



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA**

**DETERMINACIÓN POST-MORTEM DE COCAÍNA Y
BENZOÍLECGONINA EN UNA MUESTRA DE HÍGADO.**

**Tesina para obtener el grado de Licenciado en
Químico Farmacéutico Biólogo**

Presenta: LÓPEZ CUANDO FERNANDO

Asesor: Dr. en C. FRANCISCO OSCAR GUADARRAMA MORALES

MÉXICO D.F. A 07 DE MARZO DEL 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

CONTENIDO

	pagina
RESUMEN.....	6
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	7
OBJETIVOS.....	8
INTRODUCCIÓN.....	9
1. TOXICOLOGÍA.....	10
1.1 Definición.....	10
1.2 Clasificación.....	11
1.3 Grado de Toxicidad.....	12
2. TOXICOLOGÍA FORENSE.....	13
2.1 Definición.....	13
2.2 Campo de Estudio.....	14
2.3 Tipo de Muestra.....	14
2.4 Recolección y Almacenamiento de Muestras.....	15
2.5 Cadena de Custodia.....	19
3. DROGAS DE ABUSO.....	23
3.1 Definiciones.....	23
3.2 Clasificación.....	24
4. TOXICOLOGÍA DE LA COCAÍNA.....	28
4.1 Características fisicoquímicas de la cocaína.....	28
4.2 Farmacocinética de la cocaína.....	29
4.3 Metabolismo de la cocaína.....	30
4.4 Metabolismo de acción de la cocaína.....	32
4.5 Acciones farmacéutica de la cocaína.....	34
5. ANÁLISIS DE COCAÍNA.....	35
5.1 Características generales de técnicas de determinación.....	35
5.1.1 Inmunoensayos.....	37
5.1.2 Técnicas Cromatográficas.....	41
5.1.3 Identificación y cuantificación mediante cromatografía...	42

5.2 Características generales de técnicas de extracción.....	60
5.2.1 Columnas de Extracción Líquido-Líquido.....	61
5.2.2 Columnas de Extracción en Fase Sólida (CEFS).....	64
6. COMPARACIÓN DE DIFERENTES MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE COCAÍNA Y BENZOÍLECGONINA EN UNA MUESTRA DE HÍGADO <i>POST-MORTEM</i>	69
6.1 Resultados.....	77
6.2 Conclusiones.....	82
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83

ABREVIATURAS

ACHE	Acetilcolinesterasa
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AMIA	American Medical Informatics Association
BCHE	Butirilcolinesterasa
BSTFA	Bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida
BZ	Benzoilecgonina
CCD	Cromatografía de Capa Delgada
CCDAR	Cromatografía en Capa Delgada de Alta Resolución
CEFS	Columnas de Extracción en Fase Solida
CFE	Cromatografía de Fase Enlazada
CL	Cromatografía Líquida
CLAR	Cromatografía Líquida de Alta Resolución
COC	Cocaína
D₃-BZ	N-desmetil-N-[² H ₃] metilbenzoilecgonina
D₃-EC	N-desmetil-N-[² H ₃] metilecgonina
D₃-COC	N-desmetil-N-[² H ₃] metilcocaina
D₃-ED	N-desmetil-N-[² H ₃] Metilecgonidina
D₃-MED	Metil N-desmetil-N-[² H ₃] Metilecgonidina
DMF	Dimetilformamida
DMF-DPA	Dimetilformamida Dipropil Acetal
EC	Ecgonina
ECD	Detector de Captura Electrónica
ED	Anhidroecgonina
EFS	Extracción en Fase Sólida
ELISA	(acrónimo del inglés) Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas
EME	Ecgonina metil ester
EMIT	(acrónimo del inglés) Técnica de Inmunoensayo Enzimático Multiplicado
FE	Fase Estacionaria

FID	(acrónimo del inglés) Detector de Ionización de Llama
FM	Fase Móvil
FPIA	(acrónimo del inglés) Inmunoensayo de Polarización de Fluorescencia
FT-ICR	(acrónimo del inglés) Resonancia de Ion Ciclotron con Transformación de Fourier
CG	Cromatografía de Gases
IS	Estándares Internos
IUPAC	(acrónimo del inglés) Unión Internacional de Química Pura y Aplicada
LSD	Dimetilamida de Ácido Lisérgico
MED	Metilecgonidina
MS	(acrónimo del inglés) Espectrómetro de masas
MSTFA	N-metil-N-trimetilsilil-trifluoroacetamida
MTBSTFA	N-metil-N-(terc-butildimetilsilil) trifluoroacetamida
NAD⁺	Nicotinamida Adenín Dinucleótido, en su forma oxidada
NADH	Nicotinamida Adenín Dinucleótido, en su forma reducida
NIDA	(acrónimo del inglés) Instituto Nacional de Drogas de Abuso
NPD	Detector de nitrógeno-fósforo
OMS	Organización Mundial de la Salud
RF	(acrónimo del inglés) Relación de Frentes
RIA	(acrónimo del inglés) Radio Inmunoensayo
SIM	(acrónimo del inglés) Monitoreo de Ion Seleccionado
SNC	Sistema Nervioso Central
TBDMCS	Terbutildimetilclorosilano
TIC	(acrónimo del inglés) Escaneo Total de Iones
TMS-BZ	Trimetilsilil-Bezoilecgonina
TOF	(acrónimo del inglés) Tiempo de Vuelo
tr	Tiempo de Retención
UV	Ultravioleta

RESUMEN

Se realizó la revisión bibliográfica que abordó la problemática que presenta la determinación de cocaína en una muestra de hígado, como alternativa a las muestras biológicas encontradas en un probable delito como indicio en el lugar de los hechos, como son la sangre, orina, semen, entre otras. Se revisaron aspectos relacionados con la presencia de cocaína y su metabolito más representativo; en una matriz biológica tal como lo es el hígado, siendo este órgano en el cual se metaboliza esta droga, es más probable que la sustancia se encuentre en mayor concentración. Mediante la revisión bibliográfica se estableció la metodología más apropiada, para el tratamiento de la muestra, así como para la extracción de la sustancia de interés. En el presente trabajo se abarcaron las metodologías más comúnmente aplicadas a la determinación en estudios forenses de drogas, como cromatografía de líquidos de alta resolución, cromatografía de gases así como cromatografía de gases acoplada a espectrómetro de masas.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En el lugar del hecho normalmente se encuentran muestras de sangre y orina, pero en diversas situaciones no siempre es obtenida en la cantidad mínima necesaria para una investigación toxicológica, por ende es indispensable la sustitución de estas muestras empleando una matriz alternativa como lo es el hígado, en la cual se podría encontrar en mayor cantidad los diferentes tóxicos y aunado a ello se puede obtener mayor concentración para la determinación de cocaína y sus metabolitos.

OBJETIVOS

- Revisar bibliográficamente la metodología empleada para la determinación y cuantificación de cocaína y su metabolito benzoilecgonina en una muestra de hígado *post-mortem*.

SECUNDARIOS

- Mostrar la metodología de extracción de cocaína y sus metabolitos en una muestra de hígado *post-mortem*, con base a la revisión bibliográfica.
- Presentar la metodología de análisis instrumental para la determinación de cocaína y su metabolito benzoilecgonina en una muestra de hígado *post-mortem*, con base a la revisión bibliográfica.

INTRODUCCIÓN

La cocaína es una de las drogas de abuso más populares y por tanto rutinariamente investigada en el Laboratorio de Toxicología Forense. Los cuerpos de los fallecidos por sobredosis de cocaína generalmente no están disponibles de manera inmediata. En muchos casos, el cadáver puede estar en un avanzado estado de descomposición, carente o deficiente de sangre para un análisis toxicológico. Si se quiere valorar que la defunción fue por sobredosis de cocaína, hay que tener presente que cualquier muestra biológica es susceptible de un examen toxicológico. Por lo que, es factible contemplar una muestra de vísceras tal como el hígado. Es necesario implementar la técnica adecuada para realizar la investigación toxicológica de una matriz biológica (hígado), de la cual se extraiga y determine cualitativa y cuantitativamente cocaína y su metabolito más representativo, la benzoilecgonina.

Por lo tanto, es muy importante identificar selectivamente la presencia de esta droga y su metabolito en una muestra tisular, donde se descompone más lentamente. El análisis de cocaína en hígado no es tan habitual en la práctica pero su detección en ciertos casos puede ser de gran utilidad, empleando métodos como la extracción en fase sólida y posterior determinación por cromatografía de líquidos acoplada con masas. Shimomura y col.³¹ Han publicado estudios de detección y cuantificación de cocaína y sus metabolitos en muestras *post-mortem* de fluidos y tejidos con buenos resultados. De la misma forma se han realizado evaluaciones de los métodos de extracción, obteniéndose resultados satisfactorios con la extracción en fase sólida.

TOXICOLOGÍA

1.1. Definición

Puede ser definida como la ciencia de los venenos o de las sustancias tóxicas, sus efectos, antídotos y detección; o bien como señala la Organización Mundial de la Salud " disciplina que estudia los efectos nocivos de los agentes químicos y de los agentes físicos (agentes tóxicos) en los sistemas biológicos y que establece además, la magnitud del daño en función de la exposición de los organismos vivos a dichos agentes. Se ocupa de la naturaleza y de los mecanismos de las lesiones y de la evaluación de los diversos cambios biológicos producidos por los agentes nocivos",¹ de la misma forma hay que definir los siguientes conceptos.

Tóxico: Cualquier sustancia o elemento xenobiótico que ingerido, inhalado, aplicado, inyectado o absorbido, es capaz por sus propiedades físicas o químicas de provocar alteraciones orgánicas o funcionales y hasta la muerte.²

Estupefaciente: Droga que actúa a nivel del SNC y además producen dependencia y tolerancia.

Psicoactivo: Todo lo que actúe a nivel del SNC estimulándolo o deprimiéndolo.

Dependencia física: Son las manifestaciones corporales que se presentan cuando se retira la administración de una sustancia a la que el cuerpo está acostumbrado.

1.2. Clasificación

El fenómeno de incremento en el uso de sustancias químicas para muchos propósitos, y en lo que concierne, a la presencia de contaminantes químicos y tóxicos en el aire, agua, alimentos y otras partes del ambiente, han motivado que esta rama del conocimiento pueda ser clasificada o dividida en las siguientes áreas de toxicología:³

- Clínica
- Ocupacional
- Ambiental
- Forense

Toxicología clínica

Estudia los efectos esperados o inusuales de una droga terapéutica (medicamentos) que se aplica en pacientes; donde se observa la condición de los mismos y el progreso que tienen estas sustancias en el tratamiento de padecimientos o enfermedades.

Toxicología ocupacional

En la última mitad del siglo diecinueve y durante el siglo pasado, el conocimiento de los efectos de la actividad laboral en ciertas industrias incurrieron en la manifestación de serias enfermedades y decesos ocasionados por la exposición a químicos peligrosos y agentes tóxicos bajo condiciones inseguras de trabajo; este es el campo de acción de la toxicología ocupacional, cuya disciplina aborda el estudio de los efectos nocivos sobre la salud del trabajador producidos por los contaminantes del ambiente laboral.

Toxicología ambiental

La toxicología ambiental es aquella que concierne con los efectos dañinos de las sustancias químicas o agentes tóxicos que están presentes en el aire, agua, suelo, alimentos u otros factores ambientales y a los cuales están expuestos tanto el hombre como animales domésticos, peces, vida silvestre y otros elementos de la

biota. Es decir se aboca al estudio de los efectos adversos de los agentes ambientales sobre los organismos vivos.

Toxicología forense

Es la rama de la toxicología que estudia los métodos de investigación médico-legal en los casos de envenenamiento y muerte.⁴

1.3. Grado de toxicidad

Toxicidad es la propiedad de una molécula o compuesto químico que es capaz de producir una lesión o efecto nocivo sobre los organismos vivos. Estos daños pueden ser causados por las circunstancias particulares de exposición. Por lo tanto una subdivisión de la toxicidad puede ser hecha sobre la base de la duración a la exposición.⁵

Exposición aguda

Se produce por una exposición de corta duración en el cual el agente químico o físico es absorbido rápidamente, ya sea en una o varias dosis, en un período no mayor de 24 horas; los efectos aparecen de manera inmediata.

Exposición subaguda

Se produce ante exposiciones frecuentes o repetidas durante varios días o semanas; los efectos aparecen en forma relativamente retardada.

Exposición crónica

Se produce con exposiciones repetidas a bajas dosis durante largo tiempo. Los efectos se manifiestan porque el agente tóxico se acumula en el organismo, es decir, la cantidad eliminada es menor que la absorbida; o bien, porque los efectos producidos por la exposiciones repetidas se suman.

Además la toxicidad también puede seccionarse sobre el contexto del sitio de acción en que tiene su efecto:

Efectos locales: Refiere a la acción que toma lugar en el punto o área de contacto. El sitio puede ser la piel, membrana mucosa de los ojos, nariz, boca, o cualquier otra parte del sistema respiratorio o gastrointestinal.

Efectos sistémicos: Se refiere a un sitio de acción que puede estar muy ajeno al lugar de contacto y se asume que la absorción se ha llevado a cabo. Es decir, tras la absorción y distribución de la sustancia tóxica, a través de la sangre, se aloja en un órgano blanco o bien es manifiesta su acción en todo el organismo.

TOXICOLOGÍA FORENSE

Muchas sustancias tóxicas no generan ninguna lesión característica, de tal manera que si se sospecha alguna reacción tóxica, la investigación visual no sería suficiente para llegar a una conclusión.

2.1. Definición

Es la rama de la toxicología que estudia los métodos de investigación médico-legal en los casos de envenenamiento y muerte.⁴

Tiene como funciones:

- Identificación de un agente lesivo
- La identificación de sustancias que produzcan una alteración psíquica pasajera o permanente
- El determinar una intoxicación como circunstancia calificadora de un delito
- El determinar una intoxicación como delito
- El establecer una intoxicación como estado peligroso

2.2. Campo de estudio

Cuando esta área de las ciencias biológicas se emplea para esclarecer asuntos de orden jurídico, ayudando a la aplicación de la ley, hablamos de toxicología forense. Se trata de una disciplina donde la toxicología y la química examinan los aspectos médico-legales de las investigaciones *post-mortem* a fin de esclarecer las causas y circunstancias de un deceso.

Como todo estudio científico se basa en la colección y posterior análisis de los datos, por el método cartesiano, se van eliminando posibilidades hasta concluir con un agente etiológico. Entre los instrumentos modernos de trabajo en el laboratorio forense se incluyen el espectrofotómetro de absorción atómica y el cromatógrafo de gas computarizado.⁶

2.3. Tipo de muestra

Las muestras biológicas en toxicología forense incluyen sangre, orina, semen, riñón, cerebro, hígado, bilis, contenidos gástricos, intestino, bazo, pulmón, huesos y más recientemente cabello, uñas, saliva y sudor. También son fundamentales en casos de agresión sexual, las muestras de contenido vaginal y/o rectal, así como las prendas íntimas más cercanas o en contacto con estos fluidos, pues permiten situar al sospechoso en el lugar del hecho e identificarlo, a través de la realización de diversos estudios.⁷

La selección apropiada, la recolección y la remisión de muestras biológicas y de otro tipo para el análisis toxicológico son de importancia fundamental para la producción de resultados significativos precisos, así como, para la interpretación subsecuente de los mismos.

La estabilidad de las diferentes muestras es muy variable. Hay muestras estables, que no requieren ningún tipo de conservación, como las uñas y los pelos, las hay más o menos inestables, que requieren algún tipo de conservación, como el humor vítreo, la orina o el contenido gástrico, y las hay muy inestables, que exigen

una toma rápida (muy cercana a la hora de la muerte) o métodos específicos de preservación, como la sangre y los tejidos.⁸

2.4. Recolección y almacenamiento de muestras

Sangre. Los análisis de sangre son los únicos que permiten extrapolar los valores correspondientes al momento en que se recogieron las muestras, hasta el momento del accidente o del incidente, pudiéndose así establecer una hipótesis sobre la concentración de la droga en sangre en el momento que nos interesa y deducir, como consecuencia, el posible grado de afectación del individuo en el momento del incidente.

Para la toma de muestra se desinfectará la piel con alcohol, excepto en el caso de determinación de alcoholemia, donde se recurrirá a la solución jabonosa, agua oxigenada o solución de lugol. Ante la sospecha de una intoxicación de origen desconocido se deberá recoger la muestra de sangre en dos tubos, uno de ellos con anticoagulante (fluoruro de sodio al 1 por ciento, que también es preservador antibacteriano) y el otro sin anticoagulante. El volumen mínimo recomendable en cada caso será de 10 mL (tomar 20 mL de sangre con una jeringa y dividir el contenido en ambos tubos). Los recipientes que se envían deben ser tubos de polipropileno o similar con cierre hermético, de tapa rosca y sellado con cinta adhesiva. Es preferible utilizar material nuevo o virgen, para evitar contaminaciones pues muchas veces quedan restos de medicamentos u otras sustancias que no se extraen con lavado, provocando confusiones en el ulterior estudio analítico.⁹

Al obtener la muestra no debe quedar espacio vacío en el recipiente, es decir, se debe evitar la formación de una cámara de aire, que produce pérdidas importantes no sólo de etanol sino de cualquier otro tóxico volátil, para evitar ésto, el recipiente debe ser llenado al ras, bien tapado y si es posible sellado. La conservación de la muestra se hará en hielera a 4°C. Las muestras deben rotularse y sellarse correctamente en frente de la persona sometida a examen (si se trata de paciente vivo), con datos apropiados mínimos y legibles, que correspondan al hecho

(identificación de la víctima o imputado, juzgado o fiscalía interviniente, fecha, hora de toma de muestra y número de causa), que no den lugar a confusión, utilizando marcadores de tinta indeleble, iniciando inmediatamente la cadena de custodia.¹⁰

Orina. Este tipo de muestra es idónea para realizar un estudio de búsqueda rápida en el caso de no conocer el origen de la intoxicación ya que todo medicamento o droga es excretado en mayor o menor parte por vía renal, ya sea en forma de compuesto inalterado o en forma de diversos metabolitos.

Generalmente, se emplea en la detección de consumo de sustancias ilícitas en trabajadores o en casos de dopaje en el deporte. Sin embargo, un resultado positivo solo indicará el consumo de la sustancia detectada, independientemente del nivel obtenido. Las ventajas de esta muestra es que la concentración del analito puede ser mayor que en sangre, además la orina está exenta de proteínas, con lo cual se tienen menos interferencias, y es una muestra abundante, fácil de recolectar y de conservar.¹¹

Durante el proceso de recolección, algunos individuos tratan de falsificar la muestra mediante el agregado de diferentes sustancias como por ejemplo: sales, disolventes, sustancias enmascarantes. Con el fin de asegurar la autenticidad de la muestra, la persona efectuará la micción ante la presencia directa del responsable del proceso, y se evaluará el aspecto de la muestra. También se practicarán pruebas para controles de temperatura, el pH y densidad urinaria, que permitan detectar la adulteración de la muestra.⁸

Se deberá recoger un volumen de orina no inferior a 30 mL, en un frasco de toma de muestra de polipropileno o similar con cierre hermético, de tapa rosca y sellado con cinta adhesiva, es conveniente conservarla a -20°C, pero se acepta la refrigeración a 4°C, si el análisis se practica dentro de las 24 a 48 horas posteriores a la toma de muestra. No agregar ninguna sustancia como conservante.

Contenido vaginal, rectal y/o bucal. Este tipo de muestra es fundamental en casos de agresión sexual, toda vez que permiten no solo tipificar el delito, sino

también identificar al sospechoso en caso de un resultado positivo, para la detección de espermatozoides en estos fluidos corporales, a través de la realización de un estudio comparativo de ADN.⁸

Este examen que tiene mérito probatorio se lleva a cabo en las Unidades de Biología Molecular y Genética. Para la toma de muestra el médico responsable realizará un lavado vaginal, rectal o bucal utilizando 10 mL de suero fisiológico estéril, usando para ello una jeringa desechable de un volumen aproximado de 20 mL. El contenido total de la jeringa obtenido después del lavado, se depositará en tubos de polipropileno o similar con cierre hermético, de tapa rosca y sellados con cinta adhesiva. Aunque se han utilizado torundas estériles para la realización de este procedimiento, los resultados obtenidos son significativamente menos eficientes, por lo que se prefiere la utilización de lavado con suero fisiológico. Las muestras así obtenidas, deberán ser remitidas en cajas aisladas y refrigeradas, dentro de las 24 horas posteriores a la toma de muestra.

Pelo. El análisis de pelo tradicionalmente se ha utilizado para la determinación de metales pesados como el arsénico, el cual se deposita en la raíz y a lo largo del cabello en la medida de su crecimiento. Posteriormente, se han realizado en esta matriz distintas determinaciones de drogas, tales como heroína, morfina, lidocaína, además de contaminantes como hidrocarburos aromáticos policíclicos, y recientemente se desarrolló un método para determinar escopolamina.^{12, 13}

La ventaja del uso de esta matriz, es que permite la detección de las sustancias en una muy amplia franja de tiempo si la comparamos con otras muestras biológicas, como sangre y orina, que lo permiten en unas horas o pocos días. Además es una muestra muy fácil de obtener, se toma aprox. 1 cm de mechón lo más próximo al cuero cabelludo, en el caso de vello pubiano o axilar se obtiene al ras de la piel, dicha muestra deberá ser colocada en sobre de papel a temperatura ambiente.⁹

Humor vítreo. En recientes investigaciones se propone de forma novedosa al humor vítreo como muestra de elección para la búsqueda de ciertos tóxicos como el etanol, también pueden ser determinadas en esta matriz barbitúricos,

benzodiazepinas, antidepresivos, opiáceos, cannabinoles, amfetaminas, LSD, anestésicos generales.¹⁴ Las ventajas de esta muestra estriban en que no se contamina fácilmente con otros fluidos y su descomposición es más retardada en el cadáver.¹⁵

Líquido pericárdico. Es un ultrafiltrado del plasma y puede constituir una muestra alternativa *post-mortem* cuando no haya disponibilidad de sangre, existen estudios que han validado métodos de extracción de cocaína y sus metabolitos en esta muestra, así como morfina y codeína.¹⁶ También, se realizó un estudio del comportamiento *post-mortem* de la actividad hidrolítica de las enzimas Acetilcolinesterasa (AChE) y Butirilcolinesterasa (BChE) en este líquido, con la finalidad de estudiar la factibilidad de utilizar estos parámetros bioquímicos como “biomarcadores *post mortem*” y establecer el diagnóstico de muerte por intoxicación con sustancias inhibitoras de las enzimas colinesterasas.⁷

Prendas. La prenda deberá ser fijada, conservada seca a temperatura ambiente y remitida en sobre de papel y no en bolsas plásticas (para evitar la contaminación bacteriana y de otros microorganismos), estas muestras deben rotularse y sellarse correctamente de la misma manera en que se ha señalado para los casos anteriores, iniciando inmediatamente la cadena de custodia.¹⁵

Muestras requeridas en una toxicológica general sistemática. Existen casos en que no hay sospechas o pistas acerca de lo que se quiere investigar en el cadáver, por lo que debe realizarse una sistemática toxicológica general, para lo cual es preciso remitir al laboratorio las siguientes muestras *post-mortem*:^{10, 15}

- Un frasco bocal con estómago y su contenido, además de vómitos y lavado gástrico.¹⁷
- Un frasco seco con sangre limpia (aprox. 100 mL), algunos protocolos recomiendan 10 mL como mínimo.^{17, 18}
- Un frasco con orina (el máximo volumen posible) o en su defecto pared de la vejiga. Un frasco bocal con aprox. 100 g de riñón, esta cantidad deberá

aumentarse ante la sospecha de intoxicación por mercurio, cadmio, manganeso, fósforo, etc.

- Un frasco bocal con aprox. 100 g de hígado y vesícula biliar, necesarios para la investigación de tóxicos orgánicos y metálicos. Además, un frasco bocal con aprox. 500 g de cerebro especialmente indicado en intoxicaciones por disolventes orgánicos, productos de limpieza en seco, anestésicos y plaguicidas orgánicos fosforado y clorados.¹⁵
- Humor vítreo: todo lo que se disponga.⁸
- Cuando se sospeche de intoxicaciones por arsénico, plomo, berilio, talio, estroncio, uranio, y flúor deberán remitirse muestras de uñas, cabellos o huesos

2.5. Cadena de custodia

Procedimiento de control que se aplica al indicio material, ya sea vestigio, huella, medio de comisión, objeto material o producto relacionado con el delito, desde la localización por parte de una autoridad, policía o Agente del Ministerio Público, hasta que la autoridad competente ordene su conclusión, según se trate de la averiguación previa o el proceso penal.¹⁹

La Cadena de custodia, juega un papel importante en el proceso penal sobre los elementos materiales del delito y la evidencia física. Su importancia radica en que éstas pueden probar la comisión de un delito, relacionar al sospechoso con la víctima o con la escena del crimen, establecer las personas asociadas con el delito, corroborar el testimonio de una víctima, definir el modo de operación del agresor y relacionar casos entre sí o exonerar a un inocente. Además, es más confiable y objetiva que la prueba testimonial.²⁰

Principios de la cadena de custodia. La cadena de custodia al iniciarse en la escena del delito en donde se descubran, recauden o encuentren los elementos materiales probatorios y evidencia física, se rige con los siguientes principios:²⁰

- **El control** de todas las etapas desde la recolección o incorporación de los elementos materiales, evidencias y bienes incautados hasta su destino final, así como del actuar de los responsables de la custodia de aquellos.
- **La preservación** de los elementos materiales y evidencias, así como de los bienes incautados para garantizar su inalterabilidad, evitar confusiones o daño de su estado original, así como un indebido tratamiento o incorrecto almacenamiento.
- **La seguridad** de los elementos materiales y evidencias así como de los bienes incautados con el empleo de medios y técnicas adecuadas de custodia y almacenamiento en ambientes idóneos, de acuerdo a su naturaleza.
- **La mínima intervención** de funcionarios y personas responsables en cada uno de los procedimientos, registrando siempre su identificación.
- **La descripción detallada** de las características de los elementos materiales y evidencias además de los bienes incautados o incorporados en la investigación de un hecho punible, del medio en el que se hallaron, de las técnicas utilizadas, de las pericias, de las modificaciones o alteraciones que se generen en aquellos entre otros.

Dichos principios, son importantes para efecto de demostrar que los elementos materiales probatorios y la evidencia física han sido detectados, fijados, recogidos, obtenidos y embalados técnicamente, observando lo prescrito por la Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos, el Código Federal de Procedimientos Penales y los Tratados Internacionales sobre derechos humanos vigentes.

Procedimiento de la cadena de custodia

La cadena de custodia debe de ser constante en todos los procedimientos que se usan en la técnica criminalística, en la medicina legal, en las ciencias forenses y no únicamente unas reglas que se utilizan al explorar la escena de los homicidios, como se piensa usualmente. En todo caso, las escenas del delito son tan diversas como la misma tipicidad del código penal lo permite, por lo que en cada escena del delito los niveles a adoptar son los siguientes:

- **Primer nivel:** Cuando se produce un hecho delictuoso, por lo general los primeros en constituirse al lugar de la escena del delito son los efectivos policiales locales, los mismos que verificarán y confirmarán la noticia criminal para que procedan a comunicar al Ministerio Público para que se constituya al lugar de la escena del delito conjuntamente con efectivos especializados, y procedan a asegurar y fijar el área a ser aislada y acordonarán el lugar utilizando una barrera física (cuerdas, cintas, etc.). A fin de evitar la pérdida o alteración de los elementos materiales o evidencias físicas que se puedan encontrar.
- **Segundo nivel:** Cuando llegan a la escena del delito, el Ministerio Público y los efectivos especializados, solicitarán información previa de la persona que dio a conocer el hecho y realizarán un registro cronológico de todo lo que van hacer para proceder a la búsqueda de los elementos materiales y evidencias físicas utilizando un método de búsqueda dependiendo de las características del lugar y circunstancias de la escena del delito, quienes registrarán la información obtenida de todas sus actividades.
- **Tercer nivel:** Una vez encontrados los elementos materiales y evidencias físicas en la escena del delito se procederá a perennizarlo antes, durante y después de recolectar, embalar, rotular y etiquetar por medio de fotografía, video o topográficamente de forma adecuada clasificándolo de acuerdo a su clase, naturaleza y estado, observando las condiciones de bioseguridad

y protección como por ejemplo uso de guantes, tapabocas, gorros, gafas, caretas y equipos, entre otros, según la naturaleza del elemento material o evidencia física que se hayan encontrado o aportado, pero observando las condiciones de preservación y seguridad que garanticen la integridad, continuidad, autenticidad, identidad y registro, de acuerdo a su clase y naturaleza.

- **Cuarto nivel:** Una vez obtenidos los elementos materiales y evidencias físicas el Ministerio Público determinará la remisión a los correspondientes laboratorios para que sea analizado en los laboratorios criminalísticos, quienes realizarán los estudios o análisis solicitados y emitirán el informe pericial, pero en caso que no requiera de análisis o estudio inmediato se procederá a enviarlo al almacén de evidencias, pero en uno u otro caso se deberá prever para que quede un remanente con la finalidad de que en el futuro puedan constatar ciertos análisis o estudios sobre dichos elementos materiales o evidencias físicas y todo personal que se encuentre en contacto con los elementos materiales y evidencias físicas deberá de señalar en el formato de cadena de custodia el lugar, la fecha y la hora.

Este procedimiento se sigue debido a que este sistema de cadena de custodia, debe nacer a la luz del proceso penal en sus diferentes fases, y quedar establecidas a las pautas que deberán seguir las personas que reglamenten, desarrollen, apliquen y controlen el sistema de cadena de custodia.

DROGAS DE ABUSO

3.1. Definiciones

- Droga
1. Los términos *drug* (en inglés) y *drogue* (en francés) se utilizan indistintamente para definir fármacos de prescripción como sustancias psicoactivas sin utilidad terapéutica. Según la Organización Mundial de la Salud, *droga* es “toda sustancia que, introducida en un organismo vivo, pueda modificar una o varias de sus funciones” (OMS, 1969). Esta definición es poco útil e inexacta, ya que engloba fármacos de prescripción, sustancia psicoactiva, muchas plantas, sustancias químicas o tóxicas para el organismo.²¹
 2. Toda sustancia que, introducida en el organismo por cualquier vía de administración, produce una alteración de algún modo, del natural funcionamiento del sistema nervioso central del individuo, alteraciones de conducta, y es además, susceptible de crear dependencia.²²
 3. Toda aquella sustancia que produce dependencia y que se emplean voluntariamente para provocarse determinadas sensaciones o estados síquicos no justificados terapéuticamente.²³
 4. En farmacología, una droga es toda materia prima de origen biológico que directa o indirectamente sirve para la elaboración de medicamentos, y se llama principio activo a la sustancia responsable de la actividad farmacológica de la droga. Puede ser todo vegetal o animal entero, órgano o parte del mismo, o producto obtenido de ellos por diversos métodos que poseen una composición química o sustancias químicas que proporcionan una acción farmacológica útil en terapéutica.²¹

5. El término *droga de abuso* define mejor lo que coloquialmente entendemos como droga: “sustancia de uso no médico con efectos psicoactivos (capaz de producir cambios en la percepción, el estado de ánimo, la conciencia y el comportamiento) y susceptibles de ser auto administradas”.²¹

3.2. Clasificación ²⁴

Las drogas se pueden clasificar en legales e ilegales; entre las primeras se incluyen alcohol, tabaco (con algunas restricciones legales), los fármacos de prescripción médica, ciertos disolventes de uso doméstico o industrial; y el resto de ellas son ilegales.

Existen varias clasificaciones de las sustancias adictivas de acuerdo a su estructura y propiedad química y a los efectos que producen en el SNC. De éstas existen varias versiones; una clasificación de utilidad práctica es la de NIDA. Clasificado por el efecto *estimulante* o *depresor*.

Los depresores (Tabla 1) (alcohol, sedantes, narcóticos y ansiolíticos, cannabis, así como disolventes volátiles) reprimen todas las estructuras presinápticas neuronales con la consecuente disminución de la cantidad de neurotransmisor liberado por el impulso nervioso, lo cual produce además una disminución de la función de los respectivos receptores postsinápticos. El alcohol al igual que otros depresores como los barbitúricos y las benzodiazepinas producen una estimulación de la transmisión inhibitoria.

Tabla 1. CLASIFICACIÓN DE DEPRESORES

TIPO DE DROGA	EJEMPLOS (<i>nombre común</i>)	FORMA DE USO	APARIENCIA	ALGUNAS CONSECUENCIAS
Cannabis	Marihuana (<i>toque, mota, hierba, chora, grifa, chuby, churro, flexo, bacha, juanita, material</i>). Hashish (<i>Hash</i>)	Fumada. puede ser consumida en galletas o pasteles	Hierba de olor semejante a orégano quemado Sustancia gomosa de color negro-café	<ul style="list-style-type: none"> • Posibles daños al Sistema Nervioso por las sustancias usadas para su cultivo. • Síndrome de desmotivación. • Disminución de la capacidad creativa e intelectual. • Esterilidad en el hombre. • Trastornos en el ritmo ovulatorio de la mujer. • Factor de riesgo para cáncer 8 veces superior al del tabaco.
Tranquilizantes	Valium, Lexotán, Ativán, Rohypnol, Rivotril. (<i>Pingas, pastas, chochos</i>).	Oral	Pastillas y tabletas	<ul style="list-style-type: none"> • Desinhibición de los impulsos agresivos. • Deterioro en los procesos de pensamiento, atención y memoria. • Cambios desfavorables en actitudes escolares y sociales.
Alcohol	Cerveza, Vino, Tequila, Licor. etc	Bebido	Líquido	<ul style="list-style-type: none"> • Detención y/o deterioro del crecimiento físico, mental y emocional. • Desinhibición de impulsos agresivos y sexuales. • Alto riesgo de accidentes al conducir. • Aislamiento social.
Opiáceos (narcóticos) de origen natural	Heroína (<i>chiva, heroica</i>)	Inyección: subcutánea, intravenosa, intramuscular Fumada Inhalada	Piedra o polvo café amarillento o blanco.	<ul style="list-style-type: none"> • Deterioro en el pensamiento, atención y memoria. • Cambios drásticos en actitudes escolares y sociales. • Síndromes de supresión violentos. • En la supresión o en periodos de no consumo estados anímicos centrados en insatisfacción y frustración. • Exposición a contagio de enfermedades infecciosas (hepatitis, SIDA).

Tabla 1. CLASIFICACIÓN DE DEPRESORES (cont.)

TIPO DE DROGA	EJEMPLOS (<i>nombre común</i>)	FORMA DE USO	APARIENCIA	ALGUNAS CONSECUENCIAS
Opiáceos (narcóticos) de origen sintético y análogos	Codeína Nubaíno Darvón Temgesic Demerol Fentanilo	Oral Intravenosa	Jarabes Pastillas, cápsulas. Soluciones inyectables	<ul style="list-style-type: none"> • Alto nivel adictivo. • Suprimen el hambre. • Estados de desnutrición. • Apatía ante la vida. • Deterioro de la capacidad de pensamiento. • Problemas escolares, laborales y sociales.
Barbitúricos	Pentobarbital, Secobarbital. (<i>pastas, nembus, muñecas, barbas</i>)	Oral	Cápsulas de color rojo, amarillo o azul.	<ul style="list-style-type: none"> • Alto riesgo de intoxicación al mezclarlo con alcohol. • Riesgo de paro respiratorio. • Apatía ante las actividades cotidianas.
Inhalables	Tonsol (<i>toncho</i>), Thinner, Resistol (<i>chemo, pegue, FZ-10, flan, activo, vainilla</i>) Gasolina, Nitrito de amilo (<i>poppers</i>)	Inhalado	Líquido transparente de olor penetrante Pegamento amarillo	<ul style="list-style-type: none"> • Conductas agresivas. • Depresión del sistema inmunológico del organismo. • Síndrome de supresión intenso. • Experimentación de estados anímicos de frustración. • Deterioro de los procesos mentales. • Aislamiento.

El grupo de los narcóticos incluye al opio, morfina, heroína, meperidina, codeína, difenoxilato, fentanilo, nalbufina, propoxifeno y la metadona.

Los estimulantes o simpaticomiméticos (Tabla 2) (cocaína, amfetaminas y metamfetaminas, alucinógenos, y estimulantes menores donde se clasifica a las xantinas) ejercen un bloqueo sobre la inhibición o una excitación de las neuronas en forma directa. Sus mecanismos de acción son variados y pueden explicarse por afectación fisiológica; por ejemplo, aumento de la despolarización neuronal, incremento de la cantidad de neurotransmisores disponibles, alargamiento de la acción de los neurotransmisores, debilitamiento de la membrana neuronal o reducción del tiempo de recuperación sináptica.

Tabla 2. CLASIFICACIÓN DE ESTIMULANTES

TIPO DE DROGA	EJEMPLOS (<i>nombre común</i>)	FORMA DE USO	APARIENCIA	ALGUNAS CONSECUENCIAS
COCAÍNA	<i>Cocaína (coca, blanca nieves, perico)</i>	inhalada, fumada, inyectada	Polvo blanco amarillento	<ul style="list-style-type: none"> • Fantasías paranoides. • Deterioro en el proceso del pensamiento. • Impotencia sexual. • Se presenta inseguridad. • Deterioro paulatino en la capacidad de aprendizaje. • Alteraciones cardiovasculares. • Alteraciones en la actividad cerebral.
	<i>crack (base, baserola)</i>	fumada	Piedras o cristales blancos con olor dulce	
Alucinógenos de origen natural	Hongos (<i>pajaritos, san isidro, derrumbes</i>) <i>Peyote (cabeza, botones)</i>	Oral	Similar a <i>Agaricus bisporus</i> Tubérculo amorfo	<ul style="list-style-type: none"> • Alto riesgo de rompimientos psicóticos. • Exposición a accidentes. • Deterioro en la capacidad de pensamiento. • Apatía hacia las actividades cotidianas. • Aislamiento. • Explosiones de agresión. (especialmente con el consumo de PCP). • Cambios desfavorables en actitudes escolares, familiares y sociales • Vacío existencial.
Alucinógenos de origen sintético y análogos	LSD (<i>ácidos, micropuntos</i>) PCP (<i>polvo de ángel</i>)	Oral (en azúcar, calcamonías o pedazos de papel) Inyectado	Líquido e incoloro Líquido, cápsulas píldoras o polvo blanco cristalino	<ul style="list-style-type: none"> • Alto riesgo de rompimientos psicóticos. • Exposición a accidentes. • Deterioro en la capacidad de pensamiento. • Apatía hacia las actividades cotidianas. • Aislamiento. • Explosiones de agresión. (especialmente con el consumo de PCP). • Cambios desfavorables en actitudes escolares, familiares y sociales • Vacío existencial.
Amfetaminas y análogos	Ionamín, Esbelcaps, Ritalín, Tonoate dospan	Oral	Pastillas o cápsulas	Disminución de la capacidad de atención, concentración y atención.
Metamfetaminas y análogos	Cristal (<i>crístina</i>) Ice, Crank	Oral, Inyectado Inhalado	Píldoras, polvo blanco o como pedazos de cera.	<ul style="list-style-type: none"> • Generan una dependencia muy intensa. • Complicaciones orgánicas como daño al hígado, pulmón, riñón, irritación cerebral, pérdida de peso, desnutrición, deficiencias en el sistema inmunológico.

TOXICOLOGÍA DE LA COCAÍNA

4.1 Características fisicoquímicas de la cocaína^{25, 26}

Características del analito

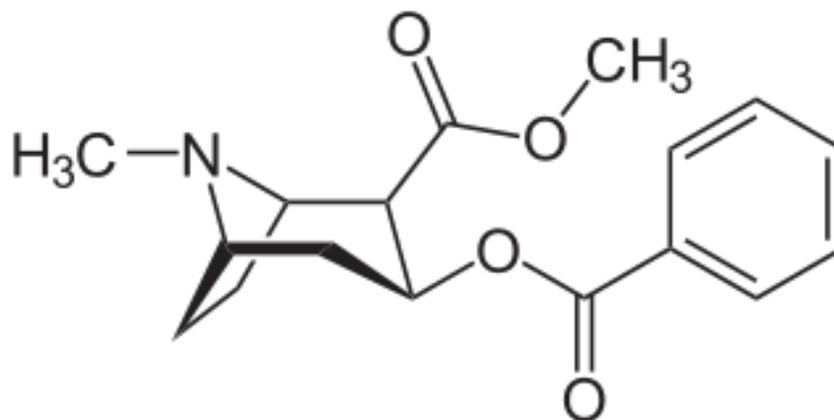
- Nombres comunes:

Coca, escamas, nieve, polvo blanco, pase, C, niña blanca, polvo feliz, oro en polvo, terrón de azúcar, blow, candy.

- Nombre (IUPAC) sistemático:

(1R,2R,3S,5S)-3-(benzoiloxi)-8-metil-8-azabicyclo[3.2.1]octano-2-carboxilato de metilo

- Estructura



- Fórmula condensada: $C_{17}H_{21}NO_4$
- Peso mol: 303.35 g/mol
- Propiedades fisicoquímicas
 - Cristales incoloros o blancos o polvo blanco
 - Punto de fusión: 98.0 °C

- Solubilidad: 1 g en 600 mL de agua, 1 g en 270 mL de agua a 80°C, 1 g en 6.5 mL de etanol, 1 g en 0.7 mL de cloroformo y 1 g en 3.5 mL de éter también poco soluble en acetona, acetato de etilo y disulfuro de carbono.
- Constante de disociación: pK_a 8.6
- Coeficiente de partición: $\log P$ (octanol/agua), 2.3

4.2 Farmacocinética de la cocaína²⁷

La cocaína (COC) es una base débil con un pK_a de 8.6. En su forma básica, tanto en sangre como en el humo del tabaco que llega a los pulmones, la cocaína atraviesa las membranas celulares de forma rápida y eficaz.

Atraviesa la barrera hematoencefálica: esnifada o administrada por vía intravenosa se encuentran niveles de cocaína en el cerebro en 30 segundos, mientras que fumada sólo tarda 5 segundos en tener efectos centrales.

Absorción: La cantidad relativa de cocaína que se absorbe a nivel sistémico depende fundamentalmente de la vía de administración.

El pico plasmático se produce normalmente a los 60 minutos después de la administración nasal u oral; aunque como en otros parámetros de la cinética de la cocaína, la variabilidad individual es muy grande, con intervalos de 30 a 120 minutos. La biodisponibilidad nasal u oral es de un 30-40 por ciento, aunque la variabilidad es mayor para la vía oral.

Al igual que ocurre con la nicotina del tabaco, la biodisponibilidad de la cocaína fumada varía entre un 10 a 20 por ciento, siendo el porcentaje menor la más común.

Las concentraciones máximas venosas y arteriales después de las diferentes administraciones varían enormemente. No sólo depende de las dosis y de las vías

de administración sino también de la frecuencia de las inyecciones. El rango de las dosis de cocaína normalmente varían entre 0.2 a 3 o 4 mg/Kg, dependiendo de la vía de administración, sin embargo las concentraciones plasmáticas máximas varían en un rango entre 50 a 2000 ng/mL o mayor dependiendo de la vía de administración y de la frecuencia de las inyecciones.

Distribución: La cocaína después de ser administrada, es distribuida ampliamente por todo el organismo. El volumen de distribución varía entre 1.5 a 2 L/Kg (57 por ciento vía oral y aproximadamente 70 por ciento fumada).

4.3 Metabolismo de la cocaína²⁷

La cocaína es rápidamente metabolizada, generalmente por hidrólisis enzimática para producir benzoilecgonina (BZ), Ester metílico de la ecgonina (EME) y posteriormente ecgonina (EC) (Figura 1).

En un 1-5% se excreta por la orina sin cambios.

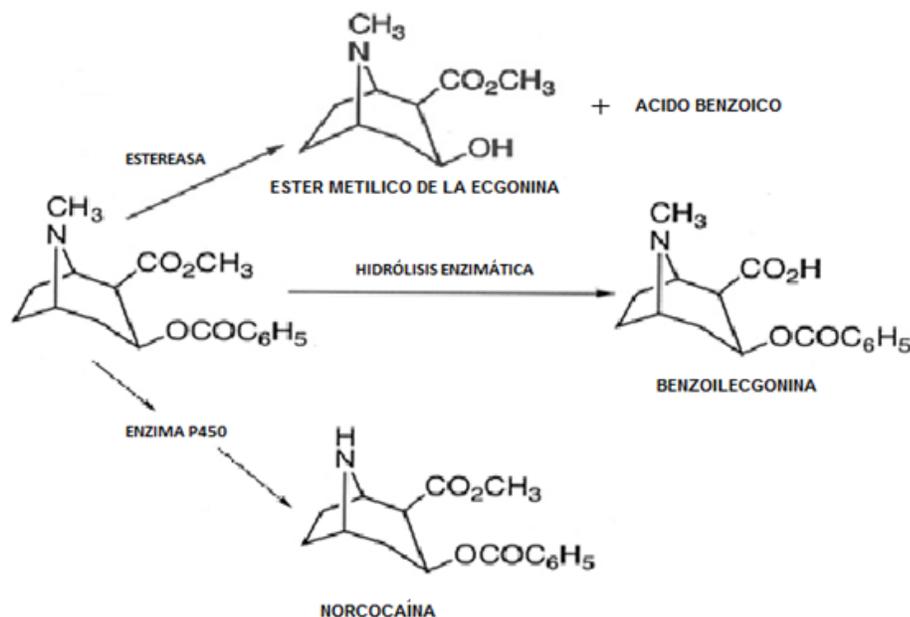


Figura 1. Metabolismo de la cocaína

La hidrólisis a benzoilecgonina se produce en un 45 por ciento, de una dosis administrada esta hidrólisis se realiza por las Hidrolasas hepáticas; porcentaje

similar a la hidrólisis del EME. Ninguno de los dos metabolitos poseen actividad biológica significativa en humanos. El nitroxido de norcocaína y otros radicales libres son metabolitos potencialmente activos, pero se producen en pequeñas cantidades que generalmente no representan cantidades farmacológicamente significativas en clínica humana.

Cuando la cocaína se fuma, la droga se piroliza a una serie de compuestos químicos dependiendo de la temperatura. El principal metabolito es la Metilecgonidina (MED).

La benzoilecgonina es el metabolito que se detecta en orina, y el más utilizado para monitorizar las intoxicaciones. Puede ser detectada en orina 3-4 días después del último consumo y por supuesto dependerá de la cantidad de cocaína consumida y del valor de corte que se establezca o de la sensibilidad de la prueba.

La vía de administración también influye en la cantidad de BZ que se detecta en plasma y que se eliminará a través de la orina. En general, se puede decir que las máximas concentraciones y la mayor área bajo la curva se produce después de administraciones nasales u orales. Cuando la cocaína se fuma, aunque los efectos que se producen son mucho más intensos y precoces, la cantidad absorbida es menor y por tanto las concentraciones de BZ en plasma son también menores, esto se puede observar en la (Figura 2), donde se observa gráficamente este comportamiento.

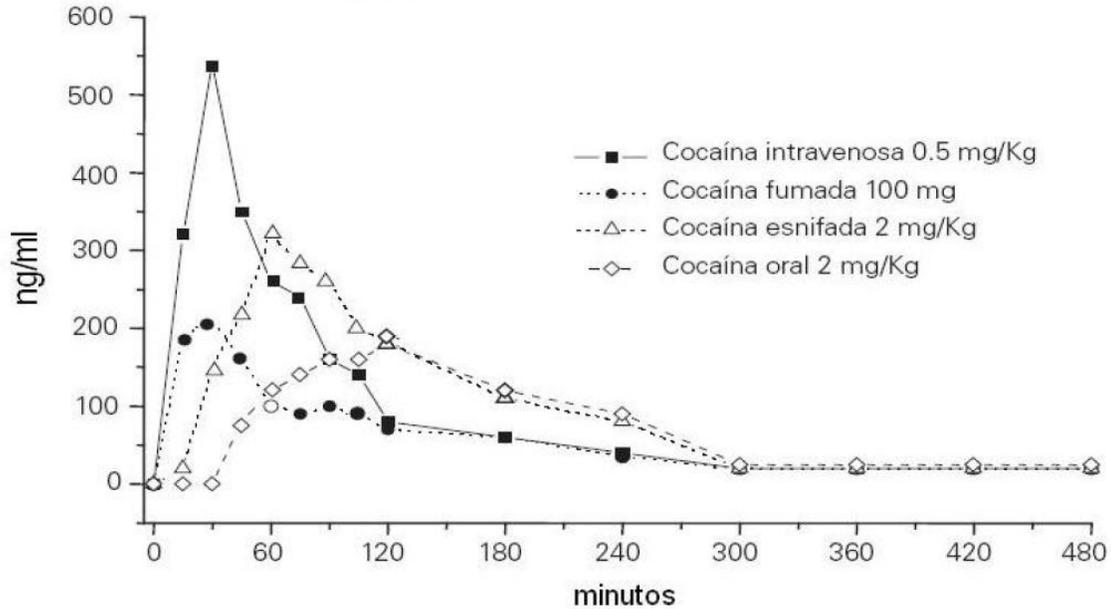


Figura 2. Niveles plasmáticos de benzoilecgonina, dependientes de la vía de administración.

Eliminación: El aclaramiento de la cocaína es muy rápido, variando entre 20 a 30 mL/min/Kg. La semivida plasmática es, de nuevo, variable con intervalos de 1 a 1.5 horas. La benzoilecgonina presenta una semivida plasmática de 6-8 horas y el Ester metílico de Ecgonina de 3-8 horas.

4.4 Mecanismo de acción de la cocaína²⁷

La cocaína se comporta como una amina simpaticomimética de acción indirecta, es decir, es capaz de remedar las acciones de las catecolaminas no actuando directamente sobre los receptores adrenérgicos o dopaminérgicos, sino aumentando la disponibilidad del neurotransmisor en la hendidura sináptica.

La cocaína es un inhibidor de los procesos de recaptación tipo I (recaptación de noradrenalina y dopamina desde el intersticio sináptico a la terminal presináptica) (Figura 3); lo que facilita la acumulación de noradrenalina o dopamina en la hendidura sináptica.

Al aumentar la disponibilidad de dopamina se produce un aumento de euforia. Si el consumo de cocaína se hace crónico se producirán cambios en la disponibilidad de dopamina. El transportador de la recaptación de dopamina es necesario para que se produzca la acción farmacológica de la cocaína ya que al hacerse estudios en ratones deficientes en este transportador la cocaína no ejerce efectos conductuales ni bioquímicos.

El exceso de noradrenalina es el responsable de la mayoría de los efectos y complicaciones agudas de la cocaína como pueden ser el aumento de la presión arterial, dilatación pupilar, sudoración, etc.

Además la cocaína bloquea la recaptación de serotonina. Estos efectos sobre la neurotransmisión catecolaminérgica y serotoninérgica constituyen la base de su dependencia.

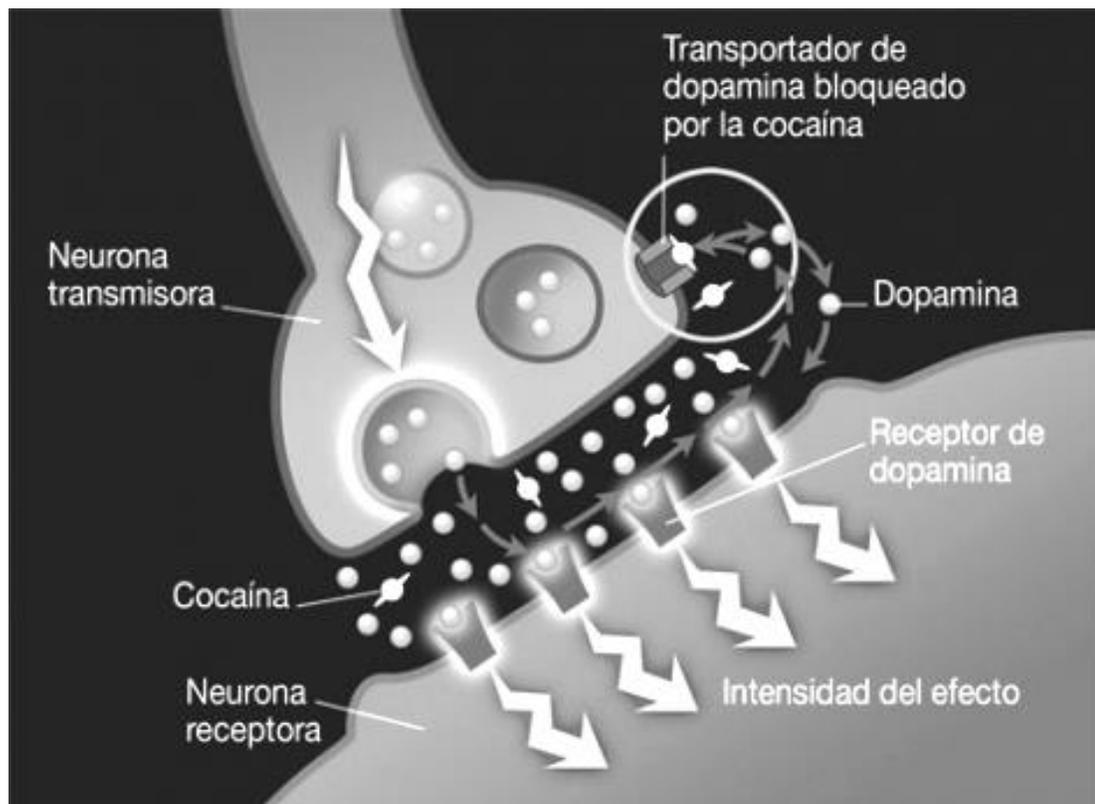


Figura 3. Mecanismo de acción de la cocaína

4.5 Acciones farmacológicas de la cocaína²⁷

1. Estimula receptores alfa y beta adrenérgicos del Sistema nervioso simpático y aparato cardiovascular

- Vasoconstricción
- Aumento de la presión arterial
- Bradicardia a dosis bajas y taquicardia a dosis altas
- Midriasis, sudor y temblor.

2. Aumenta la Temperatura corporal

- Producción de calor por aumento de la actividad muscular.
- Disminución de pérdida de calor por vasoconstricción
- Pérdida de control central dopaminérgico.

3. Potente estimulante del SNC

- Elevación del estado de ánimo
- Disminución de apetito y sensación de fatiga
- Insomnio
- Hiperactividad motora y verbal

ANÁLISIS DE COCAÍNA

5.1 Características generales de técnicas de determinación²⁸

El procedimiento analítico toxicológico incluye usualmente dos pasos. El primero consiste en realizar un análisis preliminar que permite identificar las muestras negativas, que no contienen el analito o alguno de sus metabolitos de las drogas u otros tóxicos que pudieran estar presentes en la muestra (pruebas de *screening* conocidas como pruebas rápidas). El segundo paso involucra la confirmación de la identidad de las sustancias presentes en las muestras positivas.

Las pruebas rápidas proveen sólo resultados preliminares y tienen poder de decisión. Indican claramente la ausencia de una droga, es decir, no informan falsos negativos. Sin embargo, un resultado positivo debe ser confirmado por otro método específico. Siempre debe realizarse al mismo tiempo que se analiza la muestra un control positivo y uno negativo.

Un control negativo (blanco) ayuda a evitar los falsos positivos (por ejemplo contaminación con reactivos o material de vidrio con el analito en cuestión o la presencia de componentes de la muestra). Igualmente, la inclusión de un control positivo sirve para asegurar que los reactivos han sido preparados en forma correcta y han mantenido su estabilidad.

Un resultado sospechoso falso positivo debe ser repetido usando material de vidrio correctamente lavado y enjuagado finalmente con agua bidestilada. En toda circunstancia los ensayos de comprobación deben realizarse sobre una nueva alícuota de la muestra, lo cual implica que en el momento de decidir que ensayos van a realizarse debe considerarse reservar un volumen adecuado para confirmar el resultado.

La mayoría de estos tóxicos sufren profundos cambios metabólicos en el organismo y en consecuencia, pueden aparecer en los fluidos o tejidos en su forma original o como productos de biotransformación (metabolitos), libres o conjugados con diferentes compuestos (ácido glucurónico, sulfatos, aminoácidos,

etc.). Las propiedades fisicoquímicas del tóxico y sus metabolitos pueden ser muy distintas, a veces incluso entre los metabolitos de un mismo compuesto. Ello determina una excreción característica según los casos y la conveniencia de realizar la investigación en una u otra matriz (orina, sangre, bilis, etc.).

Frecuentemente, el compuesto que será analizado está presente en un tejido o un fluido biológico, unido a proteínas u otros constituyentes celulares. En este caso, puede ser necesario separar el tóxico (el compuesto madre o sus metabolitos) del resto de los componentes de la matriz, a modo de obtenerlo en cantidad y pureza suficientes para permitir su identificación y cuantificación, utilizando diferentes métodos de análisis (Figura 4).

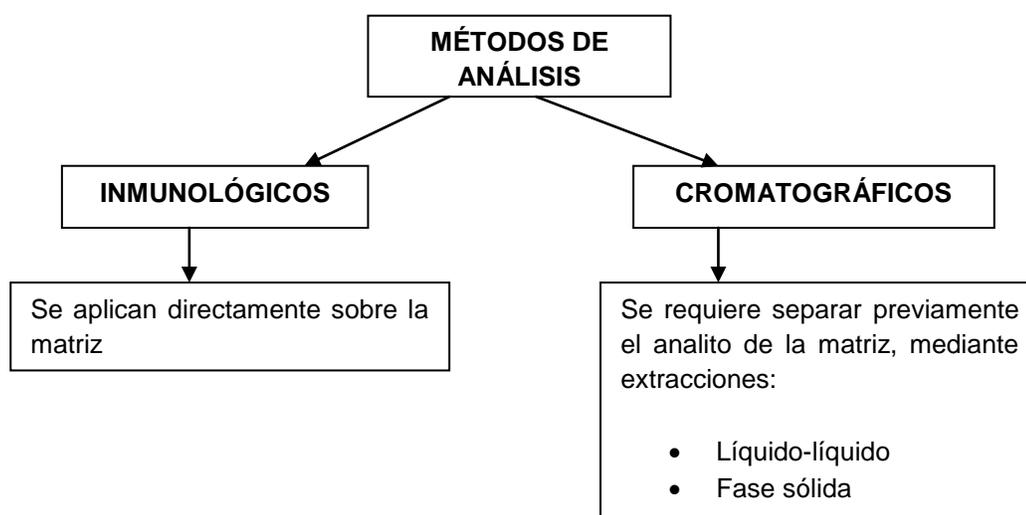


Figura 4. Métodos de análisis químicos

5.1.1 Inmunoensayos²⁸

Los ensayos inmunológicos de mayor uso en Toxicología son aquellos destinados a la búsqueda de drogas de abuso (opiáceos, cocaína, benzodiazepinas, amfetaminas, entre otros) y algunos fármacos en orina (barbitúricos, dextropropoxifeno, fenciclidina, metadona, ácido lisérgico, antidepresivos tricíclicos). También aquellos que permiten la cuantificación de etanol en sangre, el monitoreo de algunas drogas terapéuticas en plasma (ciclosporina, metotrexato, difenilhidantoína, fenobarbital, carbamazepina, ácido valproico, digoxina, teofilina, paracetamol, etc.) Otros compuestos analizados son ciertos plaguicidas en agua y suelo (endosulfan, carbofurano, aldicarb, endrin, dieldrin). Se utilizan también para la determinación semicuantitativa de micotoxinas en alimentos (aflatoxinas, zearalenona y ocratoxina) e incluso la actividad de algunas enzimas como la acetilcolinesterasa.

Existen en el comercio numerosos tipos de inmunoensayos con aplicaciones en Toxicología. En su mayoría están diseñados para el análisis de muestras líquidas, como orina, agua y suero debido a que estas matrices presentan poca cantidad de interferencias. Estas muestras se emplean en forma directa, evitando por lo tanto el paso previo de extracción o aislamiento de los analitos y logrando una reducción importantísima en el tiempo de obtención de los resultados (10 minutos – 1 hora).

Los inmunoensayos competitivos, se fundamentan en la reacción en donde una droga marcada (Ag^*) con un determinado compuesto, compite con la droga (Ag) a investigar, por unirse a un anticuerpo específico (Ab). La presencia de la droga en el problema se pondrá de manifiesto dado que al unirse al anticuerpo específico desplaza a la droga sin marcar, para que el complejo marcado ó inmunocomplejo sea detectado por el instrumento analítico adecuado (Figura 5).

En forma simple se esquematiza esta competencia:



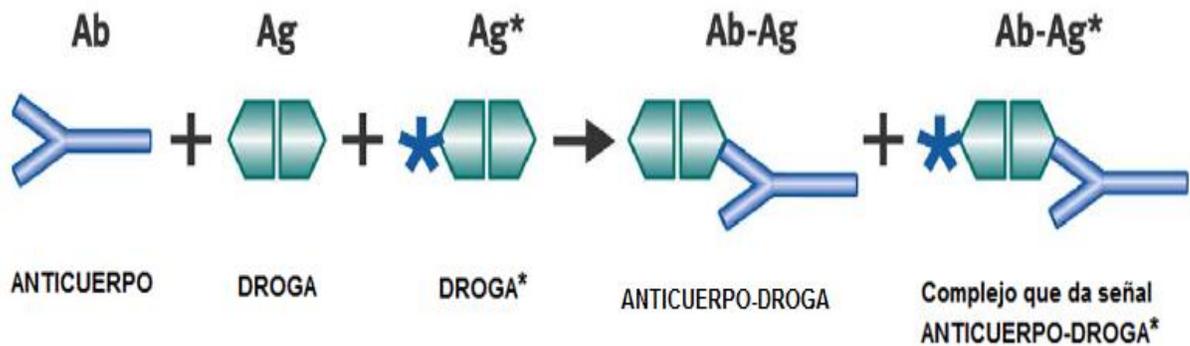


Figura 5. Inmunoensayo principio

Las pruebas rápidas empleadas para la búsqueda de drogas en Toxicología se caracterizan por elegir un valor de corte tal que no se produzcan falsos negativos. Es por eso que los resultados positivos deben ser confirmados por otras técnicas.

Los marcadores generalmente empleados en la búsqueda de drogas en Toxicología son:

- Isótopos radiactivos (**RIA**: Radio Inmunoensayo)
- Enzimas, (**ELISA**: (acrónimo del inglés) Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas, **EMIT**: (acrónimo del inglés) Técnica de Inmunoensayo Enzimático Multiplicado)
- Sustancias Fluorescentes (**FPIA**: (acrónimo del inglés) Inmunoensayo de Polarización de Fluorescencia)
- Oro Coloidal (**AMIA**: ASCEND Multi-inmunoensayo)

De todos ellos el **RIA** posee el mayor límite de detección (del orden del picogramo/mililitro). Sin embargo posee algunas desventajas que han llevado a su reemplazo por alguno de los demás inmunoensayos (cuyos límites de detección están en el orden de los nanogramos/mililitro). Los reactivos empleados en el **RIA** son de vida media corta, por ejemplo un trazador radiactivo marcado con yodo tiene una vida media de 60 días, mientras que un conjugado enzimático usado en **ELISA** suele conservarse en buen estado durante años. Además se corre el riesgo de contaminación producida por el manejo de isótopos radiactivos. Los

radioinmunoensayos fueron los primeros en desarrollarse. Sin embargo, son los que presentan más problemas de manipulación ya que se trabaja con isótopos radiactivos que presentan una serie de riesgos para la salud además de producir una serie de desechos radiactivos que hay que eliminar apropiadamente. Por ello, a pesar de su gran sensibilidad se han visto desplazados por los inmunoensayos de fluorescencia.

El fundamento del análisis por **RIA** es la competencia entre el antígeno sin marcar por el sitio de un anticuerpo que puede estar ocupado por un antígeno marcado radiactivamente, seguida por la separación de los antígenos unidos y libres y la medida de sus concentraciones. La probabilidad que una molécula marcada o sin marcar se una al anticuerpo depende de su concentración. Se puede construir una curva de dilución isotópica mediante la adición de cantidades cada vez mayores del compuesto sin marcar, manteniendo constante la concentración del antígeno marcado. La concentración del compuesto se determina a partir de la curva de calibración construida. Se trata de un inmunoensayo heterogéneo por lo que antes de realizar la medida de radiactividad se debe separar el complejo Ag-Ac sin marcar del Ag libre y del complejo Ag-Ac sin marcar. Este método se utiliza en la determinación de los metabolitos urinarios de morfina, capaz de diferenciar entre codeína, morfina glucurónido y morfina, cocaína, buprenorfina y digoxina. La principal desventaja del **RIA** es que para realizar el análisis de varias sustancias habría que realizar tantos análisis como sustancias que se quieran determinar.

Los inmunoensayos más difundidos son el método **ELISA** y el método **EMIT**. El método **ELISA** es un inmunoensayo enzimático competitivo y heterogéneo. La actividad enzimática se mide por la conversión catalizada enzimáticamente de un compuesto incoloro o no fluorescente en uno coloreado o fluorescente. Tiene el mismo fundamento que el **RIA** pero no utiliza marcadores radiactivos. Se desarrollaron varios inmunoensayos para la determinación de drogas de abuso (barbitúricos, benzodiazepinas, amfetaminas, metamfetaminas, morfina, opiáceos, metabolitos de la cocaína, fenciclidina y dietilamida de ácido lisérgico (LSD)) en

sangre y suero. La sensibilidad y especificidad de estos inmunoensayos son similares a los obtenidos por **RIA**.

El método **EMIT** es la técnica de inmunoensayo con mayor aplicación en el análisis de fármacos o drogas de abuso. Los ensayos **EMIT** están basados en la unión competitiva a proteínas, pero no requiere el uso de radioisótopos y tampoco la separación de las fracciones libres y unidas antes de realizar las medidas de actividad enzimática. Se trata, por tanto, de un inmunoensayo enzimático competitivo homogéneo en el que se mide la absorbancia a 340 nm de la reacción producida por el paso de NAD^+ a NADH , que es el cofactor necesario para que la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa actúe sobre su sustrato.

Los ensayos de **EMIT** se diseñaron originalmente para el análisis de muestras de orina, pero posteriormente se han desarrollado algunos reactivos para suero. No hay que someter a dichas muestras a ningún tratamiento previo antes de analizarlas mediante este inmunoensayo. No requiere realizar la hidrólisis previa en muestras de orinas dado que el anticuerpo marcado reacciona con los glucurónidos de las drogas. Actualmente es una técnica fácil y rápida de realizar y está automatizada. La sensibilidad de esta técnica es similar a la cromatografía gaseosa, sin embargo su especificidad es menor ya que pueden aparecer reacciones cruzadas de los anticuerpos empleados en el análisis con sustancias que posean una estructura química similar a la del analito en cuestión. Además, como ciertos anticuerpos están destinados a la determinación de familias de fármacos, hay que tener en cuenta que no todos los compuestos incluidos en la misma familia tendrán la misma reactividad con el anticuerpo.

5.1.2 Técnicas Cromatográficas²⁸

La búsqueda de drogas en Toxicología mediante técnicas cromatográficas, como **CCD**, **CCDAR**, **CL**, **CLAR** y **CG**, etc. se caracterizan porque antes de aplicarlas es necesario separar las drogas de la matriz en la que se encuentran inmersas mediante alguna técnica de extracción. En la práctica esto se logra siguiendo una serie de pasos, como los que se describen a continuación.

- 1- Preparación de la muestra:** es un paso crucial en los análisis. Involucra la homogenización de la muestra, ajustes de pH, pesaje, procedimientos de hidrólisis (ácida, básica o enzimática), precipitación, centrifugación, etc. de modo tal que se facilite el aislamiento de la sustancia de interés.

- 2- Aislamiento del analito:** se puede llevar a cabo mediante extracción líquido-líquido (en tubos, en ampollas de decantación) o extracción en fase sólida (CEFS) de acuerdo a las disponibilidades del laboratorio. En este paso se remueve el analito de su matriz original para obtenerlo en la mayor concentración posible, estabilizarlo (ya que en su matriz original puede degradarse química o enzimáticamente) y eliminar interferencias.

- 3- Concentración del extracto:** el objetivo de este paso es colocar el analito en el menor volumen posible para aumentar la sensibilidad del análisis. Se deben usar condiciones controladas, idealmente una temperatura menor de 40°C y corriente de nitrógeno. Durante las operaciones antes mencionadas se debe tener sumo cuidado para evitar pérdidas por volatilización, oxidación o absorción en los precipitados, ya que frecuentemente los productos a identificar están presentes en concentraciones menores del $\mu\text{/mL}$. Las pérdidas por volatilización de sustancias básicas como amfetaminas puede

prevenirse cuidando la temperatura y salificando el extracto con ácido clorhídrico al 1 por ciento en metanol.

4- Identificación del analito: existen diferentes niveles de complejidad dependiendo de las técnicas que se utilicen para su identificación. Así existe un nivel primario de pruebas rápidas que utiliza técnicas como CCD, Espectrofotometría UV, inmunoensayos, además de reacciones de coloración para la orientación, etc. Un nivel secundario involucra técnicas tales como CG y CLAR, como para la determinación de una droga en particular y un nivel terciario que utiliza la CG/MS o CLAR/MS.

5- Cuantificación del analito: una vez identificado el analito la cuantificación del mismo se puede realizar por una técnica directa, bien ajustada y utilizando patrones de referencia puros para el análisis. Esta técnica directa generalmente es espectrometría de masas acoplada a una técnica de cromatografía de gas-líquido o líquido-líquido.

5.1.3 Identificación y cuantificación mediante cromatografía²⁸

Según la IUPAC, la cromatografía es un método usado para la separación de los componentes de una muestra, mediante su distribución en dos fases: estacionaria (FE) y móvil (FM). La fase estacionaria puede ser un sólido o un líquido retenido sobre un soporte sólido. La fase móvil puede ser un gas o líquido (o un fluido supercrítico). Con base a la FM los sistemas cromatográficos se dividen en:

- de Fase Gaseosa, internacionalmente CG y
- de Fase Líquida, denominados CL

El principio común a todas ellas es el siguiente: un fluido FM circula a través de la fase estacionaria y cuando una mezcla de sustancias se introduce en el sistema

se produce una serie de equilibrios de distribución entre las dos fases, generalmente de distinta magnitud para cada componente de la mezcla, por lo que cada uno de ellos se desplazará con diferente velocidad (dependiendo de sus solubilidades, valores de pKa, capacidad de formar puentes de hidrógeno, etc.) a lo largo del sistema. La cromatografía en fase líquida puede llevarse a cabo en columna, donde la mezcla a separar se desplaza en una dirección preferencial sobre las otras dos o bien, puede tratarse de una técnica planar, cuando dicho movimiento se realiza sobre un plano donde prevalecen dos direcciones sobre la tercera. De este modo la CLAR es un procedimiento en columna, mientras que las técnicas de CCD o CCDAR, son procedimientos planares.

- **Cromatografía en capa delgada (CCD)**

La CCD es una de las técnicas más ampliamente usadas para la separación e identificación de drogas. Permite en ciertos casos también, determinar semicuantitativamente los compuestos de una muestra. Se trata de un procedimiento no destructivo de los componentes a investigar, accesible a la mayoría de los laboratorios por su simplicidad y bajo costo. Las muestras a investigar pueden consistir en soluciones, sólidos disueltos o extractos obtenidos en los procedimientos de aislamiento. La técnica de CCD involucra diferentes pasos, denominados: preparación de la placa, aplicación de la muestra, corrida de la placa y ubicación de las manchas. Aunque pueden prepararse en el laboratorio, en la actualidad se usan placas comerciales. Las FE están constituidas por partículas irregulares con poros en su interior. Estos rellenos se extienden uniformemente en una capa delgada de 250 μm (las más usadas), 200 μm , 150 μm o 100 μm sobre un soporte de vidrio de 2 mm, sobre un folio de aluminio de 0.2 mm o sobre un folio de poliéster de 0.5 mm de espesor. Las placas suelen tener un tamaño de 20 cm x 20 cm pudiendo cortarse del tamaño elegido (particularmente los folios con una tijera). Existen varios tipos de FE que se diferencian en su porosidad, espesor, granulometría. Se describen a continuación las más utilizadas.

- **Gel de sílice:** se trata de ácido silícico hidratado y por lo tanto débilmente ácido. Las placas tienen una distribución uniforme de tamaño de partícula, normalmente de 20 μm de diámetro. La adherencia a la placa se logra mezclando un agente de unión con la FE. Cuando se usa sulfato de calcio (yeso) como “adhesivo”, las placas se denominan Gel de sílice. Las placas más fuertes usan un adherente orgánico. Las placas pueden almacenarse una sobre otra ya que la capa adsorbente es muy dura.
- **Alúmina:** (óxido de aluminio). Es un adsorbente débilmente básico. Tiene menos aplicaciones que el gel de sílice y necesita ser activado para obtener buenas separaciones.
- **Kieselgur:** se trata de ácido silícico amorfo existente en la Naturaleza. Proviene de los esqueletos de diatomeas (algas microscópicas) y por ello se denomina frecuentemente “tierra de diatomeas”. Posee menos propiedades adsorptivas que la sílica.
- **Florisil:** se trata de silicato de magnesio, se usa únicamente para separaciones de pesticidas o eliminar compuestos altamente polares cuando otros adsorbentes han fallado.
- **Celulosa:** usa procesos de partición para la separación. Las placas de celulosa generalmente corren mucho más lentamente que las placas de sílica del mismo espesor. Para procedimientos de adsorción, las capas deben tener la mayor actividad posible en los poros. Para ello se someten placas y folios en el momento de su fabricación, a la acción de unos 110°C en estufas secadoras continuas, desalojando de este modo humedad, gases y contaminantes orgánicos. Para procedimientos de partición en cambio, las capas se inactivan química o físicamente en sus poros, impregnándolas con diferentes reactivos hidrofobizantes. Los componentes se separarán de acuerdo a su solubilidad en los hidrofobizantes anclados.

Los sistemas de CCD de partición de FASES REVERSAS están constituidos por placas cubiertas con partículas de sílica a cuyos grupos hidroxilos se les han unido cadenas hidrocarbonadas de varias longitudes y utilizan fases móviles conteniendo agua. Poseen un alto poder de resolución y son comercialmente reproducibles. La fase más popular es aquella unida con cadenas de C18 (octadecil) de 12 por ciento p/p sobre la sílica.

Las fases móviles generalmente empleadas son las mezclas de metanol: agua o acetonitrilo: agua y las propiedades de estas CCD se correlacionan bien con los sistemas CLAR usando similares FE. La muestra se aplica dibujando con un lápiz una línea a 1,5 cm del borde inferior de la placa. Sobre esta línea de origen se aplicarán los extractos separados 1 cm uno de otro. La muestra, (usualmente 1 – 10 µg) es aplicada en un pequeño volumen de disolvente (1 a 10 µL) con micropipeta o a través de un tubo capilar o una microjeringa. Lo importante es que la mancha no supere los 4 mm de diámetro, sino se perderá resolución.

La superficie de la placa no debe ser cortada o perforada por el aplicador. El disolvente usado para aplicar la mancha debe ser volátil y tener baja polaridad de modo que la mancha no difunda mucho. El disolvente puede aplicarse en alícuotas y secar naturalmente o por aplicación de aire caliente. Es importante que la mancha esté seca al final de la siembra, especialmente si la solución contenía agua. La mayoría de los compuestos orgánicos son incoloros, razón por la cual deben hacerse visibles, preferentemente con una técnica no destructiva. Es por ello que algunas placas poseen en su composición de FE un indicador fluorescente. Se trata de metasilicatos de Al, Zn, Co, de gran polaridad, distribuidos en los poros de todo el adsorbente y que no serán eluidos. La siembra se controla examinando la placa bajo luz de onda corta (254 nm), el indicador se excita y fluoresce a 561 nm observándose un fondo verde azulado en la placa. Los analitos presentes en la placa tapan al indicador al cual no le llegará luz, por ende no fluoresce y los compuestos pueden localizarse como manchas oscuras sobre el fondo verde. Si se ilumina la placa con luz UV de mayor longitud de onda (366

nm), las drogas con fluorescencia natural pueden ser vistas, independientemente de la presencia de un indicador. Es el caso, por ejemplo, de las aflatoxinas.

- **Cromatografía en capa fina bidimensional**

Si fuera necesario separar varios componentes de una mezcla de polaridad muy distinta resulta difícil elegir una FM adecuada, que permita una buena resolución de todos los componentes. Por ejemplo, dados los compuestos A, B, C y D, tras la corrida con una FM de baja polaridad puede suceder que A y B presenten un R_f muy próximos. Mientras que C y D presenten R_f muy bien definidos. Si se eligiera como FM un disolvente más polar se logrará la separación de A y B pero probablemente C y D corran próximos al frente del disolvente. Una solución sería cambiar la fase estacionaria (emplear celulosa, por ejemplo). O bien, se puede recurrir a una cromatografía bidimensional. En este caso la placa es eluida en una FM de baja polaridad, de modo que se separen C y D. Luego se seca la placa y se cambia el disolvente (mayor polaridad) pero también la dirección de elución (giro de 90°).

- Ventaja: se amplía el campo de polaridades.
- Desventajas: sólo se siembra una muestra por placa y se requiere el doble de tiempo porque son 2 corridas. (la segunda más lenta que la primera por la mayor polaridad del disolvente que será retenido en los poros).

En la práctica, se suele llevar a cabo este tipo de CCD para la separación de Aflatoxinas (micotoxinas producidas por hongos del género *Aspergillus*), aprovechando el sencillo revelado mediante luz UV después de cada corrida.

- **Cromatografía en Capa Delgada de Alta Resolución (CCDAR)**

En comparación con las placas de gel de sílice de CCD, las placas de CCDAR tienen partículas mucho más pequeñas y distribuidas en un estrecho rango de tamaño (2-7 μm). Además el espesor de la capa es más delgado (190 μm). Estas características hacen que las corridas en CCDAR sean más rápidas y más reproducibles. Además permiten obtener una mayor resolución y una disminución

del límite de detección. Son especialmente útiles para los trabajos de cuantificación.

Las dos cromatografías tanto CCD como CCDAR tiene sus ventajas en su empleo. A continuación se presentan las diferencias entre estas dos técnicas (Tabla 3).

Tabla 3. COMPARACIÓN ENTRE CCD Y CCDAR

Condiciones típicas	CCD	CCDAR
Dimensiones de la placa (cm)	20 x 20	10 x 10
Tamaño de la partícula (µm)	5 – 20	2 – 7
Espesor de la capa (µm)	100 – 250	150 – 200
Volumen de muestra (µL)	1 – 10	< 0.1
Diámetro de la mancha antes de correr (mm)	< 4	< 1.5
después de correr (mm)	5 – 10	2 – 5
Distancia de corrida (cm)	10 – 15	3 – 6
Tiempo de corrida (min.)	30 – 120	5 – 15
Numero de muestras por placa	10 – 15	30 – 40
*Limite de detección (absorción) ng	10 – 100	0.5 – 5
*Limites de detección (fluorescencia) ng	0.1 – 1	0.01 – 0.1
*Los límites de detección son para sustancias fuertemente absorbentes o fluorescentes.		

- **Cromatografía Gases (CG)**

La cromatografía gaseosa permite no sólo separar, sino también identificar y cuantificar cada uno de los componentes de una muestra, debido al riguroso control a que se somete cada una de las variables que intervienen en el proceso. En este sistema la fase móvil es un gas (gas acarreador o portador) pudiendo ser su fase estacionaria un sólido o un líquido adsorbidos sobre un soporte inerte que no sean volátiles a la temperatura de trabajo.

Presenta como requisitos que las sustancias a analizar (gases, líquidos o sólidos) sean volátiles a la temperatura de trabajo (o puedan prepararse sus derivados volátiles mediante el uso de reactivos “derivatizantes” adecuados), que no se descompongan a altas temperaturas y posean bajo peso molecular.

En caso que la sustancia o molécula a analizar no sea volátil se preparan derivados volátiles empleando reactivos que en el cromatógrafo la muestra se

vaporicé en el inyector que está a temperatura elevada, donde una corriente de gas portador inerte y de alta pureza lo arrastra por la columna. Allí tiene lugar el proceso de separación bajo condiciones controladas de temperatura para luego pasar por un detector, cuya señal es registrada en un cromatograma. (Figura 6)

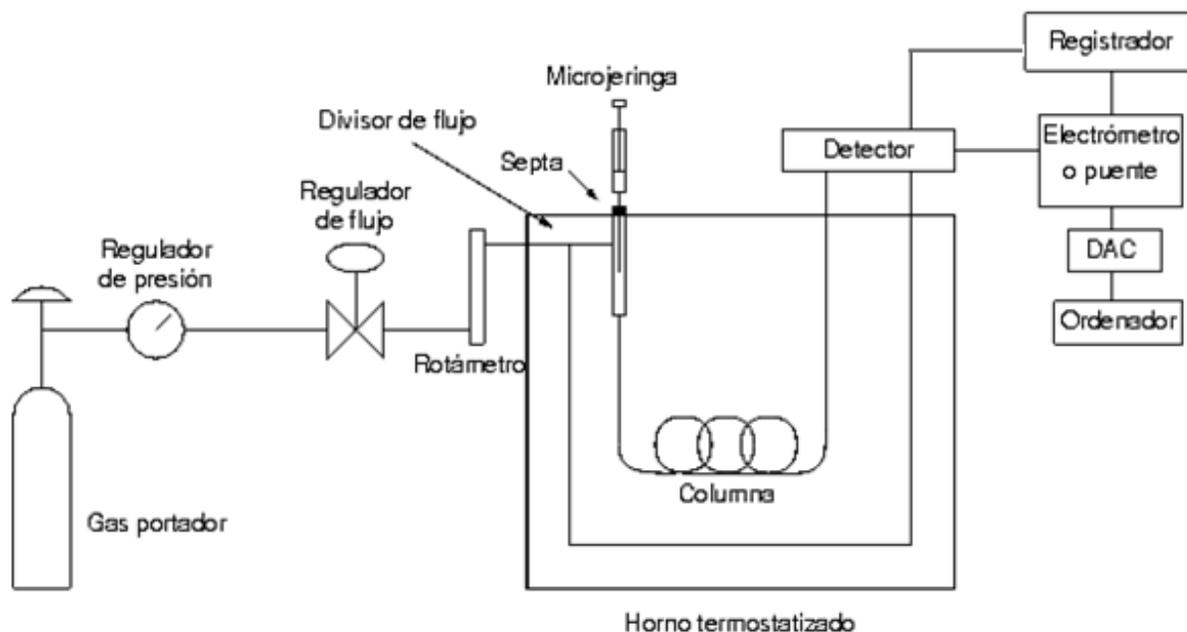


Figura 6. Esquema básico de un cromatógrafo gaseoso

Como se observa en el esquema anterior los cromatógrafos gaseosos contienen esencialmente:

1. Una fuente de gas comprimido: proporciona la FM (gas portador o gas acarreador) cuya finalidad es arrastrar los componentes volátiles de la muestra. Los gases más usados son: hidrógeno, helio, nitrógeno y argón.
2. Un regulador de presión o flujo del gas portador: cuya función es mantener constante el flujo del mismo durante todo el proceso para obtener resultados reproducibles.
3. Un Inyector: es un dispositivo que permite la introducción de la muestra en la corriente del gas portador y transformarla rápida y uniformemente al estado gaseoso. Existe cierta variedad de diseño según el tipo de muestra

que se trata de analizar. El más común es el inyector de líquidos, que puede utilizarse para sólidos (en disolución) y gases (mediante jeringas especiales). Se trata de una cámara situada a la entrada de la columna y calentada independientemente de ésta (a temperatura superior al punto de ebullición del componente menos volátil de la muestra); suele tener una membrana de caucho a través de la cual se introduce la muestra, con la ayuda de una microjeringa hipodérmica.

4. Una Columna Cromatográfica: es un tubo de vidrio o metal (acero inoxidable, cobre, aluminio, etc.) cuya longitud oscila entre 1 y 200 m, su diámetro interior puede ser desde 0.1 a 50 mm, según el tipo de columna. La separación de la mezcla se realiza en ella, siendo por tanto, la parte más importante del equipo. Actualmente se pueden utilizar tres tipos de columnas: empacadas, intermedias y capilares. En términos generales las columnas empacadas tienen 2- 4 m por 1/4 a 1/8 pulgada de diámetro interno. Pueden ser de vidrio o metálicas. Las columnas capilares tienen un diámetro interno menor de 1 mm y una longitud de 2 a 100 m. Pueden ser de acero inoxidable, vidrio borosilicato o de sílice fundida y contienen la fase estacionaria sobre la pared de la columna quedando la parte central vacía. Con las columnas capilares se pueden obtener resoluciones semejantes a las columnas empacadas pero en menor tiempo. Las fases estacionarias empleadas con mayor frecuencia, debido a su universalidad, son las relativamente no polares de silicona, como metilsilicona o 2-5 por ciento de fenilmetilsilicona. También, se ha propuesto el uso de algunas fases moderadamente polares como 14 por ciento de cianopropil metilsilicona.
5. El horno: en su interior se sitúa la columna, debe poseer una buena regulación de temperatura. Para mejorar la separación el calentamiento del horno se realiza de forma programada, pudiendo consistir en una única rampa de temperatura o en dos y hasta cuatro rampas.

6. El detector: es un dispositivo que permite medir de una manera continua una propiedad física del gas portador, que se modifica ampliamente con la presencia de muy pequeñas concentraciones de la sustancia a analizar (conductividad térmica, corriente de ionización, afinidad electrónica, etc.). Genera una señal eléctrica proporcional al contenido de cada componente de la muestra. Los más usados en Toxicología son el detector de ionización de llama (FID), el detector de captura electrónica (ECD) y el detector de nitrógeno-fósforo (NPD). El NPD es específico y sensible para los compuestos que contienen átomos de Nitrógeno (N) o Fosforo (P) en su molécula, como las drogas de abuso y medicamentos, ya que la mayoría contiene átomos de N, así como en el análisis de plaguicidas organofosforados y carbamatos que contengan átomos de N y/o P. El ECD, es de gran utilidad para el análisis de compuestos electronegativos con átomos de halógenos o grupos nitro o carboxilo, como es el caso de los pesticidas organoclorados y piretroides, y el FID es sensible a compuestos orgánicos que contengan uniones C-H en sus moléculas, una de sus características es que pueden analizarse muestras acuosas, ya que no detecta al agua.

7. Sistema electrónico de amplificación y medida de la señal eléctrica enviada por el detector y registrador de la misma.

Un **cromatograma** está compuesto por una serie de picos. Cada pico determina la presencia de por lo menos una sustancia, y el área por debajo del mismo es proporcional a la cantidad de dicha sustancia en la muestra inyectada. Para identificar una sustancia se usa un parámetro llamado tiempo de retención (t_r) que es constante para cada sustancia en determinadas condiciones, y se define como el tiempo transcurrido entre la inyección de la muestra y el momento en que se detecta su mayor concentración (ápice del pico). También puede usarse el tiempo de retención relativo, que es el tiempo que tarda en eluir una sustancia de la columna, con respecto al tiempo que tarda una sustancia "x" en el mismo sistema.

Este valor permite corregir posibles variaciones del (t_r) durante el desarrollo del programa cromatográfico.

Existen parámetros más exactos aún como los índices de Kovatz, que permiten estandarizar el comportamiento de las sustancias en un determinado sistema cromatográfico. Antes de la aplicación de la GC y de la GC/MS, se recurre frecuentemente a la derivatización de los grupos funcionales polares.

El objeto de esta reacción es aumentar la volatilidad, aumentar la estabilidad térmica o disminuir el límite de detección debido a la mejora en la simetría del pico, además de eliminar las llamadas colas en los cromatogramas. Se mejora considerablemente la separación de sustancias conteniendo grupos funcionales tales como $-\text{COOH}$, $-\text{NH}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{OH}$.

Para que la derivatización sea exitosa, debe ser cuantitativa y formarse un solo derivado en forma rápida y reproducible. Los procedimientos más utilizados son la acilación, la metilación y la silylación.

- **Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR)**

Como se mencionó anteriormente, en este sistema cromatográfico la fase móvil es un líquido. Se puede utilizar para la separación de cualquier compuesto orgánico ya que la técnica por CLAR no está limitada por la volatilidad ni la estabilidad térmica del analito. Se aplica, por ejemplo, para la separación, identificación y/o cuantificación de productos farmacéuticos, extractos vegetales, proteínas, ácidos nucleicos, polisacáridos, pigmentos, metabolitos animales o humanos, etc. Los principales componentes de un cromatógrafo líquido son la fase móvil contenida en un reservorio, la cual llega a la bomba que suministra un flujo continuo y constante y alcanza la columna, pasando previamente por la válvula de inyección. La FM atraviesa la columna que finalmente llega al detector, luego de lo cual pasa por una válvula que permite su colectado o bien su descarga. (Figura 7)

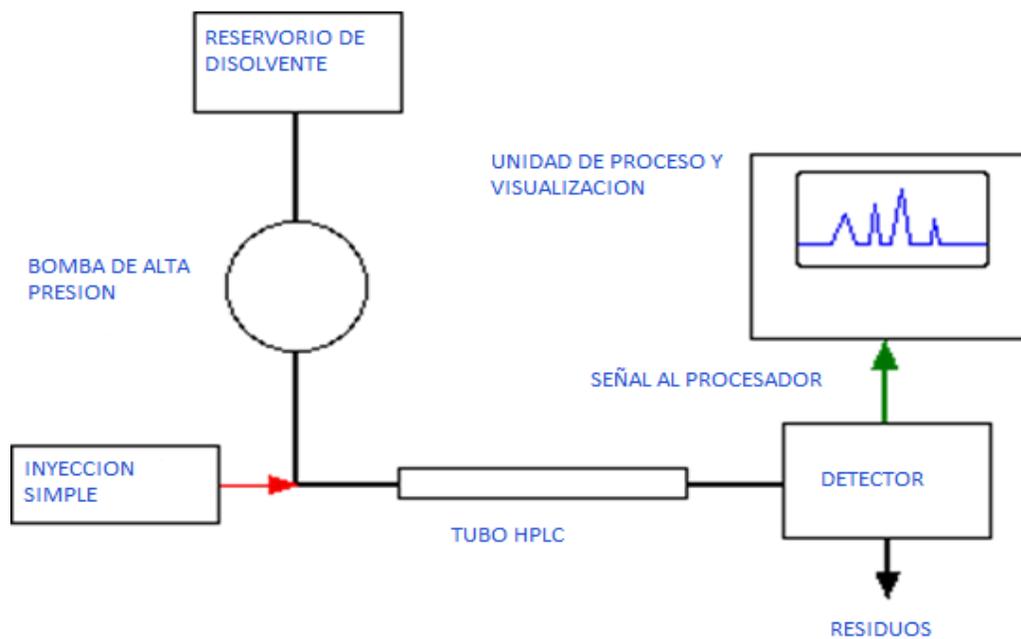


Figura 7. Esquema básico de un equipo para CLAR

1. Reservorio de disolventes: es el recipiente que contiene la fase móvil (cualquier frasco de vidrio o polímero resistente, de buena calidad, con tapa). En general se ubica por encima del nivel de la bomba para que la fuerza de gravedad dirija el disolvente hacia ésta, manteniendo las conexiones llenas. La FM debe ser de calidad cromatográfica, es decir, libre de sustancias orgánicas y de partículas mayores de 0.5 μm . En el extremo del tubo de salida de disolvente se conecta un filtro de acero (buzo) que impide el ingreso de partículas a la bomba.

2. Tuberías: la FM empleada en CLAR debe circular por tuberías que conectan los componentes del equipo. Obviamente estas tuberías deben ser inertes, empleándose tubos de acero inoxidable para conectar los componentes sometidos a alta presión (entre bomba-inyector, inyector-columna, columna-detector y detectores entre sí). Además se usan tuberías poliméricas (polipropileno o teflón) para conectar los componentes donde la presión es atmosférica o ligeramente superior (reservorio-bomba, detector-frasco de desperdicios).

3. Bomba: impulsa la FM desde el reservorio de disolvente al inyector y de allí a la columna. Las más usadas son las bombas de pistón. Para cubrir el amplio rango de compuestos a separar se han propuesto eluciones en gradiente, es decir, se varía la composición de la FM (porcentajes de los disolventes) comenzando la elución con un disolvente de menor polaridad y aumentando progresivamente la proporción del disolvente “fuerte”. Para formar estos gradientes se emplea generalmente una bomba y válvulas solenoides que entregan cada disolvente en una cámara de mezclado de pequeño volumen; la fase móvil formada en cada instante es entregada a la bomba.
4. Inyector: es una válvula que permite la introducción de la muestra en solución sin interrumpir el caudal de disolvente a través del sistema. Las proteínas presentes en las matrices biológicas deben eliminarse antes de inyectar la muestra para evitar que precipiten dentro del equipo. Además las muestras y estándares a inyectar deben estar totalmente libres de partículas en suspensión, ya que pueden rayar los sellos del inyector o bloquear tuberías. Para ello se utilizan filtros desmontables o fijos de 0.45 o 0.22 μm .
5. Columna Cromatográfica: en general es de acero inoxidable, de 25 a 30 cm de longitud y 2-4 mm de diámetro interno, aunque en la actualidad existe variedad en el tamaño y material (columnas de acero recubierto con vidrio, plásticas, etc.).

Las FE utilizadas en CLAR tienen un tamaño de partículas muy pequeño (5-10 μm) para favorecer la interacción entre las moléculas de muestra y la FM y aumentar de este modo la eficiencia en la separación de los componentes. Además, la cantidad de FE es baja, lo que disminuye el tamaño de las columnas y los tiempos de corrida.

El mecanismo más común, es la cromatografía en fase ligada. Las FE involucradas se denominan fases químicamente unidas (BPC), tienen sílica

como soporte, y diferentes grupos químicos unidos a sus grupos silanoles. Son muy variables en cuanto a polaridad y selectividad de acuerdo al "líquido" unido a la silica: C₁₈ (octadecilsilano), C₈ (octilsilano), C₂ (dimetilsilano), CN (nitrilo), NH₂ (aminopropil), diol. Las más usadas en Toxicología son las de C₁₈ y C₈, de baja polaridad que utilizan como fase móvil mezclas de agua (o soluciones salinas, buffers) con disolventes orgánicos polares (por ejemplo, acetonitrilo, metanol) Existen otros tipos de FE, como las basadas en la adsorción, en el intercambio iónico, y en la exclusión molecular.

6. Detectores: los detectores generales miden el cambio de alguna propiedad física de la FM que contiene al analito en comparación con la FM pura, por ejemplo, el detector de índice de refracción. Los *detectores selectivos* son aquellos sensibles a alguna propiedad del soluto, por ejemplo, el detector UV que producirá una señal proporcional a la absorbancia del soluto a una longitud de onda dada; el detector de fluorescencia empleado para la detección de solutos con fluorescencia natural o conferida por reacción con un reactivo fluorogénico (ya que CLAR también puede recurrirse a la derivatización) y el detector electroquímico, empleado en la detección de analitos capaces de oxidarse o reducirse ante la aplicación de un potencial.
7. Sistema electrónico de amplificación y medida de la señal eléctrica enviada por el detector y registrador de la misma.

- **Comparativo entre CG Y CLAR**

Como características de ambos métodos:

- Son eficientes, muy selectivos, ampliamente aplicables.
- Sólo se requiere una muestra pequeña.
- Pueden utilizarse sin destruir la muestra.
- Se adapta fácilmente al análisis cuantitativo.

Ventajas de la CLAR:

- Puede acomodar muestras no volátiles e inestables térmicamente.
- Es aplicable a iones inorgánicos.

Ventajas de la CG:

- Se trata de un equipo sencillo y barato en comparación con CLAR.
- Es rápido.
- Tiene resolución en paralelo (columnas capilares).
- Se conecta fácilmente con la espectrometría de masas, (MS).

La CG, ofrece la ventaja de la velocidad y simplicidad del equipo, pero la CLAR es aplicable a sustancias no volátiles y materiales térmicamente inestables.

• Algunas diferencias instrumentales:

- En CLAR no existen detectores tan aplicables universalmente, ni tan fiables como en CG.
- El detector en HPLC no es necesario que sea sensible en un intervalo tan grande de temperaturas.
- El detector usado en HPLC debe tener un volumen interno mínimo a fin de reducir el ensanchamiento de banda.

Al igual que en CG, la identificación de una sustancia por CLAR se basa en el tiempo de retención obtenido, comparado con testigos o estándares, con las consecuentes dificultades en cuanto a su reproducibilidad. Además, a pesar de cuidadosas purificaciones, ciertas interferencias pueden inducir resultados falsos positivos o impedir una adecuada identificación y cuantificación. Por otro lado, puede ocurrir que algunas sustancias eluyan juntas o muy próximas. Es decir en varias oportunidades, el tiempo de retención no es suficiente para proporcionar una información definitiva, por lo que conviene recurrir a un método de confirmación como la MS. La separación se realiza con el CG (o por CLAR) de acuerdo a sus tiempos relativos y la determinación se hace por la fragmentación de los iones característicos del analito: CG-MS y CLAR-MS.

- **Espectrometría de masas**

La espectrometría de masas es una poderosa técnica analítica usada para identificar compuestos desconocidos, cuantificar materiales conocidos y elucidar las propiedades químicas y estructurales de las moléculas.

La muestra, puede ser un sólido, líquido o vapor pero el espectrómetro de masas, requiere que la muestra sea transformada en un gas. Por ello en el primer paso la muestra es introducida en la cámara de vacío y luego es bombardeada por electrones. Los iones, los cuales están en fase gaseosa, son distribuidos en el analizador y son separados de acuerdo a su relación masa/carga del ion (m/z) y luego colectados por el detector.

En el detector (para iones), se convierte el haz de iones en una señal eléctrica. El sistema de datos registra estas señales eléctricas y luego las convierte en el espectro de masas. Un espectro de masa es un grafico de la abundancia relativa de iones contra la relación masa/carga. Los iones y sus abundancias sirven para establecer el peso molecular y la estructura de los compuestos que están siendo analizados. (Figura 8)

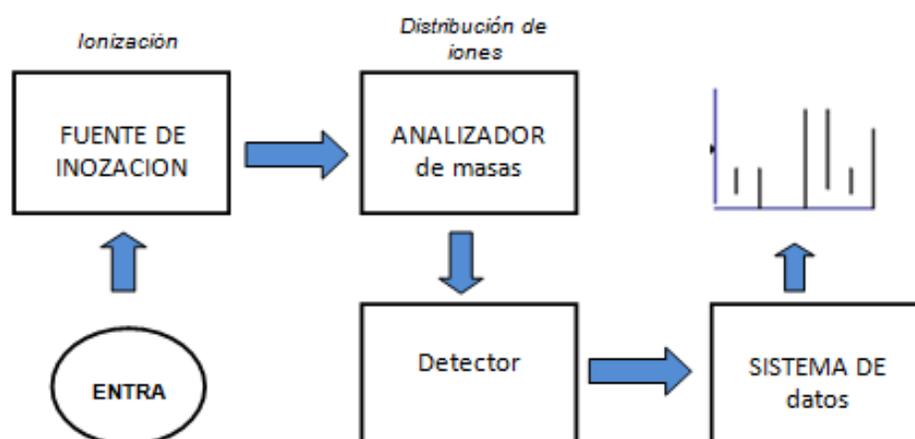


Figura 8. Esquema de los componentes de un espectrómetro de masas

Un simple compuesto puede generar varios fragmentos. Dos compuestos ionizados simultáneamente crean un espectro solapado o superpuesto. Entonces para obtener el espectro de masa de un compuesto, las mezclas de compuestos deben ser separados en sus componentes individuales previamente al análisis por espectrometría de masas. La Cromatografía gaseosa es ampliamente usada con este fin, de modo que los compuestos separados en fase vapor, entran al espectrómetro y son analizados secuencialmente. Más recientemente Cromatógrafos líquidos, Cromatógrafos de fluidos supercrítico y equipos de electroforesis capilar han sido conectados a un MS. Como se mencionó anteriormente, los procesos que ocurren en un espectrómetro de masas son:

1) ionización, 2) distribución de las masas y 3) detección.

1. Ionización

Los dos métodos de ionización más usados son: el impacto electrónico y la ionización química. El impacto electrónico es un proceso físico donde se transfiere energía mediante la colisión de electrones con las moléculas de la muestra en fase gaseosa. Debido a que la energía de los electrones de bombardeo es generalmente mucha más grande que la de las uniones moleculares; cuando ocurre la colisión las uniones se rompen y se forman fragmentos iónicos. Los iones negativos formados y los electrones son atraídos por un cátodo cargado positivamente o una trampa de electrones. Las moléculas y fragmentos neutros que no son ionizados son bombeados lejos. Los iones positivos son impulsados dentro del analizador y enfocados hacia un sistema de lentes. La energía empleada en la ionización electrónica puede conducir a una fragmentación excesiva, dejando poca o ninguna traza del ion molecular. En ausencia de un ion molecular, el peso y la estructura no son fáciles de determinar. Esto ha conducido al desarrollo de técnicas de ionización de baja energía, como la ionización química. En esta técnica, se producen iones por un proceso relativamente suave de transferencia de protones cuando la muestra se mezcla con un exceso de reactivo gaseoso ionizado como metano, isobutano, amoníaco, etc. Los

iones originados tendrán una unidad de masa mayor. Actualmente existen otros métodos de ionización, conocidos como técnicas de ionización-desorción, cuya gran ventaja es que pueden aplicarse a moléculas frágiles o no volátiles.

2. Distribución de masas

Los tres analizadores más ampliamente utilizados son: sectores magnético y eléctrico, cuadrupolos y trampa de iones. Otros dos están siendo usados con mayor frecuencia en laboratorios de investigación: resonancia de ion ciclotrón con transformación de Fourier (FT-ICR) por sus siglas en inglés y el tiempo de vuelo (TOF).

3. Detección

Los espectrómetros de masa pueden operar en dos modos diferentes, el registro total o "*full scan*" (TIC) y el de iones seleccionados "*selected ion monitoring*" (SIM). En la modalidad de registro total, el espectrómetro barre todos los iones presentes dentro de un rango de valores masa/carga, que normalmente oscila entre 40 y 650. En la modalidad SIM, el instrumento se prepara para detectar únicamente un ion (*single ion monitoring*) o varios iones (*multiple ion monitoring*) de abundancia relativamente grande, o de relación masa/carga significativa en el espectro de masas del compuesto de interés, resultando un cromatograma que responde sólo a compuestos en cuya fragmentación estén presentes los iones seleccionados. La ionización mediante impacto electrónico usando la modalidad de escaneo completo es la de mayor aplicación en el campo toxicológico, ya que el espectro de masa o patrón de fragmentación obtenido en estas condiciones, es como una huella dactilar, que contiene suficiente información para caracterizar la molécula, permitiendo confirmar su identidad, o en el caso que ésta se desconozca buscarla en las bibliotecas de espectros de referencia que estén disponibles.

Métodos en Tándem En algunos casos las concentraciones de los compuestos de interés son tan bajas, como ocurre con los compuestos cannábicos en el pelo o con algunos análisis de agentes de doping, que la CG-MS no posee sensibilidad suficiente para detectarlos, por lo que hay que recurrir al MS/MS en tándem, de más reciente aparición. Mediante el acoplamiento de dos etapas de análisis de masa (MS/MS), se puede generar el espectro de masa de iones individuales. A partir de mezclas de iones, un ion madre es seleccionado en la primera etapa del análisis de masas. El ion parental es luego fragmentado y los iones hijos resultantes son analizados según sus masas en una segunda etapa. Para instrumentos de cuadrupolo o sector magnético, cada etapa de análisis de masa requiere un analizador de masa separado. Para trampa de iones o ICR, el experimento MS/MS puede ser conducido secuencialmente en tiempo con un único analizador de masas. Esta metodología se caracteriza por su gran selectividad y sensibilidad, del orden de los fentogramos.

Interpretación de los resultados La interpretación de los resultados es el punto que requiere mayor atención y cuidado a efectos de asignarle al resultado de un análisis toxicológico el exacto significado que encierra y transformarlo en un elemento de real utilidad para el caso en cuestión. Primeramente, debe consignarse claramente las unidades y la forma de expresión de los resultados. En general los resultados siempre relacionan cantidad de una sustancia en un volumen de líquido determinado (sangre, orina, etc.).

Es importante remarcar que la cantidad de las sustancias investigadas son habitualmente escasas, menores al gramo, por lo tanto es necesario utilizar fracciones o submúltiplos de la unidad que se utiliza. La validez de un resultado está respaldada por la sensibilidad y la especificidad del método analítico empleado.

5.2 Características generales de técnicas de extracciones²⁸

La extracción es el proceso de separación de una sustancia, basado en la libre distribución de esta sustancia en dos fases. Mediante esta técnica se pueden separar componentes que se hallan presentes en mezclas sólidas o mezclas líquidas.

La extracción, se puede definir como la transferencia de una sustancia "X" desde una "fase líquida A" a otra "fase líquida B", inmisible con la anterior. El reparto de "X" entre las fases "A" y "B" viene dado por la ecuación de Nernst:

$$C_B(X) / C_A(X) = K_T$$

Donde:

- $C_B(X)$ y $C_A(X)$ son las concentraciones de "X" en "B" y "A" respectivamente.
- K_T es el coeficiente de reparto, que depende de la temperatura.

La mayoría de las veces lo que se persigue al realizar una extracción es aumentar la concentración del analito y reducir o eliminar la presencia de posibles agentes interferentes en el proceso de análisis.

La fase más utilizada para realizar los procedimientos de análisis es la fase líquida, por esto la mayoría de los procesos de extracción buscan llevar el analito a una solución en la cual el nivel de concentración del analito sea adecuado.

La extracción con disolventes de un compuesto a partir de una mezcla sólida o líquida, aprovechando las diferencias de solubilidad de los componentes de la mezcla en un disolvente adecuado, constituye una de las técnicas de separación de compuestos más utilizada en el laboratorio químico.

5.2.1 Columnas de Extracción Líquido-Líquido²⁸

La extracción usando columnas de tierra silíceo, basan su funcionamiento en la partición líquido-líquido. El relleno consiste en tierra silíceo, de estructura granular y gran volumen de poro. La columna queda cerrada en el extremo superior por una cestilla provista de una hoja de papel de filtro y en el extremo inferior, por papel de filtro. La velocidad de elución se controla mediante una cánula colocada sobre la boca cónica de salida. (Figura 9)



Figura 9. Columnas Extrelut NT

El procedimiento consiste en aplicar una muestra acuosa en la columna, la cual pasa a ser la fase estacionaria distribuida dentro los poros del relleno. Aproximadamente el 90 por ciento del volumen de relleno queda humedecido, mientras que el 10 por ciento restante se mantiene seco y activo en la parte inferior de la columna, destinado a secar el eluato.

Luego de 15 minutos de espera para lograr el acondicionamiento de la columna, se añade un disolvente orgánico inmiscible con el agua. La fase acuosa se mantendrá fija sobre el soporte mientras que todas las sustancias lipofílicas serán extraídas de la fase acuosa a la orgánica.

Es decir, en la primera parte del relleno (90 por ciento) de los analitos de interés se solubilizan en la matriz polar acuosa de la muestra, pero como tienen baja o a lo sumo mediana polaridad, su retención física en los poros es mucho menos firme que la de moléculas interferentes más polares del resto de la matriz.

Al añadirse el disolvente orgánico, éste acarrea al analito hacia abajo, debido a su afinidad con él. El flujo enriquecido de las sustancias de interés, encuentra la segunda porción (10 por ciento) de poros de tierra silíceo aún secos. Debido a estos poros aún activos, cambia la relación de velocidades de elución de los distintos componentes:

Las moléculas polares (entre ellas el agua y gran parte de las impurezas) son atraídas con gran fuerza y se adhieren a los poros por absorción.

Mientras que los analitos de interés continúan su avance hacia la parte inferior de la columna junto al disolvente de extracción, recuperándose con un rendimiento del 90 por ciento o más. Gracias a este último paso, el eluato obtenido se encuentra libre de humedad y puede concentrarse directamente sin necesidad de una etapa previa de secado. Esta técnica ofrece importantes ventajas en comparación con la extracción en ampolla de decantación en la cual, es necesario recurrir a varias agitaciones para proceder a una extracción cuantitativa, la fase orgánica debe secarse y a continuación concentrarse. En cambio en las columnas de extracción se tienen las siguientes características:

- Las muestras no necesitan ser agitadas durante las extracciones evitándose la formación de emulsiones y por ende la pérdida de analitos.
- El eluato no requiere un secado previo al proceso de concentración.

- El extracto obtenido contienen un bajo número de impurezas, tales como pigmentos urinarios, lípidos y otros compuestos metabólicos que podrían dificultar el análisis, especialmente si sólo hay trazas de la sustancia buscada (ng).
- Se logra una extracción cuantitativa, con una recuperación del 90 por ciento o más, en un solo paso lo cual implica un importante ahorro de disolventes orgánicos, con reducción de los costos.
- La elución transcurre automática y rápidamente disminuyendo notablemente el tiempo en los análisis, sobre todo cuando se trabaja con muchas muestras simultáneamente.
- Se puede efectuar una extracción secuencial a valores de pH diferentes en dos etapas.
- Se admite la posibilidad de automatización o robotización para realizar las extracciones.
- Es posible transportar la columna con la muestra aplicada para realizar un análisis diferido.

En resumen, en corto tiempo se obtendrán eluatos de gran pureza con altos porcentajes de recuperación y por ende muy buena sensibilidad analítica. Sin embargo, el empleo de estas columnas tiene ciertas limitaciones. Por ejemplo, los interferentes polares son eliminados fácilmente, pero no pueden eliminarse los componentes de menor polaridad que la de los analitos de interés, los cuales pasarán indefectiblemente al eluato. Además, debido a las características de su relleno posee un campo limitado de aplicación en la búsqueda de drogas de cualquier constitución. Prácticamente, por su funcionamiento, casi no tiene en cuenta el distinto grado de ionización de los analitos durante las extracciones, causados por cambio de pH o fuerza iónica, con lo cual se pueden modificar las retenciones a voluntad en los sistemas de extracción en fases sólida (EFS) que se describen a continuación.

5.2.2 Columnas de Extracción en Fase Sólida (CEFS)²⁸

Las CEFS (Figura 10) permiten aislar compuestos de interés a partir de una matriz biológica compleja o que contiene sustancias interferentes, en alto grado de pureza y con un alto porcentaje de recuperación. Sin embargo, el principio de extracción es muy diferente al de las columnas con tierra de diatomeas.

Las CEFS contienen un empaquetamiento de sílica químicamente enlazada a distintos sustituyentes, de modo tal que se aprovechan las interacciones polares, no polares o basadas en intercambio iónico entre los componentes de la muestra, el adsorbente sólido y el eluyente apropiado. Las columnas se elaboran en polipropileno para asegurar su inercia química.

En su parte inferior se coloca el relleno, comprimido suavemente entre dos filtros de micro-fibra de vidrio, químicamente inertes. En su parte inferior la columna se estrecha, ajustándose en el adaptador individual que forma parte de la tapa del sistema extractor.

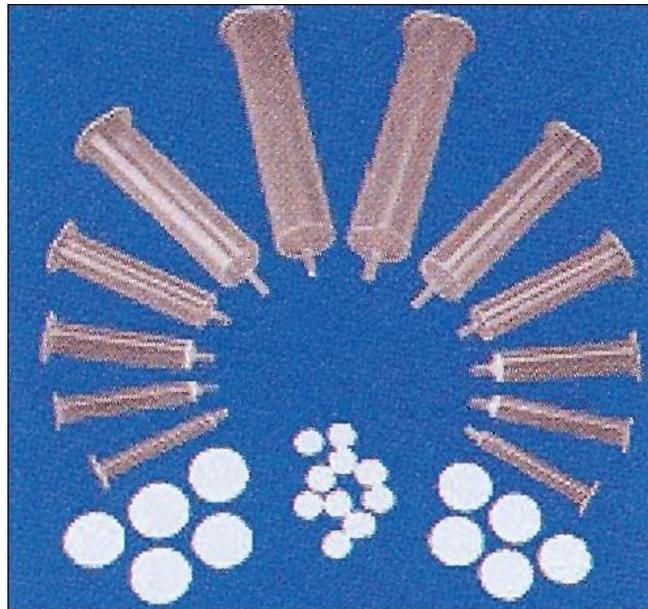


Figura 10. Columnas de EFS

Un sistema extractor clásico (Figura 11) consta de una cámara de vidrio transparente de forma rectangular, con tapa que permite asegurar el vacío en el

interior del sistema. En uno de los costados lleva un tubo de salida, una válvula de regulación de vacío y un manómetro.



Figura 11. Cámara de vacío para EFS

Cuando toda la muestra se encuentra en el interior de la columna se realiza el lavado para que termine de eluir la matriz; fuera del relleno se observa sólo el disolvente de lavado. La elución selectiva del primer grupo de analitos se colecta en un vial. Luego se cambia el vial y se procede a la segunda elución selectiva, con una nueva mezcla de disolventes de pH y polaridad adecuados.

La extracción en fase sólida es cada vez más específica y óptima, dado que proporciona una extracción más rápida y selectiva, ésta requiere menores volúmenes de disolvente orgánico. La utilización de sílice ligada para la extracción de muestras en estas columnas, parte desde su empleo en CLAR.

La EFS es una técnica cromatográfica que implica la partición de compuestos entre una fase sólida y una fase líquida, debiendo el compuesto a extraer tener mayor afinidad por la fase sólida que por la matriz de la muestra y al mismo tiempo ser fácilmente extraíble por un pequeño volumen de disolvente.

Una típica secuencia de extracción incluye acondicionamiento, aplicación de la muestra, lavado y finalmente elución del analito. La mayoría de las fases ligadas

disponibles comercialmente son tipo siloxano, se preparan por reacción de los grupos silanoles libres del gel de sílice microparticulado con un modificador, lo que ha permitido desarrollar distintos tipos de fases estacionarias que pueden clasificarse según el grupo funcional en apolares, polares o de intercambio iónico.

A finales de los 80 se desarrollaron las llamadas fases de función mixta, en las que parte de los grupos silanoles se han hecho reaccionar con cadenas alquílicas de longitud intermedia y otra parte con sustituyentes que permiten el intercambio catiónico, por lo que se pueden dar interacciones de tipo polar y apolar. La aparición de este tipo de columnas ha permitido que la extracción en fase sólida, que en principio se utilizó únicamente para la extracción de compuestos concretos o familias de compuestos, se esté aplicando de forma generalizada en la sistemática analítica toxicológica de todo tipo de muestras.

Las fases mixtas son capaces de retener a un pH adecuado a las sustancias ácidas y neutras por interacciones hidrofóbicas con las cadenas alquílicas y a las sustancias básicas por interacciones con los grupos de intercambio catiónico. La elución diferencial se lleva a cabo por el ajuste adecuado de pH y la elección correcta del disolvente. En caso de muestras especialmente sucias se pueden utilizar secuencialmente dos columnas, con fases iguales o diferentes, para primero eliminar interferencias como grasas o pigmentos biliares y proceder después a la extracción propiamente dicha. Los factores críticos a tener en cuenta al afrontar una extracción en fase sólida una vez establecido el procedimiento son el ajuste del pH, la velocidad de flujo en las distintas etapas y el control de los tiempos de secado. También hay que tener en cuenta que pueden existir variaciones en la manufactura de las columnas de un mismo o diferente lote comercial, que puede ser la causa de variaciones en los rendimientos. De ahí la importancia del empleo de un estándar interno adecuado.²⁹

Recientemente se ha dado un paso más en la extracción en fase sólida, son los discos de extracción en fase sólida, cuya principal ventaja es la reducción en el volumen de muestra y de disolvente. Se han publicado los primeros trabajos sobre

la aplicación de estos discos a la sistemática analítica toxicológica de muestras de orina con resultados satisfactorios.³⁰

La extracción por Espacio en Cabeza consiste en inyectar directamente en el cromatógrafo de gases la muestra tomada de la cámara de aire de un vial herméticamente cerrado donde se ha colocado la muestra. Es únicamente aplicable a compuestos volátiles y no consigue concentrar la muestra, pero es altamente selectiva y la manipulación de la muestra es mínima, requiriendo sólo un simple calentamiento o la adición de una sustancia que favorezca la volatilización. Esta es la técnica de elección para el análisis de tóxicos tan importantes como el etanol, metanol o monóxido de carbono, pero no es aplicable a la sistemática analítica toxicológica.

Una modalidad con grandes perspectivas es la microextracción en fase sólida, que podría considerarse como una combinación entre el método de Espacio en Cabeza y la extracción en fase sólida. En un principio se utilizó únicamente para la determinación de compuestos volátiles en aguas, hoy en día su aplicación se ha extendido a todo tipo de muestras, incluso sólidas, y para compuestos con distinto grado de volatilidad.

En la microextracción en fase sólida los analitos son adsorbidos directamente desde la muestra a una fibra de sílice fundida ligada químicamente con la fase estacionaria apropiada. La fibra está incluida en el émbolo de una jeringa especial. Para que se produzca la adsorción la fibra entra en contacto con la muestra, directamente o con el espacio en cabeza, durante el tiempo adecuado y a la temperatura que se establezca como óptima. Los analitos se absorben térmicamente en el bloque de inyección del cromatógrafo de gases o en una interfase que permita la elución de los analitos por la aplicación de la fase móvil. Esta conexión con la cromatografía líquida de alta resolución abre el campo de aplicación de este tipo de extracción. Aunque hoy en día su aplicación se limita a familias concretas de compuestos, mencionaremos también la extracción por inmunoabsorción. Se basa en la interacción selectiva entre el anticuerpo y el analito por lo que permite una extracción altamente selectiva, aumentando la

sensibilidad y la recuperación. No es necesario el pretratamiento de la muestra para la liberación de los conjugados y permite la inyección directa en CLAR.

Concentración del Extracto Los extractos obtenidos por cualquiera de los procedimientos antes descritos, deben ser reducidos a un volumen menor, para aumentar la concentración de los analitos presentes, e incluso llevados a sequedad para redissolverlos posteriormente en un disolvente más adecuado según la técnica de identificación que se seguirá. Esta operación requiere que los analitos sean estables térmicamente y que no se volatilicen junto con el disolvente. El método usual consiste en colocar los viales en placas calefactoras (temperatura menor de 40°C) y bajo corriente de nitrógeno. El método de elección es la utilización de la evaporación a presión reducida en rotavapor, lo que permite eliminar el disolvente a bajas temperaturas (40°C).

COMPARACIÓN DE DIFERENTES MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE COCAÍNA Y BENZOÍLECGONINA EN UNA MUESTRA DE HÍGADO *POST-MORTEM*

Los análisis toxicológicos de muestras *post-mortem* dan un panorama más amplio de las posibles causas de muerte de un sujeto, por este motivo en el trabajo realizado por Cingolani y col.³¹ se reportó la detección y cuantificación de COC y su metabolito BZ en muestras de hígado conservadas en formaldehído así como de la soluciones de formaldehido en las que se preservaron las muestras. Se trabajó con cuatro muestras provenientes de consumidores de COC las cuales se separaron en dos porciones en cada caso, una de las cuales se analizó inmediatamente y la otra se preservó en solución de formaldehido (10 por ciento a un pH=7) por cuatro semanas antes de su análisis, las determinaciones se llevaron a cabo por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

Por otro lado, en el trabajo realizado por Buddha y col.³² se reportaron las determinaciones de COC y BZ en muestras de tejidos y fluidos provenientes de fumadores de crack. Los análisis se realizaron mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

En estos dos estudios se determinó la presencia de COC y BZ mediante las siguientes metodologías.

En el primer estudio los análisis toxicológicos se realizaron en muestras pertenecientes de tejidos de hígado fijados en formol y soluciones de formalina (10 por ciento a un pH=7) en el que las muestras fueron preservadas. Estos materiales biológicos provenían de cuatro casos de muerte de consumidores de cocaína, para cada caso, en el momento de la autopsia, se tomó una muestra de hígado se separó en dos proporciones: la primera se analizó inmediatamente, la segunda fue puesta en formol. Las muestras de tejido fueron conservadas en soluciones de formalina durante cuatro semanas antes del análisis. El tejido se pesó antes y después de la fijación en formol, el cual no resultó ser sensiblemente modificados por la preservación.

Los reactivos químicos son de grado analítico certificados individualmente hidróxido de sodio (Merck, Darmstadt, Alemania), metanol (Carlo Erba, Milán, Italia), ácido clorhídrico (Carlo Erba), hidróxido de amonio (Sigma, St. Louis, MO), diclorometano (Baker, Phillipsburg, Nueva Jersey), alcohol isopropílico (Sigma), N-metil-N-trimetilsilil-trifluoroacetamida (MSTFA) (Sigma), cocaína (Alltech, Los Alamos, CA), benzoilecgonina (Alltech), y escopolamina (Sigma).

El equipo utilizado para el análisis, incluye un homogeneizador (Ultra Turrax, Ica Labor Technik, Milan, Italy), sonificador (model 1210, Bramson, Danbury, CT), centrífuga (modelo 4218, ALC, Milán, Italia) y vortex mixer (Falc, Bergamo, Italia), SPS 24, Varian, Bergon op Zoom, Países Bajos, baño de temperatura (Carlo Erba baño termostático), y GC-MS (Instrumentos Fisons, Milán, Italia).

Preparación de las muestras

Tejidos. Cinco gramos de tejidos frescos y cinco gramos de tejidos fijados con formalina, los dos de fuentes de la autopsia, fueron molidos por separado y homogeneizados en agua destilada (1:1) y se sonificó durante 7-8 horas. 1 mL de ácido clorhídrico 0.1 M fue agregado a las soluciones homogeneizadas, seguido por el ácido sulfosalicílico para desproteínización. Las soluciones fueron centrifugadas, y el pH del sobrenadante fue ajustado a pH=6, con sulfato de amonio e hidróxido de sodio (8 por ciento en agua). Se añadió 1 mL de solución de escopolamina (1 mg / L en agua) como estándares internos (IS) y 2 mL de buffer de fosfatos 0.1 M (pH=6), y las soluciones fueron centrifugadas antes de la siguiente fase de extracción.

Cinco mililitros de solución de formalina se extrajeron de las muestras. Las soluciones se evaporaron a sequedad a temperatura ambiente. Cinco mililitros de agua destilada se añadieron al residuo. Se añadió 1 mL de la solución de escopolamina (1 mg/L en agua), como IS y 2 mL de buffer de fosfatos 0.1 M (pH=6), y las soluciones fueron centrifugadas antes de la siguiente fase de la extracción.

Extracción en fase sólida

Las columnas fueron acondicionadas de forma secuencial con 2 mL de metanol y 2 mL de buffer de fosfato 0.1 M a pH=7.

Aplicación de la muestra: Las muestras fueron extraídas lentamente a través de las columnas usando vacío (al menos por 2 minutos)

Lavado de columna: Las columnas se lavaron secuencialmente con 2 mL de agua, 3 mL de ácido clorhídrico 0.1 N y 2 mL de metanol y luego secadas durante 5 minutos mediante vacío total.

La elución de cocaína. Los analitos se eluyeron dos veces con 1 mL de una solución de diclorometano y alcohol isopropílico en proporción (8:2) con un 2 por ciento de hidróxido de amonio, elaborado todos los días; los eluidos fueron transferidos a tubos silanizados graduados de 3 mL y se evaporó a sequedad en un baño de agua a temperatura de 50°C bajo una corriente lenta de nitrógeno.

Derivatización

Los extractos se reconstituyeron con 50 µL de MSTFA y se incubaron durante 15 minutos a 75°C en tubos de ensayo silanizados

Análisis CG-MS

Las condiciones siguientes fueron aplicadas: fue utilizada una columna capilar recubierta (sílice fundida de 30 m x 0.32 mm), el gas portador fue helio a un flujo mínimo de 1.5 mL/minuto. El programa de temperatura se inició a 100°C y el primer incremento fue de 40°C/minuto hasta una temperatura de 180°C, el segundo incremento fue de 10°C/min hasta 310°C. El volumen de inyección fue de 1µL (modo splitless). Para el espectrómetro de masas se utilizó el método de impacto eléctrico a 70 eV. Los espectros de masas fueron registrados en un rango de 70-500 m/z.

El diagrama de flujo para esta metodología se muestra en la (Figura 12).



Figura 12. Diagrama de análisis de COC y BZ

En el segundo estudio revisado, los análisis que se realizaron fueron en muestras de 15 casos de muerte de fumadores de crack. Las muestras provenían de la división Toxicológica Forense de las Fuerzas Armadas. Las muestras se analizaron previamente por inmunoensayo de las que se informó dieron positivo para la COC y BZ.

Los productos químicos, reactivos y suministros que fueron utilizados son: *N*-desmetil-*N*-[2H3] metilcoquina (d_3 -COC), BZ, *N*-desmetil-*N*-[2H3] metilbenzoilecgonina (d_3 -BZ), *N*-desmetil-*N*-[2H3] metilecgonina (d_3 -CE), ecgonina, MED (Ester metílico de la anhidroecgonina) y ED (anhidroecgonina) los cuales fueron adquiridos de Radian International. COC (base libre) la cual se adquirió de Sigma Chemical, y dimetilformamida (DMF), dimetilformamida dipropil acetal (DMF-DPA), y dimetilformamida dimetilacetal, se adquirieron de Aldrich Chemical. Para la EFS, se emplearon columnas que contienen una base de sílice C8 y SO₃H (200 mg) y un vaso de extracción de la cámara fueron adquiridos de Tecnologías Químicas. Reactivación viales, bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida (BSTFA), y *N*-metil-*N*-(terc-butildimetilsilil) trifluoroacetamida (MTBSTFA) que

contiene 1 por ciento tertbutildimetilclorosilano (TBDMCS) fueron adquiridos de Pierce. Todos los disolventes y los reactivos fueron de análisis o grado CLAR. La acetona se secó sobre tamices moleculares (3Å, 8.12 de malla) por lo menos 24 horas.

Los instrumentos que fueron empleados son: CG-MS de marca Hewlett-Packard en el que el sistema consistía en un cromatógrafo de gases HP 5890 Serie II Plus y un espectrómetro de masas modelo de 5972 cuadrupolo de detección selectiva. Una impresora HP 18593B, inyector automático el cual se utiliza para inyectar las muestras en el CG-MS.

Preparación de muestras para COC, BZ y MED para su determinación

El hígado. Para cada muestra y control un 1 g de tejido (tejido negativo para el control) se pesó en tubos de plástico de fondo plano y se almacenaron congelados. Los controles fueron preparados en concentraciones de 100, 50 y 20 ng/g de tejido mediante la adición de COC (100 µL de 1.0, 0.5 y 0.2 mg/L), BZ (100 µL de 1.0, 0.5 y 0.2 mg/L), MED (100 µL de 1.0, 0.5 y 0.2 mg/L) en tres tubos vacíos de vidrio. Los estándares internos (100 µL de 0.5 mg/L d₃-COC, 100 µL de 0.5 mg/L d₃-BZ, de 50 µL de 0.68 mg/L d₃-MED, y 100 µL de 0.5 mg/L d₃-ED) se añadieron a los tubos de control y tubos de centrifugación que se utilizaron posteriormente para el análisis de muestras, NaF (200 mL, 10 g / L) se añadió a los tejidos de los tubos de plástico. Los tejidos fueron descongelados, y homogeneizados con 1 mL de tampón fosfato 0.1 mol/L (pH=6.0), y se vertieron en los tubos de vidrio correspondiente que contienen la droga y los estándares internos de control y los estándares internos sólo para las muestras. Dos mililitros de tampón de fosfatos 0.1 mol/L (pH=6.0), se añadió a el tejido residual y homogeneizada de nuevo. El homogeneizado resultante se combinó con el homogeneizado inicial.

Después de la homogeneización, los tubos se taparon y se colocaron en un baño de hielo. El homogeneizado se coloca en un agitador mecánico por 10 a 15 segundos y se centrifuga durante 60 minutos a 3834-g (ó Fuerza Centrifuga

Relativa) a 7-10°C. Un conjunto de CEFS fueron colocadas en la cámara de extracción y acondicionadas con 3 mL cada uno de metanol, agua, y 0.1 mol/L de tampón fosfato (pH=6.0), en secuencia, empleando presión reducida.

Un conjunto de tubos de centrifuga de vidrio fueron colocados en la cámara para recoger la fracción de elución siguiente. Los sobrenadantes de las muestras homogenizadas de tejido fueron vertidos sobre las columnas y se deja eluir por gravedad o mediante presión reducida. En la EFS las columnas se lavaron con 2 mL de agua destilada, 3 mL de ácido clorhídrico 0.1 mol/L y 3 mL de isopropanol, y luego se secaron durante 5 minutos a presión reducida. El MED, COC y BZ se eluyeron con 3 mL de una mezcla (9:1:0.2 en volumen) de diclorometano-metanol-NH₃ acuoso (14.8 mol/L).

Las soluciones se evaporaron a sequedad bajo corriente de nitrógeno a temperatura ambiente para minimizar la pérdida de MED. Los extractos se disolvieron en 50 µL de acetona seca, se transfirieron en viales al muestreador automático, y se realizaron las pruebas del MED y COC por separados mediante CG-MS. Después de que las pruebas de MED y de COC se realizaron, las muestras fueron analizadas para BZ como el derivado de propilo, utilizando otro procedimiento de CG-MS.

Derivatización

Después del análisis de COC y MED de la solución de acetona, se añadió DMF-DPA (20 µL) a los viales. Los contenidos se mezclaron y los viales se vuelven a tapar. El análisis se realizó para propil-BZ.

Análisis CG-MS

Las muestras fueron introducidas en volúmenes de 1 a 4 µL en el auto inyector. El análisis CG se realizó con una columna DB-5MS columna capilar [5:95 fenilmetilsiloxano; 15 m X 0.25 mm (i.d.); Científico J & W] o una ZB-5 [5 por ciento de fenil polisiloxano; 15 m X 0.25 mm (i.d.); Phenomenex] a 10 psi con flujo de helio a presión constante. El detector de masas fue operado en el modo de ionización de

electrones a 70 eV, con una temperatura de la fuente de 200-250°C. El voltaje del multiplicador de electrones del detector se fijó en 200-700 V por encima de autoajuste, y el tiempo de detección del monitor de iones fue de 50 ms.

CG-MS para el MED. El análisis se realizó en inyector y temperaturas lineales de transferencia de 140 y 280°C, respectivamente. La temperatura del horno se inició a 90°C (que tuvo lugar durante 1 minuto) y aumentó de 20°C/minuto hasta llegar a 140°C esta última temperatura tuvo una duración de 2 minutos. El CG se inició en modo splitless, se purga el puerto del inyector y se enciende después de 0.3 minutos. El control de iones fue de 181, 166 y 152 m/z para MED y 184 y 155 m/z para el d₃-MED. Se utilizaron para cuantificación los iones 152 y 155 m/z. Porque COC, BZ, y MED se extrajeron juntas, las temperaturas del inyector se mantuvieron ≤ 140°C para evitar la posible formación de MED de cualquier COC presentes en la muestra. Después de cada inyección, 2-3 µL de acetona se inyectó como un blanco de disolvente.

CG-MS para la COC. El análisis se realizó en inyector y temperaturas lineales de transferencia de 280 y 270°C, respectivamente. La temperatura del horno se inició a 170°C (que tuvo lugar durante 0.5 minutos) y aumentó a 270°C a 30°C/minuto (realizado por 2.7 minutos). El CG se inició en modo splitless, se purgó el puerto del inyector y se encendió después de 0.3 minutos. Los iones fueron monitoreados a 303, 272, y 182 m/z para COC y 306 y 185 m/z de la d₃-COC. Se utilizaron para cuantificación los iones 303 y 306 m/z. Después de cada inyección, 3 µL de acetona se inyectaron como un blanco de disolvente.

CG-MS para propilo BZ. El análisis se realizó en el inyector y la temperatura de transferencia de la línea de 280 y 270°C, respectivamente. La temperatura del horno se inició a 170°C (que tuvo lugar durante 0.5 minutos) y aumentó de 30 °C/min hasta llegar a 270°C teniendo una duración de 2.7 minutos. El CG se inició en el modo splitless, se purga el puerto del inyector y se enciende después de 0.3 min. Los iones fueron monitoreados 331, 272, y 210 m/z para BZ y 334 y 213 m/z de d₃-BZ. Se utilizaron para la cuantificación los iones 331 y 334 m/z. Después de

cada inyección, 3µL de MTBSTFA que contiene 1 por ciento de TBDMCS fue administrada como un blanco de disolvente.

El diagrama de flujo para esta metodología se muestra en la (Figura 13).

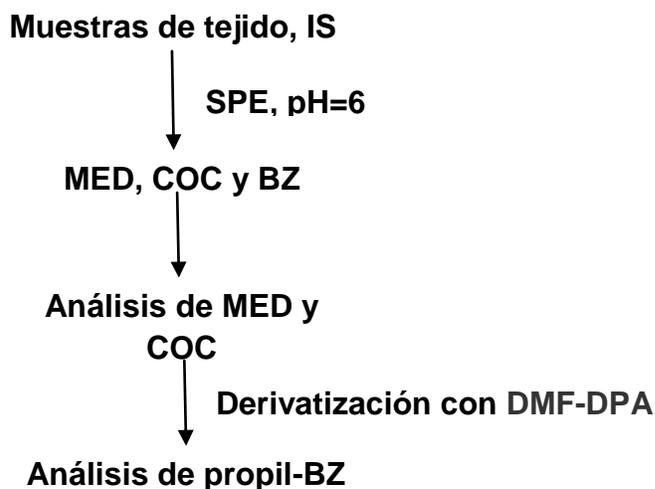


Figura 13. Diagrama de análisis de MED, COC y BZ

En las dos metodologías presentadas anteriormente se observan grandes diferencias tanto en disolventes empleados así como en la derivatización, los rendimientos de la determinación de COC y BZ son presentados por separado para cada metodología.

Los resultados obtenidos por los métodos utilizados se presentan, comparando cada uno de los rendimientos obtenidos al determinar COC y BZ.

6.1. Resultados

En el primer estudio el análisis principalmente detecta y cuantifica benzoilecgonina en todos los materiales estudiados. La cocaína fue detectada sólo en un caso en tejido fresco, pero nunca en tejidos fijados en formalina o en soluciones de formaldehído. La cocaína y benzoilecgonina fueron identificados al comparar los tiempos de retención con el del patrón interno que es escopolamina y el espectro de masas de cocaína y benzoilecgonina estándar (cocaína, 182, 82, 303, y 272 m/z; benzoilecgonina-TMS 82, 240, 361, y 346 m/z).

La cuantificación se llevó a cabo mediante el control de la abundancia relativa del ion 182 m/z (de cocaína), 82 m/z (iones de benzoilecgonina-TMS), y 138 m/z (los iones de la escopolamina-TMS, IS). Los resultados de la cuantificación para las muestras de hígado fijados con formalina y para las soluciones de formalina en las que estos tejidos fueron conservados se enumeran en la (Tabla 4).

Tabla 4. CUANTIFICACIÓN DE COC Y BZ EN TEJIDOS DE HÍGADO AL MOMENTO DE LA AUTOPSIA, TEJIDOS DE HÍGADO FIJADOS Y SOLUCIONES DE FORMALINA DE LOS TEJIDOS FIJADOS.

Caso	Tejido de Hígado al Momento de la Autopsia (mg/Kg)	Tejido de Hígado Fijados (mg/Kg)	Solución de formalina (mg/L)
1	COC: 0.376 BZ: 0.423	BZ: 0.056	BZ: 0.885
2	BZ: 0.816	BZ: 0.104	BZ: 0.509
3	BZ: 0.162	BZ: 0.024	BZ: 0.124
4	BZ: 0.815	BZ: 0.135	BZ: 0.672

Los valores cuantitativos de cocaína y benzoilecgonina obtenido en los tejidos fijados y desde los mismos tejidos en el momento de la autopsia eran muy diferentes, debido a que los umbrales de detección son redistribuidos a partir de tejidos en la solución de formalina. En muchos casos, las concentraciones de benzoilecgonina en las soluciones de formol en la que el hígado fue conservado

se comprobaron que fueron superiores que los recuperados en los tejidos fijados. En la (Tabla 5) se enlista los niveles medios de benzoilecgonina recuperados a partir de hígado (tanto tejidos fijados y soluciones de formalina en el que los tejidos se conservaron) en comparación con los niveles medios de las mismas muestras en el momento de la autopsia.

Las mejores tasas de recuperación fueron encontradas en soluciones de formalina resultando en un 84.47 por ciento. La suma total de las tasas de recuperación en soluciones de formalina y tejidos fijados 12.31 por ciento, nos da un total del 96.78 por ciento, siendo este comparable con el porcentaje obtenido al cálculo de la eficiencia del método el cual fue del 97.78 por ciento, e indica que la cocaína y benzoilecgonina tienen una buena estabilidad. Este valor puede ser útil en la evaluación cuantitativa de los casos.

Tabla 5. MEDIOS DE RESULTADOS CUANTITATIVOS PARA LA BZ (CANTIDADES) Y LA TASA DE RECUPERACIÓN DESPUÉS DE CUATRO SEMANAS

Cantidad de BZ al momento de la autopsia (media, µg)	Cantidad de BZ en Tejido de Hígado Fijados (media, µg)	Cantidad de BZ en Solución de formalina (media, µg)	% recuperado en Tejido de Hígado Fijados	% recuperado en Solución de formalina
3.24*	0.399	2.737	12.31	84.47
*COC y BZ se consideran BZ				

Los espectros obtenidos mediante este estudio son los que a continuación se muestran, utilizando las condiciones de impacto eléctrico de 70 eV. Los espectros de masas fueron registrados en un rango de 70-500. (Figura 14)

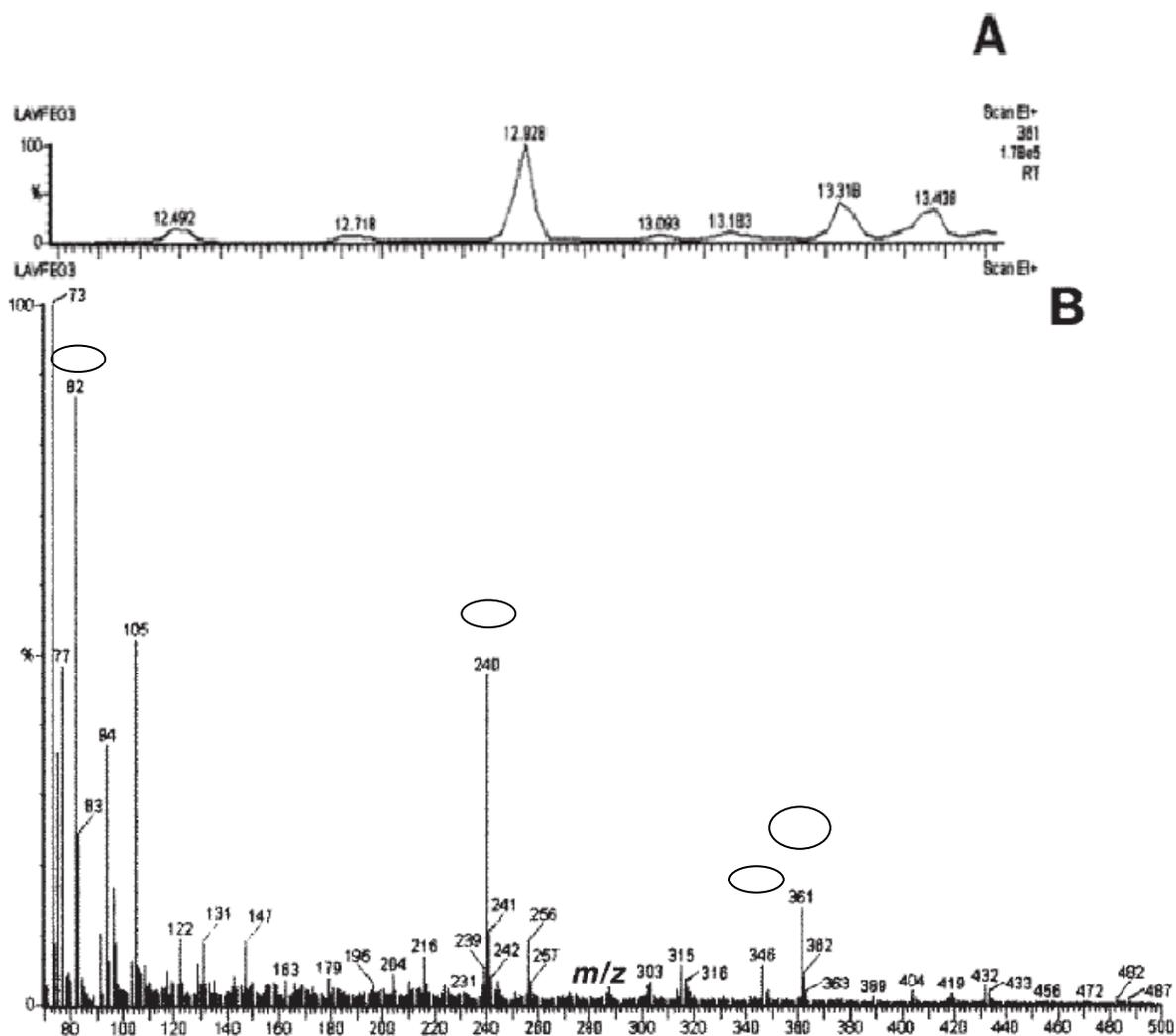


Figura 14. Espectro de masas de TMS-BZ en solución de formalina, tiempo de retención 12.928 min (A), modo de detección cromatográfico de iones TIC y SIM en m/z 82, 240, 346 y 361 (B).

El espectro obtenido en este estudio es comparable con el reportado en la literatura ³³ (Figura 15).

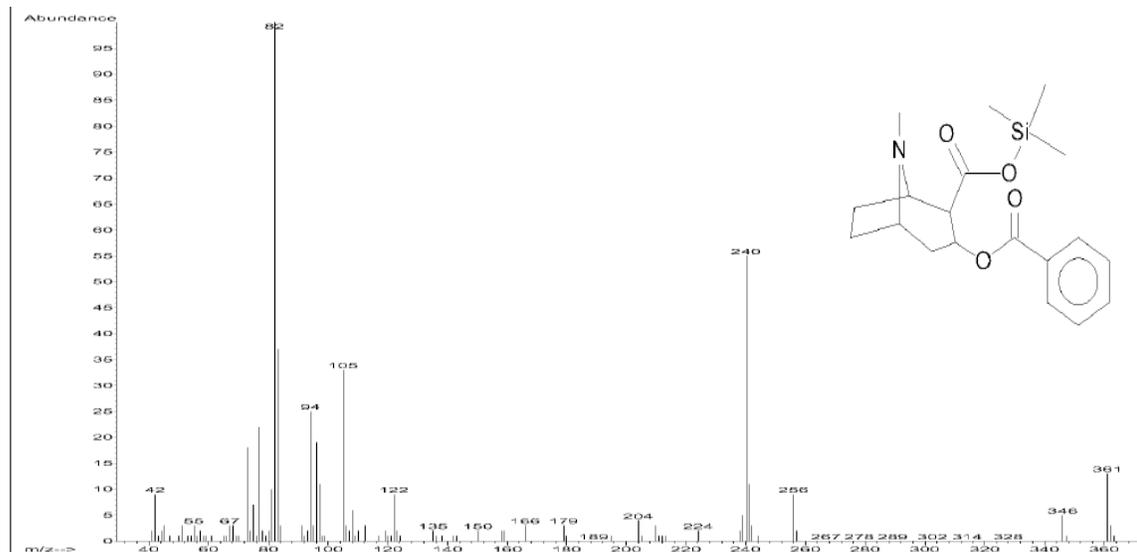


Figura 15. Espectro de BZ ³³, Derivatizado con TMS: *m/z* 361; M+

Los resultados obtenidos en el segundo estudio donde se determinó la presencia de COC y BZ también se identificó la presencia de MED como metabolito representativo de la vía de administración de COC, en muestras de tejido hepático.

Dado que MED es un producto pirolítico de COC. Condiciones adecuadas de análisis por CG-MS son necesarias para evitar la producción de MED como derivado de COC.

Más del 90 por ciento de COC, BZ, y MED fueron retenidos en las columnas empleadas.

Para eluir MED, COC, y BZ se empleó, diclorometano-metanol-amoniaco en proporción de 9:1:0.2 en volumen, esta mezcla se prefirió utilizar sobre la generalmente empleada diclorobutano-isopropanol-amoniaco, dado que la MED es volátil y se pierde fácilmente durante la evaporación de isopropanol.

La MED se analizó en el extracto de COC y BZ por separado en un CG a una temperatura $\leq 140^{\circ}\text{C}$. Se evitaron temperaturas más altas para minimizar la formación de derivados de MED. Para garantizar que los derivados no se formaran

durante el análisis, un control que contiene COC, BZ y MED en 1, 5 y 5 mg/L, respectivamente, fue probado. No se detectó MED en virtud de la extracción y el análisis GC-MS descrito. Se inyectó COC por separado antes de la derivatización de BZ porque los agentes de alquilación contienen una pequeña cantidad de agente de metilación como impureza. En el experimento, DMF-DPA, DMF-diisopropilamida, o DMF-dietilamida con sólo BZ produjo una pequeña cantidad de COC como subproducto (<1 por ciento). Aunque MED y COC fueron inyectados bajo dos condiciones diferentes (temperaturas de inyección 140 y 280°C, respectivamente), las muestras podrían ser analizadas en lotes de inyección mediante el uso de un autoinyector con dos ajustes de CG-MS.

Las concentraciones obtenidas de COC, BZ y MED en las muestras de Hígado se muestran en la (Tabla 6). Se observa que en las 15 muestras analizadas se determinó cualitativamente y cuantitativamente la presencia de BZ, de éstas en un 80 por ciento, de las muestras se detectó COC y un 33 por ciento de MED.

Tabla 6 CONCENTRACIÓN DE COC, BZ Y MED EN 15 MUESTRAS *POST-MORTEM* DE HÍGADO.*

MUESTRA	MED (ng/g)	COC (ng/g)	BZ (ng/g)
1	0	0	60
2	0	0	68
3	0	66	612
4	0	0	45
5	0	21	149
6	0	11	440
7	0	57	103
8	0	9	821
9	0	21	890
10	0	426	1643
11	5	134	2755
12	6	103	3513
13	8	503	4980
14	8	77	2963
15	10	270	2430
MEDIA	0	57	821
RANGO	0-10	0-503	45-4980
POSITIVO	5/15	12/15	15/15
*Los valores de 0 indican cuantificación por debajo del límite de determinación.			

6.2. Conclusiones

De los trabajos revisados se puede concluir que el hígado es una buena matriz biológica de análisis para la determinación del metabolito de COC. Dado que se puede observar que en la determinación de BZ se obtienen muy buenos resultados a su cuantificación en soluciones de formalina en las que las muestras de hígado se conservaron siendo éste un porcentaje aproximado del 85 por ciento de recuperación.

La particularidad del segundo trabajo examinado, en el que también se tuvieron muy buenos resultados a la cuantificación de BZ observándose un 100 por ciento de determinación en el número de muestras positivas a la cuantificación de este metabolito. En cinco muestras se pudieron determinar MED el cual es un indicativo de la vía de administración, dado a la reacción de pirolisis de COC, que nos indica que la vía de administración fue fumada.

Se puede tomar como base para la determinación de BZ ambos estudios dado que en los dos se cumple el principal objetivo, que es el determinar que el consumo de COC tuvo relación con el hecho de un ilícito en base al análisis de muestras *post-mortem* de hígado.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Corey, G. Vigilancia en epidemiología ambiental. OPS/OMS. 1988; 193.
2. Córdoba P. D. Toxicología. 5ª ed. Medellín: Manual Moderno; 2005.
3. Durham, W.B. Toxicology of Environmental Pollutants. Industrial Pollution. New York: Van Nostrand Reinhold Company: 1974. 1-9.
4. Disponible en: <http://www.mexicoforense.org/toxicologia.html> consultada el día 17 de noviembre del 2011 a la 1:00 p.m.
5. Dirección de Salud Ambiental, Subsecretaría de Regulación y Fomento Sanitario, SSA. Manual de toxicología.1993;183.
6. Tobón F. A. Aspectos Toxicodinámicos Básicos. MSc-Farmacología, Universidad de Antioquia; 2006.
7. González C, Semeszczuk N, Bellati N, Fernández G. Análisis Retrospectivo de Sustancias de Interés Médico legal. [monografía en Internet]. Universidad Nacional de Misiones; 2006 [acceso 12 de mayo del 2012]. Disponible en: http://www.unam.edu.ar//index.php?option=com_content&task=view&id=216&Itemid=123
8. Oficina del Alto Comisionado para los Derechos Humanos de las Naciones Unidas. Protocolo Modelo para la Investigación Forense de Muertes Sospechosas de Haberse Producido por Violación de los Derechos Humanos. Proyecto MEX/00/AH/10. 2001.
9. Ministerio de Justicia de Chile. Laboratorio Toxicológico Médico Legal de la Región de Tarapacá. 2004.
10. Teijeira R. Aspectos Legales de la Atención Toxicológica. [monografía en Internet]. Instituto Navarro de Medicina Legal. Clínica Médico Forense. Palacio de Justicia. Pamplona. 2003 [acceso 13 de mayo del 2012]. Disponible en: www.cfnavarra.es/salud/anales/textos/vol26/sup1/suple17a.html

11. Álvarez E, Rodríguez E, Hernández T. Sistemática utilizada en el Centro Nacional de Toxicología. Urgencia Toxicológica. 2000; 36-40.
12. Perkins A, Locani O, Lorenzo J. Drogas en Pelo: Sus Alcances y Limitaciones II. Experiencia en el Laboratorio de Toxicología y Química Legal en el Análisis del Pelo. Cuad. Med. Forense. 2005; 19-28.
13. Pascal K, Villain M, Barguil Y, Jean-Yves C, Cirimele V. Testing for Atropine and Scopolamine in Hair by LC-MS-MS alter Datura Innoxia Abuse. J. Anal. Toxicol. 2006; 454-457.
14. Gómez J. Estudio de la Correlación entre Niveles de Alcohol Etilico en Sangre y Humor Vítreo en Muestras Procedentes de Autopsias Judiciales. Rev. Toxicol. 1999; 193.
15. Locani O, Lorenzo J. El laboratorio de Toxicología y Química Legal. Cuad. Med. Forense. 2004; 127-35.
16. Contreras M, González M, Ventura R. Análisis de Morfina y Codeína en Líquido Pericárdico por Cromatografía de Gases Acoplada a Espectrometría de Masas. Rev Toxicol. 1999; 191-92.
17. American Academy of Forensic Sciences Forensic Laboratory Guidelines. [monografía en Internet]. 2006 [acceso 20 de Junio del 2012]. Disponible en: <http://www.aafs.org>
18. Repetto M, Herce C, Cameán A, Repetto G, Álvarez M, Moreno I, et al. Consideraciones sobre los Análisis de Fluidos Biológicos. Sangre y Orina de Drogadictos Vivos y Fallecidos Efectuados en 1995-1996 por el Instituto de Sevilla. Rev. Toxicol. 1997; 98-99.
19. Diario Oficial de la Federación. ACUERDO número A/002/10. 2010 [Acceso 20 de Abril del 2012]. Disponible en: http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5130194&fecha=03/02/2010

20. Restrepo M. M. El Nuevo Sistema Acusatorio. Bogotá, Colombia: Intermedio. 2005; 39.
21. Caudevilla G. F. Drogas: Conceptos Generales, Epidemiología y Valoración del Consumo. [Monografía en Internet]. Grupo de Intervención en Drogas. [Acceso 30 de noviembre del 2011]. Disponible en:
<http://www.comsegovia.com/pdf/cursos/tallerdrogas/Curso%20Drogodependencias/Drogas,%20conceptos%20generales,%20epidemiologia%20y%20valoracion%20del%20consumo.pdf>.
22. Gisbert C. "Medicina Legal y Toxiología. Barcelona: Masson; 2001.
23. Cabrera B. R, Torrecilla J, JM. Manual de Drogodependencias. Madrid: Cauce; 1998.
24. Goodman A, G. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. 8^a ed. México DF: Mc Graw Hill-Interamericana; 1991.
25. Forey K, Analytical of Drug Substances. Orlando. Academic Press Inc. 1986: (15); 151-231.
26. Anthony C. M, M David Osselton, Brian Widdop. Clarke's analysis of Drugs and Poisson's in Pharmaceuticals, Body Fluids and *Post-mortem* Material. 3^a ed. Great Britain: Pharmaceutical Press; 2004.
27. Francisco P, Meritxell T, Monografía cocaína. España; 2001: (13).
28. Leda G., Luis Alberto F. Manual de Técnicas Analíticas en el Laboratorio de Toxicología y Química Forense. Buenos Aires: Praia. 2006; 23-55.
29. Bogusz, MJ, AlthofF, H, ErkeNS M, Maier R D and Hofmann R, Internally Concealed Cocaine: Analytical and Diagnostic Aspects, J. of Forensic Science. 1995; 40,811-815.

30. Chen X., Franke J.P., Wijsbeen J., and de Zeeuw R.A. Determination of Basic Drugs Extracted from Biological Matrices by Means of Solid Phase Extraction and Wide1Bore capillary gas chromatography with Nitrogen – Phosphorus detection. *J. Anal. Toxicol.*, 18, 150, 1994.
31. Cingolani M, Cippitelli M, Froidi R, Gambaro V, Tassoni G. Detection and Quantitation Analysis of Cocaine and Metabolites in Fixed Liver Tissue and Formalin Solutions. *J. Anal. Toxicology*. 2004; (28): 16-19.
32. Eric T. Shimomura, Gwendolyn D. Honde, Buddha D. Paul. Examination of Postmortem Fluids and Tissues for the Presence of Methylecgonidine, Ecgonidine, Cocaine, and Benzoylecgonine Using Solid-Phase Extraction and Gas Chromatography–Mass Spectrometry. *Clinical Chemistry*. 2001; (47:6): 1040-1047.
33. Analysis of Pharmacologically Relevant Compounds Using GC/MSD-EL/PCI/NCI. *Compendium of Applications*. Alemania: Agilent Technologies. 2002; 25.