

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

LICENCIATURA EN QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA

REPORTE DE SERVICIO SOCIAL

“Síntesis y caracterización de benzoilecgonina como sustancia de referencia secundaria”

PASANTE

ALONDRA TECXIS MARTÍNEZ

LUGAR DE REALIZACIÓN

LABORATORIO DE QUÍMICA DE LA COORDINACIÓN GENERAL DE
SERVICIOS PERICIALES DE LA FISCALÍA GENERAL DE LA REPÚBLICA

PROYECTO GENÉRICO

OBTENCIÓN DE MATERIAS PRIMAS, PRINCIPIOS ACTIVOS,
MEDICAMENTOS Y PRODUCTOS BIOLÓGICOS

ASESORES

QFB. ANTONIO OLALDE TERREZ

DR. JAIME PÉREZ VILLANUEVA

PERIODO DE REALIZACIÓN

1 DE FEBRERO A 1 DE AGOSTO DE 2019

Two handwritten signatures in black ink. The top signature is more legible and appears to be 'Antonio Olalde Terrez'. The bottom signature is more stylized and appears to be 'Jaime Pérez Villanueva'.

Contenido

Resumen	2
Introducción	2
Marco teórico	3
Hidrólisis de ésteres	3
Caracterización de compuestos orgánicos usando espectroscopía de infrarrojo y espectrometría de masas	5
Fundamentos de la espectroscopía	5
Espectroscopía Infrarroja	5
Instrumental	7
Interpretación del espectro infrarrojo	8
Espectrometría de masas (MS)	10
Métodos cromatográficos: Cromatografía de gases	11
Cromatografía	11
Cromatografía de Gases (GC)	13
Objetivos	14
Materiales y Métodos	14
Resultados y discusión	16
Conclusiones	24
Bibliografía	24

Resumen

La cocaína es una sustancia ilícita de origen natural que representa un problema para la salud y seguridad pública en el mundo, por lo tanto, resulta de suma importancia detectar y cuantificar el consumo de dicha droga en el organismo humano a través del rastreo de metabolitos, siendo benzoilecgonina el principal producto de degradación de la cocaína, que además puede detectarse aún después de varios días del consumo de la sustancia. En este trabajo se desarrolló un método de obtención de benzoilecgonina, así como estimación de su pureza para ser usado como posible sustancia de referencia en un laboratorio de análisis toxicológicos confirmando su identidad mediante técnicas espectroscópicas.

Introducción

La cocaína es un alcaloide presente en distintas variedades de la planta *Erythroxylum*, sin embargo, sólo dos de éstas contienen cantidades considerables de cocaína *Erythroxylum coca* y *Erythroxylum novogranatense* (Casale & Klein, 1993). Es una de las sustancias ilícitas más usadas alrededor del mundo y representa un problema tanto de seguridad como de salud pública mundial, pues de acuerdo con el reporte anual de drogas 2019 (United Nations Office on Drug and Crime, 2019), se calcula que en el año 2017 existían alrededor de 18.1 millones de consumidores de cocaína en el mundo y gran parte de ellos se concentran en el continente americano.

Con el fin de detectar el consumo de cocaína y cuantificarla es sumamente importante el desarrollo y mejora de métodos analíticos simples, confiables y precisos, capaces del rastreo de metabolitos o sustancias de degradación (Cherconi, Stefanelli, Valle, & Giusiani, 2015). En este sentido, las sustancias de referencia son esenciales en el desarrollo de metodologías al ser compuestos bien caracterizados y de pureza conocida.

La benzoilecgonina cobra su interés de estudio al ser el principal metabolito de cocaína y, por lo tanto, marcador del consumo de esta droga. Este producto de degradación se forma al consumir cocaína por casi cualquier vía de administración, debido a la acción hidrolítica de la enzima carboxilesterasa en el hígado (Clauwaert, Lambert, & De Leenheer, 1995) (Clauwaert, Van Bocxlaer, Lambert, & De Leenheer, 1997). Además, la benzoilecgonina (BE) puede detectarse en fluidos biológicos hasta después de varios días de haber cesado el consumo de la sustancia (Cone, Sampson-Cone, Darwin, Huestis, & Oyler, 2003). La síntesis de este compuesto es relativamente sencilla pues solamente requiere de un paso de hidrólisis.

Considerando lo antes expuesto, en este trabajo se desarrolló un método de obtención, caracterización y estimación de pureza de benzoilecgonina para usarse como sustancia de referencia secundaria en un laboratorio toxicológico.

Marco teórico

Hidrólisis de ésteres

Entre las reacciones de sustitución nucleofílica del grupo acilo se encuentran la hidrólisis, alcoholólisis y aminólisis. El mecanismo general de una reacción de sustitución nucleofílica del grupo acilo se muestra en la Figura 1.

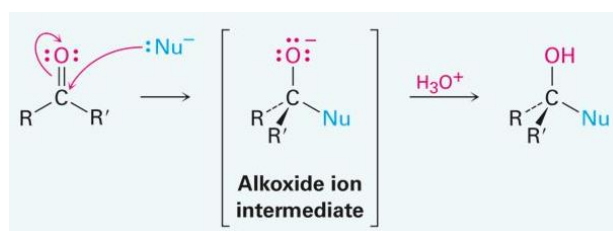


Figura 1. Mecanismo general de una reacción de sustitución nucleofílica de acilo (Klein, 2017)

Esta reacción se lleva a cabo con una gran variedad de sustratos, incluyendo cloruros de ácido, anhídridos, ésteres, amidas, entre otros. Consiste como primer paso en una adición nucleofílica a un enlace $C=O$ polar para formar un intermediario tetraédrico, para después eliminar el grupo saliente que es desplazado por el par electrónico del oxígeno en el intermediario. Cuando el sustrato es un éster, la

reacción puede ser llevada a cabo por una base o un ácido acuoso, para producir el ácido carboxílico y el alcohol correspondiente.

La hidrólisis básica se conoce como saponificación y el mecanismo de reacción consiste en la adición del ion hidróxido al carbonilo del éster, dando el intermediario tetraédrico, al eliminar el ion alcóxido se genera el ácido carboxílico; después el ion sustrae el protón ácido del ácido carboxílico produciendo un ion carboxilato, finalmente ocurre la protonación del ion carboxilato al añadir el ácido mineral acuoso en un paso por separado, obteniendo el ácido carboxílico libre.

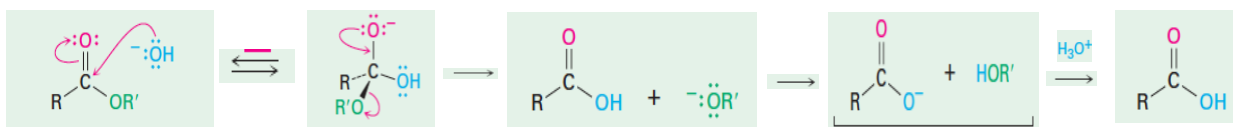


Figura 2. Mecanismo de hidrólisis de un éster en medio básico. Saponificación (McMurry, 2012)

La hidrólisis ácida se puede llevar a cabo por medio de un mecanismo inverso a la esterificación de Fischer, que consiste en la protonación del grupo carbonilo que activa el ataque nucleofílico por agua lo que produce un intermediario tetraédrico; la transferencia de protón hace al -OR un buen grupo saliente, al salir el alcohol se produce el ácido carboxílico libre y se regenera el catalizador ácido (McMurry, 2012)

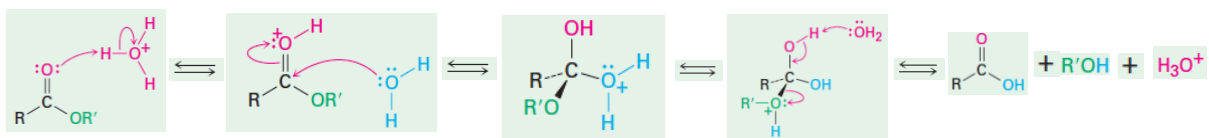


Figura 3. Mecanismo de hidrólisis de un éster en medio ácido (McMurry, 2012)

Caracterización de compuestos orgánicos usando espectroscopía de infrarrojo y espectrometría de masas

Fundamentos de la espectroscopía

La radiación electromagnética es la base de las técnicas espectroscópicas (Harvey, 2000). Cuando una partícula absorbe radiación electromagnética experimenta un cambio en su energía. Visualizamos la radiación electromagnética como un haz de partículas energéticas llamadas fotones. Esta radiación se caracteriza por una longitud de onda (λ), una frecuencia (f) y una amplitud. La longitud de onda es la distancia desde el máximo de una onda hasta la siguiente, la frecuencia es el número de ondas que pasan por un determinado punto por unidad de tiempo, suele representarse en segundos recíprocos (s^{-1}) o Hertz; la amplitud es la altura de una onda, medida desde el punto medio de la onda, hasta su punto más alto (McMurry, 2012).

La radiación o espectro electromagnético se encuentra dividido en diferentes regiones con base en el tipo de transición atómica o molecular que da lugar a la absorción o emisión de fotones. Por tanto, la espectroscopía se divide en dos amplios grupos: en el primer grupo de técnicas la energía se transfiere entre un fotón de energía electromagnética y el analito; en la espectroscopía de absorción la energía que lleva un fotón es absorbida por el analito promoviendo que éste pase de un estado de menor energía a uno de mayor energía, o un estado excitado (Harvey, 2000) en este sentido, la radiación infrarroja es una técnica de absorción.

Espectroscopía Infrarroja

El análisis por espectrometría infrarroja se limita a especies moleculares en las que existen pequeñas diferencias de energía entre los distintos estados vibracionales y rotacionales, ya que, para absorber radiación infrarroja una molécula debe sufrir un cambio neto en el momento dipolar cuando vibra o gira. El momento dipolar está determinado por la magnitud de la diferencia de carga y por la distancia entre los dos centros de carga. Si la frecuencia de la radiación coincide exactamente con la frecuencia de vibración natural de la molécula, tiene lugar la absorción de la

radiación, lo cual origina un cambio en la amplitud de la vibración molecular. De igual manera a la rotación de las moléculas asimétricas alrededor de sus centros de masa produce cambios en el momento dipolar que permiten la interacción con el campo de radiación.

Si se trata de especies como O_2 , N_2 , o Cl_2 el momento dipolar no sufre un cambio neto durante la vibración o la rotación. Por consiguiente, este tipo de compuestos no absorben radiación infrarroja. Con la excepción de algunos compuestos de este tipo, todas las demás especies moleculares absorben radiación infrarroja (Skoog, 2008).

La región infrarroja del espectro electromagnético incluye longitudes de onda fuera de la región de luz visible (400-80 nm) y longitudes de onda menores a la región de microondas (mayor a 1 nm).

En esta técnica el enfoque se encuentra en la porción vibracional de la región infrarroja, que recae en longitudes de onda entre $2.5 \mu m$ y $25 \mu m$. En estas longitudes de onda la mayoría de los compuestos con enlaces covalentes, sean orgánicos o inorgánicos, absorben frecuencias que permiten identificarlos.

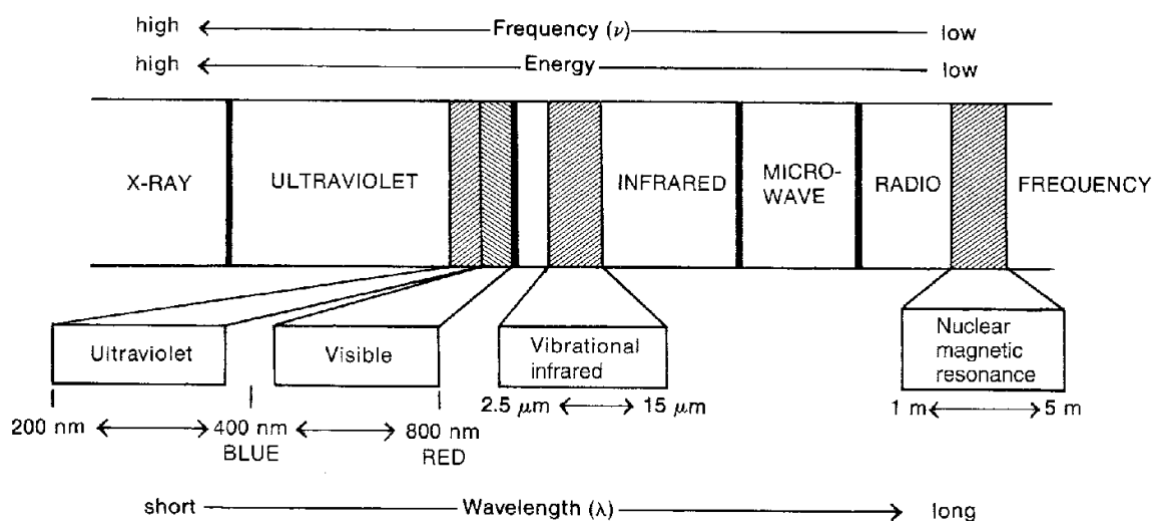


Figura 4. Porción del espectro electromagnético (Lampman, Kriz, & Pavia, 2001)

En general, en el infrarrojo vibracional se suele utilizar como unidad al número de onda ($\tilde{\nu}$) en lugar de longitud de onda (μ o μm). Los números de onda se expresan como centímetros recíprocos (cm^{-1}). La razón principal por la que se prefiere tomar como unidad el número de onda es porque esta es directamente proporcional a la energía, de tal forma que un número de onda mayor corresponde a una mayor energía. En términos de número de onda, el infrarrojo vibracional se extiende desde los 4000 a los 400 cm^{-1} (Lampman, Kriz, & Pavia, 2001).

La radiación infrarroja involucra cambios de energía en el orden de 8 a 40 kJ/mol que incluye frecuencias de estiramiento y flexión vibracional de los enlaces covalentes de la mayoría de las moléculas (Lampman, Kriz, & Pavia, 2001), cada frecuencia absorbida por una molécula corresponde a un movimiento molecular específico, por ello se puede determinar qué tipo de movimientos experimenta una molécula obteniendo su espectro IR, así al interpretar dichos movimientos es posible conocer qué tipo de enlaces y grupos funcionales están presentes en la molécula (McMurry, 2012).

Como se mencionó anteriormente existen dos tipos de vibraciones moleculares: estiramiento y flexión. Un estiramiento vibracional es un movimiento rítmico a lo largo del eje del enlace tal que la distancia entre los átomos incrementa o disminuye; la vibración de flexión consiste en un cambio en el ángulo de un enlace entre enlaces con un átomo en común o el movimiento de un grupo de átomos con respecto al resto de la molécula sin el movimiento de estos átomos con respecto otro grupo (Silverstein & Webster, 1998) y son de cuatro tipos: tijereteo, balanceo, aleteo y torsión.

Instrumental

Llamado espectrómetro infrarrojo, este equipo determina el espectro de absorción de un compuesto, también es llamado espectrofotómetro. Usualmente se utilizan dos tipos de espectrofotómetros en un laboratorio orgánico, el equipo de dispersión y el de transformada de Fourier (FT), con el uso del último (FT-IR) es posible obtener

el espectro de un compuesto de forma mucho más rápida que con el instrumento de dispersión (Lampman, Kriz, & Pavia, 2001) además de su confiabilidad, ventaja en relación señal-ruido y comodidad; su funcionamiento está basado en la interferencia de radiación entre dos haces dando como resultado un *interferograma*, que es una señal producida por el cambio de longitud en la trayectoria de la luz entre los dos haces; los dos dominios de distancia y frecuencia son interconvertibles por el método matemático de transformada de Fourier (Stuart, 2004).

Interpretación del espectro infrarrojo

En el espectro resultante, la intensidad de las bandas puede expresarse como transmitancia (T) o absorbancia (A). Transmitancia es la relación entre la potencia radiante o intensidad de radiación transmitida por la muestra y la potencia radiante que incide en la muestra mientras que la absorbancia es el logaritmo en base 10 del recíproco de la transmitancia (Silverstein & Webster, 1998).

La intensidad de las bandas regularmente se reporta en términos semicuantitativos como fuerte (s), medio (m) y débil (w), por su origen en inglés.

Cada enlace contenido en una molécula se comporta de manera diferente según el entorno en el que se encuentre, así se trate del mismo tipo de enlace, cada uno es diferente dependiendo de qué átomos tenga a su alrededor, esto se ve reflejado en su absorción y por lo tanto en el espectro infrarrojo, aunque ciertamente existen zonas o frecuencias determinadas en las que cada tipo de enlace absorbe, el siguiente esquema es sumamente útil para la identificación de grupos funcionales en el infrarrojo.

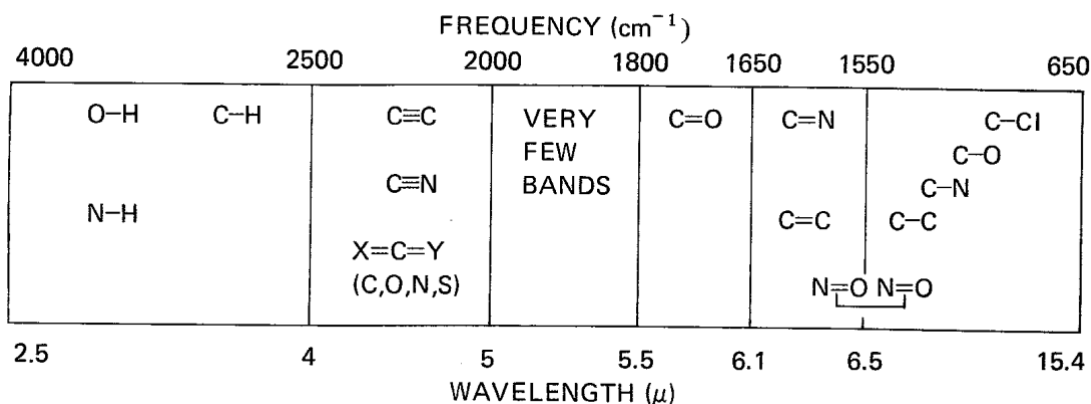


Figura 5. Regiones aproximadas en las que los tipos de enlaces comunes absorben la radiación infrarroja (Lampman, Kriz, & Pavia, 2001)

En cualquier grupo de dos o más átomos hay dos tipos de estiramiento: simétrico y asimétrico. En términos generales los estiramientos vibracionales asimétricos ocurren a más altas frecuencias que los estiramientos simétricos, de igual forma las vibraciones de estiramiento ocurren a mayores frecuencias que las vibraciones de flexión.

El espectro obtenido puede dividirse en dos secciones para su interpretación, la región de las frecuencias del grupo de infrarrojo medio (~3600 a 1250 cm⁻¹) se utiliza para identificar grupos funcionales comunes. Con la región de la huella dactilar (~1200 a 600 cm⁻¹) se identifican compuestos (Skoog, 2008).

La identificación de un compuesto orgánico a partir de un espectro infrarrojo se puede lograr siguiendo dos etapas:

1. Se identifica qué grupos pueden estar presentes en el compuesto analizando la región de frecuencias de grupo (~3600 a 1250 cm⁻¹)
2. Se analiza la región de huella dactilar (~1200 a 600 cm⁻¹) para determinar el entorno en el que se encuentran estos grupos funcionales y “armar” la molécula desconocida ya que pequeñas diferencias en estructura y constitución de la molécula causan cambios importantes en aspecto y distribución de las bandas en esta región.

Las denominadas frecuencias de grupo inevitablemente cambian ya que las interacciones con otros grupos las altera o modifica sin embargo estos cambios son pequeños lo que permite asignar intervalos de frecuencias dentro de las cuales es muy probable encontrar el máximo de absorción para un grupo funcional determinado, existen tablas de correlación en las que se encuentran los datos comunes en los que se encuentran los grupos de manera característica y que además incluyen la intensidad de la banda dependiendo del grupo funcional del que se trate.

Es importante mencionar que esta técnica de identificación está limitada a muestras puras de moléculas no muy grandes, relativamente pequeñas. No es posible elucidar biomoléculas complejas y grandes.

Espectrometría de masas (MS)

La espectrometría de masas es una técnica analítica utilizada para medir masas moleculares y dilucidar la estructura de moléculas registrando los productos de su ionización, para que una molécula pueda ser analizada por este método necesita cubrir dos requerimientos básicos, primero las moléculas generalmente en estado líquido o sólido condensado tienen que pasar a fase gaseosa y eventualmente son sometidos a vacío en el analizador másico, después las moléculas neutras deben adquirir una o más cargas para poder ser separadas y así detectables en el analizador másico.

Espectrómetro de masas

El espectrómetro de masas ejecuta con tres funciones principales, la primera es que somete a las moléculas a bombardeo mediante un flujo de electrones de alta energía, convirtiendo algunas moléculas en iones que son aceleradas en un campo eléctrico; segundo, los iones acelerados son separados de acuerdo con sus proporciones masa-carga en un campo magnético o eléctrico. Finalmente, los iones que tienen una proporción masa-carga particular son detectados por un dispositivo que es capaz de contar el número de iones que lo golpean (Lampman, Kriz, & Pavia, 2001). Una computadora controla todos los procesos y ayuda a procesar los datos.

Interpretación del espectro

El espectro de masas es una característica única de un compuesto. Contiene información de la masa molecular de un analito y las masas de sus fragmentos estructurales. El ion con mayor masa en el espectro es llamado *ion molecular* y representa la masa molecular del analito. El espectro de masas se representa en formato de tabla o gráfica. En el formato de gráfica el eje de las abscisas representa la masa de los iones (masa-carga, m/z) mientras que el eje de las ordenadas representa la intensidad relativa de los iones. Las unidades de masa atómica o Daltons se usan como las unidades para medir la masa de los iones mientras que la intensidad se presenta en porcentaje relativo a la base del pico o señal en el espectro o a la abundancia total de todos los iones en el espectro. La unidad de masa atómica (Dalton) es igual a una doceava parte de la masa de un átomo de ^{12}C (1.661×10^{-27} g). Esta técnica es el método con más sensibilidad para el análisis de compuestos orgánicos (Ekman, Silberring, Westman-Brinkmalm, & Kraj, 2009).

La interpretación puede lograrse de varias maneras, una de gran utilidad es la llamada *regla del nitrógeno*, en esta se toma a M^+ como masa máxima o ion molecular, sin considerar las masas de los isótopos. Dependiendo del número de nitrógenos que contenga, el número de masa molecular será par o impar, en caso de que no contenga nitrógeno, la masa será par. Otro aspecto por tomar en cuenta es que no debe haber pérdidas de masa ilógicas en la fragmentación (Christian, 2009).

Métodos cromatográficos: Cromatografía de gases

Cromatografía

La cromatografía es un método de separación que fue inventado por el botánico ruso Mikhail Tswett a principios del siglo XX. Su nombre proviene del griego *chroma*, color y *graphein*, escribir. Se basa en un grupo de métodos que facilitan la

separación, identificación y determinación de componentes relacionados en una mezcla compleja (Skoog, 2008).

La muestra se disuelve en una fase móvil (gas, líquido o fluido supercrítico) y se hace pasar por una fase estacionaria fija en una columna o superficie sólida; estas fases deben elegirse cuidadosamente de manera que los componentes de la mezcla se distribuyan en grados distintos entre ambas fases.

Las sustancias de la mezcla se separan mediante *elución*, aquellos con mayor afinidad a la fase estacionaria son *retenidos* por esta fase y se mueven de forma lenta mientras que los componentes de la mezcla más afines a la fase móvil se mueven rápidamente. A consecuencia de estas diferencias de velocidades de elución los componentes se separan en bandas o zonas distintas lo que permite analizarlos cuantitativa y cualitativamente (Skoog, 2008).

Existen diferentes formas de clasificar los tipos de cromatografía sin embargo la clasificación general basada en el tipo de fase móvil es: cromatografía de gases (GC) cromatografía de líquidos (CL) y cromatografía de fluidos supercríticos (CFS). Sólo la cromatografía de líquidos puede llevarse a cabo en columnas o sobre superficies planas, la cromatografía de gases y de fluidos supercríticos están restringidas a procedimientos en columna, la cual contiene en sus paredes la fase móvil (Skoog, 2008).

El proceso comienza con la adición de una mezcla de componentes, los componentes de la mezcla se distribuyen entre las dos fases; la columna que está rellena con un sólido inerte que mantiene en su superficie a la fase estacionaria y la fase móvil se va adicionando continuamente. Dando suficiente tiempo, fase estacionaria y flujo de fase móvil los componentes de la mezcla pueden separarse. Conforme la mezcla va descendiendo a través de la columna, los analitos comienzan a separarse y las bandas individuales de los compuestos comienzan a ensancharse y tener un perfil Gaussiano, el progreso de la separación cromatográfica se monitorea con un detector apropiado que se sitúa al final de la

columna. La gráfica de la señal del detector como una función del tiempo o volumen de la fase móvil eluida se conoce como *cromatograma* y muestra un pico para cada banda de soluto separada (Harvey, 2000) el área del pico correlaciona con la cantidad del componente al que corresponda y el tiempo que le toma pasar a través de la columna (tiempo de retención) da información acerca de la posible identidad del compuesto.

Cromatografía de Gases (GC)

En la cromatografía de gases, como se mencionó antes la fase móvil es un gas (frecuentemente nitrógeno o helio) y la fase estacionaria es generalmente una columna de líquido, goma o elastómero, pero no un sólido (Herbert & Johnstone, 2003), se usa generalmente para la separación de materiales de bajo peso molecular, volátiles que pueden evaporarse y mantenerse estables a una temperatura por debajo del límite superior del cromatógrafo, sin embargo existen muchas sustancias no volátiles que pueden convertirse en derivados volátiles (mediante un proceso denominado derivatización) que se separan por GC.

Existen dos tipos básicos de columnas en GC: la columna empaquetada y la columna capilar; las columnas empaquetadas usualmente están hechas de acero inoxidable o vidrio, tienen mayor diámetro interior (2-4 mm) y menor longitud (1-4 m) que las columnas capilares, se prefieren estas columnas cuando se requiere inyectar una cantidad mayor de muestra aunque estas columnas tienen una capacidad de resolución menor que las capilares y es más complicado acoplarlas directamente a un espectrómetro de masas.

Las columnas capilares utilizan menor flujo de gas, tienen mayor poder de resolución y menor capacidad de carga de muestras, están hechas de sílice fundido, su diámetro interno varía entre 0.1 mm y 0.5 mm y su longitud va de 10 a 100 m, pueden revestirse internamente con una fase estacionaria líquida (WCOT) o un sólida (PLOT). La fase móvil debe ser inerte para proteger la columna y la muestra, el helio se usa comúnmente como gas acarreador y es no flamable además de que funciona con una buena parte de detectores; el hidrógeno brinda mejor separación.

A comparación de la cromatografía de líquidos (LC) y la cromatografía de fluidos supercríticos, el tiempo de elución no puede controlarse cambiando la composición de la fase móvil. En GC se pueden controlar los tiempos de elución elevando la temperatura de la columna ya sea de forma continua o programando aumentos (Ekman, Silberring, Westman-Brinkmalm, & Kraj, 2009), cuando se opera a una temperatura fija el proceso es *isotérmico*.

Objetivos

General:

- Obtener benzoilecgonina a partir de cocaína a través de una reacción de hidrólisis.

Específicos:

- Hidrolizar la cocaína.
- Caracterizar benzoilecgonina mediante espectroscopía infrarroja (FTIR).
- Caracterizar benzoilecgonina a través de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).
- Estimar la pureza del compuesto.

Materiales y Métodos

Reactivos

Todos los reactivos y disolventes utilizados fueron grado analítico y se obtuvieron de J.T. Baker, la cocaína utilizada (pureza 94.5%) fue donada por el área de investigación del laboratorio de química de la Coordinación General de Servicios Periciales la Fiscalía General de la República.

FT-IR

La obtención de espectros se realizó con el Espectrómetro Perkin Elmer FT-IR Spectrum 100 con el accesorio ATR (Attenuated Total Reflection). Los parámetros

de recolección fueron resolución 4 cm^{-1} , seis escaneos y rango espectral de 4000 a 550 cm^{-1} .

GC-MS

Se utilizó el cromatógrafo Agilent 7980 equipado con un inyector automático 7683B. La separación cromatográfica se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: Columna GC DB5 5% Difenil / 95% Dimetilpolisiloxano ($30\text{ m} \cdot 250\text{ }\mu\text{m} \cdot 0.25\text{ }\mu\text{m}$), usando Helio (He) como gas acarreador con un flujo de 1.3 ml/min con un tiempo de corrida total de 10 min . Las condiciones de temperatura fueron: una vez alcanzados 100°C , 40°C/min hasta 300°C , manteniendo dicha temperatura por 5 min . El volumen de inyección fue de $0.2\text{ }\mu\text{l}$.

Los parámetros de adquisición del detector másico (Agilent) fueron: modo de impacto electrónico (IE), la fuente de ionización trabajó a 230°C y el cuadrupolo a 150°C detectando un rango de masas de 40 a 550 uma , solvent delay de 1.6 min y threshold de 300 .

El procesamiento de datos se realizó a través del software MSD ChemStation (Agilent Technologies).

Obtención de cocaína

En un tubo de ensayo se agregaron 501.0 mg de clorhidrato de cocaína ($\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{NO}_4 \cdot \text{HCl}$) y agua bidestilada (3 ml), después de agitarse se añadieron tres gotas de hidróxido de amonio (NH_4OH) para extraer con éter etílico (2 ml) y agitar en vórtex durante tres minutos un total de tres veces. En cada extracción se verificó que el pH tuviera un valor de 11 .

Los extractos orgánicos se juntaron y llevaron a sequedad con corriente de N_2 .

La identidad del compuesto se verificó por FTIR y GC-MS. También se analizó el clorhidrato de cocaína por FT-IR como materia prima antes de ser procesada.

Reacción de hidrólisis

En un matraz bola se colocaron 251.2 mg del total de cocaína extraída de pureza 94.5% , calentando a reflujo con 18 ml de agua bidestilada durante 4 horas (Jane,

Scott, Sharpe, & White, 1981). Terminado el tiempo de reacción, el disolvente se desplazó con corriente de N₂. Una muestra del producto se disolvió en metanol y fue analizada por GC-MS.

Extracción de benzoilecgonina

El sólido obtenido se lavó con 3 ml de éter 6 veces, conservando la fase acuosa. Se desplazó el disolvente bajo corriente de N₂.

Caracterización de Benzoilecgonina (BE)

FTIR

Se obtuvo el espectro infrarrojo del producto obtenido (*Figura 11*)

Estimación de la pureza del compuesto obtenido y caracterización por GC/MS

Se pesaron por separado tres muestras M1 = 11 mg, M2 = 10 mg y M3 = 10.1 mg del producto. Cada una se colocó en un matraz volumétrico de 10 ml y se llevó a aforo con metanol. De la solución metanólica se tomó una alícuota de 1 ml que se llevó a sequedad bajo corriente de N₂. Una vez seco se derivatizó añadiendo 50 µl de BSTFA TMCS 1%, se agitó por 30 segundos, se incubó a 65°C por 20 minutos después de lo cual se dejó que alcanzara temperatura ambiente y se reconstituyó con 50 ml de acetato de etilo.

Una vez homogeneizada la solución, se tomó una muestra para inyectarse en el cromatógrafo.

Resultados y discusión

Análisis de materia prima

El espectro FTIR-ATR de la materia prima demuestra la identidad del clorhidrato de cocaína pues pueden identificarse las bandas representativas en 1728, 1712, 1265, 1230, 1105, 1071, 1026 y 729 cm^{-1} (Penido, Pacheco, Zângaro, & Silveira, 2015)

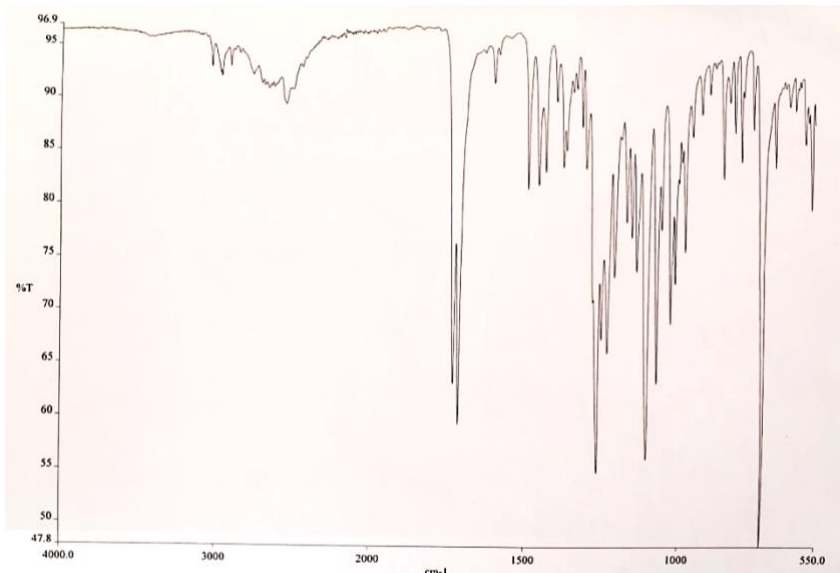


Figura 6. Espectro FTIR de Clorhidrato de cocaína

De las extracciones realizadas al clorhidrato de cocaína se obtuvo un sólido blanco insoluble en agua y soluble en metanol cuyo porcentaje de recuperación fue de 77.16%.

Debajo se muestra el cromatograma y espectro FTIR del producto de las extracciones que corresponde a cocaína base. Con las condiciones cromatográficas antes descritas el compuesto aparece en el minuto 6.9.

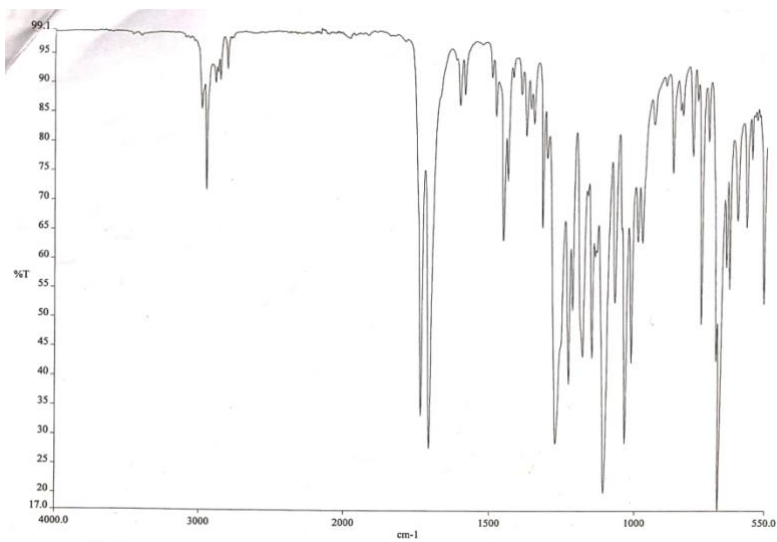


Figura 7. Espectro FTIR de cocaína base

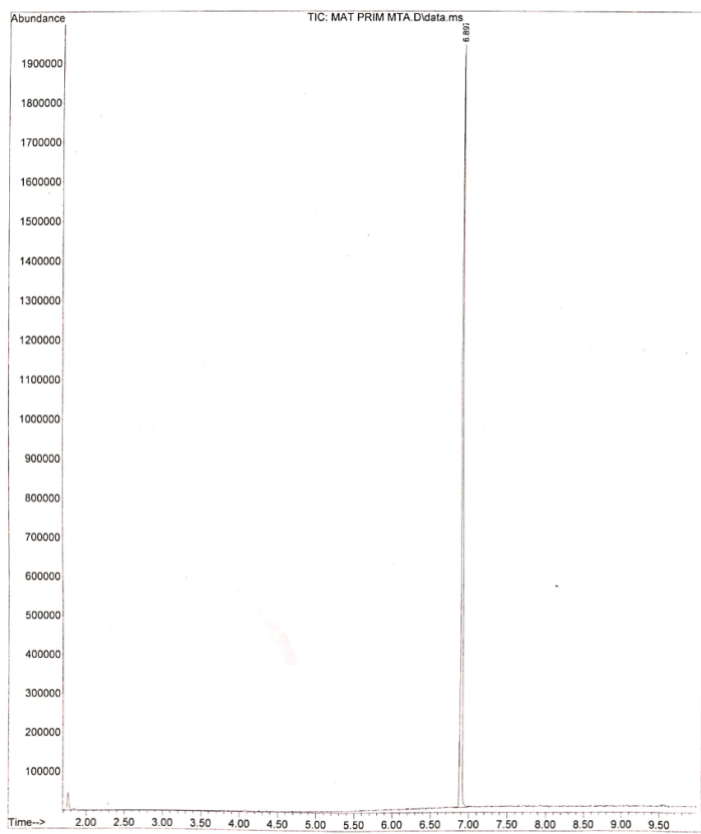


Figura 8. Cromatograma de cocaína base.

Obtención de benzoilecgonina

Después de analizar la muestra tomada del matraz de reacción fue posible conocer la composición de la mezcla obtenida que se muestra en la *Figura 9*. Con ayuda de la base de datos NIST 08 se identificaron las sustancias mayoritarias presentes en la muestra además del compuesto de interés (BE) siendo estas: ácido benzoico, metil ecgonidina y cocaína. Puesto que la literatura reporta la limpieza exitosa de BE realizando lavados con éter (Karlsen, H., Johansen, & Hoff, 2015) (Jane, Scott, Sharpe, & White, 1981) se procedió de tal forma.

De la hidrólisis realizada se obtuvieron 168.8 mg de BE, por lo cual el rendimiento de la reacción fue de 67.19%, con un método similar el rendimiento reportado fue de 40% (Everhart, Jacob, Mendelson, & Jones, 1999).

Con el objetivo de mejorar el rendimiento, se propone aumentar el tiempo de reacción, esperando que menor proporción de cocaína quede sin reaccionar.

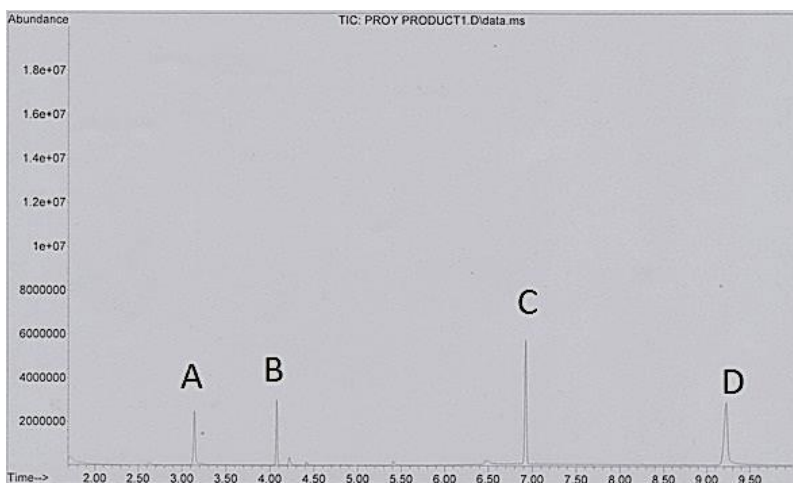


Figura 9. Cromatograma de muestra de mezcla. Donde: A. Ácido benzoico; B. Metil ecgonidina; C. Cocaína; D. Benzoilecgonina

Caracterización del compuesto.

Características físicas

Se obtuvieron cristales blancos solubles en agua en forma de agujas, tal como puede observarse en la siguiente imagen.



Figura 10. Cristales de benzoilecgonina.

FTIR.

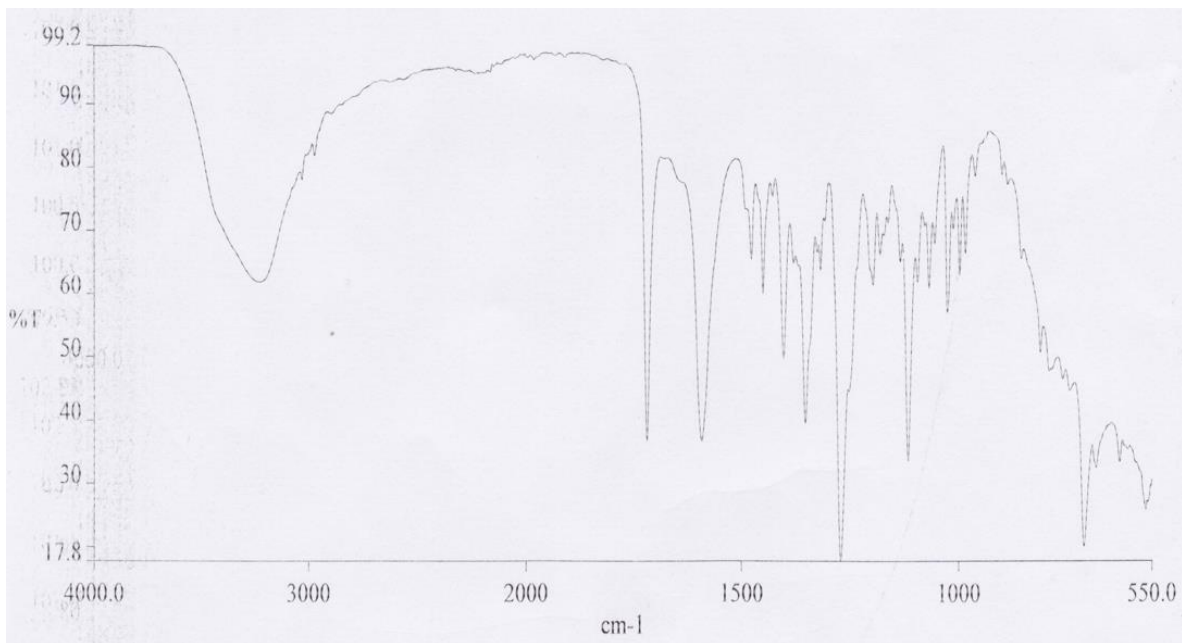


Figura 11. Espectro FTIR de benzoilecgonina obtenida.

Las bandas que presentó el espectro del compuesto corresponden a 3225.19 61.83
 2972.36 81.83 1718.35 36.79 1591.00 36.62 1476.46 65.30 1449.51 60.02
 1427.67 75.23 1402.15 49.56 1351.98 39.52 1316.98 63.61 1270.36 17.72
 1196.42 61.25 1180.13 66.05 1133.90 64.84 1116.01 33.58 1094.43 61.68

1067.84 60.61 1054.88 67.80 1025.55 56.78 1011.58 70.04 996.94 62.88
 983.83 66.06 960.92 78.36 898.75 78.61 810.18 50.49 789.31 47.57 707.86
 20.05 679.46 32.43 624.62 33.36 33.36 564.03 25.87.

En seguida se muestran las bandas reportadas en la literatura, útiles en la caracterización de BE, comparadas con los resultados obtenidos en el presente estudio

Tabla 1. Identificación de BE por FT-IR

Pico	Bandas compuesto obtenido (cm⁻¹)	Bandas según UNODC (cm⁻¹) (United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC), 2012)	Bandas (cm⁻¹) según IDDA (Mills, y otros, 2005)
A	1718	1720	1724
B	1591	1618	1597
C	1316	1316	
D	1270	1275	1279
E	1116	1116	1118
F	707	717	

El producto de la reacción coincide con los datos antes reportados, existiendo una discrepancia menor en el pico B de 1591 cm⁻¹ con respecto a los datos de UNODC. En la asignación de los picos principales reportados para BE, el pico A ubicado en 1718 cm⁻¹ corresponde al estiramiento simétrico C=O derivado posiblemente del éster aromático, mientras que B puede atribuirse a las vibraciones C-C del anillo aromático, la banda en 1270 cm⁻¹ se atribuye al estiramiento C-N; F en 707 cm⁻¹ corresponde a la deformación C-H fuera del plano. La señal que puede verse en 1316 cm⁻¹ se ha reportado como el estiramiento simétrico del grupo carboxilo (Penido, Pacheco, Zângaro, & Silveira, 2015).

Estimación de pureza y caracterización por GC-MS

Se presentan los cromatogramas y datos obtenidos para un estimado de pureza mediante la obtención de área bajo la curva (ABC).

Tabla 2. Datos de integración M1

Pico #	Tiempo de retención (min)	Altura del pico	Área corregida	% Máximo	% Total
1	2.610	187501	1216046	1.01	0.954
2	3.949	763701	5913795	4.92	4.641
3	6.134	10736958	120302675	100.00	94.405

Tabla 3. Datos de integración M2

Pico #	Tiempo de retención (min)	Altura del pico	Área corregida	% Máximo	% Total
1	2.614	183629	1331036	1.04	0.983
2	3.974	808721	5842297	4.56	4.316
3	6.221	11545419	128205025	100.00	94.701

Tabla 4. Datos de integración M3

Pico #	Tiempo de retención (min)	Altura del pico	Área corregida	% Máximo	% Total
1	2.611	222927	1598573	1.11	1.037
2	3.961	1101412	8192749	5.67	5.313
3	6.175	11739630	144408653	100.00	93.650

Habiendo realizado la media de lo anteriormente expuesto, la pureza estimada de la BE obtenida fue de 94.25%.

Como se visualiza en los cromatogramas de M1, M2 y M3 se logró eliminar completamente la cocaína después de la purificación del compuesto, sin embargo, en BE existieron residuos de ácido benzoico y metil ecgonidina (ME) en su forma derivatizada, con un tiempo de elución aproximado de 2.6 y 3.9 minutos respectivamente. Ambas sustancias propias de la degradación de cocaína.

ME es también uno de los metabolitos mayoritarios de cocaína, que al igual que BZE es inactivo farmacológicamente y posee importancia toxicológica (Bujak, 2016) (Johansen & Bhatia, 2007) al ser un marcador de fumadores de crack pues es un producto de pirolisis (Scheidweiler, Plessinger, Shojaie, Wood, & Kwong, 2003) (Scheidweiler, Shojaie, Plessinger, Wood, & Kwong, 2000)

Identificación de BE por GC-MS

El compuesto mostró correspondencia de 99% con los datos contenidos en la base de datos NIST 08 para benzoilecgonina-TMS.

La justificación propuesta para la fragmentación de BE-TMS se muestra a continuación (Hernández-Domínguez, Martínez-Brito, & Montes-de-Oca-Porto, 2018)

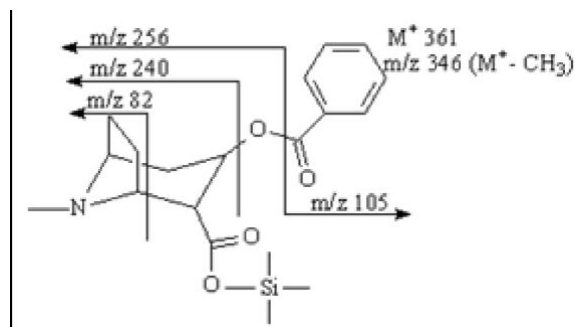


Figura 12. Fragmentación propuesta de BZE-TMS (Hernández-Domínguez, Martínez-Brito, & Montes-de-Oca-Porto, 2018)

Conclusiones

A través de una reacción de hidrólisis fue posible obtener benzoilecgonina y caracterizarla mediante técnicas instrumentales, se obtuvo un compuesto con bajo porcentaje de impurezas que lograron ser identificadas.

Considerando la cantidad de material que fue analizado el porcentaje de impurezas se reduciría significativamente en el desarrollo de un método, ya que las concentraciones manejadas de la sustancia de referencia son significativamente menores.

El producto obtenido puede ser utilizado como un estándar secundario una vez que se hayan verificado características tales como humedad, estabilidad, entre otras. Para la determinación de pureza se sugiere analizar el producto mediante HPLC contra un estándar primario.

Bibliografía

- Clauwaert, K. M., Van Bocxlaer, J. F., Lambert, W. E., & De Leenheer, A. P. (1997). Liquid chromatographic determination of cocaine, benzoylecgonine, and cocaethylene in whole blood and serum samples with diode-array detection. *Journal of chromatographic science*, 321–328.
- Clauwaert, K., Lambert, W., & De Leenheer, A. (1995). High Performance Liquid Chromatographic Determination of Cocaine and Its Main Metabolites In Biological Samples: A Review. *Journal of Liquid Chromatography*, 2097-2114.
- Lampman, G. M., Kriz, G. S., & Pavia, D. L. (2001). *Introduction to spectroscopy : a guide for students of organic chemistry*. Harcourt College Publishers.
- Casale, J., & Klein, R. (1993). Illicit production of cocaine. *Forensic Science Review*, 95-107.
- Cherconi, S., Stefanelli, F., Valle, Y., & Giusiani, M. (2015). A Direct Aqueous Derivatization GSMS Method for Determining Benzoylecgonine Concentrations in Human Urine. *Journal of forensic sciences*.

- Cone, E. J., Sampson-Cone, A. H., Darwin, W. D., Huestis, M. A., & Oyler, J. M. (2003). Urine testing for cocaine abuse: metabolic and excretion patterns following different routes of administration and methods for detection of false-negative results. . *Journal of analytical toxicology*, 386–401.
- Christian, D. G. (2009). *Química analítica*. McGraw Hill.
- Bujak, R. G.-K.-G.-L. (2016). Selective determination of cocaine and its metabolite benzoylecgonine in environmental samples by newly developed sorbent materials. *Talanta*, 401–409.
- Ekman, R., Silberring, J., Westman-Brinkmalm, A., & Kraj, A. (2009). *Mass Spectrometry. Instrumentation, Interpretation and Applications*. John Wiley & Sons, Inc.
- Everhart, E., Jacob, P. I., Mendelson, J., & Jones, R. (1999). The synthesis of deuterium-labelled cocaine, cocaethylene and metabolites. *Journal of labelled compounds and radiopharmaceuticals*, 1265-1275.
- Harvey, D. (2000). *Modern Analytical Chemistry*. McGraw-Hill.
- Herbert, C. G., & Johnstone, R. A. (2003). *Mass Spectrometry Basics*. Taylor & Francis.
- Hernández-Domínguez, D., Martínez-Brito, D., & Montes-de-Oca-Porto, R. (2018). Characterization of metabolites in urine samples from individuals with a lethal co-administration of cocaine and ethanol. . *Revista CENIC Ciencias Químicas*, 83-92.
- Jane, I., Scott, A., Sharpe, W., & White, P. (1981). Quantitation of cocaine in a variety of matrices by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, 243-248.
- Johansen, S. S., & Bhatia, H. M. (2007). Quantitative analysis of cocaine and its metabolites in whole blood and urine by high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 338–344.
- Klein, D. R. (2017). *Organic Chemistry*. Wiley .

- Karlsen, M., H., L., Johansen, J. E., & Hoff, B. H. (2015). Economical synthesis of ¹³C-labeled opiates, cocaine derivatives and selected urinary metabolites by derivatization of the natural products. *Molecules*, 5329–5345.
- McMurry, J. (2012). *Química orgánica*. Cengage Learning.
- Mills, T., Roberson, J., Matchett, C., Simon, M., Burns, M., & Ollins, R. (2005). *Instrumental Data for Drug Analysis*. Taylor & Francis.
- Penido, C. A., Pacheco, M. T., Zângaro, R. A., & Silveira, L. J. (2015). Identification of different forms of cocaine and substances used in adulteration using near-infrared Raman spectroscopy and infrared absorption spectroscopy. *Journal of forensic sciences*, 171–178.
- Scheidweiler, K. B., Plessinger, M. A., Shojaie, J., Wood, R. W., & Kwong, T. C. (2003). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of methylecgonidine, a crack cocaine pyrolyzate. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 1179–1187.
- Scheidweiler, K. B., Shojaie, J., Plessinger, M. A., Wood, R. W., & Kwong, T. C. (2000). Stability of methylecgonidine and ecgonidine in sheep plasma in vitro. *Clinical chemistry*, 1787–1795.
- Silverstein, R. M., & Webster, F. X. (1998). *Spectrometric identification of organic compounds*. Wiley.
- Skoog, D. A. (2008). *Principios de análisis instrumental*. 6e. Cengage Learning Editores S.A. de C.V.
- Stuart, B. H. (2004). *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*. Wiley.
- United Nations Office on Drug and Crime. (2019). Obtenido de World Drug Report 2019:
https://wdr.unodc.org/wdr2019/prelaunch/WDR19_Booklet_1_EXECUTIVE_SUMMARY.pdf
- United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC). (2012). *Recommended Methods for the Identification of Cocaine in Seized Materials*. Obtenido de https://www.unodc.org/documents/scientific/Cocaine_Manual_Rev_1.pdf

Vo. Bo. DE LOS ASESORES RESPECTO A LOS CONTENIDOS ACADÉMICOS



Dr. Jaime Pérez Villanueva
Asesor Interno
Profesor Titular C de TC
Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco



QFB. Antonio Olalde Terrez
Asesor Externo
Fiscalía General de la República