

---

FACULTAD DE QUIMICA

U.N.A.M.

**Métodos de Extracción y Reacciones de Identidad de Amitriptilina para Aplicación en Toxicología**

T E S I S

Que para obtener el título de :  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

p r e s e n t a :  
MARIA DE LA LUZ HERNANDEZ MARTINEZ

---

México, D. F.

1978





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

TESIS 1978  
LAC \_\_\_\_\_  
AGE M.T. ~~\_\_\_\_\_~~  
FECHA \_\_\_\_\_  
PRBC \_\_\_\_\_ 220  
• \_\_\_\_\_



## J U R A D O

Presidente	Prof. Enrique Calderón García
Vocal	Prof. Ehtelvina Medrano de Jaimes
Secretario	Prof. César A. Domínguez Camacho
1er. Suplente	Prof. Ma. Teresa Coppola Fernández
2° Suplente	Prof. Ana María Méndez Chávez

Sitio donde se desarrollo el tema.

Laboratorio de Análisis Clínicos.

Prop. Q.B.P. José Ramos Gómez.

Sustentante Ma. de la Luz Hernández Martínez

Director Prof. Enrique Calderón García.

A MIS QUERIDOS PADRES  
EJEMPLO DE AMOR Y HONRADEZ

A MIS HERMANOS CARIÑOSAMENTE

CON GRATITUD

SR. ARGELICO GUERRERO H.

SRA. MARIA CORNEJO DE GUERRERO

A MIS MAESTROS

CON RESPETO Y ADMIRACION

A MIS AMISTADES

CON AGRADECIMIENTO

## I N D I C E

	Página
CAPITULO I	
Introducción	1
CAPITULO II	
Generalidades sobre amitriptilina	3
CAPITULO III	
Parte experimental	19
CAPITULO IV	
Resultados	32
CAPITULO V	
Conclusiones	36
Bibliografía	37

## CAPITULO I

### INTRODUCCION

La problemática psicosocial, fué la causa principal que influyó a que elaborase el presente estudio químico toxicológico de amitriptilina, fármaco utilizado en medicina como antidepresivo.

Los fármacos antidepresivos se han considerado como "normalizadores" del estado de ánimo y se ha aconsejado su uso para controlar y --prevenir la depresión. En consecuencia el paciente al recibir el bienestar que necesita puede incurrir en el abuso de la dosificación, provocándose intoxicación y en ciertos casos privarse de la vida. De esta situación de suministro desmedido se desprende el núcleo principal del presente trabajo.

Este trabajo tiene como finalidad dar a conocer los métodos y procedimientos para la extracción e identificación de amitriptilina a partir de material biológico.

Además, como una ayuda para reducir y facilitar el trabajo del -

toxicólogo, al médico para que no desconozca los peligros potenciales del abuso de la amitriptilina y como una contribución para la investigación científica en esta disciplina.

Los individuos, independientemente del estamento social a que pertenezcan, pueden padecer malestares psíquicos al experimentar periodos de aflicción, ansiedad y malestar, ocasionados por diversa índole como: enfermedades, dificultades en el trabajo, problemas en el hogar, sensación de inseguridad de inutilidad, soledad, etc.

Como tales individuos difieren en la forma y grado en sus reacciones emocionales y de conducta, algunos requieren de asistencia médica para poder tolerar dichas vicisitudes; en estos casos, generalmente, bastará un moderado tratamiento con un fármaco antidepresivo.

El fármaco antidepresivo contribuye para que el individuo se reincorpore emocionalmente y pueda continuar en el desempeño de sus cometidos o bien, vuelva a su nivel anterior de actividad social, intelectual y ocupacional.

## CAPITULO II

### GENERALIDADES

#### HISTORIA

Las sustancias que alteran la mente y el comportamiento han llamado la atención del hombre desde principios de la historia; desde entonces, en muchas sociedades se han usado dichas sustancias, pero los fines de su uso han sido diversos, rara vez o nunca tal fin ha sido modificar la evolución de una enfermedad o curarla, en nuestra cultura algunas de estas sustancias se han empleado para facilitar el trato social.

En el año de 1889; Thiele y Hozinger sintetizaron iminodibencilo y describieron sus caracteres químicos en detalle. Las propiedades farmacológicas se investigaron en 1948, al sintetizar Halflieger más de cuarenta derivados de iminodibencilo, para el posible uso como antihistamínico, sedantes, analgésicos y contra-parkinsonismo.

Durante la investigación química de estos análogos de las fenotia

zinas, Kuhn en 1957 descubrió que al contrario de las fenotiazinas, la imipramina era relativamente ineficaz para tranquilizar pacientes psicóticos agitados, por lo contrario hacía mucho bien en ciertos pacientes deprimidos así surge el primer antidepresivo.

Más tarde Kuhn dió a conocer la acción terapéutica de imipramina en el tratamiento de las depresiones endógenas y su labor pionera representó un gran avance en el tratamiento químico para el estado depresivo. Con ello empezó un vasto esfuerzo químico y farmacológico para sintetizar análogos de la imipramina y proyectar nuevos métodos de pruebas en animales que tuvieran importancia clínica.

Un estudio que trata de otros refinamientos estructurales que produjeron cambios cualitativos y cuantitativos en bases bioquímicas y farmacológicas fue la sustitución del nitrógeno del anillo de la imipramina por un átomo de carbono lo que dió por resultado el compuesto llamado amitriptilina.

El perfil farmacológico de la amitriptilina y su eficacia clínica, fueron conjugados por Kuhn, y observó que ésta tenía actividad antidepresora, entonces estimuló extensa investigación con base a estos esfuerzos se han acumulado un considerable conocimiento sobre amitriptilina.

## SINTESIS

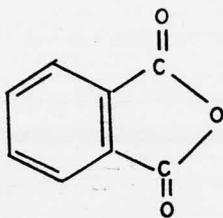
La síntesis de amitriptilina por Cope Arthur y Walter. A partir

del anhídrido ftálico que reacciona con el ácido fenil acético para formar el 3-benciliden-ftalato, el cual es reducido con HI, P a ácido 2-fenetil-etil benzoico, la conversión al cloruro ácido con  $\text{SOCl}_2$ , seguido por ciclización intramolecular produce la 2, 3, 6, 7-dibenzo suberona, la cual mediante una adición de Grignard, con el 3-(dimetil-amino) propilo y la deshidratación del carbinol terciario resultante, da amitriptilina. Además este fármaco posee la ventaja que puede prepararse por otro método según Hoffsomer; a partir de la acetona 5H-dibenzo (a, d) ciclo hepten-5ona, y una adición de Grignard, mediante propil-bromuro de magnesio y en presencia de ácidos halogenuros anhidros o ácidos minerales acuosos respectivamente, para formar el compuesto 5(8-halopropilideno) 5H- dibenzo 10,11 dihidro-ciclo-hepteno, este en presencia de halogenuro de dimetil amino se forma la amitriptilina.

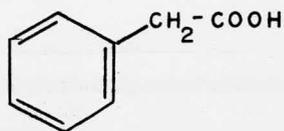
SINTESIS

DE

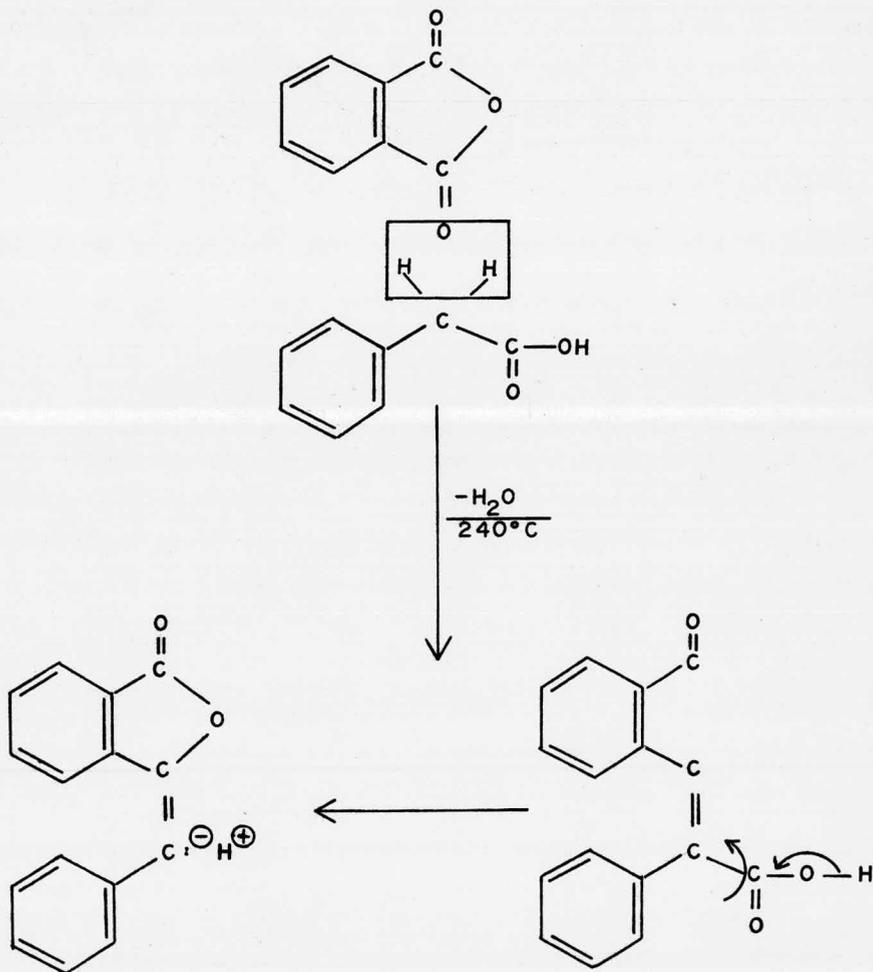
AMITRIPTILINA

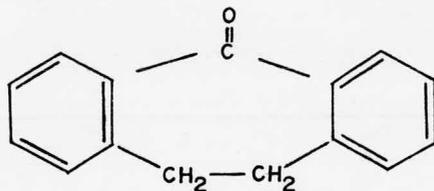
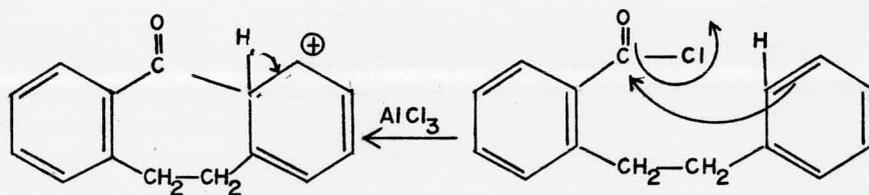
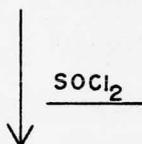
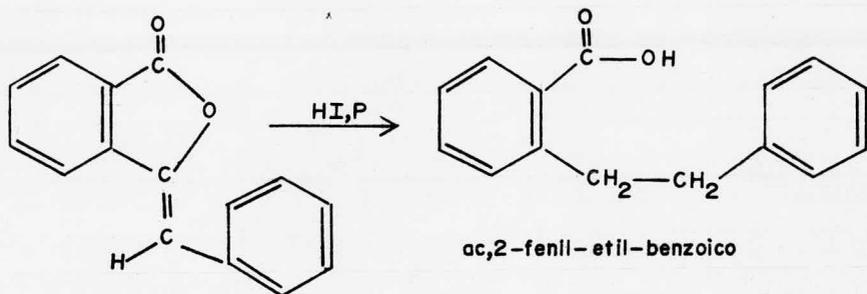


anhidrido ftálico



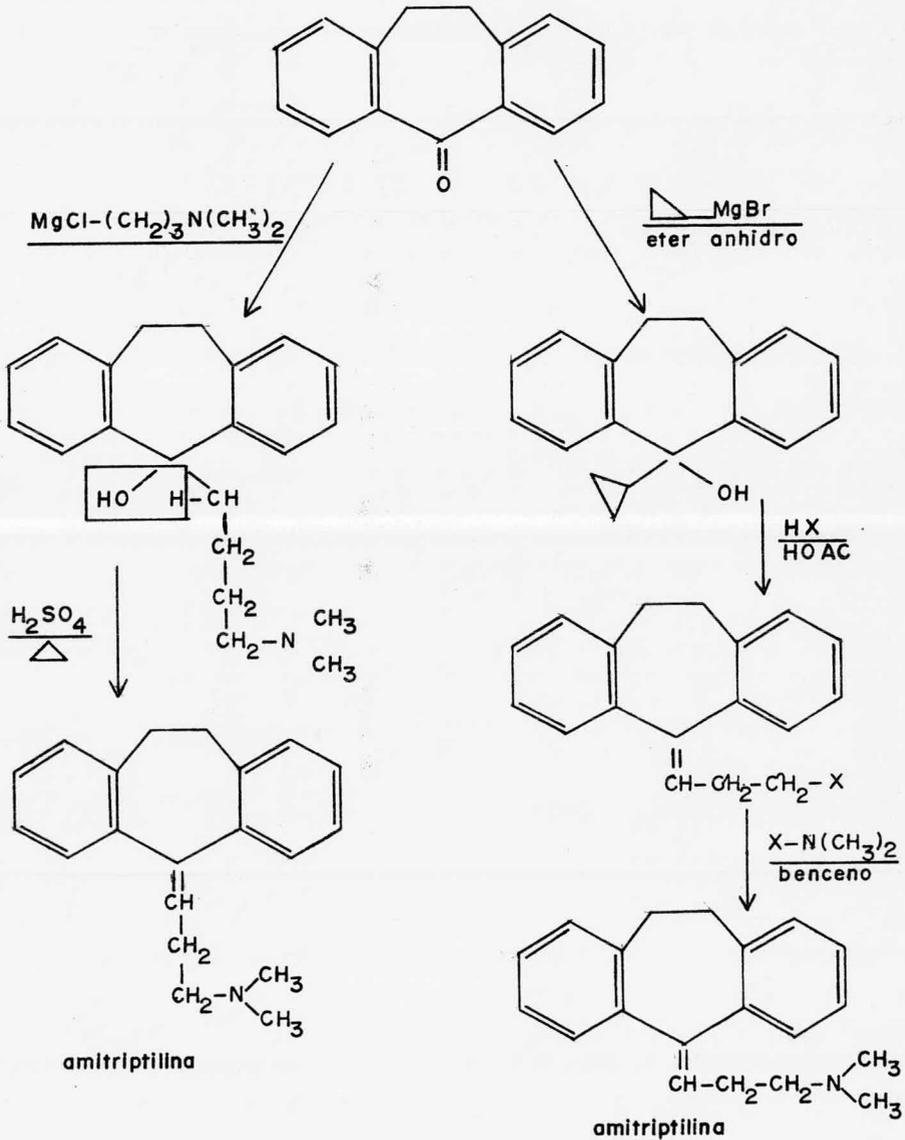
ac. fenil acetico





2,3,6,7 dibenzo suberona

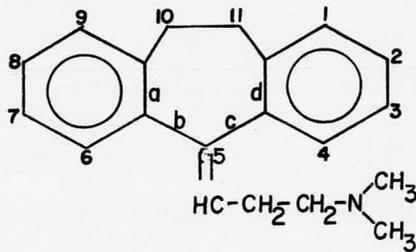
5H-dibenzo (a,d) ciclohepten 5-ona



# QUIMICA

De acuerdo a su estructura química la amitriptilina pertenece a -  
los compuestos tricíclicos.

## Estructura Química:



10, 11, dihidro-5-(3-dimetil, amino, propileno)5H-dibenzo(a,d)ciclohepteno.

Forma aprovechable: Clorhidrato de amitriptilina.

Nombres propios: Elavil, Laroxil, Saroten, Triptanol, Triptisol.

Propiedades Físicas: Polvo blanco cristalino, solubilidad en agua 1:1; en etanol 1:1.5; en cloroformo 1:1.2, insoluble en éter, punto de fusión 197°C.

Formas farmacéuticas: Se expende en tabletas y grageas de 10 y 25 mg., - frasco ampula de 10 ml., equivalente a 100 mg.

Dosis y vía de administración: de 10 a 25 mg. por vía oral tres veces al día.

Dosis límite de 10 a 50 mg, tres veces al día.

CONTRAINDICACIONES: Dado sus acciones anticolenérgicas la amitriptilina, así como todos los antidepresivos tricíclicos en general, deben ser - - empleados con cuidado.

No deben tomarse en padecimientos como: glaucoma y en el adenoma prostático lo mismo que en afecciones coronarias, en pacientes excitados o agitados y en los epilépticos.

No debe suministrarse nunca dicha droga, junto con los inhibidores de la mono-amino-oxidasa, debe transcurrir, por lo menos, 15 días su primidos estos últimos, para poder suministrar los antidepresivos.

REACCIONES SECUNDARIAS: Sequedad de la boca, constipación y estreñi-

miento.

## RELACION ENTRE ESTRUCTURA QUIMICA Y ACCION FARMACOLOGICA.

1. - Las aminas secundarias poseen en general reacciones antidepressivas más potentes que las terciarias.

2. - El cambio del núcleo de la dibenzazepina (imipramina) por el dibenzo ciclohepteno (amitriptilina); hace que esta droga se caracterice por sus propiedades antidepressivas, y además por sus acciones depresivas centrales.

## ACCION FARMACOLOGICA:

SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.- La acción fundamental de dicha droga es la antidepresión, fácil de demostrar en el sujeto afectado de depresión, difícil en animales de experimentación normales, en las personas normales la amitriptilina no produce mayores efectos, salvo discreta sedación o somnolencia inicial y muy discreta euforia, por administración continua. En cambio en pacientes afectados de estados depresivos ya se trate de una depresión endógena, involutiva o reactiva esta droga produce sensación de bienestar, mejoría del sueño y del apetito.

Las dosis elevadas son capaces de producir temblores hasta llegar a un discreto síndrome parkinsoniano, pudiendo producirse aún convulsiones del tipo epiléptico, incluso en personas que no sufren de esa enfermedad.

En ese sentido, es muy peligroso la asociación de los antidepresivos tricíclicos con los inhibidores de la mono-amino-óxidasa, aunque también son agentes antidepresivos. La administración concomitante, o bien, el reemplazo de los segundos por los primeros son capaces de provocar un cuadro donde las manifestaciones anteriores se exageran hasta llegar al coma y la muerte.

En general, la amitriptilina no actúa rápidamente en los estados depresivos, así, los efectos beneficiosos comienzan a notarse a los seis días de iniciada la administración llegando al máximo a los dos o tres semanas.

SISTEMA NERVIOSO AUTONOMO.- La amitriptilina posee importantes acciones autonómicas:

a).- Acción anticolérgica. En el hombre la acción parasimpática, se caracteriza por disminución de secreción salival, midriasis, constipación retención urinaria.

b).- Acciones adrenérgicas. Esta droga posee la propiedad de reforzar la acción presora de la adrenalina y, nor-adrenalina. La supersensibilización de éstas puede explicarse porque los antidepresivos tricíclicos, al igual que la cocaína impiden la captación de las catecolaminas por los depósitos naturales de éstas, de manera que habiendo mayor cantidad disponible de catecolaminas para los receptores, se produce la supersensibilización.

c).- Acción antihistamínica. La amitriptilina antagoniza la acción de la histamina sobre los bronquios produciendo broncospasmos.

SISTEMA CARDIOVASCULAR.- Es frecuente la producción de hipotensión ortostática, sobre todo en posición de pie, que puede ser intensa, además, puede producir taquicardia y acción anticolinérgica.

MECANISMO DE ACCION.- Hasta el momento no se ha podido localizar el lugar de acción de la amitriptilina en el sistema nervioso central, que explique los efectos antidepresivos.

Respecto al mecanismo de acción, debe señalarse de acuerdo con la hipótesis de Hollister, se debe a una deficiencia de noradrenalina en los centros cerebrales, constituyendo así el mecanismo principal de inactivación de dicha sustancia. Y también se sabe que normalmente, la mayor parte de este transmisor químico encontrado en las terminales nerviosas debe ser captado por las terminaciones nerviosas. Por lo tanto se acepta que la amitriptilina actúa inhibiendo la captación de la nor-adrenalina de manera que se produce un aumento de transmisor químico, disponible para reaccionar con los receptores adrenérgicos centrales.

Si se administra amitriptilina, la reserpina provoca un cuadro de excitación nerviosa, y la nor-adrenalina sintetizada, que no puede ser almacenada debido a la reserpina difunde fuera de la neurona y, como no puede ser captada por las terminaciones nerviosas, debido a la droga anti-depresiva permanece a disposición de los receptores adrenérgicos.

CONCLUSION. El mecanismo de acción, es como sigue:

A.- Aumenta la transmisión adrenérgica central mediante inhibición de la recaptación intracelular de la noradrenalina, por estimulación simpática.

B.- Inhibe la transmisión colinérgica central, por disminución de la concentración de la actil-colina, en el cerebro o bloquea, los efectos de este neuro-transmisor.

METABOLISMO:

ABSORCION.- La amitriptilina se absorbe perfectamente y casi en su totalidad cuando se administra por vía oral y parenteral.

Una vez absorbida pasa a la sangre donde se combina con albúmina plasmática del 92% al 96%.

DESTINO Y EXCRECION.- Desde la sangre las drogas pasan rápidamente a todos los tejidos encontrándose especialmente en hígado, riñón y pulmón. Y a nivel de los microsomas hepáticos la amitriptilina sufre tres procesos de biotransformación.

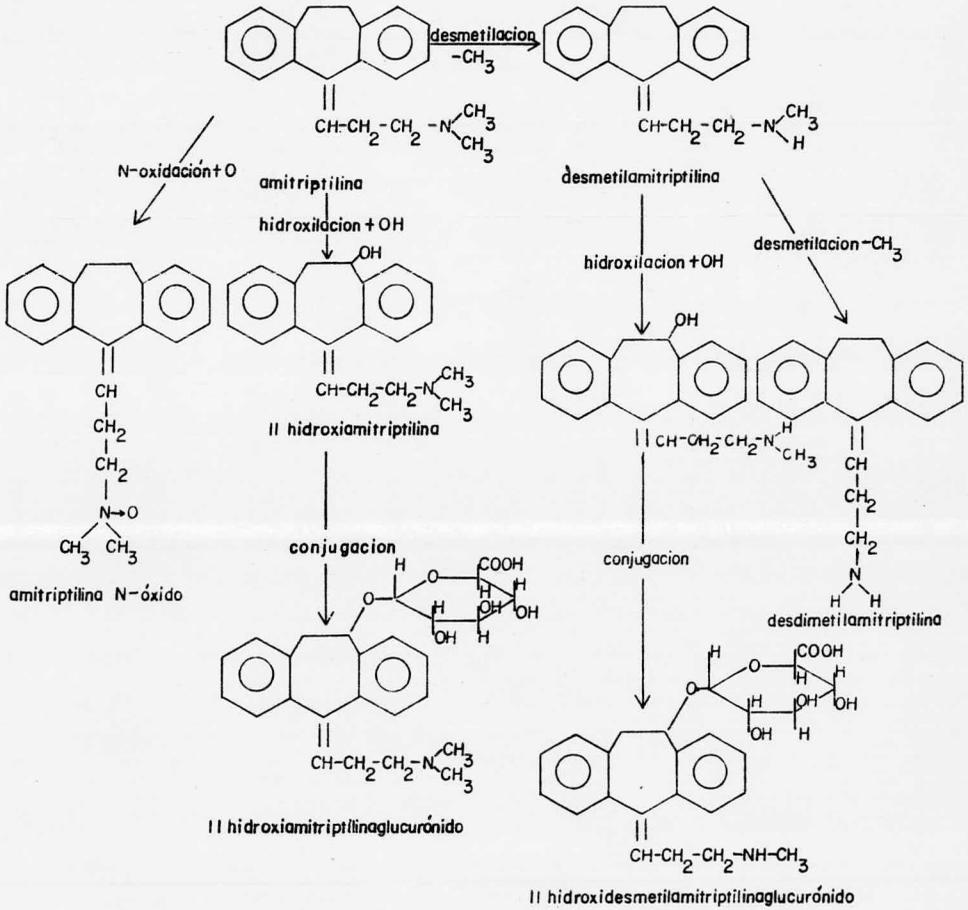
a.- La desmetilación que conduce a la formación de nortriptilina metabolito muy activo que luego sufre una nueva desmetilación.

b.- La hidroxilación a nivel del puente de etileno tanto para amitriptilina como para nor-triptilina los compuestos formados respectivamente

te sufren luego la conjugación con glucorónico.

c.- La n- oxidación a nivel de nitrógeno amínico, sus metabolitos y pequeña cantidad de droga intacta del uno al cinco por ciento se excreta en orina en más de 72 horas. La vida media de la amitriptilina es aproximadamente de 60 horas.

BIOTRANSFORMACION DE AMITRIPTILINA



## INTOXICACION:

En general los antidepresivos tricíclicos son drogas de menor peligro, pero no drogas inocuas ya que son capaces de producir dichas reacciones con menor frecuencia que otros antidepresivos; las manifestaciones son:

a.- Trastornos psíquicos.- Consisten en: excitación, euforia, insomnio, ansiedad, pudiendo originar alucinaciones, ilusiones y aún, síndrome maniaco y de confusión mental; en la esquizofrenia puede producirse exacerbaciones o reactivación. Puede ocasionar también fatiga, sedación y somnolencia.

b.- Manifestaciones neurológicas.- Consisten en temblor fino de los dedos, disartria, hiperreflexia, visión borrosa, retención de la orina, estas últimas derivadas de la acción anticolinérgica, cefálea y cierta rigidez muscular hasta llegar a un síndrome parkinsoniano leve, también se ha observado que en dosis elevadas puede producirse convulsiones epileptiformes, estado confusional, disnea, estado de coma e incluso la muerte por parálisis respiratoria. Estos trastornos pueden aparecer también con dosis terapéuticas si el paciente recibe al mismo tiempo inhibidores de mono-amino-oxidasa.

c.- Síntomas digestivos son.- Sequedad de la boca constipación, acción parasimpaticolítica, molestias epigástricas, náuseas y vómitos.

d.- Trastornos cardiovasculares.- Como: Taquicardia y descenso de la presión arterial, sobre todo del tipo ortostático esta caída tensional puede favorecer un infarto miocárdico en personas con deficiente circulación coronaria, se han descrito también taquicardia y fibrilación ventricular mortal.

e.- Trastornos alérgicos consisten en: Erupciones cutáneas del tipo urticario, edema-angioneurótico, prurito, eosinofilia; algunas veces se ha observado leucopenia, agranulocitosis y excepcionalmente ictericia colostática, convulsiones e hipotensión grave.

## CAPITULO III

### PARTE EXPERIMENTAL

Experimentación en animales de laboratorio.- Se utilizaron cinco lotes de ratas certificadas para laboratorio de ocho ratas cada uno, edad siete semanas, peso corporal de doscientos treinta a doscientos cuarenta -- gramos aproximadamente. Fueron colocados en jaulas metabólicas, se les administró alimento y agua ad-libitum; los lotes fueron numerados del uno - al cinco. Adjunto a las jaulas se colocó un libro en el que se anotó diariamente el comportamiento de los animales.

Procedimiento.- Se les administró amitriptilina por vía oral de acuerdo a las siguientes dosis:

Manejo de los animales de experimentación.- La palma de la mano izquierda es puesta sobre la espalda del animal, sujetando la cabeza por la parte posterior entre los dedos pulgar e índice, el dedo pulgar debe pasar por el lado derecho del cuello y por la cara posterior de la extremidad anterior derecha, el índice por el lado izquierdo del cuello y por delante de

la extremidad anterior izquierda, el dedo medio complementa la sujeción pasando por la parte posterior del mismo miembro, de este modo la rata queda inmovilizada, firme y suave a la vez, luego se oprime la comisura lateral de los labios de la rata entre los dedos pulgar e índice volteando el labio inferior hacia afuera quedando abierta la cavidad bucal, con la mano contraria se toma una jeringa provista de un tubo de plástico flexible de calibre 15 ó 16 y de 6 a 10 cm. de longitud, el cual es introducido por la abertura suavemente, dándole una ligera rotación sobre la lengua se pasa a la faringe y ahí se siente la presión opuesta por el esófago al paso del tubo el fluido debe ser descargado lentamente; la amitriptilina se encuentra disuelta en agua destilada.

LOTE 1.- Este lote formado por ocho ratas, se les administró una dosis de cien miligramos de amitriptilina a cada una por vía oral en la forma anteriormente descrita; el tiempo de observación fué menor en comparación a los otros lotes; una hora después de administrar a la amitriptilina, fueron sacrificadas.

LOTE 2.- Al siguiente lote se les administró 75 mg. de amitriptilina a cada una respectivamente, fueron sometidas a observación durante cuarenta y ocho horas, al término de este tiempo fueron sacrificadas.

LOTE 3.- Al tercer lote, se les administró 50 mg. de amitriptilina a cada una respectivamente, manteniéndose en observación el mismo tiempo que se dedicó al lote anterior siendo igualmente sacrificadas.

LOTE 4.- Al cuarto lote, se aplicó una dosis de veinticinco miligramos de amitriptilina sometiénolas a observación desde la administración hasta el término de una semana.

LOTE 5.- El último lote fué empleado como lote testigo, se les administró solamente agua y alimento ad-libitum, notándose su comportamiento normal en todos ellos todo el tiempo que duró el experimento; finalmente, también fueron sacrificadas.

#### Recolección de las muestras:

Orina.- Las muestras de orina fueron recolectadas y analizadas cada doce horas conjuntamente con la orina de las ratas testigos.

Vísceras.- Los animales después de ser sacrificados, mediante la inhalación de un anestésico volátil, fueron discectados, se observaron con detenimiento sus órganos víscerales que fueron extraídos (riñones, pulmones e hígado), se colocaron en frascos limpios para llevarlos a congelación para su posterior análisis toxicológico.

#### Métodos de extracción y reacciones de identidad de amitriptilina:

Los métodos empleados para la extracción e identificación de amitriptilina, son esencialmente aquellos aplicados en química analítica; estos métodos incluyen:

A.- Métodos de extracción a partir del material biológico: san-

gre, orina y vísceras.

B. - Métodos de identificación o reacciones de identidad, tales - como: pruebas cristalográficas; pruebas coloridas (cuantitativas y cualitativas); cromatografía en papel; cromatografía en capa delgada; espectrofotometría de absorción infrarrojo; cromatografía de gases.

Explicación concreta tanto del método "A" como del "B".

A. - Preparación de las muestras de sangre y orina

Precipitación de proteínas. - Se maceran los volúmenes obtenidos de sangre o de orina, con dos veces su peso en agua, añadir a la mezcla solución de cloruro de aluminio al 10%, un volumen igual al volumen de agua, calentar en baño de agua a temperatura constante de 40°C. durante una hora con una agitación ocasional; filtrar a través de doble hoja de papel Whatman del número uno, el cual previamente ha sido humedecido con agua fría; el filtrado obtenido es tratado como sigue:

Extracción en el filtrado. - El filtrado es generalmente claro o de color amarillo pálido; se mide y se acidifica con ácido clorhídrico 2 N, luego, se transfiere a un embudo de separación son añadidos diez veces su volumen, de eter y la mezcla se agita por un minuto, se deja reposar para permitir que el extracto etéreo generalmente emulsificado se separe en una capa superior en caso contrario añadir sulfato de sodio anhidro con constante agitación, hasta que el éter claro se separe del resto de la mez-

cla, la fase etérea se deshecha. La fase acuosa se alcaliniza hasta  $\text{p}^{\text{H}} = 9$ , con solución de hidróxido de amonio 2 N. Y se extrae con diez volúmenes de cloroformo, estas fracciones clorofórmicas se transfieren a un vaso de precipitados y es colocado en baño de agua para evaporar a sequedad; se reconstituye con cloroformo, este extracto es aprovechado para la identificación de amitriptilina utilizando los métodos analíticos fisicoquímicos mencionados.

#### Extracción en vísceras

Son necesarios y frecuentes los análisis en vísceras, cuando en las necrópsias no existen hallazgos que indiquen la naturaleza de la muerte. Varios métodos, han sido utilizados para la extracción de drogas, sin embargo no se ha logrado un método general, ya que todos presentan limitaciones por ejemplo:

a) Método de Valov.- En este método las proteínas son precipitadas con ácido túnstico. Ha sido muy satisfactorio para drogas ácidas y neutras, pero insuficiente para la extracción en sustancias básicas, como amitriptilina.

b) Método de Stas Otto.- En éste la extracción en vísceras con alcohol caliente conteniendo ácido tartárico para todo tipo de drogas, tiene la desventaja que para separar las drogas de fracciones con material grasoso, son procedimientos muy largos.

c) Método de Nickolls.- Es aquél en donde las proteínas son -- precipitadas con solución de sulfato de amonio caliente a 70°C. en medio ácido. Tiene el defecto de que comúnmente no se logra la acidez requerida que permita retener las drogas en solución como sales.

d) Método de Sunshine y Baumir.- Recomiendan el uso de ácido clorhídrico 5 N. De 70 a 80°C., para separar drogas de proteínas víscerales, así como formas conjugadas de drogas en fluidos y tejidos corporales el problema es que en estas condiciones las drogas tienden a ser hidrolizadas.

e) Método de Stas Otto Modificado.- Método que fué empleado para la extracción de amitriptilina.

Procedimiento: Los órganos congelados son fragmentados finalmente y acidificados con solución de ácido tartárico en etanol, esta mezcla es calentada en baño de agua durante una hora a temperatura menor de -- 60°C. o bien, se deja digerir el homogenizado durante una noche a temperatura ambiente después se filtra, el proceso de filtración se repite y los filtrados se unifican, el etanol es removido por evaporación a baja temperatura utilizando un recipiente para baño de agua o, con aire caliente permitiéndole estar en contacto con la superficie o, de preferencia destilación al vacío; al extracto se le añade alcohol absoluto caliente, este deberá ser -- añadido en pequeñas porciones agitando cada vez, decantar. Se juntan los extractos y se dejan evaporar; el residuo final es reconstruido con agua aci

dificada con unas gotas de ácido sulfúrico, se deja reposar durante la noche si es posible o bien transferirla a un matraz cónico y agitar durante una hora, luego filtrar con papel Whatman del número uno y el filtrado está listo para la extracción con solventes. Procedimiento ya descrito para las muestras de sangre y orina.

B.- Métodos de identificación y reacciones de identidad para amitriptilina

Punto de Fusión.- Después de la extracción del filtrado, se procede a detectar el punto de fusión de amitriptilina, se utilizó el aparato de Carl Fisher.

Pruebas Coloridas.- Que pueden ser cualitativas o cuantitativas. Están fundadas en el desarrollo de color, la absorbencia se mide dentro de la región visible del espectro, generalmente se añade a la muestra preparada, un reactivo para producir color, que se compara con la substancia que se ha preparado al mismo tiempo y que contiene una cantidad igual a la de un patrón. Cuando se observa que la absorbencia de una substancia repetidamente valorizada se ajusta a la ley de Lambert-Beer en un intervalo razonable de concentración es posible utilizar una curva típica que se prepara con el correspondiente patrón U.S.P. Para la interpretación de los datos obtenidos con la muestra por identificar.

Pruebas de orientación.- Conocidas en toxicología como pruebas

presuntivas; son rápidas y como su nombre lo indica sirven de orientación para las pruebas de confirmación. Dentro de éstas, para identificar amitriptilina encontramos las siguientes:

a) Reactivo de Marquis.- Agregar 5 ml de solución acuosa de formaldehído al 40% a noventa y cinco mililitros de ácido sulfúrico Q.P. y amitriptilina, desarrollan un color café naranja.

b) Reactivo de Mandeli.- Solución acuosa al 5% de Vanadato de amonio más amitriptilina, producen color café que cambia rápidamente a verde.

c) Reactivo de Vitali's.- Acido nítrico concentrado Q.P. más amitriptilina desarrollan un color café claro.

d).- Reactivo de Tiocianato de Cobalto.- Se coloca una pequeña cantidad del problema y se añade tres gotas de solución acuosa al dos por ciento de tiocianato de cobalto, forman un precipitado azul intenso además es insoluble en tres gotas de solución recientemente preparada de cloruro estano.

Métodos cromatográficos.- Cromatografía es el nombre dado a una familia de técnicas de separación de sustancias. El método original fué descrito por Twest en 1901 quién lo usó para separar sustancias coloridas, de donde se dió este nombre, sin embargo las limitaciones a compuestos coloridos desapareció y en la actualidad la mayoría de las separa-

ciones cromatográficas, se efectúan en sustancias incoloras.

a) Cromatografía en papel.- En la cromatografía en papel, la celulosa actúa como soporte de una fase líquida estacionaria firmemente -- unida al papel, sobre la que fluye la fase líquida móvil que suele ser un sol vente de distinta polaridad.

b) Cromatografía en capa delgada.- La idea de usar un sorbente cromatográfico en capa delgada en un soporte rígido, fue propuesto por primera vez en 1938 por Izmailov y Sharaiber, sin embargo fue hasta 1950 cuando Stahl diseñó métodos convenientes para la preparación de placas y -- demostró que la cromatografía puede ser aplicada para gran variedad de -- separaciones. Preparación de la placa:

Aplicar el absorbente en forma de una película delgada de doscientos cincuenta micras de espesor, sobre una soporte firme e inerte generalmente vidrio o aluminio (fase fija), el absorbente sólido finamente pulveri-- zado se hace una suspensión en agua y se extiende sobre la placa por medio de un aplicador. También es posible hacer la capa por rociado o por sumersión. La placa aplicada es secada por calentamiento a cien grados centígra dos, por un período predeterminado.

Cuando la placa está lista, se marca una línea con lápiz a lo an-- cho de la placa sobre la que se deposita por goteo tanto la substancia en estudio como los testigos, la aplicación se hace con una pipeta Pasteur, jeringa o tubo capilar, cuando las gotas se han secado, se introduce la placa en

una cámara (recipiente adecuado de vidrio), saturada con la mezcla de solventes orgánicos previamente seleccionados; procurando que la línea de de pósito de la placa quede sumergida en la fase móvil, se cierra la cámara y el solvente asciende por capilaridad; cuando éste ha recorrido las dos terceras partes de la placa, se saca la placa de la cámara y se marca la altura que alcanzó el solvente, cuando está seca la placa se asperge con un reactivo (revelador) o se visualiza con lámpara de luz ultravioleta que ponen de manifiesto a la substancia en estudio.

Los distintos compuestos suelen caracterizarse por un valor llamado Rf.

$$R_f = \frac{\text{Distancia recorrida por la substancia en estudio}}{\text{Distancia recorrida por el solvente, desde la línea de depósito hasta el frente del solvente.}}$$

#### SOLVENTES ENSAYADOS:

Acido acético/Benceno .....	90:10
Amoniaco/Benceno/Dioxano .....	5:75:20
Cloroformo/Acetona .....	90:10
Cloroformo/Benceno .....	70:30
Cloroformo/Etanol .....	80:20
Cloroformo/Dioxano/Acetato de Etilo/Amoniaco	25:60:10:5
Metanol/Acetona/Trietanol Amina .....	50:50:0.03
Metanol/Amoniaco .....	100:1.5
Metanol/Cloroformo .....	50:50
Metanol/Hidróxido de Amonio/Acetato de Etilo	7.9:4.5:87.5

Reveladores ensayados:

Cámara de Yodo.- Yodo sólido en cámara de vidrio.

Luz ultravioleta.- De onda larga y corta.

Reactivo de ácido pícrico.- Solución acuosa saturada.

Reactivo de Ehrlich.- Solución al 5% de P-dimetil-Amino-Benzaldehído en isopropanol.

Reactivo de Dragendorff Modificado.- a) Mezclar dos gramos de subnitrito de Bismuto, 25 ml. de ácido acético y cien ml. de agua; b) Disolver 40 gr. de yoduro de potasio en cien ml. de agua. Mezclar diez ml. de (a) y diez ml. de (b) con veinte ml. de ácido acético y añadir cien mililitros de agua, se mezclan hasta el momento de usar.

Reactivo de Marmé.- Tres gramos de yoduro de Cadmio en 18 ml. de agua que contiene seis gramos de yoduro de Potasio.

Solución de Yoduro de Platino.- Un gramo de  $H_2PtCl_6$  más cinco gramos de yoduro de sodio en 20 mililitros de agua destilada.

Solución de Yoduro de Bismuto.- Un gramo de subnitrito de bismuto más cinco gramos de yoduro de potasio en veinte mililitros de solución acuosa de ácido sulfúrico al dos por ciento.

### Espectrofotometría de Absorción de Luz Ultravioleta.

La absorción molecular en la región visible y ultravioleta del espectro, depende de la estructura electrónica de la molécula. La absorción de energía es cuantizada y resulta de la elevación de electrones de orbitales en el estado basal a orbitales de energía superior en el estado excitado.

Es necesario purificar la droga extraída del material biológico que se encuentre en concentraciones elevadas de 0.200 - 0.250 microgramos; esta clase de datos obtenidos dan información para la identificación de la droga.

### Espectrofotometría de absorción infrarroja.

La absorción infrarroja se refiere ampliamente a esa parte del espectro comprendido entre la región visible y la de microondas. La absorción molecular en la fracción infrarroja es también cuantizada, pero el espectro vibracional aparece como bandas, debido a que los cambios de energía vibracional están acompañados de cambios de energía rotacional en las moléculas. Aunque el espectro infrarrojo es característico de la molécula, resulta que determinados grupos de átomos dan origen a bandas de casi la misma frecuencia, sin hacer caso de la estructura del resto de la molécula. Es la persistencia de estas bandas características lo que permite al Químico obtener útil información estructural de las sustancias en estudio.

## Cromatografía de gases.

Establecida en términos simples la cromatografía de gases re- -  
presenta un método por el cual una mezcla de moléculas pueden ser rápida-  
mente separadas y examinadas.

Utilizando un gas como fase móvil. La posibilidad de tal método  
de separación fue descrito en 1941 por Martín y Synger. Está basado a tra-  
vés del conocimiento de los principios de la cromatografía líquido - líquido;  
la separación utilizando un gas en vez de un líquido para la fase móvil fue -  
demostrado en 1952 por Martín James. Corresponde probablemente a Curry  
hacer la primera referencia a cromatografía de gases aplicada a los proble-  
mas de laboratorio en la ciencia forense.

## CAPITULO IV

### RESULTADOS

- 4.1 Lote Uno. Con la dosis de cien miligramos de amitriptilina se obtuvo un resultado franco de intoxicación en cinco animales, quedando inmóviles, con pérdida de reflejos y respiración apenas perceptible, al término de la administración de la droga fallecen tres ratas, una hora después fueron sacrificadas, detectándose amitriptilina tanto en sangre como en las vísceras (pulmón, riñón e hígado).
- 4.2 Lote Dos. Con dosis de setenta y cinco miligramos se observó inmediatamente después de la aplicación convulsiones, síntomas de vómito y vértigos, los cuales desaparecieron aproximadamente en dos horas; más tarde aparecieron los síntomas de anorexia inmovilidad y piloerección. A las cuarenta y ocho horas se le sacrificó, encontrándose tanto en orina, sangre y vísceras pequeñas cantidades de amitriptilina.

- 4.3 Lote Tres. Con la dosis de cincuenta miligramos de amitriptilina se observó seis horas después de la administración, que los animales se encontraban aislados e inmóviles y faltos de apetito, reincorporándose poco a poco, en el término de veinticuatro a cuarenta y ocho horas, desaparecieron por completo estos fenómenos, una semana después fueron sacrificados. En las muestras de orina, sangre y vísceras no se detectó amitriptilina.
- 4.4 Lote Cuatro. La dosis para este lote fué de veinticinco miligramos estuvo en observación durante una semana, no habiendo ninguna señal sintomatológica. En las muestras de orina, sangre y vísceras no se detectó amitriptilina
- 4.5 Lote Cinco. Los animales de este lote marcados como testigos, se encontraron normales en su forma habitual todo el tiempo que duro el experimento. Los resultados de las muestras de orina, sangre y vísceras fueron negativos.
- 4.6 Métodos de extracción de amitriptilina. Para fluidos corporales, (sangre y orina), el método de Stevens fué el que dió mejores resultados y tiene la ventaja de ser un método directo. Para la extracción en vísceras, el método de Stas Otto modificado, fué el que brindó mejores resultados. Con estos métodos se logró extraer a partir de material biológico la suficiente cantidad de amitriptilina para abastecer las pruebas de identificación.

- 4.7 Punto defusión. El extracto obtenido se disolvió en una mínima cantidad de alcohol; se recristalizó y, del producto purificado, se determinó su punto de fusión.  
Punto de fusión = 296-297°C.
- 4.8 Reacciones de orientación. De las diferentes pruebas que se realizaron, se obtuvieron resultados más satisfactorios con el reactivo detiocianato de cobalto, la reacción produjo un precipitado azul intenso, característico en amitriptilina.
- 4.9 Cromatografía en capa delgada. El sistema de solventes más adecuado, fué el siguiente: metanol/hidróxido de amonio/acetato de etilo (7.9 : 4.5 : 87.5). El revelador más conveniente fué el reactivo de Dragendorff modificado, el cual produce un color amarillo intenso, en la zona donde la muestra de un  $R_f = 71$ . El sistema anterior fué utilizado para efectuar un estudio comparativo entre amitriptilina y otros antidepresivos, obteniendo los resultados que se indican en la siguiente tabla:

<u>MUESTRAS</u>	<u>VALORES</u>
Amitriptilina	0.71
Butriptilina	0.60
1 Bencil-2-(5-metil-3-isoxazolicarbonil) hidrazina.	0.00
Nortriptilina	0.55
Desipramina	0.50
Doxepin	0.48
N (8-Dimetil aminopropil) iminodibencilo imipramina	0.65

- 4.10 Espectrofotometría de absorción ultravioleta. - Se utilizó un aparato Perkin Elmer. El residuo de la extracción se disuelve en la menor cantidad de etanol, se calienta en baño maría, se recristaliza, finalmente, se disuelve en etanol se mide su absorción ultravioleta a 242 m . La curva obtenida se compara con la de un patrón.
- 4.11 Espectrofotometría de absorción infrarrojo. - En un aparato Perkin Elmer mod. 337, se utilizó como soporte pastillas de bromuro de potasio grado espectro, se llevó a cabo la identificación del fármaco. El residuo del extracto del material biológico, se disolvió en una pequeña cantidad de cloroformo, se tomó una alícuota de 0.2 milímetros para impregnar la pastilla de bromuro de potasio. Se colocó la pastilla en el aparato y, en la gráfica se identificaron los siguientes máximos:  
a). - 762; b). - 765; c). - 775.

4.12 Cromatografía de gases. - Los estudios se realizaron utilizando un cromatógrafo de gases Variant Aerograph Mod. 2 100, con -- las siguientes condiciones de operación:

a). - Columna de Vidrio Pyrex de 1.80 metros de largo por 4 mi límetros de diámetro interno empacada con S.E. de 30 al 2.5%, sobre cromosorb Wawhmds, de 80 a 100 mallas.

b). - Detector: ionización de flama.

c). - Flujos: gas portados nitrógeno 30 ml./min, hidrógeno 30 ml./min., aire 300 ml./min.

d). - Temperatura de las columnas: 225°C.

e). - Temperatura del inyector: 180°C.

f). - Temperatura del detector: 260°C.

g). - Atenuación:  $32 \times 10^{-11}$

h). - Velocidad de la carta: 0.25 pulgadas/min.

Tiempo de retención: 0.58 min.

## CONCLUSIONES

- 5.1 Se observó en ratas, que se utilizaron como animales de experimentación, que con dosis mayores de 280 mg./kg. de peso corporal, la Amitriptilina provoca intoxicaciones con signos muy claros.
- 5.2 Se estableció que para la extracción de Amitriptilina, se debe emplear el método de Stevens para líquidos corporales y, para la extracción en vísceras, el método de Stas Otto modificado. Con estos métodos se obtuvieron óptimos resultados.
- 5.3 Se sugiere, para el reconocimiento de Amitriptilina, emplear cromatografía en capa delgada, por ser un método de separación de la sustancia problema y sus posibles metabolitos; además, es un método de purificación de sustancias.
- 5.4 Se recomienda el método espectrofotómetro de absorción infrarrojo

jo, en virtud de que dicho método nos ofrece una información completa de la estructura molecular de la sustancia en estudio.

5.5 Se procuró en el presente trabajo, encontrar métodos rápidos, confiables y reproducibles con los cuales se pudiera extraer e identificar Amitriptilina a partir de material biológico para su aplicación en toxicología.

5.6 Se considera pertinente continuar en la investigación para crear nuevos fármacos, esperando sean la solución a la enfermedad mental y en la misma medida mejorar los métodos y habilidades para su identificación en toxicología.

## BIBLIOGRAFIA

Cole, J.O. "Therapeutic Efficacy of Antidepressant Drugs"  
J. Amer. Med. 190: 448-455 (1964).

Cope, C. Arthur, and Staur, W. Fenton, "Synthesis of Amitriptyline", J. Am. Soc., 73: 1973 (1951).

Clark Del Guidice "Antidepresivos"  
Psicofarmacología; Ed. La Prensa Médica Mexicana  
México (1975).

Clarke, E.G. "Isolation and Identification of Drugs"  
The Pharmaceutical Press, London (1971).

Delay J. Cochin J. "Methods and Experimental Therapeutics"  
J. of Pharmacology 139: 160-162 (1963).

Diamond, S. "Use of Amitriptyline in General Practice"  
J. Medical 123: 347-348 (1963).

Drill, Victor Alexander "Antidepressives" Pharmacology in Medicine; fourth edition. Mc. Graw-Hill. New York (1971).

Gelbaumand, L.R., Domansky, T. A.  
J. Forensic, Science. 11: 233 (1966).

Goodman, Louis; Gildman Alfred "Antidepressives" The Pharmacological Basis of Therapeutics. Third edition, Mc. Millan Co., New York. (1974).

Gyernek, L. "The Pharmacology of Imipramine"; Int. Rev. - - Neurobiol; 9: 143 (1966).

Granier-Doyeux, M. "Del opio al LSD. La larga historia de -- los alcaloides". El Correo de la UNESCO 21: 9 (1968).

Hoffsommer, E. "Prepn. Amitriptyline".  
J. Org. Chem. 27: 4134 (1962); 28: 1751 (1963).

Holmberg, M. Jansson, B. "A Study with Amitriptyline"  
J. New Drugs. 2: 361-365 (1962).

Haflienger, F. Schindler, W.  
U.S. Patent 2: 764-780 (1956).

Hollister, L.E.; Overall, J.E.; Johnson M. "Drug Therapy of Depression" Arch. Gen. Psychiat 17: 486-493 (1963).

Jaffe, J.H. "Drugs adiction and Drugs abuse" The Pharmacological Basis of Therapeutics, Fourth Ed. New York. 276-213 (1972).

Kuhn, R. "Imipramine" Amer. J. Psychiat; 115-459 (1958).

Litter Manuel "Antidepresivos" Farmacología experimental y clínica Ed. Ateneo, Buenos Aires (1975).

Mesnard, P. Et. Devaux, G., Produits et Problemes Pharmaceutiques 22: 96-103 (1967).

Nickolls, L. "The Scientific Investigation of Crime"  
London 383 (1956).

Pérez de Francisco César "Intoxicaciones" Rev. de Medicina Vol. XII No. 5 México, D. F. (1969).

Raab, E.; Desilverio, R., "Drug Treatment in depression"  
J. Amer. Med. 201: 675-681 (1967).

Remington, S. "Amitriptyline" Pharmaceutic Sciences. Fifteenth Edition Mack Publishing Company Pennsylvania 1030 1031 (1971).

Sahagun, B. "Historia general de las cosas de la Nueva España"  
Ed. Porrúa. México (1956).

Klaus Florey "Analytical Profiles of Drug Substances"  
Vol. I, Ed. Academic Press, New York p. 65 (1972)

Silverstein, M. R., Bassler, G. O., "Spectrometric Identification of Organic Compounds", Third Edition, John Wiley & Sons Inc., New York p. 73-116 (1963)

Sunshine, I., "General Screening Method"  
J. of Clinical Pathology 40: 576 (1963)

Stas, J.S., Bull. Acad. Roy. Med. Belg. 11: 202 (1851)

Stevens, H. M., Med. Scie., 4: 180-188 (1964)

Sthall, E., "Thin Layer Chromatography", Academic Press, London (1965)

Street, H. V., Journal of the Forensic Science Society  
2: 118 (1962).

Walter, F., "Organic Syntheses", Coll. Vol. 2, John Wiley & Sons, Inc., New York p. 61 (1943)