



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES "ZARAGOZA"

Métodos para la determinación de cocaína en cabello

TESINA
PARA OBTENER E TITULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA
Alcántara Moreno Mónica

México, DF, 2007



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.

Planteamiento del problema.....	3
Introducción	4
1. Marco teórico	5
1.1 Drogas de abuso	5
1.1.1 Cocaína	5
1.1.2 Mecanismo de acción	6
1.1.3 Vías de administración	7
1.1.4 Farmacocinética	7
1.2 El cabello	
1.2.1 Historia del análisis del cabello	7
1.2.2 Estructura y fisiología del cabello	8
1.2.3 Composición química	12
1.2.4 Suministro de sangre al folículo	12
1.2.5 Velocidad de crecimiento	12
1.2.6 Cambio de cabello	12
1.2.7 Mecanismo de incorporación de la droga en el cabello	13
1.3 Cromatografía de gases	13
1.4 Espectrometría de masa	22
2. Objetivo	23
3. Resultados	24
3.1 toma de la muestra	24
3.2 Pretratamiento y extracción de la muestra	24
3.3 determinación de cocaína	28
4. Discusión	29
5. Conclusiones	30
6. Bibliografía	31

PLANTEAMIENTO EL PROBLEMA

El gran aumento en el consumo de drogas de abuso, se ha convertido en un gran problema para la sociedad, ya que en muchos de los delitos que se cometen están involucradas las drogas de abuso. Por estas razones los investigadores forenses necesitan contar con técnicas para determinar drogas de abuso.

En este trabajo bibliográfico se investigaron algunas técnicas para determinar cocaína en cabello.

INTRODUCCIÓN

En nuestros días el consumo de drogas de abuso se ha incrementado considerablemente, por lo que también aumenta la necesidad de contar con medios para tratar de resolver este problema, desde como prevenir la drogadicción, como detectarla y tratarla.

Este gran aumento en el consumo de drogas de abuso, se ha convertido en un gran problema para la sociedad, ya que en muchos de los delitos que se cometen están involucradas las drogas de abuso. Por estas razones los investigadores forenses necesitan contar con técnicas para determinar drogas de abuso.

Para las determinaciones de drogas de abuso, el cabello tiene una gran importancia como evidencia, ya que presenta una gran resistencia a la destrucción y además tiene la gran ventaja de que muchos tóxicos se eliminan por el cabello, por lo que pueden ser determinados en él, cuando ya han desaparecido de otros puntos del organismo.

En este trabajo se trataran las técnicas para determinar cocaína en cabello, el análisis del cabello es un marcador extremadamente sensible del consumo de cocaína en las últimas semanas o meses.

1. MARCO TEÓRICO

1. 1 DROGAS DE ABUSO

Una droga se define como *"toda sustancia terapéutica o no, que introducida al organismo por cualquier vía, es capaz de actuar sobre el Sistema Nervioso Central y modificar la conducta del individuo"*

Las drogas de abuso se pueden definir como sustancias químicas, de origen ya sea natural o sintético, con efectos sobre el Sistema Nervioso Central, que pueden ser consumidas con fines no terapéuticos (1)

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define a la drogodependencia como un *"Estado psíquico y algunas veces físico, resultante de la interacción entre un organismo vivo y un producto psicoactivo y que se caracteriza por modificaciones de la conducta y por otras reacciones que incluyen siempre un deseo invencible de consumir la droga, continua o periódicamente, a fin de experimentar nuevamente sus efectos psíquicos y evitar a veces el malestar de su privación."*

1.1.1 Cocaína

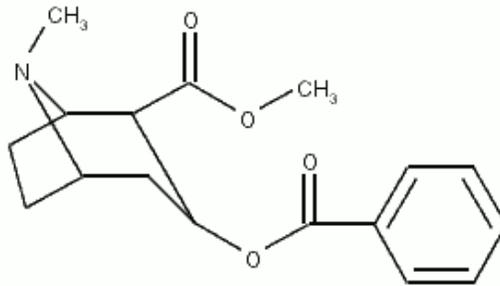
Las primeras referencias sobre el uso de las hojas de coca masticadas con fines estimulantes se remontan a 2000 años a.C., fue usada por primera vez con fines terapéuticos en 1596 y fue sintetizada por primera vez en 1858 por Albert Newmann (1)

La cocaína es un alcaloide que se obtiene de las hojas de coca, procedentes del árbol, *Erythroxylon coca*, que se cultiva principalmente en Perú y Bolivia (5)

Este compuesto es una 2-metil-3-bencilecgonina, que presenta un grupo amino hidrofílico, conectado por un grupo intermediario a un residuo aromático lipofílico.

Fórmula química : C₁₇H₂₁NO₄

Peso molecular: 303.35 g/mol



*3-benzoiloxi-8-metil-8-azabicyclo
[3.2.1]octano-2-carboxiato de metilo*

Básicamente hay dos formas químicas de la cocaína: la sal de clorhidrato y los cristales de cocaína. El clorhidrato es soluble en agua, alcohol y cloroformo, e insoluble en éter. Los cristales de cocaína resultan de calentar el clorhidrato de cocaína con amoníaco, bicarbonato de sodio y agua, para así eliminar el clorhidrato(6)

1.1.2 Mecanismo de acción

En el proceso normal de comunicación, las neuronas liberan dopamina dentro de la sinapsis, donde se une a los receptores de dopamina en las neuronas adyacentes. Normalmente las proteínas transportadoras de dopamina la reciclan a la neurona transmisora. Cuando se consume cocaína esta se adhiere a la proteína transportadora de dopamina bloqueando así la reabsorción de dopamina, resultando en una acumulación de dopamina en la sinapsis, causando una estimulación continua de las neuronas receptoras, lo que contribuye al efecto placentero de la cocaína (8)

1.1.3 Vías de administración

La cocaína puede administrarse por vía intranasal (inhalaando el polvo), pulmonar (fumada) o por vía intravenosa. Por vía oral es hidrolizada rápidamente en el estomago, inactivándose, por lo que es menos tóxica por esta vía. Por vía intranasal se aspiran *líneas* que contienen entre 15 y 25 mg de cocaína pura (1)

1.1.4 Farmacocinética

La cocaína se absorbe rápidamente por cualquier vía y tiene una vida media de aproximadamente 1 hora. El tiempo de comienzo de acción se correlaciona con la vía de administración (7)

Vía administración	Inicio acción	Máx. efecto	Duración acción
Inhalación (fumada)	3 - 10 seg	1 - 3 min	5 - 15 min
Intravenosa	10 - 60 seg	3 - 5 min	20 - 60 min
Intranasal u otra mucosa	3 - 5 min	15 - 20 min	60 - 90 min

Tabla 1 . farmacocinética de la cocaína en relación a la vía de administración

1.2 EL CABELLO

1.2.1 Historia del análisis del cabello

El primer caso de determinación de venenos en el cabello humano fue publicado en Caspers *Praktisches Handbuch der Gerichtlichen Medizine* (Guía Practica de Medicina Legal) por Hope en 1885. El encontró arsénico en el cabello de un cuerpo exhumado después de 11 años. Casi cien años después, en 1954 Goldblum determino anfetaminas en el pelo de un cerdo de Guinea. Baumgartner publico como extrajo opiáceos con metanol por calentamiento de 2 horas, después evaporo y reconstruyo en una solución amortiguadora y después examino con un radioinmunoensayo. En Alemania este método fue introducido por Arnold en 1980. Klug en 1980 impuso las condiciones del

análisis toxicológico del cabello, porque el confirmo los resultados radioinmunológicos por un método cromatográfico (10)

La primera determinación de cocaína en cabello humano fue hecha por Valente en 1980. el uso radioinmunoensayos para metabolitos de opiáceos y cocaína. El comparo procedimientos de extracción para optimizar el método y disminuir el límite de detección, comparó medios básicos y ácidos con agua, metanol y amortiguadores. En 1987 Balabanova y Homoki identificaron cocaína por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas. Cocaína, benzoilecgonina y ecgonina fueron identificadas por Kidwell en 1988 por pirolisis y MS/MS. En 1991 cocaína y los metabolitos benzoilecgonina, metilecgonina y norcocaína fueron cuantificadas por Cone. Kintz publico un método para distinguir entre cocaína fumada y otras administraciones(10)

1.2.2 Estructura y fisiología del cabello

El cabello esta compuesto de estructuras cilíndricas de células compactadas que crecen en pequeños órganos, llamados folículos. En el hombre el diámetro del tallo del cabello tiene un rango de 15 a 20 μm dependiendo el tipo de cabello y la región del cuerpo donde se localiza el folículo. El cabello contiene proteínas sulfuradas llamadas queratina. La queratina forma largas fibras, unidas por enlaces disulfuro con otras proteínas, lo que da como resultado una estructura fuerte y altamente estable(10)

El cabello esta compuesto de una raíz incluida en la piel y estructuras cilíndricas que forman el tallo.

La raíz del cabello esta incluida en el folículo piloso. Este representa un tubo que se extiende desde la superficie cutánea hasta la dermis y termina en un abultamiento llamado bulbo piloso. El bulbo se invagina desde abajo en el tejido conjuntivo laxo de la papila dérmica con vasos y nervios formando una depresión ovalada. Las células adyacentes a la papila forman la matriz del pelo. Ahí se encuentran los melanocitos, que ceden la melanina a la células basales, para dar el color al pelo(2)

ESTRUCTURA DEL TALLO DEL CABELLO

El tallo del cabello es la parte que sobresale de la piel y consiste de tres capas: cutícula, corteza y medula

La cutícula es una capa delgada, totalmente queratinizada, anucleada y transparente, esta formada por células que al principio son cúbicas, después se van aplanando, pierden el núcleo, se queratinizan y se hacen transparentes. La cutícula consta de 5-10 estratos de células que se superponen, cada célula de la cutícula mide aproximadamente 0.5 a 1.0 μm de grueso y aproximadamente 45 μm de largo. La cutícula representa la capa protectora del cabello contra la desecación y la penetración de sustancias extrañas, también da soporte al tallo del cabello en el folículo y protege las fibras interiores. Algunas veces la cutícula puede dañarse y destruirse por agentes químicos, calor, luz o daños mecánicos.

La corteza es la parte mas gruesa del cabello y esta compuesta por células queratinizadas, las cuales forman largas fibras de aproximadamente 100 μm de largo. Estas fibras se mantienen juntas por una sustancia química especial parecida al cemento. Entre las células de la corteza se encuentran pequeños espacios de aire, en la raíz estos espacios están llenos con fluidos, pero al crecer el cabello se seca y es reemplazado por aire. Los gránulos de pigmento también se encuentran en las células de la corteza, la cantidad, distribución y alineación de los pigmentos dan al cabello el color. La melanina (del griego *melas*, que significa negro) es el principal pigmento del cabello, de la piel y los ojos. La melanina es sintetizada en organelos llamados melanosomas localizados dentro del bulbo del cabello en pequeños cuerpos llamados melanocitos. La melanina se forma a partir del aminoácido tirosina por acción de la enzima tirosinasa. La corteza es la capa más gruesa del cabello y es la que le da la elasticidad, la resistencia a la rotura, la forma y el color. Esta constituida por células muertas.

La médula forma el cordón celular interno del pelo, pero su presencia no es constante, esta constituida por una columna de células que se empaquetan(2)

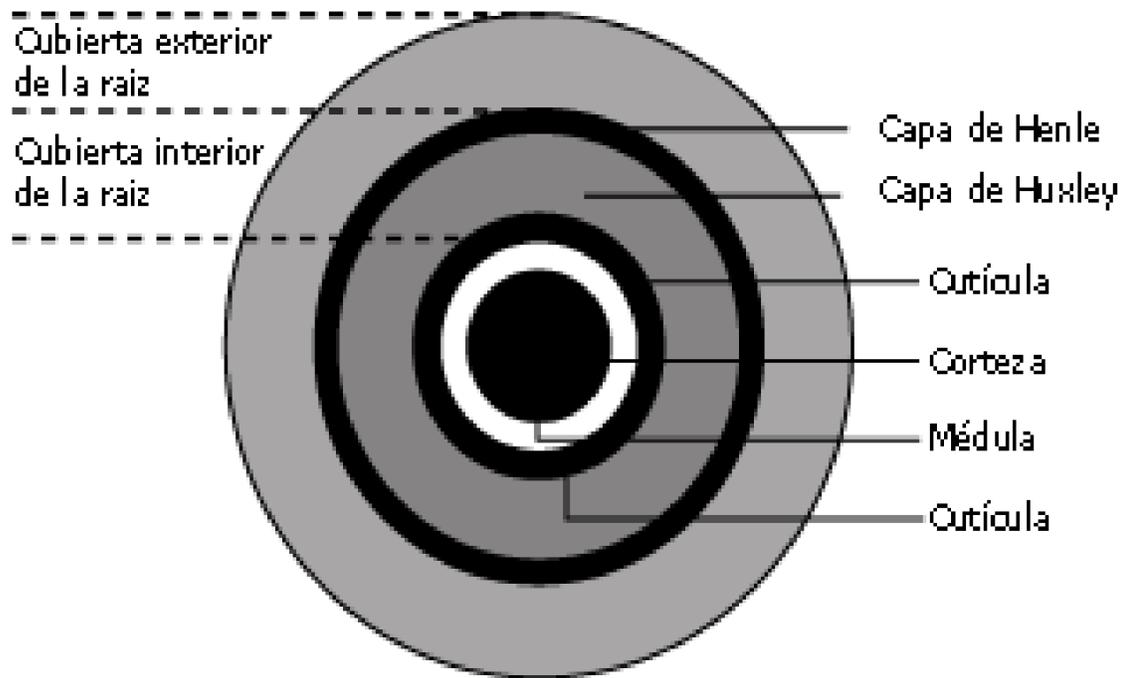


Figura 1. Capas del tallo del cabello

FOLÍCULO DEL CABELLO

Los folículos del cabello están fijados en el epitelio epidermal de la piel, aproximadamente 3-4 mm debajo de la superficie de la piel. El folículo del cabello se puede dividir en tres zonas a lo largo del eje del tallo del cabello. La zona más profunda, en y alrededor del bulbo, es el sitio de la síntesis de células. La siguiente sección localizada encima del bulbo, es el sitio de queratinización. La zona final, es la región del cabello permanente, aquí el tallo del cabello consiste de células deshidratadas. Las células crecen en la matriz, la cual se encuentra en la base del folículo. Como las células se dividen, incrementan en volumen y tamaño.

GLÁNDULAS SECRETORAS.

Glándulas que se asocian con el folículo del cabello.

Glándula sebácea

Esta glándula esta presente en toda la superficie de del cuerpo, excepto en las palmas y dorso del pie. Están localizadas debajo de la superficie de la piel y sus ductos salen directamente dentro del túnel del folículo. Como resultado, por la constante formación de cabello, este sale bañado en grasa antes de salir de la piel. La secreción de esta glándula, es una sustancia cerosa llamada sebo. La composición del sebo varia dependiendo del área, aproximadamente un tercio se compone de ácidos grasos libres, otro tercio de ácidos grasos combinados y el otro tercio de colesterol y ceras(11)

Glándula sudorípara

Esta glándula es un tubo que consiste de un segmento enrollado localizado en la dermis y de un ducto recto que abre sobre la epidermis. Agua, sales como sodio y potasio son los principales componentes del sudor, también contiene urea, aminoácidos, lactato y pirú bato(11)

1.2.3 Composición química

Del 65 al 95% del cabello son proteínas, del 15 al 35% agua, del 1 al 9% lípidos y el contenido mineral es del 0.25 al 0.95 %, también se pueden encontrar metales pesados en el cabello. El material lípidico consiste de ácidos grasos libres; mono, di y triglicéridos; ceras, hidrocarburos y alcoholes(9)

1.2.4 Suministro de sangre al folículo

Los folículos están rodeados de dos densas redes capilares. Abajo del bulbo se encuentra rodeado por un plexo vascular compuesto por largos vasos paralelos conectados por desviaciones cruzadas. La segunda red de vasos se localiza a nivel de la glándula sebácea la cual se extiende a la superficie de la piel. Como resultado el bulbo y la glándula sebácea se encuentran muy vascularizadas. Estas dos redes están conectadas por un sistema sencillo de vasos que desciende a lo largo de los lados del folículo(9)

1.2.5 Velocidad de crecimiento

En las mujeres el cabello crece con más rapidez, pero el vello corporal lo hace despacio. En el hombre sucede lo contrario. La formación del cabello es un proceso mitótico muy activo. La tasa de crecimiento es de 0,35 mm/día. Normalmente, el cabello crece a una velocidad de 1 cm/mes.

1.2.6 Cambio de cabello

El cabello no crece continuamente, sino que alterna entre periodos de crecimiento y quietud.

Fase de anagen

La fase de anagen esta acompañada por un incremento en la actividad metabólica de la matriz localizada al fondo del folículo, justo sobre la papila. El fondo del folículo es empujado mas abajo, dentro de la dermis por la continua división celular. El cabello nuevo comienza con células nuevas que se extienden y forman delgados filamentos que empujan en dirección ascendente dentro del canal folicular. Ahí, las células se diferencian en cutícula, corteza y medula y el proceso de queratinización es iniciado. Se considera que las drogas y elementos traza son incorporados en el cabello en este momento de intensa actividad metabólica.

Fase de catagen

Después del periodo de crecimiento activo, el folículo entra en esta corta fase de transición. Durante esta fase la división celular se detiene y la base del tallo del cabello llega a estar totalmente queratinizada y se seca. El bulbo empieza a degenerarse y el folículo se vuelve más pequeño.

Fase de telogen

Siguiendo el estado de transición, el folículo entra en un periodo de receso en el cual el tallo detiene completamente el crecimiento y es retenido en la porción superior del canal folicular donde puede ser removido fácilmente. El tiempo que dure el periodo de receso depende de la zona del cuerpo y la edad del individuo. Para el cuero cabelludo este periodo es corto, dura cerca de 10 semanas.

1.2.7 Mecanismos de incorporación de la droga en el cabello.

Transferencia por difusión pasiva

En este modelo la droga se mueve por difusión pasiva del torrente sanguíneo dentro de las células en crecimiento en la base del folículo y después en el interior del tallo del cabello durante la subsecuente queratogenesis. En este modelo, la incorporación depende de la concentración de droga en la sangre, es decir, depende de la cantidad de droga administrada. Como se asume que la velocidad de crecimiento del cabello es constante, la posición de la droga a lo largo del tallo del cabello se puede correlacionar con el tiempo que la droga estuvo presente en el torrente sanguíneo(12)

1.3 CROMATOGRAFÍA DE GASES

La *cromatografía* como un método físico de separación en el cual los componentes a separar se distribuyen entre dos fases, una de las cuales constituye la *fase estacionaria*, de gran área superficial, y la otra es un fluido (*fase móvil*) que pasa a través o a lo largo de la fase estacionaria.

En la cromatografía ocurren dos fenómenos muy importantes y que son prácticamente los rectores del proceso de separación: la *adsorción* y la *absorción*.

La adsorción es la retención de una especie química en los sitios activos de la superficie de un sólido, quedando delimitado el fenómeno a la superficie que separa las fases o superficie interfacial. Esta retención superficial puede ser física o química. La adsorción depende de la naturaleza de la sustancia adsorbida, de la temperatura, de la naturaleza y estado de subdivisión del adsorbente, y de la concentración. La absorción es la retención de una especie química por parte de una masa y depende de la tendencia que tiene ésta a formar mezcla o reaccionar químicamente con la misma.

El proceso cromatográfico, aparentemente simple en práctica, es en realidad una compleja unión de fenómenos tales como hidrodinámica, cinética, termodinámica, química de superficie y difusión.

Teoría de los Platos, una columna cromatográfica está constituida por una serie de platos que contiene una fase estacionaria. Supone que el volumen de fase estacionaria en cada plato es constante; que el volumen de fase móvil es constante de plato a plato; que en cada plato las dos fases están en equilibrio, y que el valor del Coeficiente de Distribución es constante e independiente de la concentración del soluto.

La principal desventaja de la Teoría de los Platos Teóricos es la falta de

conexión entre la eficiencia de la columna cromatográfica, el tamaño de la partícula, la difusión, la velocidad de flujo y la temperatura. La otra desventaja es que utiliza un modelo basado en muchas suposiciones.

La Ecuación que rige esta teoría es:

$$N = 16(tr/w)^2$$

La Teoría Cinética considera el proceso cromatográfico en función de los factores cinéticos que intervienen en él.

Siendo estos factores:

- Las múltiples trayectorias (diferentes rutas) que toma un soluto durante su movimiento (migración) a través del empaque de la columna, provocando variaciones en la velocidad del flujo.
- La Difusión Axial o Longitudinal del soluto en la fase móvil.
- La cinética de la resistencia a la transferencia de masa entre las fases móvil y estacionaria.

La Ecuación de Van Deemter,

$$\text{HETP ó } H = A + B/u + Cu$$

donde $u = L(\text{cm}) / t_{\text{aire}}(\text{seg})$

La cromatografía de gases es una técnica cromatográfica en la que la muestra se volatiliza y se inyecta en la cabeza de una columna cromatográfica. La elución se produce por el flujo de una fase móvil de gas inerte. A diferencia de los otros tipos de cromatografía, la fase móvil no interacciona con las moléculas del analito; su única función es la de transportar el analito a través de la columna. Existen dos tipos de cromatografía de gases (GC): la cromatografía gas-sólido (GSC) y la cromatografía gas-líquido (GLC), siendo esta última la que se utiliza más ampliamente, y que se puede llamar simplemente cromatografía de gases (GC).

La GC se lleva a cabo en un cromatógrafo de gases. Éste consta de diversos componentes como el gas portador, el sistema de inyección de muestra, la columna

(generalmente dentro de un horno), y el detector.

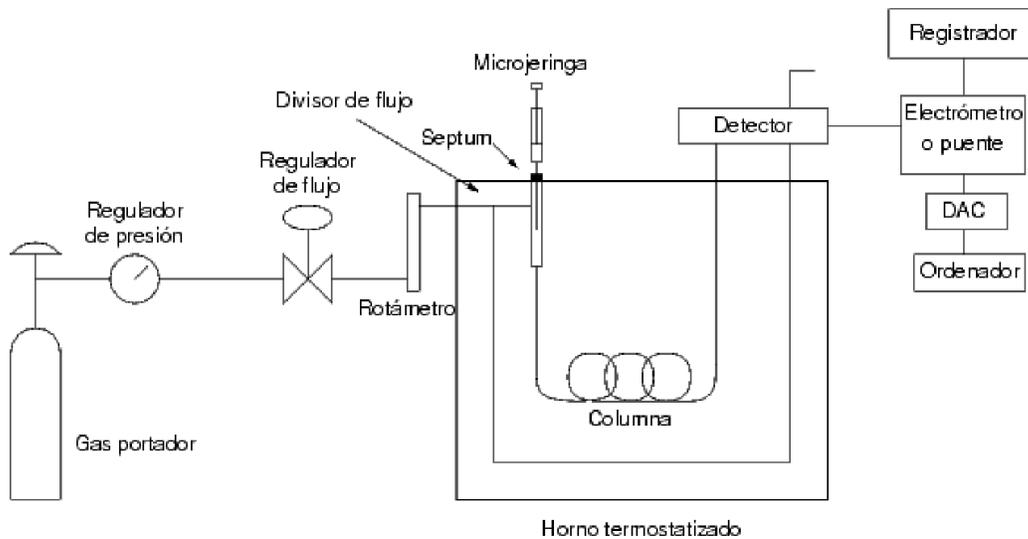


Diagrama de un cromatógrafo de gases

Gas portador

El gas portador debe ser un gas inerte, para prevenir su reacción con el analito o la columna. Generalmente se emplean gases como el helio, argón, nitrógeno

Sistema de inyección de muestra

La inyección de muestra es un apartado crítico, ya que se debe inyectar una cantidad adecuada, y debe introducirse de tal forma (como un "tapón de vapor") que sea rápida para evitar el ensanchamiento de las bandas de salida; este efecto se da con cantidades elevadas de analito. El método más utilizado emplea una microjeringa (de capacidades de varios microlitros) para introducir el analito en una cámara de vaporización instantánea. Esta cámara está a 50°C por encima del punto de ebullición del componente menos volátil, y está sellada por una junta de goma de silicona septa o *septum*.

Columnas y sistemas de control de temperatura

Las columnas de relleno consisten en unos tubos de vidrio, metal (inerte a ser posible como el acero inoxidable, cobre o aluminio) o teflón, de longitud de 2 a 3 metros y un diámetro interno de unos pocos milímetros, típicamente de 2 a 4. El interior se rellena con un material sólido, finamente dividido para tener una máxima superficie de interacción y recubierto con una capa de espesores entre 50 nm y 1 μm . Para que puedan introducirse en el horno, se enrollan convenientemente.

El material de relleno ideal consiste en pequeñas partículas, esféricas y uniformes, con una buena resistencia mecánica, para tener una máxima superficie donde interaccionar la fase estacionaria y el analito. La superficie específica mínima ha de ser de 1 m^2/g . Como todos los componentes de columnas para GC, debe ser inerte a altas temperaturas ($\sim 400^\circ\text{C}$) y humectarse uniformemente con la fase líquida estacionaria durante el proceso de fabricación. El material preferido actualmente (2005) es la tierra de diatomeas natural, debido a su tamaño de poro natural. Estas especies, ya extinguidas, utilizaban un sistema de difusión molecular para tomar nutrientes del medio y expulsar sus residuos. Por tanto, debido a que el sistema de adsorción superficial del analito y la fase estacionaria es parecido, son materiales especialmente útiles.

El tamaño es crítico a la hora de darse el proceso de interacción del analito, y a menores tamaños la eficacia de la columna es mejor. Pero existe el problema de la presión necesaria para hacer circular un caudal estable de gas portador por la columna, ya que dicha presión es inversamente proporcional al cuadrado del diámetro de dichas partículas. Así, el tamaño mínimo para usar presiones máximas de 50 psi es de 250 a 149 μm .

- Columnas capilares

Las columnas capilares son de dos tipos básicos: las de pared recubierta (WCOT) y las de soporte recubierto (SCOT). Las WCOT son simplemente tubos capilares donde la pared interna se ha recubierto con una finísima capa de fase

estacionaria. Las

columnas SCOT tienen en su parte interna una fina capa de material adsorbente como el empleado en las columnas de relleno (tierra de diatomeas) donde se ha adherido la fase estacionaria. Las ventajas de las SCOT frente a las WCOT es la mayor capacidad de carga de esta última, ya que en su fabricación se emplean mayores cantidades de fase estacionaria, al ser la superficie de intercambio mayor. Por orden de eficacia, en primer lugar están las WCOT, luego las SCOT y por último las columnas de relleno.

Las columnas WCOT se fabrican a partir de sílice fundida, conocidas como *columnas tubulares abiertas de sílice fundida* o FSOT. Estas columnas se fabrican a partir de sílice especialmente pura, sin apenas contenido de óxidos metálicos. Debido a la fragilidad inherente a este material, en el mismo proceso de obtención del tubo se recubre con una capa de poliimida, de esta forma la columna puede enrollarse con un diámetro de unos pocos centímetros. Estas columnas, con propiedades como baja reactividad, resistencia física y flexibilidad, han sustituido a las WCOT clásicas.

Las columnas FSOT tienen diámetros internos variables, entre 250 y 320 μm (para columnas normales) y 150-200 μm para columnas de alta resolución. Estas últimas requieren menor cantidad de analito y un detector más sensible, al eluir menor cantidad de gas. Existen asimismo columnas *macrocapilares* con diámetros de hasta 530 μm , que admiten cantidades de analito comparables a las de relleno pero con mejores prestaciones.

En estas columnas existe un problema debido a la adsorción del analito sobre la superficie de la sílice fundida, adsorción debida a la presencia de grupos silanol (Si-OH), los cuales interaccionan fuertemente con moléculas polares orgánicas. Este inconveniente se suele solventar inactivando la superficie por sililación con dimetilclorosilano (DMCS). La adsorción debida a los óxidos metálicos se ve paliada en gran parte por la elevada pureza de la sílice empleada.

En GC se emplean dos tipos de columnas: las *empaquetadas* o *de relleno* y las *tubulares abiertas* o *capilares*. Estas últimas son más comunes debido a su mayor rapidez y eficiencia. La longitud de estas columnas es variable, de 2 a 50

metros, y

están construidas en acero inoxidable, vidrio, sílice fundida o teflón. Debido a su longitud y a la necesidad de ser introducidas en un horno, las columnas suelen enrollarse en una forma helicoidal con diámetros de 10 a 30 cm, dependiendo del tamaño del horno.

La temperatura es una variable importante, ya que de ella va a depender el grado de separación de los diferentes analitos. Para ello, debe ajustarse con una precisión de décimas de grado. Dicha temperatura depende del punto de ebullición del analito o analitos, y por lo general se ajusta a un valor igual o ligeramente superior a él. Para estos valores, el tiempo de elución va a oscilar entre 2 y 30-40 minutos. Si tenemos varios componentes con diferentes puntos de ebullición, se ajusta la llamada rampa de temperatura con lo cual ésta va aumentando ya sea de forma continua o por etapas. En muchas ocasiones, el ajustar correctamente la rampa puede significar separar bien o no los diferentes analitos. Es recomendable utilizar temperaturas bajas para la elución, pero conforme la temperatura es mayor la elución es más rápida, pero corriendo el riesgo de descomponer el analito.

Detectores

El detector es la parte del cromatógrafo que se encarga de determinar cuándo ha salido el analito por el final de la columna. Las características de un detector ideal son:

- Sensibilidad: Es necesario que pueda determinar con precisión cuándo sale analito y cuando sale sólo el gas portador. Tienen sensibilidades entre 10^{-8} y 10^{-15} g/s de analito.
- Respuesta lineal al analito con un rango de varios órdenes de magnitud.
- Tiempo de respuesta corto, independiente del caudal de salida.
- Intervalo de temperatura de trabajo amplio, por ejemplo desde temperatura ambiente hasta unos 350-400°C, temperaturas típicas trabajo.
- No debe destruir la muestra.
- Estabilidad y reproducibilidad, es decir, a cantidades iguales de analito

debe dar salidas de señal iguales.

- Alta fiabilidad y manejo sencillo, o a prueba de operadores inexpertos.
- Respuesta semejante para todos los analitos, o
- Respuesta selectiva y altamente predecible para un reducido número de analitos.

Algunos tipos de detectores:

- Detector de ionización de llama (FID, Flame Ionization Detector).
- Detector de conductividad térmica (TCD, Thermal Conductivity Detector).
- Detector termoiónico (TID, ThermoIonic Detector).
- Detector de captura de electrones (ECD, Electron-Capture Detector).
- Detector de emisión atómica (AED, Atomic Emission Detector).
- La fase estacionaria

Las propiedades necesarias para una fase estacionaria líquida inmovilizada son:

Características de reparto (factor de capacidad k' y factor de selectividad α) adecuados al analito.

Baja volatilidad, el punto de ebullición de la fase estacionaria debe ser al menos 100°C mayor que la máxima temperatura alcanzada en el horno.

Baja reactividad.

Estabilidad térmica, para evitar su descomposición durante la elución.

Existen como mucho una docena de disolventes con estas características. Para elegir uno, debe tenerse en cuenta la polaridad del analito, ya que a mayor polaridad del analito, mayor polaridad deberá tener la fase estacionaria.

Algunas fases estacionarias utilizadas actualmente (2005) son:

- Polidimetilsiloxano, fase no polar de uso general para hidrocarburos, aromáticos, polinucleares, drogas, esteroides y PCBs.
- Poli(fenilmetidifenil)siloxano (10% fenilo), para ésteres metílicos de ácidos grasos, alcaloides, drogas y compuestos halogenados.
- Poli(fenilmetil)siloxano (50% fenilo), para drogas, esteroides, pesticidas y glicoles.

- Poli(trifluoropropildimetil)siloxano, para aromáticos clorados, nitroaromáticos, bencenos alquilsustituídos.
- Polietilenglicol, para compuestos como glicoles, alcoholes, éteres, aceites esenciales.
- Poli(dicianoalildimetil)siloxano, para ácidos grasos poliinsaturados, ácidos libres y alcoholes.

Generalmente, en columnas comerciales, la fase estacionaria se presenta enlazada y entrecruzada para impedir su pérdida durante las operaciones de elución o lavado. De esta forma se obtiene una monocapa adherida químicamente a la superficie de la columna. La reacción implicada suele ser la adición de un peróxido al líquido a fijar, iniciándose una reacción por radicales libres que tiene como resultado la formación de un enlace carbono-carbono que además incrementa su estabilidad térmica. Otra forma es la irradiación con rayos gamma.

Otro tipo de fase estacionaria son las quirales, lo cual permite resolver mezclas enantioméricas. Este tipo de fases suelen ser aminoácidos quirales o algún derivado adaptado al trabajo en columna.

El grosor de la película varía entre 0,1 y 5 μm ; el grosor depende de la volatilidad del analito. Así, un analito muy volátil requerirá una capa gruesa para aumentar el tiempo de interacción y separar más efectivamente los diferentes componentes de la mezcla. Para columnas típicas (diámetros internos de 0,25 o 0,32 mm) se emplean grosores de 0,25 μm , y en las columnas macrocapilares el grosor sube hasta 1 μm . El grosor máximo suele ser de 8 μm

1.4 ESPECTROMETRÍA DE MASA

En la espectrometría de masa la muestra es convertida en iones positivos de rápido movimiento, que luego se separan y caracterizan. La resolución se basa frecuentemente en diferencias en las trayectorias de los iones en su campo magnético o en un campo electroestático, o en ambos.

Los pasos para realizar la determinación, son los siguientes:

1. un micromol de muestra o menos es volatilizado y entra lentamente en la cámara de ionización
2. las moléculas de la muestra son ionizadas por una corriente de electrones que parte del filamento calentando hacia un ánodo (se forman iones positivos y negativos)
3. los iones positivos entran en un área de separación
4. en el área de separación, las partículas de rápido movimiento son sometidas a un fuerte campo magnético que hace que se desplacen en una trayectoria curva, cuyo radio depende de su velocidad y de su masa,
5. Partículas de diferente masa son enfocadas hacia la ranura de salida
6. Los iones que salen caen sobre un electrodo colector; la corriente de iones que resulta es amplificada y registrada como una función de la fuerza del campo o el potencial de la aceleración. Este método es de gran ayuda para determinar formulas moleculares y pesos moleculares.

2. OBJETIVO GENERAL

- 1 Realizar una revisión bibliográfica acerca de la determinación de drogas de abuso en el cabello.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 2 Describir los métodos para determinar cocaína en cabello.
- 3 Conocer las ventajas del cabello como matriz

3. RESULTADOS

3.1 Toma de la muestra

La sociedad del examen del cabello recomienda los siguientes criterios para la toma de la muestra(13)

1. El cabello debe ser recolectado de la parte posterior del vértice de la cabeza , cortando cerca del cuero cabelludo.
2. El análisis debe realizarse con un segmento de cabello medido.
3. Todas las muestras deben pasar por un proceso de descontaminación..
4. La descontaminación consiste de un primer lavado con un solvente orgánico, un segundo lavado con agua o una solución amortiguadora.
5. Todas las pruebas que den un resultado positivo deben ser confirmadas.

3.2 Pretratamiento y extracción de la muestra

En todos artículos los investigadores mencionan que el cabello debe ser sometido a una serie de lavados para eliminar la contaminación externa. Cada uno de los investigadores utiliza una técnica diferente para el lavado y extracción de la muestra

TECNICA 1

Tagliaro (14), primero cortó cerca de la raíz, alrededor de 20-100 mg de muestra de cabello, posteriormente lava el cabello con 30 mL de solución tween 20, al 0.3 % en agua y después enjuagar con suficiente agua. Después coloco la muestra toda la noche en ácido clorhídrico 0.25 M a 45°C, para realizar la extracción. Al termino de la incubación, la mezcla se neutraliza con hidróxido de sodio y se extrae dos veces con solvente orgánico, la fase orgánica es evaporada a sequedad y el residuo se reconstituye con 20 mL de agua.

TECNICA 2

Baumgartner(15), primero lavo 20 mg de cabello en 2 mL de agua, después lavo con solución amortiguadora de fosfatos, la cual es retirada y remplazada con solución fresca, posteriormente es lavado por 15 min en metanol y después en tres tiempos de 30 min en el buffer de fosfatos. Posteriormente se lleva a cabo la digestión de la muestra, a 20 mg de cabello lavado se le adicionan 20 mL de una solución (a 10 mL de solución amortiguadora pH 6.2 se le adicionan 60 mg de ditioneitol, 200 mg de dodecilsulfato de sodio y 200 unidades de proteinasa K), se coloca en un baño de agua a 37°C y agitar 80-100 rpm durante 16-18 hrs., después se retira del baño se agua, se centrifuga y se recolecta el sobrenadante.

TECNICA 3

Uhl (16), este investigador primero corto la muestra de cabello en segmentos (1-6 cm), los coloco en un microtubo, se le adicionan 1 mL de hexano (30 s) , seguido de 1 mL de acetona, el microtubo se coloca en un baño ultrasónico. Posteriormente la muestra se coloca en un filtro y los solventes son evaporados por corriente de nitrógeno. Se pesan 10 mg de la muestra y se transfieren a un tubo, se le adicionan 0.5 mL de metanol y estándar interno, el tubo se coloca en un baño ultrasónico (40° C) por una hora, después se centrifuga 15 min y se deja reposar toda la noche. La fase metabólica es decantada, se transfiere a un vial y se evapora a 40 °C bajo corriente de nitrógeno.

El residuo obtenido se derivativa con 50 mL de anhídrido pentafluoropropionico y 25 mL de hexafluoroisopropanol por 30 min a 70 °C. La mezcla se seca bajo corriente de nitrógeno a 25 °C y se reconstituye en 100 mL de acetato de etilo.

TECNICA 3

Cone, E (17) la técnica que utilizó este investigador es la siguiente: primero se colocan 10 mg del cabello cortado en pequeños segmentos en una columna de filtración, la columna se sella y se adiciona 10 mL de metanol, el metanol es recolectado. El cabello se vuelve a lavar con metanol y la fracción del enjuague se combina con la de lavado. Se le adicionan 25 ng de estándar interno y la fracción de lavado y enjuague son evaporadas. Después de lavar la muestra de cabello es enjuagada con metanol. La columna es tapada y colocada en un vial, el vial es encubado en un baño de agua a 40° después se enfría y la fracción metanólica es recolectada y se enjuaga con 0.5 mL de metanol. Las fracciones son combinadas y evaporadas a sequedad. Los residuos son reconstituidos con 3 mL de solución amortiguadora de acetatos 0.5 M, la cual contiene 0.5 % de fluoruro de sodio pH 6, después la muestra se coloca en una columna la cual es acondicionada con metanol agua y buffer de acetatos, después de la elución la columna es lavada con solución amortiguadora pH 4 y acetonitrilo. Posteriormente la columna es tratada con metilen clorhidr-2-propanol con hidróxido de amonio al 2%), la fracción que es eluida se recolecta y se evapora a sequedad en residuos reconstituidos con 20 mL de acetonitrilo y 20 mL de N,O bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA) con 1% de trimetilclorosilano (TMCS). La mezcla es calentada a 60° por 30 min.

TECNICA 4

Springfield (19), en esta técnica se colocan de 50 a 100 mg de muestra de cabello en un recipiente y se determina su peso. Se le adiciona 1 mL de metanol y se coloca en un baño de agua a 37 °C por 15 min. El metanol es recolectado en un tubo de vidrio. El proceso de lavado se repite dos veces más y el metanol de los tres lavados se combina. Se le adicionan 100 ng de estándar interno y el solvente es evaporado a sequedad. Al residuo se le adicionan 2 mL de ácido sulfúrico 0.05 M y estándar interno, se coloca nuevamente en un baño de agua a 37 °C.

Posteriormente para neutralizar el ácido se adiciona hidróxido de sodio 1.0 M Y 1 mL de acetato de sodio para ajustar el pH a 4. Para extraer se utiliza una columna, la cual se lava con 0.5 mL de agua, 1 ml de ácido clorhídrico 0.1 M y 2 mL de metanol.

TECNICA 5

Moeller(21), este investigador reporta que para eliminar la contaminación externa, el cabello primero se lava 5 min con agua tibia y 1 min en acetona y posteriormente se seca con aire caliente. La muestra es pulverizada. A la muestra pulverizada (10-30mg) se le adicionan 2 mL de solución amortiguadora de fosfatos pH 7.6 y 100ng de estándar interno. La muestra es hidrolizada 75 mL con b- glucuronidasa/ arilsulfatasa encubados 2 h a una temperatura de 40° C. Después de centrifugar, el sobrenadante es transferido a un recipiente limpio y se le adiciona 2 mL de buffer de fosfatos, se agita y se centrifuga. Para llevar a cabo la extracción se utiliza una columna acondicionada con 6 mL de metanol y 3 mL de agua. La columna se lava consecutivamente con 3mL de agua, 3 mL de bicarbonato de sodio 0.6 M Y 3 ml de agua, se seca y se centrifuga por 15 min a 4000 rpm. La droga que es absorbida en la columna se eluye con acetona/diclorometano(3:1). El eluyente es evaporado bajo corriente de Nitrógeno a 60 °C. el residuo obtenido se derivatiza con 100 mL anhidrido pentafluoropropionico y 70 mL de pentafluoropropanol por 30min a 60 ° C. la mezcla es secada con una corriente de nitrógeno a 60 C y reconstituida con 30 mL de acetato de etilo

TECNICA 6

Traldi (22), este investigador resumen el Pretratamiento de la muestra en algunos pasos:

1. Lavar con 10 ml de dietileter y 12 ml al 0.01 M HCl en un filtro de vidrio

poroso

2. Extraer con 2 ml de ácido clorhídrico al 0.5 M a 45°C por 16 h
3. Neutralizar con una cantidad equimolar de hidróxido de sodio
4. Amortiguar el pH y extraer en una columna secar en una corriente de aire
5. Los extractos secos se disuelven en un 1ml de metanol para poder analizar.

3.3 DETERMINACIÓN DE COCAINA

Una vez extraída la cocaína se puede analizar de varias maneras

Tagliaro determinó la cocaína por electroforesis capilar. Las condiciones analíticas son las siguientes: se utilizó un amortiguador de borato 0.050 M, pH= 9.2, se usó un capilar de sílica de 40 cm de largo, 50 μm i.d. un potencial de 15 kV, la detección es por UV a una longitud de onda de 238 nm. La separación se realizó en un capilar de 50 cm x 75 μm con un detector de arreglo de diodos(14)

Traldi determinó la cocaína por espectrometría de masas, utilizó un espectrómetro de trampa de iones. Los pares de iones usan valores de q_z en el rango 0.15-0.29, son obtenidos por la aplicación de un voltaje. Los valores de voltaje de excitación y tiempo de excitación se encuentran en un rango de 200-250 mV y 15-35 ms (22)

Kathryn determinó la cocaína por microscopía infrarroja, tomando en cuenta que se tiene una resolución de 10 μm , con esta técnica se eliminan los problemas de contaminación externa de la muestra, ya que la prueba es interna (26)

Los demás investigadores(28,30) utilizan la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas para determinar la presencia de la cocaína. En dos

artículos se utilizó una columna capilar (12 m x 0.2 mm I.D. X 0.33 μm), el gas usado fue helio, con una velocidad de flujo de 1 mL/ min la temperatura inicial fue de 70°C

4. DISCUSIÓN

En los artículos revisados en todos se menciona la importancia de que el cabello sea cortado de la parte posterior del vértice de la cabeza, cortando cerca del cuero cabelludo, esto se debe a que en esta parte es más probable que los cabellos se encuentren en la fase de anágena.

También los investigadores mencionan en todos los artículos llevar a cabo un lavado previo al cabello, no todos usan la misma técnica, pero todas coinciden en usar para el lavado un disolvente orgánico (la mayoría usa metanol), agua y una solución amortiguadora de fosfatos.

En cuanto a la determinación de la cocaína y sus metabolitos la mayoría de los investigadores la llevaron a cabo usando cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas.

5. CONCLUSIONES

Al realizar esta revisión bibliográfica podemos darnos cuenta que actualmente la técnica mas utilizada para la determinación de cocaína (y de muchas sustancias más) es el sistema acoplado de cromatografía de gases/espectrometría de masa, esto seguramente se debe a que la cromatografía nos permite separar los componentes de una mezcla compleja y la espectrometría de masa nos permite obtener un espectro único por medio de un patrón de fragmentación que es característico para cada sustancia, al acoplar estas técnicas se puede obtener información precisa de los componentes de la muestra y nos permite cuantificar.

También en esta revisión pudimos darnos cuenta que no se encontraron dificultades en el manejo del cabello como matriz y que esta matriz biológica es de gran ayuda cuando la muestra es muy antigua.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Calabuig G. Medicina legal y toxicología. 6ª ed. Ed. Masson, 2004: 1014, 1018, 1275, 1276.
2. Charlet E. Cosmética para Farmacéuticos. España: Ed. Acribia, 1996: 143,145-148.
3. Martínez MS. Medicina legal. México: UNAM,1977: 306- 311
4. Ogle RR, Fox MJ. Atlas of human hair microscopic characteristics. USA: CRC Press, 1999: 11, 22
5. Goodman . Las bases farmacológicas de la terapéutica.
6. National Institute on Drug Abuse. Consultada el 18 de abril del 2006-04-21
<http://www.nida.nih.gov/NIDAEspanol.html>
7. Enciclopedia libre. Consultada el 18 de abril del 2006
<http://es.wikipedia.org/wiki/droga>
8. Organización Panamericana de la Salud. Neurociencia del consumo y dependencia de sustancias Psicoactivas. USA: 2005: 89-90
9. Harkey MR, Anatomy and Physiology of hair, *Forensic Sci. Int.* 63, 9-18, (1993)
10. Sachs H, History of hair analysis, *Forensic Sci. Int.* 84, 7-16,(1997)
11. Fox S, Fisiología humana. España, McGRAW HILL, 2003:
12. Henderson G, Mechanisms of drug incorporación into hair. *Forensic Sci. Int.* 63,19-29,(1993)
13. Society of Hair Testing. *Forensic Sci. Int.* 84 3-6(1997)
14. Tagliaro F, High-sensitivity low-cost methods for determinación of cocaine in hair: high-performance chromatography and capillary electrophoresis. *Forensic Sci. Int.* 63,227-238,(1993)
15. Baumgartner W, Sample preparation techniquet. *Forensic Sci. Int.* 63,121-135,(1993)
16. Uhl M, Tandem mass spectrometry: a helpful tool in hair analysis for Forensic expert. *Forensic Sci. Int.* 107,169-179,(2000)

17. Cone E, The occurrence of cocaine, heroin and metabolites in hair of drug abusers. *Forensic Sci. Int.* 63,55-68,(1993)
18. Rang H, Dale M, Farmacología. 5ª ED.
19. Springfield A, Cocaine and metabolites in the hair of ancient Peruvian coca leaf chewers. *Forensic Sci. Int.* 63,269-275,(1993)
20. Felli M, Disappearance of cocaine from Human hair after abstinence. *Forensic Sci. Int.* 154,96-98,(2005)
21. Moeller M, Simultaneous determination of drugs of abuse (opiates, cocaine and amphetamine) in human hair by GC/MS and its application to a treatment program. *Forensic Sci. Int.* 154,96-98,(2005)
22. Traldi P, Ion trap mass spectrometry, a new tool in the investigation of drugs of abuse in hair. *Forensic Sci. Int.* 63,239-252,(1993)
23. Moeller M. Hair analysis as evidence in forensic cases. *Forensic Sci. Int.* 63,43-53,(1993)
24. Velázquez B,(1996), Farmacología básica y clínica. Ed. McGraw Hill, España.1996
25. Skoog, D, (1994), Análisis Instrumental, Madrid: McGraw-Hill. 84-481-0191
26. Kathryn S, Hair analysis by infrared microscopy for drugs of abuse. *Forensic Sci. Int.* 63,253-260,(1993)
27. Staub C. Supercritical fluid extraction and hair analysis: the situation in 1996. *Forensic Sci. Int.* 84,295--304,(1997)
28. Saito T, Determination of chronic methamphetamine abuse by hair analysis. *Forensic Sci. Int.* 112,65--71,(2000)
29. Tagliaro F, Hair analysis for abused drugs by capillary zone electrophoresis with field-amplified sample stacking. *Forensic Sci. Int.* 92,201-211,(1998)
30. Skender L, Quantitative determination of amphetamines, cocaine and opiates in human hair by GC/MS. *Forensic Sci. Int.* 125,120-126,(2002)