positivo para cocaína.

En las muestras que resultaron positivas alcohol y cocaína se encontraron los metabolitos metilecgonina y etilecgonina.

En las muestras que resultaron positivas para alcohol y negativas para cocaína no se encontraron los metabolitos metilecgonina y etilecgonina.

No se encontró la presencia del metabolito cocaetileno en ninguna de las muestras analizadas.



### Recomendaciones

Hacer verificaciones de sensibilidad del equipo y comparación con valores obtenidos en otros países.

Utilizar un método específico que permita la detección del metabolito cocaetileno, posiblemente utilizando, algún derivatizante como BSTFA.

### Agradecimientos

Al Ministerio Público, en especial al laboratorio químico/sección de sustancias controladas, por el apoyo técnico y económico brindado para el desarrollo de la parte experimental del trabajo de investigación.

### Bibliografía

Alvarez de Rebage L. 1996. "Compendio de Farmacodependencia y Alcoholismo", Guatemala, Guatemala. Hospital Universitario San Vicente de Paul. Departamento de Toxicología. Pp.48-83.

Carrillo, A. 1981. "Lecciones de Medicina, Forense y Toxicológica", Guatemala. Ed. Universitaria Pp. 315-318.

Casarett & Doull. 1975. Toxicology: The Basic Science of Poisons. New York. Macmillan. 324p.

Congress of the International Association of Forensic Toxicologist (TIAF) and the Society of Forensic Toxicologist (SOFT), Program and Abstracts October 31 - November 4 de 1994 en Tampa Florida. 521 p. y Puerto Rico, October 9 - 14 de 1999. pp. 40,41,71.

Charles A. Et al. 1998. "Chromatographic Methods In Gas Analisis". Hewlett-packard. 44p.

Fabre, Rene. Et al. 1962. Compendio de Toxicología. Caracas, Venezuela. Ediciones de la biblioteca. Pp. 282-302

Merck. "The Index Merck", 10 th. Edición. 1986. U.S.A. Raahway, N.J. pp. 348, 349, 590.