

50524  
80



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
"ZARAGOZA"**

**PROPUESTA DE UN METODO PARA IDENTIFICAR  
Y CUANTIFICAR PSILOCIBINA POR CROMATOGRAFIA  
DE GASES ACOPLADA A ESPECTOMETRIA DE MASAS**

**PROTOCOLO DE INVESTIGACION**

**TESINA**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

**PRESENTA**

**OSCAR PEREZ REYES**

**ASESOR DE TESINA**

**M. EN C. VICENTE JESUS HERNANDEZ ABAD**



**MEXICO, D.F. 2003.**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

A



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

El presente trabajo se realizó en la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza bajo la dirección del M. en C. Vicente Jesús Hernández Abad como una opción de titulación que presenta la carrera de Químico Farmacéutico Biólogo a través del Diplomado de Química Legal.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**A mi madre:**

Gracias por cuidarme, por educarme, por comprenderme, por orientarme.

Gracias por ser mi mejor maestra.

Gracias porque estuviste, porque estas y porque siempre estarás a mi lado.

Haré lo posible porque te sientas orgullosa del hijo que tienes tanto como me siento yo orgulloso de la madre que tengo.

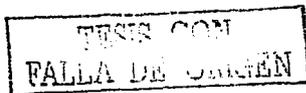
**A Nancy:**

Porque cada sonrisa que me brindas me motiva a seguir adelante.

Porque has sido durante todos estos años mi mejor amiga.

Gracias por animarme y hacer de esta difícil tarea una ilusión ahora hecha realidad. Se que llegado el momento eres capaz de lograrlo también.

Siempre contarás conmigo hermanita.



**DETERMINACIÓN DE PSILOCIBINA POR CROMATOGRFIA DE GASES  
ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASAS**

**PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN**

**INDICE**

1 RESUMEN .....	3
2 OBJETIVOS .....	4
3 ANTECEDENTES TEÓRICOS .....	5
3.1. FARMACODEPENDENCIA .....	5
3.2. ALUCINÓGENOS .....	5
3.3. TEONANÁCATL Y PSILOCIBINA .....	6
3.3.1. HISTORIA .....	6
3.3.2. HONGOS DE PROCEDENCIA .....	8
3.3.3. LOS COMPONENTES ACTIVOS .....	11
3.3.4. METABOLISMO Y DOSIFICACION .....	13
3.3.5. QUÍMICA .....	14
3.3.6. SÍNTESIS DE PSILOCIBINA .....	16
3.3.7. BIOSÍNTESIS DE PSILOCIBINA .....	18
3.4. MARCO LEGAL .....	19
3.5. ASPECTOS BIOQUÍMICOS DE LAS INTOXICACIONES .....	21
3.6. ANÁLISIS DE DROGAS DE ABUSO .....	21
3.7. CROMATOGRFIA .....	22
3.7.1. CROMATOGRFIA DE GASES .....	22
3.7.2. CONSTITUYENTES DE UN CROMATOGRFO DE GASES .....	23
3.7.3. ANÁLISIS CUALITATIVO POR CROMATOGRFIA DE GASES .....	31
3.7.4. ANÁLISIS CUANTITATIVO POR CROMATOGRFIA DE GASES .....	31
3.8. ESPECTROMETRIA DE MASAS .....	32
3.9. ACOPLAMIENTO CG / EM .....	35
3.10. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO .....	39
4 PROYECTO EXPERIMENTAL .....	43
4.1. PRINCIPIO DEL ANÁLISIS DE PSILOCIBINA .....	43
4.2. TIPOS DE MUESTRA .....	44
4.2.1. MATRICES BIOLÓGICAS .....	44
4.2.2. MATRICES NO BIOLÓGICAS .....	44
4.3. PRETRATAMIENTO .....	46
4.3.1. EXTRACCIÓN A PARTIR DE ORINA .....	46
4.3.2. EXTRACCIÓN A PARTIR DE HONGOS O MATERIAL SECO SOSPECHOSO .....	46
4.4. PRUEBAS PRESUNTIVAS PARA PSILOCIBINA .....	47
4.5. ANÁLISIS DE PSILOCIBINA .....	48
4.6. CONDICIONES DE TRABAJO .....	50
4.7. CONTROLES DE CALIDAD .....	53
4.8. INTERPRETACION .....	54
5 BIBLIOGRAFIA .....	55

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## 1. RESUMEN

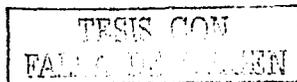
Desde tiempos ancestrales los hongos alucinógenos han sido utilizados en rituales por ser considerados como especies mágicas que ponen, a quienes los consumen, en contacto con dioses y otro tipo de seres extraordinarios. Se ha demostrado que este tipo de vivencias se originan por los efectos de las sustancias activas presentes. El principal componente encontrado en estos hongos es la psilocibina, aunque pueden existir mas de 20 diferentes compuestos capaces de provocar ese tipo de situaciones dependiendo del tipo de hongo que se maneje.

Se dice que este tipo de sustancias no tienen un gran poder adictivo pero sí desencadenan una serie de reacciones que pueden ser impredecibles en quien las consume, en algunos casos reacciones agresivas y en otros tantos se puede provocar trastornos psiquiátricos de tal duración que pueden ser irreversibles, es por esto que en la Ley General de Salud se establece que los hongos que producen efectos alucinógenos deben ser sujetos a control y se considera a las sustancias activas en el grupo de las sustancias psicotrópicas con valor terapéutico escaso o nulo y que, por ser susceptibles de uso indebido o abuso, constituyen un problema especialmente grave para la salud pública por lo que queda prohibido todo uso ya sea: siembra, cultivo, cosecha, elaboración, preparación, acondicionamiento, adquisición, posesión, comercio, transporte en cualquier forma, prescripción médica, suministro, empleo, uso, consumo y en general, todo acto relacionado con sustancias de este tipo.

Por lo anterior es que resulta de tanto valor la identificación de la psilocibina en el ámbito legal, pero más importante resulta la determinación de ésta en las emergencias clínicas, ya que hay pocas situaciones donde la determinación sea más crítica que en las intoxicaciones agudas; en tales cuadros (caracterizados por un estado clínico grave en una persona sin antecedentes de enfermedad) es necesario conocer, en el menor tiempo posible, qué sustancia es la causante, cuál fue su vía de entrada al organismo, en qué cantidad, y cuánto tiempo transcurrió desde el contacto. Estos parámetros son usualmente evaluados por los laboratorios especializados en toxicología y las sustancias responsables de la gran mayoría de las intoxicaciones agudas pueden ser determinadas con técnicas susceptibles de ser desarrolladas en los laboratorios de los distintos sectores de la Secretaría de Salud. Tales técnicas, no tienen la sensibilidad y especificidad analítica de la Cromatografía de Gases Acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM), que puede aportar información cualitativa y cuantitativa de importante valor para determinar de manera rápida y precisa la sustancia que afecta al paciente.

La Cromatografía de Gases (CG), es una técnica utilizada para la separación y análisis de mezclas de sustancias volátiles en los casos en que se acopla a la espectrometría de masas permite la separación y cuantificación en los componentes fundamentales de la muestra a analizar. Los espectros se recolectan a intervalos regulares de tiempo y se construye así el espectro de masas. Durante la corrida se comparan los espectros de masas recolectados en la base de datos del computador del equipo para identificar los compuestos presentes. Lo más recomendable es trabajar con un patrón de psilocibina y dar tratamiento bajo las mismas condiciones que la muestra.

El presente proyecto se encuentra orientado al desarrollo de un método analítico para identificación y cuantificación, por tal motivo es necesario mencionar la importancia de garantizar que los resultados que se ofrecen son consistentes, para ello será requerido validar este método y además, tomando en cuenta que la psilocibina es una sustancia de uso ilegal y que los resultados obtenidos serán de gran valor al presentarse en una corte como evidencia con el fin de soportar o refutar probables sanciones penales, será necesario que exista una homogeneidad en los resultados presentados tanto por la defensa como por la parte acusadora sobre la misma prueba, para que esto sea posible es necesario llegar mas allá de la validación, esto es, será necesario llegar hasta la acreditación del método propuesto.



## 2. OBJETIVOS

1. Presentar una monografía de la psilocibina que contenga los aspectos mas representativos de este alucinógeno en nuestro país.
2. Aplicar los conocimientos adquiridos en el diplomado de química legal en la elaboración de una propuesta de análisis.
3. Elaborar un procedimiento de análisis para casos en los que se sospeche de la presencia de psilocibina en fluidos biológicos.
4. Elaborar una propuesta sobre las pruebas presuntivas pertinentes que sugieran la posible presencia de psilocibina.
5. Presentar una propuesta de análisis cualitativo y cuantitativo para psilocibina por la técnica de Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas.
6. Analizar la importancia de la validación y la acreditación de métodos analíticos.

TESIS CON  
VALLE DE BERGEN

### 3. ANTECEDENTES TEÓRICOS

#### 3.1. FARMACODEPENDENCIA

La Farmacodependencia se define como el estado psíquico, y en ocasiones, también físico que resulta de la interacción entre una persona y una droga, caracterizados por respuestas de la conducta y de otro tipo que siempre incluyen una compulsión para tomar la droga en forma continua o periódica y experimentar sus efectos psíquicos, y a veces para evitar la molestia de su carencia. Puede haber o no haber tolerancia. Una persona puede ser dependiente para más de una droga<sup>(1)</sup>. El concepto de Farmacodependencia debe diferenciarse del de dependencia terapéutica, aunque en un principio no hay diferencia manifiesta, solo que en este último caso se trata de la dependencia hacia un fármaco o medicamento<sup>(2)</sup>.

#### TIPOS DE DEPENDENCIAS DEL FARMACODEPENDIENTE

##### DEPENDENCIA FÍSICA

Dependencia física, es un estado de adaptación biológica que se manifiesta por trastornos fisiológicos más o menos intensos cuando se suspende bruscamente la droga. Esto significa que, cuando existe dependencia física, el organismo se acostumbra a la droga y la necesita para vivir<sup>(1,2)</sup>.

##### DEPENDENCIA PSÍQUICA

Dependencia psíquica, es el uso compulsivo de una droga sin desarrollo de dependencia física, pero que implica también un grave peligro para el individuo. Es decir, en la dependencia psíquica no se produce trastornos fisiológicos al suspender bruscamente la droga; sin embargo, el individuo siente la necesidad de tomar la droga, necesidad que no puede reprimir<sup>(1,2)</sup>.

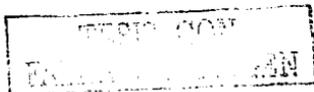
Hoy en día el Comité de Expertos de la OMS se ocupa de la farmacodependencia producida por los diferentes tipos de drogas, de este modo las clasifica acuerdo al efecto que ejercen sobre la actividad mental o el estado psíquico de una persona como: alcohol, barbitúricos, anfetaminas, marihuana, cocaína, opiáceos, solventes y alucinógenos<sup>(1)</sup>.

#### 3.2. ALUCINÓGENOS

Como su nombre lo indica, los alucinógenos son sustancias que tienen la capacidad de producir alteraciones en la percepción. La mayor parte de ellos son de origen vegetal, pero desde hace unos 30 años se producen en los países industrializados muchos sintéticos, que se cobijan bajo el nombre de "ácidos"<sup>(1)</sup>.

El término "alucinógenos" es empleado frecuentemente en periódicos y otros medios de comunicación para referirse en general a las sustancias psicoactivas. Este uso es inadecuado, pues aun cuando muchas sustancias pueden producir alucinaciones (los inhalables, las anfetaminas, la cocaína, el alcohol) este es un efecto secundario, resultante generalmente de intoxicaciones crónicas o severas, no de su efecto principal. Los alucinógenos de uso más frecuente son por lo general la mezcalina, el yahé, el LSD y los hongos alucinógenos<sup>(1)</sup>.

- **La mezcalina:** Es extraída de un cactus muy común en México y el sur de los Estados Unidos llamado peyote. Normalmente su consumo está fuertemente ritualizado y asociado a procesos de comunicación o contacto con fuerzas espirituales. En sujetos que lo consumen por primera vez son comunes las náuseas, cefalea, vómitos, gran malestar y angustia durante muchas horas, a lo que sigue la euforia con alucinaciones visuales y cromáticas muy brillantes.



- **El yagé:** Ampliamente difundido en las selvas colombianas, es el producto de la mezcla de varias plantas. Entre los indígenas sólo se emplea en circunstancias especiales y, al igual que la mescalina, tiene propósitos asociados a ceremonias de carácter religioso. En Colombia ha surgido en los últimos años un consumo urbano, generalmente bajo la supervisión de indígenas; no se sabe mucho al respecto de los objetivos de estas prácticas, pero es probable que se trate en gran parte de curiosidad<sup>(3,4)</sup>.
- **El LSD:** Es la abreviatura del ácido lisérgico dietilamida. Es la droga más potente que conoce el hombre; cuatro mil veces más fuerte que la mescalina y de mayor duración; antídoto para los dolores de migraña o jaqueca<sup>(3,4)</sup>. Provoca vértigo y angustia, cambios ópticos, estado de letargo y de ensueño; imágenes fantasmagóricas de extraordinaria plasticidad y colorido. Fue extraído originalmente de un hongo del centeno, pero actualmente es sintetizado por métodos químicos. Es un alucinógeno muy poderoso; tiene la característica de producir "flashbacks", es decir, que muchos días (e incluso meses) después de haberlo ingerido, la persona puede experimentar súbitamente las mismas experiencias que tuvo cuando la ingirió; esto sugiere que la sustancia no es eliminada totalmente y que puede reactivar sus efectos sin previo aviso.
- **La psilocibina:** Es el principal activo contenido en los hongos alucinógenos, al consumirse produce relajamiento muscular, frío en los brazos y piernas, dilatación de pupilas y cambios de humor brusco; visiones espectaculares: colores, formas, sonidos y visiones fantásticas, después se presenta agotamiento seguido de una depresión anímica y pérdida de la percepción del tiempo y del espacio. Aun cuando algunos usuarios describen la experiencia como placentera, muchos tienen experiencias desagradables ("malos viajes") que pueden producir conductas erráticas y, eventualmente, poner al usuario en serio peligro<sup>(3,4)</sup>. La literatura clínica contiene muchos casos de personas que han sufrido trastornos permanentes luego de consumir hongos, pero no se sabe con claridad si esto se debe a una predisposición de la persona, o a la mezcla de sustancias<sup>(1)</sup>.

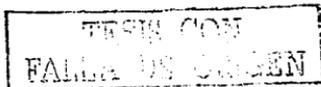
Los alucinógenos, por lo general, no producen dependencia. El peligro de estas sustancias se encuentra relacionado con el desencadenamiento de fenómenos de percepción que pueden inducir pánico o conductas imprevisibles, y con la posibilidad de aparición de trastornos durables en personas que tienen una predisposición o una historia de problemas psiquiátricos. La mezcla con otras sustancias también puede dar lugar a la aparición de complicaciones difíciles de predecir<sup>(1,2)</sup>.

La utilidad de los alucinógenos es reducida, aun cuando algunos psiquiatras han pretendido a lo largo de los años que pueden facilitar el "entrar en contacto con uno mismo". Hasta el momento actual tales experiencias han sido un fracaso, y pueden ser bastante resgosas para los pacientes. En la mayoría de los países su uso es ilegal<sup>(1,2,3)</sup>.

### 3.3. TEONANÁCATL Y PSILOCIBINA

#### 3.3.1. HISTORIA

En el desierto del Sahara se han encontrado pinturas antiguas realizadas en cuevas que representan figuras de humanoides con forma de hongos. Así mismo, culturas de América del sur y central construyeron templos a los dioses hongos y esculpieron "piedras-hongo". Estas esculturas con forma de hongos en las cuales se representan figuras bajo el sombrero de un hongo, se han fechado alrededor de 500-1000 años antes de Cristo. La finalidad de estas esculturas no se ha determinado con seguridad, pero deben haber servido como objetos religiosos<sup>(4)</sup>.



La cultura Mixteca de México central adoraba muchos dioses, el conocido como *Pitzintecuhtli* o 7 flor ( su nombre en el lenguaje pictórico se representaba por 7 círculos y una flor) era el dios de las plantas alucinógenas, especialmente de los hongos divinos. El Códice Vienna o Códice Vindobonensis (S. XIII-XV) representa el uso ritual de hongos por los dioses mixtecos, mostrando a *Pitzintecuhtli* y otros siete dioses sosteniendo hongos en sus manos<sup>(6)</sup>.

Los Aztecas tienen un dios que es pariente cercano de los enteógenos. Xochipilli, Príncipe de las flores, era el maestro divino de "el sueño de flores" que era como los aztecas denominaban el ritual de trance alucinógeno. Los aztecas usaban varias plantas y hongos alucinógenos, como por ejemplo los hongos *psilocybes* sp. (*teonanácatl*), *Salvia divinorum*, *Datura* sp. (*tlapatl* o *tolocha*), *Peyote* (*peyotl*), y grano mixtil. Los hongos psicocibicos se usaban en rituales y ceremonias, en alguno de los cuales eran servidos con miel o chocolate (algunos investigadores creen que utilizaban esta técnica para preservar los hongos, pero no se ha comprobado)<sup>(4,5,6)</sup>.

A partir de la victoria de Hernán Cortes sobre los Aztecas en 1521, los europeos empezaron a prohibir el uso de los intoxicantes / embriagantes no alcohólicos, incluyendo los hongos sagrados, lo que provocó que el uso del *teonanácatl* ("hongo maravilloso" o "carne de dios" ) se realizara de forma oculta<sup>(6)</sup>.

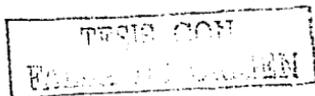
A mediados del siglo XVI el sacerdote español Bernardino de Sahagún describió en su *Códice Florentino* el uso que los Aztecas daban a los hongos alucinógenos: "Lo primero que comían en el festejo eran unos pequeños hongos de color negro, los cuales llamaban *nanacatl* y que les producía embriaguez, alucinaciones e incluso lujuria; los comían después del amanecer con miel; y cuando empezaban a notar los efectos comenzaban a bailar, algunos cantaban y otros lloraban (a mares) cuando la embriaguez de los hongos se les pasaba se contaban las visiones que había tenido cada uno"<sup>(6)</sup>.

De acuerdo con Sahagún, los hongos psicoactivos ingeridos por los sacerdotes aztecas y sus seguidores se denominaba siempre *teonanácatl*; sin embargo este término no parece que se use entre los indios modernos o los chamanes de mesoamérica<sup>(6)</sup>. Las variedades que más usaban los aztecas eran *Psilocybe caerulescens* y *Psilocybe mexicana*. *Psilocybe cubensis* es muy popular en la actualidad por lo fácil de encontrar así como de cultivar, no fue introducida en América antes de la llegada de los europeos y su ganado<sup>(7)</sup>.

A principios del siglo XX existía una disputa entre los investigadores occidentales sobre la existencia o no de los hongos psicoactivos. Sin embargo, Sahagún había mencionado el *teonanácatl* en sus diarios y un botánico americano, William Safford, sostuvo que Sahagún había confundido los hongos con los botones secos del peyote. Esta teoría fue muy discutida por un botánico aficionado austriaco, Dr. Blas Pablo Reko, quien había vivido en México. Reko estaba convencido de que esa gente seguía usando estos hongos en México y de que el término *teonanácatl* no sólo hacía referencia a los hongos psicoactivos, tal y como Sahagún había escrito<sup>(4,5,7)</sup>.

A principios de 1930, Robert Weitlaner, un antropólogo aficionado australiano presenció una ceremonia Mazateca donde se consumían hongos (velada) en el nordeste de Oaxaca, México. Después de tener noticias acerca de la disputa entre Safford y Reko, contactó con Reko, le contó que los indios Otomíes de Puebla usaban hongos como embriagantes y le mandó algunas muestras de los hongos. Reko envió las muestras a Estocolmo para realizar un análisis químico y a Harvard para un examen botánico, pero cuando las muestras llegaron estaban demasiado deterioradas para una correcta identificación<sup>(4,7,8,9)</sup>.

Las muestras habían sido recibidas en Harvard por el etnobotánico Richard Evan Schultes. Schultes rápidamente se convirtió en un defensor de que el término *Teonanácatl* se refería de hecho a los hongos y, en la *Revista del Museo Botánico de Harvard* de Abril de 1937 argumentó en contra de las conclusiones de Safford e insistió en realizar una investigación más profunda para identificar los hongos.



En 1938, Schultes y Reko viajaron a México y, después de escuchar relatos sobre veladas Mazatecas que se hacían cerca de Huatla de Jiménez, en el nordeste de Oaxaca, recolectaron algunos ejemplares de *Panaeolus sphinctrinus*, de los cuales se cuenta que son la principal especie usada por los Mazatecos. También recogieron ejemplares de *Psilocybe cubensis*, *Psilocybe caerulescens*, y posiblemente unos pocos de la especie *Psilocybe mexicana*, todos estos fueron depositados en el herbario de Harvard<sup>(8)</sup>. Aunque la especie *Panaeolus sphinctrinus* se clasificó como psicoactiva, solamente dos análisis han detectado alcaloides indólicos en la especie, mientras que cientos de análisis no han detectado en absoluto la presencia de sustancias psicoactivas. Los hongos que fueron examinados eran, probablemente, una mezcla de varias especies clasificada como una sola<sup>(4)</sup>.

Las investigaciones de Schultes y Reko llegaron a su fin durante la 2ª Guerra Mundial, y poco más se avanzó hasta principios de los años 50, cuando el micólogo aficionado Robert Gordon Wasson y su esposa Valentina Povolnova, se interesaron por el uso tradicional de hongos en México. En 1953, Wasson y un pequeño grupo viajaron a Huatla de Jiménez y asistieron a una ceremonia, conducida por un chamán llamado Don Aurelio, que duró toda la noche. Otros dos viajes posteriores a México le permitieron conocer a la curandera Mazateca María Sabina, que el 29 de Junio de 1955, durante la "velada" donde serían iniciados en el uso de los hongos visionarios, le proporcionó a Wasson y su compañero, el fotógrafo Allan Richardson, unos ejemplares de *Psilocybe caerulescens*. El conocimiento de este tipo de hongos fue rescatado del olvido gracias a los esfuerzos combinados de un grupo de pioneros, encabezado por el propio Wasson y su esposa Valentina, el botánico Richard Evans Schultes y el etnobotánico Blas Pablo Reko<sup>(9)</sup>. En 1957, el micólogo francés Roger Heim, colaborador y amigo de Wasson, logró cultivar con éxito ejemplares de *Psilocybe mexicana* en su laboratorio, y una parte de los mismos fue enviada a Albert Hofmann, quien en un breve espacio de tiempo logró aislar y sintetizar los alcaloides indólicos psilocibina y psilocina, responsables de los efectos psicoactivos de los hongos mexicanos. La publicación en la revista Life, el 13 de mayo de 1957, del artículo de R. Gordon Wasson titulado "En busca del hongo mágico", trajo como consecuencia un creciente interés por los hongos visionarios y la expansión del uso de los mismos en la sociedad occidental. Comenzó la experimentación tanto con hongos como con sustancias sintéticas y los "hongos mágicos" formaron, inmediatamente, parte del movimiento psicodélico de los años 60<sup>(10)</sup>.

Una segunda generación de etnomicólogos, entre los que destacan Jonathan Ott, Jeremy Bigwood, Terence McKenna, Andrew Weil, Jochen Gartz, Giorgio Samonni y Paul Stamets recogieron el conocimiento dejado por Wasson y empezaron a desentrañar el misterio que aún rodeaba a los hongos alucinógenos. El desarrollo de las investigaciones en este campo permitió constatar la presencia de hongos psilocibicos en prácticamente todas las regiones del mundo. El uso de los mismos a lo largo de la historia se ha revelado evidente tras el descubrimiento de motivos artísticos que señalan la presencia de un uso de estos hongos en culturas de diferente tiempo y lugar: Tassili (Argelia), Kerala (India) y la Europa Medieval. Nos encontramos sin duda ante una de las sustancias visionarias que más ha influido en la cultura humana, y responsable para algunos- de la génesis de las religiones<sup>(4)</sup>.

### 3.3.2. HONGOS DE PROCEDENCIA

El nombre del género *Psilocybe* proviene de los vocablos griegos "psilos" (pelado, desnudo) y "kube" (cabeza), que transformado al latín moderno adoptó la forma "*Psilocybe*". Traducido literalmente significa "cabeza pelada", lo más seguro es que se refiera a su apariencia. Los componentes más psicoactivos que se encuentran en los hongos del género *Psilocybe* son la psilocibina y la psilocina. La ortografía original en griego de estas palabras es "psilocibin" y "psilocin" mientras que en latín es "psilocibyne" y "psilocine". Ambas ortografías se usan indistintamente. Los vocablos latinos se usan principalmente en Europa, mientras que los eruditos prefieren las palabras griegas<sup>(9)</sup>.



Los hongos *Psilocybe cubensis*, *Psilocybe caerulescens* y *Psilocybe mexicana* son los más característicos de género *Psilocybe* que contienen psilocibina aunque también ha sido encontrada en otras especies como *P. candidipes*, *P. semilanceata*<sup>(11)</sup> y *P. Aztecorum*.

Otros géneros de hongos en los que ha sido encontrada esta sustancia son los del género *Conocybe* y *Stropharia cubensis*<sup>(12)</sup>.

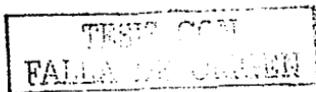
Los géneros anteriores de hongos se caracterizan porque en ellos la seta es el órgano sexual responsable de la reproducción, es decir, que la seta no es todo el hongo en sí, sino solamente una parte muy importante. El resto del hongo está formado por un conjunto de hebras que se encuentran en el sub suelo cerca de la seta. El conjunto de estas fibras que parecen raíces pero no lo son, reciben el nombre de micelio y constituye el verdadero cuerpo del hongo<sup>(4)</sup>.

El ciclo vital comienza cuando se desprende una espora del sombrerillo y cae sobre la superficie de la tierra. Si las condiciones ambientales (temperatura, humedad) y de substrato (calidad y composición del medio) son las adecuadas la espora desarrollara unos filamentos conocidos con el nombre de hifas cuya misión es establecer una anastomosis (unión) con otra hifa de otra espora que sea compatible. Esta unión tiene como fin conseguir una carga cromosómica completa (diploide) ya que cada hifa de cada espora tiene la mitad de carga genética (haploide) necesaria para reproducirse. A partir de que se establece la carga completa, el micelio se desarrollará hasta que fructifique y recomience el ciclo de nuevo. Puede ocurrir que las condiciones generales no sean muy buenas para la fructificación y el micelio puede seguir otra estrategia que es la de mantenerse en estado de latencia a la espera de unas mejores condiciones. Esto da pie a que algunas variedades como por ejemplo la *Psilocybe tampanensis*, en situaciones adversas forme lo que se conoce con el nombre de esclerocios (masa densa de micelio)<sup>(13)</sup>.

El ciclo vital completo de los hongos contenedores que contienen psilocibina puede oscilar entre 40 y 60 días por término medio<sup>(4)</sup>. A continuación se muestran algunos de los hongos más utilizados por contener psilocibina.



Fotografía 1. *Psilocibe semilanceata*.





**Fotografia 2. Stropharia cubensis.**



**Fotografia 3. Psilocibe mexicana.**



**Fotografia 4. Psilocibe wasonni.**

TRINIS CON  
FALLER UN COLLETTOR

### 3.3.3. LOS COMPONENTES ACTIVOS

La psilocibina (4-fosforiloxi-N,N-dimetiltriptamina) y la psilocina (4-hidroxi-N,N-dimetiltriptamina) fueron consideradas las sustancias únicas causantes de la embriaguez fúngica, hasta que en 1968 se aislaron dos análogos de la psilocibina, la baeocistina y la norbaeocistina, con propiedades similares a las anteriores<sup>(14,15,16,17,18)</sup>. Un nuevo alcaloide, la aeruginascina, ha sido hallado recientemente por Jochen Gartz a partir del *Inocybe aeruginascina*<sup>(19)</sup> y es responsable, según este investigador, de un aumento de los efectos eufóricos<sup>(20)</sup>. Aproximadamente un centenar de especies de hongos contienen este tipo de sustancias, con lo que se puede decir, como señala Jonathan Ott, que se trata de las toxinas más extendidas en el mundo fúngico. El contenido de sustancias activas alucinógenas de hongos es muy variable, dependiendo fundamentalmente de la especie de que se trate y de las condiciones particulares en las que se desarrolló (substrato, temperatura, etc.). En ocasiones, se observan variaciones de contenido en alcaloides muy elevadas, incluso dentro de ejemplares de la misma especie que han crecido en las mismas condiciones ambientales<sup>(14,18)</sup>.

Figura 1. Estructura de la psilocibina.

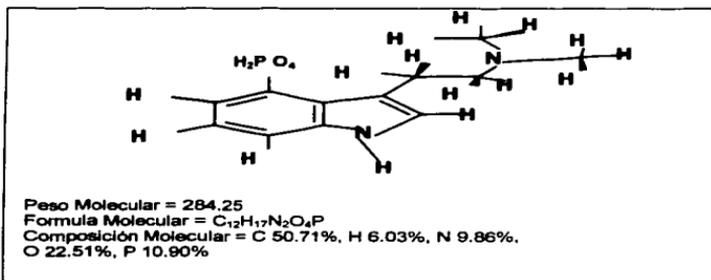


Figura 2. Estructura de la psilocina.

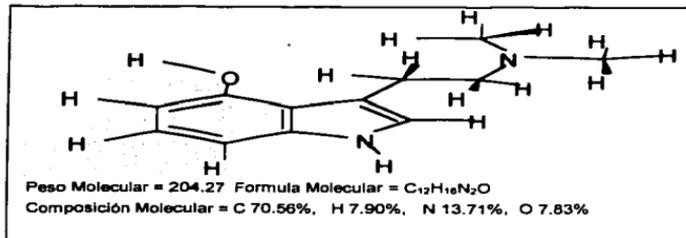


Figura 3. Estructura de la baecocistina.

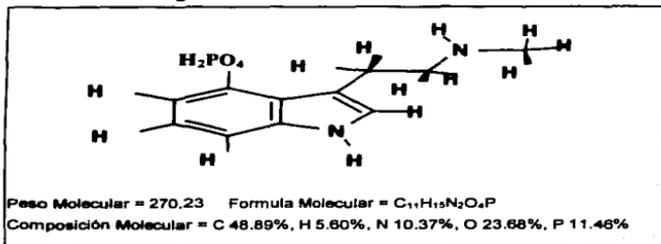
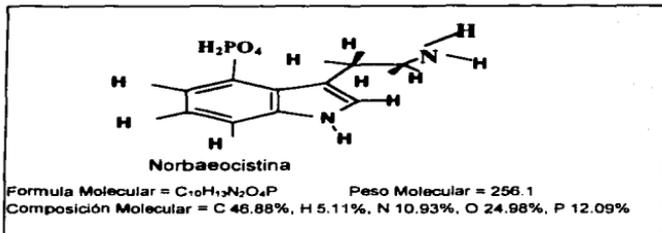


Figura 4. Estructura de la norbaecocistina.



Como se observa en las estructuras la baecocistina y norbaecocistina son simplemente psilocibina con uno y dos grupos metilo respectivamente. Cuando la baecocistina y norbaecocistina se desfosforizan se convierten respectivamente en 4-hidroxi-N-metiltryptamina y 4-hidroxitryptamina. Se cree que estas cuatro sustancias son alucinógenas, aunque algunos sospechan que lo son en menor medida que la psilocibina y psilocina<sup>(17,18)</sup>. Dato curioso es que aunque la baecocistina y norbaecocistina no tienen un número de control de la DEA, ambas están recogidas en el Acta de Sustancias Controladas (Controlled Substance Analogue Act)<sup>(9)</sup>.

La baecocistina y norbaecocistina generalmente se presentan en menor proporción que la psilocibina y psilocina, si es que se presentan. Parece que se ha trabajado muy poco con estas sustancias ("Chemical Abstracts" suele publicar acerca de ellas una cita al año). Se ha especulado con una posible relación entre el contenido de baecocistina y las náuseas, pero de momento un bioensayo sugiere que los efectos son similares a los que producen la psilocibina y psilocina<sup>(8)</sup>.

TESIS COM  
FALLA DE ORIGEN

### 3.3.4. METABOLISMO Y DOSIFICACION

Como derivado de la triptamina, la psilocibina se encuentra estrechamente relacionada con varias sustancias de estructura indólica que también presentan actividad farmacológica semejante<sup>(19)</sup>. Se han observado pequeñas cantidades de dimetil triptamina (DMT) en algunos hongos psicótrópicos, pero dado que la DMT no es activa oralmente si no se combina con un IMAO (Inhibidor de la Monoamida Oxidasa) es bastante difícil que se note su efecto. Las aminas alcaloides son los derivados de la triptamina, esta es fisiológicamente inactiva; pero se sabe que la familia de las N,N alquil triptaminas tiene propiedades alucinógenas, por ejemplo la DMT, la cual se encuentra en la naturaleza en varias especies de plantas que crecen en Sudamérica, al combinarse con un IMAO es un alucinógeno de corta duración ya que su acción es de 40 a 50 minutos<sup>(20)</sup>.

Sintéticamente se produce la DET (dietil triptamina) cuya acción es similar a la DMT, pero los síntomas duran aproximadamente 2 horas y media. Se ha llegado a sintetizar hasta la dihexil triptamina, sin embargo su actividad fisiológica decrece a partir de la dipropil triptamina y la dihexil triptamina se considera inactiva<sup>(20)</sup>.

La DMT también se encuentra en ciertos hongos pequeños de especies como: *Psilocybe mexicana* y *Conocybe cyanopus*; una característica de los miembros activos de estas especies es que tienen una coloración pardusca pero se observan claramente manchas azuladas a moradas, especialmente cerca de la base del estipe, que se forman cuando el tejido se lesiona o envejece. Los estudios químicos revelan que los principales principios activos de estos hongos son la psilocina y la psilocibina<sup>(21)</sup>.



Fotografía 5. Es muy característico que en hongos psicótrópicos se presente una coloración morada al producirse un daño superficial.

La dosis umbral de psilocibina oscila entre 2 y 4 miligramos, por encima de 5 miligramos se considera que comienzan los efectos enteogénicos, y a pesar de que la dosis máxima segura se ha establecido en 150 miligramos, dosis superiores a 50 miligramos no se consideran recomendables. Para algunos autores, una medida adecuada se situaría en torno a unos 0,25 miligramos por kilogramo. Dosis de psilocibina de 1 a 2 mg por vía oral o 3 a 6 mg vía subcutánea producen euforia después de 15 a 30 minutos, y después de 3 a 5 horas en algunos casos se presentan síntomas depresivos<sup>(21)</sup>. Estas consideraciones son de escaso valor para el usuario medio, que incapaz de obtener la psilocibina y sus análogos de forma sintética, se ve obligado a consumir en ocasiones hongos de dudosa procedencia.

Las condiciones de almacenamiento influyen notablemente en la potencia de los hongos, sobre todo en aquellos donde la psilocina aparece como principal alcaloide; el *Psilocybe cubensis*, probablemente el hongo psicoactivo más cultivado del mundo, es un ejemplo de esto último<sup>(22)</sup>.

TRATADO DE  
FALLA DE

La psilocibina, la psilocina y los hongos *Psilocybe* en general, tienen una toxicidad muy baja, en pruebas con ratas dosis de más de 200 mg de psilocibina pura por kilogramo de peso se han administrado intravenosamente sin efectos letales (lo que serían alrededor de 13 gramos de psilocibina pura para un sujeto medio de unos - 65 kgs/140 lbs -). La relación entre ED50 . LD50 es 64:1, de acuerdo con el Registro de Efectos Tóxicos del NIOSH; algunos ejemplos serían 9637 para la vitamina A, 4816 para la LSD, 199 para la aspirina y 21 para la nicotina. De acuerdo con Leo Hollister, Jonathan Ott y John Allen, uno debería ingerir su propio peso de hongos frescos o aproximadamente 19 gramos de la sustancia pura para alcanzar la muerte. Si la identificación de los hongos *psilocybe* es correcta el envenenamiento nunca se producirá<sup>(8)</sup>.

Los hongos secos contienen de un 0.2 a un 0.4% de psilocibina por término medio en hongos *Psilocybe*, la psilocina, el otro componente psicoactivo solo aparece en trazas<sup>(23)</sup>.

Se ha hablado mucho sobre el mal viaje de estas sustancias (pánico, confusión, depresión) y es algo que no se puede negar. El mal viaje está más ligado a problemas emocionales preexistentes, a la actitud de quien la consume y al ambiente que rodea a la persona. El tratamiento en estos casos pasa por proteger al individuo de conductas que puedan conllevar o producir lesiones físicas. A veces basta con un ambiente estructurado que dé seguridad y apoyo hasta que se metaboliza la sustancia para que desaparezcan los problemas. En casos graves se utiliza a nivel hospitalario las benzodiacepinas (Valium, Diazepam), para reducir los efectos indeseables. Dosis de 5 a 10 miligramos suelen ser suficientes para frenar un mal viaje<sup>(24)</sup>.

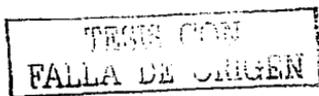
La psilocibina fue propuesta como medicamento de uso psiquiátrico con el nombre comercial de Indocin al igual que la LSD-25 que se comercializó con el nombre de Delysid. Por motivos ajenos a la investigación médica (campaña política desinformativa), se paralizaron los estudios clínicos que se estaban realizando cerrando la puerta a su posible uso en psiquiatría. Actualmente se está investigando con estas sustancias sobre todo en el campo de la psicoterapia, desde enfoques diferentes<sup>(25)</sup>.

Ambas son muy similares al neurotransmisor serotonina. El cómo actúan estas sustancias esta todavía muy confuso, aunque parece que el efecto principal consiste en la inhibición de la serotonina (5-Hidroxi-triptamina o bien 5-HT). Así es como actualmente se cree que actúa la LSD-25 y seguramente se cumpla también para la psilocibina. Estas sustancias también presentan lo que se conoce como tolerancia cruzada<sup>(25,26)</sup>.

Los efectos de la psilocibina se pueden potenciar si se toman con un IMAO como la harmalina o harmalina, las cuales se encuentran en la planta llamada *Peganum harmala* (Syrian Rue). Esta combinación duplica aproximadamente la potencia de los hongos de acuerdo con la mayoría de las referencias. Es necesario ser extremadamente cuidadosos cuando se combinen IMAO's y triptaminas. Cuando se usen IMAO's no reversibles o grandes cantidades de IMAO's reversibles, hay un número de sustancias que deben evitarse para prevenir una crisis de hipertensión<sup>(8)</sup>.

### 3.3.5. QUÍMICA

Los Principios activos principales de los hongos del género *Psilocybe* son la psilocibina y la psilocina y en menor grado la Baecocistina y la Norbaecocistina. La proporción entre la psilocibina y la psilocina varía de unas especies a otras. La principal diferencia entre ambos compuestos es que la psilocina es inestable y se pierde cuando se secan los hongos, en cambio la psilocibina se mantiene más tiempo<sup>(27)</sup>. Las dos son igualmente psicoactivas debido a que una molécula de psilocina se transforma en una molécula de psilocibina, pero si las analizamos en función de su peso molecular, tenemos que:



Peso molecular de la psilocibina = 284.3

Peso Molecular de la psilocina = 204.3

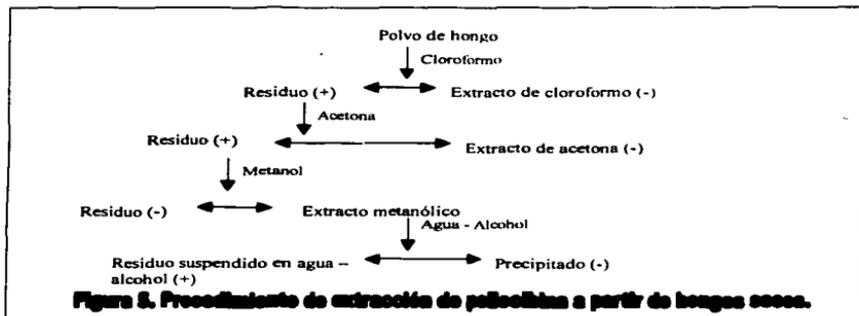
Por lo tanto, en función del peso la psilocibina es aproximadamente 1.4 veces más potente que la psilocina. La fórmula para calcular la potencia total, ignorando [nor] Baecocistina, es

(psilocibina) + (1.4 \* psilocina) = potencia total en "unidades de psilocibina"

La psilocibina resulto ser el primer compuesto de combinación indol fosforilado encontrado en la naturaleza y como lo indica su formula está constituido por la 4 - oxí dimetil triptamina fosforilada. Por hidrólisis se desdobla en ácido fosfórico y psilocina, la que como ya se mencionó se encuentra también en los hongos, aunque en proporciones mínimas. Por la preparación sintética de cantidades suficientes de esta última ha sido posible aclarar la importancia de la fosforilación. Una vez ingerida, el radical grupo fosfórico es eliminado ("desfosforizado") por la enzima "fosfatasa alcalina", convirtiéndola en psilocina. Se piensa que el grupo fosfato ejerce principalmente una función protectora estabilizante, que explicaría la estabilidad considerablemente mayor de la psilocibina, en relación con el producto de su desfosforilación<sup>(27)</sup>.

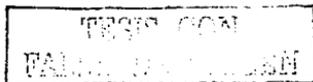
Tanto la psilocibina como la psilocina pertenecen a la familia de las triptaminas (indol C<sub>8</sub>H<sub>7</sub>N y parte de la cadena etilamina). La psilocibina es soluble en 20 partes de agua, en 120 partes de metanol, en ebullición y difícilmente soluble en etanol, mientras que la psilocina es muy poco hidrosoluble, además la psilocibina es prácticamente insoluble en cloroformo y benceno<sup>(28)</sup>.

A. Hofmann cultivó hongos de la especie P. mexicana, estos hongos fueron secados y pulverizados, extrayendo el principio activo como se muestra en el diagrama



**Figura 8. Procedimiento de extracción de psilocibina a partir de hongos secos.**

La extracción se hizo también usando metanol. El extracto metanólico se trató en el siguiente orden: con éter de petróleo, cloroformo y cloroformo etanol, y las impurezas sólidas se eliminan por disolución en pequeñas cantidades de agua. Por último se trató con etanol absoluto.



El extracto se evaporó al vacío y el residuo se disolvió en agua saturada con butanol y se cromatografió en una columna de celulosa. De esta cromatografía la fracción interesante fue la segunda; de donde se obtuvo un polvo amorfo que por tratamiento con carbonato de plata y ácido sulfhídrico, dio la sustancia activa psilocibina que se cristalizó en solución acuosa con rendimiento de 0.4 % basado en el producto seco<sup>(29)</sup>.

De los cuerpos de *P. mexicana* cultivados en el laboratorio A. Hofmann, R. Heim y colaboradores obtuvieron 250 g de material fresco que al secarse con corrientes de aire caliente a 40° C, dio lugar a 54 gramos de hongos secos, los cuales se molieron finalmente a temperatura ambiente, se agitaron una vez con 600 mL y tres veces con 300 mL de metanol; el residuo se evaporó al vacío quedando 12 gramos de sólido que después se molió y se extrajo cuatro veces con 250 mL cada vez de éter de petróleo, en seguida dos veces con 10 mL cada vez de alcohol y después con cloroformo. Con esto se eliminaron 3.6 gramos de compuestos inactivos. Los 8.6 gramos que quedaron del residuo y que presentan actividad, se extrajeron con 60 mL de metanol obteniéndose así los agentes activos. La parte insoluble dio color con el reactivo de Sélter, usado para la identificación de compuestos indólicos (cloruro férrico, ácido acético y ácido sulfúrico concentrado)<sup>(29)</sup>.

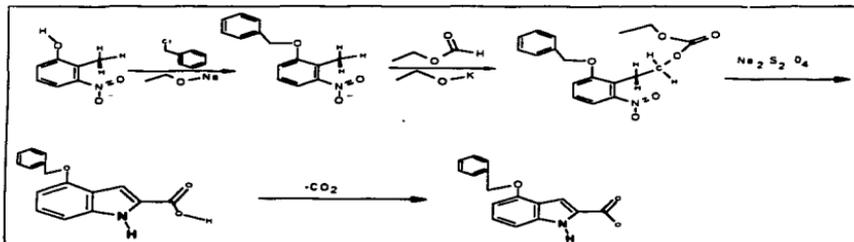
Los extractos metanólicos se cromatografiaron en una columna de celulosa y se eluyeron con butanol saturado de agua recogiendo porciones de 10 mL que se probaron con reactivo de Keller, separándose las fracciones que dieron reacción positiva, en las que después se investigó la presencia de psilocibina y psilocina<sup>(29)</sup>.

### 3.3.6. SÍNTESIS DE PSILOCIBINA

Por las reacciones de degradación y el análisis elemental efectuado para aclarar la fórmula estructural de la psilocibina, se dedujo fácilmente el camino a seguir para sintetizarla<sup>(30)</sup>.

Se parte de 4 benciloxi indol, el cuál había sido obtenido por stoll, Hofmann y colaboradores al preparar compuestos oxitriptamínicos, partiendo de 2 nitro 6 hidroxí tolueno según la figura 6.

Figura 6. Procedimiento de síntesis de psilocibina en el laboratorio, primera parte.



Por transposición con cloruro de oxalilo se obtuvo el cloruro del ácido (4 benciloxi 3 indolil) glioxílico que no se aisló sino que se hizo reaccionar con dimetil amina dando la dimetilamina del ácido (4 benciloxi 3 indolil) glioxílico. A partir de esta última se redujeron los grupos carbonilo con tetrahidruro de litio aluminio obteniéndose así, 4 benciloxi N,N dimetil triptamina de la cual se eliminó el grupo bencilóico mediante una reducción con ayuda de catalizador de paladio con lo que se obtuvo 4 hidroxil N,N dimetil triptamina (psilocina).

La fosforilación de psicocina a psicocibina se hizo a través del compuesto dibencilico que se obtuvo por transposición de la sal de sodio con cloruro de di dibencil fosforilo.

Después de eliminar por hidrogenación con hidrógeno / paladio los grupos bencilo en VII, se llegó a la 4 fosforiloxi N,N dimetil triptamina (I). Este producto coincidió en todas sus propiedades con la psicocibina natural.

A continuación se describirá de manera somera la síntesis de cada uno de los compuestos<sup>(20, 21)</sup>.

Síntesis de la dimetil amida del ácido (4 benciloxi 3 indolil) glioxílico (V): se preparó una solución de 4 benciloxi indol en éter seco y se le goteó cloruro de oxalilo, bajo agitación constante y a una temperatura de 0 a 5° C. Una vez terminada la adición se agita la mezcla (rojo-naranja) por una hora a la misma temperatura.

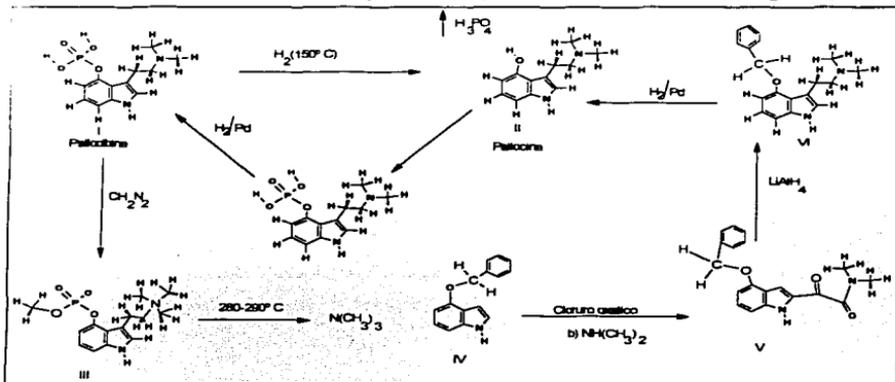
Se enfría con hielo y sal y se adiciona por goteo una solución de dimetilamina en éter; una vez terminada la adición se agitó media hora a temperatura ambiente.

El precipitado se lavó con éter y después con mucha agua, el producto se secó al vacío y se recrystalizó con éter de petróleo dando un producto con punto de fusión de 146-150° C y un rendimiento del 73%.

4. Benciloxi N,N dimetil triptamina (VI): una solución del compuesto V en dioxano absoluto se goteó bajo fuerte agitación en una solución a ebullición en tetrahidruro de litio aluminio en el mismo disolvente y se agitó durante 17 horas a la misma temperatura.

Después se obtuvieron el complejo y el medio reductor mediante el enfriamiento con hielo y con la adición de metanol.

**Figura 7. Procedimiento de síntesis de precursores psicocibina en el laboratorio, segunda parte.**



Se agregó una solución saturada de sulfato de sodio; el precipitado se filtró y se lavó con metanol y dioxano. El filtrado se puso a pH ácido y se separaron subproductos por extracción con éter. De aquí se obtuvo el producto de reacción básico mediante la alcalinización con hidróxido de sodio en cloroformo. Al extracto se le agregó potasa, se secó a un volumen muy pequeño y se obtuvo con extracto de cloroformo, cristalizando VI, por la adición de éter de petróleo VI cristaliza en forma de agujas delgadas con punto de fusión 125-126° C y rendimiento en la primera cristalización del 68%. Por cromatografía de las aguas madres en trióxido de aluminio, usando como eluyente benceno con 0,2% de alcohol, se obtuvo un 20% más del producto, con lo que se logró un rendimiento total del 88%.

4 hidroxil N,N dimetil triptamina (psilocina): a una solución de VI en metanol se le agregó una mezcla al 5% de catalizador de paladio en trióxido de aluminio y se agitó durante 12 horas en atmósfera de hidrógeno. La solución se separó del catalizador por filtración y se concentró a un volumen pequeño cristalizando II en placas hexagonales con punto de fusión 173-176° C y un rendimiento del 81%.

La sustancia sintética coincide con la natural en todas sus propiedades; los espectros infrarrojos son iguales.

4 dibencil fosforiloxi N,N dimetil triptamina VII: se disolvió II en una solución metanólica de hidróxido de sodio 1N, la solución se evaporó a sequedad en atmósfera de nitrógeno y el residuo se secó 3 horas al alto vacío a 40° C; éste se disolvió con ácido teramilico. Se adicionó una solución de dibencilfosforilo en tetracloruro de carbono, preparado a partir de dibencilfosfito, se agitó dos horas a temperatura ambiente, se evaporó a sequedad y al residuo se le agregó cloroformo-alcohol 9:1; se filtró para eliminar el cloruro de sodio formado y el filtrado se cromatografió en una columna de trióxido de aluminio eluyéndose con la misma mezcla de disolventes. Se recrystalizó en cloroformo-alcohol obteniéndose el producto VII con punto de fusión 238-240° C.

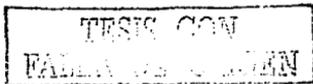
Psilocibina (I). Una solución de VII en metanol se agitó en una atmósfera de hidrógeno, después de agregar paladio en trióxido de aluminio. El residuo de la evaporación liberado del catalizador se recibió en agua y los productos no disueltos se filtraron. La solución acuosa se volvió a evaporar a sequedad y el residuo se evaporó en un poco de metanol separándose I en finos prismas con punto de fusión 220-228° C con un rendimiento del 42%. La reacción de Keller dio coloración violeta. El producto sintético coincidió en sus propiedades con el natural y los espectros de infrarrojo fueron idénticos.

### 3.3.7. BIOSÍNTESIS DE PSILOCIBINA

Para llevar a cabo el estudio de la biosíntesis de la psilocibina se hicieron investigaciones con compuestos marcados que se suponía podían ser precursores. Para esto se desarrolló un cultivo de *Psilocybe semperviva* en medio nutriente que contenía D L triptofano marcado y la psilocibina aislada fue radiactiva<sup>(32)</sup> por lo que se deduce que hay una relación bioenergética entre el triptofano y la psilocibina.

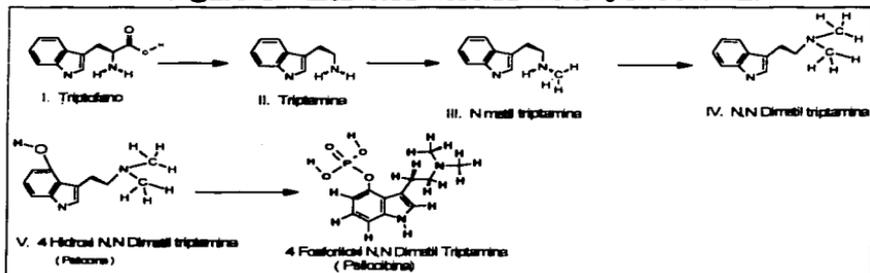
En *Psilocybe cubensis* se incorporó D L triptofano y triptamina marcados, siendo un precursor más eficiente la triptamina, a pesar de que se presume que solo el L triptofano a triptamina puede ser el paso inicial en la síntesis de psilocibina<sup>(33)</sup>.

Dado que la psilocibina como la psilocina son compuestos íntimamente relacionados con indoles 4 hidroxilados y se supone que la psilocibina puede derivarse biosintéticamente de triptofano y triptamina, se deduce que la molécula de triptofano requiere de las siguientes modificaciones, en orden definitivo o alternativo, para su conversión a psilocibina: descarboxilación, metilación, hidroxilación y fosforilación<sup>(34,35)</sup>.



Se obtuvieron resultados experimentales consistentes en la secuencia biosintética de psilocibina en cultivos de *Psilocybe cubensis*<sup>(33)</sup> y *Psilocybe semperiviva*<sup>(32)</sup> que se muestran en el esquema siguiente:

**Figura 8. Ruta biosintética de la psilocibina.**



Este y otros caminos han sido estudiados previamente con técnicas conocidas, investigando la incorporación de deuterio en intermediarios hipotéticos marcados de la psilocibina en cultivos de *Psilocybe cubensis*<sup>(33)</sup>.

### 3.4. MARCO LEGAL

La Ley General de Salud es muy clara de acuerdo con su CAPITULO IV, en el que se indica que la Secretaría de Salud elaborará un programa nacional contra la farmacodependencia y lo ejecutará en coordinación con dependencias y entidades del sector salud y con los gobiernos de las entidades federativas en el Artículo 192, indicándonos además en el Artículo 191 que la Secretaría de Salud y el Consejo de Salubridad General, en el ámbito de sus respectivas competencias, se coordinarán para la ejecución del programa contra la farmacodependencia, a través de las siguientes acciones:

I. La prevención y el tratamiento de la farmacodependencia y, en su caso, la rehabilitación de los farmacodependientes;

II. La educación sobre los efectos del uso de estupefacientes, sustancias psicotrópicas y otras susceptibles de producir dependencia, así como sus consecuencias en las relaciones sociales y por último

III. La educación e instrucción a la familia y a la comunidad sobre la forma de reconocer los síntomas de la farmacodependencia y adoptar las medidas oportunas para su prevención y tratamiento<sup>(15)</sup>.

La Ley General de Salud establece que los hongos que producen efectos alucinógenos deben ser sujetos a control y clasifica las sustancias activas en el grupo de los psicotrópicos de acuerdo con su Capítulo VI y siendo para los efectos de esta Ley, que se consideran sustancias psicotrópicas las señaladas en el Artículo 245 de este ordenamiento y aquellas que determine específicamente el Consejo de Salubridad General o la Secretaría de Salud.

En el Artículo 245 se indica que, en relación con las medidas de control y vigilancia que deberán adoptar las autoridades sanitarias, las sustancias psicotrópicas se clasifican en cinco grupos de los cuales para nuestro interés se indica únicamente el Grupo I de las consideradas de valor terapéutico escaso o nulo y que, por ser susceptibles de uso indebido o abuso, constituyen un problema especialmente grave para la salud pública y a saber:

- Las especies *Psilocybe mexicana*, *Stropharia cubensis* y *Strophana conocybe* así como sus principios activos. Hongos alucinantes que contengan Fosfato dihidrogenado de Psilocibina, cualquier variedad botánica 3-(2-dimetil-aminoetil)- en especial indol-4-ilo.
- Psilocina 3-(2-dimetilaminoetil)-4-hidroxi-indol.

De acuerdo con el Artículo 248, queda prohibido todo uso, ya sea: siembra, cultivo, cosecha, elaboración, preparación, acondicionamiento, adquisición, posesión, comercio, transporte en cualquier forma, prescripción médica, suministro, empleo, uso, consumo y en general, todo acto relacionado con sustancias psicotrópicas o cualquier producto que los contenga.

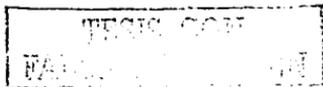
Solamente de acuerdo con el Artículo 249 para fines de investigación científica, la Secretaría de Salud podrá autorizar la adquisición de las sustancias psicotrópicas a que se refiere la fracción I del Artículo 245 de esta Ley, para ser entregadas bajo control a organismos o instituciones que hayan presentado protocolo de investigación autorizado por aquella dependencia, los que a su vez comunicarán a la citada Secretaría el resultado de las investigaciones efectuadas y cómo se utilizaron<sup>(27)</sup>.

La República Mexicana ha firmado una serie de acuerdos internacionales que le obligan a prohibir todas las sustancias que la Organización Mundial de la Salud considere objeto de control internacional, no obstante, no existe una sola ley dentro del territorio nacional que castigue el consumo de sustancias ilegales; por el contrario, el Artículo 195 del Código Penal señala que: "No se procederá en contra de quien, no siendo farmacodependiente se le encuentre en posesión de alguno de los narcóticos señalados en el artículo 193, por una sola vez y en cantidad tal que pueda presumirse que está destinada a su consumo personal"<sup>(28)</sup>.

Por su parte el Artículo 199 del mismo código establece: "Al farmacodependiente que posea para su estricto consumo personal algún narcótico de los señalados en el artículo 193 no se le aplicará pena alguna". Así pues, tanto farmacodependientes como no farmacodependientes están protegidos por la ley en cuanto al consumo y a la posesión de pequeñas cantidades. La posesión de cantidades mayores a las que se explicitan en las tablas anexas al Código Penal se castiga con diversas penas puesto que eso case ya dentro del delito tipificado como tráfico de narcóticos (para la legislación mexicana, un narcótico no es sólo una sustancia que deprima el sistema nervioso central, sino cualquier sustancia prohibida)<sup>(29)</sup>.

Además del tráfico, lo que se castiga en nuestro país es la producción, (esto es, la manufactura, fabricación, elaboración, preparación o acondicionamiento de algún narcótico), el transporte, el tráfico, el suministro gratuito, la prescripción y el comercio (esto es, vender, comprar, adquirir o enajenar algún narcótico). También se imponen penas a quienes aporten recursos o colaboren financieramente en los delitos anteriores, a quienes siembren o permitan que se siembre en terrenos de su posesión alguna planta cuyo alcaloide esté prohibido y realicen actos de publicidad o propaganda para favorecer el consumo de narcóticos<sup>(30)</sup>.

Por todo lo anterior es muy claro que es necesario que se puntualice en la legislación nacional sobre cuál es la cantidad de sustancia considerada como de consumo personal ya que al no estar bien especificada, pudiera llegar a suceder que un individuo sea considerado como narcotraficante por lo que podría pasar un largo tiempo encerrado en prisión por el hecho de portar sustancias consideradas como ilegales siendo que pudiera ser el caso de que este individuo solo necesite de ayuda para superar algún problema de adicciones. Es muy claro también con este ejemplo la importancia de llevar a cabo una análisis cuantitativo muy preciso sobre las sustancias de este tipo.



### 3.5. ASPECTOS BIOQUÍMICOS DE LAS INTOXICACIONES

Ante un paciente con signos de intoxicación es necesaria una actuación coordinada y armoniosa del equipo de salud; se debe considerar la información disponible sobre la etiología (causas accidentales, iatrogénicas, suicidas) y factores como edad, ocupación, vía de entrada, grado y tipo de los síntomas, para proceder a la búsqueda del agente causante, que en principio estaría orientada hacia las sustancias más frecuentes en nuestro medio, como etanol, monóxido de carbono, salicilatos, metanol, fármacos psicoactivos y drogas de abuso (cocaína, marihuana).

Para un correcto estudio de la situación, el profesional debería tener en cuenta no sólo las acciones de los tóxicos sino la cinética en el organismo, es decir, cómo es la absorción por la vía involucrada, el metabolismo, cómo se elimina, cómo es la distribución tisular, a qué proteínas se liga; el conocimiento de todos estos aspectos es necesario para la discusión del caso con el profesional médico actuante y el establecimiento de la factibilidad de realización del análisis.

La tarea del laboratorio no acaba en la identificación del agente etiológico; dado que la causa de decesos más común de los pacientes intoxicados es la depresión del Sistema Nervioso Central con las consecuencias cardiopulmonares asociadas, como acidosis respiratorias, con hipoxias e hipercapnias, es primordial vigilar el medio interno y controlar la evolución de los parámetros hematológicos y renales. Posteriormente en el tratamiento es importante monitorear el empleo de los antidotos específicos, como quelantes para metales, atropina para organofosforados, valium en el caso de alucinógenos, oxigenación para monóxido de carbono, oxigenación y terapia de nitritos para cianuro.

### 3.6. ANÁLISIS DE DROGAS DE ABUSO

De manera general los análisis de drogas en matrices biológicas y no biológicas por parte de los laboratorios especializados en el ámbito legal tiene esencialmente dos objetivos fundamentales:

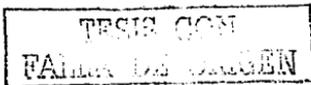
- Diagnóstico del consumo de una droga de abuso en el marco de un proceso judicial.
- Diagnóstico clínico en toxicología clínica y en tratamientos de rehabilitación.

Si en casi todas las emergencias clínicas es imprescindible el respaldo del laboratorio bioquímico, hay pocas situaciones donde el mismo sea más crítico que en las intoxicaciones agudas; en tales cuadros (caracterizados por un estado clínico grave en una persona sin antecedentes de enfermedad) es necesario conocer, en el menor tiempo posible, qué sustancia es la causante, cuál fue su vía de entrada al organismo, en qué cantidad, y cuánto tiempo transcurrió desde el contacto. Y aunque estos parámetros son usualmente evaluados por los laboratorios especializados en toxicología, las sustancias responsables de la gran mayoría de las intoxicaciones agudas pueden ser determinadas con técnicas susceptibles de ser implementadas en los laboratorios de los distintos efectores de la Secretaría de Salud. Tales técnicas, si bien no tienen la sensibilidad y especificidad analítica de aquellas de referencia, son lo suficientemente prácticas como para ser llevadas a cabo por el profesional bioquímico en el ámbito de una guardia y son perfectamente compatibles con el instrumental del que se dispone en los citados laboratorios pudiéndose, en muchos casos, aportar información cualitativa y cuantitativa de importante valor para el diagnóstico y tratamiento del paciente.

### MATERIALES DE ELECCIÓN PARA LA BÚSQUEDA DE TÓXICOS.

La muestra para el análisis toxicológico dependerá del tipo de tóxico sospechado, la vía de absorción, y si la intoxicación es aguda o crónica. Conviene tomarla apenas el paciente ingresa al servicio, para que los medicamentos y tratamientos que recibe no interfieran en el análisis.

La orina es ideal para hacer controles de exposición a sustancias, pero presenta el inconveniente de que sólo se podrán analizar aquellas que presenten (el tóxico original o más frecuentemente un metabolito del mismo) una vía de excreción renal. En ese caso, es suficiente con un volumen de 50 mL de orina, recogido sin conservadores y mantenido en refrigeración hasta su análisis.



El plasma / suero es la elección en muchas situaciones, ya que se encuentra presente el toxico de origen y su nivel está relacionado con el daño, aunque la interferencia por sustancias endógenas es mayor que en la orina. Dejando de lado la alcoholemia, se aconseja extraer 10 mL en un tubo con heparina y un volumen similar en uno seco.

El vómito y el contenido gástrico (sobre todo las primeras fracciones) son muy útiles para el análisis cualitativo, ya que no se encuentran metabolitos y, en el caso de los plaguicidas, el olor proporciona indicios de la sustancia en cuestión, pero sólo se pueden detectar aquellas sustancias que hayan ingresado por vía oral y no tengan una velocidad de absorción rápida, y hay que considerar las interferencias producidas por los alimentos ingeridos.

## TÉCNICAS ANALÍTICAS

Para determinar la cantidad de cualquier sustancia, no sólo de psicobina presente en una muestra biológica o en cualquier material, es recomendable y necesario llevar a cabo los análisis de identidad para comprobar que verdaderamente se trata de la sustancia que presuntamente se sospecha de acuerdo con el aspecto físico o los síntomas en el caso de intoxicaciones.

En el caso de que se sospeche de psicobina presente en alguna muestra, el análisis de mayor utilidad será la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, debido a que el compuesto cumple con las características requeridas para ser analizada por tal método, además de que se trata de un excelente método de separación y cuantificación de las sustancias contenidas en una mezcla.

## 3.7. CROMATOGRAFÍA

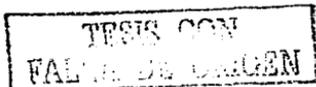
La cromatografía es un método en el cual los componentes de una mezcla son separados por un adsorbente en un sistema fluente. El sistema consta de: 1) Una columna que contiene un soporte fijo y adsorbente (fase estacionaria), 2) La muestra a separar y 3) Un eluyente que permite el movimiento descendente de la muestra en la columna ( fase móvil). La separación de los solutos depende de las interacciones con el adsorbente en la columna. Se ha demostrado que la Sílica es un adsorbente adecuado para cromatografía. Existen dos técnicas cromatográficas principales que se caracterizan por el tipo de fase móvil empleada: la cromatografía de flujo líquido y la cromatografía de flujo gaseoso (en adelante se verá únicamente la cromatografía de gases)<sup>(36,40)</sup>.

### 3.7.1. CROMATOGRAFÍA DE GASES

La Cromatografía de gases (CG) es una técnica utilizada para la separación y análisis de mezclas de sustancias volátiles. La muestra es vaporizada e introducida en un flujo de un gas apropiado denominado fase móvil (FM) o gas de arrastre. Este flujo de gas con la muestra vaporizada pasa por un tubo que contiene la fase estacionaria FE (columna cromatográfica), donde ocurre la separación de la mezcla.

La FE puede ser un sólido adsorbente (Cromatografía Gas-Sólido) o, más comúnmente, una película de un líquido poco volátil, soportado sobre un sólido inerte (Cromatografía Gas-Líquido con Columna Empaquetada o Rellenada). En la cromatografía gas-líquido (CGL), los dos factores que gobiernan la separación de los constituyentes de una muestra son:

- solubilidad en la FE: cuanto mayor es la solubilidad de un constituyente en la FE, éste avanza más lentamente por la columna.
- volatilidad: cuanto más volátil es la sustancia (o, en otros términos, cuanto mayor es la presión de vapor), mayor es su tendencia de permanecer vaporizada y más rápidamente avanza por el sistema<sup>(36)</sup>.



Las sustancias separadas salen de la columna disueltas en el gas de arrastre y pasan por un detector; dispositivo que genera una señal eléctrica proporcional a la cantidad del material eluido. El registro de esta señal en función del tiempo es el cromatograma, en donde las sustancias aparecen como picos con áreas proporcionales a sus masas, lo que posibilita el análisis cuantitativo<sup>(39,40,41)</sup>, ver figura 9.



### 3.7.2. CONSTITUYENTES DE UN CROMATÓGRAFO DE GASES

Los constituyentes básicos de un sistema cromatográfico son:

- Depósito del Gas de Arrastre. El gas de arrastre está contenido en cilindros de alta presión. Así, la elección del gas de arrastre es independiente de la muestra a ser separada. El parámetro más importante es su compatibilidad con el detector (algunos detectores trabajan mejor cuando se utilizan determinados gases). Los gases más usados son  $H_2$ , He y  $N_2$  y el flujo del gas de arrastre, que debe ser controlado, es constante durante el análisis.
- Sistema de Introducción de la muestra. En la CG, la sección del cromatógrafo donde es hecha la introducción de la muestra es el inyector (o vaporizador). En la versión más simple, se trata de una pieza de metal conectada a la columna cromatográfica y a la alimentación del gas de arrastre. Esta pieza contiene un orificio con un septo, generalmente de caucho de sílicona, por el cual las muestras líquidas o gaseosas pueden ser inyectadas con microjeringas. Las muestras sólidas pueden disolverse en un solvente apropiado. El inyector debe calentarse a una temperatura mayor del punto de ebullición de los componentes de la muestra, para que la muestra se volatilice completa e instantáneamente y sea introducida en la columna. Si la temperatura fuera excesivamente elevada, puede ocurrir la descomposición de la muestra. La muestra debe entrar en la columna en la forma de un segmento estrecho, para evitar alargamiento de los picos por lo que debe volatilizarse rápidamente<sup>(39,40,41)</sup>.

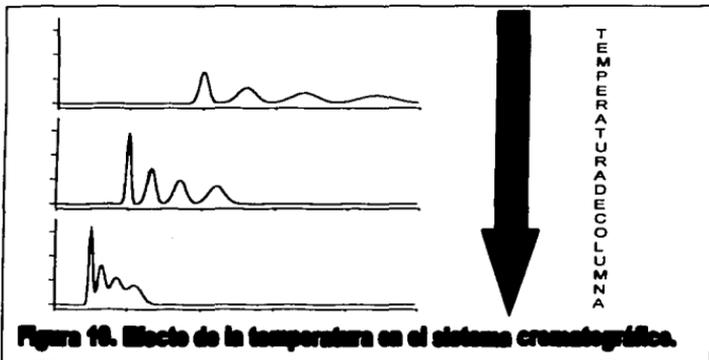
La cantidad de muestra inyectada depende de la columna y del detector empleado. Para columnas empaquetadas, volúmenes de 0,1  $\mu$ l a 3,0  $\mu$ l de muestra líquida son típicos. Los volúmenes altos perjudican la calidad de la inyección (alargamiento de los picos) o saturan la columna cromatográfica. Para la cromatografía gaseosa de alta resolución (CGAR), los volúmenes de inyección deben ser del orden de nanolitros.

Sin embargo, no existe un medio simple para medir semejante volumen con la precisión necesaria. Así, los inyectores para CGAR son dotados de un "divisor de muestra", de modo que apenas una fracción del volumen inyectado (típicamente entre 1/10 y 1/300) llega a la columna, siendo descartado lo restante.

- Columna Cromatográfica y Control de la temperatura de la columna. Después de inyectada y vaporizada, la muestra ingresa en la columna cromatográfica, donde es efectuada la separación. En la CG la afinidad de un soluto por la FM es determinada por la volatilidad del soluto, su presión de vapor, que es función de la estructura del compuesto y de la temperatura. Modificándose la temperatura, se altera también la presión de vapor y, por consiguiente, la afinidad de una sustancia por la FM.

ESTE CON  
FALLA DE ORIGEN

Si la temperatura de la columna fuera excesivamente baja, todos los constituyentes de la muestra tendrán presiones de vapor muy bajas y permanecerán casi todo el tiempo disueltos en la FE, haciendo con que su migración por la columna sea muy lenta. El resultado puede ser un tiempo excesivo de análisis y picos muy anchos y bajos (cuanto más tiempo la sustancia pasa en la columna, más se dispersa). Eventualmente, el compuesto no puede salir de la columna. Por otro lado, una temperatura muy elevada también implica presiones de vapor muy grandes y los compuestos apenas pasan algún tiempo disueltos en la FE, saliendo muy rápidamente de la columna sin ser separados. Así, la temperatura de la columna es una condición que debe ser ajustada para obtenerse una determinada separación. Además de las consideraciones sobre la separación, la temperatura usada debe ser compatible con la FE empleada, pues las FE líquidas se volatilizan o se degradan con temperaturas excesivas. La temperatura de la columna debe controlarse estrictamente, para asegurar la reproducibilidad de los análisis<sup>(39,40)</sup>.

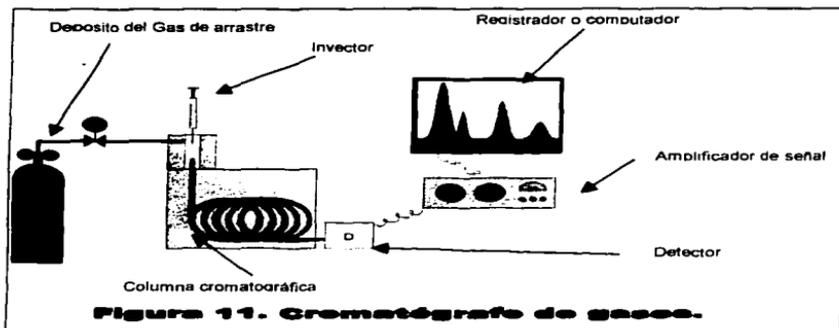


En el caso de muestras que contienen constituyentes con presiones de vapor muy diferentes, si la temperatura se ajusta para la separación apropiada de los compuestos menos volátiles (temperaturas altas), los volátiles serán retenidos muy poco y no serán separados.

Por otro lado, si se hace el ajuste para separar los compuestos volátiles (temperaturas bajas), los constituyentes pesados se presentarán sobre la forma de picos excesivamente anchos y bajos o serán retenidos en la columna. Este problema puede controlarse usando la programación lineal de temperatura (PLT), a través del cual la temperatura de la columna va aumentándose gradualmente durante el análisis. La PLT permite separaciones de muestras muy complejas (petróleo, aceites esenciales, etc.), no analizables con temperatura constante de la columna (CG isotérmica)<sup>(39,40)</sup>.

- Detector. El último bloque de un CG es el detector, que será discutido detalladamente más adelante.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



#### COLUMNAS PARA CROMATOGRAFÍA DE GASES

Las características fundamentales que definen el desempeño de una columna de CG son: retención/ selectividad, eficiencia y resolución.

**Retención y Selectividad.** En CG, el parámetro de retención es el tiempo de retención,  $t_r$ . Este es definido como el tiempo transcurrido entre la inyección de la muestra y el máximo del pico cromatográfico. Aunque la sustancia no interactuase de alguna forma con la FE, su tiempo de retención no sería nulo, porque pasaría algún tiempo entre su inyección y su pasaje por el detector. Este tiempo corresponde al tiempo que el gas de arrastre demora para recorrer la columna, y es denominado tiempo de retención del compuesto no retenido (o tiempo muerto),  $t_m$ . El parámetro que realmente refleja las características físico-químicas de retención de un determinado compuesto es el tiempo de retención descontado del tiempo muerto, llamado de tiempo de retención ajustado,  $t'_r$ :

$$t'_r = t_r - t_m$$

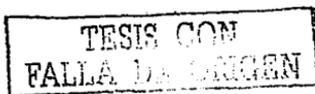
La selectividad, capacidad de un sistema de diferenciar dos compuestos, es definida por

$$\alpha = \frac{t_{r,2}}{t_{r,1}}$$

siendo una característica que, en CG, se asocia más a la columna cromatográfica.

- **Eficiencia.** En CG, la eficiencia es expresada por el número de platos teóricos, que es calculado usando el parámetro de retención ( $t_r$ ) y el ancho del pico cromatográfico - en este caso, el ancho de la base,  $W_b$ :

$$n = 16 \left( \frac{t_r}{W_b} \right)^2$$



La altura equivalente a un plato teórico es calculada por:

$$h = \frac{L}{N}$$

siendo L la longitud de la columna cromatográfica. La dependencia de h con la velocidad de la FM es descrita por la ecuación de van Deemter:

$$h = A + B/V + C_V$$

donde  $V = L / t_m$  es la velocidad del gas de arrastre. El término A está relacionado con el ensanchamiento del pico y el término B con la difusión molecular del soluto en la fase móvil<sup>(39)</sup>.

- Resolución. En CG, la resolución entre dos sustancias es la proporción entre la diferencia de las distancias de migración y el promedio de los anchos de las bandas y está definida como:

$$R_s = \frac{2(t_{r2} - t_{r1})}{W_{b1} + W_{b2}}$$

o, si el ancho de los picos fuesen próximos,  $R_s = \frac{t_{r2} - t_{r1}}{W_{b1}}$

## FASES ESTACIONARIAS

En CG existe un gran número de fases estacionarias líquidas y sólidas disponibles comercialmente, de modo que la naturaleza de la FE es la variable más importante en la optimización de la selectividad.

Las FE líquidas son las más utilizadas en CG. FE sólidas (carbón activo, sílica, tamices moleculares y polímeros porosos) son aplicadas a la separación de gases y compuestos de bajo peso molecular. En principio, para que un líquido sea usado como FE en CG, debe ser poco volátil (presión de vapor hasta 0.1 mmHg o 13,332 Pa a la temperatura de trabajo) y este líquido térmicamente estable, debe tener como características:

1. Ser un buen disolvente para los componentes de la muestra, caso contrario el efecto será el mismo que el de la temperatura excesivamente elevada de la columna (los compuestos permanecerán casi todo el tiempo en el gas de arrastre, siendo eluidos muy rápidamente y sin separación);
2. Ser un buen disolvente diferencial, esto es, además de disolver bien a todos los constituyentes de la muestra, hacerlo con solubilidades suficientemente diferentes para que ellos puedan ser separados y ser químicamente inerte en relación a la muestra.

En general, FE con estructuras similares a la de la muestra disolverán mejor sus constituyentes, proporcionando mejores selectividades y separaciones. FE polares disuelven mejor compuestos polares. Por ejemplo: hidrocarburos pueden ser separados eficientemente usando escualeno (un alqueno de peso molecular elevado).

Las FE más populares son las siliconas. Las siliconas son polímeros sumamente estables e inertes, lo que las vuelve especialmente apropiadas a la CG. En esta clase, los polidimetilsiloxanos son los menos polares. La sustitución de los grupos metilo en la cadena por otros grupos (fenilo, ciano, trifluoropropilo, etc.) proporciona FE con polaridades crecientes. De este manera, estas pueden usarse en la separación de mezclas de las más variadas polaridades. Comercialmente, están disponibles bajo varias denominaciones, muchas de ellas prácticamente equivalentes. SE-30, OV-1 y DC-200 son nombres comerciales para polidimetilsiloxanos de fabricantes diferentes.

ANÁLISIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Otra clase de FE importante es la de los poliglicoles. Son polímeros de etilenglicol y epóxido, preparados con diferentes tamaños de cadena polimérica. Son FE moderadamente polares, apropiadas para la separación de alcoholes, aldehidos, éteres, etc. La denominación comercial "Carbowax" designa la serie de poliglicoles más conocidos (p. ej., Carbowax 20M, Carbowax 600, Carbowax 750, Carbowax 6000, etc.).

Un tercer grupo importante de FE son los de poliésteres. Son obtenidos por condensación de diácidos con glicoles. Son fases altamente polares. Las fases más comunes de esta categoría son el succinato de dietilenglicol (DEGS) y el adipato de dietilenglicol (DEGA)<sup>(36,42)</sup>.

### COLUMNAS EMPACADAS

La columna cromatográfica es el lugar donde ocurre la interacción entre la muestra y la FE. Existen dos geometrías básicas de columnas para CG: las columnas empaquetadas (o rellenas), y las columnas tubulares abiertas (o capilares).

En las columnas empaquetadas, la FE líquida es depositada bajo la forma de una película delgada y uniforme sobre las partículas de un soporte apropiado. El soporte debe ser un sólido poroso con gran área superficial, inerte y de buena resistencia mecánica. El tamaño de las partículas y de los poros debe ser lo más uniforme posible. El material más empleado como soporte es la diatomita, esqueletos fósiles de algas microscópicas (diatomeas), compuestos principalmente de SiO<sub>2</sub> amorfo y trazas de óxidos metálicos.<sup>(39,40,42)</sup>

Muchas veces, el material es sometido a tratamientos químicos para disminuir su actividad superficial, y volverlo más inerte. La diatomita preparada para soporte de CG es comercializada con el nombre de "Chromosorb".

Para preparar una columna empaquetada, el material de relleno (FE sobre soporte) es colocado de la forma más uniforme y compacta posible ("empaquetado") en un tubo de longitud y diámetro apropiados. Los materiales más usados para los tubos de las columnas son de acero inoxidable y de vidrio, siendo el primero preferido por la manipulación más fácil. Si el material de relleno no es colocado en la columna de forma compacta y uniforme, los espacios vacíos resultantes funcionarán como cámaras de dilución para la muestra. El resultado será picos más anchos y menor eficiencia.

El tamaño de la columna es variable. Típicamente son usadas columnas con diámetros internos de 1 mm a 4 mm y 1 m a 3 m de longitud. Cuanto más larga la columna, mayor la eficiencia; sin embargo, también aumenta el tiempo de análisis. Columnas muy largas ofrecen una resistencia muy alta al pasaje del gas, exigiendo presiones excesivamente altas.

Además de la naturaleza de la FE y de la calidad del empaquetamiento, existen dos variables importantes que influyen en el desempeño de una columna empaquetada:

1. El porcentaje de la FE en el material de relleno. El porcentaje de la FE sobre el soporte es un parámetro que debe controlarse rigidamente. Si la cantidad de la FE fuese muy baja, se expondrán partes de la superficie del soporte a la muestra, que puede ser adsorbida. El resultado es el agrandamiento o deformación de los picos. Esto es, cuanto más cantidad de FE, mayor es la retención. La selectividad también aumenta, aunque a expensas del aumento del tiempo de análisis y disminución de la eficiencia. Actualmente, columnas que contienen de 2 % a 10 % de FE son las más usadas, difícilmente se usan columnas con más de 30 %.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

- 2 El diámetro de las partículas del soporte. Cuanto más pequeño el diámetro de las partículas del soporte, mayor la eficiencia de la columna. También, es importante la uniformidad de las partículas. Los rellenos con partículas cuya distribución según su tamaño son muy grandes no serán muy eficaces. Normalmente, se usan soportes con 80-100 mesh (149  $\mu\text{m}$  a 177  $\mu\text{m}$  de diámetro) o 100-120 mesh (125  $\mu\text{m}$  a 149  $\mu\text{m}$ ). Si fuese usado soporte con partículas excesivamente pequeñas, la resistencia al pasaje de gas será muy alta.

En las columnas tubulares abiertas (genéricamente denominadas "columnas capilares"), la FE es depositada en la forma de una película sobre la superficie interna de un tubo fino. Su gran ventaja sobre las columnas empaquetadas es que, por el hecho de ser tubos abiertos, pueden hacerse columnas capilares de grandes longitudes y por tal, más platos teóricos contiene la columna (y es mayor su eficiencia), por lo que columnas capilares son mucho más eficientes que las empaquetadas. Normalmente, se encuentran columnas de 5 m hasta 100 m, aunque ya se ha fabricado una columna con 2175 m. Pueden usarse tubos metálicos, de vidrio o de sílica fundida, siendo actualmente preferidos los últimos por su flexibilidad e inercia química.

En las columnas empaquetadas, el desempeño es afectado por el diámetro y uniformidad de las partículas del relleno y por la carga de FE. En las columnas capilares, son importantes el diámetro interno de la columna y el espesor de la película de la FE. Cuanto más fina sea la columna, más eficiente ella será. Sin embargo, columnas muy estrechas soportan poca FE, lo que disminuye su selectividad. Típicamente, se usan columnas con diámetros internos entre 0.1 mm y 0.5 mm. El espesor de la película de la FE equivale al porcentaje de FE en las columnas empaquetadas, de manera que cuanto mayor es el espesor de la película, mayor será la retención y la selectividad. Películas excesivamente espesas causan el agrandamiento de los picos y tiempos de análisis grandes. Normalmente, se utilizan películas de 0.1  $\mu\text{m}$  a 3.0  $\mu\text{m}$ <sup>(43)</sup>.

Las FE son las mismas usadas para las columnas empaquetadas. Muchas veces, para minimizar las pérdidas de la fase por volatilización durante el uso, la FE es fijada a las paredes del tubo por algún medio. Puede polimerizarse parcialmente a la fase después de la deposición (fases inmovilizadas) o entonces entlazarse químicamente a las paredes (fase entlazada)<sup>(36,40,42)</sup>.

La capacidad de procesamiento de muestra de las columnas capilares es más pequeña que en las columnas empaquetadas. Dependiendo de la columna, esta puede saturarse con cantidades muy pequeñas como 0.001  $\mu\text{L}$  de muestra. Como la inyección directa de volúmenes de muestra de este orden es inviable, debe recurrirse al artificio de la división de la muestra en la inyección. Sin embargo, el uso de la división de muestra presenta algunos inconvenientes.

Es difícil ajustar reproduciblemente la proporción de la división (fracción de la muestra inyectada que entra en la columna), lo que puede provocar errores en el análisis cuantitativo. Además de eso, las muestras conteniendo constituyentes con volatilidades muy diferentes pueden ser alterados por la división; la fracción de la muestra que realmente va para la columna se enriquece con los componentes menos volátiles.

Dada la gran eficiencia de las columnas capilares, pueden realizarse separaciones de mezclas sumamente complejas: fracciones de petróleo, esencias, muestras biológicas, etc. En el caso específico de análisis de interés ambiental (por ejemplo, contaminantes en agua y aire), es casi obligatorio su uso. La tendencia actual es que la mayoría de los análisis se hagan con el uso de columnas capilares. Esto no significa que las columnas empaquetadas están siendo abandonadas, aun así su uso debe restringirse a aplicaciones específicas.<sup>(36,40,41)</sup>

## DETECTORES EN CROMATOGRAFÍA DE GASES

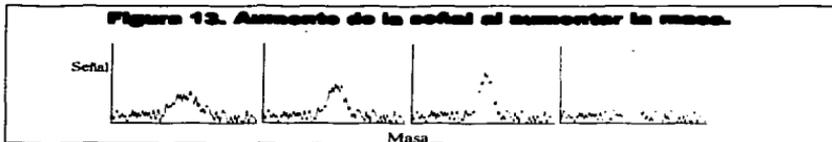
El detector es un dispositivo que detecta los componentes separados por la columna. Un gran número de detectores han sido descritos y usados en CG. Existen, sin embargo, algunas características básicas comunes para describir su desempeño:

TIENE CON  
FALLA DE ORIGEN

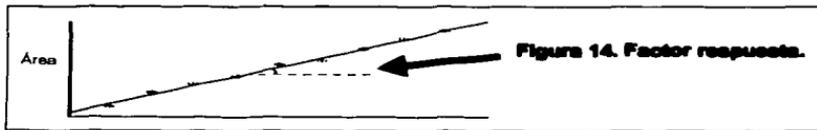
- **Selectividad.** Algunos detectores presentan respuestas para cualquier sustancia diferente del gas de arrastre que pasa por este. Estos son los llamados detectores universales. Por otro lado, existen detectores que sólo responden a compuestos que contengan un determinado elemento químico en su estructura, que son los detectores específicos. Entre estos dos extremos, algunos detectores responden a ciertas clases de compuestos (detectores selectivos).
- **Sensibilidad.** Es la relación entre el incremento del área de un pico y un incremento de la masa del analito<sup>(41,42)</sup>.
- **Ruido.** Son los desvíos y oscilaciones en la línea de base (señal del detector cuando sólo pasa el gas de arrastre). Puede ser causado por problemas electrónicos, impurezas y suciedades en los gases y en el detector, etc. Por muy eficiente que sea el funcionamiento del sistema, siempre existe ruido, ver figura 12.



- **Tipo de Respuesta.** Algunos detectores presentan una señal que es proporcional a la concentración del soluto en el gas de arrastre; en otros, la señal es proporcional a la fracción de masa del soluto que entra en el detector. Esto depende del mecanismo de funcionamiento de cada detector (figura 13).



- **Factor de Respuesta.** Es la intensidad de señal generada por una determinada masa de soluto, que depende del detector y del compuesto estudiado. Puede visualizarse como la inclinación de la recta que correlaciona la señal con la masa de un soluto (curva de calibración). Cuanto mayor es el factor de respuesta, más confiable el análisis cuantitativo.



- **Rango Lineal Dinámico.** Es la razón entre la menor y la mayor masa entre las cuales el factor de respuesta de un detector para un soluto es constante, esto es, donde la curva de calibración es lineal.

Los cuatro detectores más significativos en CG son el Detector por Conductividad Térmica (DCT), el Detector por Ionización en flama (DIF), el Detector por Captura de Electrones y el Detector Espectrométrico de Masas.

El funcionamiento del DCT está basado en el hecho que la velocidad de pérdida de calor de un cuerpo caliente para un cuerpo más frío es proporcional, entre otros factores, a la conductividad térmica del gas que separa estos cuerpos. Un filamento metálico muy delgado (de tungsteno, oro o aleación de tungsteno - renio) es calentado por el pasaje de una corriente eléctrica constante. Este filamento está colocado dentro de un orificio en un bloque metálico (celda), calentado a una temperatura más baja que aquella del filamento, por donde el gas de arrastre proveniente de la columna pasa continuamente<sup>(42)</sup>.

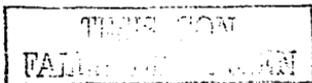
Mientras pasa el gas de arrastre puro por la celda, la proporción de pérdida de calor del filamento para el bloque es constante y la temperatura del filamento no varía. Cuando un componente es eluido de la columna, este sale mezclado con el gas de arrastre y pasa por el detector. Si la conductividad de esta mezcla es diferente de aquella del gas de arrastre puro, el filamento pierde calor para el bloque en una proporción diferente de aquella del equilibrio. Por ejemplo, si la proporción de pérdida de calor disminuye, el filamento se calienta cuando la muestra es eluida. El calentamiento del filamento causa una variación en su resistencia eléctrica y la resistividad de un metal aumenta con la temperatura. El filamento es montado en un circuito puente de Wheatstone, que transforma la variación en resistencia eléctrica del filamento en una variación de voltaje, que es colectada en un registrador generando el cromatograma.

El DCT es un detector universal, sensible a la concentración del soluto en el gas de arrastre. Generalmente, cuando se usa DCT, el gas de arrastre es He o H<sub>2</sub>. Por el hecho de que estos gases tienen conductividades térmicas altas, las mezclas gas de arrastre más soluto siempre tendrán conductividades térmicas menores que la del gas de arrastre puro, lo que impide señales negativas, además de obtenerse factores de respuesta más grandes.

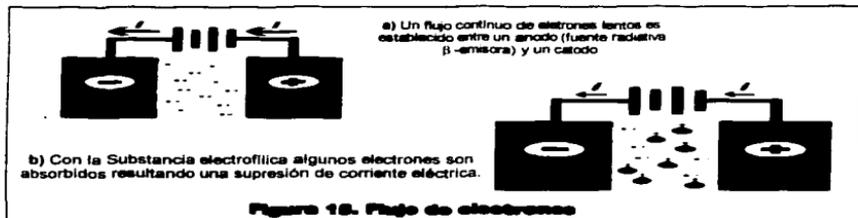
Sin embargo, es considerado un detector poco sensible. La Cantidad Mínima Detectable (CMD) de un modelo moderno, para propano, es de 400 pg/mL de gas de arrastre, con un rango lineal de 10<sup>6</sup>. A pesar de eso, el hecho de ser universal, barato y de funcionamiento simple, lo hace extremadamente útil para análisis que no necesitan de alta sensibilidad.

Durante la quema de un compuesto orgánico, se forman varios iones y como consecuencia, la flama resultante se hace conductora de electricidad. El funcionamiento del DIF está basado en este fenómeno. El gas de arrastre saliendo de la columna cromatográfica se mezcla con H<sub>2</sub> y quemado con aire u oxígeno. La flama resultante se queda contenida entre dos electrodos, polarizados por un voltaje constante. Como la flama de H<sub>2</sub> forma pocos iones, este es un pésimo conductor eléctrico y casi ninguna corriente pasa entre los electrodos. Al eluir un compuesto orgánico, este se quema y forma iones en la flama, que conducen corriente eléctrica. La corriente eléctrica resultante, del orden de pA, es amplificada y constituye la señal cromatográfica<sup>(38)</sup>.

Casi todos los compuestos orgánicos pueden ser detectados por el DIF. Apenas sustancias no inflamables (CCl<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O) o algunas pocas que no forman iones en la flama (HCOOH) no dan señal. Así, este es un detector prácticamente universal. De una manera general, cuando el compuesto tiene enlaces C-H, mayor es su respuesta (mayor sensibilidad). Este detector es mucho más sensible que el DCT, porque dependiendo del compuesto, pueden ser detectados entre 10 y 400 pg, con un rango lineal dinámico de 10<sup>7</sup>. Probablemente es el detector más usado en CG.



El Detector por Captura de Electrones tiene su principio en la supresión de un flujo de electrones lentos causada por la absorción de este por especies electrofílicas<sup>(39,42)</sup>.



### 3.7.3. ANÁLISIS CUALITATIVO POR CROMATOGRAFÍA DE GASES

Los picos cromatográficos representan a cada uno de los componentes que han sido separados de una mezcla de compuestos. Los procedimientos para identificación de los picos cromatográficos podemos dividirlos en dos categorías:

- Identificación Cromatográfica
  - Por Datos de Retención
  - Por Serie Homólogas (Índices de Retención de Kovacs)
- Identificación No Cromatográfica
  - Análisis Clásicos
  - Identificación por:
    - Adición de Estándar
    - Formación de Derivados
    - Sustracción de un Componente
  - Identificación con Técnicas Auxiliares: UV, IR, MS, RMN

### 3.7.4. ANÁLISIS CUANTITATIVO POR CROMATOGRAFÍA DE GASES

La CG es una técnica eminentemente cuantitativa. El principio básico de la cuantificación es que el área de los picos registrados en el cromatograma es proporcional a la masa del compuesto inyectado.

Existen varios métodos para cuantificar un pico cromatográfico:

- Normalización de Área
- Normalización de Área con Factores de Respuesta
- Estandarización Externa
- Estandarización Interna

Cualquiera que sea la forma usada para medir el área de los picos, el procedimiento general de un análisis cuantitativo por CG involucra la obtención del cromatograma de la muestra, la medida del área de los picos de interés y el cálculo de la masa correspondiente a cada uno de los picos. Este cálculo debe hacerse empleando una curva de calibración: un gráfico correlacionando el área del pico con la masa del compuesto. La curva de calibración es obtenida cromatografiándose patrones conteniendo masas conocidas de los compuestos a ser cuantificados. Para cada sustancia, debe hacerse una curva de calibración propia, ya que cada compuesto responde de manera diferente al detector.

El esquema general propuesto anteriormente es llamado de patronización externa. Como es muy difícil conseguir buena reproducibilidad entre inyecciones diferentes, esto es muchas veces sujeto a gran imprecisión e inexactitud. Para minimizar este problema, puede usarse la llamada patronización interna, donde a cada solución a ser inyectada se adiciona una cantidad exactamente igual de un compuesto que sea separable de los componentes de la muestra, y que no exista en ella (patrón interno)<sup>(43)</sup>.

Como para todas las soluciones, tanto de las muestras como de los patrones, existe la misma masa del patrón interno, el área de su pico debe ser la misma. Este hecho hace con que este pico pueda ser usado para corregir el área de los picos de los constituyentes de la muestra y de los patrones, eliminándose, por lo menos parcialmente, muchas deficiencias de la inyección<sup>(43)</sup>.

### 3.8. ESPECTROMETRÍA DE MASAS

**Principio:** Una muestra es fragmentada y ionizada obteniendo un registro característico para cada especie<sup>(43,44,45)</sup>.

Las características más importantes de ésta técnica son:

- Alta sensibilidad: la cantidad de muestra necesaria es pequeñísima.
- Elevada resolución: permite el análisis de mezclas siempre que puedan ser introducidas por cromatografía de gases.
- Facilidad y comodidad: las muestras pueden ser líquidas o sólidas o bien disueltas en disolventes adecuados.

A continuación se detalla lo sucedido dentro de un espectrómetro de masas.

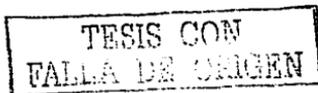
1. Las moléculas de la muestra son bombardeadas por electrones (impacto de electrones) o iones (ionización química)

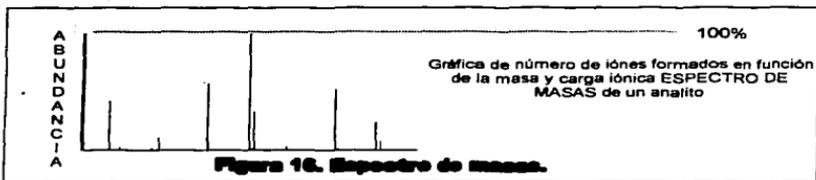


2. Un ión formado se fragmenta:



3. Como se observa en la figura 16 los fragmentos iónicos formados son separados magnéticamente de acuerdo con sus masas moleculares





El espectro de masas de un compuesto puro ofrece valiosa información para fines de identificación cualitativa, siendo la determinación del peso molecular lo más importante, si bien la fragmentación de la molécula puede ayudar en gran medida a la identificación del compuesto. Su campo de interés abarca todas las áreas donde sea preciso la identificación de compuestos: química orgánica, inorgánica, bioquímica, química agrícola, tecnología de los alimentos, medicina, etc. Las aplicaciones analíticas de la espectrometría de masas son muy variadas y mas prometedoras son:

- Elucidación estructural de moléculas orgánicas.
- Identificación y análisis cualitativo y cuantitativo de picomoles de analitos sólidos, líquidos y gaseosos en estado puro o en mezclas complejas (previa separación cromatográfica, p. e., por GC o HPLC).
- Identificación, detección y cuantificación de trazas.
- Metabolismo de los fármacos.
- Química forense.
- Estudios de contaminación del medio ambiente (análisis de aguas superficiales, potables y residuales, detección de pesticidas, herbicidas e insecticidas, detección de surfactantes, detección de colorantes azo sulfonatos).
- Caracterización de aromas, de proteínas, de vinos, de polímeros, de lacas, de pinturas, de ceras, análisis de péptidos, proteínas y nucleótidos.
- Análisis de procesos industriales, control de calidad de productos en química fina e industria farmacéutica.
- Análisis isotópico en Hidrología, Meteorología, Geología, Geocronología y Geoquímica, Paleoclimatología, Agricultura y Alimentación, Medio Ambiente; Biomedicina, e Industria Nuclear.

Estructura del espectrómetro de masas: Como se observa en la figura 17, el espectrómetro de masas básicamente está constituido por los siguientes componentes:

1. Cámara de Ionización: Electrones generados por un filamento bombardean una muestra. Los fragmentos ionizados (carga +1) son repelidos por el electrodo positivo y conducidos al separador magnético.
2. Salida de vacío: Todo el interior de un EM debe encontrarse al alto vacío.
3. Separador Magnético: Los iones atraviesan un campo magnético, durante este paso solo atraviesan algunos iones de determinada Masa y Carga.
4. Detector: Una válvula fotomultiplicadora o un fotodiodo genera una señal proporcional al número de iones que incide sobre un elemento<sup>(42)</sup>.

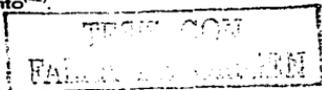
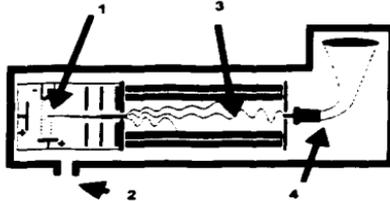


Figura 17. Espectrómetro de masas.



En la figura 18 se observa un ejemplo de un espectro de masas: se observa claramente que debido al fenómeno de resonancia existe una variedad de compuestos los cuáles son determinados de acuerdo con la masa y carga de cada uno, se observan diferentes señales, esta técnica permite la separación y cuantificación en los componentes fundamentales de la muestra a analizar<sup>(44,45)</sup>.

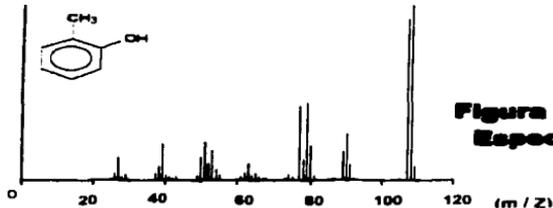
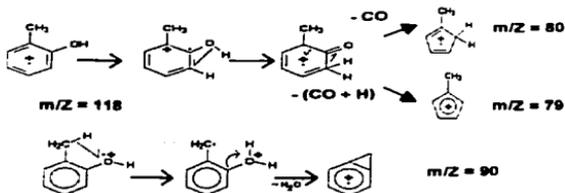


Figura 18. Ejemplo de Espectro de masas.

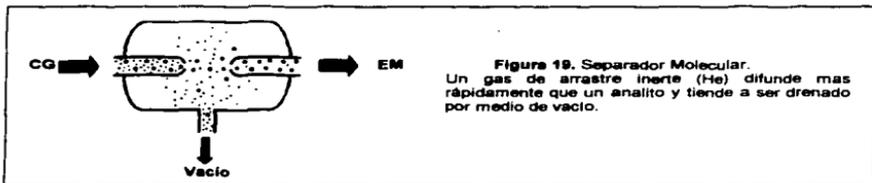


Por último se tratará la Cromatografía de Gases acopiada a Espectrometría de Masas (CG-EM).

## ACOPLAMIENTO CG / EM.

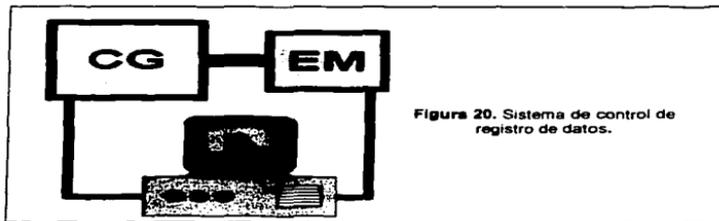
Ya se mencionó con anterioridad la importancia de la elección de un detector adecuado para CG por lo que solo se analizará la interfase en el acoplamiento CG-EM.

A continuación en la figura 19 se observa como en la interfase capilar directa una parte del gas de arrastre puede ser drenada por el sistema de vacío<sup>(42,46)</sup>.



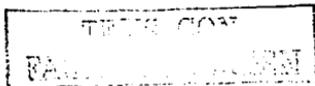
## SISTEMA DE CONTROL DE REGISTRO DE DATOS

El sistema de control de registro de datos es controlado totalmente por un microcomputador, por tal motivo para la emisión de cualquier resultado de análisis, solo será necesario introducir los parámetros de trabajo.

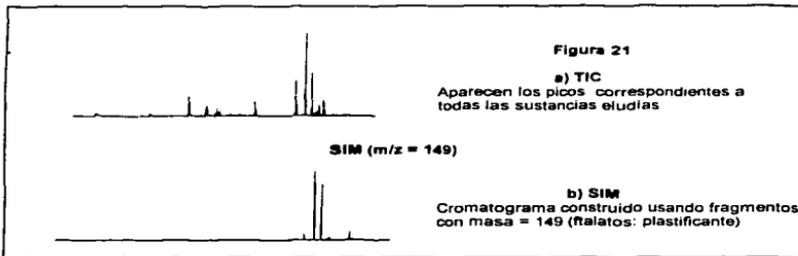


El Sistema de Control y obtención de Datos puede funcionar con dos diferentes módulos, este recolecta y archiva espectros de masas en intervalos regulares de tiempo y construye así el cromatograma. Durante la corrida, compara los cromatogramas recolectados en la base de datos para identificar los compuestos presentes. Es posible obtener dos tipos de cromatograma: Cromatogramas de Iones Totales (TIC) y Cromatogramas Ion Selectivos (SIM)<sup>(42,44)</sup>.

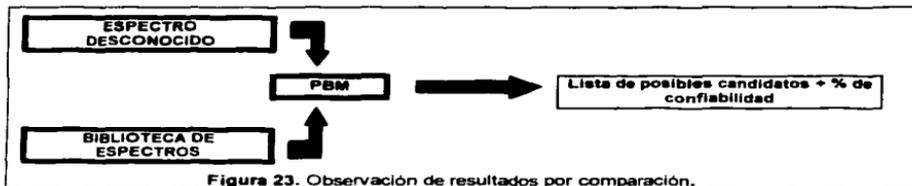
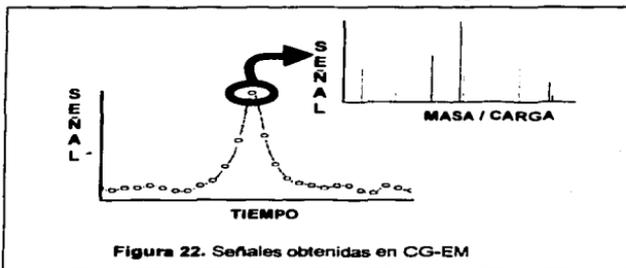
*Cromatograma de Iones Totales (TIC):* Para cada espectro o número total de iones detectados genera un cromatograma en función del tiempo y las masas, ver figura 21. Es universal y similar al DIC.



**Cromatograma Ion Selectivo (SIM):** Selecciona un fragmento resultante de la especie de interes. Genera un cromatograma basandose en el número de iones detectados con la masa del fragmento en función del tiempo. Es selectivo y tiene mayor sensibilidad, ver figura 21.

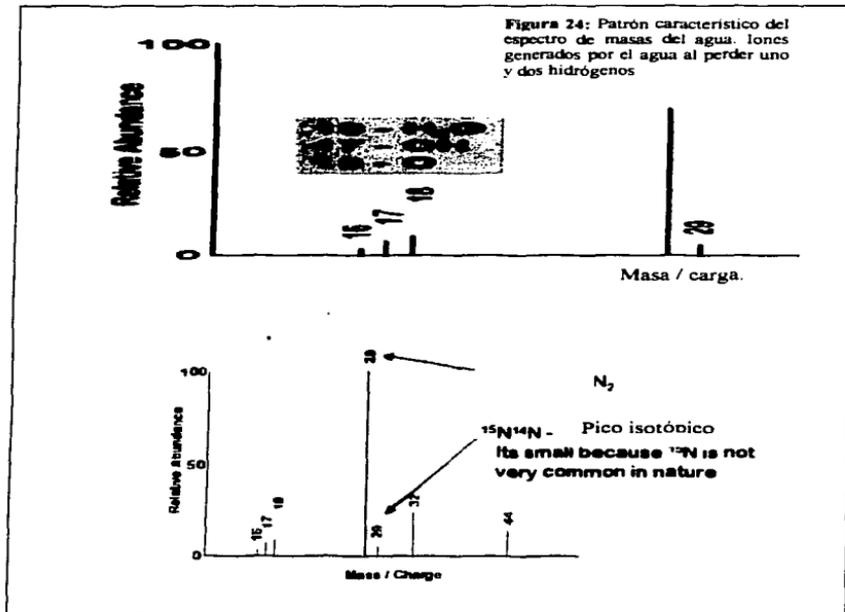


Se puede realizar una selección manual o automática del espectro de masas correspondiente al obtenido experimentalmente, esto se lleva a cabo comparando con los espectros existentes en una biblioteca o base de datos<sup>(42,44)</sup>, el procedimiento se observa en las figuras 22 y 23.

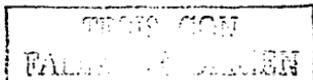


Este tipo de identificación es poco confiable ya que los posibles espectros correspondientes pueden ser bastantes aunque la cantidad de espectros de la base de datos sea limitada (NIST = 66,000 espectros), además las diferencias entre los espectros generados puede ser importante por lo que lo más recomendable será trabajar con un estándar y trabajarlo bajo las mismas condiciones<sup>(42)</sup>, es claro que para ofrecer resultados confiables será necesario validar el método de análisis.

En un espectro de masa cada molécula analizada se rompe en una serie de fragmentos originando un patrón característico para dicha molécula. En la figura 24 se observan el espectro de los iones generados por el agua y por el nitrógeno, con ello se observa claramente la gran importancia de la fragmentación en la espectrometría de masas.



A manera de ejemplificar los posibles resultados observados en el análisis de muestras de hongos psicófilos se presenta a continuación el espectro de masas de la triptamina incluyendo las masas de los iones moleculares.



TRIPTAMINA

3 - ( 2 - AMINOETIL ) INDOL.  $C_{10}H_{12}N_2$  ( Masa de ion molecular: 160)

18.0	3
28.0	2
30.0	22
39.0	1
50.0	1
51.0	2
52.0	1
63.0	1
75.0	1
76.0	1
77.0	10
78.0	1
102.0	3
103.0	9
104.0	1
115.0	1
117.0	1
128.0	1
129.0	2
130.0	100
131.0	69
132.0	7
143.0	1
160.0	25
161.0	3

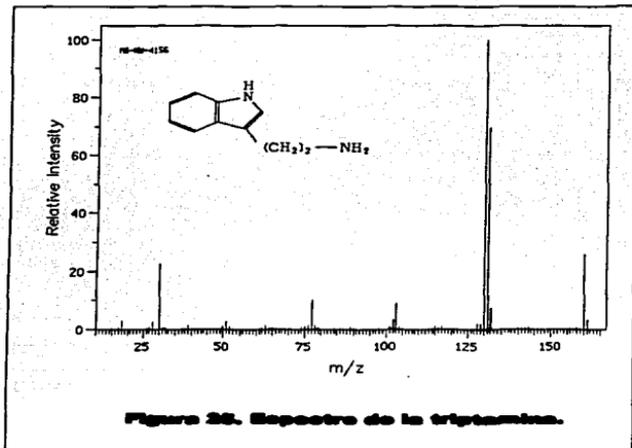


Figura 25. Espectro de la triptamina.

**ESPECTROMETRÍA DE MASAS:** Bombardea las moléculas con electrones y las rompe. El análisis de las masas de los fragmentos resultantes permite conocer el peso molecular, posiblemente la fórmula molecular, e indicaciones acerca de la estructura de los grupos funcionales.

### 3.10. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

En el entorno económico actual, caracterizado por una competitividad como jamás antes se había conocido, las empresas y organizaciones de todo tipo necesitan plantearse continuamente como mejorar su gestión y resultados, en el mas amplio término, para enfrentarse a los retos que día a día se encuentran en el mercado<sup>(47)</sup>.

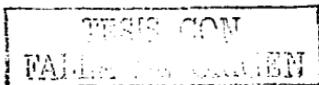
Tomando en cuenta que este proyecto se encuentra orientado al desarrollo del método analítico para identificación y cuantificación, no cabe duda que es necesario mencionar la importancia de ofrecer un método de eficacia comprobada que dé validez a los resultados obtenidos, para ello será requerido validar este método; así mismo, es de gran valor el sugerir al laboratorio interesado en llevar a la práctica este tipo de análisis, la importancia de la acreditación en este método.

La validación es la confirmación de un examen y el aporte de evidencias objetivas de que los requerimientos particulares para un uso especificado se cumplen. Validar un proceso cualquiera significa verificar que el procedimiento seguido es el adecuado para obtener el fin propuesto. Este procedimiento no nos asegura que un método es el adecuado para el análisis ya que por lo general los resultados de este no son comparados con los obtenidos en otros laboratorios, por lo que no se puede asegurar que los resultados obtenidos por un laboratorio o por otro son los correctos, solo se asegura que los resultados de la prueba son validos para el laboratorio especificado aunque no lo sean para el resto.

Como ya se indicó la psicocibina es una sustancia de uso ilegal, por lo que los resultados obtenidos serán de gran valor al ser presentados en una corte, que esperará mediante la información proporcionada soportar o refutar los argumentos presentados, con el fin de indicar sanciones penales, es por esto que es tan necesario que exista una homogeneidad en los resultados presentados tanto por la defensa como por la parte acusadora sobre la misma prueba, para que esto sea posible es necesario llegar mas allá de la validación, esto es, se llegará siempre que sea posible hasta la acreditación de la prueba indicada.

Durante mucho tiempo se pensó que la validación de un método era suficiente para garantizar los resultados de un análisis, pero con el paso del tiempo se vio que esto no era del todo cierto. En diferentes casos legales se ha creado controversia debido a que, al analizar posibles indicios o pruebas, se han presentado resultados muy diferentes por parte de los laboratorios contratados por la defensa y los de la parte acusadora, otro caso que ocurre con mucha frecuencia sucede con los resultados tan variables que suelen presentarse en pruebas de laboratorios de análisis clínicos diferentes para un mismo paciente, provocando con esto que los resultados de cualquier prueba pierdan su validez. Llegó a suceder también que algunos laboratorios de prueba con el pretexto de ser laboratorios certificados ISO 9000 intentaron, con una falta de ética terrible, dar en la corte un peso extra para la validez de sus resultados.

En la actualidad a nivel mundial las normas ISO 9000 resultan de gran peso debido a que, se dice, garantizan la calidad de un producto mediante la implementación de controles exhaustivos, asegurándose de que todos los procesos que han intervenido en su fabricación operan dentro de las características previstas. Estas normas fueron escritas con el espíritu de que la calidad de un producto no nace de controles eficientes, si no de un proceso productivo y de soportes que operan adecuadamente. De esta forma es una norma que se aplica a la empresa y no a los productos de esta. Su implementación asegura al cliente que la calidad del producto que él esta comprando se mantendrá en el tiempo. En la medida que existan empresas que no hayan sido certificadas constituye la norma una diferenciación en el mercado. Sin embargo con el tiempo se transformará en algo habitual y se comenzará la discriminación hacia empresas no certificadas. Esto ya ocurre hoy en países desarrollados en donde los departamentos de abastecimiento de grandes corporaciones exigen la norma a todos sus proveedores.



Se sabe que la certificación es el procedimiento mediante el cual una tercera parte otorga confianza por escrito en un certificado de conformidad de que el producto, proceso o servicio, cumple con los requerimientos específicos. Lo anterior lo hace generalmente utilizando una norma o especificación por lo que la certificación nos asegura el cumplimiento de una norma, pero no nos asegura la mejora de la calidad. La desventaja principal de trabajar bajo certificación ISO 9000 es que muchos creen que con ello se garantiza la calidad de un análisis o producto, pero es necesario tomar en cuenta que esta certificación se basa en el cumplimiento de una norma genérica y no específica para cada análisis.

El acreditamiento es el reconocimiento formal dado por un organismo autorizado de que un organismo o persona es competente para cumplir con cierta prueba o tarea específica. Es un proceso que se cumple no por obligación sino por voluntad, pero es de validez porque es otorgado por la competencia. La acreditación es el procedimiento mediante el cual un organismo autorizado otorga un reconocimiento formal de que un organismo o persona es competente para cumplir con tareas específicas.

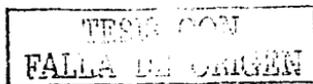
Todo tipo de pruebas debieran someterse a acreditación aunque para la mayoría de las pruebas o mediciones específicas no se tenga aún el organismo acreditador capaz de emitir el reconocimiento formal, pero pudiera tenerse luego de llevar a cabo las pruebas específicas, en este caso no se tiene conocimiento si existe algún organismo que tenga la capacidad de acreditar el análisis de psicobina en orina o a partir de polvos sospechosos por CG/EM, pero de hallarse el proceso sugerido será el siguiente:

1. Solicitud del Laboratorio o persona interesada en la acreditación hacia un organismo acreditador.
2. Revisión de documentos.
3. Evaluación de la prueba: se le indica al analista que realice la prueba por el método ya validado por el laboratorio.
4. Revisión de resultados.
5. Observaciones al laboratorio o analista y correcciones de este.
6. Nueva revisión hasta que se indique que se cumple con un buen proceso.
7. Evaluación y aprobación.
8. Acreditación.

Para llevar a cabo una validación es necesario delimitar un proceso de validación el cuál se base en los siguientes puntos:

1. Planeación: Escribir el Plan de Validación.
2. Especificaciones: Definir los criterios de aceptación.
3. Plan de pruebas: Prepara los documentos que describan las pruebas a llevar a cabo.
4. Pruebas: Llevar a cabo las pruebas y coleccionar los datos.
5. Revisión: Revisar los resultados. Determinar que el elemento a validar cumple con los criterios de aceptación<sup>(46)</sup>.

Se recomienda que se tomen en cuenta los siguientes puntos al momento de llevar a cabo el método de análisis y la validación del método:



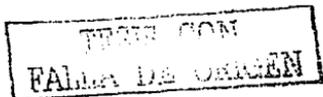
1. Identificación del lugar de toma de muestra (¿de dónde se va a tomar la muestra?).
2. Identificar y tomar la muestra con el material específico y el contenedor para ese tipo de muestra. Etiquetar la muestra.
3. Transporte de la muestra tomando en cuenta las medidas precautorias para su manejo, son ya conocidas las precauciones para el manejo de fluidos biológicos.
4. Asegurarse de que el equipo está calibrado. Es necesaria la identificación de las necesidades de calibración de los instrumentos de medición necesarios para el funcionamiento futuro del equipo.
5. Control de documentación estricto, esto es, anotar todos los pormenores acontecidos en el análisis, no olvidando realizar las anotaciones pertinentes en bitácoras de equipos y de resultados, escribir todos los contratiempos sucedidos y los nombres y firmas de la persona que realiza el análisis.
6. Informar de los resultados obtenidos en lo posible teniendo siempre un soporte estadístico.
7. Desarrollar un plan maestro de validación el cual es un documento que proporciona información sobre el programa de validación del laboratorio. Deberá definir detalles, cronogramas y responsabilidades por las actividades a ser llevadas a cabo, en el se incluirá la realización de todas las instancias de calibración, mantenimiento, capacitación, desarrollo de documentos, etc., que corresponda, antes de comenzar con las actividades de validación propiamente dichas.
8. Elaborar un protocolo de validación: Plan escrito que establece cómo se llevará a cabo la validación, incluyendo parámetros de ensayo, características del método, equipos de producción, y criterios de aceptación.
9. Elaborar un informe de validación: Documento que informa las actividades de validación, los datos de validación y las conclusiones sacadas del mismo.

En una validación se establece la evidencia documentada que proporcione un alto grado de seguridad de que un proceso específico producirá consistentemente un producto que cumpla con las especificaciones y atributos de calidad predeterminados<sup>(49,50)</sup>, en este análisis el producto es el resultado emitido, por ello será necesario tomar en cuenta que la validación cumpla con los siguientes parámetros:

- Linealidad.
- Exactitud.
- Precisión.
- Repetibilidad.
- Reproducibilidad.
- Selectividad.

Como último punto a sugerir para el proceso de validación del método se recomienda que en el protocolo de validación se incluyan los siguientes puntos:

1. Carátula.
2. Índice.
3. Objetivo.
4. Alcance.
5. Responsabilidades.



6. Introducción: Que incluya antecedentes, definiciones, descripción y la información básica.
7. Criterios de aceptación: Esto será lo más importantes.
8. Método.
9. Hojas de reporte.
10. Análisis estadístico de resultados.
11. Conclusiones: En caso de discrepancias elaborar recomendaciones y en caso de aprobación llevar un control de los cambios.
12. Seguimiento<sup>(51,52)</sup>.

Será necesario que el método sugerido para el análisis de psicobina por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas sea validado y en lo posible acreditado a manera de ofrecer resultados reales y confiables.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

#### 4. PROYECTO EXPERIMENTAL

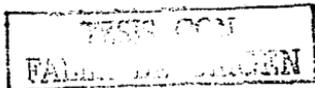
##### 4.1. PRINCIPIO DEL ANÁLISIS DE PSILOCIBINA

Al momento de iniciar con esta propuesta de método de análisis cualitativo - cuantitativo cabe aclarar, que, hasta donde se tiene conocimiento, no existe ningún estudio químico similar escrito sobre el análisis de la psicocibina. Es necesario aclarar también que para la identificación de psicocibina y de cualquier sustancia en general es necesario tomar en cuenta el tipo de muestra de la cuál se extraerá para su posterior identificación ya que como se sabe la psicocibina al desforzarse en el organismo se convierte en psicocina por lo que será esta última sustancia la que se identificará en el caso de muestras procedentes de fluidos biológicos. El primer paso será siempre llevar a cabo las pruebas presuntivas, debido a que, el análisis cualitativo por cromatografía de gases resulta ser muy caro y consume mucho tiempo en comparación con las pruebas de reacción coloridas que pueden además dar una idea del tipo de sustancia que puede existir en la muestra problema y con esto orientar hacia la elección del procedimiento a seguir, con lo que también se da un adecuado tratamiento a las muestras que presuntamente pueden ser consideradas como evidencias en casos legales.

En el caso de observar que las pruebas presuntivas apuntan hacia la identificación de psicocibina, será necesario proceder con la prueba confirmatoria, por lo que la muestra se procesará mediante extracciones, a manera de determinar la sustancia presente, analizando el extracto mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Mediante este análisis se identificarán los compuestos desconocidos, o confirmarán los ya sospechados.

Los constituyentes separados e identificados total o parcialmente serán comparados con un estándar de psicocibina y psicocina comercial que se tratará de la misma manera que la muestra problema, esto además ayudará para compensar las pérdidas del analito debidas al tratamiento de la muestra.

Se espera que los constituyentes principales obtenidos sean derivados triptamínicos, en gran parte alcaloides. Los compuestos de la mezcla, sus tiempos de retención relativos y los porcentajes de cada uno, se obtienen al comparar los espectros de masas obtenidos contra los encontrados en la base de datos del computador recomendado o los de la literatura disponible al momento. La identificación y cuantificación de psicocibina en muestras problema no biológicas se llevará a cabo al utilizar un patrón de psicocibina del mismo modo en muestras biológicas se investigará la presencia de psicocina utilizando un patrón de la misma mediante la comparación de los tiempos de retención trabajando en las mismas condiciones experimentales.



## 4.2. TIPOS DE MUESTRA

Los fármacos y en general todos los xenobióticos pueden ser determinados en matrices biológicas y no biológicas y de manera directa e indirecta.

1. Matrices biológicas.
  - a) Orina.
  - b) Sangre, etc.
2. Matrices no biológicas.
  - a) Hongos.
  - b) Polvo seco sospechoso.

En cualquier caso se sugiere que se lleven a cabo primero los análisis indirectos presuntivos como las pruebas colorimétricas y la cromatografía en capa fina, ya que por la gran cantidad de fármacos existentes no sería posible llevar a cabo análisis directos de muestras sin tener idea del tipo de sustancia que se trata, pues no se sabría ni las condiciones ni el proceso a seguir para el análisis. Las pruebas presuntivas serán siempre la base para cualquier análisis donde se sospeche de presencia de fármacos de abuso.

### 4.2.1. MATRICES BIOLÓGICAS

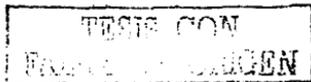
#### ASPECTOS LEGALES RELACIONADOS CON LA TOMA Y CONSERVACIÓN DE MUESTRAS PARA ANÁLISIS DE FARMACOS EN FLUIDOS BIOLÓGICOS.

1. El personal que tome la muestra es responsable de que se rotele, de su conservación antes de que llegue al laboratorio y de su transporte, además de facilitar los documentos necesarios con todos los datos requeridos (solicitud de peritaje).
2. La toma de la muestra debe ser supervisada con el objetivo de que no sea adulterada o sustituida, lo que conlleva a la invalidación de la misma.
3. El grupo de expertos de Bruselas recomienda la orina como muestra idónea para el análisis de drogas de abuso, de manera que dicha muestra debe tomarse por duplicado en frascos de 50 ml de capacidad, que deben llenarse en sus 2/3 partes. Deben evitarse los frascos plásticos siempre que sea posible, debido a que los analitos pueden adsorberse en la superficie de los frascos y se afecta considerablemente los recobrados.
4. Inmediatamente después de la colección debe medirse la temperatura ( que debe estar entre 32 y 38 °C dentro de los 4 minutos después de su colección ) y el pH . Si se sospecha cualquier adulteración se debe notificar al laboratorio. Debe verificarse si la orina tiene algún precipitado, su color, si tiene espuma, etc. Se recomienda también la determinación de creatinina ( 180 ± 80 mg / dL : normal; 10 - 30 mg / dL "probablemente está diluida " ; 10 mg / dL " diluida " ) y la determinación de la gravidez específica ( 1.007 - 1.035 "normal" ).
5. Es importante mantener las muestras en frío y en un lugar oscuro en el período de tiempo entre su toma y el análisis de las mismas.

### 4.2.2. MATRICES NO BIOLÓGICAS

#### ASPECTOS RELACIONADOS CON LA CONSERVACIÓN DE MUESTRAS PARA ANÁLISIS DE FARMACOS EN MATRICES NO BIOLÓGICAS.

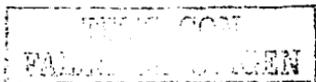
1. El personal que tome la muestra es responsable de que se rotele, de su conservación antes de que llegue al laboratorio y de su transporte, además de facilitar los documentos necesarios con todos los datos requeridos (solicitud de peritaje).



2. La toma de la muestra debe ser supervisada con el objetivo de que no sea adulterada o sustituida, lo que conlleva a la invalidación de la misma.
3. Cuando las muestras a analizar son hongos frescos, será necesario para su mejor conservación y análisis posterior, someterlos a secado, a continuación se indican algunos métodos de secado utilizados comúnmente.
4. Los hongos frescos se pueden conservar, en perfecto estado, durante unas algunas semanas (pocas) en refrigeración, metidos en un recipiente plástico o en bolsas de papel.
5. La forma más fácil de secar los hongos es ponerlos sobre hojas de periódico o papel impreso encima de una mesa o alacena, preferiblemente donde corra el aire. Separando y distribuyendo los hongos a lo largo de todo el papel y sin que estén en contacto unos con otros. Después de 2-3 días la mayoría e los hongos estarán secos, habiendo disminuido mucho de tamaño (los hongos son aproximadamente un 90% de agua). El color también cambia cuando se secan.
6. Puede utilizarse también sílica gel como complemento para secar totalmente los hongos, ya que esto acelera el proceso de secado..
7. La forma más recomendada es colocar los hongos en un horno a una temperatura aproximada de 30 ° C por algunas horas hasta el secado. Una vez secos los hongos se trituran y se procede con la extracción.

#### ASPECTOS LEGALES RELACIONADOS CON LA TOMA Y CONSERVACIÓN DE MUESTRAS PARA ANÁLISIS DE FARMACOS EN MATRICES BIOLÓGICAS Y NO BIOLÓGICAS.

1. Cuando la muestra llega al laboratorio se debe revisar contra las solicitudes de peritaje para asegurar que los datos coincidan plenamente, guardando una de las muestras para reiteración de los análisis si fuese necesario.
2. Las solicitudes de peritaje deben contener:
  - Órgano que solicita el peritaje y antecedentes del caso.
  - Nombre y apellidos del implicado, edad y peso.
  - Fecha, hora y tipo de muestra que se colecta.
  - Tiempo aproximado del último consumo.
  - Sustancias consumidas en las últimas horas o días.
  - Patrón de consumo.
  - Temperatura y pH de la muestra en el momento de su colección.
3. Los casos se deben inscribir en un registro de entrada, dándole a la misma un número consecutivo que será escrito en los frascos y en solicitud de peritaje por la persona que la reciba, anotando también la cantidad de muestra recibida, hora de recepción, etc.
4. Si los análisis no se comienzan en el momento de la recepción las muestras deben guardarse en congelación.
5. Es importante mantener una completa seguridad y confidencialidad en todo momento. Cualquier información relacionada con el caso debe considerarse secreta y colocarse en un lugar seguro.
6. Al concluir el caso debe realizarse un informe pericial dirigido al órgano de instrucción que lo solicitó, el cual debe reflejar no solo los resultados de los análisis sino todos los procedimientos que se utilizaron para arribar a los mismos.



### 4.3. PRETRATAMIENTO

La extracción de la psilocibina se hace utilizando disolventes orgánicos como por ejemplo: metanol, éter, etc.

Se ha visto que realizando una extracción con metanol y éter, en el extracto de metanol se encuentra la mayor cantidad de psilocibina.

#### 4.3.1. EXTRACCIÓN A PARTIR DE ORINA

Volumen requerido: 20 ml de orina recientemente obtenida o almacenada de 2-8° C.

**Ventajas:** Es el espécimen de elección debido a que es generalmente fácil de obtener en volumen alto; cuando se ingieren la mayoría de las drogas se encuentra en la concentración suficiente para permitir su identificación, en el caso de la psilocibina se puede esperar alrededor de un 11% de la droga ingerida.

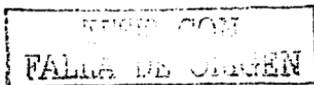
**Desventajas:** Contiene muchos productos metabólicos que pueden interferir con la identificación; se determina por lo general el metabolito; la cuantificación ofrece pocas correlaciones con efectos clínicos.

**NOTA:** Tomar en cuenta el tiempo comprendido entre la ingesta de la droga y el análisis ya que si pasa demasiado tiempo será casi imposible detectar la presencia de la sustancia, ya que como se sabe esto depende de la dosis, uso, factores fisiológicos y excreción.

1. Colocar 20 mL de orina en un embudo de separación de 125 mL, agregar 5 mL de amortiguador amonio / amoniaco 1.0 M, pH 10.
2. Agregar 5 mL de éter y mezclar perfectamente.
3. Reposar hasta la separación de fases, separar la fase orgánica, sin desecharla y adicionar 5 mL de éter a la fase acuosa en el embudo, mezclar perfectamente.
4. Reposar hasta la separación de fases, separar la fase orgánica, sin desecharla y adicionar 5 mL de éter a la fase acuosa en el embudo, mezclar perfectamente.
5. Reposar hasta la separación de fases, separar la fase orgánica.
6. Desechar la fase acuosa, ya que la mayor parte de psilocibina se encuentra disuelta en el extracto etéreo.
7. Reunir los extractos etéreos.
8. Filtrar a través de un papel filtro del número 1.
9. Llevar la muestra a sequedad por evaporación.
10. Adicionar 1 mL de metanol.
11. Transferir la muestra a un frasco con tapa de cierre hermético y guardar bajo refrigeración.

#### 4.3.2. EXTRACCIÓN A PARTIR DE HONGOS O MATERIAL SECO SOSPECHOSO

1. Colocar 1.5 gramos del hongo en un vaso de precipitados y agregar 10 mL de metanol.
2. Pulverizar lo mas finamente posible y pasar a un matraz Erlenmeyer de 50 mL, adicionar 5 mL mas de metanol, agitar durante 20 minutos para que la superficie de contacto entre muestra y disolvente sea mayor y así se pueda extraer mayor cantidad de muestra.
3. Filtrar a través de papel filtro del número 1.



4. Dejar evaporar en la campana de extracción a temperatura ambiente por tres horas.
5. Se guarda la muestra en frasco con tapa en el refrigerador.

Esta muestra puede guardarse para su uso posterior, esto será en un envase de cerrado hermético y bajo refrigeración.

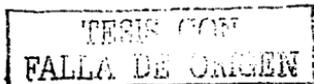
Después de haber eliminado la mayor parte de las impurezas mediante la extracción, es necesario realizar pruebas presuntivas para confirmar después por medio de Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas.

#### 4.4. PRUEBAS PRESUNTIVAS PARA PSILOCIBINA

##### CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA

**FUNDAMENTO:** El desarrollo de los cromatogramas en capa fina se realizan por el método ascendente, permitiendo que un eluyente y una mezcla de sustancias ascienda en una placa casi en posición vertical por la acción de la capilaridad, provocando la separación de esta mezcla hasta sus componentes básicos.

1. Preparación de las placas: Se sugieren dos opciones. Opción 1: El absorbente se mezcla con agua hasta formar una pasta. Las proporciones relativas de pasta y agua condicionan el espesor de la capa y la rapidez del secado. Suele trabajarse con 30 gramos de gel de sílice y 5 mL de agua, para preparar 5 placas de 0.25 mm de espesor. La pasta se extiende hasta obtener el espesor deseado; las placas se secan al aire durante 3 a 5 minutos, y se activan a una temperatura de 120° C durante una hora para eliminar la mayor parte del agua. Opción 2: Preferentemente se utilizarán cromatofolios comerciales
2. Preparación del eluyente: Se utiliza una mezcla de metanol – cloroformo – hidróxido de amonio (0.1 M) en proporciones 1.1-0.7-0.2.
3. Saturación de la cámara de elusión: Durante 30 minutos.
4. Colocación de las muestras: Usar una guía de reconocimiento para el origen de la marca a 1 cm de la orilla de la placa colocando la muestra a esta exacta distancia.
5. Colocación de las placas en la cámara de elusión: Se colocan las placas en forma casi vertical con la muestra en la parte baja en la cámara de elusión sin que la muestra colocada a 1 cm de la base toque el eluyente.
6. Tiempo de corrimiento: 20 minutos.
7. Revelado: El revelado se lleva a cabo utilizando lámpara de Luz U.V. a 254 nm. En caso de duda asperjar sobre las placas fluoresceína sódica y luego repetir la lectura.
8. Marcar el sitio en el cual llegó el disolvente (frente del disolvente), al igual marcar el sitio donde aparece la mancha de la muestra.
9. Medir las distancias observadas y obtener el Rf. El valor de Rf es simplemente una manera de expresar la posición de un compuesto sobre una placa como fracción decimal, ya que la distancia recorrida por el compuesto se mide normalmente desde el centro de la mancha y tomando en cuenta el frente del disolvente utilizado.
10. El Rf obtenido para psilocibina es de 0.90.
11. Puede compararse con un patrón de psilocibina y psilocina según sea el caso. Se seleccionará un apropiado control comercialmente disponible.



## PRUEBA DE MARQUIS

El reactivo de Marquis se prepara mezclando 1 volumen de formol con 9 volúmenes de ácido sulfúrico concentrado y un gran número de compuestos reaccionan con él para dar una escala de colores que prácticamente cubren el espectro. Por ejemplo:

- rojo: fenilefrina, tranilcipromina
- naranja: adrenalina, anfetamina, tetraciclina
- amarillo: clordiazepóxido (librium), lorazepam, colchicina
- azul: clofibrato
- violeta: codeína, morfina, nalorfina, promazina
- marrón: doxepina, ergotamina, LSD, naproxeno, psilocibina.

Llevar a cabo esta prueba en tubo de ensaye con 1 mL de muestra y adicionando 1 mL de reactivo de Marquis.

## PRUEBA DEL IODOPLATINATO PARA COMPUESTOS NITROGENADOS

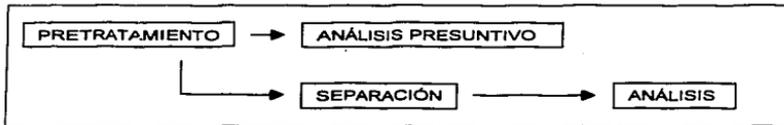
A 1 mL de muestra se le agrega 1 mL de iodoplatinato. Un precipitado marrón oscuro o azul violeta sugiere la presencia de una sustancia nitrogenada: alcaloides, ansiolíticos, antidepresivos, etc. El reactivo se prepara con 2 mL de ácido cloroplatinico al 5 %, 5 g de KI y agua destilada hasta completar 100 mL.

Preparación alterna de iodoplatinato (0.38 mol / L). Disolver 10 g de cloruro de platino en 100 mL de agua destilada. Refrigerar a 4° C. Esta solución es estable por 1 año. Agregar 5 mL de la solución anterior a 3 g de yoduro de potasio en 100 mL de agua destilada. Diluir esta mezcla hasta 125 mL con agua destilada, y entonces diluir con un volumen igual de metanol ( volumen final 250 mL). Refrigerar a 4° C. Esta solución es estable por 6 meses.

## 4.5. ANÁLISIS DE PSILOCIBINA

### INDICIOS

Realizar pruebas presuntivas para confirmar después por medio de Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas. A continuación se muestra un esquema general del análisis propuesto.



**PRETRATAMIENTO:** Se refiere a la extracción, por medio de la cual se eliminan impurezas.

**ANÁLISIS PRESUNTIVO:** Se compone de tres pruebas: prueba del iodoplatinato para compuestos nitrogenados, prueba de Marquis y cromatografía en capa fina.

**SEPARACIÓN:** La separación ocurre mediante el proceso de cromatografía de gases por lo que se definen las condiciones recomendadas para el cromatógrafo de gases.

**ANÁLISIS:** En este punto se definen las condiciones recomendadas para el análisis cualitativo y cuantitativo, esto es, el tipo de detector y el sistema de datos.

En estudios anteriores se han encontrado en hongos de la especie *Psilocybe mexicana* mas de 30 compuestos diferentes entre los que destacan los indicados en la siguiente tabla.

Derivados indólicos presentes en <i>Psilocybe mexicana</i> .	Cantidad (µg, microgramos)
Ácido 5-bencil-oxi-3-indol acético	2
N,N-dimetiltriptamina	4
Gramina	40
3-Hidroxi etil indol	2
Ácido 5-Hidroxi-3-indol acético	2
5-Hidroxi indol	4
3-Hidroximetil indol	2
5-Hidroxitriptamina creatin sulfato	4
5-Hidroxitriptofano	2
Indol	4
3-Indoleacetamida	2
Ácido 3-Indol acético	2
3-Indol acetónitrilo	2
3-Indol aldehído	40
3-Indol acetaldehído	2
Ácido 3-Indol carboxílico	4
Ácido 3-Indol láctico	2
5-Metoxi-2-carboxi indol	2
5-Metoxi dimetil triptamina-mono oxalato	4
5-Metoxi indol	4
2-Metil indol	2
3-Metil indol	4
5-Metil indol	4
5-Metil triptofano	2
N-Metil triptofano	2
Triptamina hidrociorada	4
L-Triptofano	0.8

(23)

Es muy claro que en hongos *Psilocybe* se observará la presencia de diferentes compuestos pero, por lo general como se observa en la tabla, la mayor parte de los compuestos presentes son probables precursores de la psicobina, aunque se espera que la cantidad de compuestos presentes sea mucho mayor, estos serán identificados mediante las bases de datos del equipo de computo utilizado para el manejo del CG/EM.



Luego de haber eliminado la mayor parte de las impurezas mediante la extracción, es necesario definir las condiciones para el acoplamiento en el sistema CG/EM.

#### 4.6. CONDICIONES DE TRABAJO

##### Gas Portador

El gas portador cumple básicamente dos propósitos: Transportar los componentes de la muestra, y crear una matriz adecuada para el detector.

El gas portador en este análisis será helio, ya que este cumple con las características siguientes:

- Es inerte por lo que se evitan interacciones (tanto con la muestra como con la fase estacionaria)
- Es fácilmente disponible y puro
- Es económico
- Es adecuado para el espectrómetro de masas.

##### Temperatura

Como se vio con anterioridad la matriz a analizar es sumamente compleja y encontramos sustancias con peso molecular y puntos de ebullición diferentes. En este caso no es conveniente trabajar la cromatografía de gases bajo condiciones isotérmicas sino que lo ideal es utilizar la programación lineal de temperatura trabajando con una temperatura inicial de 110° C para separar los componentes iniciales y luego incrementando hasta llegar a los 280° C en que se espera que la mayoría de los compuestos indólicos aparezcan en un tiempo corto, aprovechando con esto las propiedades físicas y químicas de los compuestos presentes en la mezcla para una mejor separación.

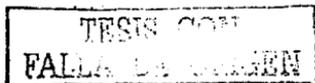
- Programación de temperatura de la columna: 4 minutos a 110° C, 110-280° C a incremento de 10° C/ minuto.
- Temperatura del inyector y de la interfase de separación: 110° C.
- Voltaje de ionización: 70 eV; corriente de ionización: 60 µA. Estos datos son los recomendables para la mayor parte de los análisis.

##### Volumen de muestra

El volumen de muestra líquida ideal es de 2 µL o menor ya que volúmenes mayores perjudican la calidad de la inyección provocando un alargamiento de picos o la saturación de la columna. No se recomienda trabajar con volúmenes menores a 1 µL ya que sería necesario contemplar en el equipo un inyector para cromatografía de gases de alta resolución dotado de divisor de muestras que representa un costo adicional.

##### Inyección de muestras

Debido al volumen de la muestra será necesario trabajar con un inyector automático. El inyector necesariamente será Split/Splitless ya que la válvula en sistema de inyección splitless (sin purga) es ideal para la detección de los elementos traza que se encontrarán en la muestra.



## Columna

Como se mencionó la columna es la variable mas importante en la optimización de la selectividad. Se sugiere una columna empacada; se opta por esta decisión en lugar de la columna capilar porque, a pesar de que la eficiencia es mayor en columnas de gran longitud como en las columnas capilares, con una columna empaquetada con el soporte y la fase estacionaria adecuada pueden observarse excelentes separaciones y selectividad. A continuación se indican las características que debe tener la columna utilizada para mejorar su eficiencia en este análisis.

- Longitud de la Columna: Con una columna de 10 metros se puede observar una eficiencia buena, pudieran utilizarse columnas desde 3 metros, ya que pueden dar buenos resultados, aunque la eficiencia es mejor a mayor longitud.
- Diámetro de la Columna: Diámetro externo de 1/8 ". Se elige por ser el que comercialmente se maneja para el tipo de fase estacionaria.
- Naturaleza de las fases: Se sabe que las fases estacionarias de mediana polaridad disuelven mejor muestras de mediana polaridad, por lo que tomando en cuenta la naturaleza de los compuestos de la mezcla, es conveniente utilizar una fase de base polidimetilsilicona con sustitución del grupo metilo por algún grupo de mayor polaridad, puede utilizarse comercialmente la columna OV-17 en Gas chrom QII que es un soporte que permite que se observen picos mas anchos y mejor eficiencia, otra propiedad importante es que trabaja adecuadamente utilizando metanol como solvente de la mezcla. Puede utilizarse otra marca comercial pero de las mismas características.
- Cantidad de fase estacionaria: 5% mínimo hasta un 10%.
- Temperatura de la columna: Como se indicó se utilizará la programación lineal de temperatura.
- Velocidad del gas portador: desde 6 mL/min hasta 10 mL/min.
- Cantidad de muestra inyectada: 2  $\mu$ L.

## Soporte

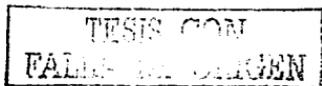
La función básica del soporte es la de "mantener" (sostener, retener) la fase estacionaria. Se recomienda el de la marca comercial Gas chrom (tierra de diatomeas blanca) que además de ser un material inerte que "mantiene" la fase estacionaria sobre su superficie como una película delgada, es el soporte que mejor se lleva con la fase estacionaria, el solvente y ofrece la mayor estabilidad térmica.

## Método de identificación

La identificación positiva se basa en la concordancia de los tiempos de retención a las condiciones expresadas comparadas con un patrón de referencia.

## Controles positivos y negativos de psilocibina

1. Control Interno Negativo: Metanol grado cromatográfico.
2. Control Positivo. Estos patrones serán los comerciales de psilocibina y psilocina disponibles en algunas casas comerciales y serán los mismos que se usan en cromatografía en capa fina. Para casos de cuantificación el patrón de psilocibina se prepara a concentración de 2  $\mu$ g/mL en metanol grado cromatográfico y se procede a la dilución 1/10, 1/100, 1/1000 para la construcción de la curva de calibración.



## **Detector**

El detector utilizado será el Espectrómetro de Masas, este es un dispositivo adecuado para el análisis ya que nos permite mediante señales, la obtención de datos cualitativos y cuantitativos de cada uno de los compuestos presentes en las muestras, además se utilizará en modo SIM para obtener datos mas precisos sobre los iones de interés.

## **Bibliotecas de Espectros de Masas**

Comercialmente existen diferentes bibliotecas que pueden ser de utilidad en la identificación pero se recomiendan las siguientes por la gran cantidad de espectros de drogas que contienen:

- o NIST (75000 Compuestos)
- o Pfleger Maurer Weber Drug

El modo de búsqueda de estas bibliotecas de espectros de masas es por similitud y por índices.

Una vez que se ha determinado el Espectro de Masas de la psicobina y la psicocina es conveniente proceder con la creación de bibliotecas propias de espectros de masas.

## **Operación del equipo**

Los parámetros operacionales del Cromatógrafo de Gases y Espectrómetro de Masas así como del procesamiento de datos y de formato de salida de informes se almacenan como "Archivo de Método". Correr siempre un control negativo y positivo a las mismas condiciones que la muestra problema. Anote ese GC/MS. La eficiencia de la columna se verifica como un procedimiento separado.

Luego de calibrar el espectrómetro de gases inyectar la muestra. El procedimiento a seguir a partir de este punto se basará en el descrito en el manual de operación del cromatógrafo.

## **Modo de análisis**

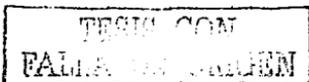
Se trabajará en modo de Monitoreo Selectivo de Iones (SIM) de este modo se volverá un análisis específico ya que únicamente se eligen determinados picos por lo que se obtendrían cantidades incluso en picogramos.

## **Método de cuantificación**

Debido a que no se cuenta con el patrón interno se utilizará el método de patrón externo realizando una curva de calibración obteniendo directamente los resultados de acuerdo a la correcta programación del equipo. Solo se reportarán los resultados cualitativos, los cuantitativos se presentarán solo en los casos legales en que así lo requieran, considerando el área bajo la curva del pico del analito con respecto del área bajo la curva del patrón.

## **Salida de Resultados de Análisis**

El cromatograma y espectros de masas mostrarán los picos característicos de la muestra a partir de la cuál se analizará el informe de picos obtenidos buscando en las bibliotecas del computador para la identificación. Para los datos de cuantificación se programará la curva de calibración en el formato especificado.



#### 4.7. CONTROLES DE CALIDAD

Como con todas las pruebas de laboratorio, hay que controlar continuamente el desempeño y confiabilidad del equipo así como de los patrones utilizados, documentando que se cumpla con la sensibilidad y especificidad requerida. El programa interno involucra el análisis diario de los materiales de control que pueden proveerse comercialmente siempre que el laboratorio posea las licencias apropiadas para manejar estas sustancias controladas. Los controles positivos y negativos deberán procesarse en la misma manera que los problemas o especímenes y deberán someterse a los mismos análisis rigurosos. Es importante para controlar las etapas del procedimiento (la extracción o preparación, selección, y confirmación), que, además de lo anterior se cumpla con lo siguiente:

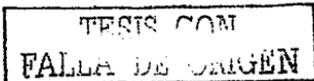
- Si el desempeño de la columna verificado el día de la prueba no es el idóneo será inaceptable también el resultado.
- Los resultados de las pruebas presuntivas serán las esperadas para psicocibina.

#### MEDIDAS PRECAUTORIAS

Un aspecto importante es garantizar que las condiciones de la columna se mantengan estables durante los análisis, para esto como medida de precaución deben cromatografiarse muestras controles antes y después de las muestras por confirmar. También las columnas deben acondicionarse al menos 30 °C por encima de la temperatura a la cual se van a realizar los análisis y durante 15 horas, no debiendo sobrepasar la temperatura máxima recomendada por el fabricante. Ahora cuando la droga se va a cuantificar es esencial realizar una curva de calibración al mismo tiempo que se están corriendo las muestras y por supuesto las muestras de la calibración deben estar en la misma matriz que las muestras por cuantificar. Es importante hacer notar que los puevados se preparan poco tiempo antes de realizar los análisis, debido a que algunos de ellos se pueden descomponer.

#### PROCEDIMIENTO

Proceder de acuerdo con el manual de operación del equipo.



#### 4.8. INTERPRETACIÓN

El hallazgo positivo indica el uso de la droga, pero no puede usarse el resultado para interpretar detenimiento o severidad del daño en la persona.

La composición de la psicobina será reportada del siguiente modo:

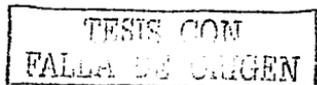
Orden de elusión.	Tiempo de retención.	Pico Base.	Ión Molecular.	Compuesto.	% Relativo.
1					
2					
3					
4					
5					
8					

Para el análisis cuantitativo será necesario ajustar el computador de acuerdo con el manual de operación del equipo para la obtención de este tipo de datos.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## 5. BIBLIOGRAFÍA

1. W. C. Bowman, M. J. Rand. Farmacología. Bases bioquímicas y patológicas, aplicaciones clínicas. Segunda edición. México D. F. Nueva editorial Interamericana S. A. de C. V.; 1984. Capítulos 15.20 a 15.25, 35.1 a 35.2 y 42.70 a 42.83.
2. J. Hardman, et al. Goodman and Gilman, las bases farmacológicas de la terapéutica. Volumen 1. 9ª edición. México D.F. Mc Graw-Hill Interamericana. 1996: 595-615.
3. <http://mx.geocities.com/lindoi48/Farmacodependencia.html>. Miércoles 8 de mayo de 2002 18:00 hrs.
4. Wasson R.G. El hongo maravilloso: teonanácatl: Micolandria en mesoamérica. México. Fondo de Cultura Económica. 1983.
5. Allen J W. Teonanácatl: Ancient and Contemporary Shamanic Mushroom Names of Mesoamerica and Other Regions of the World. Seattle: Pality Publication and RaverBooks; 1997: 3-34.
6. Benítez F. Los hongos alucinantes. 4ª edición. México. Era: 1979.
7. Singer R and Smith AH. Mycological investigations on Teonanácatl, the Mexican Hallucinogenic Mushroom. Part II: A Taxonomic Monograph of *Psilocybe*, Section *Caerulescetes*. Mycologia 1958;50:283-303.
8. <http://www6.gratiaweb.com/faqpsilocybe/faq.htm>. Miércoles 8 de mayo de 2002 20:00 hrs. Última actualización: 23 de Abril de 1999 por Erowid.
9. Compt. Rend Acad. Sci. Paris Heim R. Les chamalgnosdivinatoires utilices dans les rites des indiens Mazateques recueillis au cours de leurpremier voyage au Mexique en 1953. Te académie ;1956: 242.
10. Allen JW, Mark D and Karl LR. An Ethnomycological Review of Psychoactive Agarics in Australia and New Zealand. Journal of Psychoactive Drugs 1991;23(1):39-69.
11. Mantle W. Psilocybin in the sporphores of *Psilocybe semilanceata*. Trans. Brit 1969;53,302-304.
12. Hofmann A, Helm R, Brack A, Kobri H and Ott H. Psilocybin and Psilocin. swei psychotrope wirkstoffe aus mexicanischen rauschpilzen. Experientia 1958;14,397-409.
13. García MR. Cultivo de setas y trufas. Mundiprensa. 1991.
14. Benedict RG, Tyler VE, Watling R. Blueing in *Conocybe*, *Psilocybe*, and a *Stropharia* Species and the Detection of Psilocybin. Lloydia 1967;30(2),150-157.
15. Benedict RG et al. Occurrence of Psilocybin and Psilocin in Certain *Conocybe* and *Psilocybe* Species. Lloydia 1962;25(3),157-160.
16. Guzman G, Ott J. Description and Chemical Analysis of a New Species of Hallucinogenic *Psilocybe* From the Pacific Northwest. Mycologia 1976;68,1261-1267.
17. Leung AY, Paul AG. Baeocystin and Norbaeocystin: New Analogs of Psilocybin from *Psilocybe baecocystis*. J Pharm Sci 1968;57(10),1667-1671.
18. Repke DB, et al. Baeocystin in *Psilocybe*, *Conocybe* and *Panaeolus*. Lloydia 1977;40(6),566-578.
19. Levine WG. Observations on hydroxyindole oxidase. Biochemical Journal 1960;76,43.
20. N. S. Lobato. Identificación de psilocibina por cromatografía en capa fina [Tesis Licenciatura]. México, D.F. Facultad de Química, U.N.A.M. 1975. 8-24.
21. Levine WG. Formation of blue oxidation product from psilocybin. Nature 1967;215,1292-1293.
22. Catalfomo P, Tyler VE. The Production of Psilocybin in Submerged Culture by *Psilocybe cubensis*. Lloydia 1964;27(1),53-63.
23. Leung AY, Smith AH, Paul AG. Production of Psilocybin in *Psilocybe baecocystis* Saprophytic Culture. J Pharm Science 1965;54(11),1576-1579.
24. Smith C, Reynard A. Farmacología. Buenos Aires, Argentina. Editorial Médica Panamericana;1993:1088-1089.
25. Goth A. Farmacología médica. 6ª edición. México, D.F. Editorial interamericana;1993:72, 206,241,318-321.
26. Meyers F, Jawetz E, Goldfien A. Farmacología Clínica. México, D.F. Editorial el manual moderno, S.A.;1982:52,190-194.
27. Hofman A and Troxler F. Esteres of indoles. Chemical Abstract 1994;61,5613.



28. Susan Budavari editor. The Merck Index. Twelfth edition. Merck Research Laboratories. Division of Merck and CO, Inc.;1996:1262-1363.
29. E. M. Pérez. Psilocina y psilocibina [Tesis Licenciatura]. México. D.F. Facultad de Química. U.N.A.M.. 1972; 2-30.
30. Hofmann A, Frey A, Ott H, Petzlicca T and Troxler F. The structure and synthesis of psilocybin. *Experientia* 1958;14,397-399..
31. McKay J, Parkhurst R, Silverstein E and Skinner W. Analogs of psilocin and lysergic acid diethylamide. *Can. Journal Chem.* 1963;41,2585-2590..
32. Brack A, Hoffman A, Kalberer F, Kobel H and Rutschmann. Tryptophan as a biogenetic precursor of psilocybin. *Arch Pharm* 1961;294,230-234.
33. Argurell S. Biosynthesis of psilocybin in submerged culture of *P. Cubensis*. *Chemical Abstracts* 1966;64,18065.
34. Argurell S and Nilsson L. Biosynthesis of psilocybin, incorporation of labeled tryptamine derivatives. *Acta Chem. Scand.* 1968;22,1210-1218.
35. Bocks S. The metabolism of psilocine and psilocibyne by fungal enzymes. *Chemical Abstracts* 1968;68,75990.
36. Lars J and Nilsson G. Abiosynthetic sequence from tryptophan to psilocybin. *Tetrahedron Lett.* 1969;106344.
37. Ley General de Salud. Elaborada en México, D. F., a 26 de diciembre de 1983. Publicada en el Diario Oficial de la Federación el 7 de febrero de 1984. Última reforma aplicada 05/01/2001. Congreso de los Estados Unidos Mexicanos.
38. Código Penal para el Distrito Federal en Materia Común y para toda la República en Materia Federal. Título Séptimo. Artículo 197.
39. Quantitative analysis using chromatographic techniques. Katz E. John Wiley and sons. 1988. Perkin Elmer. U.S.A. 2-3, 20-21, 23-28,99-152, 157-189.
40. Bañuls D., et all. Cromatografía de Gases I. Madrid, España. Edit. Alambra, S.A. de C.V.; 1971:1-5,86-113.
41. Walker J, Jackson M and Maynard J. Chromatographic systems maintence and troubleshooting. New York, U.S.A. Academic Press Inc.;1977:95-113.
42. [http://www.chemkeys.com/esp/md/mds\\_7/cgced\\_1/](http://www.chemkeys.com/esp/md/mds_7/cgced_1/) Viernes 7 de junio de 2002. 20:00 horas.
43. Department of Health and Human Services. Pesticide Analytical Manual. volume 1: Multiresidue Methods. 3rd Edition. USA. Public Health Service Food and Drug Administration;1994.
44. Smith M and Busch K. Understanding mass spectra a basic approach. New York, U.S.A. John Wiley and sons, Inc.;1999:34-39,189-223.
45. Rose M and Johnstone R. Mass spectrometry for chemists and biochemist. New York, U.S.A. Cambridge University Press;1982:63-79.
46. Bañuls D., et all. Cromatografía de Gases II. Madrid, España. Edit. Alambra, S.A. de C.V.; 1971:122-176.
47. Joaquín Membrado Martínez/ Director de IBM, 1981.
48. Validación de sistemas críticos. Q.F.B. Enrique Vargas Pérez. VI Encuentro Universitario de Ciencias Farmacéuticas. 6 de Abril del 2000
49. Aponte P. Validación de procesos asepticos. Raytheon Engineers and Constructor. V Encuentro Universitario de Ciencias Farmacéuticas.
50. Guidance for Industry. Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology. United States. 1996;ICH:2-6
51. Validación de sistemas críticos. Q.F.B. Enrique Vargas Pérez, Bayer de México. México, D.F.
52. V Encuentro Universitario de Ciencias Farmacéuticas. 23 de Abril de 1999. Acapulco, México.
53. Lillsunde, et al. Comprehensive drug screening in urine using Solid-Phase extraction and combined TLC and GC / MS identification. *J. Anal. Toxicology* 1991;15,71-81.
54. Glen P, et al. Automated screening procedure using gas chromatography-mass spectrometry for identification of drugs after their extraction from biological samples. *J Chrom. B. Applic.* 1991;565,207-224.

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN