

## Tesis de Posgrado

# Estudio de las variaciones en la excreción por orina de la cocaína y sus metabolitos, en ratas tratadas con dicha droga a distintos períodos de cronicidad

Pinet, Ana María Elena

1991

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](http://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](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Pinet, Ana María Elena. (1991). Estudio de las variaciones en la excreción por orina de la cocaína y sus metabolitos, en ratas tratadas con dicha droga a distintos períodos de cronicidad. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2404\\_Pinet.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2404_Pinet.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Pinet, Ana María Elena. "Estudio de las variaciones en la excreción por orina de la cocaína y sus metabolitos, en ratas tratadas con dicha droga a distintos períodos de cronicidad". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1991.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2404\\_Pinet.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2404_Pinet.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESTUDIO DE LAS VARIACIONES EN LA EXCRECION POR ORINA  
DE LA COCAINA Y SUS METABOLITOS, EN RATAS TRATADAS  
CON DICHA DROGA A DISTINTOS PERIODOS DE CRONICIDAD

ANA MARIA ELENA PINET

Director de Tesis: Dra Eva M.Kesten

Toxicología y Química Legal

Tesis presentada para optar al Título  
de Doctora en Ciencias Químicas

*Tesis.*  
*2404*  
*g. 2.*

1991

A mis padres

"Heureux celui qui porte en soi un Dieu, un idéal de beauté et qui lui obéit, idéal de l'art, idéal de la science, idéal de la Patrie, idéal des vertus de l'Évangile"

Louis Pasteur

Todo lo puedo en Aquel que me conforta.

(Filip., 4, 13)

## A G R A D E C I M I E N T O S

Muy especialmente a mis padres, que alentaron mis ideales, me brindaron su apoyo incondicional y, en los momentos difíciles, su presencia silenciosa y comprensiva. Es imposible agradecerles todo lo que han hecho por mí a lo largo de mi vida y en particular para que pudiera concretar mi trabajo de Tesis.

A mi Directora de Tesis y Consejera de estudios, Dra.Eva M.Kesten, por su inestimable guía y valiosas opiniones durante el trabajo experimental y la escritura de esta Tesis.

A la Dra.Rosa G.de Kempny por haberme impulsado a iniciar y realizar el presente trabajo.

Al Dr.Roberto Pompei y a la Dra.María Lourdes Paviolo por infundirme el entusiasmo y la dedicación en mis primeros pasos por la Toxicología.

Al Dr.José A.Castro por sus consejos y apoyo para la concreción de este trabajo.

A la Srta.Celestina Almendra y a los Licenciados Noemí Verrengia Guerrero y Marcelo Gurfinkel, que me brindaron su apoyo y entusiasta colaboración.

Agradezco también a todos mis compañeros de Toxicología y Química Legal por su cooperación y buena disposición.

Al Dr.Norberto J.Barassi por su asesoramiento y colabo-

ración en el trabajo con animales de experimentación.

A la Dra. Ana Silvia Haedo y al Sr. Marcelo Soria por la dedicación puesta en la realización del estudio estadístico.

A la Srta. Martha Fernández por el gran esmero y dedicación puestos al transcribir el manuscrito.

A los Licenciados Domingo Torroba y Estela Zavala, al Sr Carlos Zabala y la Srta Graciela Lonchuk del Instituto Nacional de Farmacología y Bromatología, por la realización de los infrarrojos.

A la Srta. Hebe Hernando de la Biblioteca Lincoln y a la Sra. Blumenthal de la Embajada de los Estados Unidos de Norteamérica por el valioso aporte bibliográfico.

A la Sra. Lilia Lescano por su apreciada ayuda en el trabajo con los animales de laboratorio.

A mi prima Verónica A. Villa, por su encantadora colaboración.

## C O N T E N I D O

	OBJETIVOS	1
	INTRODUCCION	6
I	ANTECEDENTES HISTORICOS	6
II	BOTANICA	18
III	PRODUCCION, COMERCIO, TRAFICO ILICITO Y TENDENCIAS DEL USO DE LA COCAINA	28
III.1	PRODUCCION Y COMERCIO	28
III.2	TRAFICO ILICITO	36
III.3	TENDENCIAS DE LA COCAINA	42
IV	COCAISMO Y COCAINISMO	51
V	ACCION EN EL ORGANISMO	61
V.1	ABSORCION Y DISTRIBUCION	61
V.2	METABOLISMO	65
V.2.1	GENERALIDADES	65
V.2.2	METABOLISMO DE LA COCAINA	75
V.3	EXCRECION	96
V.4	HEPATOTOXICIDAD	98
V.5	SISTEMA NERVIOSO	110
V.5.1	BASES FISIOLOGICAS DE LA ACCION DE LAS DRO- GAS	111
V.5.1.1	GENERALIDADES	111
V.5.1.2	TEORIA DEL COMPORTAMIENTO	123

V.5.2	LA COCAINA Y EL SISTEMA NERVIOSO	132
V.5.2.1	SISTEMA NERVIOSO PERIFERICO	133
V.5.2.2	SISTEMA NERVIOSO CENTRAL	135
VI	ANTECEDENTES RELATIVOS A LA IDENTIFICACION Y DETERMINACION DE LA COCAINA Y SUS META- BOLITOS	146
VI.1	ESTUDIOS EN MUESTRAS DE TRAFICO ILICITO	148
VI.2	ESTUDIOS EN FLUIDOS BIOLOGICOS	159
	PARTE EXPERIMENTAL	176
I	DESARROLLO DE UN METODO PARA EL AISLAMIEN- TO, PURIFICACION, IDENTIFICACION Y VALORA- CION DE COCAINA, BENZOILECGONINA Y ECGONINA EN MUESTRAS DE ORINA	177
I.1	EQUIPOS, MATERIALES Y METODOS	177
I.2	PROPIEDADES FISICOQUIMICAS DE LA COCAINA Y SUS METABOLITOS EN ESTUDIO	184
I.3	RESULTADOS Y DISCUSION	189
I.3.1	DESARROLLO Y MODIFICACION DE TECNICAS PARA LA IDENTIFICACION Y VALORACION DE COCAINA Y SUS METABOLITOS	189
I.3.2	AISLAMIENTO Y PURIFICACION	204
I.3.2.1	PRIMER ESQUEMA DE TRABAJO	206

1.3.2.2	MODIFICACIONES	228
I.3.3	NUEVO ESQUEMA DE TRABAJO	233
I.3.4	IDENTIFICACION DE ECGONINA EN ORINA	236
II	ESTUDIOS DE EXCRECION DE LA COCAINA Y SUS METABOLITOS EN RATAS	239
II.1	EQUIPOS Y MATERIALES	239
II.2	METODO	240
II.2.1	TRATAMIENTO DE LOS ANIMALES Y RECOLECCION DE LAS MUESTRAS DE ORINA	240
II.2.2	AISLAMIENTO DE COCAINA, BENZOILECGONINA Y ECGONINA	243
II.2.3	PURIFICACION Y DETERMINACION DE LA COCAINA	245
II.2.4	AISLAMIENTO DE BENZOILECGONINA Y ECGONINA	246
II.2.5	PURIFICACION Y DETERMINACION DE ECGONINA	247
II.2.6	DETERMINACION DE BENZOILECGONINA	249
II.2.7	CALCULO DE LOS PORCENTAJES EXCRETADOS DE COCAINA, BENZOILECGONINA Y ECGONINA	251
II.3	RESULTADOS	252
II.3.1	ESTABILIDAD DE COCAINA Y BENZOILECGONINA	252
II.3.2	VARIACIONES DE LOS PORCENTAJES DE EXCRE- CION POR EL TRATAMIENTO CRONICO	253
III	ENSAYO CON ORINA HUMANA	263
	CONCLUSIONES	265

ABREVIATURAS	273
BIBLIOGRAFIA	276

## O B J E T I V O S

La cocaína, una droga considerada hasta no hace muchos años como incapaz de producir adicción, es hoy día proclamada como la responsable del más alto riesgo para la salud pública. Este vuelco sustancial se debe a que anteriormente se creía que la cocaína producía dependencia psíquica pero no dependencia física.

La privación de cocaína en los adictos no produce la sintomatología característica del síndrome de abstinencia de drogas como el alcohol y los opiáceos. Si bien en algunos casos se observa tolerancia, en otros aparece sensibilidad, llegando tal privación incluso a provocar la muerte en sujetos crónicos. Además, los usuarios pueden suprimir el consumo durante días o semanas, generando la creencia de que no se produce dependencia física y que el desasosiego, la ansiedad y el deseo vehemente de un nuevo consumo están sólo relacionados con la dependencia psíquica.

Fueron necesarias casi dos décadas de abuso creciente y crónico de la droga, e investigaciones exhaustivas, para poder obtener conclusiones más realistas en este ámbito.

Recientes investigaciones han demostrado que la cocaína produce un síndrome de abstinencia distinto de los modelos

conocidos, es decir en este caso las alteraciones neurofisiológicas específicas del sistema nervioso central se traducen o expresan como efectos psicológicos, que conducen al uso crónico y compulsivo de la droga.

El análisis de la cocaína y sus metabolitos es esencial para el diagnóstico y evaluación del uso de la droga, ya sea con fines toxicológicos o bien en casos legales como el "doping", y además sería de interés emplearlo con fines médicos en los programas de rehabilitación de drogadictos.

Aunque existen antecedentes de que el uso crónico de la cocaína puede influir en su metabolismo y toxicidad en los diversos órganos y sistemas, se conoce muy poco acerca del significado de los hallazgos obtenidos en relación con dicho uso crónico. Por ello, uno de los aspectos íntimamente relacionados con el abuso de la droga es el estudio de la cinética y transformaciones en el organismo.

Las investigaciones previas en animales de laboratorio permitieron obtener los primeros indicios del comportamiento de esta droga en cuanto a su biotransformación.

La cocaína presenta la característica de una extensa y rápida metabolización, originada por dos rutas distintas. La principal da cuenta del 90% de la biotransformación de la droga, produciéndose reacciones hidrolíticas mediadas por sistemas enzimáticos como esterasas del suero o por

hidrólisis espontánea. La segunda ruta involucra procesos oxidativos en los cuales interviene el sistema microsomal hepático.

Estudios previos han indicado que por orina humana se excreta como tal solamente alrededor del 1% de la cocaína ingresada, eliminándose el resto como metabolitos.

La benzoilecgonina es conocida por ser el mayor metabolito urinario, siguiéndole en importancia el éster metílico de la ecgonina y en menor proporción la ecgonina y norecgonina.

Existen diferencias en los porcentajes de excreción de la cocaína y sus metabolitos debido a modificaciones en la biotransformación de la droga que pueden deberse a una compleja variedad de factores, incluyendo la especie, el sexo, la edad, desórdenes funcionales, e incluso diferencias entre individuos. En el caso de los seres humanos debe tenerse en cuenta además la experiencia previa con otras drogas que alteran el sistema microsomal hepático.

Teniendo en cuenta estos antecedentes se propone como objetivo de esta Tesis realizar un trabajo con animales de experimentación para establecer si se producen modificaciones estadísticamente significativas en la excreción urinaria de la cocaína y sus metabolitos más importantes (benzoilecgonina y ecgonina) a lo largo de una intoxicación crónica.

Para cumplir con dicho objetivo resulta necesario disponer de una técnica que permita identificar y determinar la droga en estudio y los dos metabolitos mencionados, en orina de ratas. Ello a su vez involucra la obtención de muestras de orina libres de contaminación a fin de obtener las muestras con pH adecuado para evitar la hidrólisis espontánea fuera del organismo, siendo necesario efectuar modificaciones a las jaulas metabólicas existentes en nuestros laboratorios.

Por otra parte, la detección y determinación de los metabolitos polares en muestras biológicas no es simple. Si bien la cocaína, por ser lipofílica, puede ser extraída del material biológico mediante solventes no polares, los metabolitos, que son más polares e hidrofílicos, requieren para su extracción solventes polares. Esto ocasiona la coextracción de componentes de la muestra que interfieren en la posterior identificación y valoración de los productos de la biotransformación.

A su vez, el empleo de solventes de polaridad media disminuye las interferencias, pero es necesario un exhaustivo tratamiento de extracción de la muestra. Además se requieren pasos de purificación previos al dosaje a fin de eliminar las interferencias.

Otro aspecto a tener en cuenta es que la cocaína puede

sufrir transformaciones durante el tiempo de almacenamiento de la muestra y durante la extracción de la matriz; fenómenos que deben también controlarse adecuadamente.

Como la literatura no registra ningún método que cumpla todos los requisitos necesarios para llevar a cabo el objetivo propuesto, es imprescindible desarrollar y optimizar las diversas técnicas, encauzando la determinación en base al instrumental disponible, cromatógrafos gas líquido y líquido de alta presión.

La metodología empleada para el seguimiento de la intoxicación crónica en animales debería además ser de utilidad para su posterior aplicación en orina humana.

Por otra parte, el estudio puede sugerir el indicador más apropiado a utilizar en el caso de una intoxicación de tipo crónico.

# I N T R O D U C C I O N

## I ANTECEDENTES HISTORICOS

El descubrimiento y la conquista de América originaron un conjunto de acontecimientos y cambios que se fueron desarrollando a partir del siglo XVI, en los cuales no sólo tuvieron relevancia las confrontaciones de hombres, de culturas y civilizaciones, sino también la observación de una naturaleza sorprendente, que se presentaba diferente a los ojos de los descubridores.

Así surgió el conocimiento de costumbres, formas de vida, creencias, flora y fauna, que impulsaron un fluido intercambio, cruzándose sobre el Océano Atlántico en caminos diametralmente opuestos todos aquellos elementos que formaban parte del acervo de conquistadores y conquistados.

Uno de los hechos significativos que tuvo la conquista del Nuevo Mundo fue, sin lugar a dudas, la inquietud por parte de naturalistas y científicos del estudio de la flora y fauna encontrada.

Dentro de esa exuberante naturaleza, despertó la atención de los colonizadores de América del Sur un arbusto de flores blancas y fruto rojo: la planta de "coca". El sacer-

dote español Tomás Ortiz (1)(2) en el año 1499 observó que los indígenas de la costa septentrional de la parte sud del continente recién descubierto utilizaban una planta que llamaban "Hayo" (3), nombre vulgar con que se designa aún hoy en Colombia y Venezuela a una variedad de la coca.

Américo Vespucio informó en 1507 (4) también sobre el uso de la "coca" por parte de los aborígenes que habitaban en la desembocadura del río Pará o Amazonas.

Los soldados españoles que llegaron al Perú o Pirú, denominación que se daba en ese entonces al Imperio Incaico, observaron que los nativos cultivaban con todo esmero un arbusto muy ramificado, la "coca", que crecía espontáneamente en aquellas comarcas, siendo patrimonio del emperador la totalidad de las cosechas que de él se obtenían (5). La observación de la planta de coca constituyó el centro de atención de naturalistas y científicos (todas las ramas de la ciencia), de la que trataron de obtener la mayor cantidad de datos relacionados con su aspecto botánico, modos de empleo, usos y efectos.

Así, en la crónica de los conquistadores y viajeros se indicaba que el mascado de las hojas de coca por parte de los indígenas se remontaba a épocas muy lejanas.

Se ha podido comprobar que en casi todos los pueblos primitivos existieron plantas que jugaron un papel impor-

tante en sus mitos. La asociación de su carácter de plantas sagradas con sus propiedades y virtudes dio origen a que se destacaran singularmente, floreciendo en el campo fértil del mito y la leyenda. Hay que reconocer que las observaciones del hombre primitivo con frecuencia concordaron con lo que más tarde había de establecer la investigación científica.

El origen de la planta de coca estaría vinculado a una leyenda que relataba que "el Hijo del Sol, Manco Capac, descendió de los cielos para difundir entre los hombres los conocimientos de los dioses sobre agricultura y artes y a traerles la coca, planta divina que consuela al afligido, da fuerzas al cansado y sacia al hambriento."(5)

La práctica del mascado de las hojas de coca se difundió de generación en generación, especialmente entre los indios del altiplano, costumbre que se mantiene aún en la actualidad.

Además de los súbditos del Imperio Inca, también los Qui-chua, los Aymará y otros indígenas de las zonas altas atribuían al origen divino de las hojas de coca diversas propiedades milagrosas (6), y estas creencias aún perduran. Las hojas formaban parte de las ofrendas a los dioses, de los honorarios de los hechiceros y curanderos, y comerciaban con ellas asignándoles el valor de verdadera moneda.

En los sepulcros de los Incas fueron encontrados peque-

ños atados de hojas entre joyas y metales preciosos. A tal punto llegaban los atributos que los nativos conferían a las hojas de coca, que las ponían en los anzuelos de pesca para obtener una abundante recolección y las colocaban sobre los enfermos para su rápida curación. Se usaban como anestésico y para consolidar las fracturas óseas preparando una masa con las hojas, sal y clara de huevo.

En las ceremonias religiosas o fiestas tribales masticaban hojas sin cesar hasta quedar fuera de juicio, lo cual les producía una sensación de euforia similar a los paraísos artificiales que pretenden encontrar los drogadictos en la actualidad. En este estado reían, cantaban y se movían sin sentir fatiga, hasta que el exceso producía sus estragos; el agotamiento paralizaba sus miembros, su andar se tornaba inseguro, y por último caían en un sueño profundo; ésta es la causa por la cual hoy en día se conoce a la hoja de coca con el nombre de "haschisch de los peruanos".(5)

En suma, la coca formaba parte de los acontecimientos de la vida familiar desde el nacimiento hasta la muerte, de los ritos agrícolas y religiosos, por lo que, en conclusión, nada escapaba a su influencia.

A los indígenas que tenían la costumbre de acolliquear (masticar hojas de coca) se los denominaba "coqueros" (denominación que se mantiene actualmente); llevaban las

hojas en pequeñas bolsas de vistosos colores que llamaban "chuspa" y para su masticación las mezclaban con polvos provenientes de distintos orígenes. Estos eran por lo general productos obtenidos de la molienda de conchas de ostras que previamente quemaban y que llamaban "yusta", o bien con un producto alcalino obtenido de la carbonización de ciertas plantas, al que denominaban "ilipta". En algunas regiones las hojas de coca eran mezcladas con las de tabaco u hojas frescas de chenopodium quinoa.

En sus largas caminatas masticaban una "bolita" previamente preparada, hasta agotarla completamente; la desecharon y la reemplazaban por una nueva; por ello las distancias se medían por "cocadas", equivalentes cada una a aproximadamente tres kilómetros (6) (7). Las características de las zonas del altiplano, montañosas y áridas y por lo tanto carentes de agua y alimento, incitaban a los nativos a valerse de la coca para suplir esas deficiencias. La comprobación por parte de los nativos de las propiedades de la coca, tales como disminución del apetito, alivio de la fatiga y generación de calor, les impulsaba a negarse a realizar tareas sin su provisión. Como posteriormente lo demostró la investigación científica, las observaciones empíricas realizadas por los indígenas se correlacionaban perfectamente con las propiedades farmacológicas de la coca. Esto

quizá explica que los correos incas portadores de noticias tardaran sólo tres días en recorrer la distancia entre Cuzco y Lima, relevándose de tiempo en tiempo, mientras que los postillones españoles necesitaban doce días para efectuar el mismo recorrido (5).

Los coqueros presentaban un avanzado estado de desnutrición debido a la exigua cantidad de alimentos que ingerían, ya fuera por la anorexia producida por la coca o por la sensación de falta de fatiga ocasionada por estimulación central. Como el uso estaba muy arraigado en las tribus, sus integrantes percibieron la decadencia y degeneración de la raza e impusieron algunas restricciones. Por ejemplo, la prohibición de realizar tareas en los cocales a niños y mujeres solteras, y a embarazadas y casadas sin autorización del marido (5).

Todo este cúmulo de comprobaciones por parte de los conquistadores, de una civilización cuyos mitos, supersticiones, creencias y hábitos de vida giraban en torno de una planta, sobrepasó los límites del interés botánico o la mera crónica de las costumbres por parte de viajeros e historiadores para dar origen a fuertes polémicas con respecto a los beneficios o daños que la misma podía ocasionar.

Así, el segundo Concilio de Lima de 1567/68 consideró el tema y concluyó que el uso de la coca por los indios "es

cosa inútil y perniciosa, que conduce a la superstición por ser talismán del diablo" (3), y que dificultaba e incluso imposibilitaba la evangelización.

Sin embargo, el hecho de prohibir su empleo era una solución demasiado drástica y no tan fácil de llevar a cabo. Por una parte, los indios se negarían a trabajar en las minas o en otras actividades, y por la otra, los conquistadores españoles, cuyos intereses económicos estaban relacionados con la producción y comercialización de las hojas, se negarían a aceptar dicha prohibición. En conclusión, el intento de suprimir la coca significaba "querer que no hubiera más Perú" (8).

Teniendo en cuenta estas objeciones, resultó solamente afectada por la prohibición la ciudad de Lima; el resto del inmenso Virreinato del Perú, que en el siglo XVI incluía Argentina, Bolivia, Perú, Paraguay y Ecuador, así como parte de Chile, continuaría produciendo y consumiendo la "planta divina".

Los años fueron transcurriendo sin que se tomara ninguna posición con respecto al uso de la coca, hasta que en el siglo XVIII escritores como Antonio Julián e Hipólito de Unzué logran nuevamente convertir a la coca en un mito (8).

En 1836 E.F.Pöppig inició la polémica contra la coca - el argumento no es de índole religiosa sino moral, califi-

cando el uso como un "vicio".

En contraposición, el médico Paolo Montegazza (1831 - 1910), que visitó el noreste argentino, aseguraba que la coca puede curar estados de embriaguez producidos por el alcohol, y recomendaba su empleo (8) en varias clases de enfermedades, incluyendo la melancolía.

La ferviente apología que realizaron los defensores de la coca explicaría la gran difusión de vinos, chocolates, cigarrillos, bombones, dentífricos y bebidas varias que contienen coca. Entre estas últimas cabe mencionar la "Coca-Cola", que hasta el año 1903 contenía un extracto preparado con hojas de coca que no excluía ningún alcaloide presente en dicho extracto.

En el año 1860 un químico alemán, Albert Niemann (1834-1861), extrajo de las hojas de coca los principios activos, encontrando como principal componente el alcaloide cocaína, cuya estructura química se encuentra representada en la Figura 1.

La obtención del alcaloide propició que muchos investigadores se dedicaran al estudio de sus propiedades químicas y farmacológicas. Así, Richard Willstätter (1872-1942), químico alemán y premio Nobel, estudió la cocaína durante el período 1891-1924, completando la determinación de la estructura y la síntesis de todos los isómeros de la misma.

En 1880 Vassili von Anrep (1852-1925) comprobó su poder como anestésico local. Sin embargo se atribuye a Carl Koller (1858-1944) y a Sigmund Freud (1856-1939) la introducción de la cocaína en la medicina clínica por estas características (7) (9).

En 1884 Freud hizo el primer estudio general de los efectos fisiológicos de la cocaína como fármaco de acción sistémica, principalmente a distintos niveles del sistema nervioso. Concibió incluso su empleo terapéutico "como antídoto" para liberar a toxicómanos del hábito de la morfina. Aplicó esta terapia a uno de sus colegas, Ernst Fleisch von Maixow (1846-1891). Triunfó en su intento, pero produjo el primer adicto a la cocaína que se registra en los tiempos modernos (10). Fleisch terminó administrándose hasta un gramo de cocaína diario, lo que determinó su deceso en el año 1891.

Este hecho impresionó fuertemente a Freud, pero a pesar de todo continuó defendiendo la droga, pretendiendo que el accidente se debía a la vía de administración. Adujo que la cocaína inyectada era peligrosa, pero no así la que se absorbía por vía nasal. Freud continuó sirviéndose de la cocaína hasta el año 1895, tal como lo manifiesta en su libro "La interpretación de los sueños".

Contribuyó aún más al conocimiento de esta droga un

farmacéutico corso de apellido Mariani, que formuló un "vino a la coca de Mariani". Con la finalidad de promover su creación lo envió como obsequio a distintas personalidades de la época. Su real intención era obtener respuestas de dichas celebridades a fin de transcribirlas y conseguir una espléndida publicidad para su producto. Así confeccionó un libro, publicado en 1892 (7) (11), con las respuestas que obtuvo, en el cual figuraban composiciones musicales de Charles Gounod y Jules Massenet, dibujos de Rodin, cartas de Emile Zola y de Alejandro Dumas hijo, en honor de la coca; en total más de quinientos personajes célebres.

Debido al desconocimiento de su peligrosidad muchos desafortunadamente la ingerían. A través del personal de servicio de la reina Victoria de Inglaterra se llegó a saber que la famosa soberana tenía preferencia por una bebida muy cara, el "vino a la coca", que también era consumida por el Papa León XIII, por el ya mencionado poeta y escritor Emile Zola, por el presidente de los Estados Unidos McKinley y por el inventor Thomas Alva Edison (12) (13).

La cocaína era la droga de moda, de lujo, usada por las clases más pudientes, en contraposición al opio, que era, y lo sería por mucho tiempo, la droga de los desheredados de la fortuna (12).

Simultáneamente a estos acontecimientos se alzaron voces

sabias para denunciar sus efectos adversos. El toxicólogo y etnofarmacologista alemán Louis Lewis (1850-1929) critica severamente la hipótesis de Freud de que la cocaína serviría como "antídoto" para los morfinómanos (8). Esta clara visión del problema es corroborada por A.Erlenmeyer (1886), que además definió a la cocaína como uno de los flagelos de la humanidad (13).

Sin embargo, a pesar de estas advertencias la cocaína ganaba adeptos por doquier e incluso existen evidencias de la facilidad con que se la adquiría en bares de Europa y América y, hasta 1905, en todas las farmacias.

Este es el típico ciclo que cumple una droga, tanto en su uso farmacológico como en el ilegal. Su empleo se convierte en símbolo de prestigio y fama, y a ella sólo puede acceder una minoría exclusiva; esto hace que sea deseada por los menos privilegiados con la finalidad de sentirse equiparados (12).

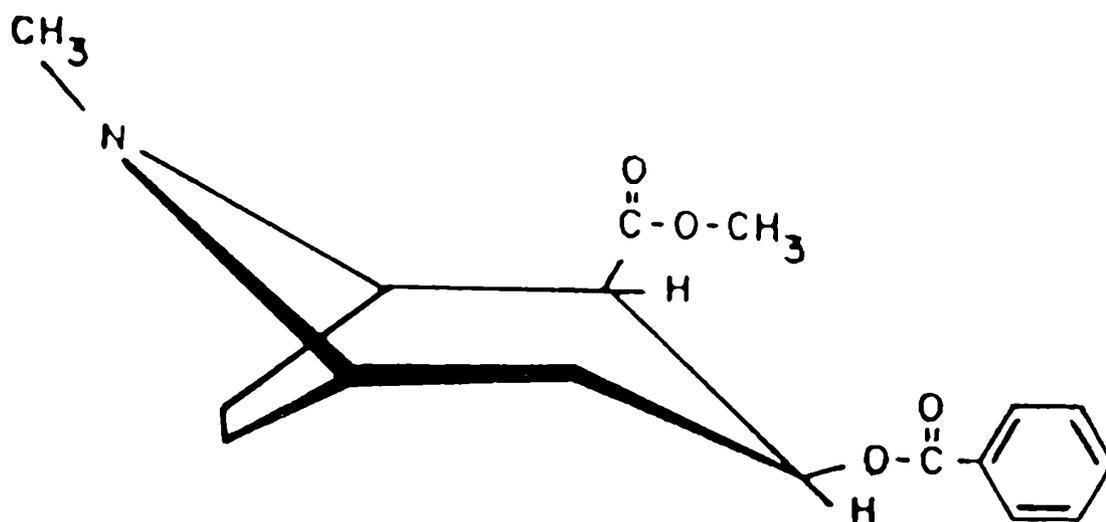


Figura 1: Estructura química de la cocaína

## II BOTANICA

Como la cocaína comercial se extrae de las hojas de la "coca", se presentan algunas consideraciones acerca de dicha planta.

El nombre común con que se la conoce deriva del inca "cuca" o del aymará "khoka", que significa la planta por excelencia, la primera entre todas, mientras que en idioma guaraní se la llama "caá", es decir yerba superior a todas las otras (5) (14).

Las hojas de esta planta presentan varias denominaciones, como coca, cuca o ypadu en Perú y Bolivia; hayo o hayelo en Colombia, e ipadú o hayo en Brasil (1) (15).

En cuanto al nombre científico *Erythroxylum*, que designa el género al cual pertenece esta planta, deriva de dos palabras griegas que significan rojo y madera, aludiendo al color de la corteza (16).

Actualmente son reconocidas más de 250 especies; entre ellas 200 se encuentran en las zonas tropicales de Sudamérica (17). Los resultados obtenidos de los estudios efectuados a fin de detectar la presencia de cocaína en distintas especies y variedades, permiten concluir que sobre las 13 especies de *Erythroxylum* analizadas solamente se detecta

cocaína en las hojas de las especies *Erythroxylum coca* Lamarck (*E.coca* Lam.), *E.novogranatense* y *E.truxillense*.

En las Figuras 2, 3 y 4 se observa la planta de *E.coca* Lam. y sus distintas partes. En el caso de esta especie la primera referencia taxonómica la hizo Antoine Laurent de Jussieu en 1750 (18), y en la Tabla I se presenta dicha clasificación.

Descripción: (1) (19)

La *E.coca* Lam. es un arbusto de 1 a 3 metros de altura, muy ramoso, con la corteza pardo-rojiza y rugosa, portador de hojas aisladas, simples o estipuladas, de pecíolo corto, limbo entero, lanceoladas o aovadas, agudas en el ápice superior y provistas de un pequeño mucrón. Las dimensiones varían de 4 a 8 cm de largo y de 2 a 4 cm de ancho.

Las características histológicas de un corte transversal de la hoja muestran la epidermis superior, lampiña y sin estomas, recubierta de una cutícula bastante espesa, constituida por células poligonales aplastadas y regulares. La epidermis inferior, desprovista también de pelos, está compuesta de células poligonales con una protuberancia central que le dan un aspecto dentado particular y que alojan unos

cristales prismáticos de oxalato de calcio.

Las flores, poco vistosas, están dispuestas en número de dos o tres en la axila de las hojas superiores, son actinomorfas o radiadas y hermafroditas y pentámeras. Están constituidas por un cáliz de cinco sépalos amarillo-verdoso, concrecentes en la base y libres en el ápice. La corola, amarillo pálida, está formada por cinco pétalos libres, alternos con las divisiones del cáliz y que rodean diez estambres fértiles dispuestos en dos verticilos de filamentos blanco-verdosos y tres estilos terminados cada uno por un estigma en forma de cabezuela (19). El ovario es súpero, trilocular, y sólo con dos celdas fértiles. El fruto drupáceo, pequeño, rojo, monospermo, con pericarpio delgado, semillas con endospermo cartilaginoso y embrión con los cotiledones plano-convexos y la radícula corta dirigida hacia arriba (1).

La *E.coca* descrita por Lamarck en 1786 conforma una gran variedad en que las diferencias se deben sobre todo a condiciones de clima y cultivo, según Hegnauer y Fikenscher (1960) (20).

Dado que la hoja es la parte de mayor interés, se destacan las diferencias entre las especies y variedades productoras de cocaína:

- 1) *E.coca* Lam. sensu stricto var. *bolivianum* Burck, que

produce la coca de Huanuco (boliviana). Las hojas son grandes, coriáceas, de color verde oscuro y con un ápice agudo u obtuso.

2) *E.coca* var. *spruceanum* Burck (= *E.truxillense* Rusby), productora de la coca de Java y de la coca de Trujillo (peruana). Las hojas son más pequeñas, más angostas, más delgadas, y de un color verde más claro que las de la variedad anterior.

3) *E.coca* var. *novogranatense* Morris, de Colombia, que produce un tipo de coca de Trujillo. Se distingue de la variedad anterior por su ápice obtuso o emarginado (16).

#### Composición química

Las hojas contienen porcentualmente: dextrina 1,12%, azúcar 11,46%, clorofila 0,25%, almidón 36,19%, proteína fibrosa 7,80%, fibra cruda 28,57%, aceites volátiles 1,82%, cenizas 6,00%, agua 6 a 7% (5). Además se encuentran oxalato de calcio, una esencia aromática (0,60 a 1,30 g por kg), un aceite esencial (0,05 a 0,10%), en que el principal constituyente es un salicilato de metilo; alcohol metílico, dos taninos (ácido clorogénico y ácido cocatánico), dos heterósidos (cocacitrósido y cocafavósido), y además se han identificado un rutósido y un isoquecitróxido, y se han encon-

trado pequeñas cantidades de vitaminas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> y C (19) (20).

En cuanto al contenido en alcaloides, es de alrededor de 0,5 a 1,5%, representando la cocaína el 75% del total de alcaloides contenidos en las hojas de la coca de Bolivia. En la de Java el contenido en alcaloides es un poco superior, del 1,0 al 2,5%, pero la cocaína representa aproximadamente el 50% del total (21).

Los alcaloides se agrupan en tres tipos básicos: a) derivados de la ecgonina (cocaína, cinamilcocaína,  $\alpha$  y  $\beta$  truxillina); b) de la tropina (tropacocaína, valerina); y c) de la higrina (higrobina, cuscohigrina) (19) (22). Solamente los derivados de la ecgonina tienen importancia comercial.

La composición de la mezcla de alcaloides en la hoja varía cuali y cuantitativamente, de acuerdo con la variedad de la planta y en cierto grado con el estado de desarrollo de las hojas en el momento de la recolección (16). Incluso se ha observado que el contenido en cocaína decrece significativamente durante el almacenamiento (21).

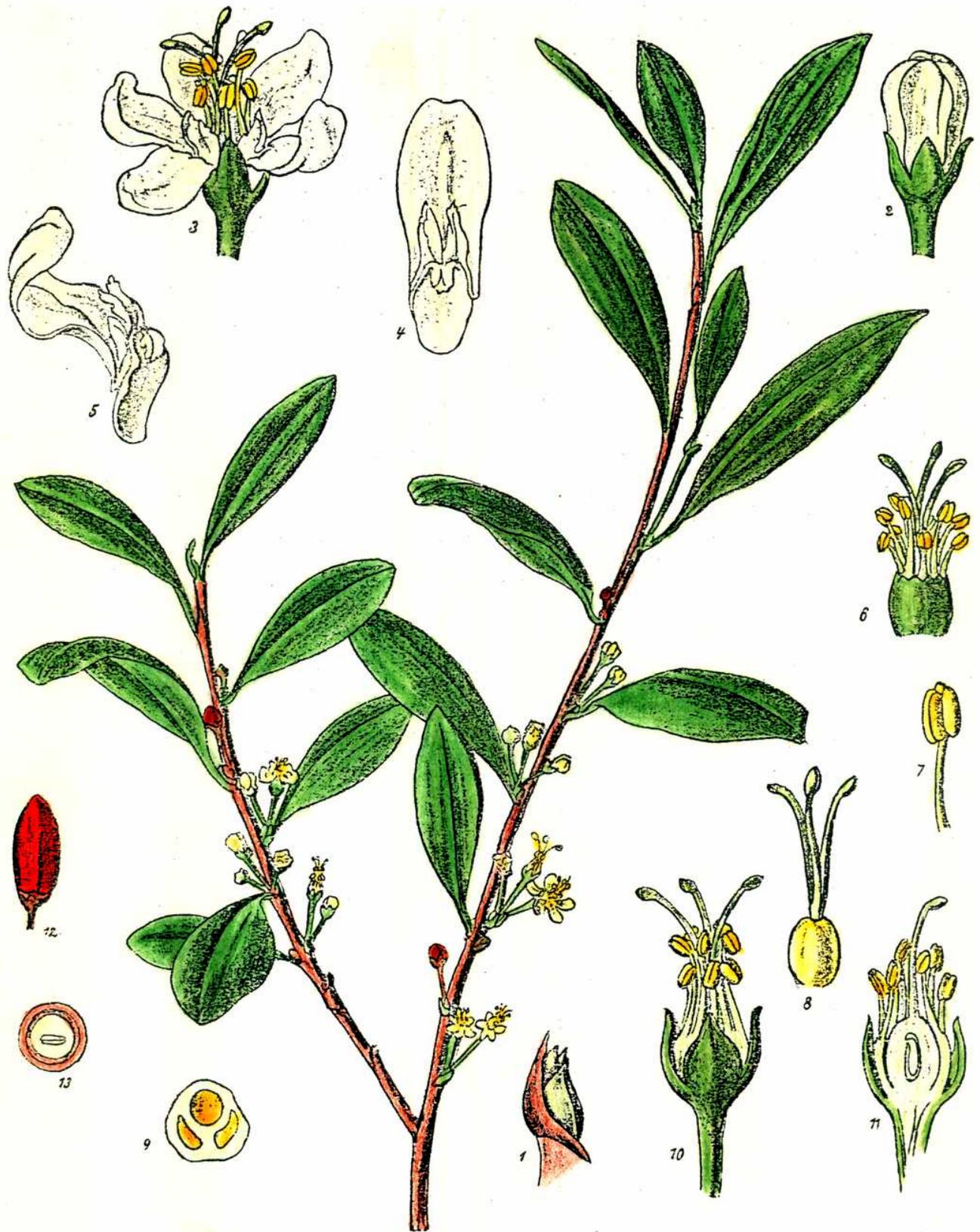


Figura 2: Planta de *E. coca* Lam.

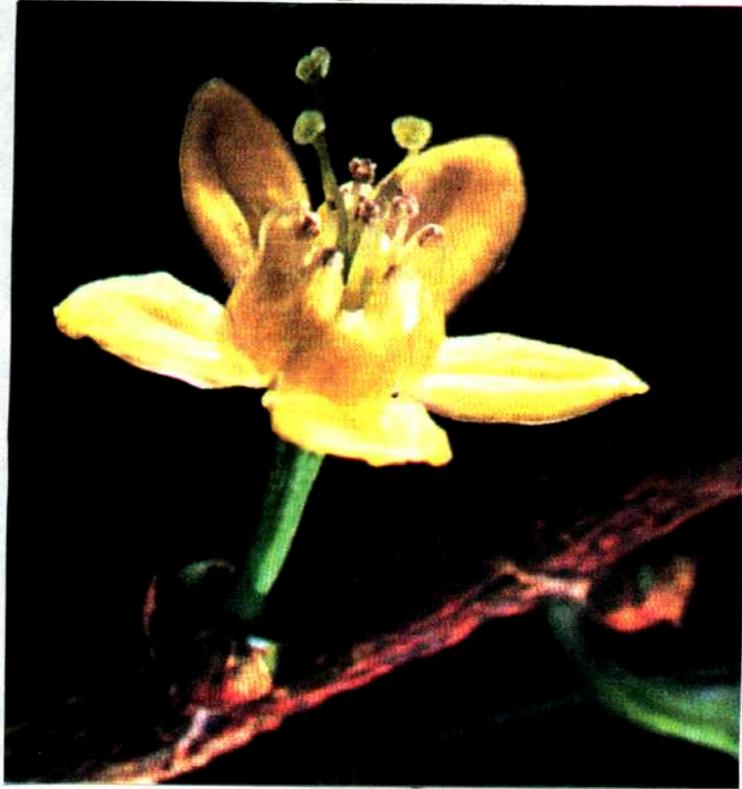
Descripción Figura 2

1	Estípula
2	Flor cerrada (capullo)
3	Flor
4	Pétalo, frente
5	Pétalo, perfil
6	Corola sin los pétalos
7	Estambre
8	Ovario con los estilos
9	Corte de ovario
10	Cáliz
11	Corte transversal del cáliz
12	Fruto
13	Transcorte de un nudo



Figura 3: Hojas y flor de la coca

(a)



(b)

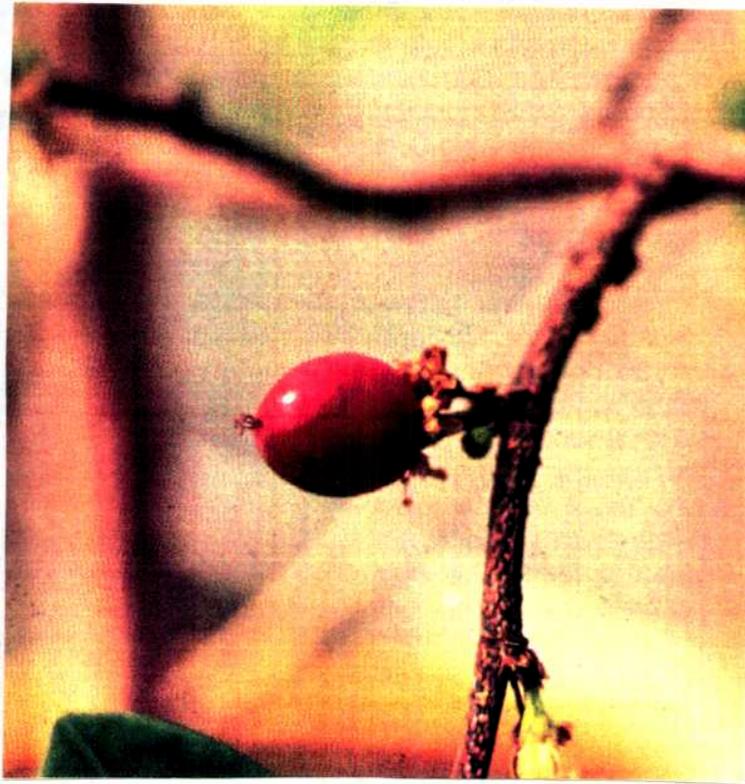


Figura 4: a) Flor de la coca; b) Fruto de la coca (cereza)

## T A B L A I

## TAXONOMIA

Filum	Espermatófitas (plantas con semillas)
Clase	Dicotiledóneas (arbustos y árboles)
Orden	Corolianos
Suborden	Geraniales
Familia	Erythroxyllaceae
Género	Erythroxyllum
Especie	Erythroxyllum coca Lamarck, Novograna- tense Morris y Truxillense

### III PRODUCCION, COMERCIO, TRAFICO ILICITO Y TENDENCIAS EN EL USO DE LA COCAINA

#### III.1 PRODUCCION Y COMERCIO

Los arbustos de coca que se cultivan intensamente en Bolivia y Perú y en menor escala en Ecuador, crecen en las vertientes de los valles en la cordillera de los Andes a una altitud comprendida entre los 500 y los 2.000 metros, en clima húmedo y cálido y en terrenos ricos en humus, o en regiones montañosas más secas de Colombia, a lo largo de la costa del Caribe; en Java, Formosa y Ceilán.

Las semillas se plantan en viveros y cuando los plántones están suficientemente fuertes se transplantan a largas terrazas denominadas "humachas" y construidas unas encima de otras como escalones de una escalera, cada una sostenida por un pequeño terraplén reforzado con piedras. Las plantas comienzan a producir al cabo de unos 18 meses, pero el desarrollo completo del matorral de coca ocurre alrededor de los 3 años, con una producción máxima a los 5 años. La recolección se realiza por lo general tres veces al año, en marzo, julio y octubre.

Los indios andinos arrancan las hojas maduras, que se secan de preferencia al calor artificial pero a temperatura

moderada, pues la desecación excesiva a los rayos del sol disminuye el contenido en alcaloides. Por ello se emplean cámaras cerradas de desecación, donde las hojas se extienden en un suelo de tierra apisonada. Una vez secas se almacenan en edificios secos y se embalan en sacos o bolsas de 30 kg para su comercialización.

Cada arbusto da por cosecha por lo menos un kilogramo de hojas (16) (19). Naturalmente, el rendimiento depende de muchos factores y variables ecológicas.

Con frecuencia se observa en las ramas de la coca una planta parásita, el "liquen", comprobándose que dicha infección provoca un aumento en el contenido de cocaína. Esto se debe a dificultades en la transpiración. El mismo incremento en alcaloides puede lograrse rodeando el tronco de la planta de coca con sacos de arpillera (19).

Las falsificaciones de la coca son raras, y además fáciles de descubrir; una posible adulteración por hojas de Jaborandi (*Pilocarpus microphilus* y *P. spicatus*) se detecta al efectuarse un estudio detallado de las características diferenciales de ambas hojas (19).

Una pequeña proporción de la producción de las hojas es utilizada como tal por los nativos o exportada legalmente a la Stepan Chemical Company de New Jersey, donde se extrae la cocaína para fines terapéuticos y el residuo se prepara

como aromatizante para la Coca-Cola (4).

La mayor parte, alrededor del 95% de la recolección anual, es convertida en cocaína, que ingresa en el tráfico ilícito (23). Se estima que durante 1987 fueron cultivadas entre 162.000 y 211.000 toneladas métricas de hojas de coca en la región andina, 59% tan sólo en Perú, considerado el mayor productor mundial de hoja de coca (24).

El cultivador de hojas peruano cosecha en promedio menos de una hectárea. Gran parte de esta tierra es marginal y no soportaría siembras sustitutas; es por ello que el ingreso potencial derivado del cultivo de este arbusto sobrepasa ampliamente el de cualquier otro. Las mismas características existen en Bolivia, segundo productor de coca, en especial desde 1980, cuando los precios del estaño, fuente principal de ingresos, disminuyeron considerablemente en el mercado mundial. Estas condiciones han contribuido a la expansión del cultivo de coca. Aproximadamente 200.000 campesinos dependen directamente de esta producción para obtener ingresos efectivos, y otros 100.000 participan en la elaboración y transporte de la droga.

Existen en Bolivia dos grandes áreas productoras de coca. La hoja producida en las Yungas, la región tradicional de cultivo del país, es la preferida por la población indígena para su consumo interno. La otra zona importante de

cultivo es un área nueva, la región del Chaparé, en el departamento de Cochabamba, que produce hojas más grandes, más resistentes y más ácidas, que tienen poca demanda entre los consumidores tradicionales. Se estima entre 60.000 y 80.000 ha. cultivadas en esta zona. En 1986 la producción fue de 132.400 t de hojas de coca (25).

Después de la recolección las cosechas ilegales deben ser transformadas en un producto comerciable. La elaboración del producto terminado comienza en sus tierras de origen y constituye una operación en tres etapas.

Las hojas se sumergen en diversas sustancias químicas, dando como resultado una pasta pardo oscura, llamada pasta de coca, que contiene 40 a 90% de sulfato de cocaína y otros alcaloides presentes en las hojas de coca, y contaminantes del proceso de extracción, como kerosene y ácido sulfúrico (26), lo que constituye la primera etapa. La segunda consiste en purificar la pasta para obtener la llamada base de coca, sustancia de color blanco sucio, casi inodora; y por último se pasa de la base al clorhidrato de cocaína, forma en la cual con mayor frecuencia se compra la cocaína en Occidente.

Las hojas de coca transformadas en pasta o base de coca en Perú y Bolivia, son exportadas en grandes cantidades de ambos productos para su mayor refinamiento en Colombia, y,

en menor grado, en Brasil. Se estima que Bolivia produce por año 765 toneladas de pasta de coca y que de esta cantidad exporta de 400 a 500 toneladas. Hasta hace muy poco la producción de pasta y base de coca en Bolivia era monopolio de intermediarios independientes, que suministraban las sustancias químicas necesarias y contrataban la mano de obra. Sin embargo, los campesinos están empezando a producir la pasta de coca, e incluso algo de base, por su cuenta. Este giro en la producción de pasta de coca, que la convierte en una empresa familiar o vecinal, es preocupante, pues aumenta las ganancias de los cultivadores y el número de personas que están dispuestas a oponerse físicamente a los esfuerzos de erradicación por parte del gobierno. Hay indicios recientes de que Perú y Bolivia también se están independizando en la producción de clorhidrato de cocaína y en la apertura de sus propios mercados. Se han descubierto en Perú algunos laboratorios perfeccionados que son capaces de producir entre 500 y 1.000 kg de base cada tres o cuatro días (24). Incluso se han tenido noticias de pequeños cultivos de coca en el noroeste de Brasil lindando con Colombia (27) y en Ecuador (24). A diferencia del procedimiento empleado en Perú y Bolivia, en Colombia se pasa por alto la etapa de la pasta, procesando la hoja de coca que se produce en el país para transformarla directamente en base de

cocaína. El método utilizado consiste en tratar las hojas con gasolina, lima, alcohol, amoníaco, permanganato de potasio y ácido sulfúrico. Esta base contiene 40 a 80% de sulfato de cocaína y aproximadamente 10 a 15% de cocaína pura (26).

Los laboratorios para producir la base son generalmente pequeños, un local rudimentario para elaborar la sustancia, y sirven a varios sembradíos que abarcan unas cuantas hectáreas. Esta base de cocaína elaborada localmente es transportada por río, en avionetas o por tierra hasta los laboratorios, donde es refinada para convertirla en clorhidrato de cocaína junto con cantidades mucho mayores de base importada del Perú y de Bolivia. Nadie sabe cuántos laboratorios de clorhidrato de cocaína existen en Colombia, pero la acción policial de ese país ha detectado desde abril de 1974 3.204 laboratorios, entre productores de la base y del clorhidrato. Estos últimos laboratorios suelen tener instalaciones más complejas y requieren luz, mesas de secado, generadores, acetona y éter. Se necesitan casi 12 kg de éter para transformar un kilogramo de base en un peso similar de clorhidrato de cocaína. La mayor parte del que se usa en Colombia procede de fabricantes europeos o brasileños y se introduce de contrabando desde Venezuela, Brasil o Ecuador. En 1986 la policía venezolana decomisó aproximadamente

2.600 kl de acetona y éter (24).

De acuerdo con la mayoría de los expertos en drogas, es axiomático que la adicción es producto de la abundancia; por ello sólo mediante acciones concertadas puede la comunidad internacional enfrentar el narcotráfico.

La erradicación de los cultivos es el medio más eficiente para reducir la oferta mundial de drogas ilegales. Esto puede llevarse a cabo manualmente o con herbicidas apropiados, desde equipos portátiles o aeroplanos. Actualmente los arbustos de coca deben ser arrancados a mano, ya que no se cuenta con un herbicida inocuo y efectivo, pero la erradicación manual es muy lenta y peligrosa, pues los trabajadores están expuestos a los ataques de los narcotraficantes.

Existen propuestas de sustitución de los cultivos; por ejemplo el Programa de Desarrollo Regional del Chaparé en Bolivia tiene por objetivo principal proveer a las poblaciones rurales de fuentes de ingreso y empleo distintas del cultivo y recolección de productos ilegales. El acuerdo se firmó en 1983; algunos agricultores se adhirieron a este programa debido a una fuerte caída en el precio de las hojas de coca como consecuencia de la "Operación Alto Horno", programa conjunto realizado en 1986 por los gobiernos de Bolivia y Estados Unidos, que localizaron y destruyeron

laboratorios de elaboración de cocaína, suprimiendo virtualmente la elaboración en Bolivia por espacio de tres meses. Esto provocó una baja de los precios a tal punto que la misma se volvió improductiva durante un tiempo (24).

En Perú la erradicación de los arbustos de coca ilegales comenzó en 1983, con un proyecto de erradicación y ejecución firmado en 1981 que tenía como objetivo la destrucción de una superficie estimada en 17.000 ha. de coca. Para mediados de 1984 casi 4.000 ha. de coca habían sido destruidas (28). En el programa de 1986 denominado "Operación Cóndor", desde el principio se logró destruir 169 pistas de aterrizaje y también 87 laboratorios de procesamiento (23).

Sin embargo, el Informe sobre Estrategia Internacional para el Control de Narcóticos emitido en abril 1988, denominó los últimos seis meses "una mezcla de progreso y algunas frustraciones". La principal fuente de frustración "se debe a que no existe una reducción del creciente cultivo de la coca en la zona andina" (29).

### III.2 TRAFICO ILICITO

El consumo de la cocaína, que hasta hace 15 años era un problema relativamente menor comparado con otras drogas como el opio y la marihuana, ha pasado a ser en la actualidad una gran amenaza a la salud pública internacional, al orden interno y a la seguridad nacional de los países productores y traficantes.

El creciente interés por la cocaína, principalmente en los Estados Unidos y Europa a partir de la década del 70, está relacionado, por un lado, con la simple experiencia hedonista, debido a las características de esta droga, considerada el estimulante más poderoso de origen natural (30) (31), y por el otro a interacción de múltiples factores sociales, económicos y políticos.

Como se ha mencionado, el tráfico ilegal comienza en las laderas orientales de los Andes, donde se cultivan y cosechan las plantas de coca. El comercio mundial de cocaína sigue estando dominado por narcotraficantes colombianos que participan en todas las etapas de producción de la droga, siendo su fuerte la elaboración final y la distribución internacional del clorhidrato de cocaína.

En los últimos años Brasil ha adquirido importancia en el tráfico sudamericano. Varios grupos de traficantes boli-

vianos han participado en operaciones de refinamiento de cocaína cerca de los límites con Brasil, dado que lograban facilidades en la obtención de productos químicos necesarios para dicho fin en este país.

Las principales rutas de tráfico (Figura 5) que se inician en los países productores, como Perú, Bolivia y Colombia, involucran a países considerados inicialmente de tránsito, como la Argentina, Brasil y México, para finalizar en los grandes consumidores, como Estados Unidos y Europa. En Argentina la acción conjunta de las fuerzas de seguridad nacional y algunos organismos internacionales ha detectado e identificado cuatro rutas principales de entrada al país (Figura 6). La mayor parte de la droga ingresada se integra a la red internacional.

La cocaína viene en dos formas: la más común el clorhidrato de cocaína, llamado "coca callejera", en forma de polvo que si es puro es blanco cristalino, parecido al azúcar, pero que en general está diluido.

Debido al alto costo de la droga los traficantes adulteran la cocaína con otras sustancias, llegando ésta a los usuarios con una pureza del 30 al 95%. Los análisis de la droga de la calle demuestran que los diluyentes más comunes incluyen varios azúcares (manitol, lactosa y sacarosa), cafeína, fenilpropanolamina, inositol, manitol (30), anfeta-

minas y anestésicos locales, entre estos últimos el más común la lidocaína (31). La mezcla de cocaína-lidocaína en una relación 61:39 ha sido determinada por cromatografía gas-líquida y se la conoce por "rock-cocaína" (32).

La otra forma es la base libre, que se fabrica convirtiendo químicamente el clorhidrato de cocaína de la calle en una sustancia purificada. En el pasado esta transformación se lograba procesando el clorhidrato con éter, un solvente altamente inflamable. En los Estados Unidos se vende un instrumento denominado tubo base para transformarla en base libre mediante calor, inhalándose sus vapores (4) o bien fumándose en una pipa, o añadiéndose a un cigarrillo. La base libre también se presenta en forma de hojuelas (33) (34).

En los últimos años se ha popularizado en varias partes de los Estados Unidos el uso de una forma pura de cocaína conocida con el nombre de "crack" (35). Se trata de una nueva técnica de comercialización de la base libre, que se prepara mezclando el clorhidrato de cocaína con bicarbonato de sodio y calentando (26). El producto, no obstante, contiene algunas impurezas presentes en la cocaína original, junto con un exceso de bicarbonato de sodio. El calentamiento de esta mezcla para vaporizarla y fumarla origina un sonido crepitante, lo que ha dado lugar a su denominación de

"crack" (36).

Los traficantes lo venden en piezas que se asemejan a pequeños granos blancos denominados "rocas" (34); es fácil de usar, fácil de ocultar, menos costosa, y causa tal adicción que garantiza su mercado.

Si bien el clorhidrato de cocaína cuesta aproximadamente 2.000 a 2.500 dólares la onza (28.34 g) (27), o sea cinco veces más que el oro, la dosis de "crack" entre 65 y 100 mg se vende a un precio de entre 5 y 20 dólares. De este modo puede ser adquirida fácilmente por muchos consumidores, entre ellos los estudiantes más jóvenes e incluso los del nivel elemental (34) (35).

En Sudamérica los traficantes venden cigarrillos de pasta de coca mezclada con marihuana o tabaco, que pueden adquirirse en las calles de algunas ciudades bolivianas por apenas 50 centavos de dólar, y el clorhidrato de cocaína se vende aproximadamente a un 20% del precio al cual se ofrece en la calle en los Estados Unidos. Los cigarrillos se conocen con el nombre de "basuco" en Colombia y Perú y "piti-lllo" en Bolivia (26).

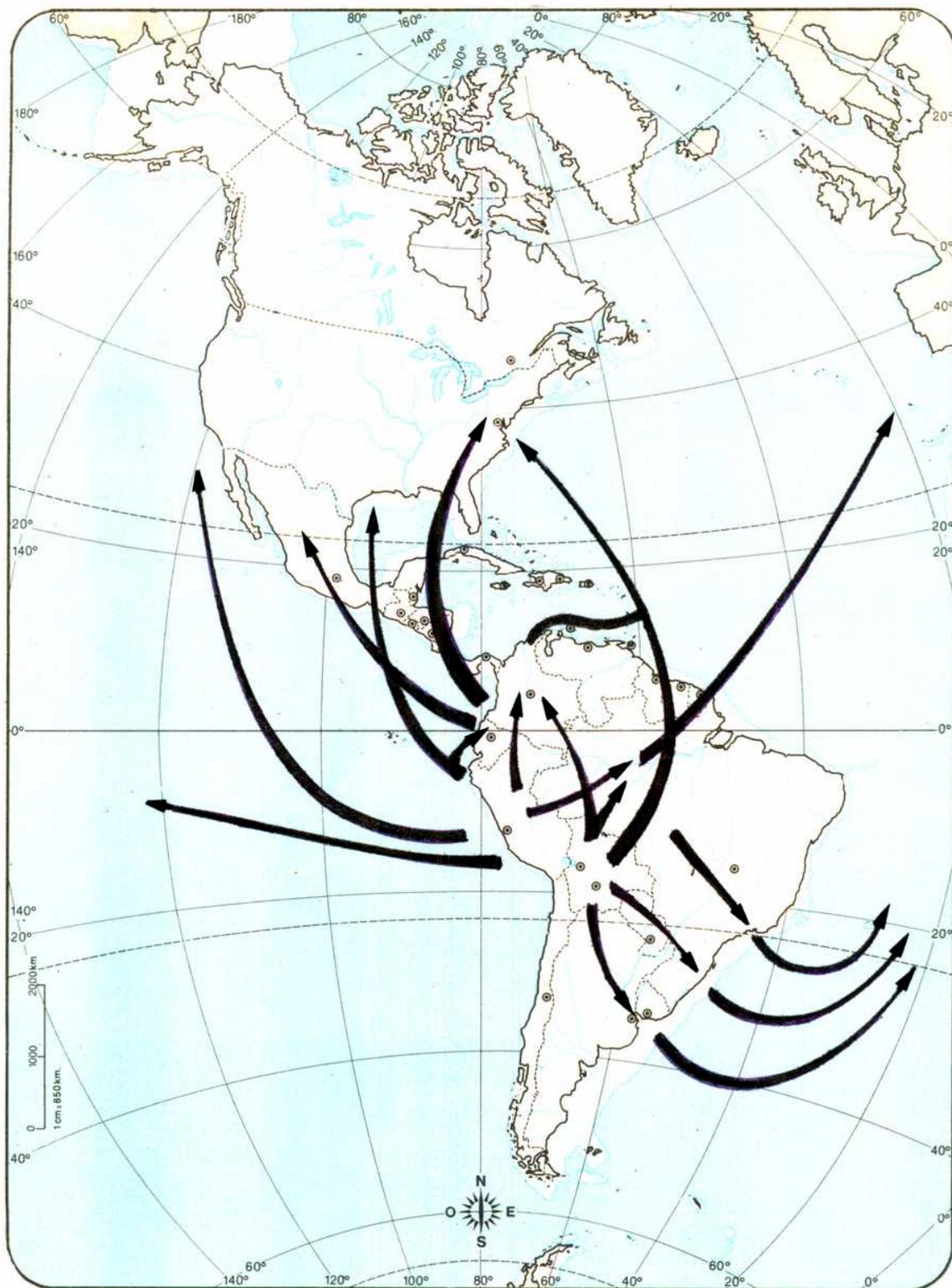


Figura 5: Principales rutas del tráfico ilícito de la cocaína

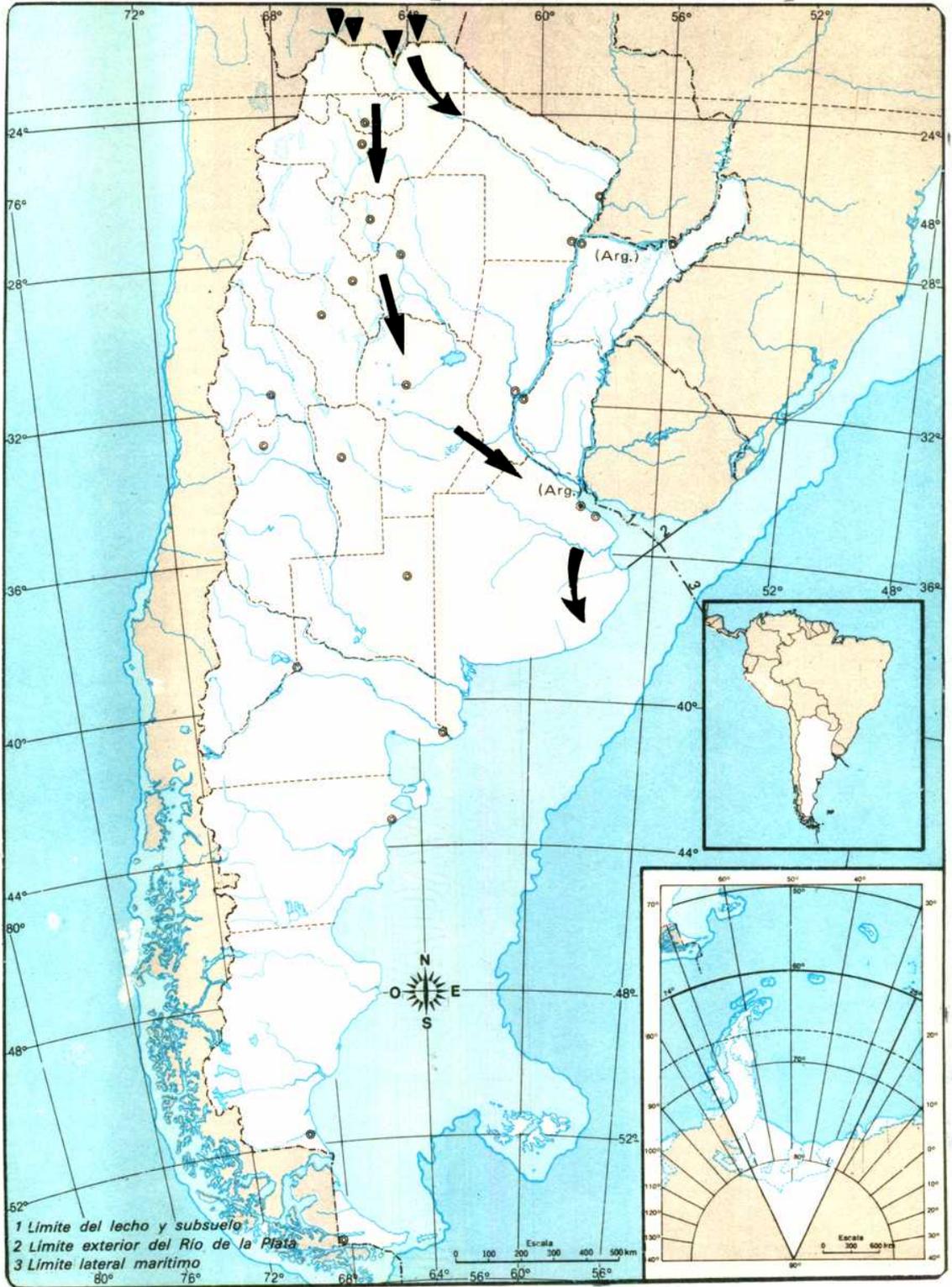


Figura 6: Rutas de ingreso a la Argentina de las hojas de coca y de la cocaína

### III.3 TENDENCIAS DEL USO DE LA COCAINA

El aumento o disminución de la preferencia de una determinada droga a nivel mundial, regional o de países, se puede evaluar teniendo en cuenta las confiscaciones por aplicación de la ley y el consumo en la población. Por supuesto, ambos parámetros tienen diversas variables y por lo tanto se toman sólo como indicadores no absolutos. Por ejemplo, el aumento en la cantidad de droga incautada puede ser consecuencia de un mayor tráfico ilegal o bien un mayor celo de las autoridades en el cumplimiento de la ley.

Según un informe divulgado en enero 1985 por la Junta Internacional de Control de Narcóticos de la Organización de las Naciones Unidas, "dondequiera que exista cultivo, producción y tráfico ilícito el abuso de estas sustancias entre la población local casi siempre es la consecuencia. Esto explica la expansión geográfica del abuso de las drogas más allá de los pocos países que fueron antaño los principales centros de ese abuso. El hecho es que muy pocos países no se ven afectados" (28).

Se ha observado un marcado incremento en los últimos años del consumo de pasta de coca y clorhidrato de cocaína en Argentina, Bolivia, Brasil, Colombia, Ecuador, Perú y Venezuela.

El surgimiento de un elevado consumo de pasta de coca en Bolivia ilustra la forma en que un país puede pasar de la producción a la drogadicción.

Durante los años 70 Bolivia casi no tenía drogadictos, aunque producía grandes cantidades de hoja de coca. Sin embargo, a los trabajadores que producen la pasta de coca, la base o el clorhidrato de cocaína, suelen pagarles con una porción y con dinero; así la mayoría son adictos y no abandonan sus hábitos cuando regresan a sus ciudades, pueblos y aldeas. Igualmente, a los contrabandistas de las sustancias químicas que se emplean en la elaboración se les paga con la droga, la que llevan a los centros urbanos para vender. Esto ocurre en un país que cinco años atrás decía tener un problema mínimo de drogadicción.

En una investigación realizada en ese país en 1986 se observó que las sustancias de mayor consumo eran la marihuana, con 38,7%, y la pasta básica de cocaína, con 37,6%, y el clorhidrato de cocaína, con 6,4%.

En Perú en 1985 el número de adictos a psicotrópicos en las ciudades de Lima y Callao era de 60.000, y se calculó que de éstos 80% eran adictos a la pasta básica de cocaína (basuco).

El consumo de cocaína ha sido desplazado por el basuco en Colombia; en las zonas urbanas 81.246 personas lo consu-

men, mientras que 31.207 prefieren la cocaína (25).

En 1985 se confiscaron a nivel mundial 56,3 t de cocaína, lo que casi igualó la cifra sin precedentes de 59,4 t en 1984.

En general la mayoría de los países de América informaron acerca de incrementos tanto en el consumo como en la confiscación (Tablas II, III, IV).

México, como país utilizado como vía de acceso a los Estados Unidos de la producción de cocaína procedente de la región andina, no escapa a esta situación, ya que a pesar de que la mayor parte de estas sustancias están destinadas a otro mercado, una porción permanece en el país. El incremento de la cantidad que pasa se puede comprobar en las estadísticas de la campaña contra el narcotráfico: entre 1975 y 1984 se decomisaron 2.303,5 kg, y en 1988 un total de 13.791,1 kilogramos (37).

La cocaína se emplea indiscriminadamente en los Estados Unidos y en mucho menor escala en Canadá, pero el acontecimiento más alarmante ha sido la entrada en escena del "crack". En la encuesta domiciliaria nacional sobre farmacodependencia que indica el número de usuarios de cocaína en los Estados Unidos, definido como las personas que usaron la droga durante el mes anterior a la encuesta, dicho número aumentó de 4,2 millones en 1982 a 5,8 millones en 1985,

pero en 1988 bajó a 2,9 millones. El número de personas que declararon haber aspirado o haberse inyectado la droga o fumado "crack" durante el año anterior a la encuesta fue de 11,9 millones en 1982, 12,2 millones en 1985 y 8,2 millones en 1988.

Se puede observar (Figura 7) que las tendencias en el uso de la cocaína varían con la edad, siendo mayor éste entre los 18 y los 25 años (24) (35). Actualmente el consumo de la droga se halla muy difundido en Europa y sigue en aumento en algunos países. Las tendencias observadas en 1986 indican un nuevo ascenso, particularmente en Francia, Alemania Occidental e Inglaterra. La Aduana inglesa informa que en 1987 las incautaciones de cocaína sobrepasaron a las de heroína. Italia, España y Portugal también informan un alza en las confiscaciones durante ese año (24).

En nuestro país, según datos suministrados por la Policía Federal Argentina (Tabla V), la cantidad de droga confiscada y el número de procedimientos realizados en los últimos años indican un incremento marcado; si bien la cantidad de cocaína confiscada en 1985 fue menor, en los 11 meses siguientes de 1986 se observa una cifra ocho veces superior.

Un cuadro comparativo (Tabla VI) entre clorhidrato de cocaína y otras drogas sugeriría que el primer puesto en

cuanto a droga incautada le corresponde a la marihuana; sin embargo, hay que tener en cuenta que de 1 kg de marihuana se obtienen unas 10.000 dosis, mientras que 1 kg del clorhidrato de cocaína equivale a 50.000 dosis; de ahí que realizando los cálculos se concluye que la prevalencia resulta similar.

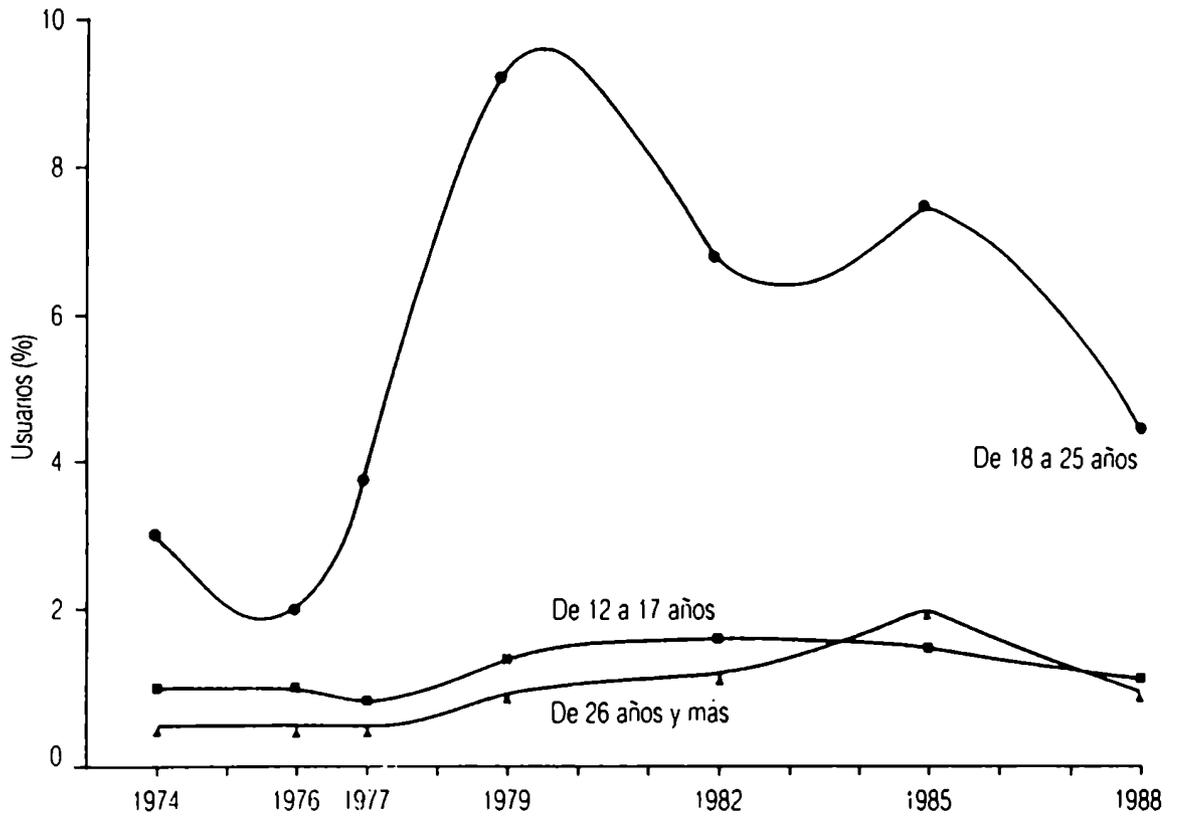


Figura 7: Tendencias del uso de cocaína por grupos de edad

T A B L A I I

CONSUMO DE COCAINA POR PAISES 1985-1987

peso en toneladas métricas

cocaína/hojas coca	1985	1986	1987
Bolivia (hojas coca)	10.000	10.000	10.000
Colombia	3	2	2
Perú (cocaína)	0,01	0,01	0,02
Perú (hojas coca)	10.000	10.000	10.000

T A B L A I I I  
 CONSUMO DE COCAINA EN LOS ESTADOS UNIDOS  
 peso en toneladas métricas

	1982	1985
cocaína	31	72

T A B L A I V  
 COCAINA INCAUTADA EN LOS ESTADOS UNIDOS 1981-1987  
 peso en kilogramos

	1981	1982	1983	1984	1985	1986	1987
cocaína	1.872	4.946	7.569	11.763	24.637	27.161	37.148

## T A B L A V

## COCAINA INCAUTADA EN LA ARGENTINA 1981-1986

peso en gramos

año	número de procedimientos	cantidad incautada
1981	110	4.662
1982	96	7.096
1983	94	34.449
1984	63	84.170
1985	127	30.622
1986	2.526	244.656

## T A B L A V I

## DROGAS INCAUTADAS EN LA ARGENTINA 1986

peso en gramos

marihuana	1.183.202
clorhidrato de cocaína	244.656
psicofármacos Lista II	19.206
opio	601
morfina	40
LSD	573 dosis

#### IV COCAISMO Y COCAINISMO

Muchos investigadores se han abocado al estudio de los diversos aspectos que involucran el coqueo o cocaísmo (mascado de las hojas de coca ya descrito en el capítulo I) y el consumo de la cocaína, principalmente por inhalación (cocaínismo), y han intentado compararlos.

La cocaína, también conocida en el submundo de la droga como coca, C, nieve, soplo, pitazo, copos, etc., es hoy la droga de moda, elegante, costosa, placentera, cuyo tráfico ilícito la ha convertido en importante mercancía internacional.

Es el prototipo de la droga estimulante, capaz en altas dosis de provocar una excitación eufórica y experiencias alucinatorias. En razón de estas propiedades la cocaína es muy apreciada por los usuarios experimentados en drogas (38).

La forma de administración más generalizada consiste en aspirar por la nariz con ayuda de un canutillo de papel el clorhidrato de cocaína finamente pulverizado, que se ha dispuesto en varias hileras sobre una superficie lisa. Una aspiración por cada fosa nasal provoca en cuestión de minutos sensaciones placenteras, de clarividencia y fuerza mental, que suelen alcanzar el punto máximo en un lapso de 15 a 20

minutos. A decir de sus adeptos, la cocaína es seductora y relativamente inofensiva. No produce malestar ni cáncer pulmonar, ni picaduras en los brazos, ni células cerebrales destruidas. Al contrario de drogas como el LSD y la heroína, la cocaína tiene la equivocada reputación de no ocasionar efectos secundarios (30).

Sin embargo, debido al corto efecto de la droga y al hecho de que después de ese vuelo experimenta una sensación de sopor, depresión y fatiga, que ha dado en llamarse "la tristeza de la cocaína", el sujeto debe realizar una docena o más de inhalaciones por día para mantener la impresión placentera.

Esta droga se caracteriza por una fuerte tendencia por parte de los consumidores a seguirla usando, es decir es productora de dependencia psíquica comprobada y de posible dependencia física, dado que el uso prolongado de sustancias adictivas produce cambios físicos en el sistema nervioso que contribuyen al ansia vehemente (28); además la tolerancia a la droga se desarrolla con rapidez (34). Dado que la cocaína es de corta acción y rápido metabolismo, pueden administrarse grandes cantidades en períodos relativamente cortos. Se ha dado el caso de adictos que han consumido hasta 10 g en un día, siendo la dosis letal de aproximadamente 1,2 g para la mayoría de los individuos, si se ad-

ministra de una sola vez (33).

En comparación con la administración oral, la absorción por vía nasal es mucho más rápida, apareciendo los efectos subjetivos más tempranamente (39) (40) (41).

La preferencia por la ruta nasal sugiere que el grado de aumento en los niveles tisulares, especialmente en el cerebro, es un factor importante para el usuario de cocaína. Debe tenerse en cuenta que la concentración de cocaína plasmática no necesariamente indica los niveles presentes en los distintos órganos. La vascularidad presente en la región nasofaríngea puede ocasionar un incremento en los niveles cerebrales sin que esto se refleje en las muestras de sangre venosa. Asimismo la droga tiende a contraer los vasos sanguíneos cuando se aplica tópicamente, provocando en el consumidor un deterioro del tejido nasal, presentando frecuentemente el aspecto de "nariz rota", roja, infiltrada, eczematosa (42), con ulceraciones de la membrana mucosa (34).

La cocaína puede ser inyectada por vía subcutánea, intramuscular o venosa. La primera de estas vías se caracteriza por una tardía aparición de los efectos, como es de suponer en comparación con la venosa, en parte debido al fenómeno de vasoconstricción capilar, que provoca una absorción relativamente menor. La vía intravenosa resulta ser una práctica mucho más peligrosa, y los efectos que provoca están re-

lacionados tanto con la dosis como con la velocidad de la administración (43) (44) (45) (46).

Cuando la inyección es rápida, los efectos subjetivos y fisiológicos aparecen dentro de los 30 segundos y luego disminuyen relativamente rápido, lo que provoca en algunos usuarios una administración frecuente, a intervalos de hasta 10 minutos, con el fin de buscar sensaciones más intensas. Por supuesto, la absorción en estos casos es del 100%.

Otra nueva técnica de consumo es por absorción a través de los pulmones, fumando la sustancia alcaloide denominada base libre o "crack". Los amantes de esta técnica argumentan que les permite obtener un efecto más intenso con menor cantidad de droga, y ello se debe a que es la forma más directa, rápida y efectiva de llevar la droga al cerebro (44) (47).

Los alvéolos pulmonares ofrecen una importante área para la absorción de la cocaína volatilizada. Otro factor a tener en cuenta es el tiempo de circulación entre la zona de contacto de la droga y el cerebro; en el caso del fumado, entre los pulmones y el cerebro es de 8 segundos, mientras que en el caso de una inyección intravenosa en el brazo es de 16 segundos.

Empleando esta vía, el derrumbamiento y una ávida demanda son más intensos que en el caso de la aplicación intra-

nasal. Debido a que llegan al cerebro cantidades mayores con mayor rapidez, los riesgos asociados con la cocaína aumentan. Entre ellos figuran cambios rápidos en la percepción, confusión, dificultad en el habla, ansiedad y, con el tiempo, depresión, angustia, graves problemas psicológicos y, por supuesto, el aumento de la dependencia.

El fumado de la base libre o "crack" compromete también el sistema respiratorio, debido a la vasoconstricción producida por la cocaína, esta vez a nivel pulmonar.

Especialmente el fumado o la inyección de cocaína pueden conducir a un consumo continuo y a una incesante demanda de la droga, que involucran un comportamiento destructivo de la integridad de la persona.

Como se mencionó, en América del Sur los jóvenes de las ciudades fuman la pasta de coca, que a pesar de tener menor contenido de cocaína posee contaminantes, tales como residuos del kerosene y el ácido sulfúrico, que pueden aumentar el daño pulmonar (26).

La relativa baja popularidad del empleo de la vía oral en los adictos corrientes es curiosa. A pesar de que los efectos subjetivos máximos tardan un poco más en aparecer, algunos autores no han encontrado mayores diferencias con los que se observan tras la administración por vía intranasal, mucho más divulgada (39) (40). Se ha argumentado que

la toxicidad aguda de la cocaína podría ser bastante diferente, considerablemente menor, en el caso de ingerirla por vía oral o por mascado de las hojas que si es administrada por cualquiera de las otras vías más populares (48).

El coqueo o mascado de las hojas de coca es un hábito cuyo fin no es tanto provocar estados eufóricos sino obtener efectos dinamógenos (2) en regiones donde es necesario paliar los inconvenientes suscitados por la vida en las grandes altitudes. A los individuos que practican el coqueo se les llama coqueros.

El mascado de las hojas de coca es la única costumbre que el indígena ha conservado incólume, sobreviviendo a su civilización, su idioma e incluso sus antiguas creencias. Este hábito ha generado controversias sobre su aceptabilidad desde 1567 (Reunión Conciliar de la Iglesia en Lima), originando dos posturas diametralmente opuestas: una que lo considera un vicio, que por lo tanto hay que erradicar, y la otra que afirma que es un hábito arraigado y justificado en determinadas regiones andinas.

Teniendo en cuenta que la cocaína se absorbe rápidamente cuando ingresa al organismo por vía oral (39), y además que después de una hora de mascado los coqueros experimentan una estimulación fisiológica similar a la observada en los adictos por otras vías de ingreso de la cocaína, algunos

autores (49) (50) (51) consideran que el problema es uno solo.

Sin embargo, el deseo insaciable de la droga, la paranoia y el deterioro mental característicos del adicto a la cocaína no son observables en el comportamiento de los coqueros en su vida diaria (15), aunque otro autor (5) consigna el daño físico general producido por el mascado de las hojas. Teniendo en cuenta que un coquero consume diariamente un promedio de 50 g de hojas de coca, y que el contenido en cocaína es de aproximadamente 0,7%, resulta una ingesta de 350 mg repartida en tres tomas. Si esta cantidad fuera completamente absorbida produciría una gran estimulación cortical e incluso efectos tóxicos, dado que la dosis mencionada excede a la que un drogadicto aspira por vía nasal. Como no se observa ninguno de los síntomas antes mencionados, resulta obvio suponer que algo le ocurre a la cocaína ingerida.

En los coqueros se ha observado que la cocaína sufre un complejo proceso metabólico e hidrolítico. La "ilipta", sustancia alcalina que se adiciona a las hojas, libera el alcaloide (52) a su estado básico y produce, junto con la saliva, la hidrólisis de la cocaína, continuándose este proceso a lo largo del tracto gastrointestinal (53). Esto provoca que la cantidad de droga intacta que llega al sitio de ac-

ción sea significativamente menor que la que ingresa por otras vías, habiéndose estimado que se absorbe tan sólo un 20% (44).

Para poder obtener una mejor perspectiva de las implicaciones fisiológicas y culturales del uso de las hojas de coca por los nativos, se detallan algunas experiencias. J.Hanna y C.Hornick (53) llevaron a cabo un estudio en la ciudad de Numoa en el sur del Perú. Resumiendo sus conclusiones puede decirse que la ingestión oral produce una leve vasoconstricción que redundará en una pérdida reducida de calor en las extremidades y una temperatura rectal más alta comparada con la de un no usuario, así como un ritmo cardíaco aumentado. En cuanto a la mayor resistencia física frente a un trabajo muscular, pudo comprobarse un leve aumento.

De lo anterior se infiere que el uso de la coca entre los indios es fisiológicamente aceptable en términos de adaptación al hambre, el frío y la fatiga en las altas planicies, donde además el trabajo duro y una dieta marginal son comunes. Así se justificaría la correlación entre el uso de la coca y la altitud, ya que a 5.000 metros el masclado es prácticamente universal, a 1.600 metros se observa en menor proporción, y a nivel del mar es casi nulo.

También se han llevado a cabo estudios integrales de la composición de las hojas, comprobándose que las mismas con-

tienen compuestos tales como tiamina, riboflavina, carotenos, hierro y calcio.

Mediante un trabajo realizado en monos Rhesus a los que se les privó de alimentos, se pudo verificar que cierto porcentaje en la disminución de alimento determina un incremento de la autoadministración de cocaína, mientras que un retorno a las condiciones de alimentación normales produce un correspondiente decrecimiento en el propio suministro de la droga (54). De hecho ha podido comprobarse que los nativos abandonan voluntariamente el hábito cuando se trasladan a zonas urbanas y al tener acceso a una mejor alimentación (53).

En consecuencia, si los pobladores del altiplano emplearan solamente las hojas de coca como fuente de nutrientes, el problema tendría una solución bastante sencilla. Sería factible mejorar las condiciones alimentarias y proveer dichos nutrientes. Frente a todos estos aspectos el más importante y difícil de resolver es, sin embargo, el impacto económico negativo que implicaría la completa erradicación de los cultivos, ya que comunidades enteras tienen como principal fuente de ingresos la comercialización de las hojas de coca. Estas áreas, como ya se mencionara, se encuentran circunscriptas a zonas de Perú y Bolivia que por condiciones climáticas y geográficas son aptas para su cultivo, siendo

en cambio imposible en ellas el desarrollo de otras actividades agrícolas. La comunicación es limitada debido a lo escabroso del terreno, pero sin embargo existe toda una red de comercialización en la cual las hojas de coca tienen un papel destacado, ya que pueden funcionar como un sustituto de la moneda: incluso los salarios son pagados en coca. El celo en los esfuerzos por erradicar su cultivo lleva irremediabilmente a diversos países a tomar decisiones unilaterales.

A fines de 1953 el Comité de Expertos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) dio a conocer su dictamen: "aunque la cantidad de cocaína absorbida en la masticación varía mucho, se puede considerar como una forma de toxicomanía".

Esto surge al tener en cuenta el aspecto más controvertido, que es sin lugar a dudas que de las hojas de coca puede extraerse la cocaína, punto de partida del tráfico ilícito, al trascender las fronteras de los países productores y poner al descubierto las facetas más oscuras de la política y la economía.

## V ACCION EN EL ORGANISMO

### V.1 ABSORCION Y DISTRIBUCION

Si bien algunos parámetros importantes, como los niveles de la droga en sangre, la unión a proteínas, el tiempo de vida media, la distribución en los tejidos y la eliminación del organismo, han sido determinados, es la gran variabilidad de los datos publicados lo que lleva a suponer que algunos de dichos parámetros aún no se hallan totalmente esclarecidos.

Como se ha mencionado anteriormente, las vías de ingreso son varias, en forma de clorhidrato la cocaína se absorbe fácilmente a través de las membranas mucosas y entra así en la corriente sanguínea; los cristales también se disuelven y absorben fácilmente en el tracto gastrointestinal (aunque esta vía no es común). Puede introducirse por vía intravenosa o absorberse a través de los pulmones.

La calidad e intensidad de los efectos psicotrópicos de la cocaína varían con la vía de administración, aparentemente debido a diferencias en la cinética de la absorción y velocidad para alcanzar el pico de máxima concentración en sangre o cerebro (55). Además hay que tener en cuenta que los efectos farmacológicos asociados con una dada concen-

tración de la droga son mayores durante la parte ascendente de la curva de concentración plasmática en función del tiempo que cuando las concentraciones están bajando (43).

Por ello la vía elegida por los investigadores varía: algunos prefieren la administración intravenosa o intraperitoneal (en el caso de los roedores) a fin de asegurarse la completa absorción de la cocaína y referir los resultados a una cantidad conocida de la droga; otros emplean la aplicación nasal, a fin de disponer de un mayor tiempo para el estudio. En todos los casos se ha intentado correlacionar los efectos subjetivos y fisiológicos de la cocaína con su concentración en plasma.

Cuando se administra una dosis por inyección intravenosa, como es de esperar los valores de concentración máxima en sangre se alcanzan casi inmediatamente y luego van disminuyendo a lo largo de un período de entre 45 y 90 minutos (4). Sin embargo, los efectos tanto fisiológicos como cardiovasculares, que presentan su punto máximo alrededor de los 5 minutos, desaparecen levemente más rápido que los de la cocaína en plasma, que lo hacen dentro de los 30 minutos (43) (56).

El fumado provee una efectiva absorción y la cocaína alcanza rápidamente el pico de máxima concentración en plasma, con los efectos subjetivos y fisiológicos similares a

la vía intravenosa; los efectos eufóricos no duran más de 20 minutos (57).

En la administración nasal el pico máximo en plasma aparece alrededor de los 35 a 57 minutos, pero los efectos aparecen entre los 15 y 20 minutos, decreciendo más rápidamente que la concentración en sangre. Esta diferencia en la correlación es más notoria en este último caso (41) (57) (58).

Por vía oral, en un estudio realizado suministrando cocaína en cápsulas de gelatina, se observó que la concentración en sangre alcanza un valor máximo entre los 57 y 65 minutos, desapareciendo de dicho fluido biológico casi a la misma velocidad que la de la inyección intravenosa (41) (59). En este caso los efectos subjetivos tardan más en aparecer que por la vía nasal. Es probable que las diferencias observadas entre los efectos fisiológicos y subjetivos y la máxima concentración en plasma se deba a que éstas no reflejen los niveles de la droga en cerebro y que en realidad sean éstos los más importantes para la producción de los efectos.

Como se sabe, la cocaína es soluble en lípidos y atraviesa fácilmente la membrana celular, contribuyendo al rápido pasaje de la barrera sangre/cerebro (60); esto justificaría que la droga pudiera alcanzar en cerebro niveles de concen-

tración mayores que los plasmáticos, produciendo en ese momento los efectos psicofísicos más altos.

De los numerosos estudios llevados a cabo para determinar la distribución de la cocaína en los distintos tejidos, tanto en animales de experimentación como en los provenientes de autopsias en humanos, a pesar de las diferencias obtenidas se pueden confirmar algunos datos. Se ha demostrado que la concentración en cerebro es mayor que en sangre y que el orden decreciente de concentraciones en los distintos tejidos sería: riñón = bazo > cerebro > corazón = músculo esquelético > pulmón > sangre > hígado > tejido adiposo (61).

## V.2 METABOLISMO

### V.2.1 GENERALIDADES

Todos los seres vivos están expuestos a los efectos de una infinidad de sustancias químicas de origen natural o sintético que son extrañas a su organismo (xenobióticos).

En general, los compuestos de naturaleza más lipofílica son rápidamente absorbidos a través de las distintas vías de ingreso. Por lo tanto, una exposición constante podría conducir a su acumulación. Sin embargo existen procesos de biotransformación o transformación metabólica por los cuales una sustancia química se convierte en otro compuesto derivado (metabolito) más polar y/o hidrosoluble.

Este aumento en la solubilidad en agua del metabolito reduce su capacidad para la partición dentro de las membranas biológicas, y por ende restringe la solubilidad en los variados tejidos, disminuye la reabsorción renal e intestinal del o los metabolitos, y finalmente promueve su excreción por las rutas urinaria, biliar y fecal. Existe un número de enzimas en los organismos animales comprometidas en estos procesos de transformación de los xenobióticos liposolubles en sustancias más hidrosolubles. Usualmente estas transformaciones tienen lugar en mayor escala en el hígado,

encontrándose las enzimas en la fracción soluble, microsomal y mitocondrial de las células. En menor grado se encuentran enzimas con capacidad metabólica en las células del tracto gastrointestinal, riñón, placenta, pulmón y sangre. Hay que tener en cuenta que para un compuesto químico dado o para una determinada vía de ingreso otros órganos pueden también desempeñar un rol metabólico, incluso más importante que el hígado.

Las reacciones enzimáticas pueden ser de dos tipos: de fase I o de fase II.

Las reacciones de fase I tienen por objeto la introducción de grupos más polares y por lo tanto involucran reacciones de hidrólisis, oxidación, reducción. Las reacciones de fase II son reacciones de biosíntesis en las cuales el compuesto extraño o un metabolito derivado de la fase I se une covalentemente a una molécula endógena (ácido glucurónico, sulfato, glicina), produciendo un conjugado con características de mayor hidrosolubilidad. Estas transformaciones sugerirían a priori que conducen a una detoxificación, dado que en general se forman productos más fácilmente excretables. Sin embargo, es necesario enfatizar que la biotransformación no está estrictamente relacionada con la detoxificación, dado que existen muchos ejemplos de productos metabólicos que son más tóxicos que los compuestos que les

dieron origen. Esto es particularmente cierto para algunos carcinógenos y un número de sustancias que provocan necrosis celular en el pulmón, hígado y riñón (62) (63).

#### Sistema del citocromo P-450

El sistema más importante involucrado en las reacciones de fase I corresponde a las transformaciones mediadas por las oxidasas de función mixta que tienen al citocromo P-450 (cit.P-450) como componente principal. Este sistema requiere NADPH y  $O_2$  y las reacciones participan entre otros componentes de una matriz fosfolipídica, cit.P-450 y la NADPH P-450 reductasa.

El P-450 es una hemoproteína que contiene por mol un átomo de hierro en estado reducido y es capaz de combinarse en su forma reducida con el CO para dar una banda de absorción característica a 450 nm, lo que ha dado origen a su nombre. En la actualidad se sabe que el P-450 está constituido por varias isoenzimas y se ha podido comprobar en algunos casos que éstas presentan distinta afinidad por los sustratos, aunque el sistema en sí cuenta con poca especificidad dado que debe procesar una gran variedad de sustancias extrañas (62) (64) (65).

La NADPH P-450 reductasa, por otro lado, es una flavo-

enzima que posee en el grupo prostático un mol de FMN y uno de FAD por mol de enzima.

En cuanto al componente lipídico del sistema, se pudo establecer que es un fosfolípido, básicamente fosfatidilcolina (65), aunque no ha podido esclarecerse totalmente su función y se considera que facilita la transferencia de electrones al P-450 y que incrementa la afinidad de los sustratos y de la P-450 reductasa por el P-450.

Existen numerosos ejemplos de reacciones catalizadas por el sistema del cit.P-450: hidroxilación alifática y aromática, epoxidación, dealnilación oxidativa, N-hidroxilación, sulfoxidación, desulfuración, dehalogenación oxidativa.

A pesar de que el sistema se clasifica como una oxidasa, también cataliza la biotransformación reductiva de ciertos xenobióticos, como la nitroreducción aromática y la azoreducción.

Existe una gran variedad de factores que pueden afectar el sistema P-450 dependiendo modificando el contenido o el tipo de P-450, la actividad de la P-450 reductasa o los niveles de NADPH; por supuesto esto puede ocasionar alteraciones en la biotransformación de sustancias extrañas al organismo, ya sea en la duración o en la intensidad de sus acciones.

También hay que tener en cuenta que en este sistema en-

zimático, por su falta de especificidad, gran cantidad de sustratos compiten por los sitios activos y por ende modifican sus respectivas biotransformaciones.

Una característica interesante del sistema P-450 es su facilidad para ser inducido y de hecho existen cientos de sustancias químicas capaces de provocar la estimulación del sistema, incrementando en general el contenido de P-450 hepático, y en algunos casos la actividad de la P-450 reductasa (65). Entre los agentes inductores más estudiados se encuentran el fenobarbital y el 3-metilcolantreno, prototipo de sustancias que causan diferentes efectos morfológicos y bioquímicos en el hígado.

#### FAD-monooxigenasas

Otra enzima oxidativa, conocida históricamente como aminooxidasa de función mixta, contribuye a las reacciones de biotransformación de tipo I. Esta FAD-monooxigenasa (FAD-M) está presente en el retículo endoplásmico y es capaz de oxidar nitrógenos nucleofílicos y átomos de azufre. Por lo tanto, no es sólo una aminooxidasa sino una flavin-monooxigenasa microsomal. La actividad de esta enzima es alta en humanos y cerdos, siendo muy baja en ratas, y compite con el sistema del cit.P-450 en la oxidación de aminas.

Convierte aminas terciarias en aminoóxidos, aminas secundarias en hidroxilaminas y nitronas y aminas primarias en hidroxilaminas y oximas. La flavin-monooxigenasa, a diferencia del cit.P-450, es inhibida por el fenobarbital o el 3-metilcolantreno. Se ha sugerido que la concentración de la enzima está regulada por hormonas sexuales esteroides, disminuyendo su concentración por testosterona y aumentando por progesterona (62).

#### Esterasas y amidasas

En los tejidos de los mamíferos existen un gran número de esterasas y amidasas no específicas que actúan sobre los xenobióticos hidrolizando uniones ésteres o amido, liberando grupos carboxilos y una función alcohol y amina respectivamente.

Las esterasas pueden clasificarse en cuatro clases principales:

- 1) Arilesterasas: hidrolizan preferentemente ésteres aromáticos.
- 2) Carboxilesterasas: hidrolizan ésteres alifáticos.
- 3) Acetilesterasas: en las cuales el ácido del éster es el acético.
- 4) Colinesterasas: hidrolizan ésteres donde el alcohol

es la colina.

Hay que tener en cuenta que existe superposición de estas enzimas en cuanto a la especificidad por el sustrato; por lo tanto esta clasificación no es absoluta.

Las esterasas/amidasas son enzimas que pueden encontrarse tanto en el citosol como en los microsomas. Las esterasas citosólicas usualmente están asociadas con una reacción específica, como la acetilcolinesterasa y la pseudocolinesterasa, mientras que las de los microsomas son inespecíficas (62). Una característica interesante es que ciertas enzimas esterásicas están sujetas al control genético, originando alta o baja actividad, así como resistencia o susceptibilidad a la inhibición. Esto redundo en una variabilidad en la respuesta a las transformaciones de las sustancias extrañas.

#### Otros sistemas enzimáticos

Aunque existen otras reacciones de biotransformación de xenobióticos, han sido mencionadas únicamente aquellas que hasta el momento actual se consideran más directamente responsables del metabolismo de la cocaína.

### Formación de metabolitos reactivos

La formación de metabolitos reactivos es otro aspecto interesante de mencionar, especialmente los que interaccionan con componentes celulares como ADN, ARN, proteínas, lípidos, etc., provocando efectos tóxicos; entre ellos se encuentran los radicales libres.

Un radical libre puede generarse por ruptura homolítica de una unión covalente o por cesión o captación de un electrón a partir de una especie neutra (66). En general son muy reactivos debido a su deficiencia electrónica en la capa externa, ya que poseen un electrón no apareado.

Esta gran reactividad de los radicales libres hace que interaccionen con las moléculas y con otros radicales libres presentes en el sitio de su formación.

Las reacciones más importantes son las de abstracción, adición, desproporcionamiento y cancelación; las dos primeras son las más comprometidas con problemas toxicológicos. La abstracción origina interacciones covalentes con componentes celulares, y la adición inicia un proceso de peroxidación de lípidos (66). Este último proceso puede conducir a importantes daños estructurales en las biomembranas, por ejemplo del retículo endoplásmico, a cambios en las funciones metabólicas y en la fluidez de las biomembranas.

Muchos tipos de lesiones en los tejidos involucran la formación de radicales libres reactivos como primera etapa, produciendo como evento secundario una estimulación de la peroxidación lipídica. Un aumento en el grado y extensión de la peroxidación lipídica en un tejido es indicativo de la formación de radicales libres reactivos y de un probable daño biológico. La peroxidación lipídica es un proceso muy complejo que puede ser evaluado experimentalmente por varios caminos, siendo los más convenientes la conjugación con dienos, producción de malonaldehído y cambios en la fluorescencia (67).

#### Inducción enzimática e inhibición

Como ya se mencionara, ciertas sustancias pueden incrementar la actividad metabólica de los sistemas enzimáticos, aumentando cuantitativamente las enzimas y componentes responsables de las transformaciones de las sustancias extrañas, siendo un ejemplo muy conocido el sistema del P-450 mencionado previamente. Este hecho es de suma importancia en toxicología dado que si los metabolitos formados son no tóxicos la inducción incrementará la detoxificación, pero si son más tóxicos aumentará la agresión (68).

### Variabilidad de las reacciones metabólicas (62) (65)

Las diferencias que existen en la metabolización de los diversos xenobióticos entre las distintas especies animales, entre una cepa y otra de una misma especie y por otros factores como el sexo, la edad, la dieta, etc., crean un serio problema al investigador, en especial en el caso de estudios toxicológicos que se valen de animales para predecir fenómenos similares en el hombre.

### Reacciones no enzimáticas (68)

Otro punto a tener en cuenta en el estudio metabólico de un xenobiótico son las posibles transformaciones no mediadas por enzimas que ocurren espontáneamente al interactuar con los constituyentes naturales del organismo o por las características del medio. Como es de suponer, aquí adquiere relevancia la vía de ingreso de la sustancia en cuestión.

## V.2.2 METABOLISMO DE LA COCAINA

Hasta 1969 sorprendentemente poco se conocía acerca del metabolismo y excreción de la cocaína, una droga que se empleó en medicina durante más de una centuria (69) (70). Sin embargo, cualquier estudio que intente comprender modelos de abuso de la droga o que tenga por finalidad desarrollar métodos para detectar su presencia en el organismo con propósitos clínicos o forenses, requiere un conocimiento previo de su cinética y metabolismo (71).

Debido principalmente a que en las dos últimas décadas se ha incrementado la notoriedad de la cocaína por su uso ilegal, se ha intensificado el estudio de las diversas implicaciones de esta droga. Uno de los aspectos más interesantes y que ha presentado un serio desafío al toxicólogo ha sido la intensa y rápida biotransformación de la cocaína, debida a su susceptibilidad a la hidrólisis enzimática y espontánea y a la ruta oxidativa. Esto ocurre tanto en el hombre como en las diversas especies animales estudiadas, siendo la droga excretada sin modificación en una muy pequeña proporción, de alrededor del 1 al 5% de la cantidad ingresada (71) (72) (73) (57).

Estudios realizados en ratas utilizando cocaína marcada con  $^{14}\text{C}$  han demostrado que es biotransformada en por lo

menos 10 metabolitos (72). En la Figura 8 están esquematizados los primeros pasos de la biotransformación de la cocaína.

Se considera que el 90% de los metabolitos de la cocaína se originan por reacciones hidrolíticas.

### Reacciones hidrolíticas

El grupo alquil éster es espontáneamente hidrolizado, especialmente bajo condiciones alcalinas, formándose benzoil-ecgonina (BEc). Hasta el momento no se ha identificado un camino enzimático que justifique su presencia (69) (71) (76).

En cuanto al grupo fenil éster, sufre en cierta proporción hidrólisis enzimática catalizada por pseudocolinesterasas del plasma, dando origen a metilecgonina o el éster metílico de la ecgonina (EMEc) (74) (75). Además, el hígado humano tiene actividad esterasa y por lo tanto hidroliza la cocaína a EMEc. Estas enzimas son distintas de las del suero, en cuanto a sus parámetros cinéticos, y presentan un  $K_m$  y  $V_{max}$  más alto, indicando que la cocaína es más lentamente hidrolizada en el suero que en el hígado. Sin embargo, la afinidad de las enzimas esterásicas normales del suero es más alta y en definitiva la contribución a

la hidrólisis es similar (75). Además, la actividad de las esterases del suero puede variar considerablemente entre especies, sexos e individuos. Así se ha comprobado que en el suero de algunos individuos que por su historia previa eran susceptibles al relajante muscular succinilcolina, se hallaba presente una colinesterasa atípica.

El porcentaje de inhibición de la actividad esterásica por dibucaína, conocido como el número de dibucaína, es una de las medidas clínicas más comúnmente empleadas para investigar la sensibilidad inusual a la succinilcolina, e indica además si los individuos son homocigotas o heterocigotas para la herencia de la esterasa atípica.

Todo ello tiene trascendencia en relación con el metabolismo de la cocaína, ya que los individuos homocigotas y heterocigotas con respecto a la esterasa atípica no hidrolizan la cocaína o lo hacen a una velocidad reducida, respectivamente.

Una cuestión intrigante y que permanece sin respuesta es si los individuos que tienen una actividad reducida de la colinesterasa normal o los que heredaron la forma atípica tienen un riesgo aumentado de toxicidad luego del uso de la cocaína, especialmente después de las dosis acumulativas que se administran los drogadictos durante las sesiones. Además, ciertos desórdenes funcionales entre los que se

incluyen enfermedades crónicas del hígado, presencia de carcinomas o bien la exposición a drogas anticolinesterásicas, pueden reducir la actividad de la colinesterasa aparte de la forma atípica (71). Algunas incongruencias encontradas en la literatura, particularmente las referidas a tolerancia y dependencia, podrían ser el resultado de variaciones entre especies de la actividad colinesterásica. Esta actividad es relativamente alta en humanos, caballos y ciertas especies de monos (por ejemplo, el chimpancé). La actividad es menor en otros mamíferos, como perros, gatos, ovejas y ratas. Una diferencia de unas cuatro veces puede observarse en la actividad enzimática entre varias cepas de ratones. Además, la actividad es menor en el feto, en los infantes, en machos viejos, y disminuye notoriamente durante la gravidez.

Teniendo en cuenta que hay un metabolismo hepático y extra-hepático, el impacto de una actividad colinesterásica mucho más baja o mucho más alta con respecto a la normal podría también depender de la vía de administración; por ejemplo, sería más importante cuando la droga se administra por vía intravenosa o se fuma que cuando la administración se realiza por vía oral, intraperitoneal o subcutánea (44).

Por ello es muy importante tener en cuenta las variaciones en las esterasas del suero en los estudios relativos al

metabolismo de la cocaína (76).

El descubrimiento de que la BEc es hidrolizada por colinesterasas del plasma puede ayudar a explicar la presencia de cantidades de ecgonina (Ec) del orden del 1 al 3% en orina humana y de animales de experimentación. Alternativamente, la Ec puede además provenir del producto de rompimiento no enzimático de la EMEc, como ocurre con el paso de cocaína a BEc (75) (77). Esta ruta metabólica produce metabolitos considerados inactivos cuando son administrados por vía sistémica; la BEc tiene actividad estimulante solamente después de la inyección intracisternal (78).

Hasta 1978 solamente dos metabolitos urinarios, la BEc y la Ec, eran considerados importantes para el esclarecimiento del abuso de cocaína, y desde 1978 el EMEc se ha incorporado a este grupo (72) (79).

Otro sistema enzimático involucrado es el de las oxidasas de función mixta hepáticas, que juega un rol menor en la biotransformación de la cocaína.

#### Reacciones oxidativas

La oxidación produce un metabolito N-demetilado, la norcocaína (NC), el único metabolito farmacológicamente activo identificado hasta ahora (71) en ratas; alrededor del 80%

de la N-demetilación ocurre en el hígado (75).

La NC es producida por dos rutas alternativas, la cocaína es N-demetilada directamente por cit.P-450, o es inicialmente N-oxidada a cocaína N-óxido por FAD-M y después N-demetilada por cit.P-450 (70) (80).

A pesar de que se produce poca NC en humanos, este camino microsomal tiene interés por el hecho de que produce la formación de metabolitos intermediarios reactivos (71), cuya influencia en la hepatotoxicidad será discutida al tratar dicho tema.

Tanto el cit.P-450 como FAD-M están presentes en otros tejidos; sin embargo, el aporte es mucho menor, por ejemplo la actividad en cerebro es un décimo de la del hígado (80). También se ha comprobado que la mucosa intestinal humana presenta alta capacidad para llevar a cabo reacciones de dealquilación (77).

En investigaciones recientes se demostró que la cocaína es también N-demetilada en la mucosa nasal de ratas, lo cual tiene suma importancia ya que la administración de la droga por la ruta intranasal en adictos es muy común. Las lesiones provocadas en la mucosa nasal y en el tabique se observaban frecuentemente en esta forma de consumo y se atribuían exclusivamente a la vasoconstricción producida por la cocaína al provocarse isquemia en los tejidos; sin

embargo, la formación local de metabolitos reactivos derivados de la NC puede considerarse que contribuye a la producción de lesiones nasales (81).

La NC es hidrolizada en el hígado y en el suero por las esterases más rápidamente que la cocaína (75) y por hidrólisis química.

En estudios efectuados en ratas tratadas en forma aguda o crónica con cocaína se ha podido identificar benzoilnorecgonina (BNEc) en la orina, además de BEc, EMEc y Ec (73) (82), y en perros también se detectó NC y norecgonina (NEc) (82). La BNEc es un metabolito considerado farmacológicamente activo solamente cuando se lo administra en forma intracisternal.

Al incubarse NC en homogenato de cerebro de ratas se demostró que en dicho tejido también ocurre la biotransformación a BNEc y NEc (73). Como la ruta oxidativa está mediada por el sistema microsomal hepático es susceptible de grandes variaciones individuales, y se ha demostrado que existen diferencias entre los sexos y la raza, influyendo además la experiencia anterior con otras drogas (72) (80).

Si bien la NC no es un metabolito urinario normalmente encontrado en orina humana, se ha podido detectar en cantidades del orden del picogramo o menos (72).

Más recientemente han sido identificados algunos otros

metabolitos menores, como metilecgonidina y una arilhidroxicoína en bilis, después de una sobredosis de cocaína administrada intravenosamente en sujetos, y etilecgonina y benzoiletilecgonina (cocaetilene) en orina de drogadictos que consumen cocaína y alcohol simultáneamente (83) (84).

Se descarta que estos compuestos provengan de impurezas presentes en las muestras de cocaína de la calle, ya que se han analizado en los laboratorios por varios años y nunca ha sido reportada su presencia (83).

Por lo contrario, la presencia de cinnamoilcocaína y el etil derivado cinnamoilecgonina, en muestras de orina de consumidores, se debe a que la cinnamoilcocaína está presente en las hojas de coca y puede ser identificada como un contaminante en ciertas cocaínas preparadas ilegalmente.

La cinnamoilcocaína es parcialmente excretada sin cambio por orina y bilis, siendo también metabolizada "in vivo" o "in vitro" a cinnamoilecgonina (84).

Investigaciones realizadas no han evidenciado la formación de conjugados de los metabolitos con ácido glucurónico (73).

Trabajos que confirman la formación de los principales metabolitos de la cocaína y su estabilidad

Estudios efectuados para determinar la estabilidad de la cocaína se realizaron por agregado "in vitro" de la droga a sangre, plasma o buffer, almacenando las muestras bajo distintas condiciones. A diferentes tiempos se determinó la presencia de cocaína solamente o también de BEc y EMEc (74) (85) (86).

En un caso se determinó cocaína y BEc en muestras de sangre mantenidas a 16°C, investigándose la presencia de cocaína y BEc. Los resultados que figuran en la Tabla VII indican que existe una transformación en el transcurso del tiempo de cocaína a BEc (87). Otros autores investigaron la declinación en la concentración de cocaína por efecto del tiempo, temperatura, concentración de la droga y del NaF empleado como inhibidor de las esterasas, en muestras de sangre y plasma, comparando con un buffer a pH 7,4, y los efectos del tiempo y el pH en la estabilidad de la droga en orina (Figuras 9, 10, 11, 12).

Las conclusiones más importantes indican que si la concentración de cocaína es de 0,1 mg/l, ésta desaparece rápidamente en plasma o sangre refrigerada y sin NaF no detectándose a los 3 y 8 días respectivamente; en cambio se en-

contraba aún presente en sangre y plasma tratados con NaF a los 21 días, pero sólo entre 40-60% de su valor original.

Además en el buffer (pH 7,4) la concentración de la droga baja más rápidamente que en el caso anterior y a los 21 días no se detecta. Esto se debe a que en las muestras biológicas el pH bajó a 7, condición menos favorable para la hidrólisis espontánea.

Las temperaturas altas (25°C), como es de esperar, causan una rápida degradación, con cerca del 90% de pérdida a los 21 días (87).

En orina, un fluido biológico que no contiene esterasas, el pH es probablemente el factor más importante que afecta la estabilidad de la droga.

En un estudio sobre la estabilidad de la cocaína y sus metabolitos en sangre y buffer se pone además en evidencia parte de la hipótesis de que la cocaína es hidrolizada a EMEc por esterasas en sangre o hígado y a BEc por hidrólisis química.

La influencia de la temperatura en muestras preparadas con sangre postmortem (pH 6,8) y de un banco de sangre (pH 7,4) es evidente, observándose alrededor del 50% de la cocaína inicial a las 12 horas a 25°C, mientras que a 4°C es del 90%. Además se demuestra el efecto del pH en la hidrólisis enzimática, ya que se forma más EMEc en el caso de la

sangre a pH 7,4 (Figuras 13 y 14). La disminución del pH en las muestras postmortem se debe a la progresiva descomposición.

En contraste con lo que ocurre en sangre, el producto de hidrólisis de la cocaína en buffers es solamente a BEc (Figura 15). Para demostrar el rol de las enzimas se incubó cocaína con las siguientes enzimas carboxiesterasas, acetilcolinesterasa (ACE) y pseudocolinesterasa (PCE). Se trabajó en solución salina (NaCl 0,9%) y solución buffer de fosfato (20 mM, pH 7,4) (Tabla VIII), observándose que la cocaína es hidrolizada a EMEc en presencia de PCE pero no de ACE, siendo además hidrolizada más rápidamente en presencia de carboxiesterasa, detectándose EMEc a los 30'.

Si se utiliza un agente anticolinesterasa como el NaF, se pone nuevamente en evidencia el rol de las enzimas de la sangre en el metabolismo (Figuras 16 y 17), al no detectarse EMEc hasta transcurridos 110 días, mientras que ocurre la hidrólisis química a BEc si la muestra se mantiene al pH fisiológico y refrigerada. Comparando la hidrólisis química en solución buffer sola (pH 7,4) se observa también la formación de BEc (Figura 18).

Todo lo anterior está indicando la importancia de la conservación de las muestras biológicas, cuando no pueden ser procesadas inmediatamente. Tanto el pH como la temperatura

influyen notoriamente en muestras de orina o sangre, y en este último caso es necesario inhibir la actividad de las enzimas degradantes de la cocaína. De esta forma se pueden minimizar los errores, obteniéndose datos concluyentes del metabolismo de la droga en el organismo.

En cuanto a la N-demetilación de la cocaína a NC catalizada por microsomas hepáticos, se determinó en animales a los cuales se administró  $\langle N-^{14}CH_3 \rangle$ -cocaína por liberación en el aire espirado de  $^{14}CO_2$  o bien por formación de formaldehído (80). En el organismo se produce la oxidación de la droga primero a formaldehído y luego a  $CO_2$  (88).

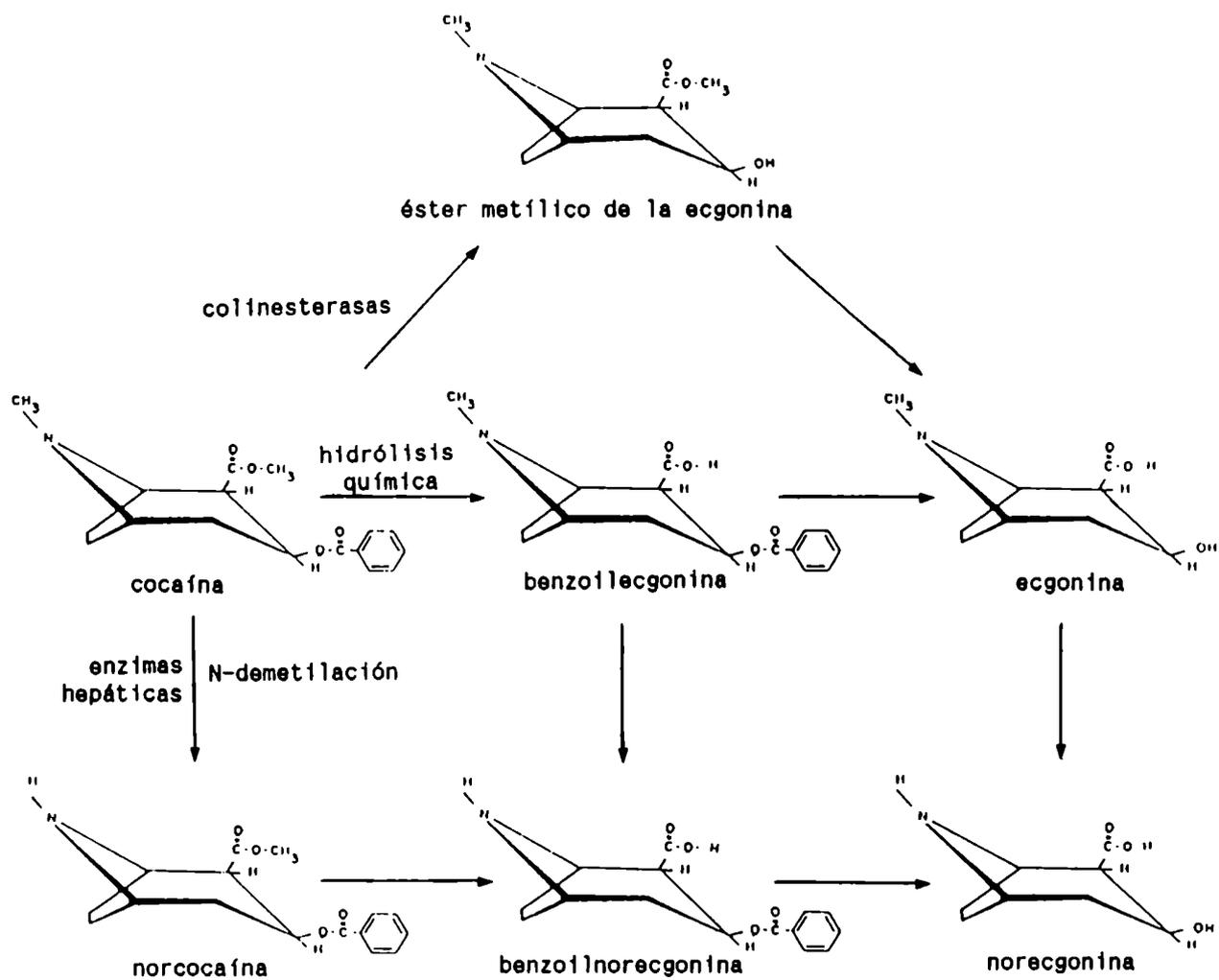


Figura 8: Biotransformación de la cocaína

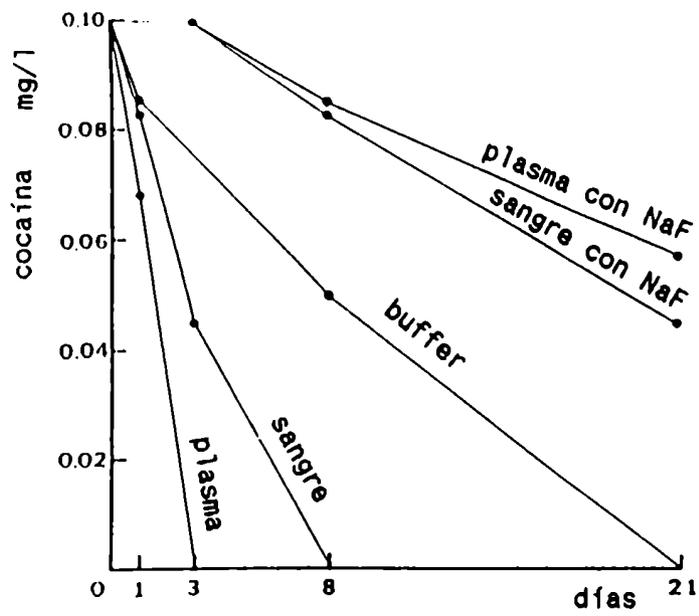


Figura 9: Disminución de la concentración de cocaína en sangre, plasma y buffer pH 7,4, con y sin 0.5% de NaF a 40C. Concentración inicial: 0.1 mg/l

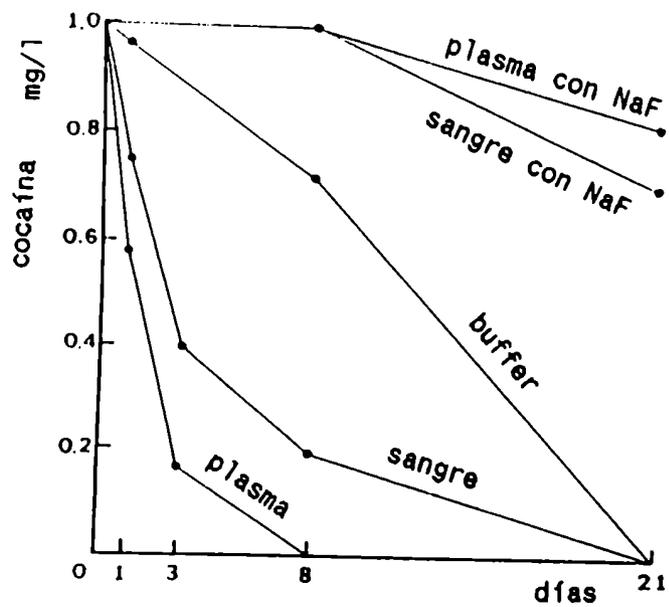


Figura 10: Idem Figura 9. Concentración inicial: 1.0 mg/l  
(87)

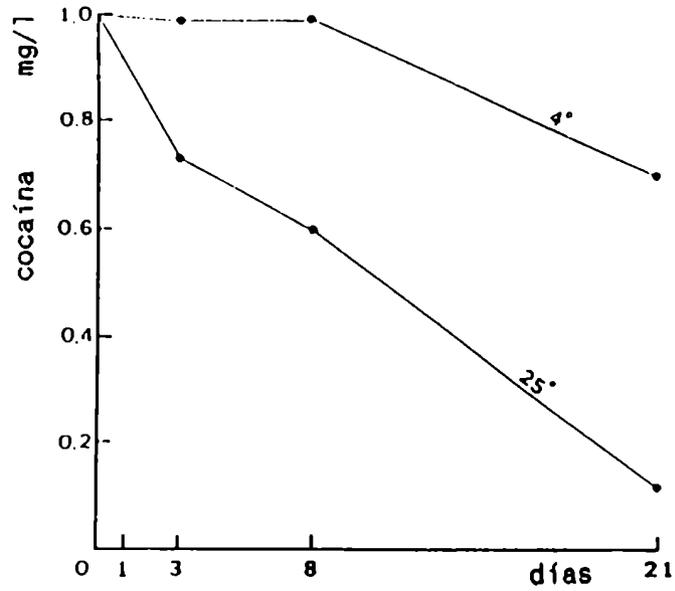


Figura 11: Disminución de la concentración de cocaína en sangre con 0.5% de NaF a 4°C y a 25°C. Concentración inicial: 1.0 mg/l (87)

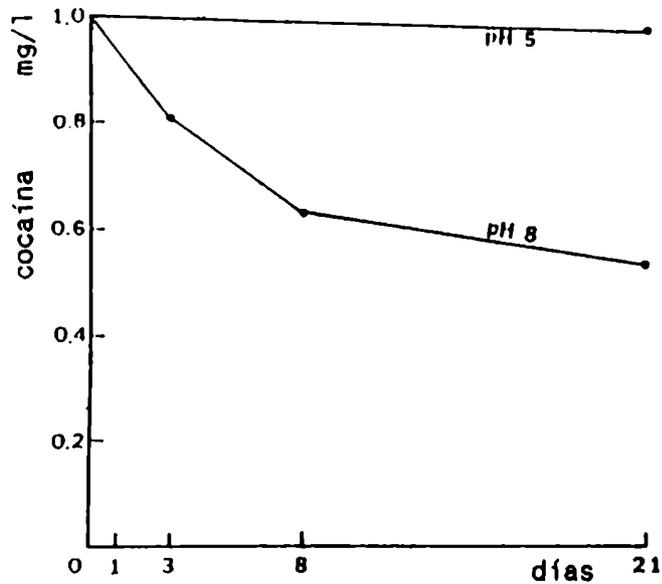


Figura 12: Disminución de la concentración de cocaína en orina a pH 5 y 8 a 4°C. Concentración inicial: 1.0 mg/l (87)

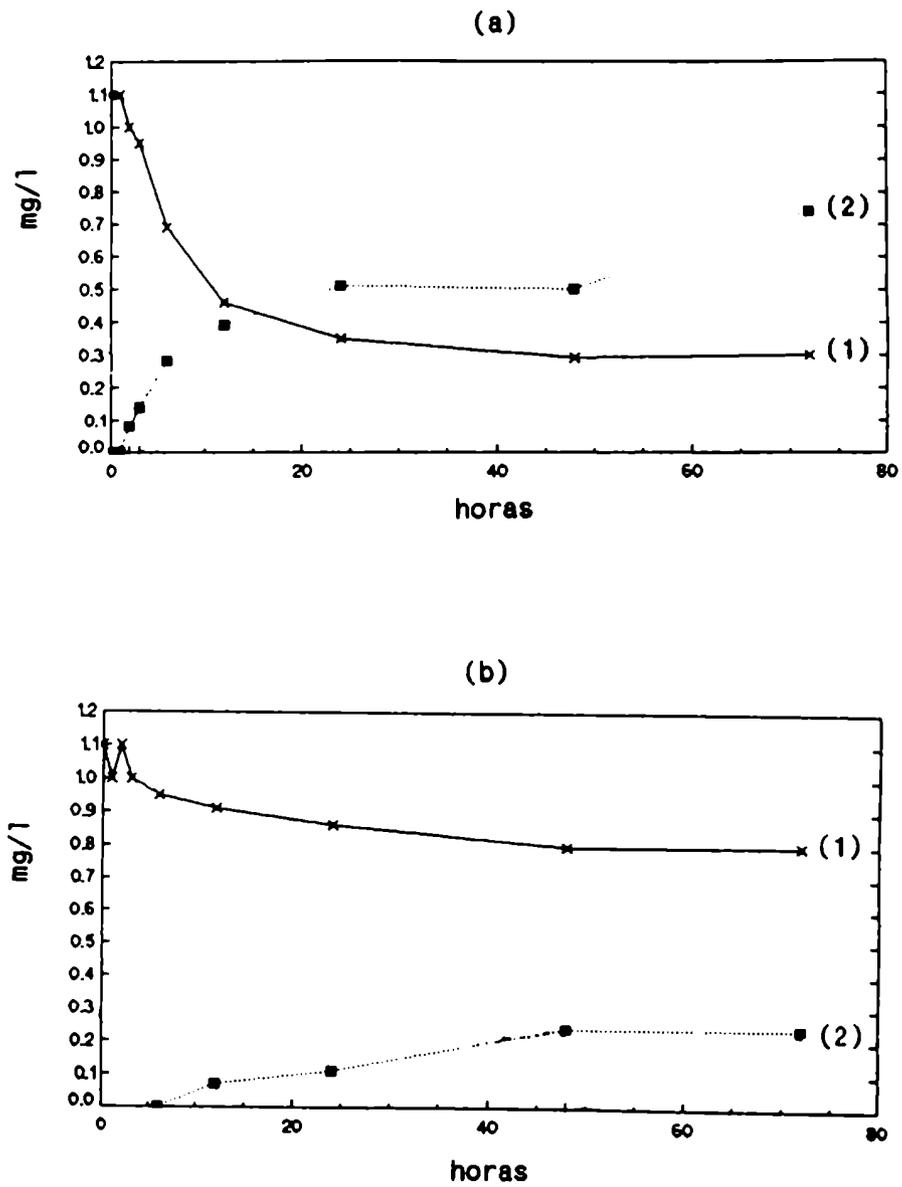


Figura 13: a) Estabilidad de la cocaína en sangre post-mortem a 25°C, (1) cocaína, 1.0 mg/l, (2) EMEc; b) Idem a 40°C (73)

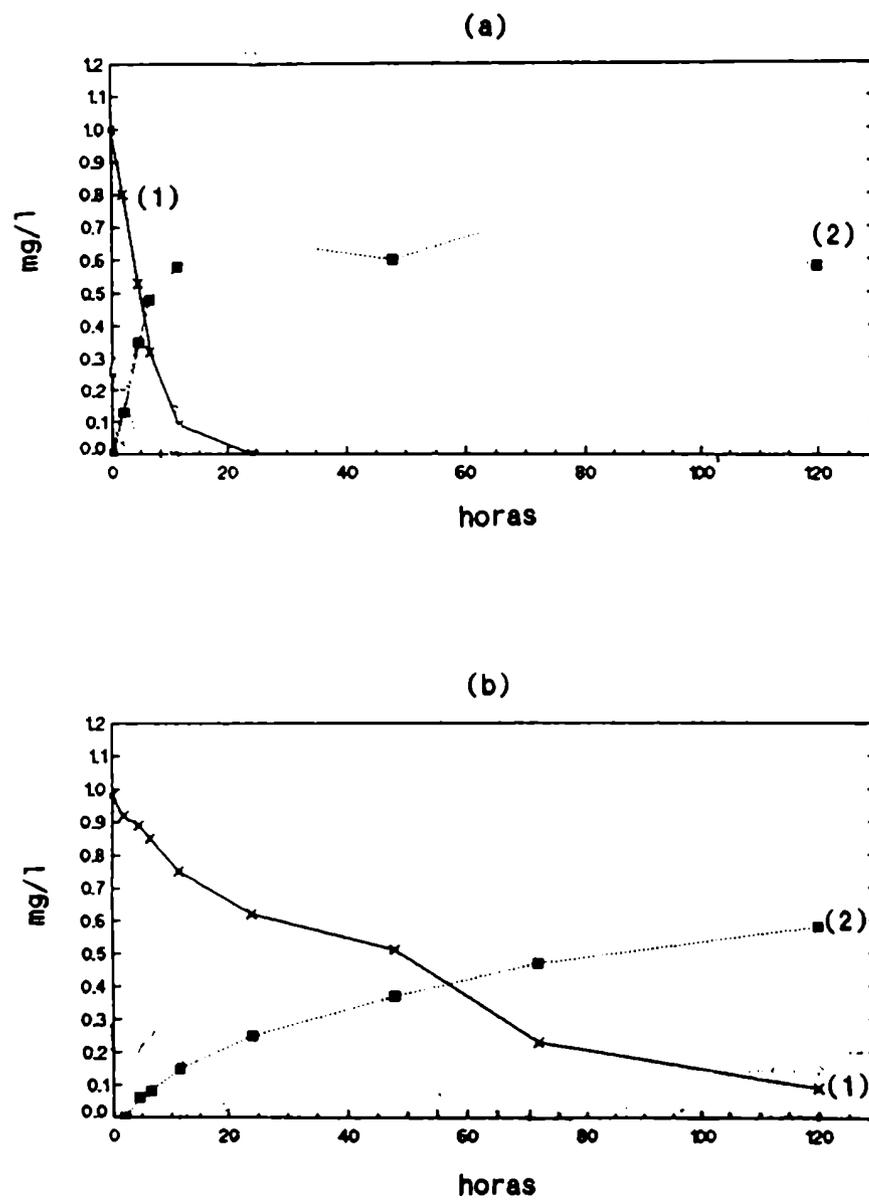


Figura 14: a) Estabilidad de la cocaína en muestras de un banco de sangre, a 25°C; (1) cocaína, 1.0 mg/l, (2) EMEc; b) Idem a 4°C (73)

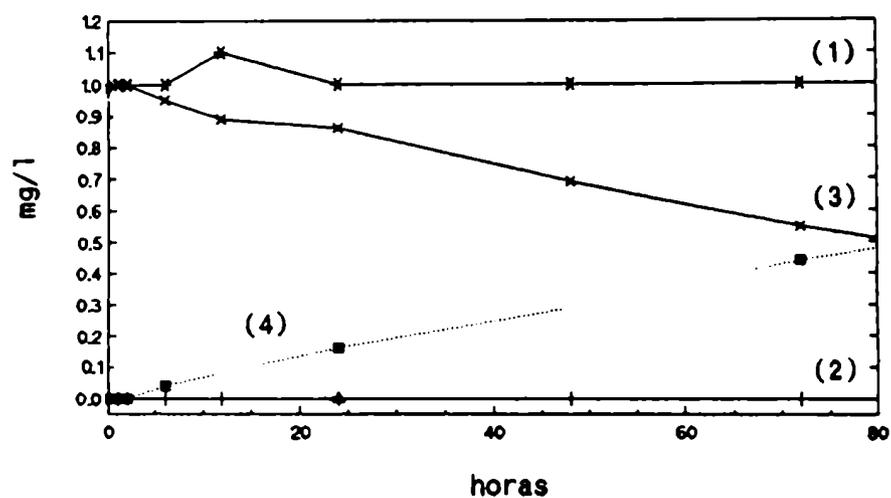


Figura 15: Estabilidad de la cocaína en buffer a 25°C; (1) cocaína, pH 5; (2) BEc formada a pH 5; (3) cocaína, pH 7,4; (4) BEc formada a pH 7,4 (73)

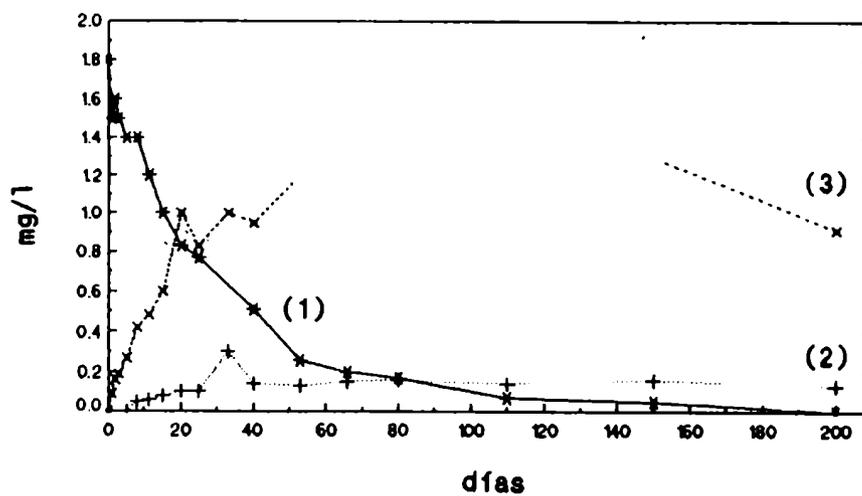


Figura 16: Estabilidad de la cocaína en sangre a 40°C; (1) cocaína, (2) BEc, (3) EMEc (73)

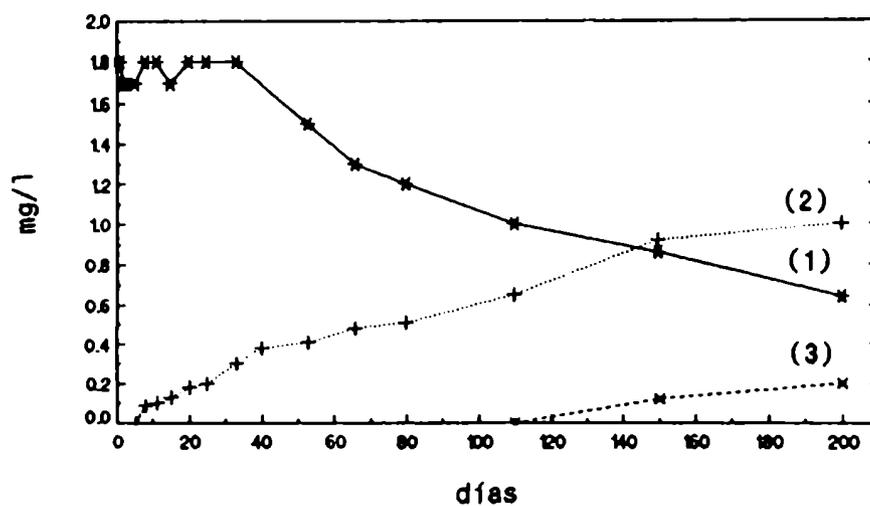


Figura 17: Estabilidad de la cocaína en sangre preservada con 2% de NaF a 4°C; (1) cocaína, (2) BEc, (3) EMEc (73)

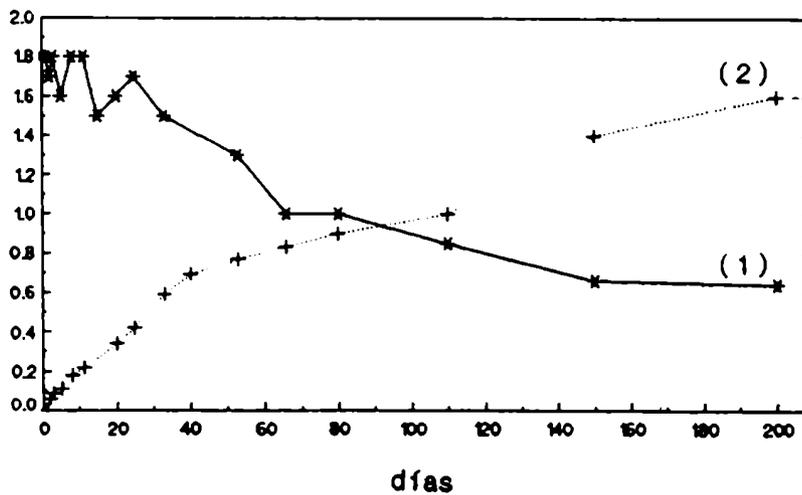


Figura 18: Estabilidad de la cocaína en solución buffer de fosfato a 4°C; (1) cocaína, (2) BEc (73)

## T A B L A V I I

## DEGRADACION DE LA COCAINA

día analizado	cocaína concentración en sangre (mg %)	BEc concentración en sangre (mg %)
0	0,100	0
1	0,093	0,009
7	0,084	0,013
14	0,083	0,016
36	0,070	0,027

T A B L A   V I I I  
 ROL DE LAS ENZIMAS EN LA ESTABILIDAD DE LA COCAINA

enzimas	0,5 h			1,0 h			4,0 h		
	Cc	EMEc	BEc	Cc	EMEc	BEc	Cc	EMEc.	BEc
CaE	1,7	0,2		1,6	0,4	0,1	0,9	0,6	0,3
ACE	2,0			2,1			1,8		0,3
PCE	1,9			1,9	0,2		1,2	0,6	0,2
FBS	2,0			2,1			1,9		0,3

Incubación    a 37°C  
 Cc            cocaína  
 EMEc        ecgonina metil ester  
 BEc         benzoilecgonina  
 CaE         carboxiestearasa  
 ACE         acetilcolinesterasa  
 PCE         pseudocolinesterasa  
 FBS         buffer de fosfatos

### V.3 EXCRECION

Como se ha detallado previamente, la cocaína se excreta como tal en una muy pequeña proporción, y las variaciones en los porcentajes de eliminación de los metabolitos dependen de varios factores. Sin embargo, el metabolismo de esta droga parece ser menos variable entre individuos que si se compara con otras drogas que dependen principalmente de la oxidación microsomal.

Al disponer en los últimos años de técnicas analíticas más sensibles se han intentado determinar los parámetros cinéticos para la excreción, como el tiempo de vida media en plasma y el clearance, tanto en el hombre como en otras especies animales, pero los datos presentados en la bibliografía muestran una dispersión notable, a tal punto que se puede afirmar que es un tema aún no dilucidado.

Por supuesto, los datos varían dependiendo de la especie sobre la que se efectúa el estudio, de las vías de ingreso de la cocaína al organismo y del tipo de tratamiento (agudo, crónico); además hay que tener en cuenta que en la mayoría de los casos el número de individuos sobre los que se determinan los parámetros es muy pequeño. Para el clearance de la cocaína se ha propuesto un valor aproximado de 2 litros por minuto (71); los valores de vida media en plasma figuran en la Tabla IX.

T A B L A I X  
VALORES DE VIDA MEDIA EN PLASMA

vía de ingreso					
	intra-venosa	intra-nasal	oral	dosis inyectada	referencia
<u>hombre</u>					
cocaína	42 min			32 mg	71
		75 min		0,19 a 2,0 mg/kg	41
			48 min	2,0 a 3,0 mg/kg	41
	61 min			0,2 mg/ml	44
	80 min			0,6 mg/ml	44
BEC	5,5 hs	4,8 hs		48 mg	69
	7,5 hs			1,5 mg/kg	57
EMEC	4,1 hs	3,9 hs		48 mg	69
	3,6 hs			1,5 mg/kg	57
<u>ratas</u>					
cocaína	2 hs (crónico)			20 mg/kg	73
	1 hs (agudo)			20 mg/kg	73
intra-peritoneal					
<u>ratones</u>					
cocaína	16 min			10-20 mg/kg	55
BEC	62 min			10-20 mg/kg	55

#### V.4 HEPATOTOXICIDAD

Las primeras observaciones clínicas en las cuales la cocaína aparece implicada en producir daño hepático, fueron publicadas en 1967. Los investigadores demostraron que en un grupo de adictos a la cocaína y heroína los niveles de transaminasa sérica estaban elevados y en algunos casos los sujetos presentaban ictericia (63). Sin embargo, no pudo obtenerse ningún resultado definitivo dada la presencia de ambas drogas; no obstante, el estudio sirvió para estimular la investigación a fin de esclarecer si la cocaína era responsable de la producción de hepatotoxicidad. Varios estudios demostraron con posterioridad que la cocaína administrada por vía intraperitoneal a ratones en forma aguda o crónica producía en el hígado infiltración grasa, necrosis midzonal y periportal, observándose además una marcada elevación de los niveles en suero de las transaminasas (70) (89).

Actualmente, y como resultado de numerosas experiencias, se puede concluir que el daño hepático observado no se debe a la cocaína por sí misma (90). Una serie de estudios parecen indicar que la biotransformación de la droga por el sistema de la oxidasa de función mixta origina metabolitos que por sus características pueden ser responsables de producir

daño en los tejidos.

Las estructuras químicas de los metabolitos de la cocaína a las cuales se hará referencia en este capítulo se hallan representadas en la Figura 8. En una experiencia realizada con ratones a los que previo al tratamiento con cocaína se induce el sistema de oxidasa de función mixta con fenobarbital, se observa un incremento del daño hepático (91). Además, al inhibir las esterasas hepáticas con tri- o toluilfosfato o SSS-tributilfosforotritioato se incrementa la cantidad de cocaína metabolizada por el sistema de la oxidasa de función mixta, provocando aumento de los niveles de transaminasas y de la necrosis periportal (92).

Otra experiencia realizada con ratones y ratas a los cuales se les administraron en forma intraperitoneal y crónica distintas dosis de cocaína y en la que se observó el grado de daño en el hígado y el porcentaje de necrosis, así como los niveles en suero de la glutámico pirúvico transaminasa en un lapso de una a tres semanas, arrojó algunas conclusiones interesantes.

En una especie susceptible como los ratones, el porcentaje de necrosis periportal hepática y la elevación de los niveles de la glutámico pirúvico transaminasa sérica dependen de la dosis y el tiempo (93). Si bien en anteriores experiencias se comprobó que es necesario el incremento de

la actividad del sistema de la oxidasa de función mixta para que la cocaína induzca necrosis hepática (92), la administración de bajas dosis de cocaína por largos períodos produce lesiones sorprendentemente similares, aunque son reversibles al suspenderse el tratamiento.

Como era de suponer, el contenido en citocromo P-450 se altera en forma diferente dependiendo de la dosis: a dosis más altas se produce una disminución de citocromo P-450 pero esto aparentemente no protege al hígado de la necrosis. Por otra parte, la necrosis hepática inducida por la droga se correlaciona bien con el grado de cocaína marcada unida a proteínas del hígado, y ambas demuestran ser dependientes de la especie, de altas dosis de la droga y la canalización selectiva del metabolismo de la cocaína, ya sea por inducción microsomal o inhibición de esterasas. El fraccionamiento subcelular del tejido hepático demostró que más del 66% de la unión irreversible ocurre en la fracción microsomal del hígado. Una unión más pequeña se observa en otras proteínas tisulares del ratón. En ratones pretratados con fenobarbital se ha observado un incremento de la unión de material marcado radioactivo a proteínas hepáticas empleando  $^3\text{H}$ -benzoil y  $^{14}\text{C}$  metoxicocaína, pero no con  $\langle^3\text{H}_3\text{C-N}\rangle$  cocaína (94), lo que indicaría que la cocaína debe ser previamente demetilada a fin de dar un intermedia-

rio químico reactivo que es el responsable de la unión con proteínas tisulares hepáticas y de producir el daño hepático.

Si bien inicialmente se consideró que el primer metabolito formado por el sistema de la oxidasa de función mixta, la NC, era responsable de producir hepatotoxicidad, experimentos realizados con posterioridad permitieron obtener otras conclusiones.

Aunque el pretratamiento con fenobarbital aumenta tanto el daño hepático como el metabolismo de la cocaína a NC en el ratón, la concentración de NC hallada no es suficiente para justificar el incremento del daño hepático. Además, la inhibición del sistema con SKF-525 A, cloramfenicol o iproniazida, bloquea el daño hepático producido tanto por la administración de cocaína como por NC. Esto sugiere que existe una transformación de la NC hacia algún otro metabolito, el cual sería el verdadero responsable.

El paso metabólico hacia la N-hidroxiamina no resulta inesperado, dado que se demostró que cierto número de drogas básicas tipo tropina sufren N-dealquilación, dando aminas secundarias, y pueden luego estar disponibles para una mayor oxidación a hidroxiaminas (94).

La N-hidroxilación ha mostrado ser un importante paso en el metabolismo de aminas y amidas aromáticas, al dar inter-

mediarios reactivos que están vinculados en la carcinogénesis y hepatotoxicidad. Este camino depende en gran medida de la estructura de la amina, la especie animal y factores ambientales. Estos requerimientos explicarían quizá la falta de hepatotoxicidad demostrada por la mayoría de las sustancias análogas a la cocaína en cuanto a sus propiedades de anestésico local o de estimulante del Sistema Nervioso Central.

En base a lo anterior, se sugiere que el grupo carboximetilo no sólo debe estar presente sino también tener una orientación determinada, ya que los compuestos carentes de estos dos requerimientos son inactivos para producir daño en hígado (90). Por ejemplo, existe una diferencia notable entre el metabolismo de la cocaína y la pseudococaína (95), que presenta como diferencia el grupo carboximetilo en la posición ecuatorial.

Se propuso entonces como siguiente metabolito a la N-hidroxi-NC (73) y se sugirió que la FAD-M microsomal purificada y en suspensión microsomal podría oxidar la NC a N-hidroxi-NC. Basado en cálculos de la  $K_m$ , la NC resulta ser un sustrato excelente para la FAD-M.

La confirmación de la formación de N-hidroxi-NC mediada por FAD-M se demuestra de dos maneras: inhibiendo el cit.-P-450 o efectuando la reacción "in vitro" en ausencia del

cofactor NADPH necesario para la enzima FAD-M; en el primer caso se obtiene el metabolito hidroxilado a partir de NC y en el segundo caso no se detecta.

Así queda claro que la FAD-M es un sistema enzimático importante en lo que se refiere a que es el único que media en la oxidación de la NC a N-hidroxi-NC "in vitro" e "in vivo", independientemente del cit.P-450.

En ratones castrados en los que se produce un aumento de la FAD-M hepática, se observó un incremento en la hepatotoxicidad inducida por administración de NC, comparando con animales en los cuales la operación fue simulada (96). Sin embargo, la hepatotoxicidad comprobada de la N-hidroxi-NC es bloqueada por pretratamiento con SKF-525 A y potenciada con pretratamiento con fenobarbital. Esto sugiere que no es la N-hidroxi-NC "per se" la productora del daño, y que existe otro paso metabólico. Este paso consiste en la oxidación de un electrón de la N-hidroxi-NC, produciendo nitróxido de norcocaína (nitróxido NC), habiéndose determinado por espectroscopía EPR debido a que se trata de un radical libre.

A pesar de que una oxidación que involucra un solo electrón no es frecuentemente mediada por el cit.P-450, las investigaciones realizadas ponen en evidencia que la oxidación en este caso es catalizada por el citado citocromo en presencia de NADPH y oxígeno.

Se descarta la posibilidad de que sea el peróxido de hidrógeno o el superóxido, producidos en las reacciones laterales, los responsables de la mencionada oxidación, ya que el agregado al medio de estudio de catalasa o superóxido dismutasa no provoca la inhibición de la producción de nitróxido-NC (97), considerada la última hepatotoxina del sistema.

El conocimiento en general de N-oxidación de aminas secundarias y terciarias indica que se produce la formación de N-óxidos intermediarios activos capaces de uniones covalentes con macromoléculas de los tejidos.

Recientes estudios, sin embargo, han demostrado que el radical libre no sería reactivo con proteínas microsomales ni del citosol.

Al descartarse la formación de una unión covalente del nitróxido, se estudiaron otras reacciones de dicho radical.

Así, a raíz de que algunos investigadores reportaron que la administración de cocaína a ratones produce depleción del glutatión reducido (GSH) en el hígado, se investigó la posibilidad de que el nitróxido-NC reaccionara con compuestos sulfhidrúlicos de bajo peso molecular, basándose en que dicho tripéptido protege al hígado contra la hepatotoxicidad inducida por la cocaína en ratones con o sin pretratamiento con fenobarbital. Asimismo, la depleción del contenido intracelular de GSH por pretratamiento con dietilma-

leato potencia la hepatotoxicidad.

Por ello es tentador suponer que el nitróxido-NC reacciona directamente con el GSH. Sin embargo, el nitróxido-NC purificado no resultó ser reactivo ni con el GSH ni con la cisteína. De este modo, la depleción "in vivo" del GSH hepático después de la administración de cocaína no estaría vinculada con la reacción directa entre el nitróxido y el glutatión.

Por otro lado, al igual que otros nitróxidos, el nitróxido-NC es reducido por los microsomas hepáticos en presencia de NADPH o NADH. Sin embargo, esta reacción no es mediada por el cit.P-450 sino por flavoproteínas como cit.P-450 reductasa y FAD-M (70) (97) (Figura 19).

Como consecuencia de esta reducción en el caso de NADPH resulta la formación de un radical libre, piridinium nucleótido, que reacciona con el oxígeno para producir un radical superóxido. La generación de este radical sugiere que la peroxidación lipídica puede ser estimulada "in vitro" e "in vivo" durante el metabolismo de la cocaína. De hecho se ha comprobado que la administración aguda de cocaína causa un rápido y significativo aumento en la peroxidación lipídica en ratones.

Además, "in vitro" sobre microsomas hepáticos de ratones previamente tratados con fenobarbital, que se incubaron ae-

rómicamente en presencia de NADPH, la cocaína y sus tres metabolitos oxidativos estimulan la peroxidación lipídica microsomal, que es medida por el incremento de la formación de productos reactivos del ácido tiobarbitúrico, siendo el nitróxido-NC el que produce más alto grado, siguiéndole en orden decreciente la N-hidroxi-NC, NC y cocaína (98).

La peroxidación lipídica ocurre a través de eventos complejos, que involucran mecanismos catalíticos enzimáticos y no enzimáticos, pudiéndose comprobar que la cocaína altera la peroxidación lipídica no enzimática al nivel de las mitocondrias del cerebro de ratas. Se realizó el estudio sobre esas organelas debido a que en ellas abundan los ácidos grasos poliinsaturados, susceptibles del ataque oxidativo (99).

Todo lo anterior sugiere que el fenómeno sería parte del mecanismo por el cual la cocaína produce hepatotoxicidad.

Otro proceso involucrado, ya mencionado, es el que está relacionado con la depleción hepática del GSH reducido. Esta depleción resulta entonces primariamente como consecuencia de la disminución de NADPH causada por su utilización en la producción de peróxido de hidrógeno durante el metabolismo oxidativo de la cocaína.

El ciclo oxidativo-reductor de N-hidroxi-NC a nitróxido-NC y viceversa, se produce a expensas de NADPH (Figura 20).

El peróxido de hidrógeno es reducido por la glutatión peroxidasa con conversión de GSH reducido en glutatión oxidado (GSSG). La reacción inversa, de reducción del GSSG mediada por glutatión reductasa y NADPH, se ve parcialmente bloqueada porque el nivel de este último cofactor necesario para la enzima está reducido por el ciclo redox.

Como resultado de lo anterior, el GSSG es activamente excretado por las células, de manera de mantener la relación normal de GSH:GSSG en el interior de las mismas, y por lo tanto resulta que la cocaína causa una depleción de glutatión. Como consecuencia de la disminución de GSH, la actividad de la enzima glutatión peroxidasa es menor, resultando que el peróxido de hidrógeno es reducido en menor proporción.

La presencia tanto del peróxido de hidrógeno como del superóxido podría servir de estimulante para la peroxidación lipídica, que deteriora la membrana celular y la actividad de enzimas hepáticas que requieren de la integridad de la misma, produciendo muerte celular (70).

Como todos los estudios se realizaron sobre ratones, ya que se comprobó que era la especie susceptible de sufrir la acción hepatotóxica de la cocaína, quedaba sin resolver la posible implicación de la droga en el daño hepático en humanos, pero en el año 1987 se reporta el caso de un paciente

con hepatonecrosis asociada con el uso de cocaína. El examen postmortem del hígado mostró una marcada inflamación periportal, necrosis periportal y midzonal de los hepatocitos, y una moderada infiltración grasa. Estos hallazgos patológicos son idénticos a los encontrados previamente en el modelo de la hepatotoxicidad inducida por la cocaína en ratones (100).

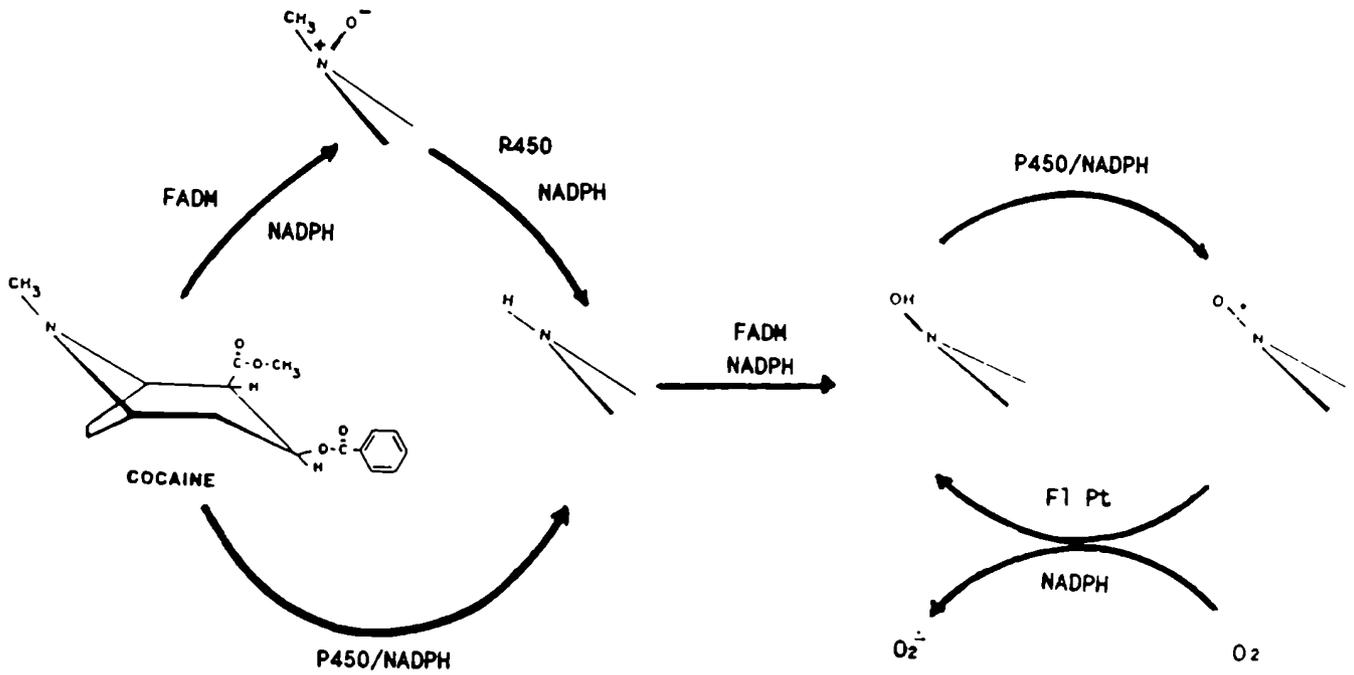


Figura 19: Metabolismo de la cocaína vía oxidativa

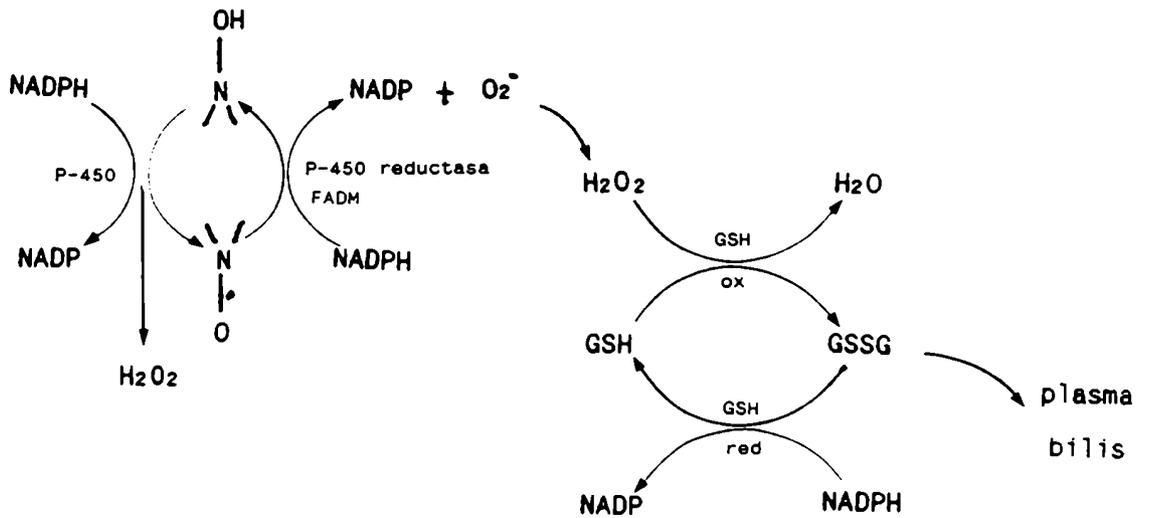


Figura 20: Mecanismo propuesto para explicar la hepatotoxicidad mediada por la cocaína

## V.5 SISTEMA NERVIOSO

La cocaína, como casi todas las drogas de abuso, modifica el comportamiento provocando emociones incontrolables, restricción del almacenamiento de información, limitación de la capacidad de tomar decisiones, y otros tipos de conducta. Esto ha llevado a estudiar cómo reaccionan a dicha droga diferentes áreas del sistema nervioso.

## V.5.1 BASES FISIOLÓGICAS DE LA ACCIÓN DE LAS DROGAS

### V.5.1.1 GENERALIDADES

#### El impulso nervioso

El sistema nervioso, como cualquier otro sistema del organismo, está constituido por células especializadas, llamadas neuronas o células nerviosas. La neurona ha sido definida como una unidad electroquímica porque genera un impulso eléctrico en respuesta a un estímulo químico o mecánico, conduce el impulso a través de su alargada estructura celular, y en sus terminales convierte la actividad eléctrica en una señal química.

Para visualizar la forma en que dichas señales químicas regulan la función de la célula nerviosa, hay que considerar la estructura y función básica de dichas células. Aunque éstas varían en tamaño y forma dependiendo de su localización y su función, consisten básicamente en el cuerpo celular (también llamado pericarion o soma) del cual se extienden prolongaciones filamentosas llamadas dendritas que son las receptoras de los impulsos, y de una prolongación que transmite dichos impulsos, el axón.

Se haría en principio referencia al impulso eléctrico

que viaja a través del axón. Normalmente la célula nerviosa en reposo posee un potencial eléctrico negativo de 60 a 70 milivoltios respecto del exterior; ello es debido a que permite la entrada de iones potasio y elimina activamente los iones sodio mediante la bomba de sodio, que es una proteína transmembranosa, importante desde el punto de vista funcional (proteína ATPasa de sodio-potasio), responsable de la producción de gradientes iónicos a través de membranas celulares nerviosas que permiten el paso del impulso nervioso. Este trabajo se realiza con gasto de energía que queda almacenada en el ácido adenosintrifosfórico (ATP). Cuando la neurona recibe cierta información a través de sus dendritas se producen cambios en la permeabilidad de la membrana a los iones sodio en el punto del estímulo, permitiendo que el sodio ingrese a través del canal de sodio, que es una glucoproteína transmembranosa, cambiando su potencial eléctrico de negativo a positivo (potencial de acción), produciéndose la despolarización. El impulso nervioso actúa después como un estímulo, causando la despolarización en toda la longitud del axón.

#### Transmisión del impulso nervioso

Una característica sobresaliente de las células nervio-

sas es que no establecen contacto físico directo unas con otras sino que están separadas por un espacio microscópico conocido como espacio sináptico, que en la mayor parte de las sinapsis es de 20 nm de espesor, e impide el flujo continuo de impulsos (101) (102). En este espacio intersináptico la transmisión del impulso al cuerpo celular de otra neurona se hace por medio de transmisores químicos o neurotransmisores, que se encuentran localizados en pequeñas vesículas en el extremo del axón y que son liberados durante la actividad nerviosa y cruzan la sinapsis. Estos neurotransmisores tienen la característica química de alterar la membrana postsináptica al unirse a receptores específicos, convirtiendo esta unión en una corriente iónica a través de la membrana y originando un impulso nervioso de la misma intensidad que el que viajaba por el axón precedente.

Por lo tanto, los impulsos nerviosos son provocados por la corriente eléctrica que pasa del cuerpo celular al axón, donde determina fenómenos químicos que se producen debido a movimientos de iones cargados eléctricamente, como sodio y potasio, y esto provoca que las vesículas de sustancia transmisora se unan con la membrana que está en el extremo del axón (membrana presináptica), se abran y liberen el neurotransmisor (Figura 21).

El primer compuesto reconocido como agente que actuaba

en la sinapsis química entre neuronas fue la acetilcolina, luego siguieron la noradrenalina, la dopamina y la serotonina, estas tres últimas denominadas en conjunto aminas biógenas. Estos, más otros neurotransmisores probables, parecían estar especializados en esta tarea y no estar involucrados en ninguna otra actividad bioquímica, encontrándose en pequeñas cantidades. Sin embargo, con posterioridad fueron considerados nuevos e importantes candidatos que también cumplían esa función, como los aminoácidos glutamato, aspartato,  $\gamma$ -aminobutirato, glicina y taurina, pero se apartaban sustancialmente de los anteriores debido a que existían en todas las células y órganos en concentraciones elevadas y también eran utilizados en una amplia serie de vías metabólicas y biosintéticas. Posteriormente se detectaron, aislaron y caracterizaron otra docena de sustancias como posibles neurotransmisores que pertenecían a una categoría química totalmente distinta, los péptidos nerviosos, que tienen actividades más especializadas que los aminoácidos y están presentes en pequeñas cantidades y en regiones localizadas del sistema nervioso.

Otro tipo de sustancias identificadas son las de la categoría funcional de moduladores, que ejercen su efecto tras su liberación sobre las acciones postsinápticas de los neurotransmisores convencionales. Además en los últimos años

se halló que unos treinta potentes compuestos, hidrosolubles, cargados eléctricamente y casi todos ellos aminas y péptidos y algunos agentes insospechados, como la adenosina y ATP, actuaban controlando la comunicación entre las neuronas o entre las uniones de las neuronas con los órganos inervados por ellas.

#### Síntesis e inactivación de los neurotransmisores

Los neurotransmisores se caracterizan por tener mecanismos propios de síntesis, almacenamiento, degradación, recaptación e inactivación (103).

La síntesis de los neurotransmisores tiene lugar, en su mayor parte, en las terminales nerviosas, y puede requerir solamente un paso, como en el caso de la acetilcolina, partiendo de dos componentes, acetato y colina, y de la intervención de la enzima colina acetil transferasa, o bien ser más compleja, como la síntesis de noradrenalina y dopamina, también llamadas catecolaminas, a partir de la tirosina. Los precursores provienen de otras regiones del organismo, como la colina que es sintetizada en primer lugar en el hígado, o la tirosina, que está disponible a partir de depósitos tisulares. En el caso de la serotonina el sustrato inicial es el triptófano, que es un requerimiento esencial de

la dieta y no puede ser sintetizado por el organismo.

Los neurotransmisores una vez sintetizados son almacenados, como en el caso de las aminas biógenas, en las llamadas vesículas granulares o de núcleo denso dentro de los axones y terminales nerviosas, o bien como la acetilcolina, que se encuentra tanto en el sinaptoplasma como en las vesículas sinápticas.

Producida la actividad nerviosa y liberados los transmisores que se unen a los receptores específicos, se inicia la inactivación de los agentes químicos mediante la acción de enzimas o por recaptación de las neuronas por medio de sistemas de transporte de alta afinidad.

Por ejemplo, la acetilcolina es rápidamente degradada por la enzima colinesterasa, presente en la circulación y en los tejidos periféricos. En cambio, las aminas biógenas pueden tomar diferentes caminos: a) pueden ser recaptadas, para ser nuevamente almacenadas dentro de las vesículas en forma granular; b) pueden pasar a la circulación general para ser deaminadas por la monoaminoxidasa (MAO) hepática, y de esta manera ser excretadas en forma de metabolitos inactivos; c) pueden ser recaptadas y destruidas por la MAO mitocondrial; d) pueden ser metiladas por la enzima catecol-O-metiltransferasa (COMT), presente en el citoplasma celular, y de esta forma ser inactivadas. Esta enzima no actúa

sobre la serotonina (102)

### El sistema nervioso

El sistema nervioso se divide en sistema nervioso central (SNC) y sistema nervioso periférico; este último se subdivide en somático y autónomo.

A su vez, el sistema somático se divide en dos tipos, el motor y el sensorial; el primero involucra las vías eferentes que envían los impulsos del SNC al músculo voluntario, y el segundo recibe los impulsos aferentes de los receptores externos.

El autónomo presenta dos subsistemas que en una primera y grosera apreciación puede considerarse que trabajan en forma opuesta, y que son el simpático y el parasimpático.

### Localización de las vías nerviosas

Se ha podido demostrar que las neuronas que producen acetilcolina constituyen muchas vías excitadoras a todo lo largo del sistema nervioso periférico y central y también algunas vías inhibitoras.

En cuanto a las vías noradrenérgicas, éstas forman parte del sistema nervioso periférico, constituyendo el sistema

nervioso simpático a nivel postganglionar, existiendo además dos vías mayores centrales y una menor, que inervan a la mayor parte de las regiones encefálicas, entre las que se encuentran el tronco encefálico, el cerebelo, el hipotálamo, la amígdala, el hipocampo, el septum, el fórnix (Figura 22).

Se han descrito seis vías dopaminérgicas en el SNC además del rol periférico que desempeña la dopamina en los ganglios simpáticos, ganglios viscerales y paredes de las arterias mesentéricas y renales. Dos de las vías centrales inervan el hipotálamo; una vía ascendente importante es el sistema nigroestriatal, que se origina en la pars compacta de la sustancia negra y se proyecta en forma de haz o tracto nigroestriatal hasta el cuerpo estriado. Otro de los circuitos es un sistema tegmentotelencefálico, llamado también sistema mesolímbico; las fibras se originan en el tegmento ventral y se proyectan hasta la amígdala, septum, núcleo accumbens, tubérculo olfatorio y corteza frontal (Figura 22).

También se han revelado las vías de la serotonina en el SNC, una ascendente medial que se proyecta en el hipotálamo y en el área preóptica, y los tractos ascendentes laterales que terminan difusamente en el cuerpo estriado y en el córtex cerebral.

### Receptores pre y postsinápticos

En las neuronas, tanto centrales como las periféricas simpáticas, la despolarización está sujeta a la modulación mediada por receptores situados presinápticamente (104), y que han sido descubiertos recientemente.

En cuanto a los receptores postsinápticos, se confirmó la existencia de diversas subcategorías. En el caso de la acetilcolina, estas subcategorías se distinguieron mediante sus respuestas frente a dos sustancias disponibles cuando se comenzaron las investigaciones sobre la sinapsis, la nicotina y la muscarina. Cada agente estimula diferentes categorías de función colinérgica, y se las llamaron nicotínicas y muscarínicas.

Igual que existen subcategorías de receptores colinérgicos, se han detectado también en los receptores de noradrenalina dos adrenoreceptores  $\alpha$  y  $\beta$ . En principio se pensó que estos dos tipos de receptores mediaban acciones excitadoras (receptor  $\alpha$ ) o inhibitoras (receptor  $\beta$ ) en el sistema nervioso periférico, pero los conocimientos actuales no confirman esta regla rígida y cada órgano periférico debe ser considerado aparte.

Los receptores de la dopamina en el SNC han sido clasificados en cuatro subcategorías, D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub> y D<sub>4</sub>, ba-

sado en estudio de unión de ligandos y en la respuesta frente a diversos fármacos dopaminérgicos. Los datos más recientes muestran que los cuatro receptores se hallan en el cuerpo estriado. El tipo D<sub>2</sub> está localizado en las neuronas intrínsecas, que son postsinápticas con respecto a las terminales dopaminérgicas de la vía nigroestriatal, y en la hipófisis, y se lo cree responsable de los efectos de la dopamina sobre el comportamiento. En las ratas el comportamiento estereotipado parece estar mediado por la estimulación selectiva de los receptores D<sub>2</sub> mediante los fármacos adecuados.

También se han revelado subcategorías de receptores de la serotonina, como el S<sub>1</sub> y S<sub>2</sub>, y parece probable que los S<sub>1</sub> medien la inhibición y los S<sub>2</sub> la excitación (102).

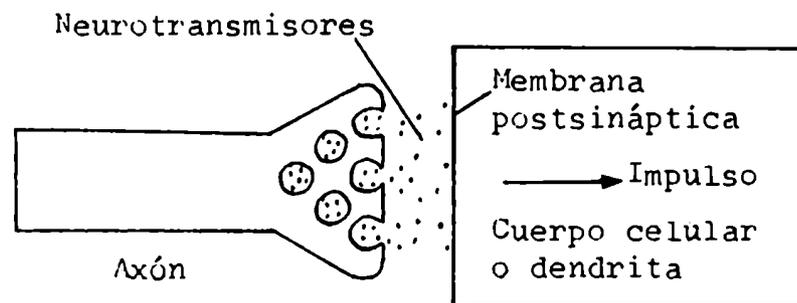
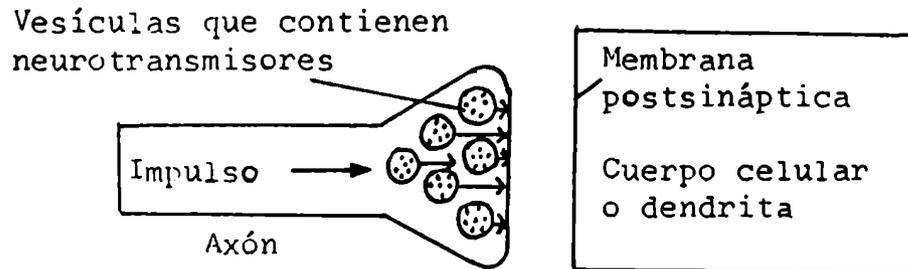
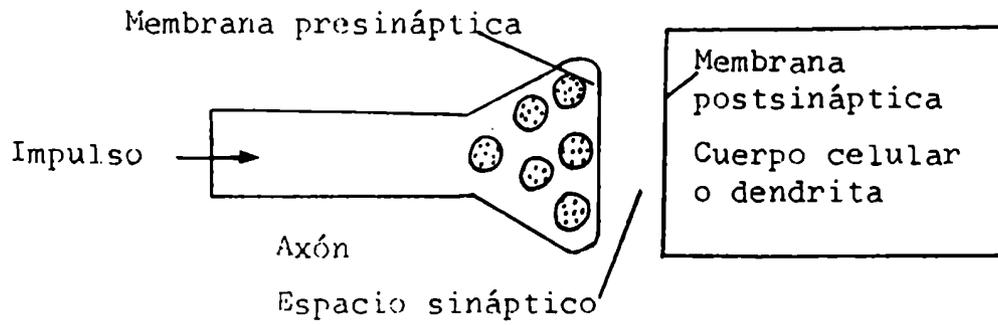


Figura 21: Esquema de la transmisión del impulso nervioso

## Vías Dopaminérgicas

## Vías Noradrenérgicas

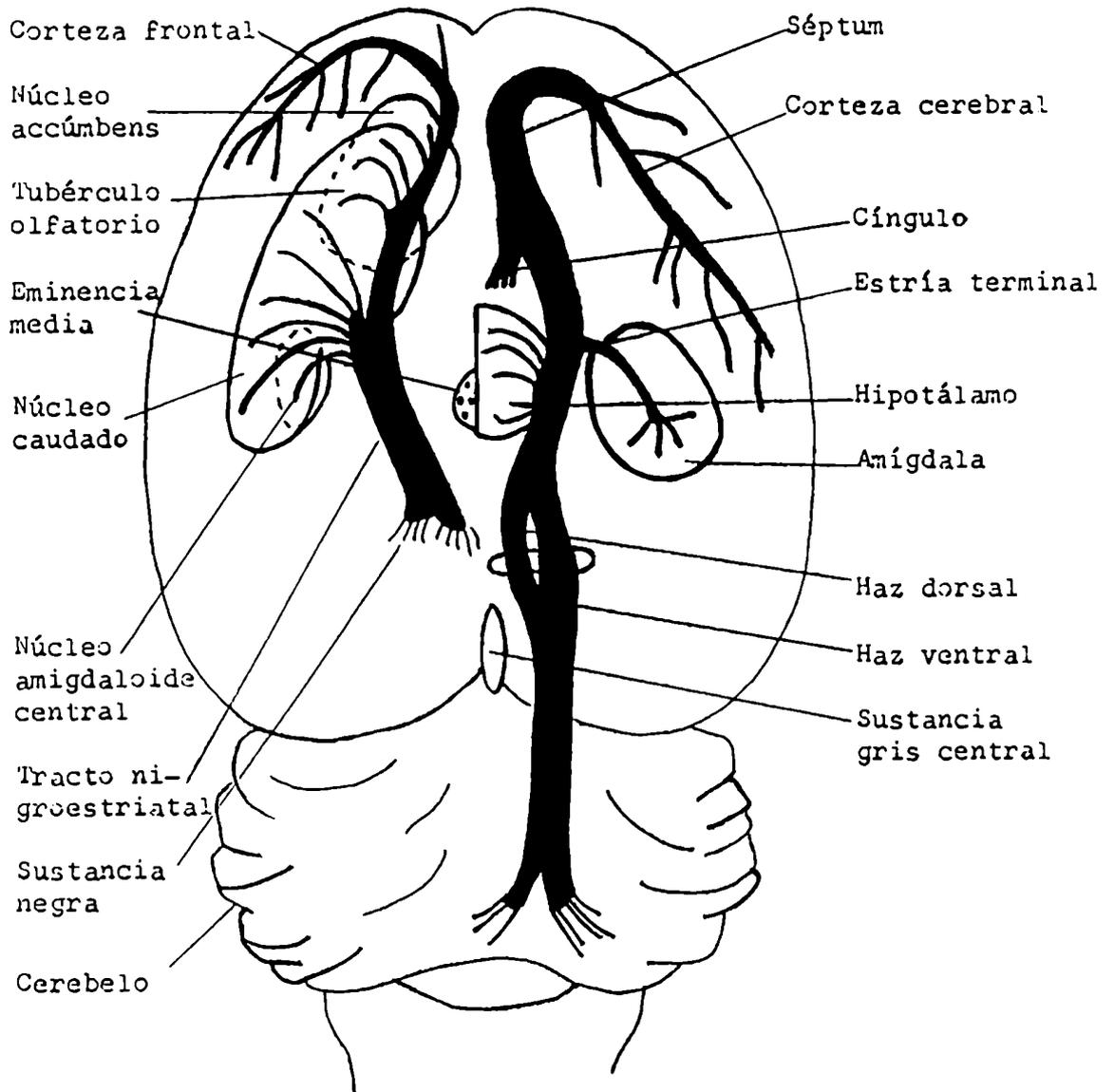


Figura 22: Vías de la dopamina y la noradrenalina en un corte horizontal de cerebro de rata

#### V.5.1.2 TEORIA DEL COMPORTAMIENTO

A pesar de que todavía hay mucho que dilucidar para poder definir el comportamiento de los mamíferos basándose en los sistemas de neurotransmisores y vías nerviosas, es evidente que el comportamiento se inicia en el cerebro y puede manifestarse a través del sistema nervioso periférico en forma de respuestas voluntarias o involuntarias complejas, o a través del hipotálamo en forma de cambios de la secreción endocrina. Las manifestaciones involuntarias de la actividad central, expresadas mediante el sistema nervioso autónomo, dan como consecuencia llanto, temblor, sudoración, saltos del corazón, etc., pero otros estados cerebrales o estados de ánimo no se expresan a través de respuestas corporales y por lo tanto no son fácilmente accesibles al estudio y la medición.

Cada sistema del organismo tiene que ver con la conducta, y todos están, al menos en parte, regulados por el cerebro, convirtiéndose éste en el punto de partida para el análisis del efecto de ciertas sustancias químicas extrañas, como las drogas.

Las estructuras encefálicas que parecen estar involucradas en los mecanismos nerviosos que generan las emociones reciben el nombre de sistema límbico. Este sistema compren-

de la circunvolución cingular de la corteza cerebral, hipocampo, amígdala, septum, hipotálamo, bulbo olfatorio, tálamo y fórnix (Figura 23). Varios aspectos típicos del comportamiento, como el miedo, la rabia, la satisfacción y el placer, se ven influidos por el sistema límbico.

Un determinado sistema de neurotransmisores dentro del encéfalo puede jugar un rol dominante o de iniciación en el desencadenamiento o mantenimiento de un programa de comportamiento específico, pero en general participa más de un sistema de neurotransmisores. La influencia de diversos fármacos sobre el comportamiento condicionado puede orientar acerca de qué sistemas de neurotransmisores están involucrados.

Como los fenómenos sinápticos son de naturaleza química, resultan vulnerables a los diversos tipos de drogas. Las drogas depresoras deben su acción a que inhiben la producción del neurotransmisor, o éste se inactiva más rápidamente que lo normal, o alteran la membrana postsináptica y se produce el bloqueo del receptor. En contraposición, las estimulantes activan las neuronas a un ritmo mayor que el normal porque provocan una mayor liberación del transmisor, o tienen la propiedad de imitar su acción o de impedir su reabsorción (103).

Se considera que las sustancias químicas activadoras o

la estimulación eléctrica en ciertas zonas del cerebro inducen un determinado tipo de comportamiento que se caracteriza por conducir a una gratificación o recompensa. Por ejemplo, las drogas de abuso actúan sobre esos circuitos normales de recompensa produciendo un refuerzo del comportamiento que conduce a la autoadministración más frecuente; por lo tanto actualmente se intenta conocer más profundamente esos mecanismos nerviosos a fin de relacionarlos con el riesgo de abuso.

#### Sistemas de neurotransmisores involucrados en el comportamiento

##### a) Sistemas catecolamínicos

Se ha podido demostrar que la dopamina es un neurotransmisor de gran importancia en el encéfalo, que participa en una serie de mecanismos encefálicos aparentemente distintos, al menos desde el punto de vista cualitativo, por ejemplo el control central de funciones como la locomoción y los procesos nerviosos que ocasionan comportamiento motivacional, estados de ánimo y emoción.

Las inyecciones intrahipotalámicas e intraestriatales de dopamina producen hiperactividad motora y las inyecciones

de dopamina o noradrenalina en el estriado de un hemisferio provocan un movimiento circular orientado en dirección opuesta al lugar que recibió la inyección. Estas y otras observaciones sugieren que las neuronas catecolaminérgicas centrales intervienen en el control de la actividad motora.

Estudios efectuados con anfetaminas en animales de experimentación han demostrado que a dosis bajas causan un incremento considerable de la actividad motora. A dosis aún más bajas conducen a los patrones de comportamiento estereotipado que se manifiesta por olfateo, masticación repetitiva, adopción de diversas actitudes posturales que no persiguen funcionalidad alguna. Esto se debe a que la anfetamina libera la noradrenalina de sus lugares de almacenamiento, y a dosis bajas provoca un incremento de las concentraciones extracelulares de las monoaminas.

En modelos experimentales se ha podido demostrar la participación de los sistemas dopaminérgicos en el comportamiento motivacional y el estudio de las vías nerviosas encefálicas que posibilitan los mecanismos de recompensa. Una experiencia consiste en implantar electrodos en un animal y producir una estimulación eléctrica en regiones encefálicas específicas, como el área hipotalámica o las estructuras del sistema límbico. El animal es capaz de autoadministrarse el estímulo eléctrico accionando una palanca, debido a

la aparente sensación placentera que le provoca, produciendo un refuerzo del comportamiento.

Otro intento experimental que pone en evidencia la participación de la noradrenalina y la dopamina en los mecanismos nerviosos que controlan los procesos de recompensa y aprendizaje, utiliza el modelo de autoadministración voluntaria de soluciones de fármacos a través de una cánula endovenosa crónica, mediante el manejo de una palanca. Por ejemplo, si la droga ensayada es la anfetamina y al animal en experimentación se le administra un bloqueante de la dopamina, se incrementa la frecuencia de actuación sobre la palanca, lo que indica que la anfetamina actúa a través de los sistemas dopaminérgicos. La autoadministración de otras drogas, como la cocaína o morfina, es también susceptible a los antagonistas dopaminérgicos o a otras acciones sobre las vías dopaminérgicas. Entonces resulta que la autoadministración de una serie de sustancias puede hacer intervenir a estas vías en el reforzamiento y recompensa.

Si bien algunos estudios señalan un posible papel de la noradrenalina en los mecanismos de recompensa, otros suministran pruebas en contra de una amplia participación de las vías noradrenérgicas; por ejemplo, los bloqueantes  $\alpha$  y  $\beta$  noradrenérgicos no ejercen ninguna acción sobre la autoadministración de cocaína o anfetamina.

Sin embargo, existen datos concretos en favor de la participación de la dopamina y la noradrenalina en las vías que median la autoestimulación. Aunque la importancia de cada una de ellas todavía se estudia, parece ser que la dopamina resulta la catecolamina más importante en la autoestimulación (102).

El sinnúmero de experiencias realizadas ha dado lugar a una hipótesis sobre la implicancia de las vías dopaminérgicas y noradrenérgicas en los mecanismos del refuerzo y de otros patrones de comportamiento (Figura 24).

Las vías dopaminérgicas parecen controlar la inducción y los mecanismos de actividad motora que llevan al animal a intentar conseguir un estímulo de refuerzo o a activar las corrientes de autoestimulación. Las vías noradrenérgicas pueden estar más relacionadas con la facilidad del aprendizaje, posiblemente por refuerzo y consolidación de la respuesta, y están involucradas en el proceso de refuerzo.

#### b) Sistemas serotoninérgicos

Se ha demostrado que la serotonina forma parte del proceso de autoestimulación, es decir existen más sistemas de neurotransmisores que participan de igual forma que las catecolaminas.

La depleción encefálica de serotonina provoca en los animales de laboratorio incremento en la actividad motora e insomnio. Por lo tanto, el sistema mediado por la serotonina lleva a cabo efectos "inhibidores", en contraposición con los "excitadores" de los sistemas catecolaminérgicos. Sin embargo, existen evidencias de que el incremento de la serotonina y algunos compuestos indol similares activan en el lugar el comportamiento motor, provocando temblor e incluso convulsiones, involucrando movimiento complejos y repetitivos de las extremidades, tronco o cabeza. El síndrome de hiperactividad provocado por la serotonina viene acompañado por una elevación de la temperatura corporal.

Aparentemente esta discrepancia se debe a una mayor actividad serotoninérgica de las vías descendentes, que son probablemente excitadoras, y predomina sobre la acción de las vías cerebrales inhibitoras ascendentes, pero es evidente que la serotonina puede tener acciones excitadoras directas en algunas de sus vías.

El movimiento poco habitual de todo el organismo llamado "sacudida de perro mojado" puede ser inducido por la administración sistémica de 5-hidroxitriptofano (precursor de la serotonina), o de fármacos liberadores de serotonina o diversos agonistas. Este fenómeno de comportamiento requiere la participación conjunta de las vías serotoninérgicas y

dopaminérgicas, y se ha demostrado al administrarse liberadores de catecolaminas y de serotonina. También la interacción entre serotonina y dopamina puede apreciarse en el comportamiento estereotipado dependiente de la dopamina en las ratas.

En el núcleo accumbens y en el sistema nigroestriatal, la dopamina y la serotonina ejercen efectos antagonistas mutuos en el comportamiento estereotipado (102).



#### V.5.2 LA COCAINA Y EL SISTEMA NERVIOSO

La cocaína es el único compuesto que es al mismo tiempo un potente anestésico local y un simpaticomimético con importantes efectos estimulantes en el SNC (105).

#### V.5.2.1 SISTEMA NERVIOSO PERIFERICO

El efecto de anestésico local de la cocaína se debe a su habilidad de bloquear la iniciación y conducción de los impulsos eléctricos dentro de la célula nerviosa, al impedir el rápido incremento en la permeabilidad de la membrana a los iones sodio durante la despolarización. El mecanismo de acción de los anestésicos locales, en general, consiste en impedir la generación y la conducción del impulso nervioso, siendo el sitio principal donde actúan la membrana celular. El bloqueo de la conducción se produce porque se obstaculizan los procesos fundamentales de la generación del potencial de acción del nervio, es decir el aumento transitorio de la permeabilidad de la membrana a los iones sodio, pero este bloqueo no está acompañado por cambios importantes en el potencial de reposo. Es generalmente aceptado que la cocaína compite con el calcio en algún sitio receptor que controla la permeabilidad de la membrana (10) (70).

Un estudio llevado a cabo sobre la piel aislada de sapo permite obtener como conclusiones que, de acuerdo con la ecuación de Michaelis-Menten, modificada por Dixon, existe un antagonismo de tipo competitivo entre la cocaína y el sodio, así como un antagonismo entre el calcio y la cocaína (106).

Se ha instituido un modelo de receptor que tiene la particularidad de que la unión con los anestésicos locales se produce por intermedio de enlaces débiles, lo que explica su reversibilidad y corta duración de acción (107).

Además se ha sugerido que el receptor está aproximadamente a mitad de la distancia hacia la parte inferior del canal de sodio (10); la unión de la cocaína a estos receptores es lo que impide el tránsito de los iones sodio a través de la membrana (4) (108).

La cocaína es un típico simpaticomimético, ya que actúa competitivamente bloqueando la recaptación presináptica de la noradrenalina a nivel del sistema nervioso autónomo, provocando un exceso en la transmisión en los receptores post-sinápticos y cambios en la utilización del calcio (109).

La activación de estos mecanismos produce vasoconstricción, taquicardia, predisposición a arritmia ventricular y aumento agudo de la presión arterial (57), y suministrada en altas dosis aumenta la temperatura corporal y dilata las pupilas (4) (104).

#### V.5.2.2 SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

Sin embargo, el hecho de que la cocaína tenga tanto auge como droga de abuso no se debe a las propiedades antes mencionadas sino a su acción sobre el SNC y en particular sobre ciertos centros específicos. Se conoce que la cocaína estimula un sinnúmero de comportamientos, como la actividad motora espontánea, la autoadministración y el comportamiento estereotipado (110). Los estudios tendientes a esclarecer la acción estimulante de la cocaína sobre el SNC la atribuyen a la habilidad de la droga de bloquear la recaptación de neurotransmisores en el cerebro, como la dopamina, noradrenalina y serotonina.

Uno de los efectos no deseados es que a altas dosis produce convulsiones clónicas. A bajas dosis tiene un efecto opuesto, inhibiendo las convulsiones producidas por agentes convulsivantes o por shock eléctrico. Como algunos anestésicos locales también producen convulsiones, se pensó en un principio que se debía a esta propiedad. Sin embargo, la reserpina previene las convulsiones desencadenadas por la cocaína, lo que indica que está implicada la vía noradrenérgica (111) (112).

Varios estudios han reportado que al producirse una o más convulsiones por cocaína se acrecienta el efecto con-

vulsivo de la droga, aunque otros estudios han observado tolerancia. La misma forma de sensibilización se ha presentado con otras drogas convulsivantes, como la lidocaína y agentes colinérgicos, así como también con otros métodos para producir convulsiones, por ejemplo el shock electroconvulsivo. Es evidente que la sensibilidad cruzada entre agentes convulsivantes puede ocurrir al repetirse la administración de un agente resultando sensible para otro.

Estudios más recientes han demostrado que la administración crónica de cocaína puede provocar no sólo un aumento del riesgo de convulsiones sino también hiperactividad y conducta estereotipada. Estos efectos motores incrementados pueden investigarse en animales de laboratorio y son similares a los producidos por otros estimulantes psicomotores, como la anfetamina. Como ya se ha mencionado, este tipo de drogas produce una alteración en las respuestas aun a bajas dosis, incrementando por ejemplo la locomoción, acicalamiento o exploración, e incluso puede dar paso a una conducta estereotipada, como por ejemplo repetición de uno o pocos ítems de conducta.

Así, en ratas la cocaína o la anfetamina provocan movimiento de cabeza, mordisqueo, olfateo y lameteo (113). La sensibilización ocurre en una variedad de especies incluyendo ratones, ratas, gatos y monos, y muchos investigadores

creen que es el modelo de la psicosis o esquizofrenia. Además las observaciones sobre el incremento de la sensibilidad de algunos de los efectos de la cocaína que aparecen con mayor probabilidad con el uso continuo de la droga, podrían explicar la psicosis paranoica y ciertos tipos de toxicidades (114) (115).

Sin embargo, se ha comprobado que también se puede producir sensibilización después de una única inyección (116).

El aspecto neurobiológico de la sensibilización es complejo debido a la variedad de cambios neuroquímicos provocados por la administración crónica. Algunos estudios llevados a cabo sobre zonas determinadas del SNC han podido observar incremento en la liberación de dopamina en el striatum y cambios en las vías dopaminérgicas mesolímbicas y nigroestriatal (113). Los mecanismos propuestos para justificar el fenómeno de la sensibilización incluyen supersensibilidad de los receptores por depleción de las catecolaminas, desensibilización de los autorreceptores de la dopamina, e incremento de los efectos de los receptores postsinápticos catecolaminérgicos (117).

Se ha comprobado la importancia de los dos subtipos de receptores dopaminérgicos, D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub>, en la mediación de los efectos de la cocaína (118).

Por otra parte, complicando aún más el panorama, en es-

tudios realizados con monos a los que se les administró por varios días dosis no convulsivantes, fueron necesarias, después de este tratamiento, dosis más altas que las normalmente utilizadas para provocar convulsiones, indicando esto el desarrollo de tolerancia más que de sensibilidad (119).

No se ha esclarecido todavía si la administración repetida de cocaína concluye en tolerancia o sensibilización, y algunos investigadores han intentado identificar los factores que contribuyen a esta diferencia en los resultados. Estos estudios han demostrado que la dosis usada para producir los efectos en el comportamiento es una importante variable (117). Tanto la euforia como la psicosis están vinculadas con el incremento de la actividad en las vías dopaminérgicas (120).

La hiperactividad inducida por la cocaína se debe a diversos mecanismos, como el aumento de la actividad noradrenérgica en el hipocampo y otras áreas, y al incremento de la dopamina en el núcleo accumbens y en el hipocampo. Además, los mecanismos serotoninérgicos y colinérgicos también están implicados en la hiperactividad, y la cocaína ha demostrado ser el más potente inhibidor de la retoma de serotonina, comparado con los de la dopamina y noradrenalina (110).

En un intento por comprender los mecanismos nerviosos

que provocan el riesgo del abuso de la cocaína y otras drogas, se investigaron las estructuras cerebrales implicadas en los procesos normales de refuerzo, dado que se sabe que el cerebro tiene circuitos neuronales especializados que son activados por los distintos reforzadores capaces de influir en el comportamiento, involucrando a los sistemas catecolaminérgicos como probables eslabones en dichos circuitos reforzadores (121).

La tendencia a la autoadministración de la droga en los animales de laboratorio mencionada previamente en este capítulo, se ha asociado principalmente con la acción sobre la sinapsis dopaminérgica.

Se ha demostrado la relación entre los efectos reforzadores del comportamiento repetitivo que conduce a la autoadministración cada vez más frecuente y la dependencia potencial de las drogas, estableciendo que la cocaína, como la anfetamina, facilita la activación del sistema de refuerzo por incremento de la neurotransmisión en los tractos dopaminérgicos mesolímbicos y/o mesocorticales (122). En los humanos la activación de estos caminos produciría sensaciones de euforia. En experimentos con animales en los cuales se provocan lesiones de estas vías dopaminérgicas, o se bloquean los receptores, se produce la atenuación de los efectos de la cocaína, mientras que el bloqueo selectivo de la

sinapsis noradrenérgica sola no tiene efectos similares; las células del núcleo accumbens mediadas por la dopamina tienen una gran importancia en el refuerzo estimulante psicomotor, las lesiones inducidas sobre esta estructura por medio de neurotoxinas reducen o eliminan la acción reforzadora de la cocaína. Las inyecciones de cocaína en la corteza de ratas también provocan refuerzo; de este modo se concluye que puede haber más de una vía dopaminérgica o región que participa en la red de circuitos gratificantes (123). Sin embargo, investigaciones más recientes han comprometido también a los mecanismos serotoninérgicos (124).

Ratas a las que se les dio la posibilidad de libre acceso a la cocaína intravenosa se la autoadministraban al grado de excluir la ingesta de alimentos; por lo tanto, perdían peso y habitualmente morían en unas pocas semanas (125). Los conocimientos sobre la conducta de los drogadictos, en cambio, sugieren que la cocaína no presenta tales efectos compulsivos en el hombre; sin embargo hay que tener en cuenta que puede deberse a que el acceso a la droga es limitado debido al precio y a la disponibilidad más que a la seguridad de la droga en sí. Existen también informes que avalan este razonamiento, ya que entre los individuos que tienen acceso ilimitado se comprobó el abuso compulsivo y potencialmente letal de la cocaína (121).

Los efectos gratificantes de la alimentación y el agua parecen depender conjuntamente con los de la cocaína y otras drogas, de la integridad del vínculo dopaminérgico en la red de circuitos implicados en el refuerzo (126). Los efectos gratificantes de la cocaína, sin embargo, no necesitan ser transmitidos al SNC a través de la red de nervios sensoriales como los mencionados de la alimentación y el agua, y pueden activar poderosa y directamente los circuitos centrales del comportamiento. Por ello no sorprende que la motivación por cocaína domine a las producidas por sustancias más esenciales para la salud (121). Por lo tanto, los estudios experimentales han demostrado que la intensidad de las propiedades reforzadoras de la cocaína es muy importante, a tal punto que puede concluirse que dicha propiedad por sí sola es un factor que contribuye al excesivo uso ilícito de la droga y que le ha dado la particularidad de presentar una alta dependencia potencial. Sin embargo es necesario aclarar que su propiedad de generar hábito, y por ende su responsabilidad de ser adictiva, es independiente del síndrome clásico de dependencia física (127). Estudios efectuados con opiáceos que presentan probada dependencia física ponen en evidencia la existencia de mecanismos neuronales anatómicamente distintos para el reforzamiento y la dependencia opiácea (127).

En la actualidad se confirma que la cocaína produce una dependencia similar, en magnitud y resistencia al tratamiento, a la de otras drogas de abuso, como el alcohol y opiáceos, pero que esta dependencia difiere sustancialmente de los modelos de abuso anteriormente establecidos.

Se han observado tres fases en los modelos de supresión de cocaína que ayudan a disipar la idea de que la cocaína no produce síndrome de abstinencia:

Fase 1: denominada "crash". Inmediatamente después de concluir la sesión con cocaína aparecen el deseo vehemente de una nueva aplicación, depresión, agitación, ansiedad y, ocasionalmente, ideas suicidas. Luego de una a cuatro horas del último ingreso de la droga, el deseo vehemente es suplantado por pronunciada fatiga y sueño. Estos efectos son debidos a una aguda depleción de la neurotransmisión.

Fase 2: abstinencia. Los síntomas fisiológicos más usuales indicativos del síndrome de abstinencia, como hipertensión, taquicardia, sudoración, piel de gallina y calambres, producidos por el abuso de otras drogas, no se detectan en los adictos a la cocaína, lo que ha llevado a sostener por mucho tiempo que la adicción a la cocaína es puramente psicológica. Se ha observado en los drogadictos que aparece un cuadro en el que predomina disminución de la actividad, intenso tedio con limitado interés por el medio ambiente

(anhedonia), después de un breve intervalo eutímico que sigue al "crash". Estos síntomas llevan frecuentemente a la reanudación del uso de la cocaína, y vuelve a cumplirse el ciclo sesión-crash-intervalo eutímico-anhedonia-recaída-sesión. También se ha observado que los adictos son capaces de soportar la anhedonia al evocar el placer de euforia provocado por la cocaína; sin embargo, esto desencadena el deseo de una nueva sesión.

El estado de anhedonia, el deseo vehemente y la reanudación del uso, son paralelos con lo encontrado en otras drogas de abuso. Una única dosis de cocaína produce una exagerada euforia, pero utilizada crónicamente desencadena un síndrome de abstinencia que se caracteriza por disminución de la euforia y producción de anhedonia.

La concordancia de estos síntomas con varios tipos de alteraciones en el comportamiento de origen neurofisiológico después de estimulación crónica en animales, permite el concepto de que las manifestaciones psicológicas son una neuroadaptación de los sistemas de recompensa del cerebro debido a las perturbaciones crónicas de la cocaína, y de aquí la hipótesis de que el origen es fisiológico a pesar de que los síntomas se expresan como psicológicos.

Una forma de explicar estos procesos en el caso del uso crónico de cocaína se basa en el hecho de que en las vías

dopaminérgicas se produce una adaptación neuroquímica, resultando en supersensibilidad de los receptores inhibidores y disminución de los niveles de dopamina en el SNC, lo que provoca una disminución de la neurotransmisión en ausencia de cocaína.

Este fenómeno puede ser clínicamente observado dentro de los 7 días de suspendida la droga, coincidiendo con la anhedonia y asociado con el síndrome de abstinencia.

Fase 3: extinción. Si se suprime completamente el acceso a la cocaína, el deseo vehemente y los recuerdos de la euforia provocada por la droga disminuyen progresivamente, produciendo esta fase final de extinción. Si bien las alucinaciones cesan en general al discontinuarse el uso, la ilusión paranoica puede continuar. Este daño por abuso de la droga no se ha dilucidado totalmente; sin embargo, se sabe que el uso crónico de estimulantes produce una degeneración irreversible de las neuronas, particularmente de la vía dopaminérgica. Una neurotoxina, 6-hidroxidopamina, producida después del uso crónico de anfetamina, se considera el agente causal del daño. Como los síntomas psicológicos son similares para la cocaína, se ha considerado a dicha neurotoxina responsable de la psicosis paranoica y del hecho de que en algunas personas, después de casi 10 años de abandonar el uso de la droga, persiste la anhedonia y el deseo

vehemente (60) (128). Por ello el porcentaje de recaída suele ser muy alto.

El hecho de que la cocaína presente estas características en cuanto al síndrome de abstinencia, es decir que no se observan los síntomas dramáticos y a corto plazo de otras drogas de abuso, y dada la posibilidad de que el adicto abandonara el uso por unos días, parecía indicar que podía existir un manejo de la situación, y por ello la cocaína fue considerada hasta hace poco una droga no adictiva. Hoy se sabe con certeza que la cocaína no sólo produce dependencia psíquica sino que compromete la dependencia física, resultando así una droga de alto riesgo.

## VI ANTECEDENTES RELATIVOS A LA IDENTIFICACION Y DETERMINACION DE LA COCAINA Y SUS METABOLITOS

Las propiedades estimulantes y euforizantes de la cocaína le han conferido un rol relevante en el tráfico y en el consumo ilícito.

Esto ha generado un interés especial en determinar su presencia en diversidad de matrices y sobre todo en fluidos biológicos, a fin de esclarecer y resolver los aspectos toxicológicos y legales que resultan de la investigación del abuso de drogas.

Para la elección de la metodología a aplicar es necesario conocer el objetivo del análisis, el tipo de muestra, la experiencia y el equipamiento del laboratorio.

Los principales métodos de identificación y determinación de la cocaína en muestras provenientes del tráfico ilícito y de la droga y sus metabolitos en material biológico, ya sea con fines de investigación o para el esclarecimiento de casos legales, son los siguientes: cromatografía en capa delgada (CCD), espectrometría infrarroja, cromatografía gas líquido (CGL), cromatografía líquida de alta presión (HPLC), cromatografía gas-líquido acoplada a un espectrómetro de masa (CGL/MS), y ensayos inmunológicos.

La aplicación de estas técnicas requiere un previo tra-

tamiento, dependiendo éste del tipo de muestra a analizar. Las más complejas involucran aislamiento mediante extracciones, purificaciones diversas, derivatizaciones, etc., dando una variedad de métodos con distinta especificidad y sensibilidad.

## VI.1 ESTUDIOS EN TRAFICO ILICITO

Es fundamental tener en cuenta que en la mayoría de las muestras provenientes de los procedimientos de incautación por ejecución de la ley se desconoce la droga o drogas involucradas y es necesario contar con métodos que permitan identificarlas entre una diversidad de sustancias de uso ilegal.

### Aislamiento y purificación

En el procesamiento de este tipo de muestras, consideradas más simples en su análisis, existen problemas de orden analítico, debido principalmente a la comercialización clandestina que, con el fin de obtener mayores beneficios económicos, agrega diversos componentes, obteniéndose en algunos casos mezclas complejas. Tal el caso de la cocaína, que frecuentemente se encuentra diluída con otros anestésicos locales no sujetos a control y sustancias inertes, siendo necesario conocer no sólo la presencia de la droga sino también su pureza.

El procedimiento del análisis consiste en un tratamiento previo que puede limitarse a una simple disolución de la muestra en los solventes más comunes, como etanol, metanol

(129), cloroformo (51), isopropanol (130), o en mezclas como cloroformo:etanol (1:1) (131); cloroformo:metanol (3:1) (132); o bien en el solvente utilizado como fase móvil en la HPLC, por ejemplo acetonitrilo:agua (85:15) con 0,1% de carbonato de amonio (133), o acetonitrilo:buffer fosfato (134).

También puede ser necesario efectuar extracciones en medio ácido y alcalino con solventes no polares, a fin de obtener dos extractos, uno que contiene las posibles drogas ácidas y neutras, y el otro las alcalinas, que pueden incluso coexistir en la muestra.

Si lo que se requiere es conocer el contenido en cocaína de las hojas de coca, el tratamiento es mucho más exhaustivo y puede consistir en reflujar durante 15 minutos con etanol las hojas previamente secadas y pulverizadas. La mezcla se filtra y el filtrado se evapora hasta sequedad; el residuo se disuelve con cloroformo y es trasvasado a una ampolla de decantación, de donde se extrae con solución de ácido cítrico al 1,5% para purificar. La fase acuosa se alcaliniza con bicarbonato de sodio a pH 8,2 y se efectúa la extracción con cloroformo (20).

### Cromatografía en capa delgada

En este tipo de muestras la técnica más usualmente utilizada para la identificación y valoración es la CCD.

Este método analítico versátil, sensible y rápido, que permite separar en forma bien definida compuestos estructurales muy parecidos (135), reporta grandes beneficios, en especial en la resolución de muestras que contienen drogas desconocidas. Además, esta técnica permite el análisis cuantitativo, ya sea en forma directa o indirecta. El método indirecto consiste en eluir la sustancia adsorbida a la capa con un solvente adecuado para su evaluación, por ejemplo, por técnicas espectrofotométricas. Hoy en día se dispone de los métodos directos que efectúan la cuantificación sobre la placa, detectando cantidades del orden del nanogramo.

Los equipos usados pueden operar por fluorescencia o absorbancia, lo que consiste en hacer incidir sobre la sustancia un haz de luz de una longitud de onda determinada y medir la luz emitida o reflejada, dependiendo de las características de la droga en estudio (135).

El gran número de publicaciones empleando la CCD para ser utilizada en los casos del tráfico de drogas ilícitas indica el papel relevante de esta técnica en los laborato-

rios toxicológicos (136). Jackson y Clatworthy (129) proponen una técnica cromatográfica que consiste en obtener zonas demarcadas en la superficie de la placa, mediante la utilización de tres drogas que cumplen el rol de marcadoras y que son sembradas conjuntamente en los puntos extremos de la misma. En cada una de estas cuatro zonas que se obtienen se ubican familias de drogas o bien drogas en particular, y haciendo uso de una serie de revelantes se puede lograr identificar la droga en cuestión.

Para las drogas alcalinas, como la cocaína, el solvente de desarrollo consiste en una mezcla de cloroformo:metanol (4:1).

Autores como Bertulli y col.(131) utilizan dos sistemas de solventes en forma bidimensional, primero con cloroformo:etanol (1:1) y segundo con metanol:hidróxido de amonio (100:1,5), logrando separar la cocaína de la morfina, heroína, procaína y otros alcaloides.

Varios reactivos de revelado se han investigado a fin de obtener los posibles límites de detección y las diferencias de respuesta de las distintas drogas. Utilizando Dragendorff seguido de ácido sulfúrico al 20% se logra obtener para la cocaína un límite de detección de  $0,5 \mu\text{g}$  (136) (137).

Baker y Gough (138) examinan quince anestésicos locales, usando placas de sílica gel 60 F254, como solvente de de-

desarrollo metanol:hidróxido de amonio 2N:nitrato de amonio 1N (27:2:1), y visualizando con luz U.V.254 y 366 nm, seguido por revelado con p-dimetilaminobenzaldehido y iodoplatinato. La cocaína presenta un Rf similar a la proximetacaína y butacaína; para poderlas diferenciar se aplican los reveladores mencionados anteriormente, obteniéndose los siguientes resultados: la proximetacaína es revelada con luz U.V. de 366 nm, la butacaína da un color naranja con p-dimetilaminobenzaldehido, no así la cocaína ni la proximetacaína. Los quince anestésicos locales estudiados se revelan a 254 nm y dan color con iodoplatinato.

Dutt y Poh (139) publican un esquema de identificación de drogas de abuso basado en la CCD y el desarrollo del color del complejo formado por la droga y la ninidrina al ser expuesta la placa al calor. Las drogas son sembradas en dos placas que se desarrollan con cloroformo:etanol (5:1), se rocían con ninidrina y se someten una a 100°C y la otra a 160°C. De los 49 compuestos que desarrollan color no hay dos que sean iguales, lo que es utilizado como una identificación preliminar.

Un trabajo presentado por Jukofsky y col.(53) permite diferenciar en forma semicuantitativa la lidocaína presente en mezclas con cocaína (rock-cocaína) mediante CCD y posterior revelado con ácido sulfúrico al 5% y iodoplatinato.

La CCD permite separar incluso los diastereoisómeros de la cocaína, en forma indirecta, según D.Eskes (140). Después de hidrolizar las correspondientes ecgoninas y esterificar con enantiómero 2-octanol, se efectúa una cromatografía sobre placa de sílica gel con metanol como solvente de desarrollo. Siegel y Cormier (141) separan directamente l-cocaína y d-cocaína (pseudococaína) en capa de sílica gel usando la mezcla cloroformo:metanol (9:1), con visualización con reactivo de iodoplatinato. Otra forma de separación es la propuesta por Allen y col. (142), en la que, usando también placas de sílica gel, utilizan como solvente acetonitrilo, separando así cocaína y pseudococaína, haciendo parcialmente los otros dos estereoisómeros.

#### Cromatografía gas-líquido

Las principales ventajas de la CGL son: alta resolución, velocidad, sensibilidad, sencillez y resultados cuantitativos (143).

Si bien por estas características esta técnica supera ampliamente los requisitos para la resolución del tipo de muestras expuestas, los métodos desarrollados en estos trabajos resultan interesantes y se pueden aplicar a muestras de fluidos biológicos donde las cantidades a detectar son

del orden del nanogramo o picogramo.

También, como la cocaína en general no ingresa pura al organismo sino mezclada con otras sustancias, se requiere la separación de la misma para su identificación y cuantificación en medios biológicos.

Además de las muestras ilícitas, en los laboratorios toxicológicos existe a veces la necesidad de determinar las concentraciones de cocaína y otras drogas en muestras de importación legal, y cuando estas sustancias son utilizadas en la instrucción de perros detectores, donde conviene verificar la pureza de la muestra. Para ello Prager y col. (132) proponen la CGL en la cuantificación de cocaína, morfina y heroína. Las sustancias son separadas en una columna rellena de una mezcla de partes iguales de 5% SE-30 sobre Chromosorb W y 3% OV-17 sobre Varaport 30. Se emplea temperatura programada desde 190 a 240°C a 2°C por minuto para la cocaína y el detector de ionización de llama. La exactitud y precisión son del 5% y 3% respectivamente.

Turner y Elsohly (20) desarrollaron un método para determinar el contenido de cocaína en las hojas de la coca con una recuperación del 93% y una precisión del 4%. Después del tratamiento de las hojas como se indicó anteriormente, al residuo obtenido se le agrega como patrón interno androst-4-ene-3,17-diona en etanol. El relleno de la columna

es de 6% OV-1 sobre Chromosorb W., las temperaturas de la columna, inyector y detector son respectivamente 220°C, 295°C y 300°C, y el detector es de ionización de llama.

Jindall y col.(51) examinan cocaína ilícita y separan y cuantifican la lidocaína presente en este tipo de muestras utilizando una columna rellena con 3% OV-17 y detectores de ionización de llama y de nitrógeno.

Los picos obtenidos son identificados por espectrometría de masa. Gough y Baker (144) mencionan varias fases estacionarias usadas en CGL para separar 40 drogas. La fase SP - 2250 es un metilfenil/dimetilsilicona semejante a la OV-17 pero con mayor poder de resolución. En cuanto a la OV-275, permite separar compuestos con estructuras similares, como cocaína y metacualona, lo cual no se logra con otras fases.

Un estudio realizado por Roberson (145) sobre la reproducibilidad en la cuantificación de cocaína por CGL pone en evidencia los distintos parámetros que afectan dicha determinación; por supuesto, la mayoría no son únicos para la cocaína y son propios de la técnica. Pero este autor tiene en cuenta que la irreproducibilidad en los resultados se debe a la posibilidad de que la conversión del clorhidrato de cocaína a la base libre por descomposición térmica sea incompleta o lenta; este problema surge preferentemente debido a la pérdida de solvente en el momento de la inyección, cau-

sando la descomposición dentro de la aguja.

Lukaszewski y Jeffery (146) sugieren además que la metilecgonidina encontrada en muestras de cocaína ilícita se debe a un artefacto de la técnica más que a la presencia real de este compuesto, que se produce por eliminación del ácido benzoico de la cocaína durante la inyección en el CGL a temperaturas de 250°C.

#### Cromatografía líquida de alta presión

La ventaja de esta cromatografía es que su espectro de aplicación es más amplio que el de la anterior (147), y tiene la ventaja de no requerir derivatizaciones en el caso de los metabolitos de la cocaína y ser excelente en el análisis de sus isómeros, en contraste con la CGL que puede causar descomposición. Sin embargo, el uso de la HPLC en los análisis de rutina para la identificación de drogas en los laboratorios toxicológicos y forenses está más limitado. Ello se debe a la baja precisión en los tiempos de retención relativa con respecto a los de la CGL y la dificultad en corroborar los picos de identificación.

El empleo de detectores de U.V. de longitud variable presenta dos dificultades: la de no obtener tiempos de retención precisos y la de no lograr un espectro cualitativo a

bajas concentraciones. Baker y col.(148) intentan resolver estos problemas usando un detector de U.V. de longitud de onda dual a 254 nm y 280 nm. Logrando caracterizar 101 drogas de interés toxicológico por sus tiempos de retención relativos y el valor de la relación de absorbancias a 254 nm y 280 nm ( $A_{254}/A_{280}$ ), si se utiliza solamente el tiempo de retención se logra identificar el 9% de las drogas, mientras que considerando también la relación de absorbancias se logra distinguir el 95%.

Para la cocaína el sistema cromatográfico consiste en una columna de  $\mu$ Porasil y fase móvil metanol:hidróxido de amonio 2N:nitrato de amonio 1N (27:2:1); el tiempo de retención resulta ser igual al de la fenazocina y procaína. Sin embargo la relación  $A_{254}/A_{280}$  para estas tres drogas presenta una gran variación en los valores, que permite identificarlas.

Smith, Hurdley y col.(149) (150) (151), después de efectuar un estudio intensivo sobre los factores que alteran los tiempos de retención, en especial en el caso de los anestésicos locales, proponen un método con alto grado de reproducibilidad y que puede formar parte de un banco de datos para la identificación de drogas. La columna es de Hypersil ODS y está termostaticada a 30°C; las drogas son eluidas con metanol:agua:ácido ortofosfórico 1%:n-hexilami-

na (150:350:500:7) a pH2,5. El volumen muerto de la columna es determinado utilizando una inyección de metanol.

Otra forma de resolver los problemas de esta técnica cromatográfica es la propuesta por Trinler y Reuland (133), que permite la identificación de cocaína adulterada con algunas de las siguientes sustancias: benzocaína, procaína, tetracaína, lidocaína o lactosa, combinando la HPLC con espectrofotometría infrarroja. Lewin y col.(130) logran una excelente separación de los isómeros de la cocaína empleando una columna de Partisil 10-PXS, eluyendo con isopropanol:heptano:dietilamina (25:75:0,1) y detector U.V. a 230 nm. Cada isómero es calibrado con el standard interno N,N-dibenzilbenzamida.

El método de Schwartz y David (134) utiliza un detector electroquímico porque se basa en la oxidación electroquímica del nitrógeno terciario; la columna es de fase reversa de Whatman Partisil 10-ODS-3, la fase móvil acetonitrilo:buffer fosfato (pH óptimo entre 6 y 8), y logra así una precisión y linealidad en la respuesta y un límite de detección para la cocaína de 2 ng.

## VI.2 ESTUDIOS EN FLUIDOS BIOLÓGICOS

El conocimiento de la cinética y el metabolismo de la cocaína ha permitido encauzar la correcta interpretación de los datos obtenidos en fluidos biológicos.

Como se mencionara en el capítulo correspondiente a metabolismo, la cocaína es excretada como tal por orina en una muy pequeña proporción de la ingresada, siendo la BEc el principal metabolito, siguiendo en importancia el EMEc y la Ec.

Por ello resulta indispensable el estudio de los metabolitos de la cocaína. Sin embargo, la identificación y la valoración de la droga y sus metabolitos en muestras biológicas no se hallan libres de dificultades:

La cocaína, por ser lipofílica, puede ser extraída del material biológico mediante solventes no polares; sin embargo, los metabolitos son más polares e hidrofílicos y requieren para su extracción solventes polares. Esto ocasiona la coextracción de componentes de la muestra que interfieren en la posterior detección y determinación de los productos de la biotransformación.

El empleo de solventes de polaridad media disminuye las interferencias pero requiere una exhaustiva y continua extracción o salting-out o extracción líquido-sólida poste-

rior a una liofilización del material. Estos métodos son engorrosos, en muchos casos ineficientes y relativamente no selectivos.

Los métodos tradicionales utilizados en la investigación de drogas en fluidos biológicos empleaban para el aislamiento solventes no polares, perdiéndose por lo antedicho una valiosa información. Por otra parte, en posibles casos de sobredosis se puede desestimar la cantidad de cocaína ingresada.

Otro aspecto ya mencionado y a tener en cuenta es que la cocaína puede sufrir transformaciones durante el tiempo de almacenamiento de la muestra y en el tratamiento para su aislamiento de la matriz. Por ejemplo, si se trata de una muestra de sangre es necesario prevenir la hidrólisis por esterases, y en una muestra de orina controlar el pH de la misma.

A diferencia de las muestras provenientes del tráfico ilícito, el aislamiento y purificación de la droga y sus metabolitos en fluidos biológicos es la parte más crítica en la metodología a aplicar.

#### Aislamiento y purificación

Meola y Vanko (152) plantean un método para detectar va-

rias drogas en orina, entre ellas la cocaína y sus metabolitos. Las drogas son adsorbidas de la orina por carbón previamente tratado con buffer de carbonato-bicarbonato de sodio, para luego ser selectivamente eluidas con éter etílico o la mezcla cloroformo-isopropanol (50:10). Esta adsorción preliminar sobre el carbón permite que la identificación posterior por CCD tenga muy pocas interferencias.

En la publicación de Mueller y col.(153) se presenta un método para detectar y confirmar la presencia de BEc en orina humana que incluye una extracción con la resina Amberlite XAD-2 y elución con metanol, que se evapora. La purificación del extracto se efectúa disolviéndolo con buffer carbonato-bicarbonato 0,1 M y extrayendo con cloroformo:isopropanol (13:7). La fase orgánica se evapora, se disuelve en metanol y se realiza una CCD.

Una metodología completa es desarrollada por Rafla y Epstein (154) para la identificación por CCD y CGL de la cocaína, sus metabolitos más importantes, sus diluyentes más comunes en muestras del tráfico ilícito y otras drogas de abuso que pueden estar presentes en orina humana.

La orina se acidifica con ácido clorhídrico a pH 2 y se extraen las drogas ácidas y neutras con éter, separando las fases. La fase correspondiente a la orina se alcaliniza con hidróxido de amonio (25%), ajustando el pH entre 8 y 9. Se

liberan los ácidos carboxílicos débiles, BEc y Ec, otros metabolitos y la cocaína, que se extraen con cloroformo:isopropanol (3:1).

El empleo de la cocaína en el "doping" de galgos motivó el estudio del metabolismo, excreción y detección en orina. Lewis (155) propone una extracción de la cocaína con cloroformo, previo ajuste del pH a 3-4 con ácido acético. La fase orgánica separada es lavada con solución saturada de bicarbonato de sodio, luego filtrada y evaporada a sequedad. La fase acuosa remanente se alcaliniza a pH 9-10 con carbonato de sodio sólido y se extrae la BEc con cloroformo:isopropanol (95:5). La fase orgánica es agitada con ácido sulfúrico 0,1 M. La fase acuosa ácida es trasvasada y se ajusta nuevamente el pH a 9-10, extrayéndose nuevamente con la mezcla de solventes citada.

Otras técnicas desarrolladas por nuestro grupo de trabajo (156) (157) (158) permiten la identificación de BEc y Ec en muestras de orina por CCD. La BEc es aislada de la orina mediante técnica de salting-out con carbonato de potasio, utilizando como solvente de extracción acetato de etilo.

Para la extracción y purificación de la Ec se somete previamente la muestra de orina a un tratamiento fuertemente alcalino, con HONa 40% y calentamiento, a fin de concluir la hidrólisis de los ésteres que la preceden en la cadena

de transformación. Se utiliza la técnica de salting-out, extrayendo con acetato de etilo:isopropanol (3:1). La fase orgánica se evapora y el residuo se toma con metanol, que se purifica a través de dos columnas con distintos rellenos. La primera es de sílica gel y se eluye con metanol, descartando los primeros 1,5 ml y recogiendo una segunda fracción de 6 ml que es evaporada. El residuo se disuelve con cloroformo:metanol:amoníaco (80:20:3) y se siembra en la segunda columna rellena con celulosa, se eluye con la mezcla anterior descartando los primeros 7 ml y recolectando los 8 ml siguientes, que son evaporados.

Otros autores, como Goenechea y col.(79), también proponen como indicador del abuso de la cocaína a la Ec y para ello transforman a la droga y sus metabolitos, BEc, EMEc, en Ec, mediante hidrólisis alcalina con solución de hidróxido de sodio al 10%, ajustando el pH de la orina a 13 y calentando a reflujo por 30 minutos. Después de enfriar, la mezcla se acidifica hasta pH 6-7 con ácido clorhídrico al 10% y la Ec es aislada por pasaje a través de una columna rellena con resina de intercambio catiónico, eluyendo con hidróxido de amonio al 25%. El eluido es pasado a través de una columna rellena con resina de intercambio amónica y se eluye luego con ácido clorhídrico al 10%. La solución ácida es trasvasada a un balón, se le agrega metanol y unas gotas

de tolueno y es secada al vacío y 60°C.

Ambre y col.(69) (159) identifican por CCD y CGL/MS a la cocaína y su metabolito EMEc, en muestras de orina humana. Se ajusta el pH de la orina a 8,5-9,0 con borato de sodio y se extrae con cloruro de metileno:isopropanol (3:1).

A fin de investigar la distribución de la cocaína en los tejidos en los casos fatales de administración de la droga, Poblis y col.(61) tratan fluidos biológicos y homogenatos de tejidos con buffer carbonato para obtener un pH de 9,6 y extraen con heptano:alcohol isoamílico (98:2). La fase orgánica separada se agita con ácido sulfúrico (50 mmol/l) y la fase ácida es posteriormente tratada con heptano:alcohol isoamílico, separándose esta última fase.

Otro procedimiento para la extracción y purificación de cocaína y BEc en muestras de sangre es la propuesta por McCurdy (160). Un volumen de sangre al que se le agrega buffer de cloruro de amonio e hidróxido de amonio de pH 10, es pasado a través de una columna rellena con una tierra de diatomea (JETUBE), eluyendo con cloruro de metileno:etanol (9:1); la fracción recolectada es evaporada para proseguir el análisis.

Chinn y col.(161) desarrollan un método que permite determinar cocaína, BEc y NC en distintos medios biológicos en casos de intoxicaciones en las cuales está involucrada

la droga. Sugieren dos procedimientos de extracción, uno para cocaína y NC, que consiste en una extracción directa de la muestra con tolueno:heptano:alcohol isoamílico (70:20:10), previa alcalinización con fosfato de potasio al 50%. En el otro para cocaína y BEc, el tratamiento es más complejo debido a las características del metabolito. Se ajusta el pH de la muestra a 7, si es necesario, y se extrae con cloroformo:isopropanol (9:1); se descarta la fase acuosa y la orgánica se evapora a sequedad.

Un procedimiento analítico para la determinación simultánea de cocaína y BEc en fluidos y tejidos biológicos ha sido desarrollado por Guesemer y col.(162). La extracción se efectúa con la mezcla cloroformo:etanol (80:20), y esta fase es evaporada.

En cambio, Jacob y col.(163) efectúan un aislamiento y purificación más intensivos para luego determinar cocaína y BEc por CGL. La orina o el plasma son alcalinizados a pH 8,5 con buffer carbonato 1 M y la mezcla es extraída con cloroformo:isopropanol (1:1); la fase orgánica se separa y se evapora. El residuo es tratado con cloruro oxálico y butanol y calentamiento en baño de agua por 20 minutos. Después de enfriar, la mezcla es alcalinizada con carbonato de potasio 2 M y extraída con tolueno:2-metilbutanol (9:1). La fase orgánica es extraída con ácido sulfúrico 0,5 M y la

fase acuosa se reextrae con acetato de butilo.

Teblett y McCarteney (164) purifican las muestras de orina o sangre aplicándolas a una columna Bond-Elut C<sub>8</sub> activada con metanol y buffer pH 9,5 de carbonato-bicarbonato y secada; luego se lava con la solución buffer. Las drogas adsorbidas y la BEc son eluidas con cloroformo:isopropanol (4:1). Para la identificación y cuantificación de cocaína, BEc y EMEc en orina humana, Mule y Casella (165) alcalinizan a pH 9 con carbonato de potasio y bicarbonato de sodio sólidos en la proporción de 1 a 2, y extraen con cloroformo:isopropanol (9:1).

Javaid y col.(166) describen un método para la determinación de cocaína en orina humana, plasma y glóbulos rojos. La droga es extraída con ciclohexano del material biológico previamente alcalinizado a pH 8-9 con solución saturada de borato de sodio.

En cambio, Masoud y Krupski (167) alcalinizan con carbonato de sodio y extraen con éter; a esta fase separada se le agrega solución de ácido acético, se agita y centrifuga y la fase acuosa ácida se alcaliniza nuevamente y se extrae con n-hexano.

Khan y col.(168) aplican un procedimiento similar, pero alcalinizan con la mezcla de carbonato de sodio y fosfato disódico, y la segunda extracción la efectúan con heptano.

Los nuevos metabolitos hallados en orina por Smith y col.(83) (84), hidroximetoxibenzoil-metilecgoninas, son aislados utilizando cloroformo:isopropanol (9:1), previa alcalinización de la orina a pH 8,5 con solución saturada de borato de sodio. A la fase orgánica se le añade ácido clorhídrico 0,1 N y se agita; la fase acuosa se separa y alcaliniza nuevamente para efectuar una segunda extracción con la mezcla citada anteriormente. La fase orgánica es transferida y evaporada a sequedad.

Estos métodos de aislamiento y purificación expuestos son necesarios para poder aplicar las técnicas más comúnmente utilizadas, como la CCD, CGL y HPLC, y el inmunoensayo, a fin de garantizar la identificación y valoración de la cocaína y sus metabolitos en fluidos y tejidos biológicos.

#### Cromatografía en capa delgada

Los extractos obtenidos durante la extracción y purificación se disuelven en un solvente adecuado y se siembran en placas de sílica gel GF 254.

Para separar cocaína de algunos de los diluyentes más comunes (lidocaína, benzocaína, procaína), la placa se trata previamente al desarrollo cromatográfico con hidróxido de sodio 0,1 N, siendo el eluyente acetato de etilo:metanol

(80:20). Los solventes que permiten separar cocaína de BEc y Ec son metanol y cloroformo:metanol (50:50) (154), y mediante la mezcla de benceno:acetato de etilo:metanol:hidróxido de amonio (40:45:13,5:0,5) se logra la separación de EMEc (159).

A fin de identificar BEc se utiliza cloroformo:metanol:hidróxido de amonio:agua (70:30:1:0,5) (155), o metanol:cloroformo (75:25) en atmósfera de amoníaco (156).

Para Ec se realizan dos corridas cromatográficas sucesivas con metanol hasta la misma altura (157).

Los reactivos utilizados son iodoplatinato, que permite detectar la cocaína y la BEc con una sensibilidad del 2-3  $\mu\text{g/ml}$  (153); el triioduro de potasio, que detecta hasta 1  $\mu\text{g}$  de BEc (155). Se obtiene una mayor sensibilidad usando el reactivo de Dragendorff seguido por ácido sulfúrico diluido y posterior exposición a vapores de yodo, siendo para cocaína de aproximadamente 0,1  $\mu\text{g/ml}$  y para BEc de 0,25  $\mu\text{g/ml}$  (169).

#### Cromatografía gaseosa

La CGL requiere una previa derivatización de los metabolitos más polares, como la BEc y la Ec.

Para BEc puede consistir en una derivatización a cocaína

con el reactivo metilante hidróxido de trimetilanilinium (155). La conversión a etilbenzoilecgonina (cocaetileno) tiene la ventaja de permitir diferenciar en el cromatograma la cocaína y la BEc. Se realiza con sulfato de tetra-butilamonio, hidróxido de trimetilanilinium, ioduro de etilo y N-N' dimetilacetamida, calentando a 100°C durante 8 minutos, lográndose una reacción virtualmente completa, pero que requiere purificación y extracción previa a la CGL (161).

Valentour y col.(85) proponen otro esquema que involucra la extracción y alquilación simultánea.

La muestra de sangre, bilis, orina u homogenato de tejido se extrae con cloroformo:etanol (4:1). Esta fase se separa, se filtra y se le agrega ácido sulfúrico 0,5 N. La fase acuosa es transferida y se ajusta el pH entre 10,5 y 12 con solución saturada de fosfato trisódico e hidróxido de sodio 6 N. Se añade la solución de cloruro de tetrahexilamonio, la mezcla de cloroformo-n-octano y ioduro de etilo, se agita durante 20 minutos, se separa la fase orgánica y se realiza la CGL de la misma.

La BEc también puede ser etilada por reacción del residuo con etanol:ácido sulfúrico (2:1) a 85°C durante 10 minutos. Una vez enfriada la solución es lavada con éter etílico, luego se alcaliniza la fase acuosa con solución de car-

bonato de sodio y se extrae con cloroformo (163).

La esterificación del metabolito se realiza con N,N-dimetilformamida dipropil acetal en dimetilformamida, calentando a reflujo durante 30 minutos. La mezcla enfriada es purificada por acidificación con ácido sulfúrico 0,5 N y extracción con la mezcla tolueno:heptano:alcohol isoamílico (76:20:4). La fase orgánica se descarta y a la acuosa se le añade hidróxido de sodio 1 N y fosfato de potasio (50%), y se extrae nuevamente con la mezcla antes citada. Esta fase se separa y evapora (162).

Otros agentes derivatizantes son el usado por Mule y Casella (165), el anhídrido de pentafluoropropiónico, o por Taylor y col.(171), el trifluoro-N-metil-N-(trimetilsilil)acetamida, que requiere calentamiento a 70°C por 15 minutos.

Para Ec el agente empleado es la N.O.bis trimetilsililacetamida y la sililación se efectúa a 80°C durante 20 minutos (172), o bien N-metil-N-trimetilsilil-trifluoracetamida, calentando a 70°C por 20 minutos en un baño de agua (79).

El EMEc puede ser cromatografiado directamente sin derivatización utilizando las fases estacionarias comúnmente empleadas en la CGL.

Sin embargo, pueden existir serias dificultades en el

análisis si no se cuenta con espectrógrafo de masa, ya que existen componentes volátiles en los extractos provenientes de las muestras de orina que pueden interferir. Por otra parte, debe evitarse el uso del metanol como solvente para disolver el residuo que será cromatografiado, ya que puede resultar la metilación de la Ec y BEc presentes en la muestra e incrementar los valores del EMEc y la cocaína respectivamente (69) (159).

Tampoco requieren derivatización la cocaína y la NC.

Las condiciones para la CGL de la droga y sus metabolitos son comunes; las fases estacionarias más utilizadas son 3% OV-17 en gas Chrom Q o en Chromosorb W-HP, 2%, 3% o 10% OV-101 en gas Chrom.Q o Chromosorb W-HP, 3% OV-1 Chromosorb W-HP. Werner y col.(172) emplean una mezcla de dos fases líquidas, 2% metilfenilsilicona (SP-2110) y 1% SP-2510 DA, que les permite separar cuarenta drogas, entre ellas la cocaína, que pueden estar presentes en el suero y que no requieren derivatización.

El detector más generalmente utilizado es el de ionización de llama, y tiene una sensibilidad de  $0,2 \mu\text{g/ml}$ . Se logra mejorar este valor alrededor de 50 a 100 veces usando el detector de captura de electrones o de nitrógeno-fósforo; este último responde selectivamente a los compuestos que contienen nitrógeno y ha permitido cuantificar concen-

traciones tan bajas como de 2 ng/ml para cocaína y 5 ng/ml para BEc (163).

La alta especificidad y sensibilidad de la CGL acoplada a la espectrometría de masa puede ser aplicada al análisis de cocaína y sus metabolitos, en los modos de impacto electrónico y ionización química, con una sensibilidad de menos de 5 ng/ml (57) (71) (162).

#### Cromatografía líquida de alta presión

Esta técnica presenta la ventaja de no requerir derivatizaciones previas para los metabolitos, como en el caso de la CGL, aunque hay que tener en cuenta que la sensibilidad es menor.

Las columnas utilizadas son de fase reversa u Bondapak C<sub>18</sub>, ODS-HC C<sub>18</sub>, Hypersil-ODS o Micropok MCH 10, y el detector de luz ultravioleta a las longitudes de onda de 254, 232 o 229 nm.

En un estudio efectuado por Fletcher y Hancock (173) éstos logran separar la cocaína y la BEc utilizando como solvente de elución agua:metanol (45:55) a pH 3,8. Otro solvente que permite separar cocaína, BEc y NC es el propuesto por Evans y Morarity (72), que consiste en la mezcla agua:acetonitrilo:metanol (8:1:1) conteniendo un 1% de ácido acé-

tico y 0,3 M de EDTA, si bien la separación entre cocaína y NC no es del todo satisfactoria.

Masoud y Krupski (167) trabajaron sobre plasma, logrando separar la cocaína de algunos de los anestésicos locales y drogas, pero existen interferencias importantes, como la lidocaína. En el análisis en suero de analgésicos no opiáceos y cocaína, Hackett y col.(174) utilizan como fase móvil 35% acetonitrilo en ácido fosfórico 0,01%-cloruro de sodio 0,01% en solución de pH 2,8, usando el detector U.V. a 210 nm, obteniendo para la cocaína un límite de detección de 25 ng/ml.

Garrett y Seyda (175) efectúan un estudio de la hidrólisis de la cocaína a BEc en solución acuosa y en plasma y separan ambas utilizando como fase móvil acetonitrilo:0,085 M buffer acetato (25:75), a pH 3,6, y logran para la cocaína una sensibilidad de 15 ng/ml. En general, la sensibilidad de la HPLC se considera del orden de los 50 ng/ml.

#### Métodos inmunológicos

El desarrollo de métodos analíticos que incorporan las técnicas inmunológicas a la resolución de muestras biológicas implicadas en el abuso de drogas se ha incrementado debido a que no se requiere un tratamiento previo de la mues-

tra, y por lo tanto resultan ser de rápida y fácil ejecución.

Las técnicas más utilizadas son la de radioinmunoensayo (RIA) e inmunoensayo de enzima múltiple (EMIT), y se han aplicado principalmente a orina, siendo analizado el mayor metabolito urinario de la cocaína, la BEc.

Si bien se ha logrado una mayor sensibilidad en estas técnicas, a fin de que tenga sentido su aplicación, continúan careciendo de especificidad.

En el caso del EMIT, Fletcher (176) ha comprobado que presenta una excelente reproducibilidad y una especificidad relativamente buena, que en general no está afectada por los preservadores que pueden estar presentes en las muestras de orina (nitrato de fenilmercurio, fluoruro de sodio). Sin embargo, se ha comprobado que la BEc exhibe una importante reactividad cruzada con la Ec. Las modificaciones introducidas sobre esta técnica han permitido lograr un límite de detección del orden de los 300 ng/ml (71) (177).

Mulé y col.(178) realizaron una evaluación del RIA para BEc en orina humana, confirmando las reacciones cruzadas que, en orden decreciente, producen cocaína, BNEc, NC, pseudobenzoilecgonina, siendo mucho menor para pseudococaína, EMEc, Ec y NEc.

Los resultados negativos falsos no superan el 1% y los

positivos falsos el 3,5%, comparando con la CGL que se emplea como técnica de referencia.

La CGL se utiliza para confirmar, en el caso de resultado positivo del RIA, la presunta presencia de BEc, o más ampliamente, el uso de la cocaína.

La detección de drogas en exudados, manchas biológicas y pelos ha requerido más exhaustivos estudios para poder aplicar el RIA. Smith y Liu (179) han reportado la detección de cantidades equivalentes de BEc tan bajas como 10 ng en sudor, 570 pg en manchas de sangre menstrual, y 6,2 ng en pelo.

## PARTE EXPERIMENTAL

La parte experimental consta de:

I) Desarrollo de un método para el aislamiento y purificación de cocaína, benzoilecgonina y ecgonina a partir de muestras de orina, y puesta a punto de las técnicas para la identificación y valoración de las sustancias citadas.

II) Estudio comparativo de las variaciones en la excreción de la droga y sus metabolitos en ratas intoxicadas en forma crónica durante un período de 29 días, en muestras de orina tomadas a distintos tiempos.

I           DESARROLLO DE UN METODO PARA EL AISLAMIENTO, PURIFICACION, IDENTIFICACION Y VALORACION DE COCAINA, BENZOILECGONINA Y ECGONINA EN MUESTRAS DE ORINA

I.1         EQUIPOS, MATERIALES Y METODO

Cromatógrafo gas líquido (CGL) Hewlett Packard, modelo 5840 A, con detector de ionización de llama.

Columnas de vidrio de 1,80 m por 4 mm.

Rellenos: 2% O.V.101 sobre Chromosorb W-HP 100-120 mesh y 3% O.V.101 sobre Chromosorb W-HP 100-120 mesh.

Gases: nitrógeno, 4 bandas extra seco, aire e hidrógeno.

Cromatógrafo líquido de alta presión (HPLC) Varian, modelo 5000, con detector U.V. a 254 nm.

Columna de 30 cm de longitud por 0,4 cm de diámetro interno, de fase reversa de sílica gel de 10  $\mu$  de diámetro, ligadas a grupos octadecilo (Micropack MCH 10).

Espectrofotómetro infrarrojo Perkin Elmer Mod. 783

Columnas para cromatografía de 15 cm de altura por 0,4 cm de diámetro interno, especialmente diseñadas y que tienen una boca tipo embudo en la parte superior.

Relleno: sílica gel 60 purísima para cromatografía en columna tamaño de grano 0,063-0,200 mm (70-230 mesh

ASCM) Merck, Art.7754.

Agitador de tubos tipo Vortex.

Centrífuga hasta 3.000 rpm aproximadamente.

Evaporador rotatorio al vacío.

pH metro

Cromatofolios de sílica gel F254 Merck.

#### Drogas y reactivos

Clorhidrato de cocaína Merck

Clorhidrato de benzoilecgonina Merck

Clorhidrato de ecgonina Merck

Las demás drogas y solventes empleados fueron de grado analítico.

Reactivo de Dragendorff (modificación introducida en la Cátedra de Toxicología y Química Legal de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires):

Preparar hirviendo 2,6 g de subnitrito de bismuto y 7 g de yoduro de potasio, por pocos minutos, en 25 ml de ácido

acético glacial. Dejar durante una noche, filtrar para eliminar el acetato de potasio y agregar 80 ml de acetato de etilo por cada 20 ml de filtrado. La solución se almacena, protegiéndola de la luz. Antes de usar diluir 25 ml de la solución anterior con 25 ml de ácido acético glacial y 60 ml de acetato de etilo.

#### Clorhidrato de ecgonina:

Aparte del clorhidrato de ecgonina Merck empleado como testigo, se obtuvieron en nuestro laboratorio mayores cantidades de dicha droga por hidrólisis de la cocaína en medio de ácido clorhídrico, cristalización y purificación por cromatografía en columna, comprobándose su pureza por espectrofotometría U.V. (180) y espectro infrarrojo en disco de bromuro de potasio (Figura 25).

A 250 mg de clorhidrato de cocaína se le agregan 50 ml de ácido clorhídrico 2 N y se calienta durante 36 horas sobre una plancha a temperatura regulada de 80°C. A medida que el agente hidrolizante se evapora, se repone a fin de mantener el volumen de líquido original. En la última etapa, por el contrario, se concentra la muestra hasta un volumen aproximado de 5 ml. Se deja enfriar y se precipita el clorhidrato de ecgonina por agregado de 25 ml de acetona,

se centrifuga, se descarta el líquido sobrenadante y el precipitado es lavado repetidamente con acetona y cloroformo y la sal es secada a presión reducida.

El clorhidrato de ecgonina así obtenido requiere la purificación a través de una columna de celulosa, eluyendo con la mezcla cloroformo:metanol:amoníaco (80:20:3) y recolectando la segunda fracción de 7,5 a 15 ml. Esta fracción se evapora a sequedad en el rotavapor.

#### Jaulas metabólicas

Diseñé, junto con la Dra. María Lourdes Paviolo, una modificación del sistema de recolección de las orinas de ratas, especial para este trabajo, que suplanta a los ya conocidos (Figura 26), obteniéndose orinas con un pH entre 6,0 y 6,8.

A fin de optimizar aún más el pH de la orina, efectué la recolección en vasos de precipitado de vidrio de 30 ml, los cuales fueron enjuagados el día anterior a su uso con ácido sulfúrico 0,1 N y escurridos.

La recolección de las muestras se efectuó a temperatura ambiente durante períodos de 24 horas. En caso de no usarse inmediatamente, las orinas se congelaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su uso.

### Animales de experimentación

Ratas Wistar hembras de peso entre 180 y 220 g y aproximadamente 3 meses de edad, ubicadas en un ambiente climatizado y con periodos alternados de luz y oscuridad.

### Método de determinación de cocaína, benzoilecgonina y ecgonina

Comprende las siguientes etapas: aislamiento mediante extracciones, purificación por extracción o por cromatografía en columna, identificación y determinación de cocaína y ecgonina por CGL y benzoilecgonina por HPLC.

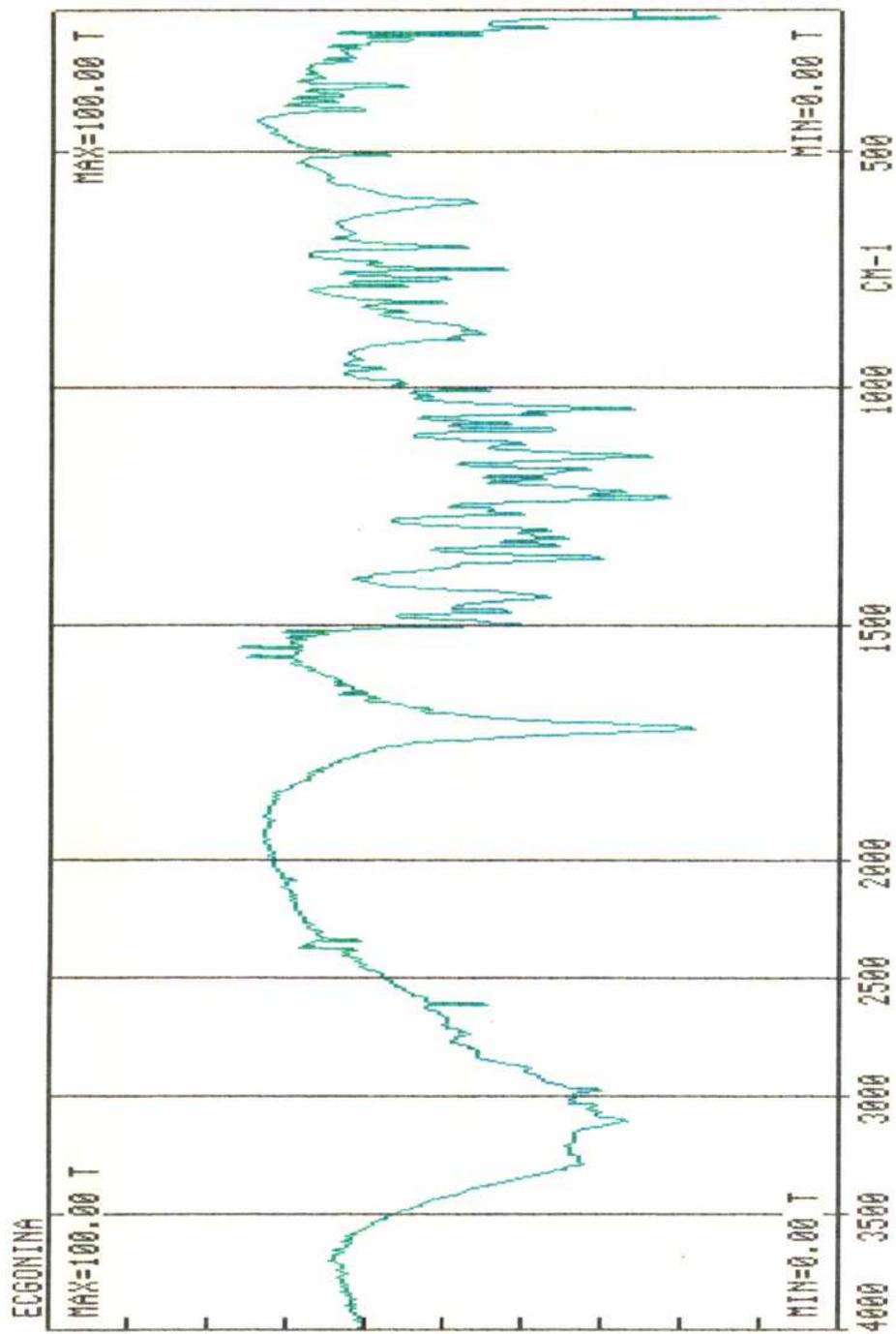


Figura 25: Espectro infrarrojo de la Ec.

(a)



(b)

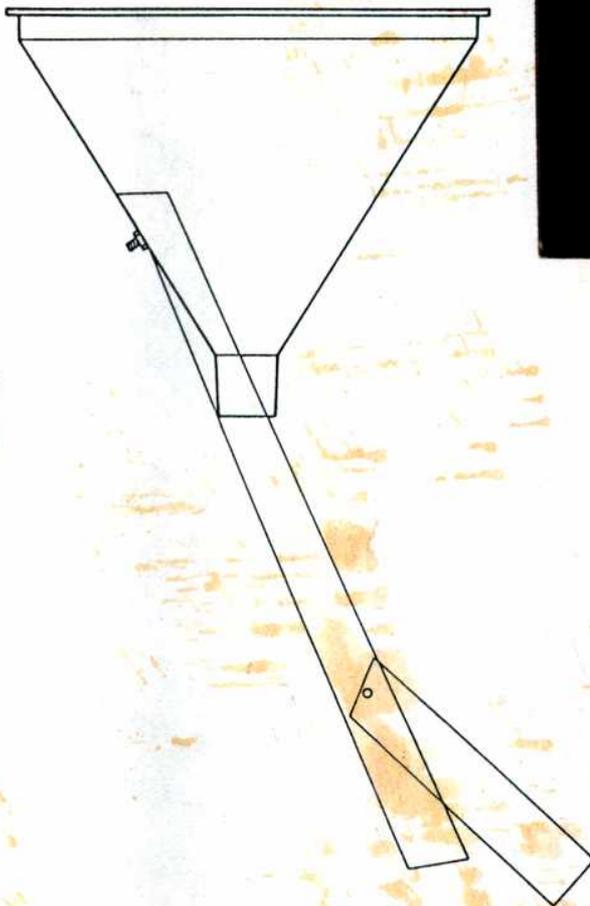


Figura 26: a) jaula metabólica; b) diseño del embudo con canaleta separadora

I.2 PROPIEDADES FISICOQUIMICAS DE LA COCAINA Y SUS METABOLITOS EN ESTUDIO

Cocaína: Metil-benzoilecgonina

8-azabicyclo [3.2.1] octane-2-carboxylic acid-3 (benzoyloxy)-8-methyl-methyl ester [1R-(exo, exo)]

Base:  $C_{17}H_{21}NO_4$ : 303,35

Punto de fusión: 96° a 98°C

Solubilidad: soluble en etanol (1 g en 7 ml), en éter (1 en 4), en cloroformo (1 en 0,5) y en otros solventes orgánicos; poco soluble en agua (1 en 1300)

pKa: 8,6

Espectro ultravioleta:

en etanol máximos: 230, 274, 281 nm

mínimos: 217, 260, 279 nm

en ácido sulfúrico 0,1 N

máximos: 233 nm (E 1%, 1 cm 470)

mínimos: 275 nm (E 1%, 1 cm 38)

inflexión: 281 nm

Espectro infrarrojo, en disco de bromuro de potasio; los principales picos son a:

1275, 1700, 1106 ó 1728 (Figura 27)

Clorhidrato:  $C_{17}H_{22}ClNO_4$ :339,81

Punto de fusión: 195°C

Rotación óptica específica de una solución al 2%: -70° a -72°

Solubilidad: soluble en agua (1 en 0,5), en etanol (1 en 4,5), en cloroformo (1 en 18); casi insoluble en éter.

Espectro ultravioleta:

en agua máximos: 233 y 274 nm

mínimos: 211 y 261 nm

Benzoilecgonina:

8-azabicyclo [3.2.1] octane-2-carboxylic acid-3 benzoyloxy-8-methyl

Base:  $C_{16}H_{19}NO_4$ :289,34

Punto de fusión: 86-92°C (descomposición a 195°C)

Solubilidad: soluble en agua, soluciones ácidas y alcalinas, débilmente soluble en etanol, metanol, acetato de etilo, acetonitrilo; insoluble en cloroformo, éter.

Espectro infrarrojo, en disco de bromuro de potasio (Figura 28).

Ecgonina: 8-azabicyclo [3.2.1] octane-2 carboxylic acid-  
3-hydroxy-8-methyl, [1R-(exo, exo)]

Base:  $C_9H_{15}NO_3$ : 185,22

Punto de fusión: 198°C (descomposición 205°C)

Solubilidad: soluble en agua (1 en 5), etanol  
(1 en 67), metanol (1 en 20), acetato de etilo  
(1 en 75); insoluble en éter y cloroformo.

pKa: 11,11

Clorhidrato:

Punto de fusión: 246°C

Solubilidad: soluble en agua, etanol y metanol;  
insoluble en éter, cloroformo, acetona.

Espectro infrarrojo en disco de bromuro de  
potasio (Figura 25)

(181) (182) (183)

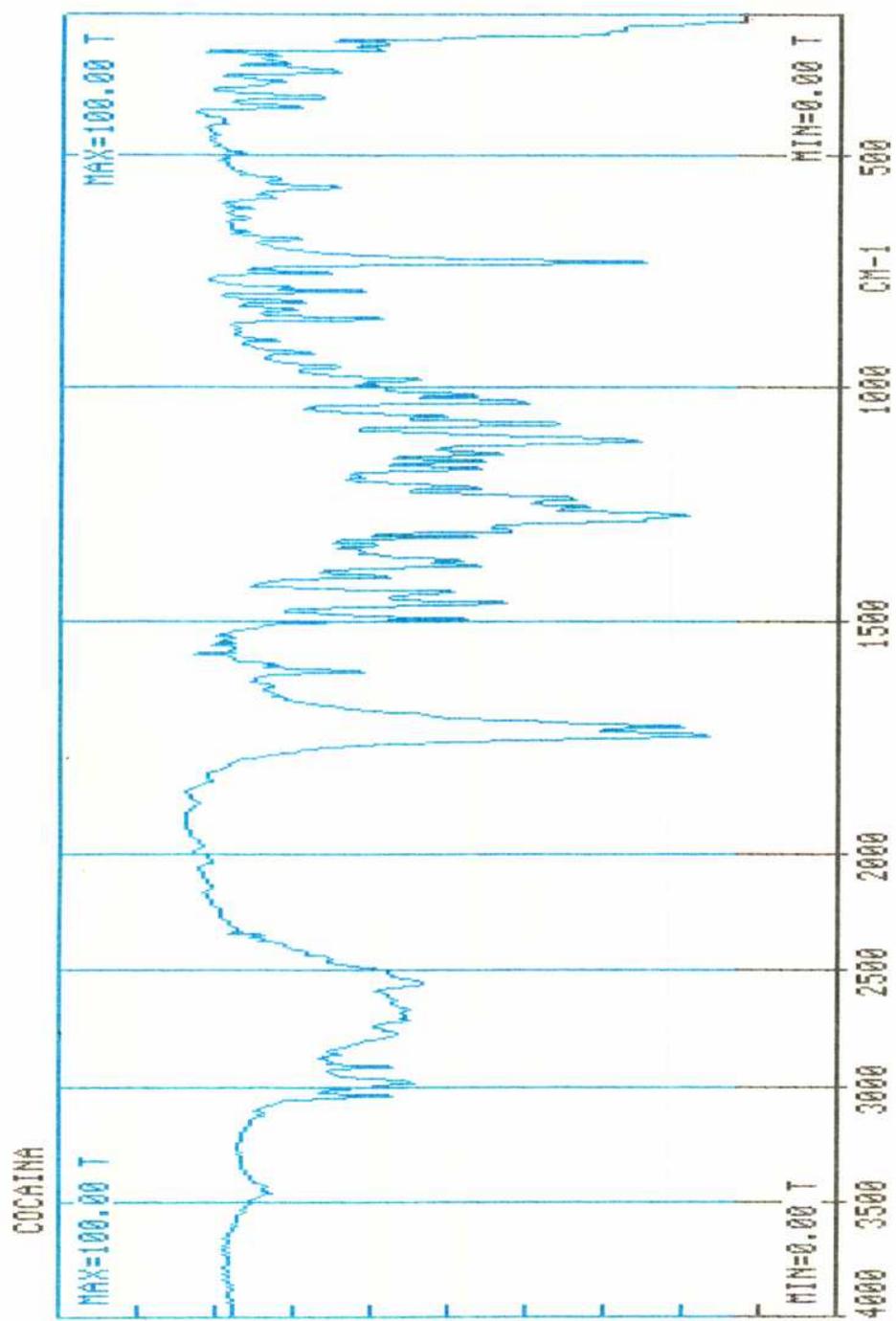


Figura 27: Espectro infrarrojo de la cocaína

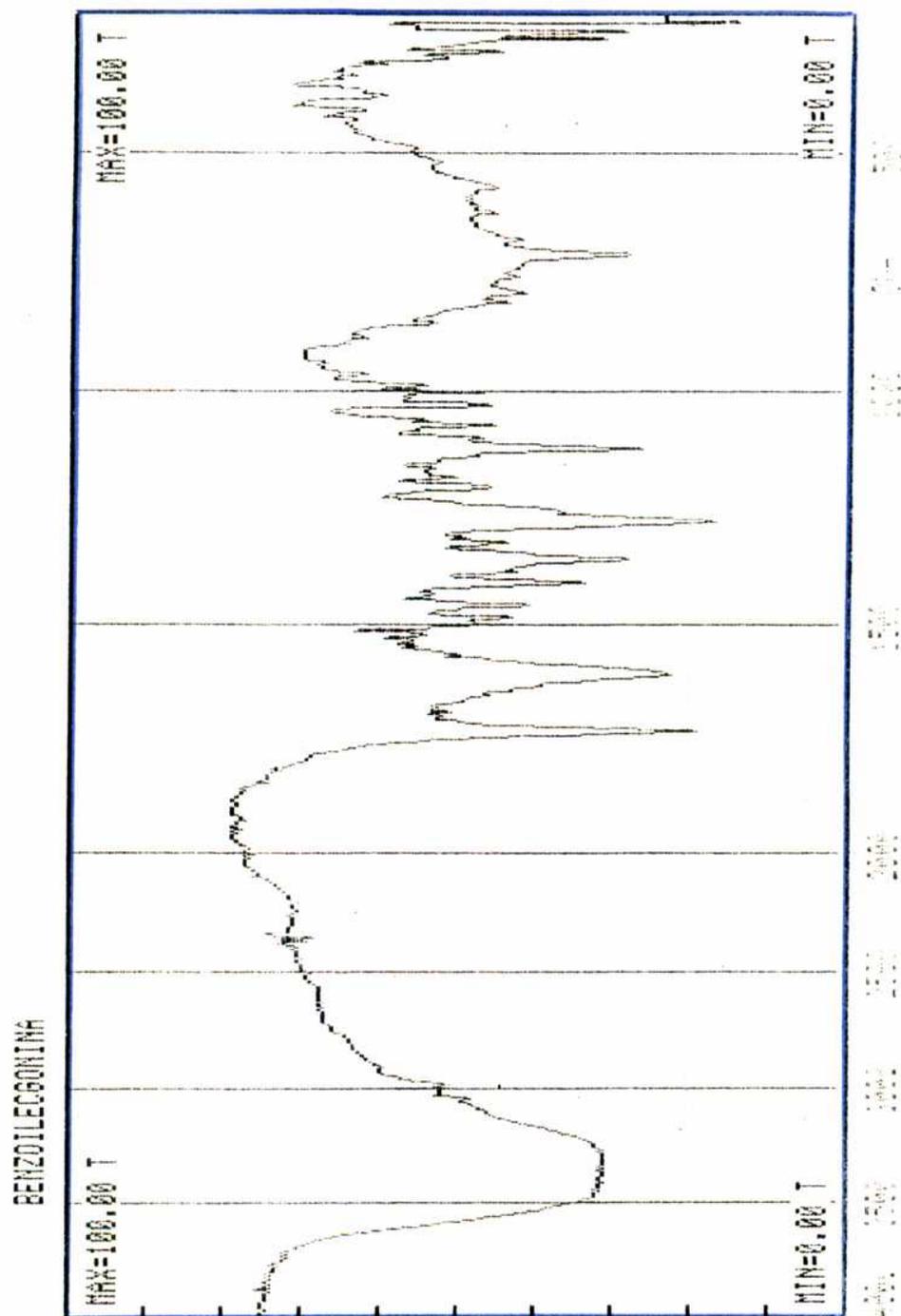


Figura 28: Espectro Infrarrojo de 1a BEC

### I.3 RESULTADOS Y DISCUSION

#### I.3.1 DESARROLLO Y MODIFICACION DE TECNICAS PARA LA IDENTIFICACION Y VALORACION DE COCAINA Y SUS METABOLITOS

##### Cocaína

De acuerdo con los antecedentes bibliográficos existentes para la identificación y cuantificación de la cocaína, se decidió aplicar la CGL previo ajuste de las condiciones cromatográficas.

Los primeros estudios se efectuaron con las condiciones que se describen a continuación:

Columna: de vidrio de 1200 mm por 4 mm

Gas transportador: nitrógeno 50 ml/min

Detector: ionización de llama

Aire: 200 ml/min

Hidrógeno: 40 ml/min

Temperatura del inyector: 250°C

Temperatura del detector: 275°C

Sensibilidad:  $3 \cdot 10^9$  a.f.r.

Atenuación: 9

Velocidad del papel: 1 cm/min ó 0,5 cm/min.

La columna se rellena con la fase estacionaria 2% O.V.-101 sobre Chromosorb W-HP 100-120 mesh, y se fija como temperatura de la columna 200°C.

Para probar dicho sistema se colocó en un tubo 100 µl de una solución etanólica de cocaína de 1 mg/ml, se evaporó el solvente, se colocó el tubo en hielo, luego se adicionaron 50 µl de cloroformo enfriado en heladera, y se agitó en un vortex. Se tomaron 4 µl de la solución y se inyectó en el cromatógrafo. El tiempo de retención fue de alrededor de 3.9 minutos; a este tiempo de retención los picos resultan demasiado anchos.

Se pudo aumentar la temperatura para disminuir el tiempo de retención, pero se corría el riesgo de producirse fraccionamiento pirolítico y aparición de picos pertenecientes a los nuevos productos formados, con consiguiente baja recuperación de la droga.

Por estos motivos se decidió aumentar el porcentaje de fase estacionaria, empleándose 3% O.V.101 sobre Chromosorb W-HP 100-120 mesh, comprobándose que con una temperatura del horno de 180°C se obtenía un tiempo de retención de alrededor de 2,7 minutos, mejorando notablemente la forma de los cromatogramas.

Para comprobar si se cumplía la linealidad de la respuesta en el rango en el cual se encuentra la cocaína en la orina de ratas intoxicadas con dosis subagudas y en adictos, se procedió a inyectar en el cromatógrafo cantidades comprendidas entre 0,5 y 30  $\mu\text{g/ml}$  de cocaína, obteniéndose los cromatogramas de las Figuras 29 y 30 y la recta de la Figura 31, que reafirma que efectivamente existe linealidad.

### Ecgonina

Se eligió como técnica para la identificación y valoración de este metabolito polar la CGL, a pesar de que requiere una previa derivatización antes de su inyección en el cromatógrafo.

La otra posibilidad hubiera sido utilizar HPLC. Sin embargo, nuestro equipo cuenta con detector de U.V. de longitudes de onda de 280 y 254 nm y el pico de máxima absorbanza de la Ec es a 261 nm, con un coeficiente de extinción muy bajo ( $E_{1\%, 1\text{ cm}} = 21$ ), lo cual hubiera significado baja sensibilidad.

Para la determinación por CGL fue necesario optimizar y estandarizar las condiciones de derivatización, a fin de obtener resultados reproducibles.

El agente elegido para este fin es la N,O-bis-trimetil-silil-acetamida, y después de varios ensayos cuidando todos los detalles, dado que tanto el reactivo como los compuestos formados se descomponen con la excesiva humedad, se procedió de la forma siguiente:

En un tubo pequeño que contiene 100  $\mu\text{g}$  de Ec se llevó a estufa a 80°C por espacio de 10 minutos a fin de eliminar la humedad, se sacó de la estufa y se tapó rápidamente, colocándolo en un desecador hasta que se enfrió; se le agregó el agente sililante (50  $\mu\text{l}$ ), se tapó inmediatamente, se agitó mediante un vortex y se volvió a colocar en la estufa a 80°C durante 20 minutos. Se sacó de la estufa, se coló en desecador hasta enfriar, y luego se inyectaron 4  $\mu\text{l}$  en el cromatógrafo bajo las siguientes condiciones operativas:

Fase estacionaria: 3% O.V.101 sobre Chromosorb W-HP

100-120 mesh

Sensibilidad:  $3 \times 10^9$  a.f.r.

Atenuación: 9

Detector: ionización de llama

Aire: 200 ml/min

Hidrógeno: 40 ml/min

Nitrógeno: 50 ml/min

Temperatura inyección: 250°C

Temperatura detector: 275°C

Velocidad del papel: 0,5-1,0 cm/min

Se ensayaron distintas temperaturas del horno a fin de lograr un tiempo de retención adecuado y que los picos propios del agente sililante no interfirieran, obteniéndose condiciones óptimas a 130°C, dando un tiempo de retención de alrededor de 2,9 minutos.

Se procedió a continuación en forma similar a la empleada para cocaína, a fin de comprobar la linealidad de la respuesta en el rango de trabajo de 0,5 a 30 µg/ml, obteniéndose una recta en dicho rango (Figura 32).

#### Benzoilecgonina

Este metabolito puede ser evaluado satisfactoriamente por HPLC; esta técnica no requiere una purificación exhaustiva de los extractos provenientes del aislamiento de la BEc de orina humana o de ratas intoxicadas y, como ya se ha mencionado, para extraerla de estas muestras se requieren solventes polares o de mediana polaridad, que coextraen componentes de la orina que pueden interferir en su identificación o valoración, de modo que deben ajustarse cuidadosamente las condiciones experimentales.

La CGL para ser aplicada necesita una derivatización previa de la BEc, como lo fue para la Ec y, por supuesto, debe

realizarse sobre extractos puros para obtener resultados satisfactorios y reproducibles.

Mediante las siguientes condiciones de trabajo por HPLC (180) se pudo separar sin mayores dificultades la BEc, y además evaluar la capacidad extractiva de los solventes ensayados para el aislamiento:

Columna: Micropok MCH 10

Fase móvil: agua:acetonitrilo:metanol (80:15:5)

Flujo: 1,5 ml/min

Presión: 170 atm

Temperatura: ambiente

Detector: de absorción U.V. a 254 nm

Atenuación: 0,08

Volumen de inyección: 10  $\mu$ l

Se evaluó la linealidad en la respuesta inyectando cantidades que cubrieran el rango de aplicación entre 0,75 a 25  $\mu$ g/ml, obteniendo los resultados, cromatogramas y parámetros que se exponen en las Figuras 33, 34 y 35, que aseguran el cumplimiento de la linealidad en ese rango.

Valoración conjunta de Ec y BEc por cromatografía gaseosa

Aprovechando la posibilidad que ofrece el cromatógrafo gaseoso de trabajar a temperatura de horno programada, se procedió a poner a punto esta técnica.

Se reúnen en un tubo 100  $\mu$ g de cada uno de los metabolitos, se derivatizan con N,O-bis-trimetilsilil-acetamida, con las condiciones ya establecidas con anterioridad para la Ec.

Los parámetros básicos, como el tipo de detector, temperatura de la zona de inyección y del detector, habían sido fijados, y faltaba establecer las temperaturas del horno y el gradiente de temperatura. En este caso se usó una columna 2% O.V.101 sobre Chromosorb W-HP 100-120 mesh.

Después de varios intentos, y con el compromiso de que la Ec tuviera un tiempo de retención que la separara no sólo de las interferencias propias del agente sililante sino también de las impurezas de la orina al trabajar sobre este tipo de muestras, y que la velocidad de cambio de temperatura fuera tal que no afectara la línea de base, así como que la BEc no saliera con un tiempo de retención muy alto que perjudicara su resolución, se logró fijar como temperatura 1:150°C y tiempo 1:4,5 minutos, velocidad de incremen-

to de la temperatura 20°C por minuto, temperatura 2:215°C, y tiempo a esta temperatura 5 minutos, obteniéndose excelente separación, según puede observarse en las Figuras 36 y 37.

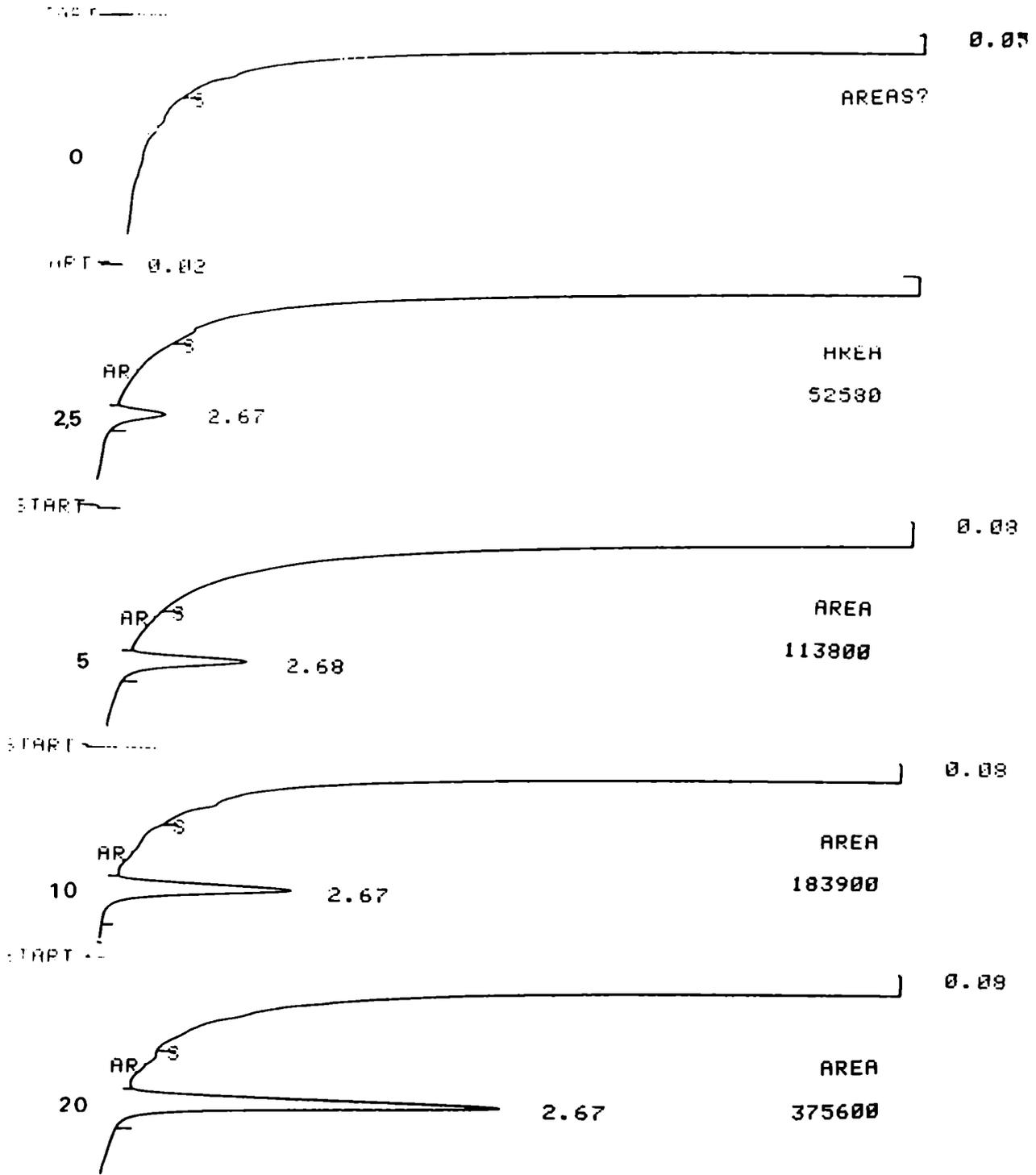


Figura 29: Cromatogramas de la cocaína obtenidos por CGL, rango 0-20 µg

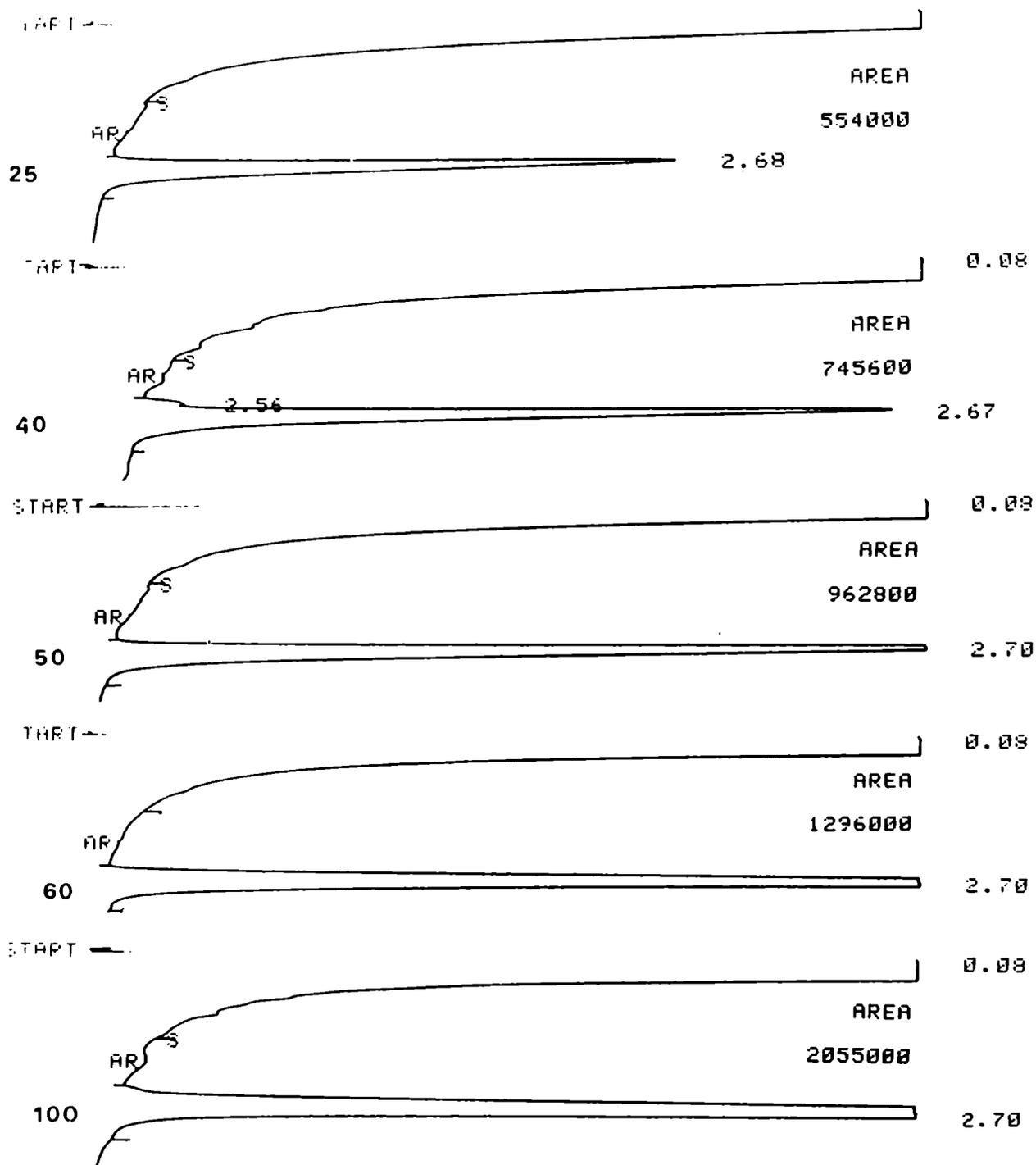


Figura 30: Cromatogramas de la cocaína obtenidos por CGL, rango 25-100 µg

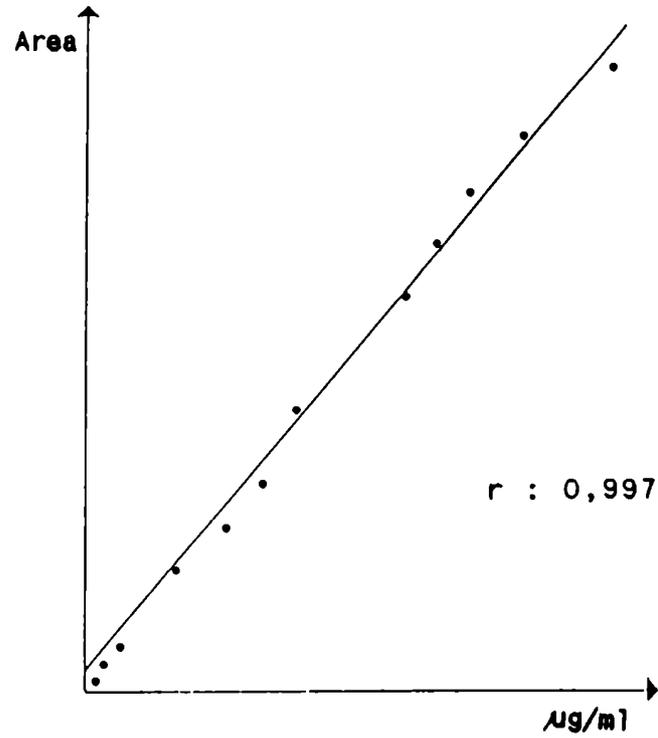


Figura 31: Recta correspondiente a la linealidad de la cocaína

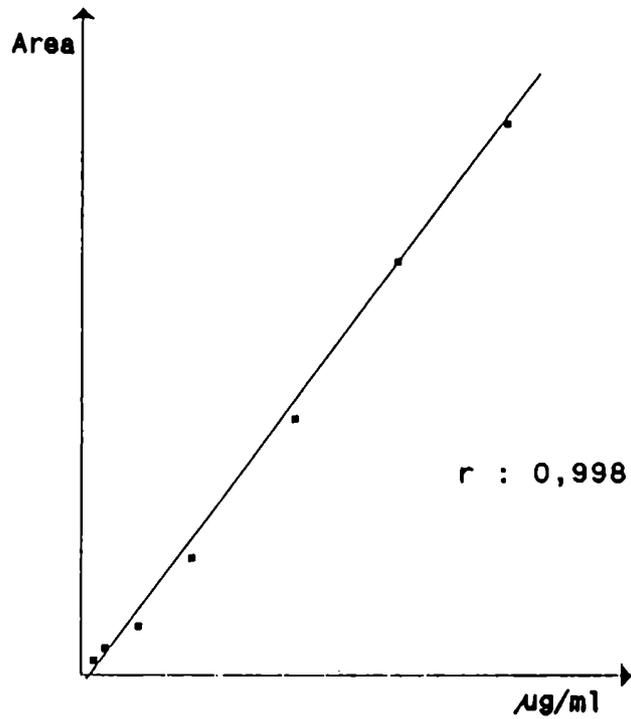


Figura 32: Recta correspondiente a la linealidad de la Ec

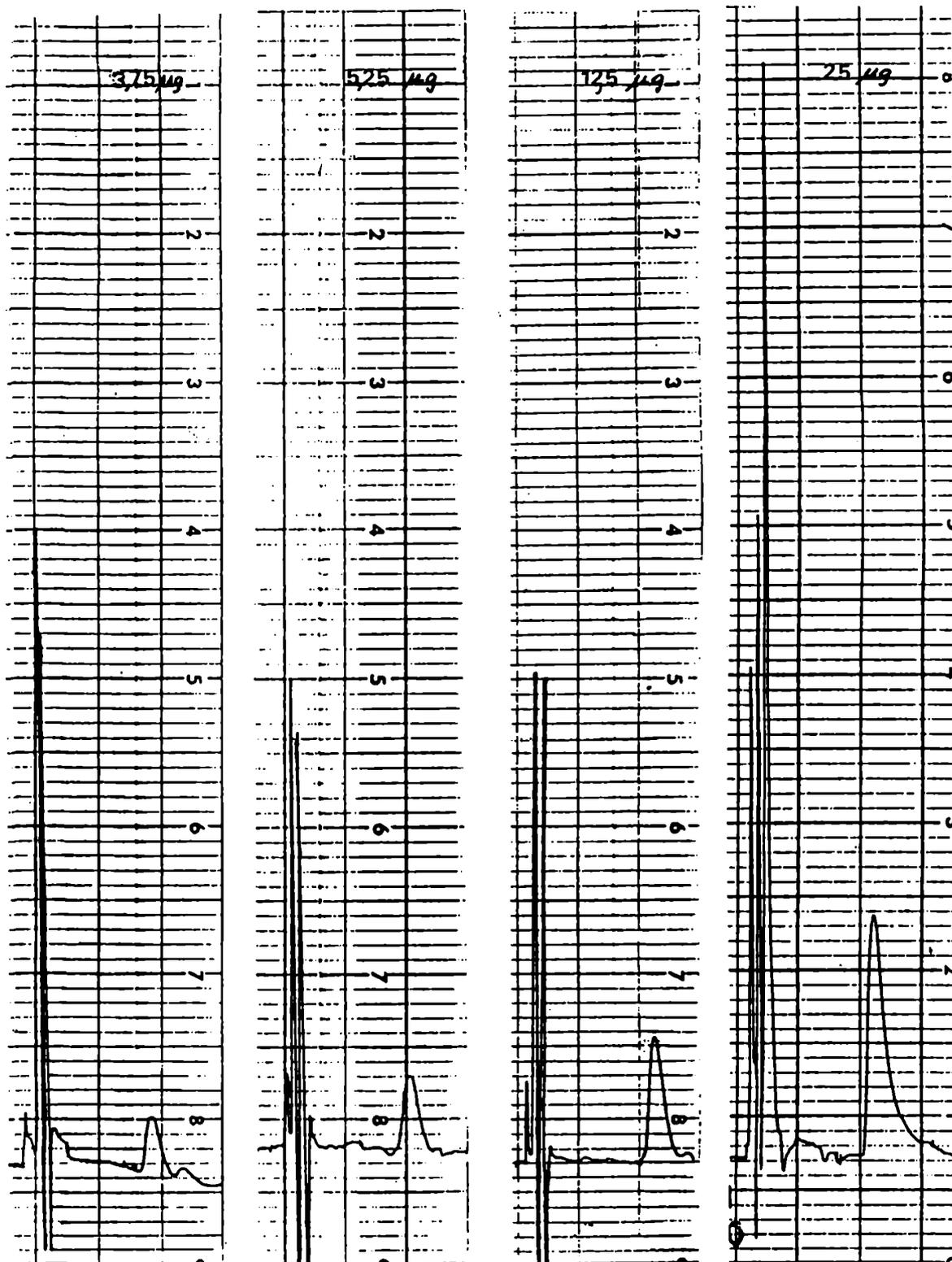


Figura 33: Cromatogramas de la BEc obtenidos por HPLC, rango 0-25 µg

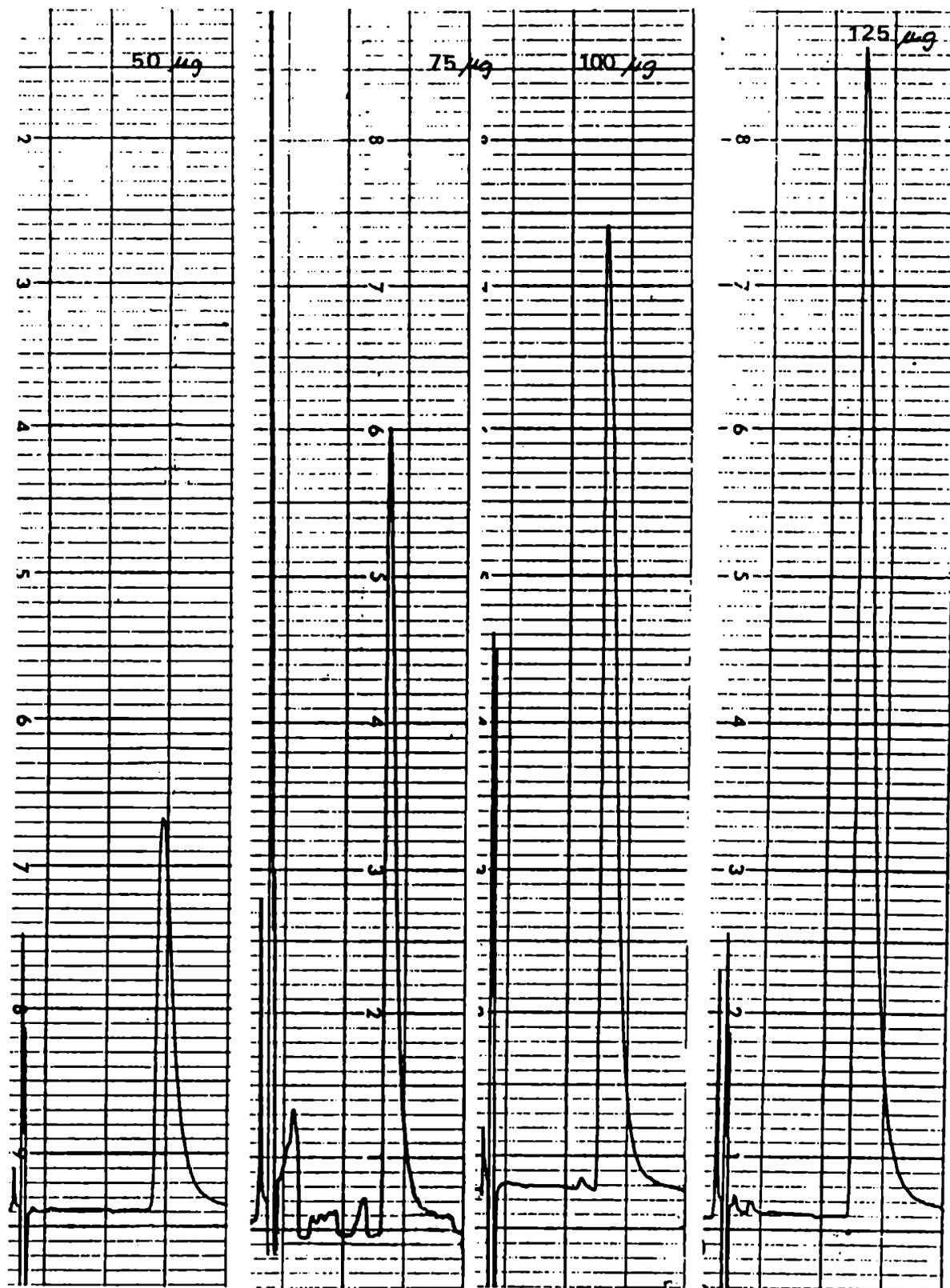


Figura 34: Cromatogramas de la BEc obtenidos por HPLC, rango 50 y 125 µg

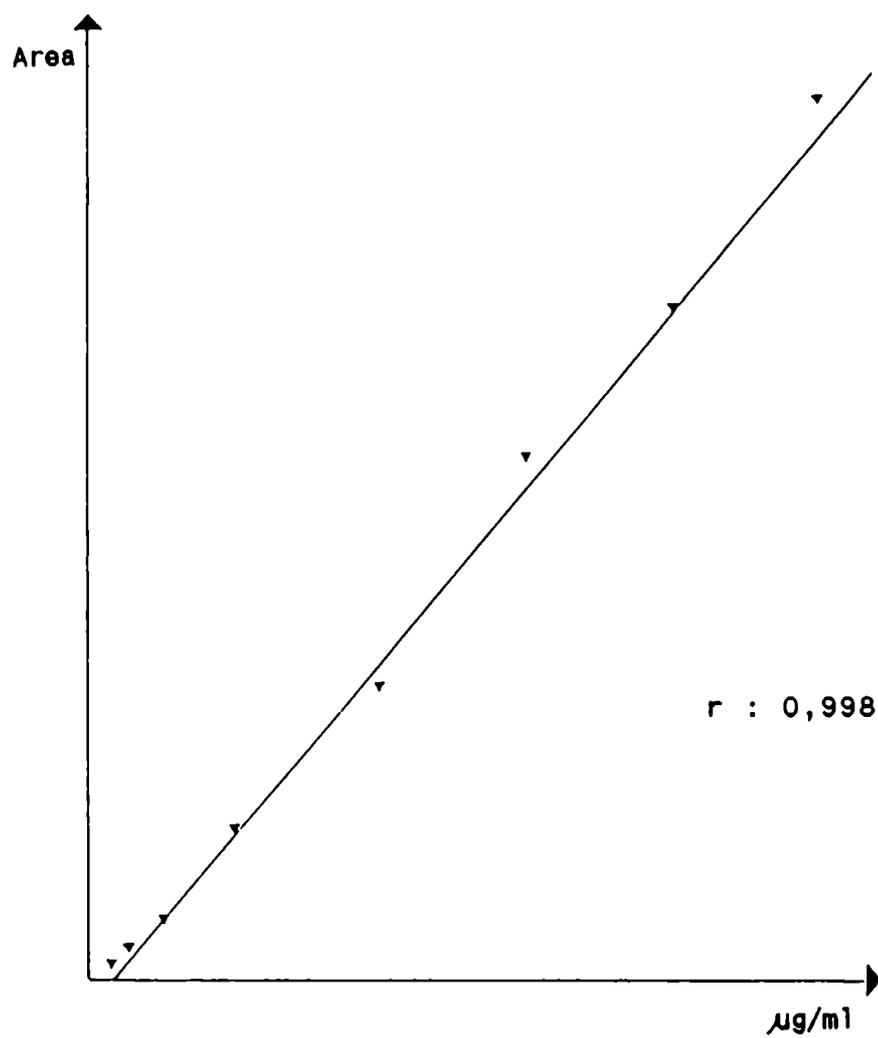


Figura 35: Recta correspondiente a la linealidad de la BEc



### I.3.2 AISLAMIENTO Y PURIFICACION

#### Esquema general para la extracción con solventes

A fin de aislar la cocaína y sus dos metabolitos, es necesario extraerlos de la matriz que los contiene. Como a lo largo de este capítulo se reiterará este tipo de aislamiento, se detallan aquí los pasos básicos seguidos; cualquier modificación introducida con posterioridad será descripta en el caso correspondiente.

Las extracciones se realizan sobre agua destilada, orina o extractos reconstituidos con agua destilada; los volúmenes serán en los dos primeros tipos de muestras de 5 ml y en el tercero de 2 ml.

Las muestras son colocadas en tubos de 30 ml de capacidad con boca esmerilada y tapa de plástico, que se sumergen en hielo; se agrega el agente alcalinizante o saturante y se extrae con el solvente orgánico según se indique en la técnica ensayada, dos veces, la primera con 5 ml y la segunda con 2 ml, agitando cada vez con vortex durante 1 minuto, dejando reposar 5 minutos y volviendo a agitar 30 segundos; se separan las fases por centrifugación a 2000 rpm durante 5 minutos. La fase orgánica superior se separa utilizando una pipeta tipo Pasteur, provista de una pequeña pera de

goma, y se trasvasa a un tubo con adaptación esmerilada y provisto de un embudo pequeño conteniendo en su vástago un botón de algodón a manera de elemento filtrante. Para minimizar errores en la recuperación se agrega al tubo conteniendo la fase acuosa 0,5 ml del solvente, haciéndolo escurrir por las paredes del mismo a fin de evitar romper la separación de las fases, y se extrae la fase solvente con la pipeta Pasteur, reuniendo ésta con las anteriores. Una vez pasada esta tercera alícuota, se lava el algodón con otros 0,5 ml del solvente. Salvo que se indique lo contrario en las técnicas ensayadas, el solvente se evapora en rotavapor a presión reducida y en baño de agua a 30°C.

### I.3.2.1 PRIMER ESQUEMA DE TRABAJO

#### Ensayos de extracción

Disponiendo de los conocimientos previos sobre el poder extractivo del ciclohexano para la cocaína, con el cual se obtiene una recuperación del 95% (180), se decidió efectuar los ensayos directamente sobre orina de ratas.

Antes de trabajar con la droga se efectuó un estudio sobre la posible interferencia de compuestos que se coextraen de la orina al aplicar la CGL de acuerdo con las condiciones descritas en párrafos anteriores.

Se eligieron como muestras orinas provenientes de distintas ratas, realizando las extracciones, de acuerdo con lo ya expuesto, con ciclohexano previa alcalinización con hidróxido de amonio al 5% hasta pH 8. Esta extracción tiene inconvenientes dado que se forma una emulsión y no se logra separar las fases por simple centrifugación, y es necesario, según consta en la bibliografía consultada (180), refrigerar por 2 horas. Después de ese tiempo los tubos se dejan a temperatura ambiente por 1 hora y se vuelve a centrifugar, logrando así la separación de ambas fases.

El extracto se analizó finalmente por CGL, obteniéndose en todos los casos un pequeño pico cuyo tiempo de retención

es similar al del standard de cocaína.

Esta interferencia ocasiona un error de hasta un 10%, dependiendo del pico de la cocaína y del área de la impureza (Figura 38).

Por tal motivo, consultando las tablas de solubilidades, tanto de la cocaína como de sus metabolitos en estudio, se decidió ensayar el acetonitrilo. Para ello se procedió primeramente extrayendo la cocaína de una solución acuosa conteniendo 100  $\mu\text{g}$  de la misma. Para separar las fases acuosa y orgánica es necesario saturar la primera, y se eligió el carbonato de potasio como agente saturante ya que se contaba con datos bibliográficos que avalaban su desempeño, y luego se extrajo con el acetonitrilo, y una vez evaporado se efectuó la cromatografía, comprobándose una recuperación de entre el 98 y el 99%.

Este resultado tan satisfactorio debió corroborarse en su aplicación en orina. La extracción se realizó sobre una muestra de orina tal cual denominada blanco de orina, y otra a la que se agregaron 100  $\mu\text{g}$  de cocaína, denominada testigo, extraída de orina.

Los extractos obtenidos presentaban a simple vista pigmentación característica y presencia de sales, y ante la imposibilidad de usar la CGL se resolvió purificarlos efectuando una extracción con ciclohexano, previa reconstitu-

ción con 2 ml de agua destilada y ajustando el pH a 8 con hidróxido de amonio, si fuera necesario. En este caso no se presentaron dificultades en la separación de las fases, y fue suficiente centrifugar para dividir las.

Sobre el extracto se procedió a efectuar la CGL, obteniéndose un resultado óptimo, ya que las impurezas provenientes de la orina, que aparecían con un tiempo de retención similar al de la cocaína, no interferían (Figura 38), y además la recuperación de la droga después de aplicar los dos pasos, aunque algo menor, es altamente satisfactoria, con una media del 93%.

Se comprobó el poder extractivo del acetonitrilo para la BEc, primero sobre una solución acuosa que contiene 100  $\mu$ g de la misma, saturando con carbonato de potasio y extrayendo con el solvente mencionado, obteniendo una recuperación promedio del 96%. Sin embargo, cuando se empleó orina los extractos a simple vista se presentaban impurificados, requiriendo un tratamiento adicional. Dicho estudio se describirá más adelante.

Para la Ec se procedió en forma similar, obteniéndose una recuperación de agua de alrededor del 97%, pero como en el caso de BEc, la extracción de orina requería una purificación previa a la determinación de la Ec, que en este caso se efectúa por CGL luego de derivatizar.

En vista de la factibilidad de extraer de soluciones acuosas con muy buen rendimiento la cocaína y los dos metabolitos en estudio, utilizando acetonitrilo, y la posibilidad de emplearlo en muestras de orina luego de una purificación posterior de los extractos, se decidió ensayar diversos procedimientos, como una segunda extracción líquido-líquido, cromatografía en columna u otras técnicas, para lograr dicha purificación.

Como se resolvió satisfactoriamente para la cocaína mediante una extracción con ciclohexano, se continuó trabajando sobre la fase acuosa remanente de esta segunda extracción a fin de aislar la BEc y la Ec.

Primeramente se extrajo la BEc con un solvente de comprobado poder extractivo para este metabolito, como lo es el acetato de etilo, previa saturación de la fase acuosa con carbonato de potasio. Sobre la fase orgánica separada y evaporada se procedió a efectuar la identificación por CCD antes de utilizar otro tipo de cromatografía, a fin de evaluar el grado de impurificación del extracto y a su vez comprobar si este solvente extrae Ec. Para ello se trabajó en forma paralela con una orina conteniendo 100  $\mu\text{g}$  de Ec y con una orina blanco.

Los extractos se sembraron en placas de sílica gel GF, ensayándose distintos solventes de desarrollo para obtener

una buena resolución del cromatograma, eligiéndose entre ellos la mezcla metanol:cloroformo(2:1), que además de separar adecuadamente los standards de cocaína, BEc y Ec con Rf 0,55, 0,35 y 0,26 respectivamente, permitió observar que el extracto proveniente de la orina conteniendo BEc, al revelarse con Dragendorff presentaba una mancha coincidente con el standard correspondiente en una zona en la cual no interferían las impurezas coextraídas (Figura 39(a)). En el extracto correspondiente a la orina que contenía Ec no se observó más que las manchas de las impurezas, confirmando que la cantidad de Ec que se puede extraer con acetato de etilo es muy pequeña. Para confirmar el porcentaje se realizó una extracción de la Ec de una solución acuosa que la contenía, saturando con carbonato de potasio y extrayendo con acetato de etilo; el extracto se derivatizó y se pasó por el CGL, comprobándose que se extrajo alrededor del 5% de este metabolito.

En vista de que los extractos provenientes de aplicar la extracción con acetato de etilo eran bastante puros, se empleó HPLC para determinar el grado de recuperación de la BEc después de aplicar los pasos descritos con anterioridad (Figura 40), resultando ser de 74-75%. Sobre la fase acuosa remanente de extraer la BEc se realizó una extracción para aislar la Ec. Para garantizar un exhaustivo ais-

lamiento del metabolito se agregó a la fase acuosa 0,3 ml de HONa al 40% y se calentó 3 minutos en baño de agua hirviente. Posteriormente se dejó enfriar a temperatura ambiente y se procedió a extraer la Ec con acetonitrilo. La identificación por CCD resultó dificultosa debido a que el extracto se encontraba impurificado, pero a pesar de esto se detectó su presencia (Figura 39 (b)).

La determinación por CGL resultó imposible y fue preciso proceder a la purificación previa del extracto. Los ensayos para lograr este objetivo se describirán a continuación.

### Purificación de la ecgonina por carbón activado

De acuerdo con la bibliografía existente sobre el tema, se resolvió aplicarlo en principio para la Ec, que, como se comprobó, es el metabolito que requiere una técnica más compleja para su identificación y valoración.

Se intentó realizar el aislamiento y purificación en forma simultánea, mediante la propiedad absorbente que tiene el carbón. Existen dos posibilidades: absorber el metabolito para luego eluirlo, o viceversa, que se absorban las impurezas de la orina y obtener un sobrenadante libre de la mayor parte de las impurezas y conteniendo la Ec.

A tres tubos que contenían 200  $\mu$ g de Ec se les agregó 5 ml de las siguientes soluciones: 1) buffer de carbonato de sodio-bicarbonato de sodio a pH 11; 2) agua destilada; 3) agua destilada acidificada con ácido acético 2 M a pH 4. Al primer tubo se le agregó 0,25 ml de carbón pretratado con el buffer mencionado, y a los restantes carbón sin tratar.

Se agitaron con vortex por espacio de 1 minuto, repitiéndose esta operación dos veces y dejando luego en reposo aproximadamente 18 horas, y luego se centrifugó y separó el sobrenadante. La fase acuosa se evaporó en rotavapor a presión reducida y en baño a agua a 40°C; el extracto obtenido se disolvió en etanol a fin de realizar una CCD.

Al carbón se le agregaron 3 ml de etanol, se agitó, se centrifugó y el sobrenadante se pasó a un tubo; nuevamente se le agregó 1 ml de etanol y se procedió como en la primera extracción, juntando las fracciones que se evaporaron y sembraron en placa, disolviendo el extracto en etanol.

El sistema cromatográfico consistió en una placa de sílica gel, un solvente de desarrollo formado por metanol:hidróxido de amonio (99:1), y un revelado con Dragendorff modificado, y iodoplatinato en forma secuencial. Se obtuvo una placa como la de la Figura 41(a), que muestra que la Ec no se encuentra en el sobrenadante en el caso del pH 11, y que es eluida del carbón en una proporción del 50% comparando en forma semicuantitativa con un standard.

Se aplicó el método sobre orina de ratas, trabajando en paralelo con un tubo conteniendo 5 ml de orina blanco y otro con 200 ug de Ec en 5 ml de orina. A cada uno se le agregaron 2,5 ml de buffer carbonato-bicarbonato e hidróxido de sodio 0,5 N hasta llevar el pH a 11. Del mismo modo se procedió con otros dos tubos con orina y orina más Ec, pero ajustando el pH a 11,5.

A los cuatro tubos se les agregó 0,25 ml de carbón previamente tratado con el buffer, se agitó la mezcla y se dejó en reposo aproximadamente 18 horas. Se centrifugó y se separó el sobrenadante, que se trasvasó a tubos y se evapo-

ró. El carbón se lavó con 1,5 ml de buffer a pH 11 y 11,5, según el caso; se centrifugó y el sobrenadante se evaporó. El carbón se trató dos veces con etanol, usando primero 3 ml y luego 1,5 ml, agitando, centrifugando y separando el sobrenadante cada vez; se juntaron ambas extracciones y se evaporaron. Todos los extractos se sembraron en placas, realizándose la CCD según se indicó en párrafos anteriores (Figura 41(b)). En los extractos etanólicos, tanto de pH 11 como de 11,5, la zona correspondiente al Rf de la Ec aparece enmascarada por las impurezas, observándose una menor intensidad de éstas en la correspondiente a pH 11.

En cuanto a los extractos provenientes de los lavados del carbón con el buffer respectivo, aparecen manchas más tenues que en el caso anterior pero con Rf próximo a la Ec, tanto en el blanco de orina como en la muestra, no observándose en esta última ninguna intensificación de la mancha por posible presencia de Ec.

El sobrenadante se volvió a tratar con carbón, pero se dejó en reposo con el buffer sólo 3,5 horas; se centrifugó y se descartó la fase acuosa, extrayendo con etanol dos veces con 2,5 ml, juntando ambas extracciones en un tubo para su posterior evaporación y sembrado (Figura 42(a)). Se observó en la muestra una mancha cuyo Rf coincidió con el de la Ec; sin embargo, la recuperación resultó muy baja.

Comparando los resultados en muestras de agua o de orina, se concluye que en el caso de esta última la Ec no es absorbida en su totalidad por el carbón y que en los dos casos la desorción no es completa.

Este procedimiento de purificación con carbón a pH 11 se aplicó sobre el extracto proveniente de las sucesivas extracciones, según esquema de la Figura 40, para aislar la Ec, observándose que las interferencias en la CCD son despreciables, pero persiste el hecho de una baja recuperación agravada por las previas etapas de extracción; por lo tanto, se descarta esta posibilidad de purificación.

### Purificación por cromatografía en columna

Esta técnica, ampliamente utilizada para separar, aislar y purificar los componentes presentes en una mezcla y que fue el pilar sobre el cual fueron desarrollándose los otros tipos de cromatografías, continúa siendo de utilidad en numerosos casos.

Contando con antecedentes de su aplicación en el estudio que nos ocupa, se procedió a ajustar e introducir las modificaciones que fueran necesarias.

Para ensayar la purificación de la Ec, se prepararon cuatro columnas cromatográficas de 150 mm de altura incluyendo la zona del vástago, y 4 mm de diámetro interno, las que se rellenaron con sílica gel para cromatografía en columna previamente activada 30 minutos a temperatura de 100-105°C a distintas alturas. Denominamos a las columnas según la altura del relleno: A, B, C y D, que corresponden a 5,5 cm, 6,0 cm, 6,5 cm y 7,0 cm respectivamente.

En cada columna se sembró una solución de 100 µg de Ec disuelta en 0,2 ml de metanol, y se lavó el tubo que la contenía con 0,1 ml de metanol, que también se sembró; luego de introducida la muestra se eluyó con metanol, recogiendo cuatro fracciones de 1,0, 0,5, 7,0 y 1,0 ml. Estas fracciones se evaporaron y se analizó la presencia de Ec por CGL

previa derivatización y en las condiciones operativas mencionadas. Los resultados cualitativos se señalan en la Tabla X, e indican que con la columna A se eluyó la Ec en las tres primeras fracciones, encontrándose un 4% en los primeros 1,5 ml. Teniendo en cuenta que al aplicar esta columna a extractos de orina se eluirán la mayor parte de las impurezas en las dos primeras fracciones, se consideró a priori que esta columna no cumplió satisfactoriamente su objetivo.

En las columnas B y C, por lo contrario, la Ec se eluyó recién en la tercera fracción, correspondiente a los 7,0 ml recolectados, no detectándose el metabolito en las dos primeras fracciones ni en la última.

En la columna D se obtuvo Ec en la tercera y cuarta fracción.

Calculando los porcentajes de recuperación de las columnas B, C y D, se observó que para las terceras fracciones de B y C son 96% y 97% respectivamente, y para la D 83%, entre las fracciones tercera y cuarta. Esta menor recuperación se debió a que existe mayor retención de la Ec en la columna y que debería recolectarse una cuarta fracción de mayor volumen, de 2 ó 3 ml. Pero como en principio las columnas B y C daban excelentes resultados y todavía era necesario poner a prueba estas columnas con extractos de orina para determinar el grado de purificación, se decidió elegir

la columna B, ya que existe un compromiso entre el porcentaje de recuperación y la eliminación de las impurezas en las primeras fracciones.

Este tipo de purificación se aplicó al residuo proveniente de extraer la Ec con acetonitrilo en la última etapa del esquema de la Figura 40 y sobre el cual no fue conveniente aplicar directamente la CGL. El residuo se tomó con 0,2 ml de metanol y se sembró en una columna tipo B, procediéndose igual con el lavado con 0,1 ml. Se eluyó con el solvente, descartándose los primeros 1,5 ml, en los cuales se observa a simple vista que se eliminan la mayor parte de las impurezas, colectándose los 7,5 ml posteriores según experiencia anterior.

Finalmente se procedió a evaporar el solvente de esta segunda fracción a presión reducida, y se identificó la presencia de Ec por CCD (Figura 42(b)), utilizando placas de sílica gel y solvente de desarrollo metanol:cloroformo (100:50), revelando con Dragendorff modificado y iodoplatinato. En forma paralela se procedió con el blanco de orina.

Los resultados anteriores permitieron concluir que el extracto se ha purificado lo suficiente como para intentar la sililación y determinar la Ec por CGL. Los resultados obtenidos indican que la recuperación después de realizados los cuatro pasos que incluyen tres extracciones sucesivas y pu-

rificación final, es del 65%.

Esta recuperación relativamente baja se debe a los sucesivos pasos necesarios para obtener un extracto lo suficientemente puro como para poder derivatizarlo.

Si bien el método permite separar en distintos extractos las sustancias en estudio, pudiéndose evaluar individualmente cada una de ellas, la BEc, y sobre todo la Ec, dan rendimientos algo bajos.

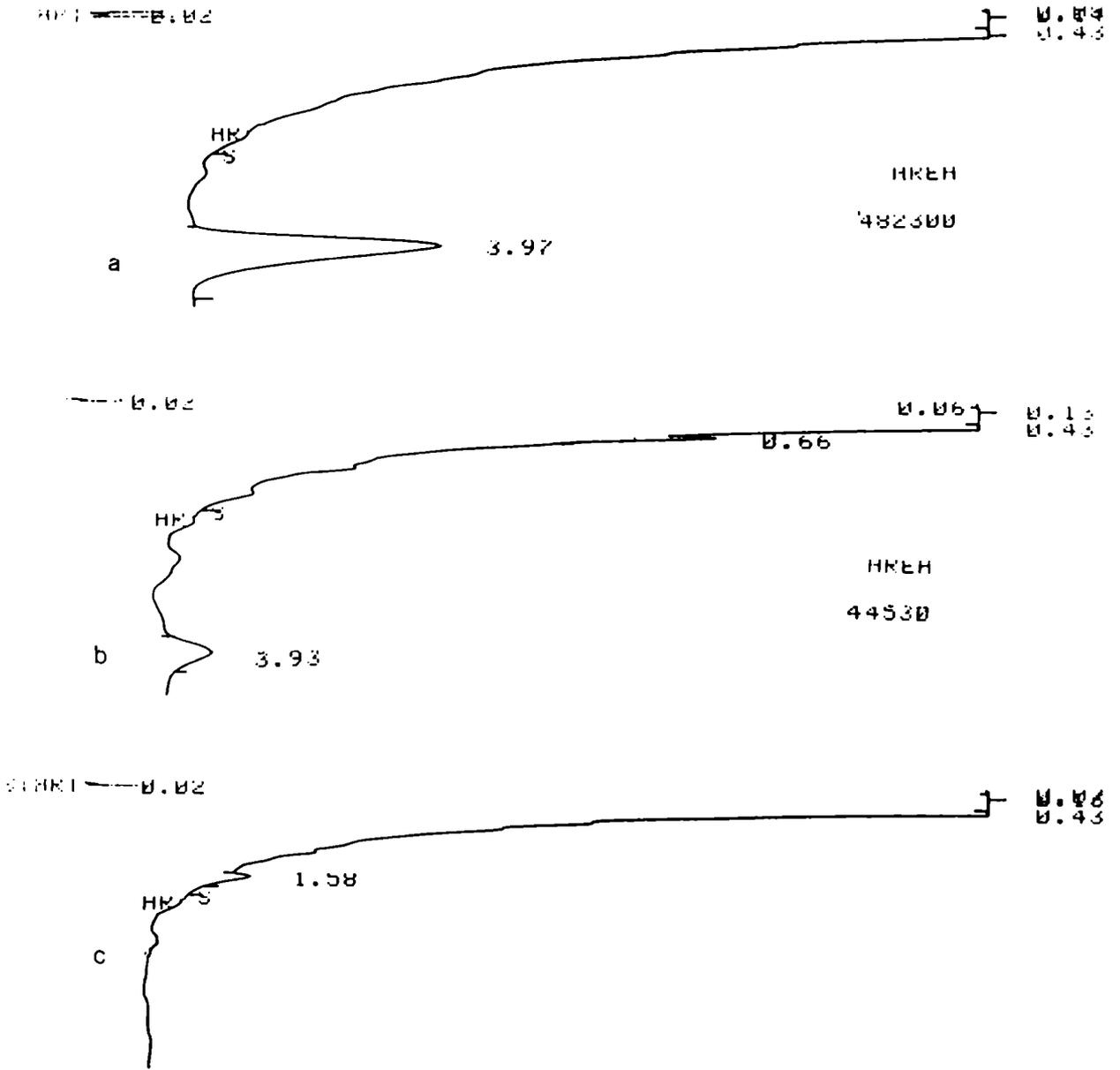


Figura 38: Cromatogramas de cocaína en orina por CGL:  
 a) standard de cocaína; b) extracción con ciclohexano; c) extracciones con acetonitrilo y ciclohexano.

## Cromatografía en capa delgada

### Abreviaturas

- Cc            cocaína  
BEc         : benzoilecgonina  
Ec            : ecgonina

### Solventes de desarrollo

- A) Metanol:cloroformo (2:1)  
B) Metanol:hidróxido de amonio (99:1)  
C) Metanol

### Agentes revelantes

- X) Dragendorff modificado  
Z) Iodoplatinato

### Standards y extractos sembrados

- 1    Standard Cc
- 2    Standard BEc
- 3    Standard Ec
- 4    Blanco de orina
- 5    Residuo III de orina, según esquema Figura 40
- 6    Residuo IV de orina, según esquema Figura 40
- 7    Purificación con carbón, extracto sobrenadante pH 4
- 8    Idem 7, pH 11
- 9    Idem 7, pH 7
- 10  Purificación con carbón,extracto etanólico,orina blanco

- 11 Idem 10 a pH 11
- 12 Idem 10 a pH 11,5
- 13 Purificación con carbón a pH 11, sobrenadante del segundo tratamiento con carbón, orina blanco
- 14 Idem 13, muestra de orina
- 15 Idem 13 a pH 11,5
- 16 Idem 14 a pH 11,5
- 17 Purificación de la Ec por columna, orina blanco
- 18 Idem 17, muestra de orina
- 19 Identificación de Ec previa hidrólisis de Cc y BEc en agua destilada
- 20 Idem 19, en orina humana blanco
- 21 Idem 19, en orina humana con agregado de Cc, BEc y Ec

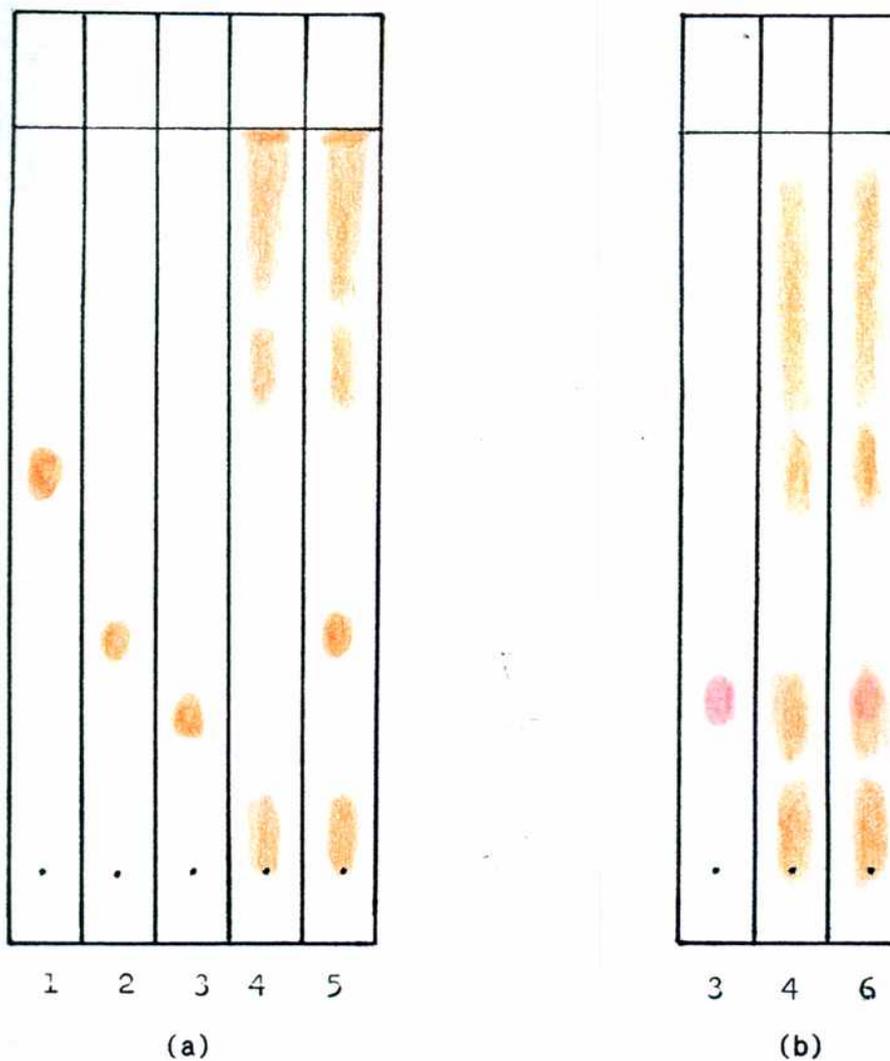


Figura 39(a): Residuo II (BEc) correspondiente al esquema de la Figura 40.

Solvente de desarrollo: A

Agente revelante: X

Figura 39(b): Residuo III (Ec) correspondiente al esquema de la Figura 40.

Solvente de desarrollo: A

Agente revelante: X y Z en forma secuencial

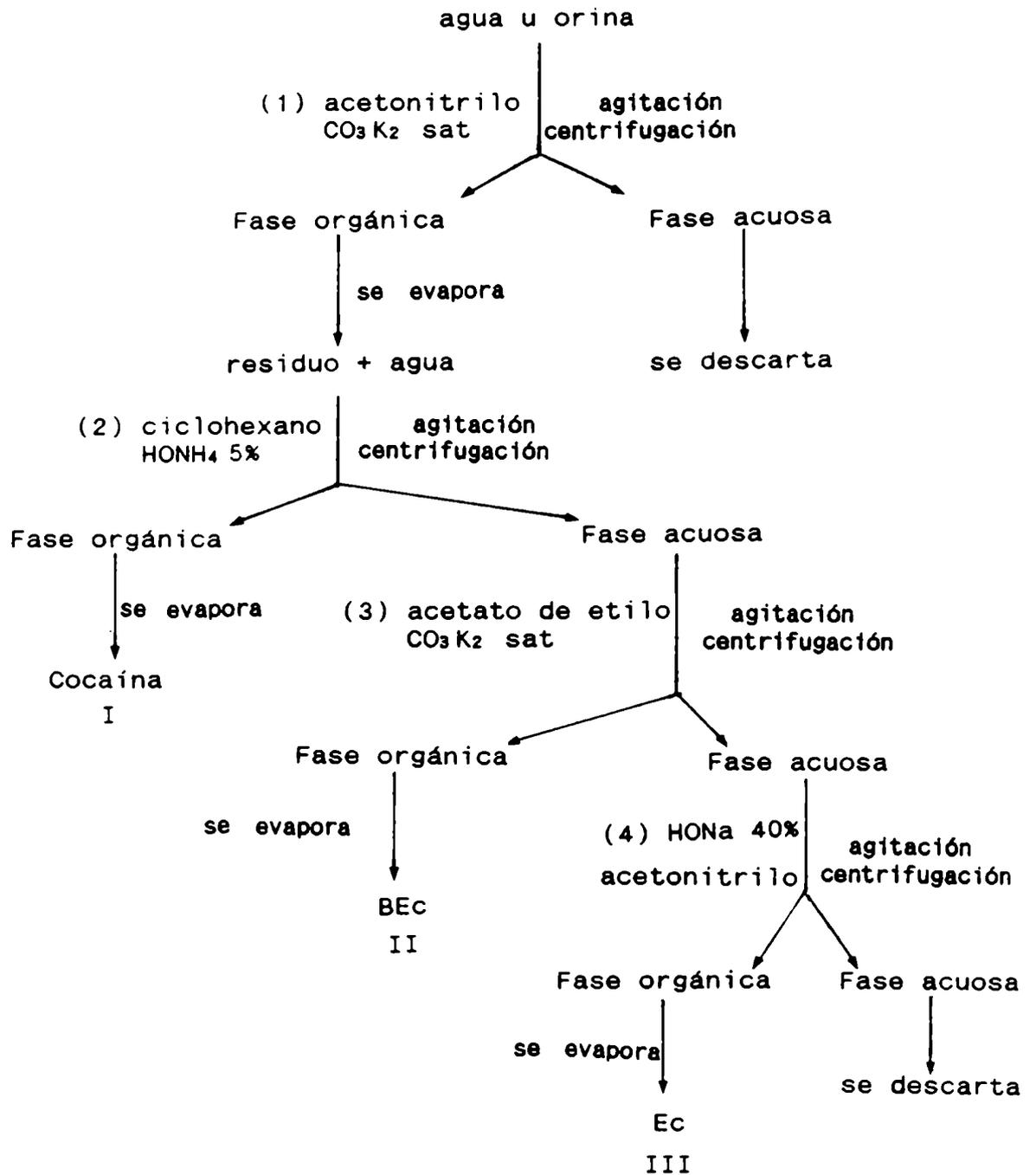


Figura 40: Primer esquema propuesto para la separación de la cocaína y sus metabolitos

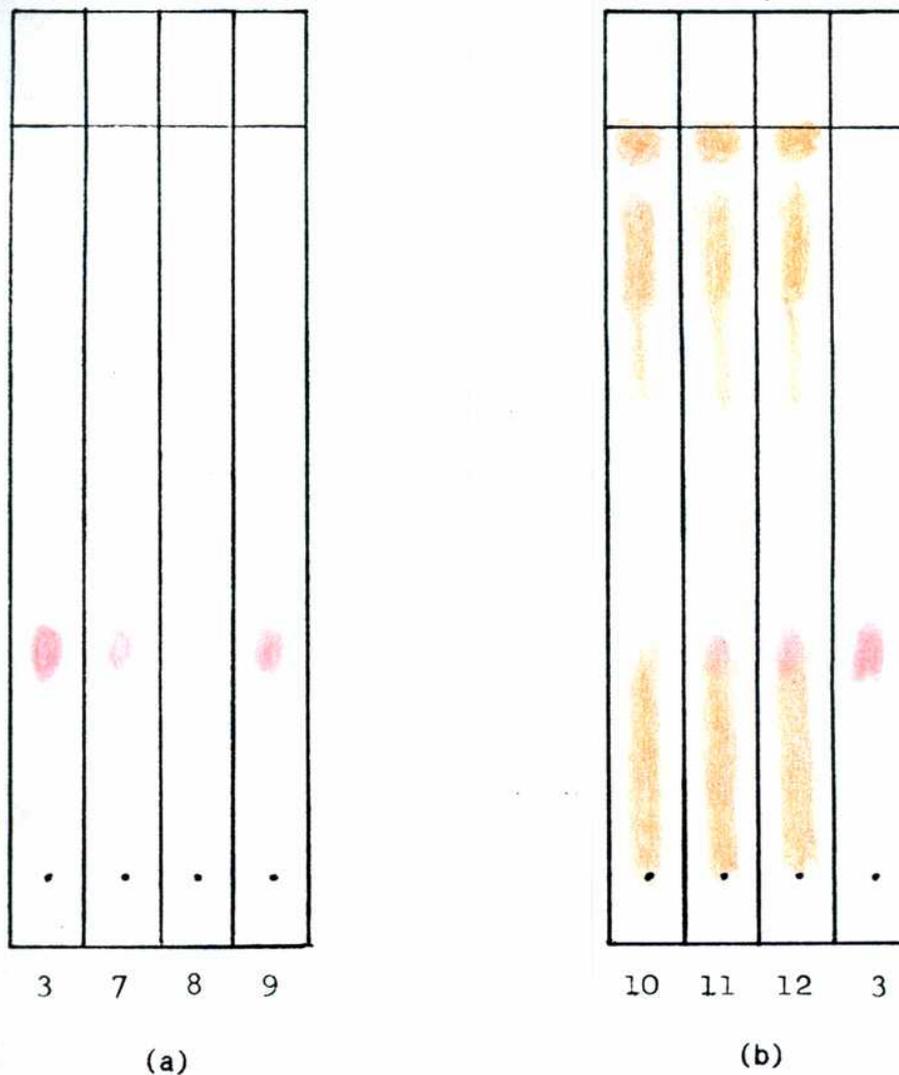


Figura 41(a): Purificación de la Ec con carbón activado, extracto de los sobrenadantes de pH 4, 7 y 11.  
 Solvente de desarrollo: B  
 Agente revelante: X y Z en forma secuencial

Figura 41(b): Purificación de Ec con carbón activado a pH 11 y 11,5, extractos etanólicos.  
 Solvente de desarrollo: B  
 Agente revelante: X y Z en forma secuencial

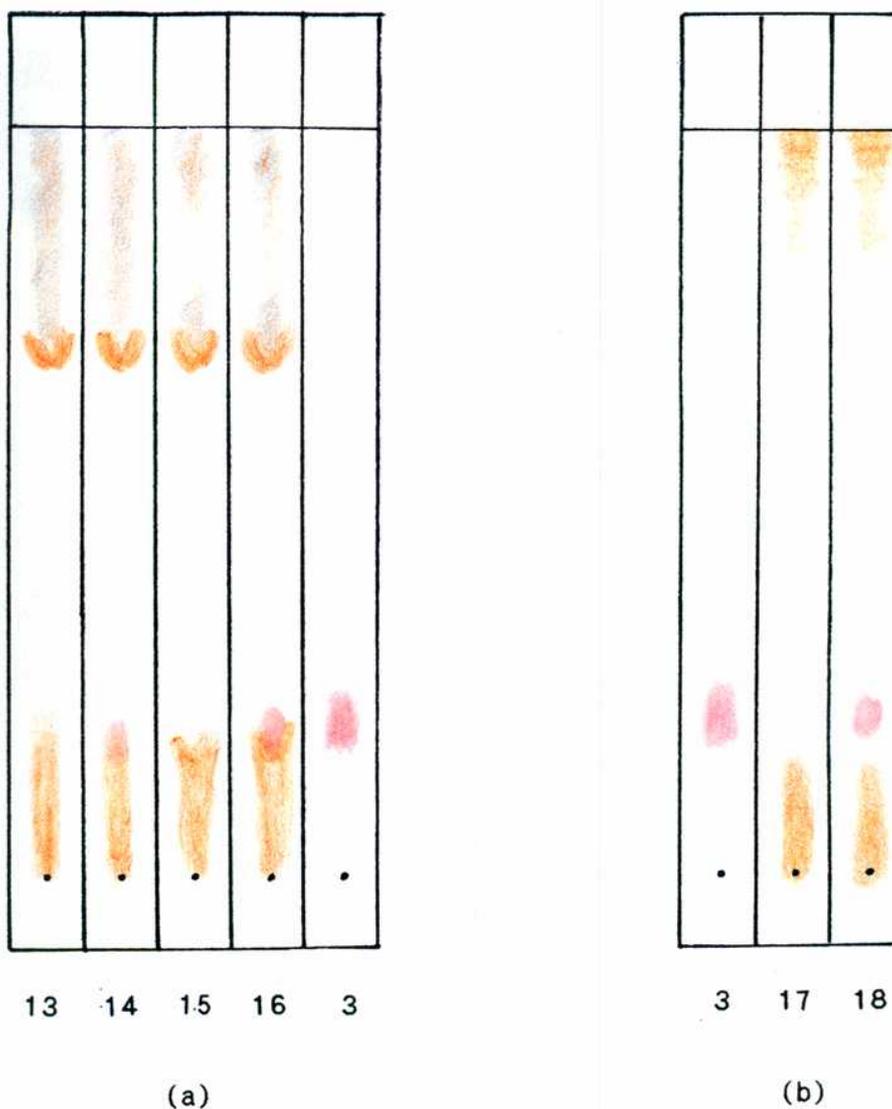


Figura 42(a): Doble purificación de la Ec con carbón activado a pH 11 y 11,5, extractos del sobrenadante.

Solvente de desarrollo: B

Agente revelante: X y Z en forma secuencial

Figura 42(b): Purificación de la Ec por columna

Solvente de desarrollo: A

Agente revelante: X y Z en forma secuencial

## T A B L A X

## PURIFICACION DE Ec POR COLUMNA

número de fracción	ml	c o l u m n a s			
		A	B	C	D
1	1,0	+	-	-	-
2	0,5	++	-	-	-
3	7,0	+	+++	+++	++
4	1,0	-	-	-	+

### I.3.2.2 MODIFICACIONES

Mediante las modificaciones que se detallan a continuación se intentó reducir el número de pasos a fin de mejorar el porcentaje de recuperación sin comprometer la pureza de los extractos.

#### Modificación nº 1

Se estudió la recuperación de BEc y Ec extraídas de una solución acuosa que las contenía, aplicando el esquema de extracción siguiente: Primero se extrajeron con acetonitrilo previa saturación de la solución con carbonato de potasio; el solvente orgánico se evaporó y el residuo obtenido se reconstituyó con agua; se efectuó una extracción, previa alcalinización del mismo con hidróxido de sodio al 5%, con ciclohexano, que en el caso que nos ocupa se descartó pero que en una muestra a analizar podría contener cocaína. Sobre la fase acuosa se extrajo nuevamente con acetonitrilo previo agregado del agente saturante, se separó y evaporó, y se pasó por el CGL según el programa de valoración conjunta de BEc y Ec, obteniéndose una recuperación aproximada de 92% y 93% respectivamente.

Ante estos resultados se decidió aplicar la secuencia de

extracciones sobre orina. Una vez efectuada la primera extracción con acetonitrilo y evaporado este solvente orgánico, el extracto se reconstituyó con 2 ml de agua destilada, se llevó a pH 8 con hidróxido de amonio al 5% y se extrajo la cocaína con ciclohexano como ya se describió y evaluó. La fase que nos interesa en este caso es la acuosa, que se extrajo con acetonitrilo previa saturación con carbonato de potasio; la fase orgánica separada se evaporó, y de esta forma se consiguió un extracto que contiene BEc y Ec juntas, pero impurificado.

Si bien surge la posibilidad de valorarlas simultáneamente por CGL, en el caso de las muestras de orina las impurezas coextraídas impiden en principio una aplicación directa. Se pensó en usar el HPLC pero está limitado para la determinación de BEc por las razones que ya se mencionaron. Por lo tanto, existe la posibilidad de purificar previamente el extracto aplicando como primera alternativa las mismas condiciones que las de la purificación de la Ec por columna de 6 cm de altura, ya descripta anteriormente, recogiendo la segunda fracción de 7,5 ml rotulada A y que se evapora.

Purificación de BEc: Se prepararon 2 columnas rellenas con sílica gel, una hasta una altura de 6 cm (B) y la otra de 6,5 cm (C). Se sembró en cada una el equivalente de

100  $\mu$ g del metabolito en una solución de metanol, y se eluyó con este mismo solvente, colectándose las siguientes fracciones de 0.5 ml cada una: B<sub>1</sub>, C<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, C<sub>2</sub>, B<sub>3</sub> y C<sub>3</sub>; de 5 ml B<sub>4</sub> y C<sub>4</sub>, y B<sub>5</sub> y C<sub>5</sub> de 0,5 ml. En todos los casos se evaporó el solvente.

Para evaluar el rendimiento en las purificaciones mencionadas y las modificaciones siguientes, se aplicó el programa de CGL de valoración simultánea de BEc y Ec. La recuperación de la Ec en la fracción A es de un 74%, superior a la del método original, que daba un 65%. Para la BEc se recuperó un 53% y 50% en las fracciones B<sub>3</sub> y C<sub>3</sub> respectivamente. No se detectó en B<sub>1</sub>, C<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, C<sub>2</sub>, B<sub>5</sub> y C<sub>5</sub>, y en B<sub>4</sub> y C<sub>4</sub> da un 10% y 15% respectivamente. Por lo tanto la purificación para Ec es excelente, pero en el caso de BEc el hecho de que aparezca en alrededor del 60% después del primer mililitro indica que el extracto está más impurificado, y éste puede ser uno de los motivos de la baja recuperación. Las impurezas pueden estar interfiriendo en la sililación, y por consiguiente dar un rendimiento bajo, o bien existe una retención de la BEc en la columna.

#### Modificaciones nº 2 y 3

Se intentó en estos dos casos trabajar sobre el primer

extracto que contiene cocaína, BEc y Ec, y purificarlos en forma simultánea y evaluar cocaína, BEc y Ec por CGL. Para ello se ensayaron las modificaciones siguientes:

Modificación nº 2: El extracto se tomó con 0,5 ml de acetato de etilo:metanol (17:2) y se sembró en una columna de sílica gel para cromatografía en columna, rellena hasta una altura de 5 cm, eluyendo con el solvente mencionado, recogándose dos fracciones de 2 y 1 ml rotulándolas D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub>, y se continuó eluyendo con metanol, colectando 2 fracciones de 2 ml y 6 ml, que son las D<sub>3</sub> y D<sub>4</sub>. Los solventes se evaporan en todos los tubos, y cada extracto se toma con metanol, se divide en dos volúmenes iguales: uno se utilizó para valorar la cocaína con el programa correspondiente y el otro se derivatizó y se efectuó la CGL de acuerdo con el programa de evaluación simultánea de BEc y Ec. La cocaína se eluyó en las fracciones D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub> y D<sub>3</sub> que, sumadas, dan un rendimiento del 75%, y en la D<sub>4</sub> no se detectó.

La BEc y la Ec no se detectaron en ninguna de las fracciones.

Esta modificación tampoco resultó satisfactoria para la cocaína, dado que la recuperación es inferior a la obtenida por purificación por extracción con ciclohexano (93%).

### Modificación nã 3

Se empleó como solvente de elución una mezcla de metanol:cloroformo (70:30), recogiendo cuatro fracciones de 1 ml cada una; luego se cambió de solvente de elución, colectándose 8 ml de metanol en una sola fracción. Las fracciones se rotulan E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub>, E<sub>3</sub> y E<sub>4</sub>. Se evaporó el solvente en rotavapor, y los extractos se dividieron cada uno en dos fracciones para determinar con dos programas distintos cocaína y juntas BEc y Ec.

La cocaína fue detectada en las tres primeras fracciones (E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub> y E<sub>3</sub>), con una recuperación total del 82%.

La identificación de BEc y Ec en las fracciones E<sub>1</sub> y E<sub>2</sub> no pudo corroborarse debido a la presencia de interferencias provenientes de la orina en la zona correspondientes a los tiempos de retención de estos metabolitos.

La BEc no se identificó en las restantes fracciones y la Ec apareció en las fracciones E<sub>3</sub> y E<sub>4</sub> con una recuperación total del 22%.

### I.3.3 NUEVO ESQUEMA DE TRABAJO

En vista de los resultados anteriores, se decidió extraer la cocaína, BEc y Ec primero con acetonitrilo previa saturación con carbonato de potasio, separado y evaporado; se reconstituyó el extracto con agua destilada y se extrajo la cocaína con ciclohexano previo ajuste del pH a 8 con hidróxido de amonio al 5%. Sobre el residuo obtenido después de evaporar el solvente se efectuó la CGL. Para extraer la BEc y la Ec se agregó a la fase acuosa el agente saturante y acetonitrilo, después de agitar, separar y evaporar la fase orgánica. El extracto se tomó con 0,4 ml de metanol y se dividió en dos volúmenes iguales; una mitad se pasó por HPLC y se determinó la BEc con una recuperación del 89%, superior a la obtenida extrayendo con acetato de etilo (74%).

La otra mitad se purificó por columna según la siguiente técnica:

Se sembraron los 0,2 ml de metanol en la columna que contenía la sílica gel activada (por calentamiento) hasta una altura de 6 cm, se eluyó con metanol, descartando en esta oportunidad 1,2 ml, y se recogieron los 7,5 ml siguientes. Estos se evaporaron y sobre el extracto se efectuó la derivatización y se pasó por CGL, obteniéndose una recuperación de la Ec del 75%, es decir se mejoró la recuperación sin

comprometer la pureza de los extractos.

Si en vez de orina de rata se trabaja con agua, se observa que el rendimiento mejora en alrededor de un 3%. Se concluye que la sílica gel se envenena con las impurezas de la orina y no absorbe totalmente el metabolito. Por lo tanto, se eluye más rápidamente de la columna lo no absorbido y se pierde en la primera fracción que se descarta.

El nuevo esquema de trabajo se halla representado en la Figura 43 y las condiciones definitivas se exponen en la Parte Experimental II.

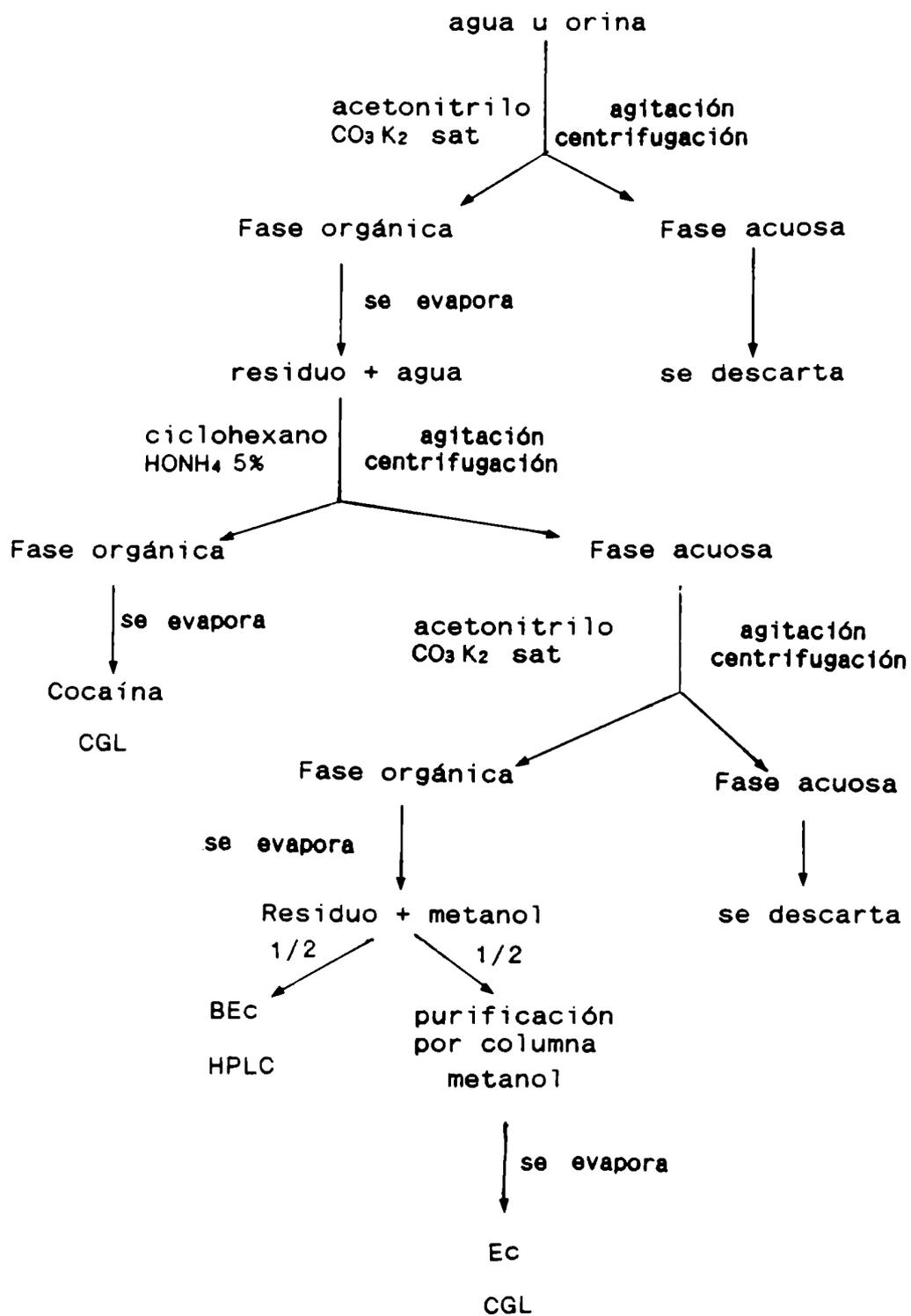


Figura 43: Esquema definitivo para la separación de la cocaína y sus metabolitos

#### I.3.4 IDENTIFICACION DE ECGONINA EN ORINA

Una posibilidad interesante y que está dirigida a la detección y confirmación del abuso de la cocaína en muestras de orina es transformar mediante hidrólisis alcalina la cocaína, EMEc y BEc en Ec, e identificar esta Ec así formada más la excretada, mediante CCD previa extracción y purificación.

La puesta a punto de esta técnica se ensayó sobre agua destilada y orina de ratas a la que se agregó 100  $\mu$ g de cada una de las sustancias mencionadas.

Sobre ambos tipos de muestras se efectuó un tratamiento con hidróxido de sodio al 20% y calentamiento en baño de agua hirviente durante 5 minutos; una vez enfriadas las soluciones se extrajo con la mezcla cloroformo:isopropanol (3:1) previa saturación con carbonato de potasio. La fase orgánica se separó, se evaporó y al residuo se le agregó 0,5 ml de hidróxido de sodio al 20% y carbonato de potasio a saturación, extrayendo dos veces con 2 ml de acetonitrilo cada vez. Estos 4 ml se pasaron por una columna de vidrio de 15 cm de altura y 0,7 cm de diámetro interno que contenía 1 gramo de celite 545. La columna se lavó con 5 ml de acetonitrilo, la fracción recolectada se evaporó y el residuo se disolvió en 50  $\mu$ l de metanol y se cromatografiaron

10  $\mu$ l bajo las siguientes condiciones: placas de sílica gel GF 254, solvente de desarrollo metanol; efectuándose dos corridas cromatográficas, una hasta una altura de 7 cm y la segunda hasta 15 cm. Se reveló con Dragendorff modificado y iodoplatinato en forma secuencial (Figura 44).

Se observó una mancha tanto en la muestra de agua como en la de orina, cuyo Rf es coincidente con el standard de Ec y en una zona libre de impurezas. Las manchas de las muestras aparecen con mayor intensidad debido a que la Ec proviene de tres fuentes de hidrólisis, además de la sustancia tal cual.

La importancia de este aporte radica en el hecho de que todos los metabolitos y la cocaína presente en la orina son detectados simultáneamente, incrementando las posibilidades de su identificación, ya que corresponde a la suma de los porcentajes de excreción, disminuyendo el riesgo de informar resultados negativos falsos.

Además, las condiciones en que se obtiene la muestra, el almacenaje y el tiempo transcurrido entre el ingreso al organismo de la droga y la recolección de la orina tienen una incidencia mucho menor en los resultados.

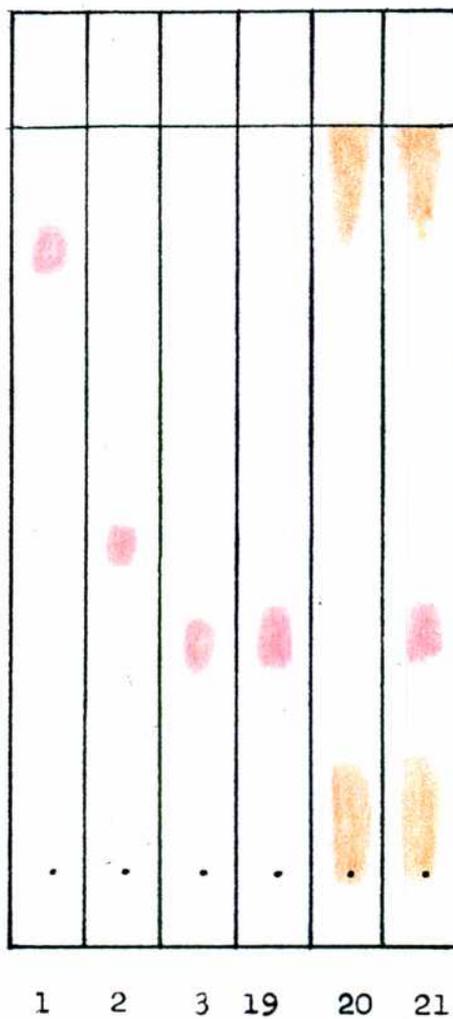


Figura 43: Identificación de Ec en orina, previa hidrólisis de la cocaína y BEc.  
Solvente de desarrollo: C  
Agente revelante: X y Z en forma secuencial

## II ESTUDIOS DE EXCRECION DE LA COCAINA Y SUS METABOLITOS EN RATAS

A fin de lograr el objetivo propuesto, se siguió el siguiente plan de trabajo:

1. Tratamiento de los animales y recolección de las muestras de orina.
2. Aislamiento de la orina de la cocaína, BEc y Ec.
3. Purificación y determinación de la cocaína.
4. Aislamiento de la BEc y Ec.
5. Purificación y determinación de la Ec.
6. Determinación de BEc.

### II.1 EQUIPOS Y MATERIALES

Los mismos que en la parte experimental I.

## II.2 METODO

### II.2.1 TRATAMIENTO DE LOS ANIMALES Y RECOLECCION DE LAS MUESTRAS DE ORINA

Las experiencias se realizaron con ratas hembras Wistar de un peso de entre 180 y 220 g, las cuales fueron tratadas según el esquema que figura en la Tabla XI. Los días lunes y viernes con inyección intraperitoneal de solución fisiológica para los animales cuyas orinas se considerarían blancas, y solución de clorhidrato de cocaína en solución fisiológica a razón de 20 mg por kg de peso expresado como cocaína base, para las ratas cuyas orinas se denominarían muestras.

Como la cocaína produce vasoconstricción en la zona de la inyección, con la consiguiente necrosis de los tejidos, y como la experiencia requería un período de tratamiento para cada rata de 29 días, a fin de evitar una disminución en la absorción en la zona de inyección por estar los tejidos necrosados se decidió mantener el nivel de la droga constante, administrando la cocaína los días martes, miércoles y jueves por inyección subcutánea, y de esta manera efectivizar un tratamiento crónico.

Una vez administrada la inyección intraperitoneal de los

días lunes correspondientes al 1, 15 y 29 del calendario de la Tabla XI, las ratas fueron colocadas en las jaulas metabólicas, ya descritas, durante 24 horas a fin de recoger orina. En dicho período dispusieron de agua pero no de alimento, a fin de no contaminar las muestras u obstruir el sistema de recolección.

La diuresis osciló entre 5,2 y 17,9 ml, y los pH entre 6,0 y 6,7.

## T A B L A X I

## C A L E N D A R I O

domingo    lunes    martes    miércoles    jueves    viernes    sábado

---

	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>5</u>	6
7	<u>8</u>	<u>9</u>	<u>10</u>	<u>11</u>	<u>12</u>	13
14	<u>15</u>	<u>16</u>	<u>17</u>	<u>18</u>	<u>19</u>	20
21	<u>22</u>	<u>23</u>	<u>24</u>	<u>25</u>	<u>26</u>	27
28	<u>29</u>	<u>30</u>				

---

- inyección intraperitoneal y colocación de las ratas en las jaulas metabólicas
- inyección subcutánea
- inyección intraperitoneal
- recolección de las muestras de orina

## II.2.2 AISLAMIENTO DE COCAINA, BENZOILECGONINA Y ECGONINA

Una vez ingresadas las muestras al laboratorio, se midió el volumen y se tomó el pH de cada una. En caso de no utilizar de inmediato las muestras, se conservaron congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$ . En tubos de vidrio Pyrex de 25 ml de capacidad, con cierre esmerilado, se colocaron 5 ml de orina o en su defecto el total recolectado, si la muestra acusaba un volumen menor.

Se colocaron los tubos en baño de hielo y una vez fríos se les agregó en forma lenta carbonato de potasio hasta saturación, y se efectuaron dos extracciones con acetonitrilo de 5 ml y 2 ml cada una; se agitó en vortex por 1 minuto, se dejó en reposo durante 5 minutos y se volvió a agitar 30 segundos más cada vez. Se centrifugó a 2.000 rpm durante 10 minutos, y se separaron las fases orgánicas mediante una pipeta tipo Pasteur, provista de una pequeña pera de goma, y las capas orgánicas provenientes de cada una de las extracciones se filtraron a través de un embudo provisto en su vástago de un pequeño botón de algodón, y se reunieron en un tubo.

Al primer tubo, que contenía la fase acuosa, se le agregó 0,5 ml de acetonitrilo con pipeta Pasteur, dejando escurrir por las paredes a fin de evitar romper la separación

de las fases; esto se hizo para facilitar la toma del solvente orgánico que quedó inevitablemente después de la separación de la segunda extracción y con el fin de minimizar los errores. Este volumen se reunió con los anteriores y se evaporó en rotavapor a presión reducida y a temperatura ambiente.

### II.2.3 PURIFICACION Y DETERMINACION DE LA COCAINA

El extracto anterior se reconstituyó con 2 ml de agua destilada, se ajustó el pH a 8 por agregado de una solución de hidróxido de amonio al 5% v/v y se extrajo dos veces con ciclohexano utilizando 5 ml y 2 ml respectivamente. Se agitó con vortex primero 1 minuto, se dejó reposar y se volvió a agitar por espacio de 30 segundos; se centrifugó durante 10 minutos a 2.000 rpm y se separaron las fases orgánicas, que se reunieron en un tubo. A la fase acuosa se le agregó 0,5 ml de ciclohexano, como ya se ha descrito anteriormente, y se separó, reuniéndola con la fase orgánica proveniente de las extracciones anteriores. Se evaporó el ciclohexano y el extracto se encontró en condiciones de ser sometido a la evaluación de la cocaína por CGL. Para ello se colocó el tubo en baño de hielo, se agregaron 50  $\mu$ l de cloroformo, se agitó, y de esta solución se inyectó en el cromatógrafo una alícuota de 4  $\mu$ l bajo las condiciones que se pusieron a punto y que fueron descriptas previamente.

#### II.2.4 AISLAMIENTO DE BENSOILECGONINA Y ECGONINA

La fase acuosa remanente del tratamiento anterior se saturó con carbonato de potasio, previo enfriamiento de la solución en baño de hielo, y se extrajo dos veces con 5 ml y 2 ml de acetonitrilo, agitando y centrifugando de acuerdo con el sistema de extracción detallado previamente.

También en este caso se trató de tomar el remanente que pudo quedar de la segunda extracción, con 0,5 ml de acetonitrilo, reuniendo todos los volúmenes que luego se evaporaron.

El residuo se tomó con 0,4 ml de metanol, y la solución se dividió en dos fracciones iguales.

## II.2.5 PURIFICACION Y DETERMINACION DE ECGONINA

Sobre una de las mitades de la solución anterior se procedió a identificar y valorar la Ec por CGL. Esto requirió una purificación previa, que se realizó a través de una columna de 0,4 cm de diámetro interno, rellena hasta una altura de 6 cm con sílica gel para cromatografía en columna, previamente activada a 105°C. Se eluyó con metanol, descartándose los primeros 1,2 ml y colectando los 7,5 ml siguientes. El solvente se evaporó en rotavapor y se trasvasó con ayuda de metanol a un tubo pequeño, evaporando cada lavado del tubo grande.

Una vez evaporado el último lavado, se llevó el tubo a estufa con temperatura de 80°C durante 10 minutos; transcurrido ese lapso se tapó y se colocó en desecador hasta temperatura ambiente. Entonces se agregaron 50 µl del agente sililante, N,O-bis(trimetil)silil acetamida, se tapó, se agitó con vortex y se llevó a estufa con temperatura de 80°C por espacio de 20 minutos. De la solución anterior se inyectaron 4 µl en el CGL, cuyos parámetros fueron detallados precedentemente, observándose en el cromatograma de la Figura 45 correspondiente al blanco de orina que no aparece interferencia en la zona de la Ec.

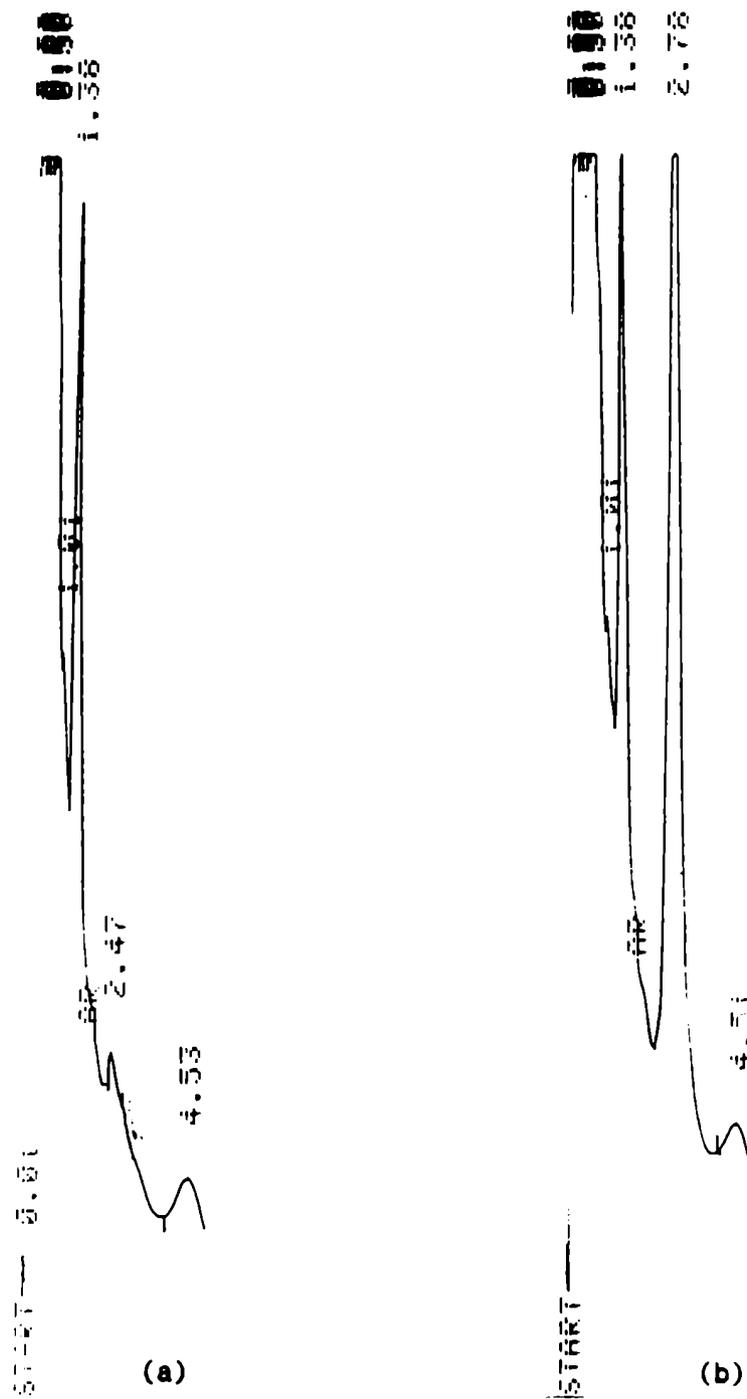


Figura 45: Cromatogramas de: a) blanco de orina; b) standard de Ec por CGL

## II.2.6 DETERMINACION DE BENZOILECGONINA

La mitad de la solución metanólica del punto II.2.4 se inyectó en el HPLC con las condiciones prefijadas anteriormente, lo que permitió obtener la zona correspondiente al tiempo de retención de la BEc, libre de interferencias (Figura 46).

En todos los casos se trabajó en paralelo con los blancos de orina y con testigos que se utilizaron como referencia y que se prepararon adicionando cantidades conocidas de la cocaína, BEc y Ec a orinas blancos. De esta forma, comparando estos testigos con las muestras provenientes del tratamiento de las ratas con cocaína, se elimina sustancialmente la disminución en la recuperación por aplicación de los pasos sucesivos de la técnica propuesta.

El método ya ha sido esquematizado previamente en la Parte Experimental I.

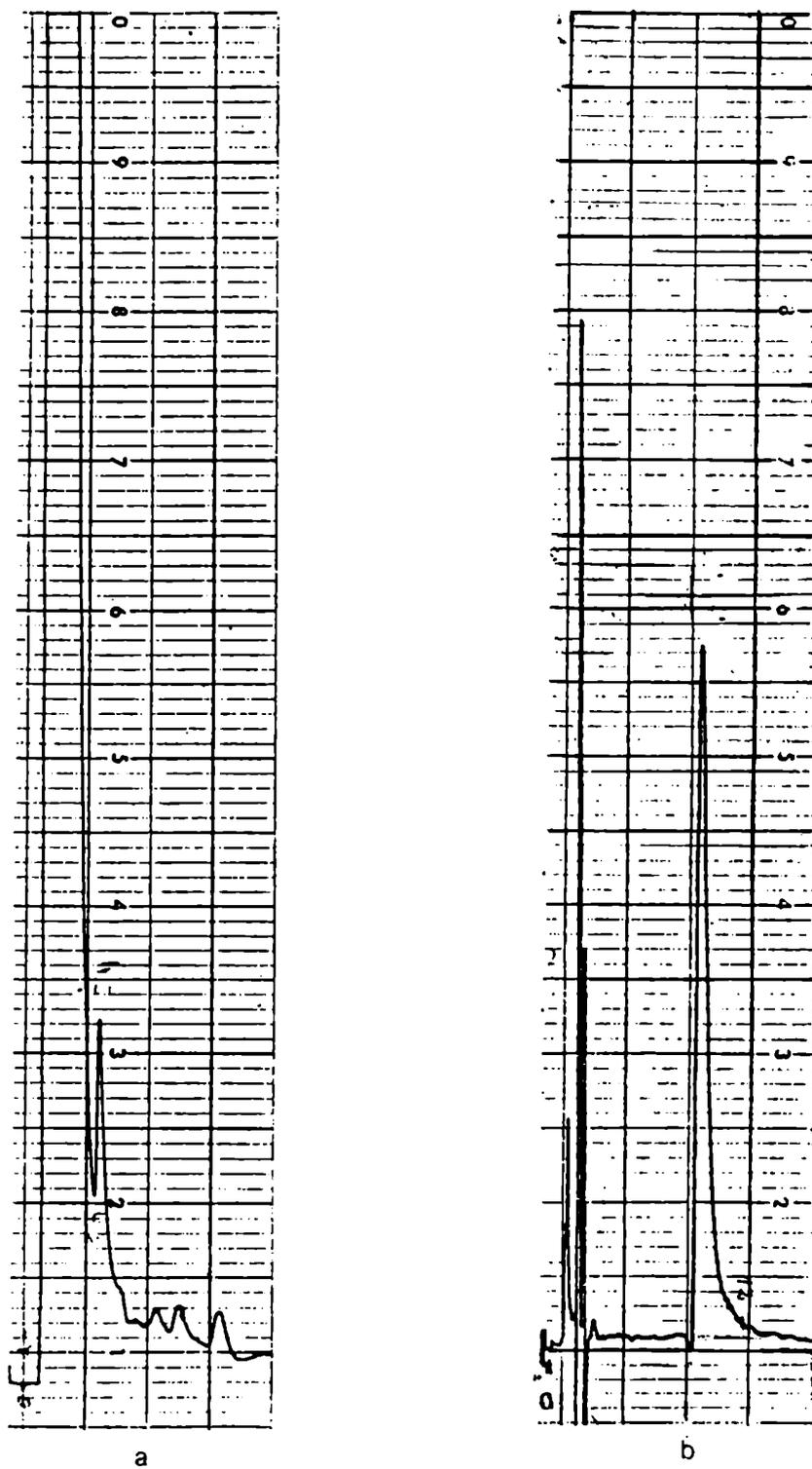


Figura 46: Cromatogramas de: a) blanco de orina; b) stand-  
ard de BEc por HPLC

### II.2.7 CALCULO DE LOS PORCENTAJES EXCRETADOS DE COCAINA, BENZOILECGONINA Y ECGONINA

Cocaína: Se calculan los porcentajes que representan los microgramos excretados con referencia a la cantidad inyectada de clorhidrato de cocaína.

BEc y Ec: Los microgramos excretados de cada una se convierten a clorhidrato de cocaína y se calculan los porcentajes para poderla referir a la cantidad inyectada.

### II.2.8 TRATAMIENTO ESTADISTICO DE LOS RESULTADOS

Se someten los datos a una ANOVA de dos factores cruzados, tiempo y experiencia, con medidas repetidas en el tiempo.

## II.3 RESULTADOS

### II.3 ESTABILIDAD DE COCAINA Y BENZOILECGONINA

Teniendo en cuenta los antecedentes bibliográficos sobre la degradación hidrolítica de la cocaína en las muestras a distintos pH y temperaturas, se efectuaron ensayos destinados a establecer el grado de hidrólisis de la cocaína y la BEc en orina, durante 24 horas en el Bioterio, que consta de un ambiente climatizado entre 21°C y 23°C.

Para ello se instalaron ratas en jaulas individuales, colocándose el recipiente de recolección de la orina conteniendo una cantidad conocida de las sustancias en estudio, y se dejó en el bioterio por espacio de 24 horas.

Efectuando el ensayo analítico contra un testigo expuesto sólo al proceso de extracción, se puede comprobar que la cocaína muestra una disminución en una proporción del 5%, mientras que para la BEc no se detecta variación.

### II.3.2 VARIACIONES DE LOS PORCENTAJES DE EXCRECION POR EL TRATAMIENTO CRONICO

Se realizaron siete experiencias incluyendo cada una de ellas seis ratas, a las cuales se les inyectó clorhidrato de cocaína, y dos ratas a las cuales se les inyectó solución fisiológica, diariamente, cinco días por semana a lo largo de 29 días, con un descanso de 72 horas de viernes a lunes, necesario para reducir las interferencias de aplicaciones anteriores, de acuerdo con lo citado en la literatura (73), y se analizaron las orinas correspondientes a los días 0, 15 y 29, de acuerdo con el esquema de la Figura 43.

En paralelo se trabajó con orina blanco a la que se agregaron 100  $\mu$ l de cada una de las siguientes sustancias: cocaína, BEc y Ec, utilizándose como testigo para la determinación de la droga y sus metabolitos. Esto tiene como finalidad minimizar los errores provenientes del procesamiento de las muestras, que pueden alterar los resultados: a) disminución en los porcentajes de recuperación por las etapas aplicadas y que afectan en forma distinta a la cocaína, BEc y Ec; b) hidrólisis de la droga debido a las condiciones que impone la metodología aplicada. De esta manera se eliminan en parte las transformaciones inevitables y ajenas a la biotransformación en el organismo.

Los datos obtenidos se expresaron como microgramos totales de cocaína, BEc y Ec por cada muestra, siendo necesario normalizar los resultados a fin de poder compararlos entre sí, ya que la cantidad de clorhidrato de cocaína inyectada fue de  $20 \pm 2$  mg/kg de acuerdo con el peso del lote de animales. Para ello se calcularon los porcentajes que representan los microgramos excretados con referencia a la cantidad inyectada. Si bien para la cocaína resulta una conversión directa, en el caso de los metabolitos los porcentajes corresponden a la cantidad de clorhidrato de cocaína que se excreta como BEc y Ec y es necesario efectuar los cálculos correspondientes.

A los efectos de estudiar la distribución de las variables, se consideraron para cada uno de los tiempos y sustancias el conjunto de los 42 datos. En los tres tiempos se observó una distribución normal de las variables cocaína, BEc y Ec, según se pudo observar en los histogramas correspondientes (Figuras 47, 48, 49). Se calcularon asimismo los promedios de los porcentajes por experiencia y por tiempo de tratamiento (Tabla XII), y se graficaron dichos promedios (Figuras 50, 51, 52).

Para conocer los posibles efectos del tiempo de tratamiento de las ratas sobre los valores de los porcentajes de excreción, se sometieron los datos a un ANOVA de dos facto-

res cruzados (tiempo, experiencia) con medidas repetidas en uno, el tiempo. El estudio mostró que en el caso de la cocaína existen diferencias significativas entre los tiempos ( $p < 0,05$ ), notándose una tendencia decreciente y no habiendo diferencias entre las experiencias. Para la BEc no se observaron diferencias ni en los tiempos ni entre las experiencias.

En el caso de la Ec, presentó diferencias entre los tiempos ( $p < 0,05$ ), con una tendencia creciente y una cierta divergencia entre las experiencias que es debida a variaciones entre las pendientes de cada una de ellas.

También se realizaron los promedios del total de datos de las siete experiencias para cocaína, BEc y Ec en función del tiempo, según consta en la Tabla XIII, en la que se incluye la desviación standard. En la Figura 53 se observa la tendencia general de cada una de las sustancias, que coincide con las correspondientes a las obtenidas en cada experiencia.

Se pudo observar que no se detecta la presencia de cocaína a los 29 días de tratamiento en el 7% de las ratas.

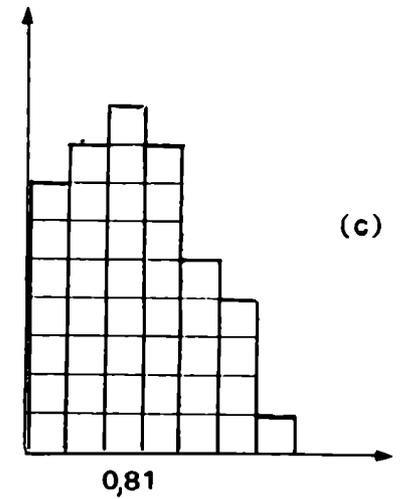
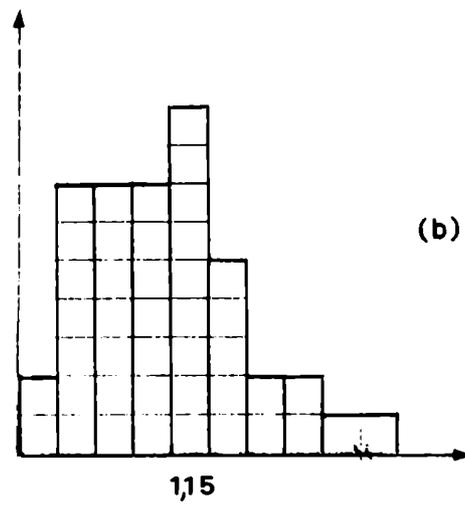
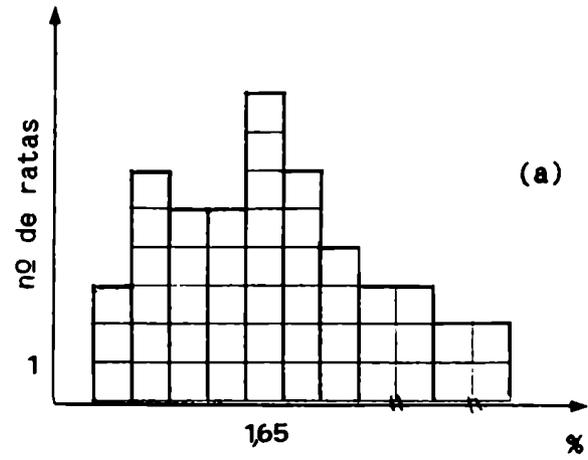


Figura 47 : a) Histograma de la cocaína a  $t = \text{día } 0$   
 b) ídem (a) a  $t = \text{día } 15$   
 c) ídem (a) a  $t = \text{día } 29$

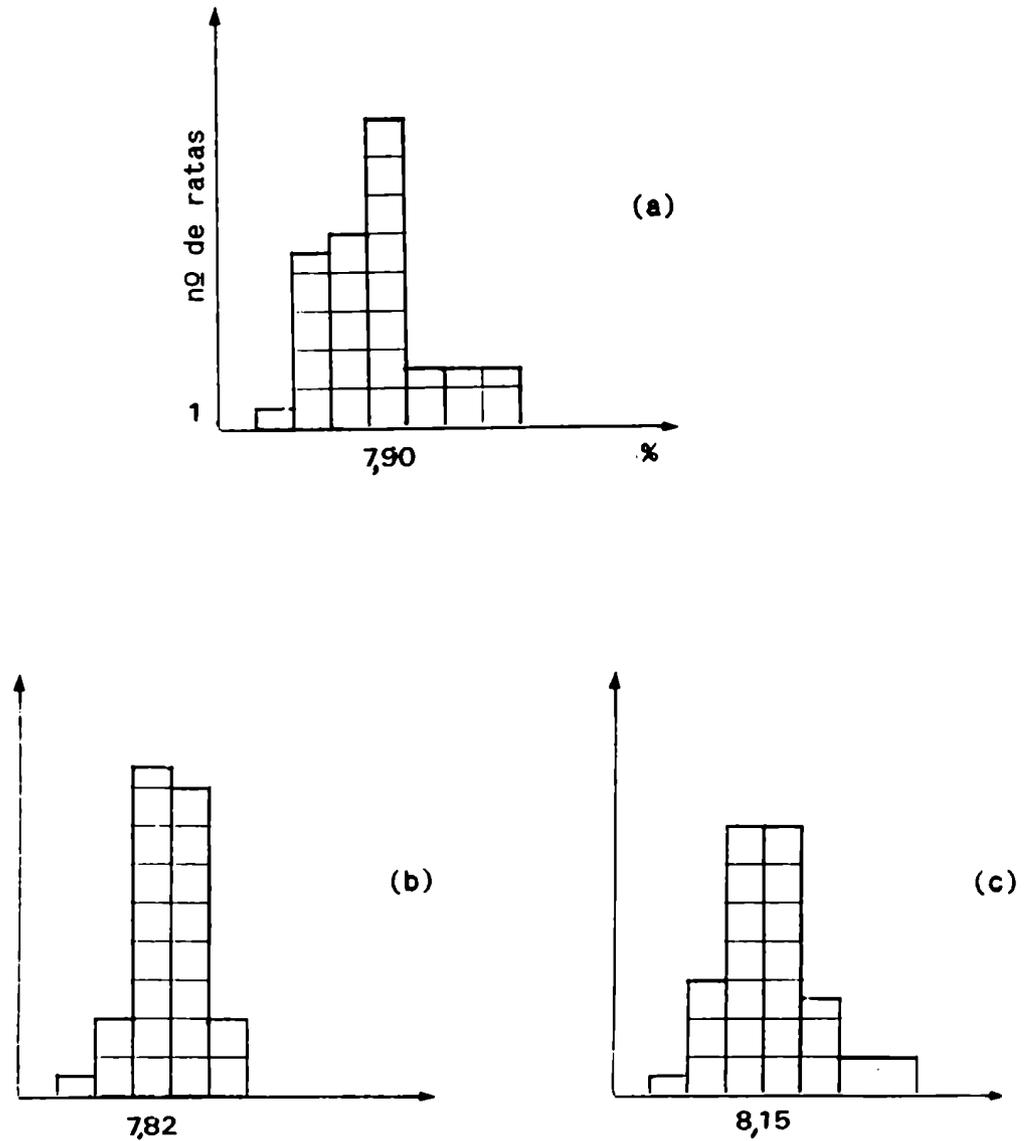
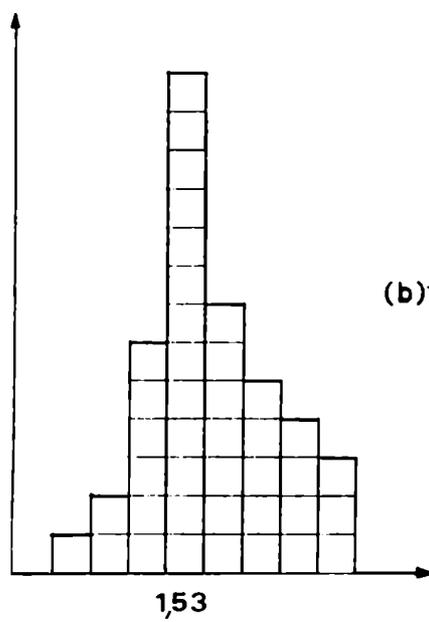
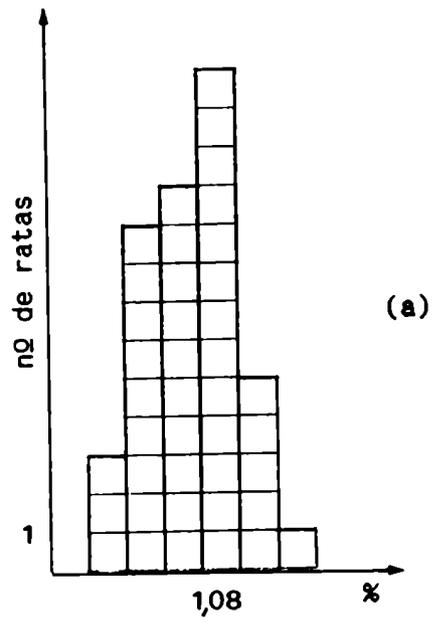


Figura 48 : a) Histograma de la BEc a  $t = \text{día } 0$   
 b) ídem (a) a  $t = \text{día } 15$   
 c) ídem (a) a  $t = \text{día } 29$



## Cocaína

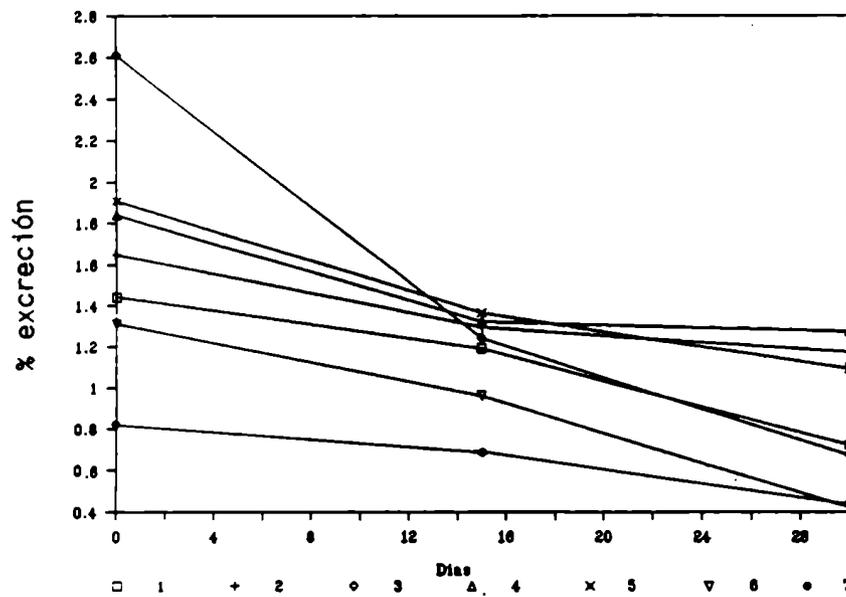


Figura 50 : Rectas correspondientes a los promedios de los porcentajes de excreción de cocaína versus tiempo, para cada experiencia.

## Benzoilecgonina

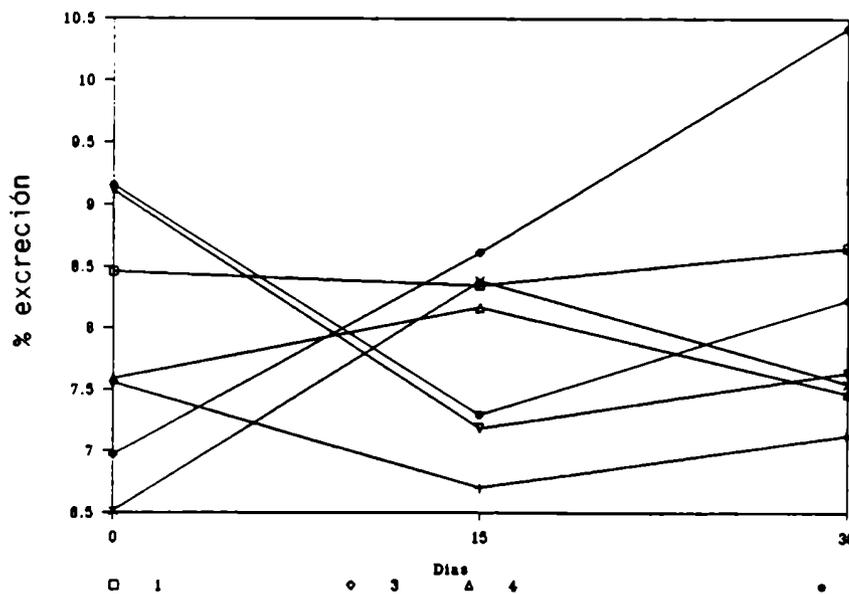


Figura 51 : Idem 50 para BEc

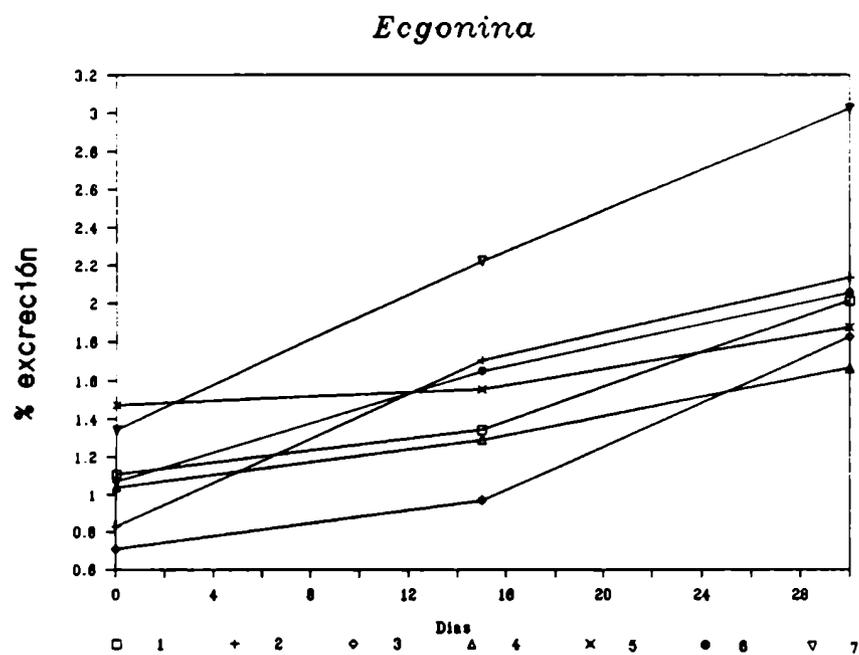


Figura 52 : Idem 51 para Ec

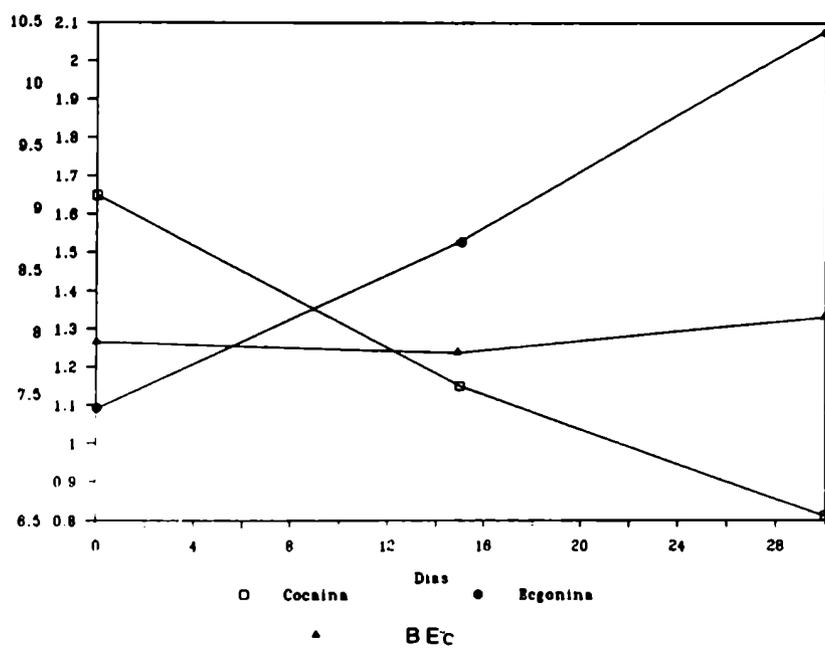


Figura 53 : Rectas correspondientes al promedio total de los porcentajes de excreción de cocaína, BEc y Ec versus tiempo.

## T A B L A    X I I

PROMEDIOS DE LOS PORCENTAJES DE EXCRECION  
POR EXPERIENCIA

-----			
c o c a í n a			
	A	B	C
1	1,44	1,19	0,72
2	1,65	1,29	1,17
3	2,61	1,24	0,67
4	1,84	1,32	1,27
5	1,91	1,36	1,09
6	1,31	0,96	0,42
7	0,81	0,71	0,43
-----			
E c g o n i n a			
	A	B	C
1	1,11	1,34	2,01
2	0,83	1,70	2,13
3	0,71	0,97	1,82
4	1,04	1,29	1,66
5	1,47	1,55	1,87
6	1,09	1,66	2,03
7	1,34	2,22	3,02
-----			
B e n z o i l e c g o n i n a			
	A	B	C
1	8,46	8,35	8,66
2	7,56	6,70	7,13
3	6,97	8,62	10,42
4	7,59	8,17	7,47
5	6,51	8,39	7,55
6	9,12	7,19	7,64
7	9,13	7,29	8,22
-----			

A : día 0  
B : día 15  
C : día 29

## T A B L A X I I I

PROMEDIOS Y DESVIACIONES STANDARD DEL TOTAL DE DATOS

Cocaína t (días)	X%	DS
0	1,65	0,91
15	1,15	0,63
29	0,81	0,51
Benzoilecgonina t (días)	X%	DS
0	7,90	2,47
15	7,82	1,70
29	8,15	2,39
Ecgonina t (días)	X%	DS
0	1,08	0,35
15	1,53	0,55
29	2,08	0,67

t : tiempo  
X : promedio  
DS : desviación standard

#### II.4 ENSAYOS CON ORINA HUMANA

Para comprobar la posible aplicación del método propuesto en orina humana, proveniente de posibles drogadictos, se trabajó in vitro sobre seis muestras de orina de seres humanos adultos, a las que se agregaron la droga y sus metabolitos en estudio; asimismo se ensayó sobre blancos de orina.

Efectuados todos los pasos descritos entre II.2.2 y II.2.6, pudo comprobarse que la metodología es perfectamente aplicable y que los resultados son enteramente satisfactorios, ya que las impurezas de la orina resultan ser menores que en el caso de la orina de ratas, especialmente en la determinación de BEc por HPLC, como lo demuestran los cromatogramas comparativos de los extractos de los blancos de orina humana y de ratas (Figura 54).

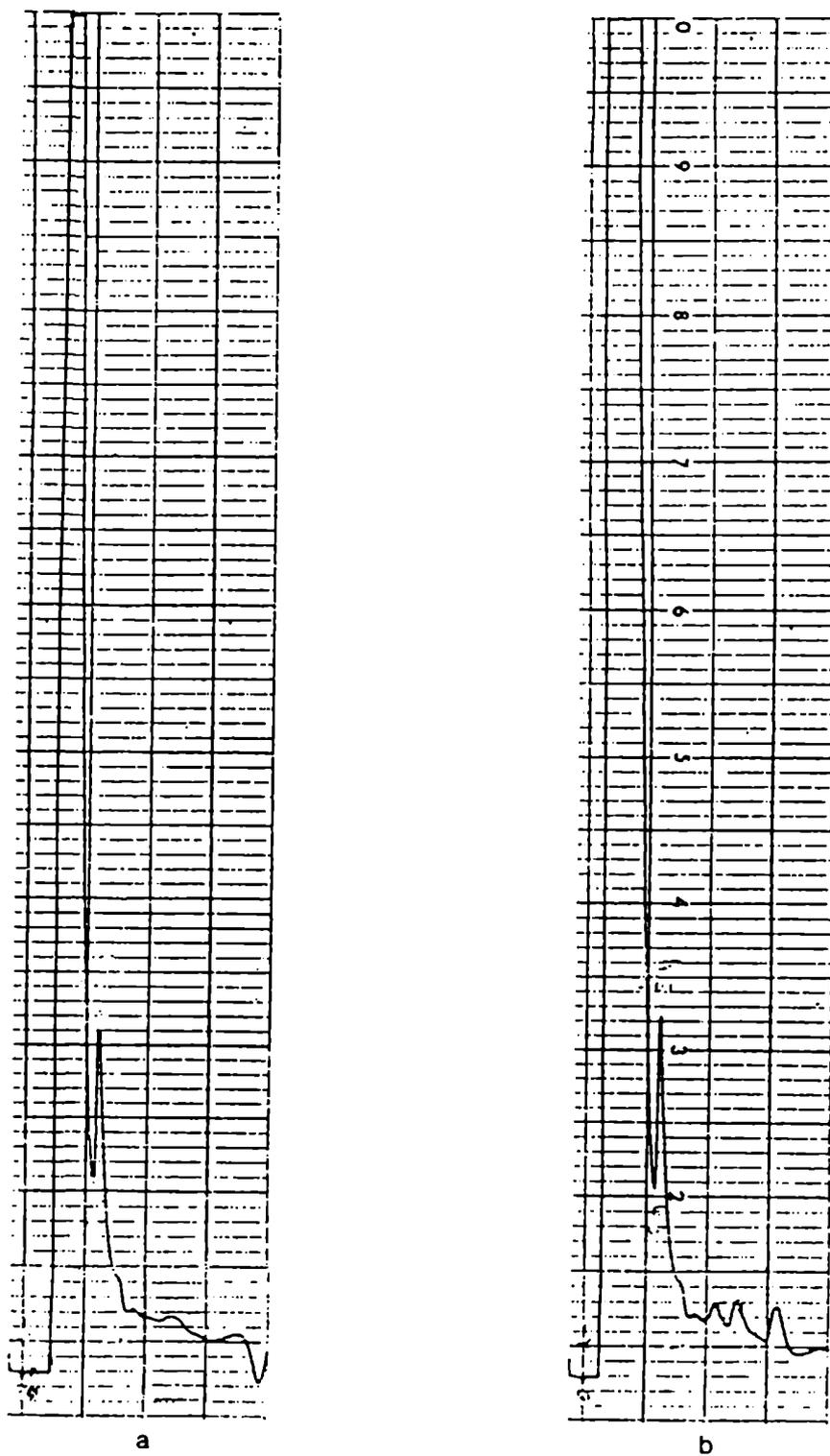


Figura 54: Cromatogramas de HPLC para:  
a) blanco orina humana  
b) blanco orina de rata

## C O N C L U S I O N E S

La drogadicción es un importante y grave problema internacional y, aunque es casi imposible identificar el número exacto de drogadictos, los expertos creen que millones de habitantes del mundo han sucumbido al falso encanto de las drogas ilegales y peligrosas. Por lo tanto, esta situación no sólo afecta a aquellos cuyas vidas están deterioradas por la droga sino que tiene adversas repercusiones sociales, políticas y económicas. Es así como en los últimos años la comunidad internacional ha aunado esfuerzos a fin de dar una respuesta coordinada. Sin embargo, esta expresión de deseos y los logros obtenidos no han sido suficientes para erradicar este flagelo, y ello se debe principalmente a que la producción y el tráfico de drogas son un gran negocio: el producto es altamente lucrativo, necesita poca publicidad y hace que el consumidor regrese por más.

Uno de los primeros pasos para poder luchar contra la drogadicción consiste en profundizar sobre el conocimiento de las drogas involucradas. En el caso de la cocaína los esfuerzos por reducir su consumo han aumentado enormemente en los últimos años gracias a una mayor comprensión de los peligros que entraña su adicción.

El principal motivo del uso de esta droga consiste en su

acción estimulante sobre el SNC; por ello los estudios tendientes a dilucidar esta acción han llevado a disipar las atractivas imágenes con las cuales anteriormente se asociaba a la cocaína.

Hoy en día existen evidencias de que la droga no sólo produce dependencia psíquica sino que está comprometida en la dependencia física que lleva al consumo crónico.

Para ello ha sido necesario determinar su presencia en diversidad de matrices y sobre todo en fluidos biológicos, a fin de esclarecer y resolver los distintos aspectos en que se encuentra implicada la cocaína, en especial para detectar su abuso y para el control en los programas de rehabilitación.

Una de las características sobresalientes de la cocaína con respecto a otras drogas es su biotransformación y su inestabilidad bajo ciertas condiciones a las que está expuesta en la matriz que la contiene o durante la aplicación de la metodología para su aislamiento y determinación.

Por ello, como el tema del trabajo de tesis consistió en determinar los porcentajes de excreción de cocaína, BEc y Ec, fue necesario agotar todos los recaudos para garantizar que las condiciones de la toma de las muestras de orina de ratas no influyeran sobre los datos obtenidos.

La bibliografía da cuenta de las condiciones adversas

que pueden alterar los resultados en este tipo de muestras, como es especialmente el pH.

En las jaulas metabólicas convencionales en que la separación entre la materia fecal y la orina se hace por medio de bochas de vidrio o mallas de metal o plástico y en las cuales el contacto entre ambas es inevitable, se obtienen orinas muy contaminadas y con pH que puede llegar a 11, condiciones altamente desfavorables para la estabilidad de la cocaína. Por tal motivo, se diseñó una modificación de los embudos que responde a lo deseado.

Además, a fin de optimizar aún más el pH de la orina, se recogieron las muestras en vasos de precipitado, los cuales fueron pretratados con ácido sulfúrico 0,1 N y escurridos hasta su secado. Así se obtuvieron las orinas con un pH que osciló entre 6,0 y 6,7. Si bien para otras drogas es suficiente su identificación y valoración como indicativo de su consumo, para la cocaína es de primordial importancia el hallazgo de sus metabolitos más que ella misma, ya que se excreta como tal en alrededor del 1% de la ingresada.

Por mucho tiempo los laboratorios toxicológicos fracasaron al obtener resultados negativos falsos, por aplicar los métodos tradicionales en los que se trabaja con solventes no polares, ya que los metabolitos requieren para su extracción solventes polares.

El uso de este tipo de solventes trae como consecuencia problemas en la detección y determinación de los productos de la biotransformación, ya que también extraen componentes de la orina. Si se emplean solventes de polaridad media disminuyen las interferencias, pero requieren un tratamiento más exhaustivo de la muestra.

En este caso se eligió la técnica de salting-out, que requiere la saturación con un agente como el carbonato de potasio que lleva el pH a 8, previo a la extracción con acetonitrilo de la cocaína, BEc y Ec. Se requirió tomar ciertas precauciones, como enfriamiento de las muestras antes y durante la saturación y rápido procesamiento. En los pasos subsiguientes, como la extracción de cocaína con ciclohexano previa alcalinización con hidróxido de amonio al 5% y un nuevo salting-out para extraer BEc y Ec, también fue necesario tomar las prevenciones antes mencionadas. Para la Ec fue además necesaria una purificación posterior del extracto.

En cuanto a los resultados obtenidos de la aplicación del método desarrollado a muestras de orina con agregado de la droga y sus dos metabolitos en estudio, cabe efectuar algunas consideraciones:

a) Para la cocaína después de efectuar las dos extracciones y determinarla por CGL, se obtuvo una recuperación del

93%.

b) La forma en que se efectuó el aislamiento de la BEc mediante dos extracciones, empleando la técnica de la saturación salina, permitió la posibilidad de evaluarla por HPLC, obteniéndose un rendimiento del 89%.

c) La metodología empleada para el aislamiento y evaluación de la Ec requirió arduos y laboriosos ensayos, ya que para la valoración por CGL fue necesaria la derivatización previa de los extractos, para poder pasarlos por el cromatógrafo, debido a la característica altamente polar de este metabolito. Pero para ello es imprescindible contar con extractos aptos para ese fin; por lo tanto, se realizó una purificación que consistió en un pasaje por columna de sílica gel, utilizando como solvente de elución metanol. En este caso, y dadas las características del procedimiento, la recuperación fue del 75%.

Lograda la metodología apropiada para determinar la cantidad de cocaína, BEc y Ec excretada por orina de ratas, se procedió a realizar las experiencias con los animales.

Como se ha señalado oportunamente, se inyectan en forma intraperitoneal una cantidad de clorhidrato de cocaína de 20 mg/kg; esta dosis, citada en la bibliografía y ensayada en nuestro laboratorio, tiene la ventaja de permitir un tratamiento crónico de las ratas (dosis fatal i.p. es de 100

mg/kg) y a su vez las cantidades a determinar permiten detectar variaciones significativas.

En vista de las diferencias en los porcentajes de recuperación de las sustancias estudiadas, se decidió realizar el análisis de las muestras en paralelo con orina de rata inyectada con solución fisiológica, a la cual se le agregaron 100  $\mu$ g de cocaína, BEc y Ec, y comparar contra este testigo los resultados obtenidos.

Una vez obtenidos los datos correspondientes a las siete experiencias realizadas en las que se analizaron las orinas correspondientes a los días 0, 15 y 29, se procede a su estudio estadístico.

A fin de poder precisar los efectos del tratamiento crónico de las ratas sobre los valores de los porcentajes de excreción de cocaína, BEc y Ec, se sometieron los datos a un ANOVA de dos factores cruzados (tiempo, experiencia), con medidas repetidas en el tiempo.

Se pudo comprobar que para la cocaína existen diferencias significativas entre los tiempos ( $p < 0,05$ ), notándose una tendencia decreciente en los porcentajes de excreción, no habiendo diferencias entre las experiencias.

En el caso de la BEc, no se observaron diferencias ni en los tiempos ni entre las experiencias.

Para la Ec se evidencian diferencias entre los tiempos

( $p < 0,05$ ), con una tendencia creciente en los porcentajes de excreción.

Esta modificación en la biotransformación de la cocaína por el tratamiento crónico puede deberse a varias causas, pudiéndose efectuar algunas consideraciones en base a la bibliografía existente (57) (73) (75) (78).

a) En estudios realizados en ratas pretratadas crónicamente con cocaína (20 mg/kg) durante 21 días se determinó la cantidad de cocaína libre excretada y los metabolitos totales por métodos radioquímicos después de la última inyección, observándose que entre las 72 y 96 horas se detecta una radioactividad muy baja, pero mayor que en el caso de un tratamiento agudo. Un efecto análogo durante el presente trabajo podría explicar en parte el incremento observado para la Ec.

b) Se ha sugerido la posibilidad de que en un tratamiento crónico la cocaína se acumule en grasa, siendo liberada lentamente al torrente sanguíneo y biotransformada; por lo tanto los metabolitos podrían sufrir un incremento, en especial la Ec por ser la última en la cadena metabólica.

c) La tendencia decreciente de la cocaína puede justificarse por la inducción de la vía oxidativa durante el proceso crónico, y por otra parte se podría alterar alguna otra de las rutas involucradas en la biotransformación de

la cocaína, que ocasionaría un incremento en la producción de Ec.

Es interesante observar en el presente estudio que después de 29 días de tratamiento con cocaína, y como consecuencia del desplazamiento de los porcentajes de excreción de la droga hacia valores más bajos, se obtienen resultados negativos falsos en el 7% de las muestras, lo que confirma la necesidad de la búsqueda de metabolitos como mejor índice de su ingreso al organismo.

Además se comprueba que la BEc es el metabolito más importante como indicador del consumo de cocaína, ya que no se altera por el tratamiento crónico.

Se pudo constatar que la metodología utilizada es aplicable al estudio de la cocaína y sus metabolitos en orina humana, hecho importante para esclarecer y resolver los aspectos toxicológicos y legales que resultan de la investigación del abuso de drogas.

## A B R E V I A T U R A S

ACE	: acetilcolinesterasa
ADN	: ácido desoxiribonucleico
ATP	: ácido adenosintrifosfórico
ARN	: ácido ribonucleico
BEC	benzoilecgonina
BNEc	benzoilnorecgonina
CCD	cromatografía en capa delgada
CGL	: cromatografía gas líquido
CGL/MS	cromatografía gas líquido/masa
cit.P-450	citocromo P-450
COMT	catecol-o-metiltransferasa
Ec	ecgonina
E.coca Lam.	Erythroxylum coca Lamarck
EDTA	sal sódica del ácido etilendiaminotetracético
EMEc	éster metílico de la ecgonina
EMIT	inmunoensayo de enzima múltiple
FAD	: Flavin adenina dinucleótido
FAD-M	: FAD-monooxigenasa
FBS	: buffer de fosfatos
FMN	: Flavin-mononucleótido
g	: gramo/s

GSH	glutación reducido
GSSG	: glutación oxidado
ha	: hectárea/s
HPLC	: cromatografía líquida de alta presión
IR	infrarrojo
kg	: kilogramo/s
kl	kilolitro/s
$K_m$	constante de Michaelis
MAO	: monoaminoxidasa
mg	: miligramo/s
NADH	: Nicotinamida adenina dinucleótido
NADPH	Fosfato de nicotinamida adenina dinucleótido
NaF	Fluoruro de sodio
NC	Norcocaína
NEc	: Norecgonina
N-hidroxi-NC	N-hidroxinorcocaína
nitróxido-NC	: Nitróxido de norcocaína
PCE	: Pseudocolinesterasa
RIA	: Radio inmunoensayo
r.p.m.	revoluciones por minuto
SNC	sistema nervioso central
t	: tonelada/s
var	variedad

$V_{max}$  : Velocidad máxima (velocidad de una reacción enzimática a concentraciones saturantes de sustrato)

$\mu g$  : microgramo/s

A handwritten signature in cursive script, appearing to read "A. Pinet", with a long horizontal flourish underneath.A handwritten signature in cursive script, appearing to read "E. B. Kester", with a horizontal flourish underneath.

## B I B L I O G R A F I A

- (1) Enciclopedia Universal Ilustrada Europeo-Americana. Tomo 13. Editores Hijos de J.Espasa, Barcelona, España
- (2) PARDAL Ramón. Medicina Aborigen Americana. Tomo 3. Capítulo 10. (1937) Editor J.Anesi, Buenos Aires, Argentina
- (3) DOMINGUEZ J.A. La Coca. El cocaísmo americano - cocaínismo europeo. Trabajos del Instituto de Botánica y Farmacología (Fac.de Cs.Médicas de Buenos Aires). 47 (1930). Editor H.Andicetta, Buenos Aires, Argentina
- (4) VAN DYKE C., Byck R. Investigación y Ciencia. Edición en español de Scientific American (1982), 68, 100-110
- (5) GUTIERREZ COLOMER L. Anales de la Real Academia de Farmacia (1966), 32 (4-5)
- (6) KREIG M.B. Medicina verde. Capítulo 1 (1968). Compañía Editora Continental S.A., México
- (7) DE MACEDO PEREIRA M. Coca-cocaína. "Separata dos Arquivos da Policia Civil de Sao Paulo" (1976), 27
- (8) HOLMSTEDT B., Fredga A. J.Ethnopharmacol (1981), 3, 113-147
- (9) RUGGIERO Romano. Todo es Historia (1982), 176, 9-20. Editor Perina E., Buenos Aires, Argentina
- (10) GOODMAN GILMAN. The Pharmacological Basis of Therapeutics. Seventh Edition (1985). Editors: A.Goodman Gilman, L.Goodman, T.Rall, F.Murad. Macmillan Publishing Company, New York, USA
- (11) MORGAN H.W. Drugs in America. A Social History 1800-1980. Capítulo 2 (1981). Syracuse University Press, United States of America
- (12) BEHR H.G. La Droga, potencia mundial (1981). Editorial Planeta, Barcelona, España

- (13) KENNEDY J. Coca Exotica. The illustrated story of cocaine (1985). Fairleigh Dickinson University Press, Cornwall Books. Associated University Presses Inc., USA
- (14) GIANNI S. Coca-cocaína. Tesis doctoral (1944). Facultad de Farmacia y Bioquímica
- (15) JOUNGKEN H. Tratado de Farmacognosia. pp.628-633 (1959). México Atlante, 6ª edición
- (16) CLAUS E.P., Tyler V. Farmacognosia. Capítulo 9 (1968). Editorial El Ateneo, Lanús Oeste, Argentina, 6ª edición
- (17) HOLMSTEDT B., Jäätmaa E., Leander K., Plowman T. Phytochemistry (1977), 16, 1753-1755
- (18) Boletín Informativo de Intercambio NQ2 (1986). Informe sobre la Erytroxilon Coca-Lae. Departamento Tráfico ilícito de la Policía Federal Argentina
- (19) SAN MARTIN CASAMADA R. Farmacognosia descriptiva. Capítulo 31 (1957). Editorial Científico Médica, Barcelona, España
- (20) MOYSE H. Matière Medicale. Tomo 2, pp.280-288 (1981). Editorial Masson, Paris, France, 2ª edición
- (21) TURNER C., Ma C.Y., Elsohly M.A. Bull.Narc.(1979), 31 (1), 71-76
- (22) KOHN Abrest. Précis de Toxicologie. 3ª edition. Capitule IV (1955). Editeurs G.Doin y Cic., Paris, France
- (23) GUTHEY E. Instan a la cooperación mundial para combatir el narcotráfico (1988). USIS. Servicio informativo y cultural de los Estados Unidos de América, Buenos Aires, Argentina
- (24) WILLOUGHBY D. Cocaína, Opio, Marihuana (1988). Agencia de Información de los E.U.A. Editores: Cincotta H. Brown D.
- (25) MURRELLE L., Escalona R., Florenzano R. Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana (1989), 107 (6), 595-644

- (26) ALLEN D. The cocaine crisis (1987). Plenum Press, New York, USA
- (27) Cis Annual Abstracts of Congressional Publications and Legislative Histories. International Narcotics Trafficking (1982), pp.116-178 (Microfilms)
- (28) Drogas ilegales: Una crisis internacional (1985). Servicio informativo y cultural de los Estados Unidos de América
- (29) FENNER L. Progreso y frustración en la guerra contra la droga (1988). USIS. Servicio informativo y cultural de los Estados Unidos de América
- (30) LAWN J. Drogas de las que se abusa (1986). Editor Hoover D., Secretaría de Justicia de los Estados Unidos, Dirección General de Estupefacientes
- (31) JINDAL S., Lutz T., Vestergaard P. J.Chromatogr. (1979), 179, 357-360
- (32) JUKOFSKY D., Verebey K., Muli J. J.Chromatogr.(1980), 198, 534-535
- (33) DUSEK D., Girdano D. Drogas, un estudio basado en hechos. Capítulo 6. (1986). Sistemas técnicos de Edición. Tlalpan, México
- (34) BENNETT W.J. Escuelas sin Drogas (1987). Secretaría de Educación de los Estados Unidos, Servicio Informativo y Cultural de los E.U.A.
- (35) KOZEL N. Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana (1989), 107 (6), 531-540
- (36) Cocaína/Crack. The Big Lie. National Institute on Drug Abuse, U.S.Public Health Service (1987). Washington, DC, USA
- (37) MEDINA-MORA M.E., Tapia C.R., Rascón M., Solache G., Otero B., Lazcano F., Mariño M.C. Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana (1989), 107 (6), 475-484
- (38) KRAMER J.F., Cameron D.C. Manual sobre dependencia de las drogas (1975). Organización Mundial de la Salud, Ginebra, Suiza

- (39) VAN DYKE C., Jatlow P., Barasch P.G., Byck R. Science (1978), 100, 211-213
- (40) VAN DYKE C., Ungerer J., Jatlow P., Barasch P., Byck R. Int.J.Psychiatry Med. (1982), 12 (1), 1-13
- (41) WILKINSON P., Van Dyke C., Jatlow P., Brash P., Byck R. Clin.Pharmacol.Ther. (1980), 27 (3), 386-394
- (42) Represión del tráfico ilícito de estupefacientes. Secretaría General de la OIPC (1975). Interpol, Paris, France
- (43) BARNETT G., Hawks R., Resnick R. J.Ethnopharmacol (1981), 3 (2), 353-366
- (44) JONES REESE. Natl.Inst.Drug Abuse, Res.Monogr.Ser.50. Washington DC, U.S. Government Printing Office (1984), pp.34-53
- (45) JAVAID J., Fischman M., Schuster C., Dekirmenjian H., Davis J. Science (1978), 200, 227-228
- (46) RESNIK R., Kestenbaum R., Schwartz L. Science (1977), 195, 696-698
- (47) PALY D., Jatlow P., Van Dyke C., Jen R., Byck R. Life Sci. (1982), 30 (9), 731-738
- (48) WEIL A.T. J.Ethnopharmacol. (1981), 3 (2-3), 367-376
- (49) ZAPATA ORTIZ B. Revista de Medicina Experimental (1944), 5, 132-162
- (50) RISEMBER M.F. Revista de Medicina Experimental (1944), 3, 317-328
- (51) CHAMBOCHUMBI M.N. Revista de Medicina Experimental (1949), 2, 94-113
- (52) DEBELMAS J. Fitoterapia (1975), 3
- (53) HANNA J., Hornick C. Bull.Narcotic (1977), 29 (1), 63-74
- (54) DE LA GARZA R., Bergman J.Hartel C. Pharmacol.Biochem.Behav. (1981), 15, 141-144

- (55) BENUCK M., Lajtha A., Reith M. J.Pharmacol.Exp.Ther. (1987), 243 (1), 144-149
- (56) FISCHMAN M.W., Schuster C.R., Javaid J., Hatano Y., Davis J. J.Pharmacol.Exptl.Thera. (1985), 235, 677-682
- (57) KOPUR B.M. American Association for Clinical Chemistry Inc (1989), 10 (11), 7-12
- (58) JAVAID J.I., Fischman M.W., Schuster C.R., Dekirmenjian H., Davis J.M. Science (1978), 202, 227-228
- (59) FISCHMAN M.W. Natl.Inst.Drug Abuse. Res.Monogr.Ser. 50, Washington D.C., U.S.Government Printing Office (1984), 72-89
- (60) FARRAS H.C., Kearns G.L. J.Pediatr. (1989), 115 (5), 665-675
- (61) POKLIS A., Mackell M., Graham M. J.Anal.Toxicol. (1985), 9, 227-229
- (62) CASARETT, Doull's. Toxicology. The basic Science of poisons. Cap. 3rd Edition (1986). Edited by Klaasen C.D., Ampur D., Doull's. Macmillan, New York, USA
- (63) Environmental Health. Criteria 6. Principles and Methods for Evaluating the Toxicity of Chemicals, Part I (1978). Ed.World Health Organization Publications, Ginebra, Suiza
- (64) LA DU B.N., Mandel H.G., Way E.L. Fundamentals of Drug Metabolism and Drug Disposition. Cap.12 (1972). The Williams y Wilkins Company, Baltimore, USA
- (65) CASTRO J.A. Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana (1985), 19 (2), 201-213
- (66) CASTRO G.D., Castro J.A. Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana (1988), 22 (2), 221-238
- (67) GORROD J.N. Drug Toxicity. Cap.6 (1979). Chelsea College University of London. Public. by Taylor-Frances Ltd, London, Inglaterra

- (68) NEBERT D., Negishi M., Lang M., Hjelmeland L., Eisen H. *Advances in Genetics*. Vol.21. Cap.I (1982). Edited by Caspari E.V. Academy Press Inc., London, Inglaterra
- (69) AMBRE J., Fischman M.W., Ruo T.I. *J.Anal.Toxicol.* (1984), 8
- (70) KLOSS M.W., Rosen G.M., Rauckman E. *Biochem. Pharmacol.* (1984), 33 (2), 169-173
- (71) JATHOW P. *The Yale J.Biology Med.* (1988), 61, 105-113
- (72) EVANS M.A., Morarity T. *J.Anal.Toxicol.* (1980), 4, 19-22
- (73) NAYAK P.K., Misra A.L., Muli S.J. *J.Pharmacol.Exp. Therap.* (1976), 196 (3), 556-569
- (74) ISENSCHMID D.S., Levine B.S., Caplan Y.H. *J.Anal. Toxicol.* (1989), 13, 250-256
- (75) STEWART D.J., Inaba T., Lucassen M. *Clin.Pharmacol. Ther.* (1979), 25 (4), 464-468
- (76) FISH F., Wilson W.D.C. *J.Pharm.Pharmac.* (1969), 21, Suppl., 1355-1385
- (77) STEWART D., Inaba T., Tang B., Kalow W. *Life Sciences* (1977), 20, 1557-1564
- (78) MULE S., Casella G., Misra A. *Life Sciences* (1976), 19, 1585-1596
- (79) GOENECHEA S., Rücker G., Neugebauer M., Zerell U., Fresenius Z. *Anal.Chem.* (1986), 323, 326-329
- (80) WATANABE H., Hoskins B., Ho I.K. *Life Sciences* (1988), 42 (1), 79-86
- (81) BRITTEBO E.B. *Toxicol.Applied Pharmacology* (1988), 96, 315-323
- (82) MULE S., Misra A. *O.O.A.S. Office of Drug Abuse Services* (1976), 214-228
- (83) SMITH M., Poquette M., Smith P. *J.Anal.Toxicol.* (1984), 8, 29-34

- (84) SMITH M. J. Anal. Toxicol. (1984), 8, 35-38
- (85) VALENTOUR J., Aggarwal V., McGu M. J. Anal. Toxicol. (1978), 2, 134-137
- (86) LIU J., Budd R., Giesemer E. J. Chromatogr. (1982), 248, 318-320
- (87) BASELT R. J. Chromatogr. (1983), 268, 502-505
- (88) INABA T., Stewart D., Kalow W. Clin. Pharmacol. Ther. (1978), 23 (5), 547-552
- (89) SHUSTER L., Quimby F., Bates A., Thompson M.L. Life Sci. (1977), 20, 1035-1038
- (90) THOMPSON M., Shuster L., Shaw K. Biochem. Pharmacol. (1979), 28, 2389-2395
- (91) EVANS M., Harbison R. Toxicol. Applied Pharmacology (1978), 45, 739-754
- (92) FREEMAN R., Harbison R. J. Pharmacol. Exp. Ther. (1981), 218 (2), 558-567
- (93) FREEMAN R., Harbison R. Biochem. Pharmacol. (1981), 30 (7), 777-783
- (94) EVANS M. J. Pharmacol. Exp. Ther. (1983), 224 (1), 73-79
- (95) MISRA A., Pontani R. Drug Metabolism and Disposition (1977), 5, (6), 556-563
- (96) KLOSS M., Cavagnaro J., Rosen G., Rauckman E. Toxicology and Applied Pharmacology (1982), 64, 88-93
- (97) RAUCKMAN E., Rosen G., Cavagnaro J. Molecular Pharmacology (1982), 21, 458-463
- (98) KLOSS M., Rosen G., Rauckman E. Toxicology Letters (1983), 15, 65-70
- (99) DAR N., Ratty A. Biochemical Medicine and Metabolic Biology (1987), 37, 258-264
- (100) PERINO L., Warren G., Levine J. Gastroenterology (1987), 93, 176-180

- (101) DUSEK D. Drogas, un estudio basado en hechos. Capítulo 2 (1986). Ed. Daniel Girdano. Sistemas Técnicos de Edición, Tlalpan, México
- (102) BRADFORD H.F. Fundamentos de neuroquímica. Capítulos 1, 4 y 8 (1988). Editorial Labor S.A., Barcelona, España
- (103) MOIZESZOWICZ J. Psicofarmacología Psicodinámica. Cap. 1 (1982). Editorial Paidós S.A.C.I.F., Buenos Aires, Argentina
- (104) NEDERGAARD O.A. Pharmacology and Toxicology Supplement (1988), 1, 5-8
- (105) PITTS D.K., Marwah J. J.Pharmacol.Exp.Therap.(1987), 240 (1), 345-351
- (106) GRIN J., Bueno E.J. CanJ.Physiol.Pharmacol. (1973), 51, 516-521
- (107) LITTER M. Farmacología Experimental y Clínica. Séptima edición (1986). Librería El Ateneo Editorial, Buenos Aires, Argentina
- (108) RITZ M.C., Lamb R.J., Goldberg S.R., Kuhar M.J. Science (1987), 237, 1219-1223
- (109) SWANSON K.L., Albuquerque E.X. J.Pharmacol.Exp. Therap.(1987), 243 (3), 1202-1210
- (110) PRADHAN S., Roy S.N., Pradhan S.N. Life Sci. (1978), 22, 1737-1744
- (111) STRIPLING J.S., Hendricks C. Pharmac.Biochem.Behav. (1981), 14, 397-403
- (112) STRIPLING J.S., Hendricks C. Pharmac.Biochem.Behav. (1981), 15, 793-798
- (113) JOHANSON C., Fischman M. Pharmacological Reviews (1989), 41 (1), 3-52
- (114) REITH M.E.A., Benuk M., Lajtha A. J.Pharmacol.Exp. Ther. (1987), 243, 281-287
- (115) HINSON R.E., Poulos C.X. Pharmacol.Biochem.Behav. (1981), 15, 559-562

- (116) PERIS J., Zahniser N.R. Pharmacol.Biochem.Behav. (1987), 27, 533-535
- (117) REITH M.E., Benuck M., Lajtha A. J.Pharmacol.Exp. Therap. (1987), 243 (1), 281-287
- (118) PERIS J., Zahniser N.R. Pharmacol.Biochem.Behav. (1989), 32, 71-76
- (119) MATSUZAKI M., Springler P., Misra A.L., Muli S.J. Life Sci. (1976), 19, 193-204
- (120) GAWIN F.H. Psychopharmacology (1986), 90, 142-143
- (121) WISE R.A. Natl.Inst.Drug Abuse Res.Monogr.Serv., 50, Washington, DC, U.S.Government Printing Office (1984), 15-53
- (122) GOEDERS N.E., Smith J.E. Science (1983), 221, 773-775
- (123) MARTIN-IVERSON M.T., Szostak C., Fibiger H.C. Psychopharmacology (1986), 88, 310-314
- (124) HANSON G.R., Matsuda L.A., Gibb J.W. J.Pharmacol. Exp.Ther. (1987), 242 (2), 507-513
- (125) PAPASAVA M., Oei T.P., Singer G. Pharmacol.Biochem. Behav.(1981), 15, 485-488
- (126) DWORKIN S.I., Guerin G., Dworkin S., Smith J. Natl. Inst.Drug Abuse Res.Monogr.Serv., 90. Editor Harris L.S., Washington D.C.Office of Science, Rockville, Maryland (1988), 27
- (127) JOHANSON C.E. Natl.Inst.Drug Abuse Res.Mongr.Serv., 50, Washington D.C., US.Government Printing Office (1984), 54-71
- (128) GAWIN F.H., Kleber H.D. The Yale Journal of Biology and Medicine (1988), 61, 123-136
- (129) SMITH I. and Seakins J.W., Chromatographic and Electrophoretic Techniques, Chapter 16 Vol.I(1976) William Hanemann Medical Books Ltd., London, 4th edit.
- (130) LEWIS A.H., Parker S.R., Carroll F.I. J.Chromatogr. (1980), 193, 371-380

- (131) BERTULLI G., Mosca L., Pedroni G. Boll.Chim.Farm. (1978), 117, 170-175
- (132) PRAGER M.J., Harrington S.M., Governo T.F. J.Assoc.of Anal.Chem. (1979), 62 (2), 303-307
- (133) TRINLER W.A., Reuland D.J. J.Forens.Sci. (1978), 23, 37-43
- (134) SCHWARTZ R.S., David K.O. Anal.Chem. (1985), 57 (7), 1362-1366
- (135) DOMINGUEZ X.A. Cromatografía en papel y capa delgada. Monografía nº 16. Editora E.V.Chesneau, Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos (1982), Washington
- (136) GOUGH T.A., Baker P.B. J.Chromatogr.Sci. (1982), 20, 289-329
- (137) GUBITZ G., Wintersteiger R. J.Anal.Toxicol. (1980), 4, 141-144
- (138) BAKER P.B., Gough T.A. J.Forensic Sci. (1979), 24, 847-855
- (139) DUTT M.C., Poh T.T. J.Chromatogr. (1981), 206, 267-277
- (140) ESKES Derk J.Chromatogr. (1978), 152, 589-591
- (141) SIEGEL J.A., Cormier R.A. J.Forensic.Sci. (1980), 25, 357-365
- (142) ALLEN A.C., Cooper D.A., Kiser W.O., Cottrell M.S. J.Forensic Sci. (1981), 26, 12-26
- (143) MCNAIR H.M. Cromatografía de gases. Monografía nº 23. Editora E.V.Chesneau, Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos (1981), Washington, USA
- (144) GOUGH T.A., Baker P.B. J.Chromatogr.Sci. (1983), 21, 145-153
- (145) ROBERSON J.C. Anal.Chem. (1978), 50 (14), 2145-2146

- (146) LUKASZEWSKI T., Jeffery W.K. J.Forensic.Sci. (1980), 25 (3), 499-507
- (147) McNAIR H.M., Esquivel B.H. Cromatografía líquida de alta presión. Monografía nº 10. Editora E.V.Chesneau, Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos (1973), Washington, USA
- (148) BAKER J.K., Skelton R.E., Cheng-Yu M. J.Chromatogr. (1979), 168, 417-427
- (149) SMITH R.M., Hurdley T. J.Chromatogr. (1986), 355, 75-85
- (150) HURDLEY T.G., Smith R.M., Gill R., Moffat A.C. Anal. Proc. (1986), 23 (5), 161-163
- (151) SMITH R.M., Hurdley T.G. J.Chromatogr. (1986), 351, 259-265
- (152) MEOLA J.M., Vanko M. Clin.Chem. (1974), 20 (2), 184-187
- (153) MUELLER M.A., Adams S.M., Lewand D.L., Wang R. J. Chromatogr. (1977), 144, 101-107
- (154) RAFLA F.K., Epstein R.L. J.Anal.Toxicol. (1979), 3, 59-63
- (155) LEWIS J.H. J.Chromatogr. (1980), 196, 337-341
- (156) PAVIOLO M.L., Pinet A.M.E., Aguirre E., Curt E. Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana (1980), 14 (4), 557-560
- (157) PAVIOLO M.L., Pinet A.M.E., Kempny R.S. J.Forensic. Sci.Soc. (1983), 23 (2), 51-52
- (159) AMBRE J.J., Ruo T.I., Smith G., Backes D., Smith S.M. J.Anal.Toxicol. (1982), 6, 26-29
- (160) McCURDY H. J.Anal.Toxicol. (1980), 4, 82-85
- (161) CHINN D.M., Crouch D.J., Peat M.A., Finkle B., Jennison T.A. J.Anal.Toxicol. (1980), 4, 37-42

- (162) GUESEMER E.C., Lin Y., Beidd R.D., Raftogranis L., Noguchi T. J.Forensic.Sci. (1983), 28 (4), 894-900
- (163) JACOB P., Baker E.B., Jones R., Benowitz N. J.Chromatogr.Bioched.Appl. (1987), 61, 277-286
- (164) TEBLETT I.R., McCarteney O.W. Forensic.Sci.Int. (1988), 39 (3), 287-291
- (165) MULE S.J., Casella G.A. J.Anal.Toxicol. (1988), 12 (3), 153-155
- (166) JAVAID J.I., Dekirmenjian H., Davis J.M., Schuster C.R. J.Chromatogr. (1978), 152, 105-113
- (167) MASOUD A., Krupski D. J.Anal.Toxicol. (1980), 4, 305-310
- (168) KLAN M., Gupta P.K., Cristie R., Nangia A., Winter H., Lam F.C., Perrier d.G., Hung C.T. J.Pharm.Sci. (1987), 76 (1), 39-43
- (169) WALLACE J.E., Hamilton H.E., Schwertner H., King D.E. J.Chromatogr. (1975), 114, 433-441
- (170) PAVIOLO M.L., Elordi I., Pinet A.M., Kempny R.S. Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana (1983), 17 (4), 547-552
- (171) TAYLOR R., Jain N., George M. J.Anal.Toxicol. (1987), 11 (5), 233-234
- (172) WERNER M., Mohrbacher J., Reindeau C. Clin.Chem. (1979), 25 (12), 2020-2025
- (173) FLETCHER S.M., Hancock V.S. J.Chromatogr. (1981), 206, 193-195
- (174) HACKETT L.P., Dusci L.J., Ilett K.F. J.Anal.Toxicol. (1987), 11 (6), 269-271
- (175) GARRETT E.R., Seyda K. J.Pharm.Sci. (1983), 72 (3), 258-271
- (176) FLETCHER S.M. J.Forens.Sci.Soc. (1981), 21, 327-332
- (177) JOERN W.A. J.Anal.Toxicol. (1987), 11 (3), 110-112

- (178) MULI S.J., Jukofsky D., Kogan M., Da Pace A., Verebey K. Clin.Chemis. (1977), 23 (5), 796-801
- (179) SMITH F.P., Liu R.H. J.Forens.Sci. (1986), 31 (4), 1269-1273
- (180) PAVIOLO M.L. J.Tesis Doctoral (1982), Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, U.B.A., Argentina
- (181) British Pharmacopoeia (1988). Vol.I. Department of Health and Social Security Scottish Home and Health Department Welsh Office
- (182) The Merck Index. Tenth Edition (1983). Editor Martha Windhobz. Published by Merck & Co.Inc., Rahway, N.J., USA
- (183) The United States Pharmacopeia. The National Formulary. Twenty-second Revision (1990). United States Pharmacopeia Convention, Inc. Twinbrook Parkway, Rockville, Md. Printed by Mack Printing Company, Easton, Pa., USA