



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

***“UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO”***

***“FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA”***

***“DESARROLLO DE UNA METODOLOGÍA ANALÍTICA PARA LA DETECCIÓN  
DE METABOLITOS DE COCAÍNA EN CABELLO POR CROMATOGRFÍA DE  
GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS”***

***Tesis***

***Para obtener el título de:***

***Químico Farmacéutico Biológico***

***Presenta.***

***C. Edgar Raúl Hipatzi Serrano***

***Director de tesis:***

***M. en C. Elias Miranda González***

***Asesor de tesis:***

***Q.F.B. Patricia Vidal Millán***



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.

## **AGRADECIMIENTOS**

*Este Tesis no se habría podido preparar sin la generosa colaboración de familiares y amigos a quienes expreso mi agradecimiento:*

*A mi Abuelita y a mi madre que me han cobijado a lo largo de mi vida y que me han enseñando los valores que hoy en día me caracterizan como persona.*

*A mi tío Víctor, que su reflejo como estudiante me impulso a querer serlo.*

*A mi familia que de alguna manera he aprendido de cada uno de sus vivencias y me ha dado pauta a definir mis objetivos.*

*A mis maestros Q.F.B. Patricia Vidal Millán y Q.F.B. Pablo Juárez De Los Santos, quienes me prepararon para enfrentar a la adversidad académica y laboral.*

*A mis jefes M. en C. Elias Miranda González y Q.F.B LLara Ceballos Cruz que me brindaron la oportunidad de crecer profesionalmente.*

*A mi gran equipo de trabajo Q.F.B. Jair Suarez Hernández quien me brindo de su tiempo para discutir y desarrollar este trabajo y especialmente a Any Sulem Gómez Palafox de quien aprendí a darle colorido a este trabajo.*

*A todos mis compañeros y amigos que fueron influyendo a lo largo de mi carrera y que han aportado en mí experiencias que me han ayudado a desarrollarme como ser humano.*

## INDICE

1.	RESUMEN	2
2.	INTRODUCCIÓN.	3
3.	MARCO TEORICO.	7
3.1.	GENERALIDADES DE LA COCAÍNA.	7
3.1.1.	PROPIEDADES.	7
3.1.2.	FUNCIÓN DEL CEREBRO.	8
3.1.3.	MECANISMO DE ACCIÓN DE LA COCAÍNA.	9
3.1.4.	ESTANCIA EN EL CUERPO DE LA COCAÍNA.	9
3.1.5.	RIESGOS DEL CONSUMO DE COCAÍNA.	10
3.2.	GENERALIDADES DEL CABELLO.	10
3.2.1.	LA MATRIZ PILOSA.	10
3.2.2.	ANATOMÍA.	10
3.2.3.	FISIOLOGÍA.	11
3.2.4.	COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL CABELLO.	12
3.2.5.	FASES DEL CRECIMIENTO DEL PELO.	13
3.2.6.	VELOCIDAD DE CRECIMIENTO DEL CABELLO.	13
3.2.7.	MECANISMOS DE INCORPORACIÓN DE DROGAS A LA MATRIZ PILOSA.	14
3.2.8.	ASPECTO QUÍMICO.	17
3.3.	GENERALIDADES DEL ANALISIS.	18
3.3.1.	LAVADO.	18
3.3.2.	DIGESTIÓN Y EXTRACCIÓN.	20
3.3.3.	DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN.	21
3.4.	CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASAS.	23
3.4.1.	CROMATOGRAFÍA DE GASES.	23
3.4.2.	DERIVATIZACIÓN.	26
3.4.3.	ESPECTROMETRÍA DE MASAS.	28
4.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	31
5.	OBJETIVOS.	34
5.1.	GENERAL.	34
5.2.	PARTICULARES.	34
6.	HIPOTESIS.	35
7.	DISEÑO DE INVESTIGACIÓN.	36
7.1.	MATERIAL Y EQUIPO.	36
7.2.	MÉTODO.	37
7.3.	POBLACIÓN.	37
7.4.	CRITERIOS.	38
8.	PARTE EXPERIMENTAL.	39
8.1.	PREPARACIÓN DE SOLUCIONES PARA LA DETERMINACIÓN DE COCAÍNA.	39
8.2.	RECOLECCIÓN DE LAS MUESTRAS.	40
8.3.	LAVADO.	41
8.4.	DIGESTIÓN.	42
8.5.	EXTRACCIÓN.	42
8.6.	DERIVATIZACIÓN.	43
8.7.	MÉTODO INSTRUMENTAL.	43
8.8.	IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN.	43
8.9.	METODOLOGIA PASO A PASO.	44
9.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	45
9.1.	DETERMINACION DE CONDICIONES.	45
9.2.	RESULTADOS EN LA APLICACIÓN FORENSE.	47
9.3.	CURVA ESTÁNDAR.	51
10.	CONCLUSIONES.	55
11.	BIBLIOGRAFIA.	56
12.	ANEXO	60
12.1.	CROMATOGRAMAS DE UNA CURVA ESTÁNDAR.	60
12.2.	GLOSARIO.	63

## 1. RESUMEN

El cabello como matriz biológica es ya un análisis de elección para la determinación de consumo de drogas en drogodependientes que está dando auge constante debido a sus ventajas, pero no es del todo completa, ya que hay algunas limitaciones que desfavorecen hasta cierto punto el análisis de drogas de abuso. Pero la metodología elaborada a partir de una revisión de trabajos publicados sobre distintos aspectos de estos análisis de drogas en cabello, es una alternativa para usarla para un análisis rutinario de cocaína, el cual consta de 4 pasos generales que incluyen el lavado, la digestión, la extracción y la cuantificación. Ésta propuesta fue elaborada y aplicada en el Laboratorio Químico Clínico Azteca S.A. de C.V. en 5 muestras de policías que dieron positivo en el análisis presuntivo en orina, en un operativo antidoping realizado en el Estado de México, y a un persona de alto consumo de carácter, en el que se encontró positividad en los cinco policías con concentraciones de 1-5 ng, considerándolos como bajos consumidores. Estas muestras fueron sometidas siempre con un control negativo y positivo de cabello, este último fue contaminado con el objeto de encontrar la cresta buscada. El análisis fue cuantificado de acuerdo a una curva de estandarización construida estadísticamente por medio de 3 curvas elaboradas a partir de una solución estándar preparada de muestra decomisada en un operativo antidoping. Este análisis es un indicador del consumo o grado cronológico mas no estima el periodo de consumo en consumidores de cocaína

## 2. INTRODUCCIÓN

La cocaína es un narcótico el cual es usado con frecuencia por la población mexicana. Los usuarios de cocaína describen una sensación que denominan “alto efecto” que consiste en sentimientos de euforia, y eleva las experiencias sensoriales después de aspirarla, fumarla, o inyectársela debido a los niveles de dopamina alterados en el cerebro. La cocaína altera los circuitos en el cerebro, que están implicados en emociones y libre voluntad. La cocaína trabaja alterando el comportamiento de un neurotransmisor llamado dopamina y ésta es responsable de sensaciones de felicidad, movimiento del cuerpo, juicio, y motivación. La cocaína utiliza el mismo receptor en el cerebro que la dopamina, así que cuando la cocaína está presente hay un exceso de dopamina, esto causa sensaciones de placer y anima a consumir droga adicional. La dopamina controla las funciones básicas asociadas a comer, beber, dormir, y actividad sexual. Por ello sería indispensable realizar un examen toxicológico ya sea para la solicitud de un empleo, sospecha razonable, post-accidente, reincorporación al trabajo, seguimiento en rehabilitación o algún otro motivo, por lo que es indispensable contar con una técnica adecuada que no sea fácil de violar para la detección de esta droga de abuso. Entre otras aplicaciones, el análisis del cabello para la cocaína está encontrando su lugar en procedimiento de divorcio, en audiencias de custodia, casos de seguro, deportes, etc. Siendo claro que el análisis de cabello puede ser usado en campos clínicos, administrativos y forenses.

Hasta hace un par de décadas la prueba del cabello era muy limitada y poco recibida entre las autoridades forenses. A mediados de los ochenta, la evidencia del análisis del cabello se utilizó en cortes americanas en casos de criminales, militares y en áreas legales adicionales.

El análisis de cabello es relativamente una técnica nueva para el mundo forense, así como para el estudio antidoping. Ya que es un análisis que puede proveer el tiempo cronológico de consumo de droga. Esto es debido a que la droga se incorpora dentro de la matriz del cabello una vez que se ha ingerido la droga y conforme éste crece se va acumulando y permanece en el cabello hasta que se corta o se daña seriamente. La orina y la sangre son los métodos estándar aceptados para el análisis de drogas de abuso hoy en día, pero son solamente útiles si la muestra se toma en el plazo de 1-2 días de ingestión. El análisis de cabello puede demostrar a partir de meses y en algunos casos hasta años, el cual depende de la longitud del cabello. Desafortunadamente, la gente ha descubierto un numero de maneras de engaño para los análisis de sangre y de orina. En cambio, la prueba de cabello proporciona ninguna oportunidad para engañar.

El examen usual para detectar el consumo reciente de drogas de abuso es el análisis de orina que se conoce como control de drogas. En estos momentos se describen en revistas especializadas innumerables trabajos sobre los anales de cabello, pero todavía la comunidad científica no llega al consenso indispensable para determinar la exactitud, confiabilidad e interpretación de los resultados. Se requiere mayor investigación para llegar a establecer datos definitivos que permitan diferenciar claramente la incorporación interna de la contaminación externa, el efecto del tipo de cabello en la incorporación de la droga de abuso, tiempo de aparición de la droga, relación de la dosis versus concentración y los mecanismos de entrada de la drogas del cabello. En los controles de drogas normalmente se practican dos ensayos, uno inicial o presuntivo., generalmente de carácter inmunológico y una prueba de confirmación para la identificación de una sustancia específica.

Los metabolitos principales de interés que se forman de la cocaína y se encuentran en cabello son benzoilecgonina y cocaetilenosiendo los más comunes. Benzoilecgonina es el metabolito que es el más útil para el análisis del cabello porque es formado siempre por el cuerpo en presencia de la cocaína. Para que la cocaína que se metabolizará en cocaetileno, el usuario de debe también beber alcohol mientras que la cocaína está presente en su sistema. Porque éste no es el caso universal, los niveles del cocaetileno no se pueden utilizar como marcador absoluto de la cocaína. Los Metabolitos son provechosos en la determinación de si los altos niveles de la cocaína en la muestra son debido a la contaminación externa. Si la cocaína detectada es debido al uso de la droga, y el cabello por lo tanto internamente se contamina, entonces los metabolitos estarán presentes, no obstante, a menudo en cantidades pequeñas. El pelo externamente contaminado, no contendrá ningún metabolitos desde la droga nunca se incorporó en el sistema del sujeto donde podría ser metabolizado. Los metabolitos (benzoilecgonina, cocaetileno) se encuentran típicamente en cabello en 10-15% de la concentración de cocaína. Una preocupación al usar los metabolitos para evitar falsos positivos con respecto a uso ilícito de la droga es que algo de la cocaína en una muestra del pelo se puede convertir a benzoilecgonina durante la fase de la extracción. Se ha encontrado que el 5% de la cocaína presente se pueden convertir en la fase de extracción si se utiliza el tratamiento del ácido o de la base, mientras que no ocurra ningún cambio si se utiliza el tratamiento enzimático. Un problema con usar benzoilecgonina mismo en un análisis de rutina junto con la detección de la cocaína es ese metabolito benzoilecgonina, el metabolito más frecuente, es más polar que la cocaína y por lo tanto es mucho menos soluble en muchos extractores comunes. Otros metabolitos de la cocaína incluyen el éster

metilecgonina y norcocaína que son los resultados de la oxidación de la cocaína por P450 (CYPs) al lado de las colinesterasas del suero. Norcocaína se puede oxidar más a fondo a N-hidroxinorcocaína. Norcocaína es el único metabolito farmacológico activo de la cocaína.

El pelo fue considerado siempre por los toxicólogos, como un elemento importante para el estudio de determinados tóxicos, fundamentalmente el arsénico y otros compuestos metálicos, debido a sus propiedades. Aunque su aspecto es frágil es prácticamente indestructible, solo si se quema o se trata con ácidos fuertes se ve alterado de alguna forma.

Tal es así que es el estudio hecho al cabello de Napoleón, a más de cien años de su muerte se le encuentra arsénico. Y aquí comienzan las especulaciones ante el hallazgo...

...¿Fue asesinado Napoleón con este tóxico?

Pero también podríamos pensar que no fue así, sino que podría haber sido tratado de alguna dolencia con algún medicamento a base de arsénico, tan común en su época y de amplia aplicación a una serie de males.

... ¿Cuál es la verdad?

Estas especulaciones hechas sobre un hallazgo analítico concreto: el arsénico, y un hecho cierto, como es la muerte de Napoleón, nos muestra como estamos obligados a ser muy cautelosos ante la interpretación de un análisis pericial para que éste nos permita arribar a la verdad real. Los recientes estudios de Kintz y Col. (2002), confirman nuestra hipótesis.

El hallazgo de Cocaína en pelo fue reportado por primera vez en 1981, Arnold and Puschel; Valente et al. En éstos estudios las muestras de cabello provenían de adictos a drogas de abuso y fueron analizadas por Radioinmunoensayo (RIA), para detectar el metabolito de la cocaína Benzoilecgonina (BZE) a modo de verificar una historia previa de consumo. Luego le siguen estudios adicionales en corto tiempo: Baumgartner en 1982; Smith y Liu en 1986; Michalodimitrakis en 1987.

El primer procedimiento para detectar cocaína en cabello usando espectrocromatografía de masa (GC/MS) no fue reportado hasta 1987 (Balabanova y Homoki). Cuando fue usada ésta técnica más específica, se encontró que la Cocaína y no la BZE era el analito más importante en el cabello. Además se encontró que los metabolitos Benzoilecgonina (BZE) y Metilecgonina (MEC) están presentes en concentraciones bajas y variables.

Ante los hallazgos obtenidos toma gran impulso e interés el uso del cabello como matriz alternativa, comenzando a aparecer una gran cantidad de trabajos de investigación a nivel internacional intentando explicar los resultados analíticos observados; para abarcar su comprensión es necesario conocer los fundamentos de su composición, su anatomía y su fisiología así como los mecanismos de incorporación de drogas al pelo, la interpretación y utilidad de los resultados analíticos encontrados y los alcances y limitaciones que ofrece ésta matriz alternativa para que nos permita el hallazgo de drogas de abuso en cabello hay que arribar a la verdad real y no a la verdad aparente.

### 3. MARCO TEORICO

Varios métodos analíticos se utilizan para detectar y cuantificar las drogas de abuso y sus metabolitos en cabello, pero ninguno ha emergido como estándar aceptado. Típicamente, cada procedimiento incluye los pasos siguientes: colección del espécimen, lavado de la muestra, digestión o extracción de las muestras de cabello, prueba presuntiva y la confirmación o la cuantificación de los analitos. Las diferencias más grandes entre los métodos están en los pasos de la preparación de las muestras de cabello, ya que lo fundamental del método es prevenir alguna conversión de la cocaína en algún otro metabolito diferente en los procesos de la digestión y la extracción.

Aunque ha sido el tema de mucho escrutinio, los procedimientos que han desarrollado con los años son relativamente buenos. Hay muchas técnicas usadas, en cuanto al lavado de una muestra de cabello antes del análisis para la presencia de la cocaína. Estos pueden incluir lavado con champús, soluciones acuosas, agua, sustancias Buffer y solventes orgánicos como el cloruro de metileno, o acetona. Se debe tener cuidado al lavar una muestra de cabello con el objetivo de quitar la contaminación externa, asegurar que la cocaína ingerida (o interna) no sea eliminada. Los buffer y los solventes orgánicos polares pueden solubilizar la cocaína del cabello y hacer que las concentraciones en cabello difieran de las reales, y por lo tanto, no se recomienda su empleo.

#### 3.1. GENERALIDADES DE LA COCAÍNA.

##### 3.1.1. PROPIEDADES

Un gramo se disuelve en 600 mL de agua, 270 mL de agua a 80° C, 0.7 mL de cloroformo. 3.5 mL de éter, 12 ml de aceite de olivo, 30-50 mL de petrolato líquido, también soluble en acetona, acetato de etilo, LD<sub>50</sub> i.v. en ratas: 17.5 mg /kg, punto de fusión 98° C, punto de ebullición 187-188° C, pKa 8.61, pKb 5.59.

La cocaína es el principio activo, su forma de uso puede ser aspirada, diluida en suero por medio de vía intravenosa y en crack que es la forma sólida la cual es

fumada. Provoca efectos inmediatos como euforia y bienestar, a mayor dosis provoca paranoia, irritabilidad y reacciones violentas teniendo como consecuencias dependencia, problemas cardiacos, y circulatorios, reducción del impulso sexual y agrava problemas psiquiátricos.

### **3.1.2. FUNCIÓN DEL CEREBRO.**

El Cerebro funciona a base de impulsos eléctricos que van desde una neurona a otra. Esta es una célula específica del sistema nervioso central y se define en dos partes principales las terminaciones alrededor de su núcleo se llaman DENDRITRAS. La segunda parte es la gran "cola " de la célula. Sus terminaciones reciben el nombre de AXONES quienes son los que comandan las acciones del cerebro siempre pasando desde los axones de una neurona a las dendritas de otra.

Las neuronas nunca se tocan. Entre ellas queda un espacio de enlace llamado SINAPSIS. Para que una neurona pueda comunicarse con la próxima, sus axones liberan sustancias en la región de la sinapsis que serán recibidas por las dendritas de otra neurona.

Las sustancias liberadas reciben el nombre de Neurotransmisores que funcionan como mensajeros del sistema nervioso, llevando recados de una neurona hacia otra. Las drogas estimulan, inhiben o sustituyen a los neurotransmisores.

### **3.1.3. MECANISMO DE ACCIÓN DE LA COCAÍNA.**

Su mecanismo de acción comienza cuando uno de los neurotransmisores liberados por las neuronas (Dopamina), queda almacenada en pequeñas vesículas como una bolsa. Cuando éstas salen, llevan un mensaje de estímulo a las otras neuronas, dejándolas agitadas produciendo sensaciones de placer y euforia. Para pasar su mensaje, la dopamina se encaja en formaciones de las neuronas llamadas receptores, neuronas involucradas en el mecanismo de gratificación tienen receptores específicos para la dopamina y son muy sensibles al estímulo de ella.

Cuando la neurona que liberó la dopamina percibe que la neurona siguiente ya fue estimulada, una proteína en su membrana llamada transportador atrae a la dopamina de regreso para ser usada más tarde.

En el cerebro, llegada la cocaína, sus moléculas entran en la sinapsis y se ligan en los transportadores que tenían la misión de recoger la dopamina de regreso. Con los transportadores bloqueados, la dopamina permanece en la sinapsis. Con el bloqueo hecho por la cocaína, la concentración de dopamina se eleva dando como consecuencia una estimulación intensa en el sistema nervioso central quedando igual que el cerebro “conectado” propiciando una adicción en muy corto plazo.

### **3.1.4. ESTANCIA EN EL CUERPO DE LA COCAÍNA.**

La cocaína tiene un tiempo para surtir efecto que es de 3 a 5 minutos, así como una duración de efecto de 60 a 90 minutos y por último un tiempo en el cuerpo de 1 a 4 días.

### **3.1.5. RIESGOS DEL CONSUMO DE COCAÍNA**

La cocaína también aumenta la liberación de adrenalina, sustancia que acelera el bombeo del corazón, además de que la presencia de la cocaína disminuye el calibre de los vasos sanguíneos y aumenta la producción de glóbulos rojos, dejando a la sangre más espesa y estimula la producción de sustancias

coaguladoras, el efecto de todos estos factores aumentan la presión arterial, ya que con una presión mayor, el corazón ya acelerado trabaja aun más, haciendo un esfuerzo extra para bombear la sangre en los vasos de bajo calibre, pudiéndose agotar el órgano, teniendo como riesgo un ataque cardiaco que aumenta 24 veces más después del consumo de cocaína.

## **3.2. GENERALIDADES DEL CABELLO.**

### **3.2.1. LA MATRIZ PILOSA**

El cabello es un tejido complejo, cuya biología y fisiología no están completamente comprendidas. El cabello es un anexo de la piel, originado desde el folículo piloso donde se encuentran las células germinativas. Éstas células dan origen a los distintos estratos del cabello, incluyendo cutícula y médula. En el nacimiento las células están en activa proliferación mientras que en su extensión el metabolismo residual es prácticamente insignificante.

Hay similitudes estructurales básicas entre el cabello de distintos colores, origen étnico y de diferentes regiones del cuerpo. Los fundamentos en la composición del cabello, anatomía y fisiología han sido expuestos en sendos artículos por Harkey, y por Cone y Joseph.

### **3.2.2. ANATOMIA**

El pelo está compuesto morfológicamente por cinco componentes: cutícula, corteza, médula, gránulos de melanina y células complejas de la membrana. Cada una es diferente tanto en su morfología como en su composición química. El número de folículos pilosos en la cabeza del ser humano se encuentra entre 80.000 y 100.000, pero éstos disminuyen con la edad. Los folículos emergen de la dermis de la piel y se encuentran altamente vascularizados para alimentar y permitir el crecimiento del bulbo y raíz.

El bulbo en la base del folículo contiene células de la matriz que tienen la capacidad de cambiar morfológica y estructuralmente durante el crecimiento, formando distintas calidades de cabello, difiriendo en calidad y cantidad de proteínas y pigmentos.

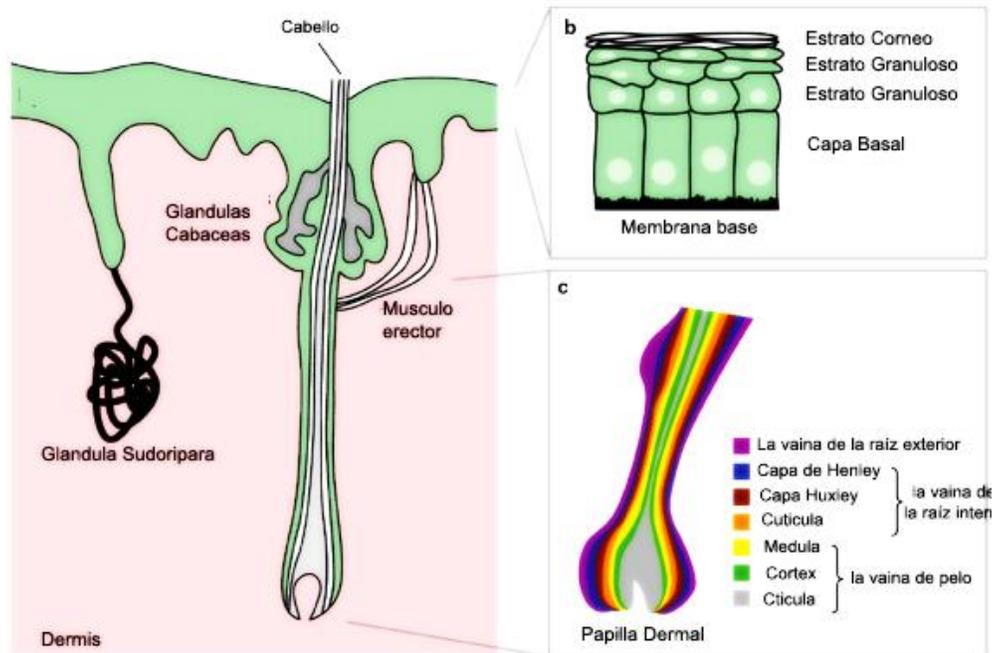
La estructura básica del cabello consiste en dos o tres cadenas de Queratina entrecruzadas en hebras llamadas microfibrillas que se encuentran organizadas en haces de microfibrillas abarcando todo el volumen de la corteza. Las hebras de pelo son estabilizadas y adquieren su forma por uniones disulfuro e hidrógeno que hacen que el cabello adquiera una estructura semicristalina.

En el folículo del pelo han sido identificadas enzimas de la familia Citocromo P 450 así como otras enzimas que proveen evidencia de que puede ocurrir metabolismo de drogas dentro de la estructura pilosa, sin embargo como la Queratinización del pelo se produce en dos o tres días ésta capacidad metabólica se encontraría muy restringida.

### **3.2.3. FISIOLÓGÍA**

La corteza del cabello contiene una capa protectora de células epiteliales. La cutícula es la capa más externa del cabello, le sigue una capa intermedia que es la corteza y la más interna es la médula. La cutícula es una capa cuya función sería la de proteger de la agresión del ambiente a las células de la corteza, por ejemplo de la radiación ultravioleta, agentes químicos y stress mecánico, pero a medida que el pelo envejece hay una degradación gradual de las células de la cutícula a lo largo de todo el pelo y por ende de su función protectora.

Es importante tener en cuenta que la cutícula puede ser total o parcialmente perdida en casos de enfermedades del pelo así como por tratamientos cosméticos, radiación ultravioleta, etc., factores que pueden influir en la fijación y estabilidad de drogas en el cabello.



**Figura 3.2.1.** Estructura de la piel y el folículo piloso, mostrando las diferentes capas que envuelven el espesor del cabello.

### 3.2.4. COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL CABELLO

- Proteínas fibrosas : 65 % a 95 % (alto % de queratinas)
- Lípidos : 1 % a 9 %
- Melaninas: % variable \*
- Sales minerales 0.25 % a 0.95 % (sobre peso seco)
- Sustancias hidrófilas
- Trazas de otros elementos
- Polisacáridos
- Agua 15% a 35 %

\* Dependerá del color del pelo.

pH de la matriz pilosa: ácida.

La dureza y fortaleza del cabello está determinada por la síntesis de proteínas dentro de las células de la matriz que a su vez pueden adquirir pigmentos y/o cantidades variables de melanina durante la diferenciación celular, a su vez los pigmentos determinarán el color final del pelo.

### 3.2.5 FASES DEL CRECIMIENTO DEL PELO

- Anagénico: fase de crecimiento: 4 a 6 años.\*
- Catagénico: fase de transición: pocas semanas.\*
- Telogénico: fase final: 4 a 6 meses.\*

(\*) Para cabello humano.

Los folículos pilosos continúan su crecimiento por un número variable de años pasando por distintas fases durante un ciclo normal de crecimiento. Aproximadamente entre un 85 a 90 % del pelo se encuentra en fase de crecimiento o fase anagénica; una pequeña porción de material piloso comienzan la fase catagénica en la cual hay disminución del rango de crecimiento que dura entre dos a tres semanas y es rápidamente seguida por la fase telogénica o fase de reposo del cabello, estadio durante el cual no hay crecimiento. Aproximadamente entre un 10 a 15 % del cabello del cuero cabelludo se encuentra todo el tiempo en la fase telogénica.

El posible largo del cabello y su grosor dependerá de la duración de cada una de éstas fases así como del rango de crecimiento. Es muy importante destacar que la duración de cada una de éstas fases, varía de una persona a otra y aún en distintas zonas del cuero cabelludo de una misma persona.

Otro aspecto a tener en cuenta y no de menor importancia es que hay sustanciales diferencias en el rango de crecimiento en la relación fase anagénica / fase telogénica entre pelo de cuero cabelludo y pelo de otras regiones del cuerpo, las cuales aún no han sido completamente investigadas. Por ejemplo, la fase telogénica del cabello púbico ocupa prácticamente la mitad de la vida total del cabello.

### 3.2.6. VELOCIDAD DE CRECIMIENTO DEL CABELLO

En cuanto a la velocidad de crecimiento del pelo, ésta oscila entre 0.7 y 1.5 cm /mes en cabello humano aunque existen diferencias por sexo, edad y etnicidad que según la misma puede aún ser de 0.3 - 1.8 cm/mes. Éste parámetro varía aún entre pelos del cuero cabelludo con respecto al pelo de otras regiones del cuerpo, (axilar, torácico, púbico, etc.) y lo que es más importante en un mismo

tipo de pelo, como ser pelo de cuero cabelludo entre distintos individuos, pero es de destacar que en un mismo individuo éste rango es variable según distintas épocas estacionales, situaciones como stress, alimentación, enfermedades de distinta etiología, alteraciones metabólicas y hormonales, etc.

Manguin y Kintz, determinaron concentraciones de Morfina y Codeína en distintos tipos de pelo como ser de cabellera humana, pelo axilar y pelo púbico en distintos casos de sobredosis a Heroína. Encontraron en sus estudios que la concentración de Morfina fue más alta en pelo púbico seguida del pelo de cabellera y en menor concentración en pelo axilar. El rango de la relación de Codeína a Morfina encontrado fue 0.054 a 0.273. Los autores lo justificaron por el menor rango de crecimiento del pelo púbico y la posible contribución de drogas que efectuarían el sudor y la orina a éste tipo de pelo.

El hecho de que el pelo se encuentre en distintas fases de crecimiento y de que se produzca el mismo en diferentes rangos es una consideración importante para determinar de qué región tomar la muestra para ser analizada. La región óptima de muestra de cabello es la posterior de la cabeza dado que en ella alrededor de un 85 % de los folículos se encuentran en fase anagénica y es además el tipo de pelo que presenta el mayor rango de crecimiento, siendo el crecimiento del pelo de la región del vertex en mujeres superior a 1.12 mm/día. También es interesante considerar que el pelo de mujeres presenta mayor rango de crecimiento que el de los varones.

### **3.2.7. MECANISMOS DE INCORPORACIÓN DE DROGAS A LA MATRIZ PILOSA**

No está totalmente clarificado el mecanismo de incorporación de drogas a la matriz del pelo y aún se sigue discutiendo sobre el mismo, aunque se proponen distintas posibilidades:

- Difusión pasiva de la droga desde la sangre a las células en crecimiento en el folículo piloso o durante la formación del eje piloso.
- Difusión o transferencia desde secreciones como ser sudor y sebo.
- Contaminación externa ambiental, después de la formación del pelo.

Henderson sugiere que las drogas pueden incorporarse al pelo en distintos sitios, por múltiples mecanismos y en varios momentos del ciclo de crecimiento del pelo.

Las drogas y /o sus metabolitos son distribuidos a lo largo del cuerpo del pelo básicamente por difusión pasiva desde la sangre. La distribución de drogas a través de las membranas celulares es facilitada generalmente por la alta solubilidad lipídica, baja unión a proteínas y factores físicoquímicos como la forma no ionizada de las drogas en la sangre. La difusión de drogas desde capilares de sangre arterial a las células de la matriz en la base del folículo piloso es considerada la causa principal de deposición de drogas en el pelo que presumiblemente se unen a pigmentos y otros componentes de la matriz.

El sebo es un material lipídico excretado por las glándulas sebáceas y que puede también contribuir a la deposición de drogas en el cabello. Éstas glándulas se hallan asociadas principalmente a los folículos pilosos, aunque algunas glándulas tienen ductos que les hace secretar sebo directamente a la superficie de la piel.

La concentración con que contribuye el sebo al depósito de drogas en el pelo se desconoce aún. Si la droga está presente en el sebo puede depositarse en el pelo a través de un íntimo contacto de éste con la piel del cuero cabelludo.

Kidwell y Blank sugieren que la mayor contribución de drogas en el pelo proviene del sudor y de la excreción sebácea que impregna el pelo, tanto durante su formación como en su maduración.

El sudor juega un rol importante en la incorporación de drogas en el pelo. Los analitos predominantes generalmente encontrados en pelo son las drogas intactas, o sea sin metabolizar en vez de los metabolitos más polares que preferiblemente predominan en orina. Esto es importante de tener en cuenta dado que por ejemplo la cocaína es rápidamente metabolizada a benzoilecgonina, estando presente en la sangre solamente por unas pocas horas luego de una administración de la misma, mientras que la benzoilecgonina persiste en la sangre durante 24 hs o por más tiempo aún. La cocaína es excretada en sudor en un rango de tiempo altamente variable, de 2 a 48 hs permitiendo éste amplio período transferir droga hacia el pelo.

En cuanto a la contaminación ambiental, estudios recientes indican que ésta contamina al pelo, dificultando entonces la distinción de una administración voluntaria de la droga de una involuntaria (administración pasiva) ante un resultado analítico positivo, lo que fue demostrado en el trabajo de investigación realizado en nuestro laboratorio, expuesto más adelante. Varios trabajos se han publicado reportando que la cocaína es absorbida dentro del pelo cuando se está en un ambiente donde se halla cocaína base vaporizada, así como en un ambiente cerrado donde se fuma Cannabis.

Las técnicas de lavado que se emplean para remover la droga que se encuentra externamente en el pelo pueden ser altamente eficientes. En contraste a éstos hallazgos, varios estudios indican que la contaminación externa originada por diferentes formas de exposición puede no ser totalmente eliminada por las técnicas de lavado aunque éstas sean intensivas así como los lavados con metanol según estudios publicados removerían más de un 70 % de la cocaína del pelo, proveniente de una exposición al vapor de la misma, pero cantidades significativas quedarían aún en el mismo.

La presencia de cocaína en la parte externa del pelo puede deberse a una exposición ambiental donde se fuma crack, partículas de cocaína en el mismo o soluciones acuosas de cocaína en el ambiente. Una de las formas que se sugieren para distinguir la droga proveniente de una contaminación externa, del uso voluntario de la misma sería encontrar metabolitos de la droga en la estructura íntima del pelo.

Cone. y Col., identificaron norcocaína y etilcocaína en el pelo de adictos a la cocaína. La norcocaína se forma por un metabolismo oxidativo de la cocaína mientras que la etilcocaína se forma por la administración simultánea de cocaína y alcohol debido a la acción de esterasas hepáticas. Se sugiere encontrar éstos metabolitos además de la benzoilecgonina y otros de la cocaína dado que la inestabilidad ambiental de ésta droga produce benzoilecgonina como un derivado de hidrólisis importante, por lo tanto podría ser administrada conjuntamente con la droga ilícita, por lo cual no sería relevante su hallazgo en un análisis de pelo para decidir si se debe la presencia de la droga a una administración voluntaria o a una involuntaria. En cambio la norcocaína y etilcocaína no son habituales compuestos de la droga ilícita pudiendo ser utilizados como indicadores de una administración voluntaria de la droga.

La identificación de metabolitos de la Heroína en cabello puede diferenciar adictos a la misma de usuarios a otro tipo de opiáceos. Goldberger y Col., identificaron Heroína, 6-monoacetilmorfina y morfina en el pelo de heroinómanos. La 6-monoacetilmorfina es encontrada en altas concentraciones en pelo, en cambio la morfina conjugada es el metabolito en mayor concentración en orina. En el estudio que realizaron en pelo sobre una población de 20 sujetos heroinómanos hallaron: Heroína en 7 casos y 6-monoacetilmorfina en 20 casos. Ninguna droga fue encontrada en el grupo de control libre de drogas. Éste hallazgo lo consideraron altamente significativo y sugirieron considerar a la 6-monoacetilmorfina como un metabolito específico de los heroinómanos ya que su presencia no puede implicar el uso de otros opiáceos.

### 3.2.8 ASPECTO QUÍMICO

Desde el punto de vista químico existen tres factores fundamentales para la incorporación de una droga en el cabello:

- Afinidad por la melanina.
- Lipofilia.
- Basicidad.

Los estudios científicos, muestran que la melanina juega un rol importante en la incorporación de drogas en el pelo. En estudios con animales se demostró que hubo una buena correlación entre la afinidad a la melanina y la incorporación de la droga en el pelo. En estudio con cabello humano se encontró que la concentración de drogas fijadas en pelo pigmentado es mucho mayor que en pelo claro.

Ha sido también documentado que la lipofiliidad es un factor clave para la fijación de las drogas en éste tipo de matriz. Por ejemplo: la cocaína y heroína son mucho mejor incorporadas a la matriz del pelo que la benzoilecgonina y la morfina, ya que las primeras son más liposolubles. Lo mismo puede decirse de la metanfetamina que es mejor incorporada que la acetilamfetamina por la misma causa, esto sugiere que la basicidad es un factor importante en la fijación de una droga en el pelo.

Una comparación de concentraciones en la relación de área bajo la curva (AUC), entre plasma y pelo, mostraron que cocaína, fenciclidina conocida como PCP y MDMA o sea metilendioximetanfetamina, (anfetamina de diseño conocida en la jerga callejera como Extasis), son mejor fijadas al pelo mientras que el delta 9 tetrahydrocannabinol es menos fijado; pero aunque éste último se fija con mayor dificultad, de hecho lo analizamos y hallamos en las muestras pilosas analizadas en el laboratorio.

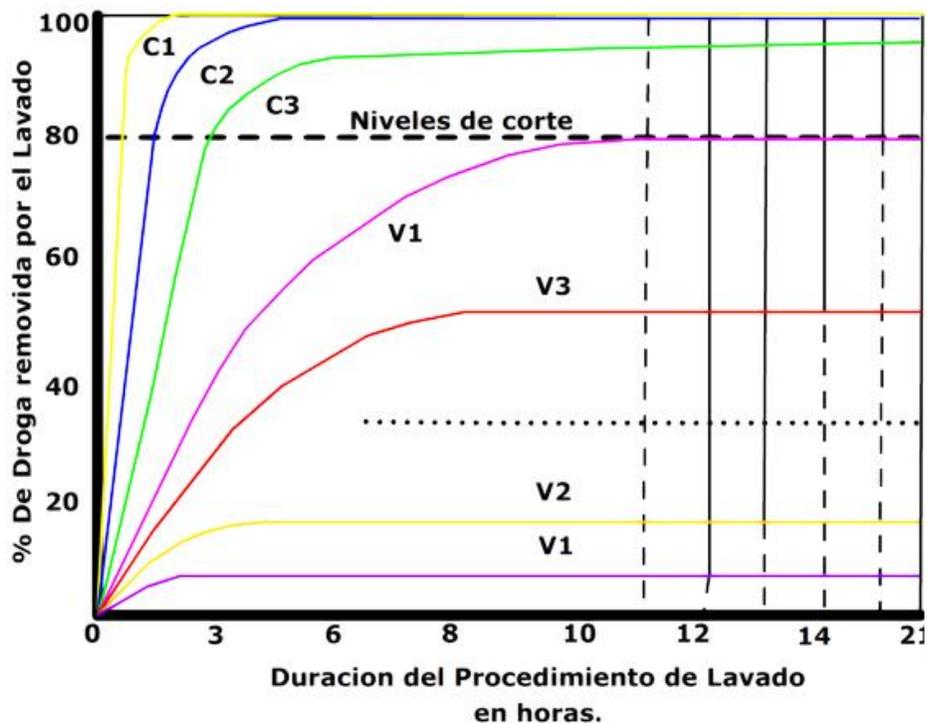
Si bien los mecanismos de incorporación de drogas no han sido aún completamente aclarados y aún existe discusión al respecto, evidentemente la concentración de drogas fijada en pelo, dependerán de la capacidad química de la droga para ser incorporada a la matriz del mismo, así como para ser retenida por la estructura del pelo.

### 3.3. GENERALIZADES DEL ANALISIS

#### 3.3.1. LAVADO

Hay tres dominios en el pelo, el dominio superficial, el dominio accesible, y el dominio inaccesible. El dominio superficial es la superficie del cabello y es donde ocurre la mayoría de la contaminación externa. El dominio superficial se puede lavar con los agentes como el etanol para el retiro de la contaminación externa. El dominio accesible es la porción central del eje del pelo y es levemente vulnerable a la contaminación externa. El dominio accesible se puede liberar de la contaminación externa usando los solventes que abren la matriz exterior del cabello. El agua es un solvente de uso frecuente para este propósito. El dominio inaccesible es el dominio en el que casi es imposible que se contamine por la exposición externa de drogas ya que en este caso ni el etanol ni el agua repercute en el dominio inaccesible del cabello, puesto que la cocaína injerida e ingerida permanece en el cabello mientras se elimina la contaminación externa.

El delicado equilibrio entre eliminar toda la contaminación externa y sin afectar la cocaína injerida se alcanza con dos procedimientos. Estos se denominan lavado rápido y lavado exhaustivo. El procedimiento rápido se utiliza en la investigación y es mucho más eficiente en cuestión de tiempo y más práctico. En el lavado exhaustivo el número y duración de los lavados son fijos para todas las muestras del cabello. El procedimiento incluye un lavado minucioso de una hora quince minutos en etanol seguido por tres horas y media con solución buffer de fosfato. El lavado exhaustivo se utiliza en casos criminales y otros casos donde es indispensable minimizar la posibilidad de un falso positivo. El procedimiento exhaustivo implica tomar la muestra, realizarle un lavado y a este realizarle un inmunoensayo que detecte niveles de cocaína, los lavados seguirán hasta que el valor detectado alcance una meseta, decreciendo posteriormente. En este punto se considera que el lavado es suficiente. La meseta es determinada por el cociente de la cantidad total de droga en el lavado del cabello a la cantidad total extraída por lavados. Si el cociente es 0.25 mayor que el lavado es completo. Los resultados del procedimiento exhaustivo de los lavados son considerados los mejores.



**Figura 3.3.1.** Representa gráficamente las concentraciones de la cocaína después de cada lavado en la figura.

La curva C1 refiere a una muestra que fue contaminada solamente en el dominio superficial. El C2 muestra una contaminación externa más severa en la cual el dominio interior accesible fue afectado por la contaminación. C3 es una muestra que fue contaminada donde el dominio interior inaccesible fue penetrado moderadamente. Se cree que una exposición tan severa como ésta en C3 daría lugar a un análisis de orina positivo también. Las curvas etiquetadas U en la figura representan las muestras positivas, muestra con un cociente más bajo que los niveles C. Las diferencias en los resultados de las curvas se diferencian en porosidad y el grueso del cabello usado en la prueba. La curva U1 es de una muestra muy gruesa y no porosa. La muestra U3 es muy porosa debido al tratamiento cosmético químico. La curva U4 es muy rara donde el cabello se encuentra extremadamente dañado que puede sesgar resultados porque la contaminación interna se quita durante los lavados. Esto puede ser prevenido usando otra clase de solventes durante el lavado.

Diversos solventes se utilizan en estos procedimientos dependiendo del tipo de cabello. El cabello poroso se trata con etanol y agua mientras que el pelo no poroso se trata con soluciones buffer de fosfatos. La porosidad de la muestra se puede determinar con azul de metileno; siendo poroso cuando después de un

enjuague se vea manchado el cabello en el microscopio. La porosidad puede ser causada por el tratamiento cosmético, diferencias de raza, o la mala preservación del cabello. Las conclusiones de varios estudios muestran que el lavado es necesario y han sugerido alternativas para la estandarización.

Después de que se lava la muestra del cabello, es necesario extraer las drogas y sus metabolitos del cabello. En el proceso de extracción se debe cuidar que la droga y sus metabolitos no se degraden, aunque muchos de ellos soporten hidrólisis ácidas o básicas severas. Los métodos de tratamiento sugeridos para la digestión del cabello son: tratamiento con hidrólisis alcalinas, hidrólisis ácidas, enzimáticos, u otros solventes orgánicos. Algunas sustancias específicas usadas en estas digestiones son TRIS, dodecil sulfato de sodio, la proteinasas K, y algunos buffers de fosfatos. Si la extracción ocurre cerca de un valor de pH de 6.2. El tratamiento con enzimas ha demostrado ser un paso seguro para su extracción empleando química húmeda porque no compromete la muestra de ninguna manera. Las extracciones ácidas y básicas sirven para hidrolizar la cocaína.

### 3.3.2. DIGESTIÓN Y EXTRACCIÓN

La extracción es el paso en el cual la droga es aislada de la matriz del cabello, se purifica, y se concentra. Un buen método de extracción debe aislar toda la droga del cabello y no degradar la muestra. Se ha estudiado la extracción con metanol, así como extracciones ácido/base y la extracción enzimática. La extracción con metanol es asombrosamente buena para muchas (pero no todas las) drogas, mientras que los ácidos y las bases pueden causar la hidrólisis, de los productos los cuales pueden ser idénticos a los metabolitos. La extracción enzimática es adecuada y se obtienen buenas recuperaciones, pero implica el uso de tóxicos desagradables. La extracción por los métodos líquidos es dependiente de trabajo, consumidora de tiempo, y es por lo tanto costosa. Una técnica de extracción que es popular y parece ser un candidato probable a la estandarización es la extracción de fluido supercrítico usando el CO<sub>2</sub>. La extracción de fluido supercrítico es fácil, rápida, suave, y no degrada la muestra del cabello. Las condiciones de la extracción que usan el CO<sub>2</sub> supercrítico pueden ser cambiadas fácilmente cambiando la presión, la temperatura. La muestra de cabello es primero "aclarada" con CO<sub>2</sub> supercrítico que no aislé a la cocaína de la matriz del cabello. Una solución denominada modificante, se agrega al CO<sub>2</sub> para permitir la extracción de la cocaína de la matriz del pelo. Algunos modificantes empleados son: CO<sub>2</sub>/MeOH/EtOH/H<sub>2</sub>O. La deserción de

la cocaína de la matriz es el punto crítico que limita la extracción, así que la extracción es muy dependiente en la matriz del cabello.

La extracción de fluido supercrítico da recuperaciones excelentes de la cocaína y de sus metabolitos, es simple, rápido, y se puede aplicar a muchos tipos de drogas. La extracción fluido supercrítico se puede también juntar fácilmente en línea con muchas técnicas cromatográficas para evitar la contaminación y dar una detección mejor.

### **3.3.3 DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN.**

Una variedad de métodos de detección también se utilizan en análisis de la drogas de abuso en cabello. La mayor parte de estas técnicas son cromatográficas, porque la cromatografía brinda la sensibilidad y la selectividad requeridas. La primera técnica utilizada no era sin embargo una técnica cromatográfica. Era el montaje del radioinmunoensayo, que todavía se utiliza en algunos casos para la investigación porque resuelve las necesidades de la sensibilidad, del rendimiento de procesamiento, y de la simplicidad necesaria en estos casos. Todos los resultados de esta técnica se deben verificar con GC-MS y esta técnica implica el usar los reactivos radiactivos. La especificidad de la técnica del análisis del radioinmunoensayo se limita a las clases de drogas y no permite la identificación específica de la droga. La cuantificación no es posible con esta técnica tampoco.

Las técnicas más populares incluyen el TLC, el HPLC, el LC, la Cromatografía Gaseosa, y GC-MS. Las técnicas cromatografía en capa fina (TLC) poseen una sensibilidad limitada, su rendimiento se mejora con la derivación química, lo que da lugar una técnica denominada de alto rendimiento (HPTLC). La detección con Fluorescencia se utiliza generalmente con la detección del TLC de la cocaína. La cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) es también útil para la detección de cocaína en muestras de cabello. Es más conveniente que otras técnicas cromatográficas para los extractos biológicos. La sensibilidad y la selectividad pueden ser excelentes con los detectores electroquímicos y de fluorescencia. Debido a que pueden manejar altas cantidades de trabajo y se automatizan fácilmente.

La cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) se considera el estándar de oro en la prueba de cabello. Casi todos los resultados positivos encontrados fueron confirmados por GC-MS y es generalmente la única prueba que se acepta en las cortes. GC-MS es la herramienta de elección porque tiene buena sensibilidad, selectividad, especificidad, un alto grado de estandarización, tiene un rendimiento de procesamiento de muestra, y

robustez del instrumento. La Cromatografía Gaseosa (CG) es una técnica utilizada para la separación y análisis de mezclas de sustancias volátiles. La muestra es volatilizada e introducida en un flujo de un gas apropiado denominado fase móvil (FM) o gas de arrastre. Este flujo de gas con la muestra volatilizada pasa por un tubo conteniendo 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) o sobre la propia pared del tubo (Cromatografía Gaseosa de Alta Resolución). 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 en estado gaseoso y más rápidamente avanza por el sistema.

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 y que es dado por la espectrometría de masas.

El espectrómetro de masas es un instrumento que permite analizar con una gran precisión la composición de diferentes elementos químicos e isótopos atómicos, separando los núcleos atómicos en función de su relación masa-carga ( $m/z$ ). Puede utilizarse para identificar los diferentes elementos químicos que forman un compuesto o determinar el contenido isotópico de diferentes elementos en un mismo compuesto. El espectrómetro de masas mide razones carga/masa de iones, calentando un haz de material del compuesto a analizar hasta vaporizarlo e ionizar los diferentes átomos. El haz de iones produce un patrón específico en el detector que permite analizar el compuesto químico. La ionización química es más sensible que el Inmunoensayo y está llegando a ser más popular. Las ventajas de GC-MS sobre otras técnicas incluyen una cantidad mínima de uso de la muestra y la capacidad de análisis para las siete drogas más importante es más funcional. La única crítica de GC-MS es que requiere la derivación de los compuestos extraídos y por lo tanto introduce un paso adicional con las labilidades asociadas.

## 3.4. CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASAS

### 3.4.1. CROMATOGRAFÍA DE GASES

La cromatografía es un método de separación basada en las diferentes interacciones entre los componentes de la muestra con la fase móvil y la fase estacionaria, a medida que los componentes migran a través de un medio de soporte. Los compuestos que interaccionen con más fuerza con la fase estacionaria se retienen durante más tiempo en el medio que aquellos que favorecen la fase móvil. Las técnicas cromatográficas se pueden clasificar de acuerdo con su fase móvil: cromatografía de gas líquida. En la figura se muestra un cromatograma típico que representa la concentración de cada compuesto detectable que eluye de una columna en función del tiempo. El tiempo de retención ( $t_R$ ) es el tiempo en que tarda un compuesto en fluir. Este valor es característico de un compuesto y se relaciona con la fuerza de su interacción, con la fase estacionaria y con la fase móvil. Así, el tiempo de retención puede emplearse para determinar la identidad de un compuesto. Este ejemplo, se separan para determinar la identidad de un compuesto. En este ejemplo, se separan dos compuestos y se representan sus tiempos de retención por ( $t_{R1}$ ) y ( $t_{R2}$ ). Estos son tiempos de retención sin corregir y se miden a partir del tiempo de inyección,  $t = 0$ .

La habilidad de una columna para separar dos compuestos dependen de dos factores: 1) la diferencia de retención de ambos compuestos o factor de capacidad ( $K'$ ), y 2) la amplitud de sus picos,  $W_b$ . El valor de  $K'$  puede calcularse a partir de la siguiente ecuación:

$$K = (t_{R1} - t_m) / t_m \text{ o } t_{R1}' / t_m$$

**Donde:**

$t_m$  es el tiempo de retención de un compuesto no retenido

$t_{R1}'$  es el tiempo de retención corregido

Otra medida derivada del cálculo del factor de capacidad es el factor de selectividad ( $\alpha$ ) o retención relativa de los solutos. Se emplea una relación de ambos factores de capacidad para calcular el factor de selectividad. Para medir la amplitud del pico deben trazarse tangentes a los lados del pico hasta la base.

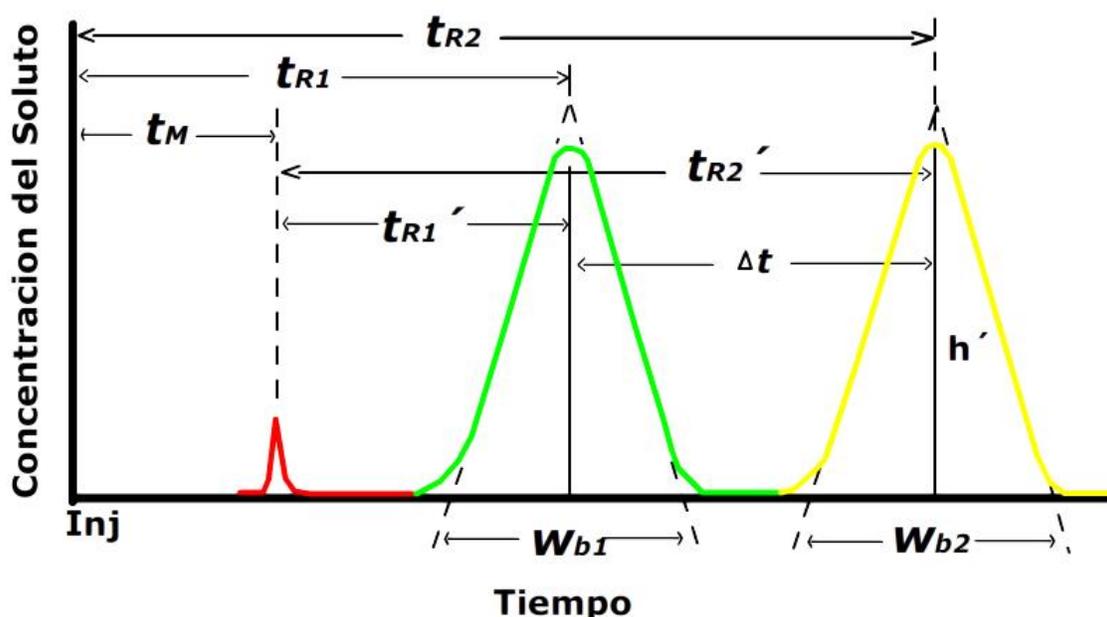
La distancia entre dos líneas intersectantes está representada por  $W_b$ . Para calcular el número teórico de placa ( $N$ ), se emplea la siguiente ecuación:

$$N=16(t_R/W_b)^2$$

Un número de placa no posee unidades, y cuanto mayor sea el valor de ( $N$ ) para una columna, mayor será la eficiencia de separación. Los efectos combinados de la eficiencia del disolvente y la eficiencia de la columna se expresan como la resolución ( $R_s$ ) de la columna.

$$R_s=2(t_{R2}-t_m)/(W_{b1} + W_{b2})$$

La concentración de un compuesto desconocido se averigua a partir de la altura máxima ( $h'$ ) del pico y puede calcularse empleando un integrador o el método de estandarización interna.

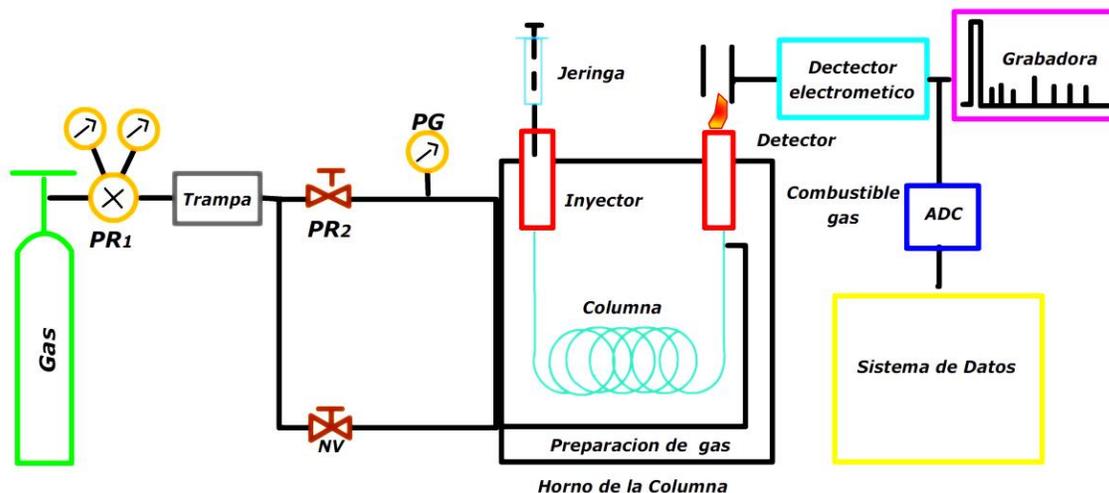


**Figura 3.4.1.1** Muestra dos compuestos que fueron separados por la columna cromatográfica, desde un tiempo inicial, en el que se fueron eluyendo de acuerdo a su polaridad, teniendo un tiempo de retención característico para cada compuesto.

La cromatografía de gases (GC) es útil para los compuestos que son volátiles en su estado natural o que pueden convertirse con facilidad en una forma volátil. La GC ha sido un método ampliamente utilizado desde hace décadas gracias a su elevada resolución, bajos límites de detección, precisión y corto tiempo de análisis. Sus aplicaciones incluyen varias moléculas orgánicas, incluyendo drogas de abuso. La retención de un compuesto en una GC está determinada por su presión de vapor y su volatilidad, las cuales, a su vez, dependen de su interacción con la fase estacionaria.

Dos tipos de fase estacionaria muy utilizados en la GC son un sólido absorbente (cromatografía de gas-sólido [GSC]) y líquidos que recubren soportes sólidos (cromatografía de gas-líquido [GLC]). En la GSC, el mismo material (generalmente aluminio, sílice o carbono activado) funciona como fase estacionaria y como soporte. Aunque éste fue el primer tipo de fase estacionaria desarrollada, no tiene un uso tan extendido como otros tipos debido, principalmente, a la fuerte retención polar y la baja cantidad de solutos volátiles de la columna. La GLC utiliza fases líquidas como polímeros, hidrocarburos, fluorocarburos, cristales líquidos y sales orgánicas volcánicas para recubrir el soporte de material sólido. La arena de diatomeas separada en rangos de tamaño apropiados se usa con frecuencia como fase estacionaria porque es una sustancia inorgánica estable. El uso de columnas capilares de sílice fundido, en las que la fase estacionaria está químicamente unida a la superficie interna de la columna, se está haciendo cada vez más popular entre los cromatógrafos. La ventaja de este tipo de columna es que la fase estacionaria no sale del soporte sólido y pasa al detector, y se consigue una capa monomolecular uniforme de fase estacionaria mediante el proceso de conjugación química.

En la Figura 3.4.1.2 se ilustran los componentes de un sistema típico de GC. Su diseño básico consiste en cinco componentes: un cilindro de gas como fuente de fase móvil, un inyector de la muestra, una columna, un detector y un ordenador para la adquisición de datos. Estos sistemas pueden estar automatizados para dar al usuario una separación más precisa y eficiente. La fase móvil (gas de arrastre) empleada en la cromatografía de gases suele ser un gas inerte como el nitrógeno, helio, hidrógeno o argón. Otras sustancias empleadas como fase móvil incluyen vapor y fluidos supercríticos. Ejemplos de éstos son el dióxido de carbono, el óxido nitroso y el amonio. El gas de arrastre debe ser de gran pureza, y el flujo debe estar muy controlado para asegurar una eficiencia óptima de la columna y la reproducibilidad de los resultados. Las muestras se introducen en la GC mediante una jeringa hipodérmica o un sistema automatizado. Una aguja atraviesa un septo elástico contenido en el interior del puerto inyector. Cada puerto inyector se calienta a temperaturas muy elevadas. Las muestras se vaporizan y pasan al interior de la columna. Si la molécula de interés no es suficientemente volátil para una inyección directa, es necesario derivarla a otra forma más volátil.



La Figura 3.4.1.2 Representa los componentes esenciales de un Cromatógrafo de Gases acoplado a un Espectrómetro de Masas.

### 3.4.2. DERIVATIZACIÓN

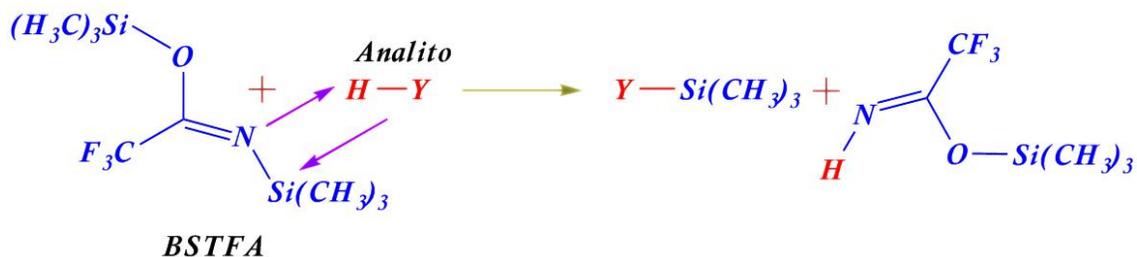
La derivatización es el proceso en el que se modifica químicamente un compuesto para producir uno nuevo que contenga propiedades que le sean satisfactorias para el análisis de GC.

Esto permite el incrementar la volatilidad de sustancias polares de alto peso molecular, incrementa la estabilidad y aumenta la detectabilidad, minimizando las pérdidas en la manipulación y ayuda a separar los picos de las muestras de los picos del solvente, así como también reduce la absorción en la superficie activa de las paredes de la columna.

La mayoría de las reacciones de derivación pertenecen a uno de los tres grupos siguientes: sililación, alquilación y acilación. La sililación es la técnica más común que sustituye hidrógenos activos de los compuestos por grupos de trimetilsilil (TMS), la cual ocurre por un ataque nucleofílico (SN2), donde los reactivos de sililación primeramente reaccionan con el agua y grupos alcohol (primario > secundario > terciario), seguidos de grupos Carboxilo > Amina > Amida. Estos reactivos requieren de calor con temperaturas menores de 60 °C cerca de 10-15 min para prevenir un rompimiento. Esta sustitución nucleofílica resulta en una forma más volátil que además es menos polar y más estable térmicamente.

La acilación en comparación con la sililación, es que los reactivos acilizantes actúan con moléculas altamente polares, así como con componentes

multifuncionales como carbohidratos y aminoácidos. Y la alquilación es usada para modificar hidrógenos ácidos como los ácidos carboxílicos y los fenoles, formando ésteres o éteres, teniendo como ventaja que puede ser usado en la sililación y la acilación. Ejemplos de otras técnicas de muestreo son el muestreo *heads-space* y la pirólisis.



**La Figura 3.4.2.1** Mecanismo de Reacción General de la derivatización.

La retención de compuestos en una columna de GC también puede ajustarse modificando la temperatura de la columna. La temperatura de la columna afecta a la volatilidad de los compuestos y, por tanto, al grado de su interacción con la fase estacionaria. Mediante la selección apropiada de la temperatura de comienzo y la temperatura del gradiente durante el proceso puede conseguirse una buena resolución tanto de compuestos fuertemente retenidos como de los que se retienen débilmente. La columna de GC, encerrada en un horno de temperatura controlada, puede ser una columna empacutada o una columna capilar. Las columnas empacutadas normalmente son de 1 m a 5 m de largo y de 2 mm a 4 mm de diámetro, y están rellenas de una fase estacionaria. Las columnas capilares oscilan entre 5 m y 100 m de longitud, y de 0,1 mm a 0,8 mm de diámetro, y poseen la fase estacionaria en su superficie interior. Las columnas capilares generalmente poseen una mayor eficiencia y mejores límites de detección. Sin embargo, las columnas empacutadas poseen una mayor capacidad, haciéndolas más útiles para los trabajos de purificación. Los ejemplos de detectores empleados en una GC incluyen un detector de ionización de llama, un detector de conductividad térmica, un detector de fósforo de nitrógeno, un detector de captura electrónica, un detector fotométrico de llama y un detector espectrofotométrico de masas. Los detectores de ionización de llama (FID) son ampliamente utilizados y son capaces de detectar casi todos los compuestos orgánicos y muchos inorgánicos. Este tipo de detector mide los iones producidos por los compuestos cuando se queman con una llama de aire de hidrógeno. Los iones son recolectados por un electrodo, de modo que se produce una corriente eléctrica. Generar resultados a partir de la señal análoga producida por el detector se consigue gracias a

sistemas basados en microprocesadores. Pueden ser integradores personales, estaciones de trabajo o sistemas de automatización de laboratorio.



**La Figura 3.4.2.2.** Las columnas capilares son de sílice fundido-(vidrio purificado de silicato) capilar (normalmente 10-100 m de longitud y 250  $\mu$  m de diámetro interior), que ha revestido la fase estacionaria en la superficie interior. Las columnas capilares proporcionar mucho mayor eficiencia de separación de las columnas empaquetadas, pero son más fáciles de sobrecarga por el exceso de muestra.

### 3.4.3. ESPECTROMETRÍA DE MASAS

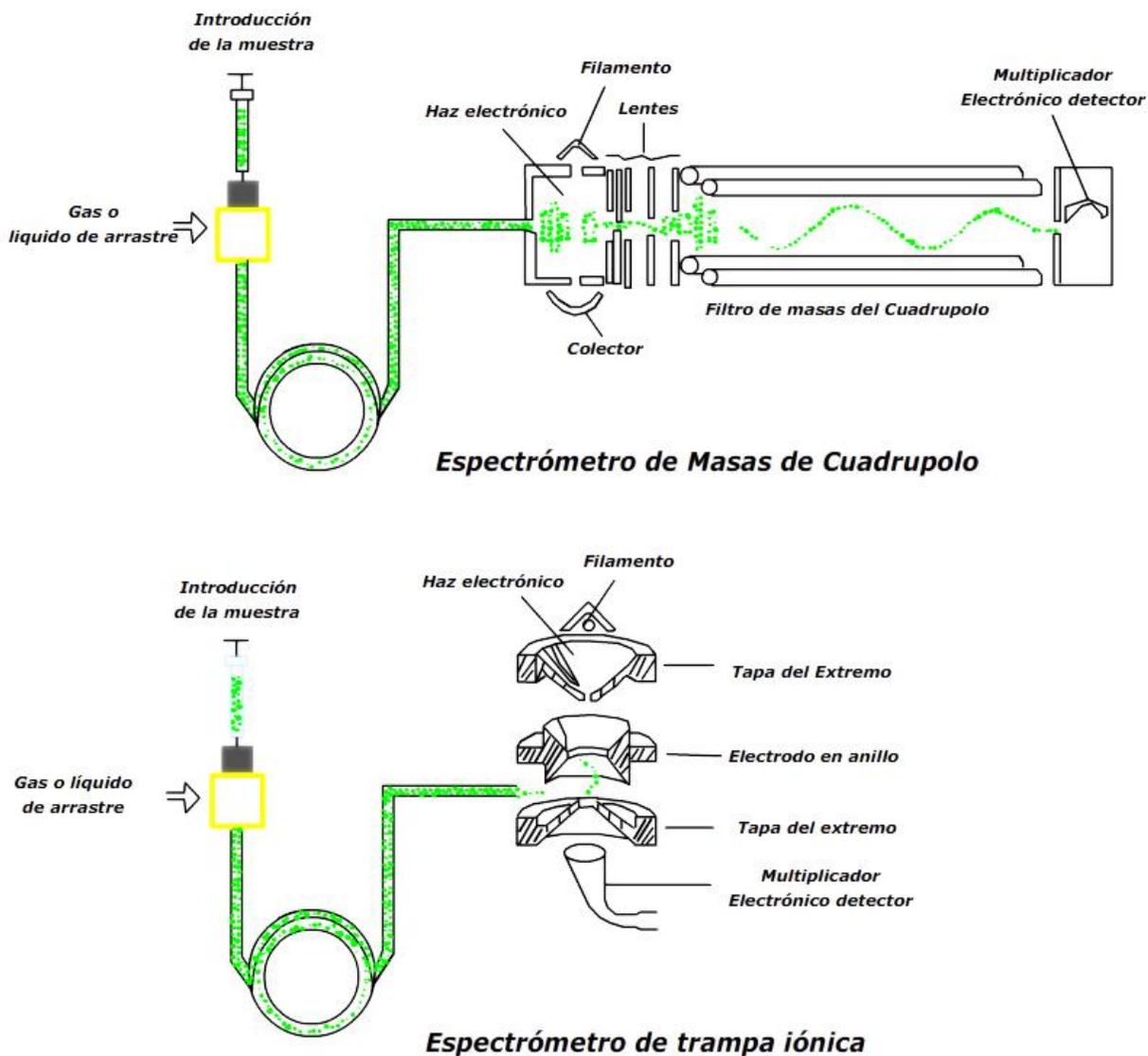
La espectrometría de masas está basada en la fragmentación e ionización de moléculas empleando una fuente de energía apropiada. Los fragmentos de masa resultantes y su abundancia relativa dan un espectro de masas característico de la molécula inicial. Antes de que pueda detectarse y cuantificarse un compuesto por espectrometría de masas debe aislarse por otro método, normalmente por GC. Con la combinación de GC y la espectrometría de masas se consigue una gran especificidad y sensibilidad. Un sistema de espectrometría de masas típico se compone de una unidad de entrada, una fuente iónica, un analizador de masa, un detector iónico y una unidad de datos. La unidad de entrada admite las muestras al interior del espectrómetro de masas. Cuando el instrumento forma parte de un equipo GC/MS, la unidad de entrada debe calentarse para mantener los compuestos volátiles en un estado de vapor cuando entran en la fuente iónica. Además, debe eliminar la mayor parte del gas de arrastre para adaptarse a la condición de vacío fuerte necesaria para la operación de espectrometría de masas. La fuente iónica se mantiene en condiciones de alta temperatura y vacío para proporcionar las condiciones apropiadas para la ionización de las moléculas vaporizadas de la muestra. Se encuentran disponibles varios tipos de fuentes energéticas para ionizar las moléculas de la muestra. Una fuente muy utilizada es un haz de electrones producidos por un filamento caliente. El proceso de bombardeo de la muestra con electrones se llama ionización por impacto electrónico. Otros procesos de ionización incluyen 1) ionización química, en la que las moléculas de la muestra

se ionizan con un gas reactivo que ha sido ionizado por un haz electrónico y 2) bombardeo atómico rápido, en el que una muestra sólida se ioniza mediante un haz de átomos, como puede ser de argón.

Un espectrómetro de masas organiza los iones de la molécula original y sus fragmentos iónicos resultantes de acuerdo con su relación masa/carga. Los espectrómetros de masa pueden ser de tres tipos diferentes: de sector magnético, cuadrupolo y de trampa iónica. En un espectrómetro de masas de sector magnético, un voltaje muy alto acelera los iones, de modo que los saca de la fuente iónica y los introduce en un campo magnético. La curva que describe un ion en su salida depende de su relación masa/carga, de la fuerza del campo magnético y del voltaje aplicado. El campo magnético o el voltaje pueden variarse para permitir la salida selectiva de iones al campo magnético. En el espectrómetro de masas de cuadrupolo (Fig. 3.4.3.1) se aplica una corriente eléctrica directa y voltajes de radiofrecuencia de magnitudes seleccionadas sobre dos varas metálicas. Sólo los iones de una determinada relación masa/carga pueden pasar sin desviarse al final de las varas, donde serán detectados. Todos los demás iones poseen trayectorias inestables a lo largo del recorrido y se desvían hacia las varas, de modo que nunca alcanzan el detector.

Una forma moderna de espectrómetro de masas muy utilizada es el espectrómetro de masas de trampa iónica (Fig. 3.4.3.1). Funciona como un analizador de masas y como unidad de fuente iónica. Tiene tres electrodos en forma de anillo y dos tapas en los extremos que producen iones en la cavidad hasta que se envían al detector iónico como resultado de la variación del voltaje de la radiofrecuencia del anillo de electrodos. Una ventaja fundamental de este tipo de analizador es su habilidad para conseguir espectros de masas completos a concentraciones muy bajas de muestra. El detector iónico en la espectrometría de masas suele ser un multiplicador electrónico o un detector de conversión de iones en fotones. En un multiplicador electrónico, los iones golpean el primer dínodo del detector que desencadena la liberación de electrones secundarios. Se produce una cascada de electrones similar a la que se da en un tubo fotomultiplicador, resultando en una amplificación de aproximadamente un millón de veces. En un detector de conversión ion-fotón, los iones golpean un fósforo que emite un fotón por cada ion. A continuación, un tubo fotomultiplicador convencional amplifica la señal. La unidad de datos procesados es una parte indispensable de un espectrómetro de masas moderno. Controla los múltiples parámetros de operación de los componentes del instrumento y almacena y analiza gran cantidad de datos. Las librerías de referencia de espectros de masas de compuestos conocidos están incorporadas, de modo que el ordenador puede buscar en ellas y compararlas con el espectro de la muestra para su identificación. En los últimos años se han introducido

varios espectrofotómetros de masas de sobre mesa para las medidas clínicas y toxicológicas de rutina. Un instrumento típico de cuadrupolo es el modelo 5971 MSD de Hewlett Packard e instrumentos típicos del tipo de trampa iónica incluyen el Finnigan MAT y el Varian Instruments Saturn 3 GC/MS.



**Figura 3.4.3.1.** Dos de tres diferentes tipos de espectrómetro, que nos sirve para identificar y cuantificar el analito deseado.

#### 4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

El análisis de cabello ha sido de mucha controversia así como sus aplicaciones en cortes federales y en situaciones de empleo. Estas controversias varían en cuanto a la contaminación externa debidas a los tratamientos con cosméticos así como por factores étnicos. La cantidad de muestra debe ser generalmente pequeña o mínima debido a las preocupaciones de tipo estética, por consiguiente las concentraciones de drogas en cabello son pequeñas requiriendo un protocolo adecuado que incluya un instrumento sensible y una metodología específica de detección.

La matriz del cabello es compleja y variable (haciendo un cociente de la cantidad de cocaína detectada con respecto a la cantidad que se incorpora en el cabello lo que también provoca controversia). Sugiriendo que las drogas de abuso se incorporan a la matriz del cabello por medio de la sangre, el sudor, y la contaminación externa, siendo esta contaminación externa por medio del contacto con restos de cocaína. Sigue siendo desconocido si la presencia de la droga está limitada a la matriz, a las fibras de queratina o a las fibras de melanina en el cabello. Mientras que los problemas asociados a la metodología analítica necesaria para detectar cantidades razonables de drogas en cabello con una buena especificidad se deben a una comprensión más clara de la incorporación de la cocaína en el cabello.

Las preguntas sobre el factor étnico se presentan en cuanto a las estructuras diversas y porosidad del cabello de las diferentes razas. Así como las diferencias entre el género. La determinación de un valor de corte estándar entre una muestra positiva y una negativa. Otro factor es la cantidad de droga ingerida no correlaciona a la cantidad de droga encontrada en cabello ya que en algunos estudios cantidades más grandes se han encontrado en cabello de usuarios ocasionales que en usuarios frecuentes. Por ello todavía no se determina la cantidad de cocaína ingerida por un individuo debido a esta restricción.

El tratamiento cosmetológico del cabello es un factor más que conduce a un nivel de detección disminuido de cocaína, que aplica también para otras drogas presentes, en el cual se ha visto esta problemática en individuos cuantificados antes del tratamiento cosmético. Los tratamientos cosméticos de cabello que afectan negativamente la detección de cocaína incluyen el colorante y blanqueador, quienes generan cambios en la porosidad del cabello.

Hay varias preguntas por contestar con respecto al análisis de cabello: (1) ¿Cuál es la mejor manera de preparación de cabello para ser analizado? (2) ¿En qué medida es la contaminación externa y cómo puede ser eliminada? Y (3) ¿qué constituyen un resultado positivo o negativo? Por lo tanto, mientras que puede ser alcanzada las respuestas a las preguntas con respecto al análisis de cabello para la detección de cocaína, la investigación adicional es necesaria hacer la técnica una metodología práctica.

Las muestras que se utilizan en la mayor parte de la prueba controlada son, desafortunadamente, no auténtico debido a la insuficiencia de donantes realmente positivos. Las muestras “auténticas” usadas en laboratorios son preparadas empapando el pelo en soluciones de cocaína por medio de soluciones buffer de fosfatos salinos. La “contaminación” producida no es idéntica a la contaminación puramente externa o interna que limita su eficacia como estándares para las muestras verdaderas del pelo. Los procedimientos se han desarrollado para quitar a la mayoría de contaminación externa y los criterios se han desarrollado para distinguir externo de la contaminación interna.

Se ha conducido una tentativa de determinar los valores para los resultados positivos y negativos. De acuerdo al uso del cabello empapado en soluciones de cocaína conocida que permite la calibración y la optimización de un método interno.

La cocaína es encontrada en concentraciones de rango de ng/mg de cabello. En casos de abuso de cocaína, la cocaína es la que se encuentra más usualmente que los metabolitos en el cabello. Esto es debido al tiempo de incorporación rápido y no a los tiempos de vida media de las sustancias ya que la vida media de la cocaína es mucho más corta que cualquiera de sus metabolitos.

Debido a la ambigüedad de la ingestión real de la droga y la posibilidad de contaminación externa, la prueba del pelo puede tener 3 resultados. Estos resultados son positivos, negativos, o contaminación pero ningún uso de la cocaína. La contaminación pero no el uso tiene dos categorías más como son la contaminación trivial y la contaminación extensa. La contaminación trivial excede el valor para una medida pequeña. Estos resultados se encuentran generalmente para los sujetos que pasan mucho tiempo en presencia de usuarios que consumen drogas de abuso. La contaminación extensa se encuentra en los casos de traficantes y de otros que están implicadas en el manejo de las drogas de abuso, pero quiénes no son usuarios activos. Estos valores exceden el valor de corte perceptiblemente.

El método de incorporación de drogas en cabello también ha sido motivo de mucha discusión y sigue siendo incierto. El modelo más simple propone que se produce por difusión pasiva de las drogas provenientes del torrente circulatorio y que penetran a las células en el folículo piloso. La droga entonces está limitada firmemente en la matriz del eje del pelo con la Queratogénesis, o atada a las fibras de la queratina del cabello. También se cree que el sudor juega un papel importante al contaminar con las drogas o sus metabolitos de una manera externa en el cabello. Otros componentes del cabello a los cuales la cocaína puede unirse y que debe ser considerada; son Melanina, Queratina, y complejos de la membrana de la célula. La matriz del cabello no sólo causa dificultades en la determinación de la acumulación de la droga, sino también en la forma de extraer la droga en el cabello.

Aunque hay mucha controversia que rodea el procedimiento del análisis del cabello, un buen avance se ha hecho estos últimos años para eliminar muchos de los problemas con el procedimiento. Aunque el método de incorporación de drogas en cabello y de la relación directa entre la cocaína y sus metabolitos no se ha determinado, la investigación se está conduciendo en estos campos para ayudar a eliminar estos problemas. La prueba del cabello ha sido reconocida y regulada por la sociedad de toxicólogos forenses y aceptada por las cortes de la ley en algunos tipos de casos. Es también importante determinar si el resultado positivo proviene de una persona que ingiere la droga o si es el producto de la exposición de una persona inocente al humo de la droga y de forma pasiva dio un resultado positivo a través de entrada externa. Aunque no se acepta rutinariamente en instituciones internacionales, el análisis de cabello para las drogas de abuso se consolidara como una técnica aceptada puesto que las técnicas son universales y los estándares para la preparación y la detección para las drogas del abuso se están desarrollando.

## **5. OBJETIVOS.**

### **5.1. GENERAL:**

- Desarrollar una metodología para la determinación de cocaína y/o metabolitos por medio de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas para realizar análisis confirmatorios en operativos antidoping ó en cortes legales.

### **5.2. PARTICULARES:**

- Estandarizar las técnicas de lavado, extracción, digestión y medición de cocaína y/o metabolitos en cabello, por medio de la correlación de concentraciones utilizando Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG/EM) para realización de un método de rutina aceptable.
- Estandarización de la metodología analítica desarrollada para la detección y cuantificación de cocaína y su metabolito en cabello
- Determinar si el método puede ser usado en aplicaciones de antidoping, forenses y administrativas, de acuerdo a las características de la metodología realizada, para la aseveración de un análisis que ayude a descartar o encontrar un resultado positivo el cual nos permita un engaño virtual.

## 6. HIPOTESIS.

Si la cocaína y su metabolito la benzoilecgonina se bioacumulan en cabello a niveles detectables entonces será posible desarrollar, optimizar y estandarizar la metodología analítica para su detección y cuantificación por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, siendo factible la aplicación de la metodología analítica en consumidores de Cocaína.

## 7. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN.

La técnica empleada es de carácter experimental para la búsqueda y optimización de una metodología para la determinación de metabolitos de cocaína es a través de criterios Cromatográficos. Evaluando muestras de carácter presuntivo salidas por métodos de inmunoensayo en los laboratorios que emplean metodologías en el análisis de antidoping para poder así describir una serie de pasos que nos lleve a encontrar cocaína y/o metabolitos en el cabello y poder así formar un esquema integro para la detección de consumo de cocaína.

### 7.1. MATERIAL Y EQUIPO

- Cromatógrafo de Gases CP- 3800 de Varian instruments.
- Detector: GC/MS/MS Saturn 2200 de Varian instruments.
- Incubador GALLENKAMP PLUS OVEN.
- Incubador RIOSSA.
- Vortex Deluxer Mixer.
- Reactivos analíticos J.T. Baker de grado de pureza HPLC.
- Dimension RxL de DADE BEHRING.
- Tubos de ensaye 13 x 75.
- Tubos de ensaye 16 X 100.
- Tijeras de cirugía.
- Pinzas con punta roma.
- Mortero con pistilo.
- Matraces aforados de 100 mL.



## 7.2. MÉTODO



## 7.3. POBLACIÓN.

Se admite a toda población que muestre resultados positivos o no a alguna droga, a partir de un análisis presuntivo para la comparación, relación y control de los procedimientos realizados que pueda reflejar resultados concluyentes, cuya población incluye tres tipos:

- **Personas de ABSTINENCIA:** Definida como una persona que es consumidora de una droga.
- **Personas de USO:** Considerada como persona consumidora de una forma puntual y esporádica.
- **Personas de ABUSO:** Aquella persona que hace un consumo abusivo de una droga cuando la consume en dosis altas y/o de una forma reiterada y por lo tanto con riesgo de poner en peligro su salud física, mental y social, incluyendo también la de las personas de su entorno.

Esto conlleva a la comparación de los diferentes consumidores para poder tener una relación entre las cantidades extraídas con respecto al consumo.

#### 7.4. CRITERIOS.

**Inclusión:** Individuos que muestren o no, en un análisis presuntivo, positividad y presenten una cabellera de por lo menos 1 cm de largo para poder obtener una muestra, la cual deberá ser tomada desde la raíz abarcando un volumen que sea mayor o igual a 100mg de cabello.

**Exclusión:** Aquellas personas que no presenten una cabellera de por lo menos 1 cm de largo o muestra que no sea equivalente a 100mg de cabello.

**Eliminación:** Será eliminada toda aquella que no presente cabello.

**Variable:** Las muestras analizadas presentarán una positividad o negatividad dependiendo del consumo de droga, así como la idiosincrasia de cada individuo que pueda variar la relación Cocaína - Benzoilecgonina.

Las muestras de cabello analizadas fueron de procedencia de antidoping realizados a policías estatales que resultaron con un presunto positivo por técnicas de inmunoensayo en orina. Las cuales se obtuvieron de manera usual, del vértice posterior de la cabeza cuidando la raíz, con una dimensión de 100 mg a 200 mg e identificadas cada muestra para ser enviadas finalmente para realizar la metodología elaborada para el análisis confirmatorio.

## 8. PARTE EXPERIMENTAL

### 8.1. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES PARA LA DETERMINACIÓN DE COCAÍNA.

#### **Solución Salina.**

La solución salina al 0.9 % también denominada Suero Fisiológico, es la sustancia cristaloides estándar, es levemente hipertónica respecto al líquido extracelular y tiene un pH ácido. Se adicionan 0.9g en 100 mL de agua desionizada.

#### **Solución Reguladora de Fosfatos pH de 6.5.**

Disolver 0.44g de fosfato dibásico de sodio y 0.60g de fosfato monobásico de sodio en agua y diluir a 250 mL.

#### **Solución 1N Ácido Clorhídrico.**

Agregar 100 mL de agua y adicionar 21.5 mL de ácido clorhídrico y seguir adicionando agua desionizada hasta alcanzar los 250 mL dejándola enfriar a temperatura ambiente.

#### **Solución 0.1N Ácido Clorhídrico.**

Agregar 100 mL de agua y adicionar 2.15 mL de ácido clorhídrico a agua desionizada hasta alcanzar los 250 mL y dejar enfriar a temperatura ambiente.

#### **Solución 1N Hidróxido de Sodio.**

Colocar 10 g de hidróxido de sodio en baño de hielo y llevarlo al aforo hasta los 250 mL.

#### **Solución 0.1N Hidróxido de Sodio**

Colocar 1 g de hidróxido de sodio en baño de hielo y llevar al aforo hasta los 250 mL.

### **Preparación de controles.**

Se purificó cocaína decomisada en un operativo antidoping con éter y metanol uno a uno, la cual fue ocupada para la preparación del estándar. Se prepara una solución de cocaína con una concentración de 1mg/mL adicionando 100 mg de cocaína purificada en 100 mL de agua.

#### **Control Positivo.**

Alrededor de 100 mg de cabello no presuntivo se le adiciona 1 mL de solución de cocaína y 3 mL de solución salina, se deja incubar por 24 hrs a 60 °C, pasadas estas se retira el sobrenadante y se deja secar a sequedad para su posterior análisis.

#### **Control Negativo.**

Alrededor de 100 mg de cabello no presuntivo se le adiciona 3 mL de solución salina, se deja incubar por 24 hrs a 60 °C, pasadas estas se retira el sobrenadante y se deja secar a sequedad para su posterior análisis.

## **8.2. RECOLECCIÓN DE LAS MUESTRAS**

Lo ideal, aunque en ocasiones problemático es remitir el cabello sin tintes ni contaminantes externos. Por lo que respecta a tintes, escoger las porciones más recientes que se vean no teñidas.

La toma de muestra de pelo debería ser realizada a nuestro criterio por personal debidamente entrenado.

Deben ser obtenidas en un ambiente no contaminado por las drogas, debiéndose coleccionar una cantidad suficiente de muestra tal que la misma permita repetir los análisis en caso de ser necesario.

Se recomiendan los siguientes pasos generales de colección de muestra:

- El pelo debería coleccionarse de la región posterior de la cabeza, prefiriéndose ésta área porque un 85 % de ella presenta pelo en fase de crecimiento activo y por lo tanto mayor cantidad de droga podría fijarse en ella.
- El pelo debe ser cortado tan próximo como sea posible al cuero cabelludo o la piel si es de otra región del cuerpo.

- El peso de la muestra adecuado para permitir los estudios de screening y de confirmación podría ser de unos 100 - 200 mg, (cantidad equivalente al diámetro de un lápiz).
- Para su almacenamiento el pelo podría guardarse en un folio de aluminio que garantiza su integridad y previene su contaminación, así como en una bolsa de papel, frasco de plásticos adecuadamente rotulados.
- Las muestras pueden ser conservadas a temperatura ambiente.
- Si la muestra pilosa se encuentra mojada, secarla y acondicionarla correctamente para su posterior análisis.
  
- Personas con pelo largo:
  - Horizontalmente separar el cabello a la altura de a mitad de la parte de detrás de la nuca, separándolo hacia arriba apoyándolo en la cabeza. Cortar unos 2-3 mechones de cabello justo en la parte que queda en la base en contacto con la nuca. Puede cortarse con tijeras de acero inoxidable o navaja.
- Personas con pelo corto:
  - Cortar mechones de cabello de las partes más cercanas al cuero cabelludo o a la nuca y en cantidad suficiente para el análisis.
- Envío al laboratorio: colocar el cabello dentro de la tarjeta de recogida. Rotular con el nombre del paciente, dirección y teléfono. No olvidar cumplimentar todos los datos que constan en la ficha.

### **8.3. LAVADO (Preparación de las muestras.)**

Este paso sirve para el retiro de algunos cosméticos y grasas que puedan afectar la determinación.

Se pesan de 50 a 100 mg de muestra y se colocan en un tubo de ensaye de 13 x 100 a éste se le adiciona 3 mL de cloruro de metileno por 30 seg y se retira el sobrenadante el cual es transferido a otro tubo. Seguidamente se realiza un segundo lavado con agua al mismo volumen y tiempo del primero y se transfiere en el mismo tubo del primer sobrenadante y finalmente se realiza el tercer lavado con 3 mL metanol con un tiempo de 10 seg y se lleva a sequedad el cabello a 60 °C para eliminar cualquier solvente. El tiempo de agitado disminuye debido a que el mismo metanol puede arrastrar la cocaína y ver afectada la detección, por ello se realiza una prueba presuntiva en el equipo Dimension al mezclado de los sobrenadantes llevándolos a sequedad y reconstituyéndolos con solución buffer de fosfatos de pH 6.5 con 1 mL. Con unidades mayores a 1000 la reconstitución de los sobrenadantes sigue el mismo procedimiento que el análisis de cabello.

#### **8.4. DIGESTIÓN (Degradar el cabello sin afectar el analito.)**

La finalidad de la digestión es la de abrir la porosidad o degradación del cabello para que libere la droga sin afectar la estructura molecular de la cocaína.

Esto se realiza cortando el cabello en trocitos de alrededor de 1-2 mm de largo obtenido de los lavados y pulverizándolo con el mortero hasta una apariencia de lo más fino, teniendo cuidado de que este no caiga fuera del mortero para no tener pérdidas en la detección. Este pulverizado se recolecta y se coloca en un tubo de ensaye de 13 X 100, adicionando 1 mL de HCl 0.1N e incubado por 24 hrs a 60 °C. Puede reducirse el tiempo de incubación a 1 hrs utilizando HCl con una concentración de 1N con el riesgo de metabolizar la cocaína en Benzoilecgonina.

Esta digestión se detiene adicionando 1 mL de NaOH 0.1N o dependiendo de la concentración utilizada, de tal manera que hay una neutralización ácido-base y se estabiliza con solución buffer de fosfatos a pH 7.0.

#### **8.5. EXTRACCIÓN.**

La extracción con solventes es una técnica de tratamiento que consiste en usar un solvente (un líquido capaz de disolver otra sustancia) para separar o retirar analitos que no se quieran analizar de tal manera que se aisle el analito deseado y poderlo concentrar para su detección por CG/EM.

Al neutralizado se le adiciona una pizca de bicarbonato de sodio al sobrenadante para elevar el pH de 8-9, con el objeto de precipitar algunas proteínas que tuvieron procedencia del cabello. Se agrega 5mL de una mezcla de Etanol/ Cloroformo para solubilizar la cocaína y/o metabolitos y es agitada con el Vortex hasta que ya no haya desprendimiento de gas, para obtener mejores rendimientos. Esta mezcla es centrifugada a 2500 rpm para poder separar las fases, de tal manera que nos permita eliminar la fase acuosa que es la capa superior y transferir la fase orgánica a otro tubo para concentrar los compuestos llevándolos a sequedad a una temperatura de 60 °C.

## 8.6. DERIVATIZACIÓN (Aumentar la volatilidad del analito.)

La derivación nos permite volatilizar más rápidamente un compuesto que tenga puntos de ebullición altos, además de que estabiliza el mismo compuesto, lo que le permite a la cromatografía de gases mayor viabilidad para la detección.

Se adicionan 50  $\mu\text{L}$  de BSTFA-TMCS (N, O-Bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida) al concentrado de compuestos en la campana de extracción de una manera rápida debido a que absorbe humedad provocando que el derivante se degrade y enturbie la solución, además de que es demasiado volátil y de carácter cancerígeno. Finalmente se incubó por 30 min a 60 °C para llevar a cabo la sustitución nucleofílica  $\text{SN}_2$  del trimetilsilil por un grupo polar y se dejó estabilizar a temperatura ambiente por 10 min.

## 8.7. MÉTODO INSTRUMENTAL

Después de enfriar se inyecta la mezcla en un Cromatógrafo de Gases (Varian CP -3800) acoplado a un Espectrómetro de Masas (Saturn 2200). La columna utilizada es la VF-5ms de 30 metros de largo por 0.25 mm de ancho con  $\text{DF}=0.25$  con un 95% de dimetilpolisiloxano. El portal de inyección en el modo Splitless a una temperatura 260 °C, el horno fue programado con una temperatura inicial 160 °C con un incremento de 12 min hasta alcanzar una temperatura final 260 °C. El gas transportador, helio de alta pureza, se usó a una velocidad de flujo 1.3 mL/min, a una presión de 17.9 psi y el equipo fue utilizado con impacto electrónico y un tiempo final de corrida de 14 min elevando la temperatura a 290 °C.

Se inyectaron 3  $\mu\text{L}$  de muestra operando en el modo de monitoreo (SIM), la detección fue realizada buscando los siguientes iones: para Cocaína  $m/z = 82+182 +304$  y para la Benzoilecgonina  $m/z = 82+240+ 361$ .

## 8.8. IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN.

La identificación se estableció de acuerdo a los siguientes parámetros unidos universalmente.

- ❖ Tiempo de retención de la sustancia problema que debe quedar dentro de un  $\pm 0.2$  seg del tiempo de retención de las sustancias de referencia.

- ❖ Todos los iones de referencia deben aparecer en el mismo tiempo de retención.
- ❖ La cuantificación es obtenida a partir de la curva de estandarización realizada para elaborar la relación Concentración-Área bajo la curva de las crestas obtenidas.

## 8.9. METODOLOGIA PASO A PASO.

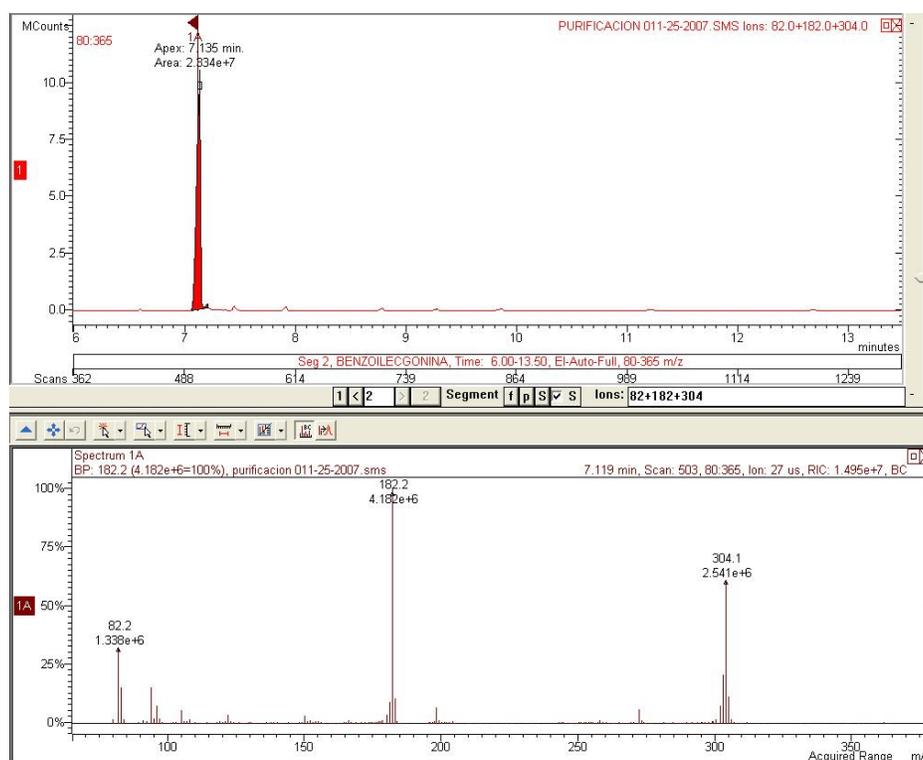
- Se recolecta un mechón de cabello de aproximadamente 200 mg los cuales se separan en dos frascos.
- Lavado: Se lava el cabello en un tubo de ensaye por agitación con 3 mL de Cloruro de Metileno por 30 seg., después con 3 mL de agua por 30 segundos y finalmente con 3 mL de metanol por 30 seg.
- Se seca el cabello a 60 °C.
- Se pulveriza el cabello con el mortero hasta una consistencia fina.
- Se recolecta el pulverizado y se coloca en un tubo de ensaye.
- Se le adiciona al tubo de ensaye 1 mL de ácido clorhídrico 0.1 N.
- Se deja reaccionar para degradar el cabello por 24 hrs.
- Se detiene la reacción con 1.0 mL de Hidróxido de sodio 0.1 N.
- Se adiciona 1 mL de buffer (fosfatos pH 7.0).
- Se centrifuga y se separa el sobrenadante.
- Se adiciona una pizca de bicarbonato de sodio al sobrenadante para elevar el pH de 8-9.
- Se adiciona una mezcla de Etanol/ Cloroformo.
- Se agita con el vortex hasta que no haya desprendimiento de gas.
- Se centrifuga a 2500 rpm.
- Se desecha la fase acuosa capa superior y se pasa la fase orgánica a otro tubo y se evapora a sequedad.
- Se DERIVA con 50 µL de BSTFA-TMCS y se agita.
- Se incuba por 30 min a 60 °C.
- Se estabiliza la derivación por 10 min a temperatura ambiente.
- Se inyecta 3 µL de muestra con el método configurado de Benzoilecgonina.

## 9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

### 9.1. DETERMINACION DE CONDICIONES

Se desarrolló un método analítico de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas, para la detección e identificación de cocaína y sus posibles metabolitos en cabello. El equipo se operó en la modalidad SIM con un monitoreo de 3 iones que dieron pauta a conocer el tiempo de retención que normalmente era de 7.1 a 7.14.

Se purificó la cocaína con una mezcla de etanol/metanol/éter verificando su pureza con el método CG/EM dando la siguiente pureza.



**Fig. 9.1.1.** Cromatograma de la preparación del estándar.

En el primer experimento se quiso determinar las condiciones de lavado a las que sería sometido el cabello. Para esto primero se contaminó el cabello de un individuo presuntamente negativo con la solución de cocaína en soluciones salinas como fueron la solución fisiológica y la solución de búfer, para tener un

control positivo y uno negativo, encontrando que la salina es la que mejor se impregnaba en el cabello debido a que a estas muestras se aplicó la metodología desarrollada hasta el punto de la digestión de tal manera que al sobrenadante de esta se le realizó una prueba de inmunoensayo en el equipo Dimension RxL, ya que trabaja con la enzima glucosa -6-fosfato deshidrogenasa y un anticuerpo policlonal que se unen a la Benzoilecgonina, determinando la cantidad de conjugado de COC-glucosa-6-osafo (COC-G6PD) que queda unido al anticuerpo y el conjugado que queda libre cataliza la oxidación de la glucosa-6-fosfato, con la reducción simultánea de NAD<sup>+</sup> a NADH más rápido de lo que lo hace el conjugado unido al anticuerpo, proporcionando un resultado preliminar teniendo como criterio que arriba de 1000 unidades lo considera positivo encontrando que hay una positividad en las condiciones de ácido clorhídrico, permitiendo elegir a éste como la solución digestora de preferencia que permita hacer la detección en las dos diferentes concentraciones como lo muestra la tabla.

### **SOLUCIONES DE LAVADO (Usando el Dimensión)**

Concentración	Con solución salina	Sin solución salina
1 N HCl	1119 POS	1150 POS
0.1 N HCl	1135 POS	1098 POS
1 N NaOH	825 NEG	877 NEG
0.1 N NaOH	809 NEG	873 NEG

**Tabla. 9.1.1.** Muestra la relación de concentración obtenida, dependiendo de las condiciones sometidas para la digestión del cabello.

En el segundo experimento se conoció, en que tiempo de retención saldría el pico de la cocaína debido a que se utilizando la búsqueda de tres iones que son el 82 + 182 +304, así como también la relación que hay entre la cantidad de muestra y los picos esperados, utilizando muestra de un consumidor anónimo que era altamente consumidor, encontrando que hay relación concentración/área bajo la curva, teniendo a esta área en un tiempo de retención de 7.08 a 7.15, debidamente identificados con los ionesantes mencionados, tanto en las concentraciones 1 N y 0.1 N.

RELACIÓN DEL PESO CON RESPECTO AL ÁREA BAJO LA CURVA				
Concentración	Peso mg	Área bajo la curva	Tiempo de retención	Iones en abundancia
0.1 N	26	143142	7.123	82+182+304
0.1 N	94	347071	7.112	82+182+304
0.1 N	112	689766	7.103	82+182+304

**Tabla. 9.1.2.**

La diferencia entre las concentraciones, es que se encontró que a la concentración de 1 N hay mayor abundancia pero se pueden alterar la estructura molecular de la cocaína convirtiéndola a Benzoilecgonina y contrarrestar la detección.

RELACIÓN DEL PESO CON RESPECTO AL ÁREA BAJO LA CURVA				
Concentración	Peso mg	Área bajo la curva	Tiempo de retención	Iones en abundancia
1 N	21	43012	7.111	82+182+304
1 N	44	91102	7.107	82+182+304
1 N	90.5	162774	7.117	82+182+304

**Tabla. 9.1.3**

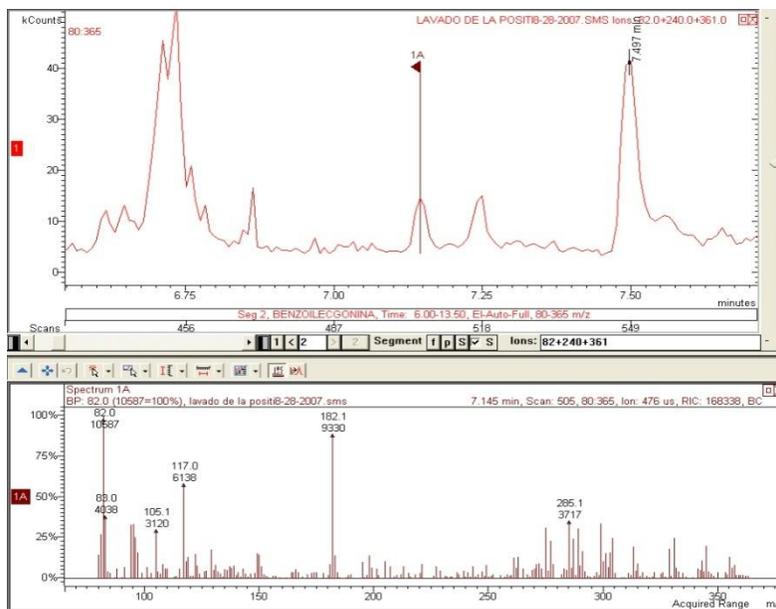
Esto conlleva a que se deben utilizar bajas concentraciones en un tiempo mayor para que se solubilice y se extraiga adecuadamente la cocaína para su detección.

## 9.2. RESULTADOS EN LA APLICACIÓN FORENSE

Se sometieron al análisis de la metodología elaborada 5 muestras de policías que fueron extraídas de un operativo antidoping seleccionándolos de acuerdo al análisis presuntivo de orina que fue positivo y una persona de ABUSO quien proporcionó su cabello para el análisis.

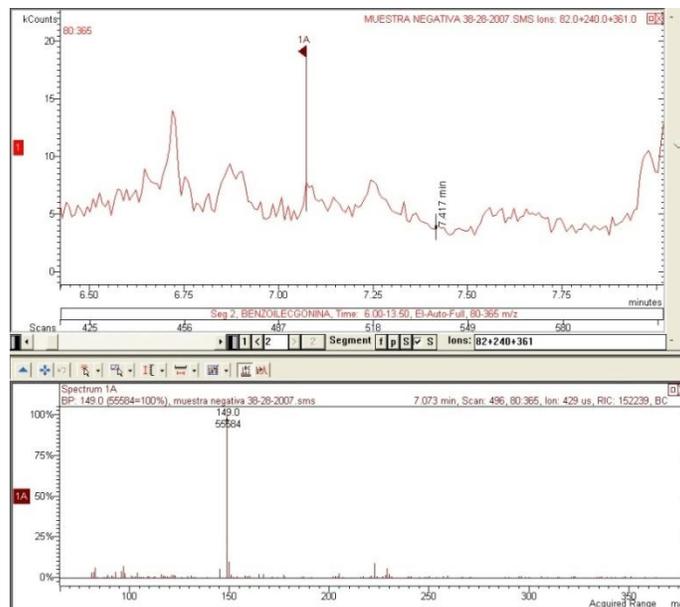
### Individuo 1

Con el primer individuo al que se le practico el análisis presentó en la fase preliminar positividad con el lavado, el cual fue procesado a la par con el extraído del cabello encontrando un análisis confirmatorio en lavado mostrando un área más grande de Benzoilecgonina con una área de 65097 y una de 32647 para la cocaína en un tiempo de retención de 7.145.



**Fig. 9.2.1.** Cromatograma del Lavado del individuo 1

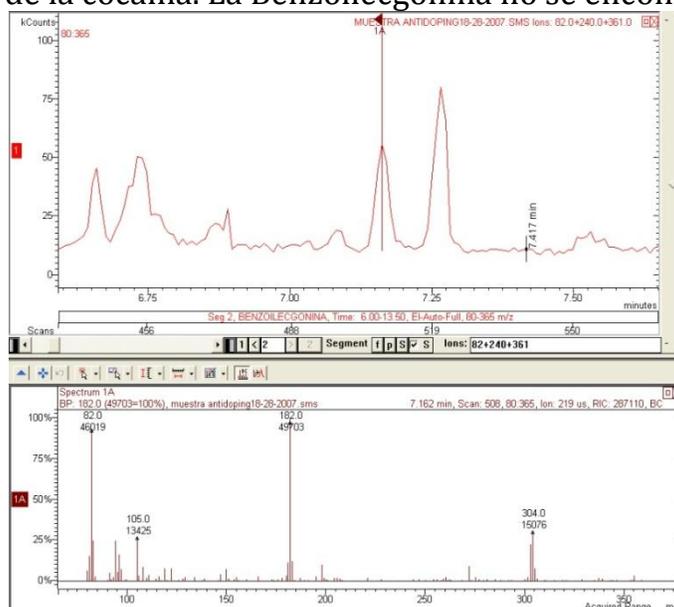
Determinando que el lavado puede extraer la cocaína y sus metabolitos dependiendo de la porosidad del cabello, por ello un análisis preliminar al lavado para saber si fue arrastrada y darle el mismo tratamiento al de la digestión, así como también una tinción al cabello con azul de metileno para conocer su porosidad por medio de microscopia. Se comparó la muestra mencionada arriba con un control negativo, en el que no se encontró ningún área en el tiempo de retención 7.08 a 7.15.



**Fig. 9.2.2.** Cromatograma de la Extracción y digestión del cabello del individuo 1

## Individuo 2

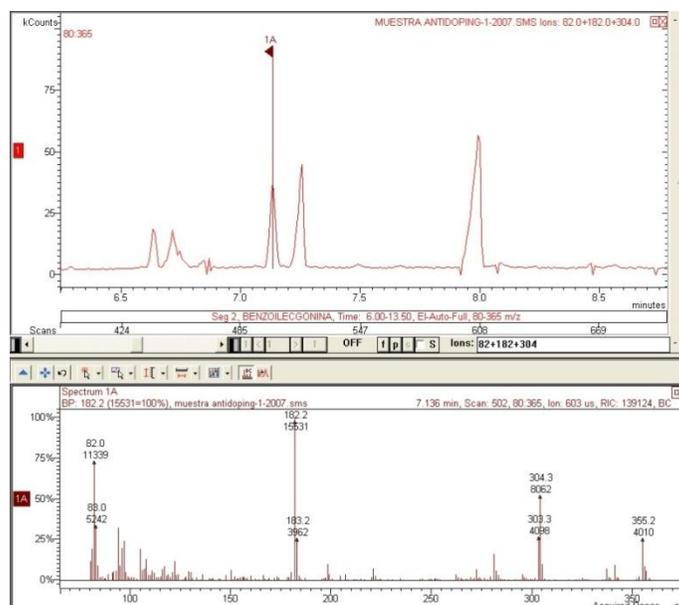
Con el individuo 2 no se encontró positividad en el lavado, pero si presenta con la fase confirmatoria un área de 181222 con un tiempo de retención 7.162 min perteneciente al de la cocaína. La Benzoilecgonina no se encontró en la corrida.



**Fig. 9.2.3.** Cromatograma de la Extracción y digestión del cabello del individuo 2. Se comparó con un control positivo, exponiendo el pico del analito buscado en el tiempo e iones esperados.

## Individuo 3

Se obtuvo un pico en el tiempo 7.136 min con un área de 55348.



**Fig. 9.2.4.** Cromatograma de la Extracción y digestión del cabello del individuo 3.

### Individuo 4

Se obtuvo un pico en el tiempo 7.113 min con un área de 96433 con 22 mg de cabello.

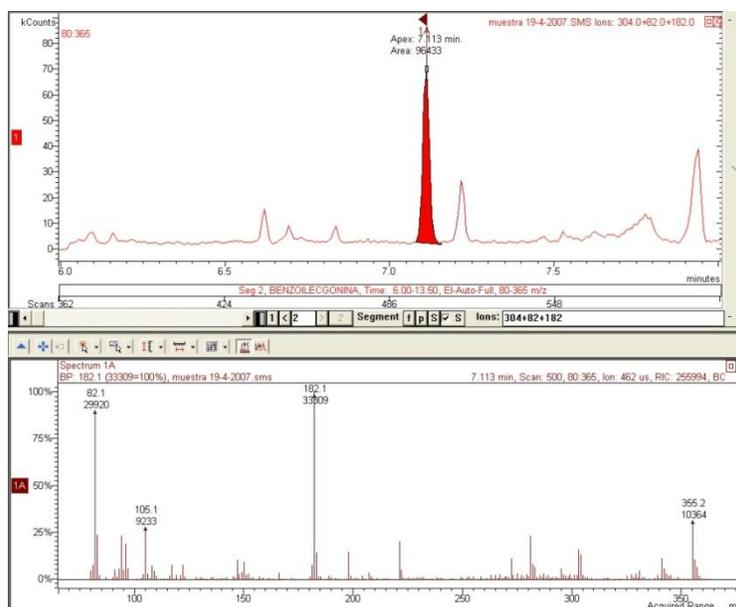


Fig. 9.2.5. Cromatograma de la Extracción y digestión del cabello del individuo 4

### Individuo 5

Se obtuvo un pico en el tiempo 7.109 min con un área de 57527 con 20.4 mg de cabello.

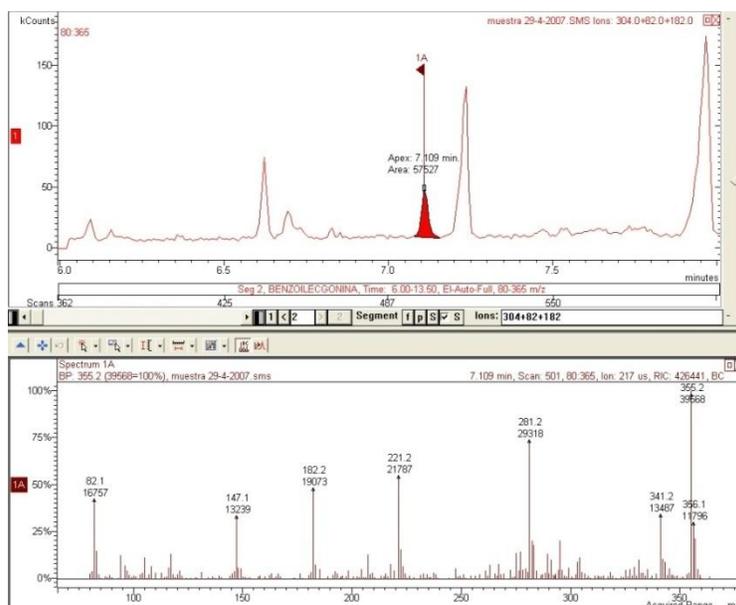
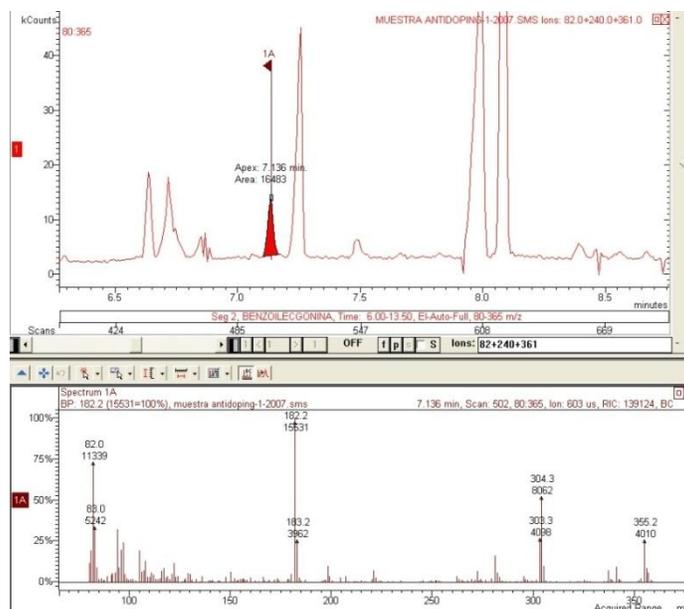


Fig. 9.2.6. Cromatograma de la Extracción y digestión del cabello del individuo 5

## Individuo 6

Se obtuvo un pico en el tiempo 7.136 min con un área de 16483 con 20.6 mg de cabello.



**Fig. 9.2.7.** Cromatograma de la Extracción y digestión del cabello del individuo 6

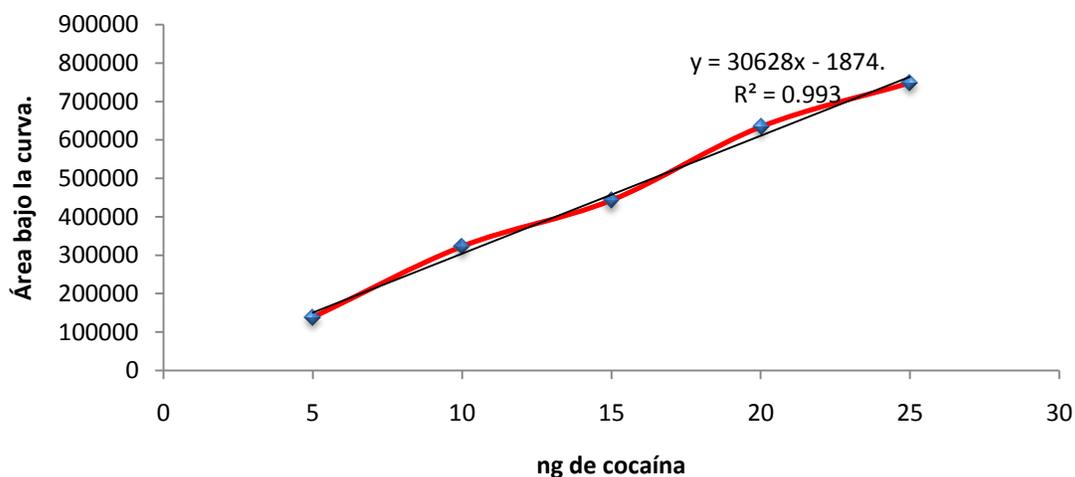
## 9.3. REALIZACIÓN DE LA CURVA ESTANDAR

Se elaboraron tres curvas estándar de las cuales se realizó una curva estándar de acuerdo a los datos estadísticos arrojados de las otras tres, mostrando los siguientes resultados.

CURVA ESTANDAR DE COCAÍNA				
Concentración (ng)	Medias de las Áreas bajo la curva	N	SD	CV
5	138515	3	21086.1	15.22297224
10	323131	3	54896.2	16.98883734
15	443243	3	43919.3	9.908627999
20	634121	3	26417.2	4.165955709
25	748722	3	27965.4	3.735084584

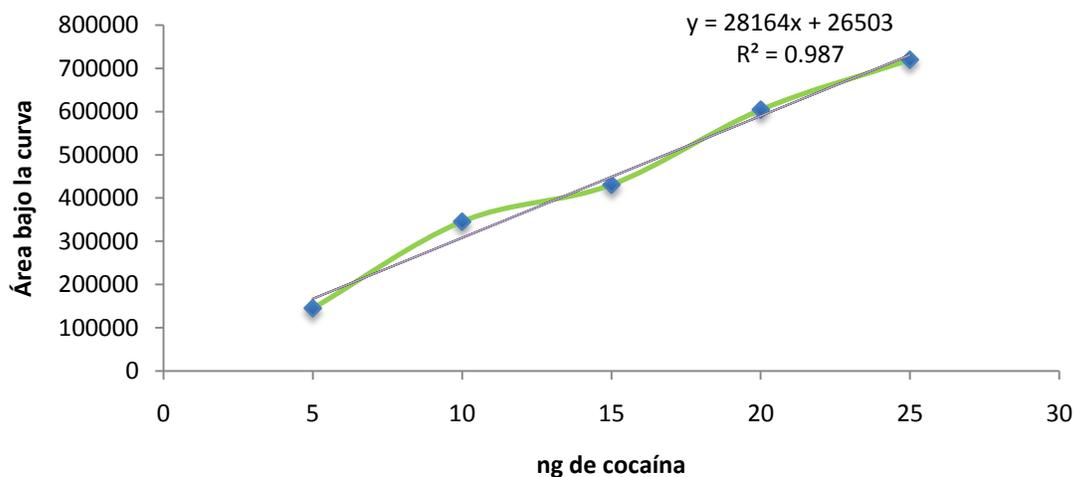
**Tabla.9.3.1.** Se muestra la relación del área bajo la curva con respecto a la concentración del estándar preparado, para conocer la concentración de cada cresta obtenida en cada análisis. Esta tabla es obtenida a partir de las medias de cada concentración de las 3 curvas elaboradas.

## CURVA DE ESTANDARIZACIÓN DE LA COCAÍNA.



**Fig. 9.3.1.** Se muestra la curva estándar graficada a partir de los datos de las otras 3 curvas estándar.

## Curva de estandarización de la cocaína1



**Fig. 9.3.2.** Primera curva elaborada.

## Curva de Estandarización de la Cocaína 2

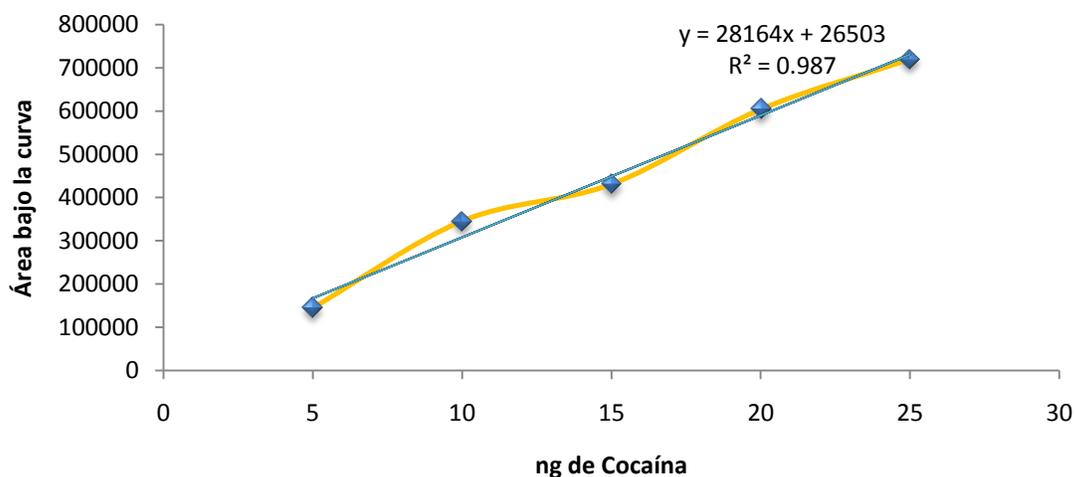


Fig. 9.3.3. Segunda curva elaborada.

## Curva de Estandarización de la Cocaína 3

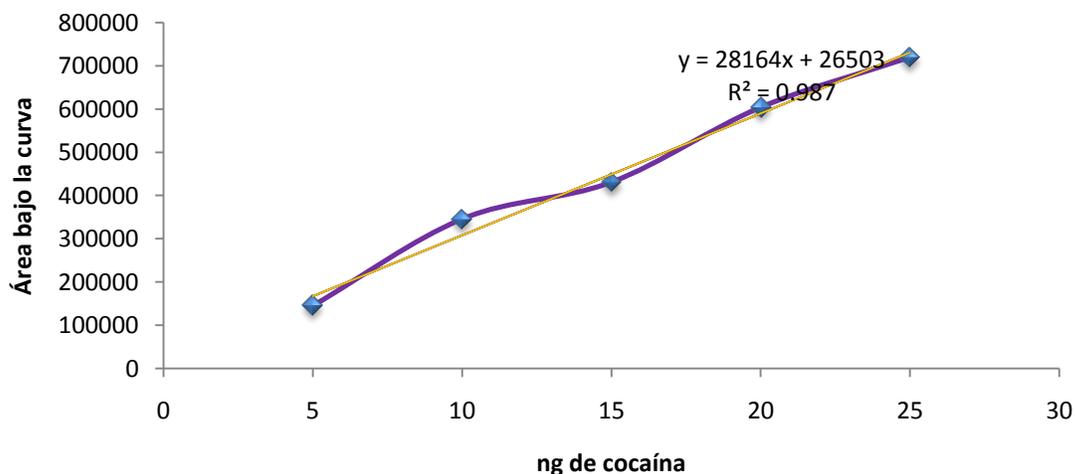


Fig. 9.3.4. Tercera curva elaborada.

Para un análisis de confiabilidad se practico la t-pareada ya que los datos obtenidos son de carácter numérico, lo que nos permite comparar las tres curvas elaboradas, para que éstas no tengan una diferencia significativa, donde lo que se busca es que hubiera una  $t$  calculada menor a  $t$  tablas, el análisis fue realizado con SigmaStat (software estadístico) el análisis estadístico muestra lo siguiente:

La comparación de la C1 con C2 dio un valor de  $t = 0.00617$  con 4 grados de libertad y con un intervalo de confianza del 95 %, determinando que no hay diferencia significativa.

La comparación de la C2 con C3 dio un valor de  $t = -0.901$  con 4 grados de libertad y con intervalo de confianza del 95 %, determinando que no hay diferencia significativa.

La comparación de la C1 con C3 dio un valor de  $t = -1.640$  con 4 grados de libertad y con un intervalo de confianza del 95 %, determinando que no hay diferencia significativa.

Esto muestra que no hay diferencia entre las tres curvas realizadas, por lo que no hay un margen de desviación significativo para rechazar las curvas, siendo estas aceptadas para determinar la concentración de las crestas analizadas.

## 10. CONCLUSIONES

La metodología elaborada satisface nuestra perspectiva para la detección de cocaína y/o metabolitos en cabello ya que de los casos sometidos al análisis mostro una detección de la droga blanco, en la que se ve reflejada en los cromatogramas utilizando concentraciones mínimas que van desde los 5 ng hasta los 100 ng. Esto permite usar la metodología de análisis como una técnica de confirmación para un análisis presuntivo positivo ó dudoso, teniendo como ventajas, el ser una prueba en donde la toma de muestra es de carácter no invasiva, así como también el análisis puede ser posterior a la toma de muestra por un periodo de hasta seis meses. La determinación del tiempo de consumo no es viable determinarlo puesto que la idiosincrasia de cada individuo es diferente, lo cual daría una variación para la estandarización de la metodología. Dejando la propuesta abierta para validarla o posteriormente realizarlo como parte de mi formación. Lo que sí es de esperar del análisis es la cronología de consumo, dependiendo de la concentración encontrada este puede de ser de consumo alto, medio o bajo. Esta metodología propuesta solo podrá confirmar un resultado dudoso que se sospeche, siendo una propuesta para un método de rutina en los laboratorios de toxicología.

## 11. BIBLIOGRAFIA.

1. Ana María de Perkins de Piacentino; Oscar A. Locani; José L. Lorenzo. **Drogas en pelo: sus alcances y limitaciones. I. CUADERNOS DE MEDICINA FORESE AÑO 3 – N° 1** Buenos Aires, 2002 (31-41).
2. Ana María de Perkins de Piacentino; Oscar A. Locani; José L. Lorenzo. **Drogas en pelo: sus alcances y limitacione. II. Experiencia en el laboratorio de toxicología y química legal en el análisis de pelo. CUADERNOS DE MEDICINA FORESE AÑO 4 – N° 1** (Buenos Aires, 2005 (19-18).
3. Arnold, W. y Puschel, K. **Experimental studies on hair as an indicator of past or present drug use.** *J. Forensic Sci Soc.* 21:83, 1981.
4. Báez G., Hernán, Prof., Camargo, Cristián, Prof. y Guerrero, Ethel. **Detección de cocaína y metabolitos en pelos de consumidores. Determinación de niveles de corte.** *Anales de la Universidad de Chile. VI serie: N°11, agosto 2000*
5. Blank, D. L. and D. A. Kidwell, **External contamination of hair by cocaine: an issue in forensic interpretation,** *Forensic Science International*, 1993. 63: 145-156; discussion 157-160.
6. Balabanova, S. and Homoki, J. **Determination of cocaine in human hair by gas chromatography/mass spectrometry.** *Z. Rechtsmed* 98. 1987.
7. Cone E. J; Yousefnejad, D; Darwin, D. W; Maguire, T. **Testing Human Hair for Drugs of Abuse II. Identification of Unique Cocaine Metabolites in Hair of Drug Abusers and Evaluation of Decontamination Procedures.** *Reprints of selected articles from J. of Analytical Toxicology.* Edit. Preston Publications. 1994.
8. Deanna K. Harkins, Allan S. Susten. **Hair Analysis: Exploring the State of the Science.** *Environmental Health Perspectives*, Vol. 111, No. 4 (Apr., 2003), pp. 576-578

9. Edward. J. Cone, Ph.D., Michael. J. Welch, Ph.D., and M. Beth Grigson Babecki, M.A. **Hair Testing for Drugs of Abuse: International Research on Standards and Technology**, 1995, p. 91-120. NIH Publication No. 95 3727.
10. F. Musshoff, F. Driever, K. Lachenmeier, D. Lachenmeier, M. Banger, B. Madea. **Results of hair analyses for drugs of abuse and comparison with self-reports and urine tests?**. *Forensic Science International*. 2005 Volume 156, Issue 2-3, Pages 118-123.
11. F. Wylie, H. Torrance, A. Seymour, S. Buttress, J. Oliver. **Drugs in oral fluid Part II. Investigation of drugs in drivers**. *Forensic Science International*. 2005. Volume 150, Issue 2-3, Pages 199-204.
12. G. Romano. **Hair testing for drugs of abuse: evaluation of external cocaine contamination and risk of false positives**. *Forensic Science International*. 2001 Volume 123, Issue 2-3, Pages 119-129.
13. **Girod C, Staub C**. Analysis of drugs of abuse in hair by automated solid phase extraction, GC/EI/MS and GC ion trap/CI/MS. **2000 Jan 10;107(1-3):261-71**.
14. Goldberger, B. A. Caplan, Y. H. Maguire, T. and Cone, E. J. **Testing human hair for drugs of abuse. III. Identification of heroin and 6 acetylmorphine as indicators of heroin use**. *J. Anal. Toxicol.* 15 1991.
15. Harkey, M. R. **Anatomy and physiology of hair**. *Forensic Science International*. 1993. 63.
16. H. Báez. **Drugs in prehistory: chemical analysis of ancient human hair**. *Forensic Science International*. 2000 Volume 108, Issue 3, Pages 173-179.
17. HARVEY D. **"Química Analítica Moderna"**. Ed. McGraw-Hill, España, 2002.
18. Ira L. **Sustancias Toxicas. La Acción Destructiva de las Drogas en el Cerebro**. QUO Especial Salud Conoce la Nueva Era de la Medicina. 2007
19. K. Lachenmeier, F. Musshoff, B. Madea. **Determination of opiates and cocaine in hair using automated enzyme immunoassay screening methodologies followed by gas chromatographic-mass spectrometric (GC-MS) confirmation**. *Forensic Science International*. 2005. Volume 159, Issue 2-3, Pages 189-199.

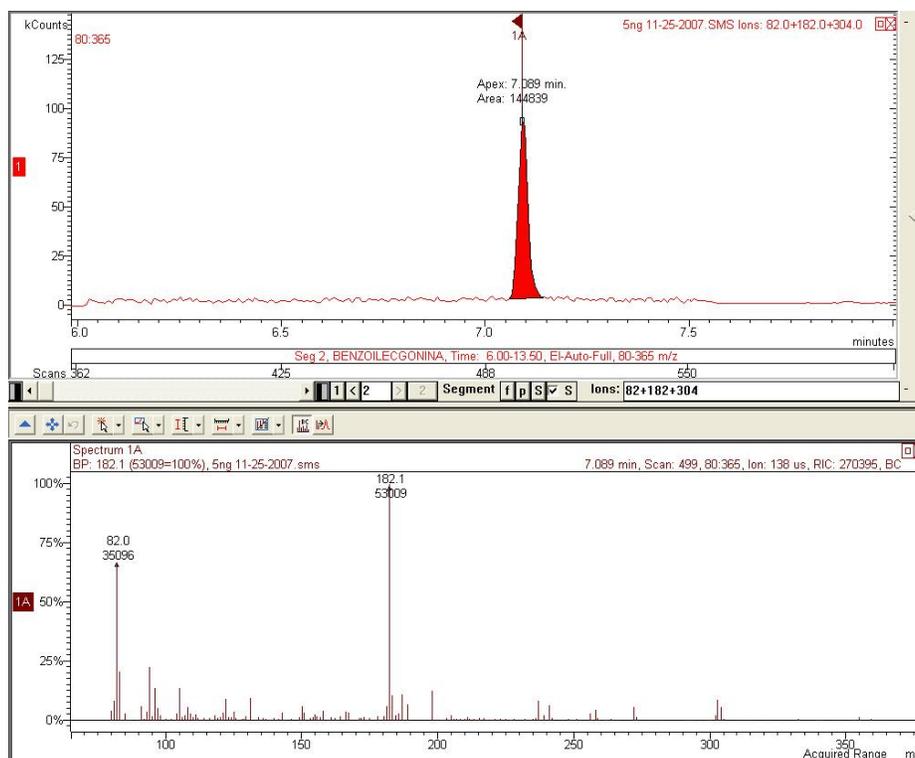
20. Karine, M.; Clauwaert, J. F; Van Bocxlaer; W. E. Lambert; A. P. De Leenheer. **Segmental analysis for cocaine and metabolites by HPLC in hair of suspected drug overdose cases.** *F. Sci. International* 110. 2000.
21. Kelly RC, Mieczkowski T, Sweeney SA, Bourland JA. **Hair analysis for drugs of abuse. Hair color and race differentials or systematic differences in drug preferences?.** *Forensic Science International* 2000 Jan 10;107(1-3):63-86.
22. Kintz P, Mangin P. **What constitutes a positive result in hair analysis: proposal for the establishment of cut-off values?.** *Forensic Science International.* 1995 Jan 5;70(1-3):3-11.
23. Kintz,P; Goullé J. P; Fornes, P; and Ludes B. **A New Series of Hair Analyses from Napoleon Confirms Chronic Exposure to Arsenic.** *Journal of Toxicology, Vol. 26. Nov-Dic. 2002*
24. Kintz, P. and P. Mangin, **Simultaneous determination of opiates, cocaine and major metabolites of cocaine in human hair by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS),** *Forensic Science International, 1995. 73: 93-100.*
25. Knapp, D. R. **Handbook of Analytical Derivatization Reactions;** John Wiley and Sons; New ork, 1979.
26. Regis 1998-99 **Chromatography Catalog.**
27. L. Skender. V. Karac'ic', I. Brč'ic', A. Bagaric. **Quantitative determination of amphetamines, cocaine, and opiates in human hair by gas chromatography/mass spectrometry.** *Forensic Science International, 2002 Volume 125, Issue 2-3, Page 120 .*
28. M. Felli, S. Martello, R. Marsili, M. Chiarotti. **Disappearance of cocaine from human hair after abstinence.** *Forensic Science International, 2004 Volume 154, Issue 2-3, Pages 96-98.*
29. Maria Joao Baptista, Paula Venancio Monsanto, Estela Gouveia Pinho Marques, Ana Bermejo, Sofia Avila, Alice Martelo Castanheira, Claudia Margalho, Mario Barroso, Duarte Nuno Vieira. **Hair analysis for D9-THC, D9-THC-COOH, CBN and CBD, by GC/MS-EI Comparison with GC/MS-NCI for D9-THC-COOH.** *Forensic Science International. 2002. VOLUME 128 (2002) 66-78.*

30. Musshoff F, Madea B. **Review of biologic matrices (urine, blood, hair) as indicators of recent or ongoing cannabis use.** *Institute of Legal Medicine*, 2006 28(2):155-63.
31. Pichini S et al. **Determination of opiates and cocaine in hair as trimethylsilyl derivatives using GC Tandem MS.** *J Anal Toxicol*. 1999;23;343-348.
32. Rivier L. **Is there a place for hair analysis in doping controls?.** *Forensic Science International*, 2000 Volume 107, Issue 1-3, Pages 309-323.
33. Selavka, C. M. and F. Rieders, **The determination of cocaine in hair: a review. [Review] [66 refs]**, *Forensic Science International*, 1995. 70: 155-164.
34. SKOOG, WEST, HOLLER, CROUCH. **"Fundamentos de Química Analítica"**, Ed. Thomson, 2005.
35. Smith, F. P. and D. A. Kidwell, **Cocaine in hair, saliva, skin swabs, and urine of cocaine users' children**, *Forensic Science International*, 1996. 83: 179-189.
36. Tsatsakis, Aristidis M. Ph.D; Tzatzarakis, Manolis N. Ph.D; Psaroulis, Dimitris M.D; Levkidis, Christos M.D; Michalodimitrakis, Manolis M.D. **Evaluation of addiction history of a dead woman after exhumation and sectional hair testing.** *American Journal of Forensic Medicine & Pathology*. March 2001. 22(1):73-77.
37. Wainhaus S.B.; Tzanani N.; Dagan S.; Miller M.L. Amirav A. **Fast analysis of drugs in a single hair.** *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. December 1998. Volume 9, Number 12, pp. 1311-1320(10).

## 12. ANEXO

### 12.1. CROMATOGRAMAS DE UNA CURVA ESTÁNDAR

Las figuras mostradas a continuación son los cromatogramas obtenidos para cada concentración inyectada a partir de la solución estándar de la primera curva, que es la que mejor se obtuvo, que va desde los 5 ng hasta los 25 ng, mostrando las áreas obtenidas, así como los tiempos de retención en los cuales cae el analito buscado y finalmente los tres iones de referencia los cuales se buscan y que se encuentran en cada pico obtenido.



**Fig.12.1.1.** Concentración de 5 ng.

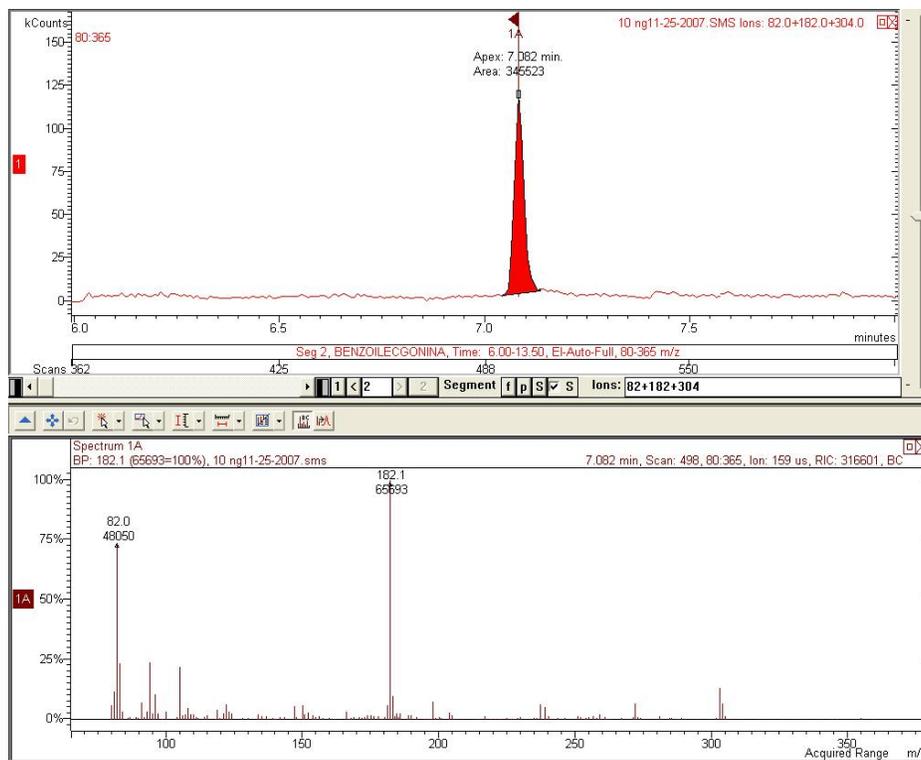


Fig.12.1.2. Concentración de 10 ng.

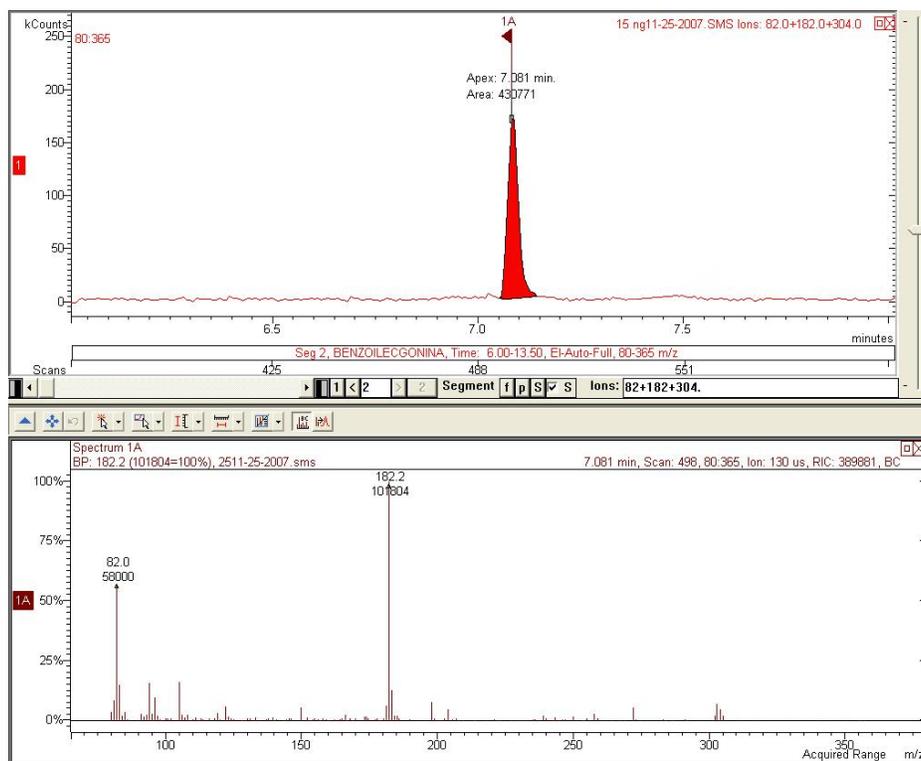


Fig.12.1.3. Concentración de 15 ng.

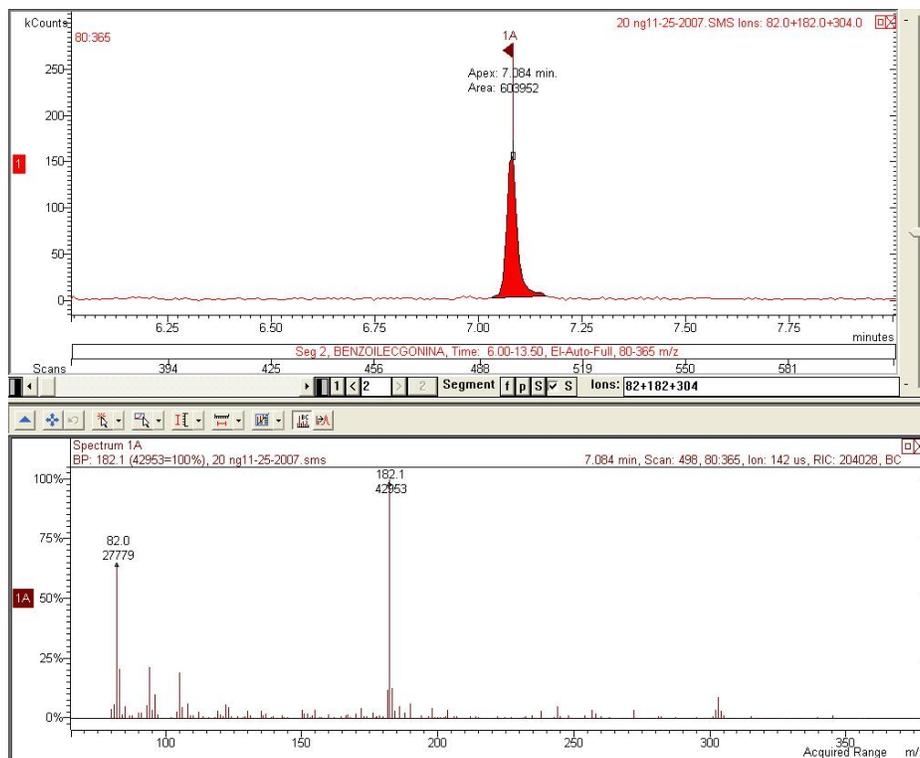


Fig.12.1.4. Concentración de 20 ng.

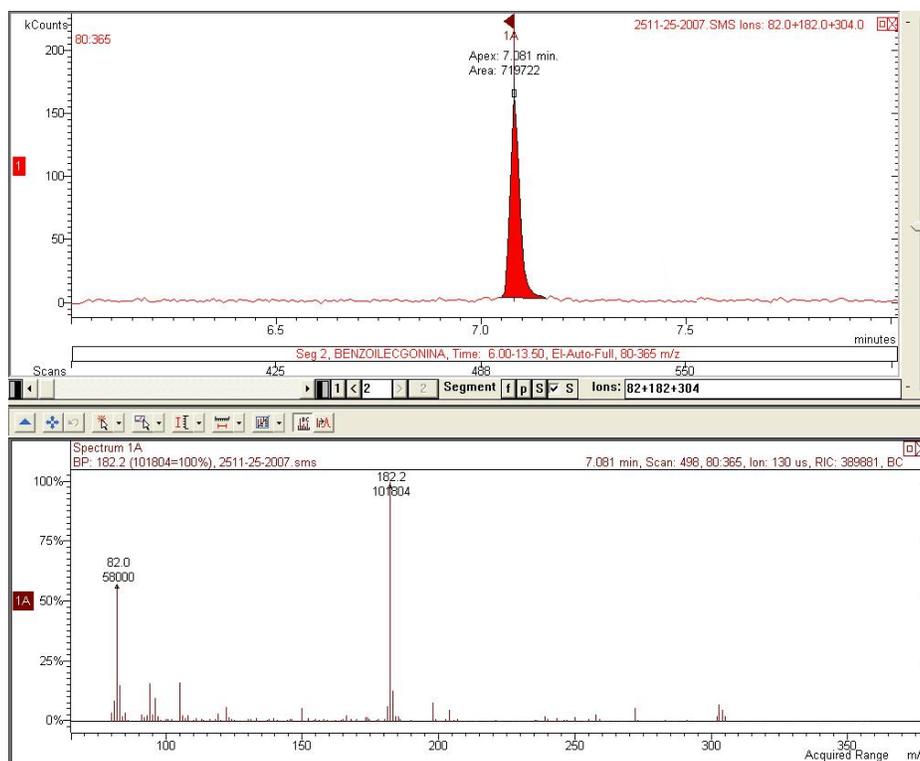


Fig.12.1.5 Concentración de 25 ng.

## 12.2. GLOSARIO.

### A.

**Amortiguación:** detención una reacción por modificación de las condiciones de la misma

**Adsorción:** las moléculas quedan retenidas por un sólido de elevada superficie específica.

**Análisis:** proceso que proporciona información física o química acerca de los componentes de una muestra o de la propia muestra,.

**Análisis ciego:** análisis de una muestra patrón de composición desconocida para el analista.

**Análisis cualitativo** análisis en el que se determina la identidad de la especie constituyente de una muestra.

**Análisis cuantitativo:** análisis en el que se determina la cantidad de una especie constituyente presente en una muestra.

**Analitos:** componentes que interesan de una muestra.

**Anchura de base:** anchura de la banda cromatográfica de un **soluto** medida sobre la línea base.

### C.

**Cromatografía:** separación en la que los solutos se distribuyen entre una fase móvil y estacionaria.

**Cromatografía de adsorción líquido-sólido:** forma de cromatografía líquida en la que la fase estacionaria es un adsorbente sólido.

**Cromatografía de exclusión por tamaño:** método de separación en el que se hace pasar la mezcla a través de un lecho de partículas porosas, de modo que las partículas más pequeñas tardan más en atravesarlo debido a su capacidad para penetrar en los poros.

**Cromatografía de exclusión por tamaño:** modo de cromatografía líquida en la que la fase estacionaria es un material poroso en el que se produce la separación en función del tamaño de los solutos.

**Cromatografía de fase inversa:** cromatografía líquida que utiliza una fase estacionaria no polar y una fase móvil polar.

**Cromatografía de fase normal:** cromatografía líquida que utiliza una fase estacionaria polar y una fase móvil no polar.

**Cromatografía de fluidos supercríticos:** técnica de separación en la que la fase móvil es un fluido supercrítico.

**Cromatografía de intercambio iónico:** modo de cromatografía líquida en la que la fase estacionaria es una resina de intercambio iónico.

**Cromatografía en columna:** modo de cromatografía en la cual la fase estacionaria está retenida en una columna.

**Cromatografía gaseosa:** técnica cromatográfica en la que la fase móvil es un gas.

**Cromatografía gas-líquido:** técnica cromatográfica en la que la fase móvil es un gas y la fase estacionaria es un líquido retenido sobre un material empaquetado sólido o sobre las paredes de la columna.

**Cromatografía iónica de columna única:** cromatografía de intercambio iónico en la que las condiciones se ajustan de modo que no sea necesaria una columna supresora de iones.

**Cromatografía líquida de alta resolución:** técnica cromatográfica en la que la fase móvil es un líquido.

**Cromatografía plana:** modo de cromatografía en la que la fase estacionaria se halla inmovilizada en una superficie plana.

**Cromatograma:** registro de la señal de detección en función del tiempo de elución o del volumen.

**Curva de valoración:** gráfica que muestra el progreso de una valoración como función del volumen de agente valorante añadido.

**D.**

**Detector de captura de electrones:** detector de GC selectivo para que yo solutos que contienen grupos funcionales halógeno por nitro.

**Desviación estándar:** medida estadística de la desviación promedio de los datos con respecto al valor medio de los mismos.

**Determinación:** análisis de una muestra para identificar la identidad, concentración o propiedades del analito.

**E.**

**Espectro de masas:** representación gráfica de la intensidad de un ion como función de los cocientes masa/carga de ese ion.

**Estandarización:** proceso por el que se establece la relación entre la cantidad del analito y la señal del método.

**Extracción:** proceso por el cual un soluto se transfiere de una fase a otra fase.

**F.**

**Factor:** propiedad de un sistema que se modifica experimentalmente y que puede afectar a la respuesta.

**Fase estacionaria:** en cromatografía como fase extractante que permanece en posición fija.

**Fase estacionaria:** mirada ligada fase estacionaria líquida ligada por medios químicos a las partículas sólidas de material empaquetado

**Fase móvil:** en cromatografía, o fase extractante que se desplaza través del sistema.

**G.**

**Grados de libertad:** número de valores independientes en que se pasa un resultado.

**I.**

**Inyección en columna:** inyección directa de muestras térmicamente inestables en una columna capilar.

**Inyección con divisor (Split):** técnica inyección de muestras en una columna capilar en la que sólo una pequeña parte de la muestra penetran a columna.

**Inyección sin divisor (Splitless):** técnica de una inyección de una muestra en una columna capilar que permite el paso a la columna de una mayor proporción de la muestra.

**L.**

**Límite de cuantificación:** concentración en cantidad ruta más pequeña de un analito que puede determinarse con seguridad.

**Límites de detección:** informe estadístico sobre la menor cantidad de analito que pueda detectarse con seguridad.

**Límite de exclusión:** en cromatografía de exclusión por tamaño, el soluto más grandes y que puede que separarse de otros solutos; todos los solutos de mayor tamaño aludió.

**Límite de inclusión:** en cromatografía de exclusión por tamaño, solutos más pequeño que puede separarse de otros solutos; todo los solutos de menor tamaño eluyen juntos.

**M.**

**Metabolito:** Producto generado durante la degradación de una sustancia en el organismo.

**Método:** medio para analizar una muestra a fin de hallar un analito pagó en una matriz específica.

**Método normalizado:** método que se sabe produce resultados aceptables.

**Muestra:** miembro de una población que se recogen y analiza.

**N.**

**Nanogramo (ng):** Unidad utilizada para expresar de manera uniforme la concentración de sustancias en muestras. Un mil millonésimo de un gramo.

**P.**

**Plato teórico:** medio cuantitativo para evaluar la eficacia de una columna que consiste en tratar la columna como si estuviera compuesta de pequeñas zonas, o platos, en la que tiene lugar el reparto entre la fase móvil y la fase estacionaria.

**Procedimiento:** instrucciones escritas que señalan la forma de analizar una muestra.

**R.**

**RIA Radioinmunoensayo:** Método utilizado para determinar la cantidad de una sustancia mediante el uso de un antígeno radioactivo específico.

**Sensibilidad:** medida de la capacidad de un método para distinguir entre dos muestras; se expresa como el cambio de la señal por cambio de unidad de la cantidad del analito.

**Señal:** medida experimental que es proporcional a la cantidad del analito.

**Sobrenadante:** disolución que permanece tras la formación de un precipitado.

**T.**

**Test de la t:** test estadístico utilizada para comparar dos valores medios con el fin de saber si su diferencias demasiado grande para poder ser explicada por un error aleatorio.

**Tiempo de retención:** tiempo que tardó absoluto en desplazarse desde inyector hasta el detector ( $t_r$ ).

**Tiempo muerto:** tiempo necesario para que los solutos no retenidos se desplacen desde inyector al detector ( $t_m$ ).

**Transferencia de masa:** una contribución al ensanchamiento de una banda debida al tiempo necesario para que un soluto se desplacen desde la fase móvil o estacionaria la interfaz entre las dos fases.

**V.**

**Validación:** proceso por el que se comprueba que un procedimiento proporciona resultados aceptables.