

50524
94



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES "ZARAGOZA"

IDENTIFICACIÓN DE COCAÍNA COMO DROGA DE ABUSO
TANTO EN MUESTRAS DECOMISADAS COMO EN
FLUIDOS BIOLÓGICOS

T E S I N A

PARA OBTENER EL TÍTULO DE :

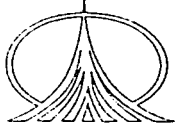
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A :

BEATRÍZ SUÁREZ MARTÍNEZ

DIRECTOR DE TESIS: M. en C. MARÍA TERESA GRISELDA FUENTES LARA.

México, 2002



A.



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.

DEDICATORIAS

A ti Dios porque haz
guiado mis pasos por un
camino lleno de luz y
Bendiciones.

A quien con indeclinable dedicación
y decidido apoyo lograron la
realización de mi carrera profesional
mis padres
Guadalupe y Francisco.

Con profundo amor
para mis dos grandes tesoros,
quienes con su apoyo y comprensión
hicieron posible la realización de uno
de mis objetivos.
Samuel e Iván.

A mis hermanos y Cuñadas por todo el cariño que me brindan:
Hugo, Rebeca, Rafael, Alfonso y Betty; Gonzalo y María; Joel y Guadalupe, y
Daniel y Araceli

A mis sobrinos para que sean firmes en sus propósitos
y no cesen en la lucha de sus ideales.
Lupita, Ricardo, Sergio
René , Rogelio, Rafael, Jorge, Bibiana, Diego , Héctor, Stephany, Daly y Yeraldí.

Con mucho cariño a mis amigas y amigos
Gloria Vázquez Núñez
Karla Hernández Mendoza
Moisés Piña Salazar
Sergio Velázquez Montero

ÍNDICE

Resumen	01
Objetivos	02
Introducción.	03

CAPÍTULO 1 CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS Y FARMACOLÓGICAS DE COCAÍNA 07

1.1. Fórmula química, peso molecular y pKa de cocaína	07
1.2. Descripción	07
1.3. Características Químicas	07
1.4. Características Físicas	08
1.5. Características farmacológicas	08
1.5.1 Farmacocinética.	08
1.5.2 Farmacodinamia	11
1.5.3 Sistema nervioso central	11
1.5.4 Sistema cardiovascular	11
1.5.5 Temperatura corporal	12
1.5.6 Toxicidad	12
1.5.7 Psicotoxicidad	14
1.5.8 Dependencia física y síntomas de supresión	14
1.5.9 Mecanismo de toxicidad	15
1.5.10 Tolerancia	15

CAPÍTULO 2 PRUEBAS PARA IDENTIFICACIÓN DE COCAÍNA EN MUESTRAS DECOMISADAS

2.1 Pruebas orientativas para identificación de cocaína	16
2.2 Pruebas para determinar la presencia de aniones asociados a la cocaína	
2.2.1 Identificación del ion cloruro	18

2.2.2	Identificación de sulfatos	19
2.2.3	Ensayo de Ferreira	19
2.3	Reacciones colorimétricas para identificación de cocaína	19
2.3.1	Reacción de Bouchardat	20
2.3.2	Reacción de Tiocianato de cobalto	21
2.3.3	Prueba de Scott	22
2.3.4	Diazoreacción de Guerbet	24
2.3.5	Reacción de Tanred	25
2.3.6	Prueba de Dragendorff	26
2.4	Cromatografía en capa fina	27
2.4.1	Sistema cromatográfico 1	27
2.4.2	Sistema cromatográfico 2	27
2.4.3	Sistema cromatográfico 3	27
2.4.4	Sistema cromatográfico 4	28
2.5	Espectrofotometría infrarroja	28
2.6	Espectrofotometría Ultravioleta	31
2.7	Cromatografía de gases	34

CAPÍTULO 3 DETERMINACIÓN DE COCAÍNA EN FLUIDOS BIOLÓGICOS

3.1	Principales muestras para el análisis toxicológico	38
3.2	Extracción de tóxicos orgánicos	40
3.3	Métodos de inmunoensayo	41

E

3.3.1	Prueba de campo Drug Check 6	41
3.3.2	Radioinmunoensayo	42
3.3.3	Fluoroinmunoensayo	42
3.3.4	Enzima inmunoensayo	43
3.4	Pruebas confirmativas	44
3.4.1	Propuesta 1. Determinación de cocaína por CG-MS	44
3.4.2	Propuesta 2. Análisis rápido de cocaína por MS	46
	Evaluación de los dos métodos propuestos para confirmación	49
	Conclusión general	50
	Referencias Bibliográficas	51

F

RESUMEN

El presente trabajo se realizó mediante una revisión bibliográfica y hemerográfica sobre los métodos para identificación de cocaína en muestras decomisadas y en fluidos biológicos.

La cocaína es una droga muy solicitada en la actualidad, esto quizá por su fácil adquisición y por su bajo costo. Lo preocupante es de que en México jóvenes de secundaria la consumen.

Es importante describir las características fisicoquímicas y farmacológicas de la cocaína, debido a que el uso de algunos métodos analíticos, requieren saber cuáles son sus metabolitos principales, su pKa, su estructura, etc.

Dentro de los métodos analíticos recopilados se menciona la importancia legal de los métodos presuntivos y los confirmativos.

OBJETIVOS

- 1.- Realizar una revisión bibliográfica sobre métodos de laboratorio que nos permitan identificar cocaína de manera específica, rápida y certera. Proporcionando esta información como una herramienta analítica en los procesos legales.
- 2.- Proponer un método confiable para determinar cocaína en fluidos y tejidos biológicos, aplicable en los laboratorios forenses.
- 3.- Evaluar dichos métodos y seleccionar el más adecuado con base a las necesidades circunstanciales.

INTRODUCCIÓN

La cocaína es un estimulante extremadamente adictivo, que afecta directamente el Sistema Nervioso Central (SNC). La cocaína ha sido llamada la droga de los ochentas y noventas por su gran popularidad y uso durante esas décadas. Sin embargo, la cocaína no es una droga nueva en realidad es una droga de las más antiguas. La sustancia química pura, el clorhidrato de cocaína se ha venido usando por más de cien años. Mientras que, las hojas se han ingerido por miles de años (11).

Entre 1884 y 1887, Sigmund Freud crea sensación entre los círculos médicos Europeos por describir sus experimentos con una nueva droga. Sigmund Freud reporta una sustancia con un potencial aparentemente ilimitado con propiedades de "excitación y alargar la euforia" esto permitió el uso de la cocaína en los tratamientos psicológicos y mentales permitiendo quitar la fatiga (8).

Freud se mostraba entusiasmado con la cocaína, una droga estimulante extraída de *Erythoxylon coca*, una planta que crece en las montañas de los Andes del Sur de América y Asia Tropical. En otro tiempo, la cocaína tuvo una amplia aplicación médica para calmar el dolor en personas con graves enfermedades, es decir se utilizó como anestésico. Sin embargo, esta función como anestésico fue reemplazada por otros medicamentos como procaína y lidocaína por ser menos susceptibles a generar dependencia (17).

La cocaína es también un poderoso estimulante del sistema nervioso central (SNC) y tiene efectos semejantes a los causados por las anfetaminas, normalmente aumentan el estado de alerta, el vigor y disminuye la fatiga, así como el aburrimiento. Comúnmente la cocaína es "sniffed o snorted" es decir

succionada por las fosas nasales y a través de las membranas mucosas de la nariz se absorbe (11).

Básicamente hay dos formas químicas de la cocaína: el clorhidrato de la sal y los cristales de cocaína ("freebase"). El clorhidrato de sal, o la forma en polvo de la cocaína, se disuelven en agua y pueden administrarse por vía intravenosa o intranasal. La base libre, se refiere a un compuesto que no está neutralizado con ácido para producir clorhidrato de sal. La cocaína base se puede inhalar. La cocaína usualmente se vende en la calle en forma de un polvo blanco, fino y cristalino que se conoce como coca, nieve, copo, golpe. Los traficantes normalmente la mezclan con sustancias, tales como maicena, talco, azúcar o con ciertas sustancias como la procaina (un anestésico local), cafeína, fenilpropanolamina, efedrina o con otros estimulantes como las anfetaminas (12).

En la actualidad la cocaína es una droga clasificada bajo la lista II ("Schedule II"), lo que significa que tiene un potencial para su abuso, pero que puede administrarse por prescripción médica con fines terapéuticos, o sea, como anestesia local para ciertos tipos de cirugía de los ojos, oídos y garganta (11).

La puerta de entrada más importante a las drogas es el tabaco, especialmente en la adolescencia. Posteriormente acceden al alcohol. El paso siguiente será para algunos las benzodiazepinas y para otros la marihuana y después la cocaína y otras drogas. Un estudio epidemiológico concluye que el 89% de los adictos a la cocaína también son dependientes de otras sustancias, especialmente alcohol y cannabis.

Las drogas de abuso, legales o no, comparten varios de sus mecanismos de acción. A través de sus efectos sobre distintos sistemas de neurotransmisión, como la dopamina, la serotonina, los péptidos opioides, etcétera. Los sujetos más vulnerables, por factores genéticos y/o adquiridos tenderán a volverse dependientes y adictos, y con frecuencia no permanecerán fieles a una droga.

El crack es el nombre callejero que se le da a los cristales de cocaína ("freebase"), al procesar la cocaína en polvo para convertirla en una sustancia que se pueda fumar.

El término "crack" se refiere al sonido crujiente que se escucha cuando se fuma esta mezcla. La cocaína "crack" se procesa con amonio o bicarbonato de sodio y agua, y se le calienta para eliminar el clorhidrato. Dado que el "crack" se fuma, el usuario siente euforia en menos de diez segundos. Debido al efecto tan rápido, casi inmediato de euforia que produce esta droga, se hizo muy popular en los años ochentas, otra razón para su popularidad es que no cuesta mucho procesarla ni comprarla (21).

Las principales formas de consumo de la cocaína son por vía oral, nasal, intravenosa y fumándola. Los términos callejeros para estos usos son el mascado, intravenosa, fumada, inhalada o resoplado. El inhalado es el proceso de inhalar el polvo de cocaína a través de la nariz, donde pasa directamente a la sangre mediante de las membranas nasales. La inyección lleva la droga directamente a la sangre aumentando así su efecto. Cuando se fuma se inhala el vapor o el humo a los pulmones, donde la sangre lo absorbe a la misma velocidad que cuando se inyecta. También, se puede aplicar a las membranas mucosas.

Algunos usuarios, combinan el polvo de la cocaína o crack con heroína para crear un "speedball".

La cocaína y sus efectos a largo plazo: La cocaína es una droga extremadamente adictiva. Una vez que un individuo, prueba la cocaína le es muy difícil predecir o controlar a que extremo continuará usándola. Se cree que los efectos adictivos y estimulantes de la cocaína son principalmente el resultado de su habilidad para impedir la reabsorción de la dopamina por las células nerviosas. El cerebro emite la dopamina como un sistema de gratificación y la misma es relacionada a las propiedades de adicción de todas las drogas de abuso (22).

Hay una cantidad enorme de complicaciones médicas, asociadas con el uso de la cocaína. Entre las cuales, se encuentra las cardiovasculares, tales como irregularidades en el ritmo del corazón y ataques cardiacos; los problemas respiratorios que causan dolores del pecho y fallos respiratorios; los efectos neurológicos que producen las embolias, convulsiones y dolores de cabeza; las complicaciones gastrointestinales que causan dolores abdominales y náuseas.

Las reacciones adversas al uso de la cocaína, fluctúan dependiendo de cómo se administran. Por ejemplo, cuando se inhala regularmente puede causar pérdida del sentido del olfato, crear hemorragias nasales, problemas al tragar, ronquera y una irritación general del tabique nasal lo que puede producir una condición crónica de irritación y secreción de la nariz. Cuando se administra vía oral puede causar gangrena en los intestinos porque reduce el flujo de la sangre.

La cocaína tiende a reducir el consumo de alimentos, por lo tanto, el uso habitual causa la pérdida del apetito, de peso y la malnutrición (21).

El efecto del etileno de cocaína en el cerebro es más prolongado y más tóxico que cuando se usa la droga por sí sola (23).

Actualmente, la droga de abuso que mayor demanda tiene para su identificación en los laboratorios de química forense es la cocaína. Cifras estadísticas reportan que en los años ochentas el consumo de cocaína fue en personas mayores de 25 años. En la actualidad el uso de la cocaína se ha ampliado y estamos hablando de que personas entre 12 y 15 años la consumen.

En el presente trabajo, se mencionan los efectos que tiene la cocaína en el humano, así como los diferentes métodos para la identificación de cocaína en muestras decomisadas y en fluidos biológicos de manera rápida, específica y certera.

CAPÍTULO 1

CARACTERÍSTICAS FÍSICAS, QUÍMICAS Y

FARMACOLÓGICAS DE COCAÍNA

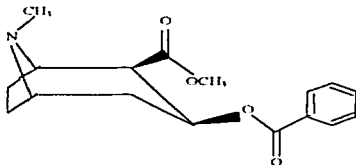
6-A

CAPÍTULO 1

CARACTERÍSTICAS FÍSICAS, QUÍMICAS Y FARMACOLÓGICAS DE COCAÍNA

- 1.1 Fórmula: $C_{17}H_{21}NO_4$
Peso molecular: 303.35
pKa: 8.61 (15°C)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Cocaína: Benzoilmetilecgonina (13)

1.2. Descripción: Cristales incoloros o polvo blanco cristalino, esponjoso, inodoro. Sabor amargo, anestésico, algo volátil y fotolábil.

1.3. Características Químicas : La cocaína es una benzoilmetilecgonina y la ecgonina es una base amino alcohólica intimamente relacionada con la

Tropina. De este modo, la cocaína es un éster de ácido benzóico y una base que contiene nitrógeno.

Tiene la estructura fundamental descrita para los analgésicos locales sintéticos (6).

La cocaína es un alcaloide obtenido de las hojas *Erythoxylon coca* y de otras especies de *Erythoxylon coca* (*Erythroxylaceae*) o por síntesis de ecgonina.

1.4. Características Físicas: Es un polvo blanco cristalino poderosamente volátil, con punto de fusión entre 96° y 98° C.

Solubilidad: Soluble 1g en 600 mL de agua, 270 mL de agua a 80°, 6.5 mL alcohol, 0.7 mL de cloroformo, 3.5 mL de éter, alrededor de 12 mL de aceite de oliva o de 80 a 100 mL de vaselina líquida; muy soluble en alcohol caliente.

1.5 CARACTERÍSTICAS FARMACOLÓGICAS

1.5.1 FARMACOCINÉTICA

Absorción, Metabolismo y Excreción

La cocaína se absorbe en todos los sitios de aplicación, incluyendo las mucosas y la mucosa gastrointestinal. Luego de su absorción, la cocaína se degrada por las esterasas plasmáticas y, por las enzimas hepáticas. Se excretan pequeñas cantidades inalteradas por la orina. La vida media de la cocaína en plasma luego de su administración por vía oral o nasal es de aproximadamente una hora (6).

La vía metabólica de la cocaína es hepática. Por hidrólisis de dos grupos ésteres se convierte en benzoilecgonina (BE), ecgonina metil éster (EME). (Fig.1).

Aproximadamente el 80% de cocaína se excreta en la orina como BE y EME y puede detectarse por un largo periodo después de haberla consumido. Por esta razón el método más común para determinar cocaína como droga de abuso es determinando por BE (14).

La cocaína se excreta poco a poco. Lo importante, es que la droga aparece invariablemente en la orina, su existencia depende del pH. En el humano entre el 1 y el 12% de la dosis de una inyección se excreta las primeras 24 horas. La excreción más abundante existe entre las primeras 5 y 6 horas (10).

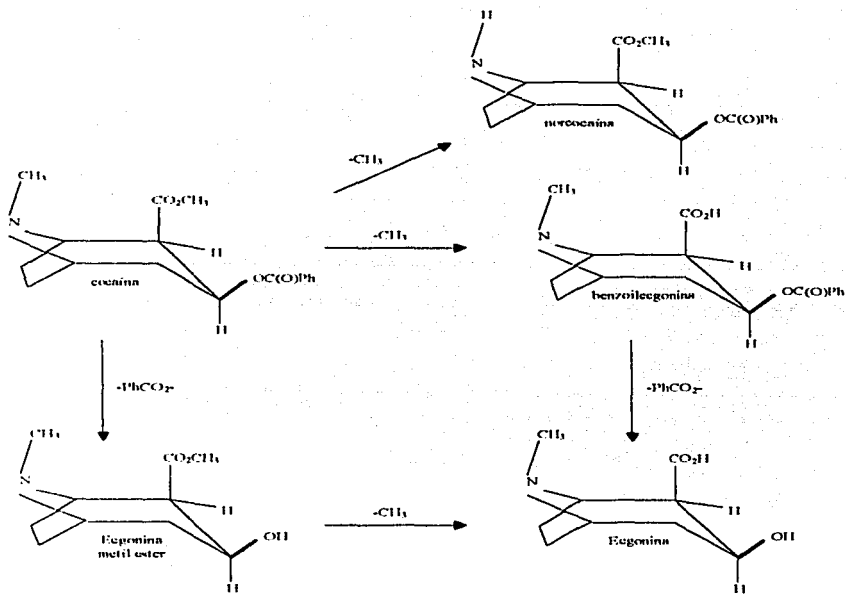


Fig. 1. Cocaína y sus principales metabolitos: Benzoilecgonina, Ecgonina Metil Éster, Ecgonina y Norcocaína.

ESTRUC CON
FALLA DE ORIGEN

1.5.2 FARMACODINAMIA

1.5.2.1 Sistema Nervioso (SN)

La acción más importante de la cocaína clínicamente es su capacidad para bloquear la iniciación o la conducción del impulso nervioso local no sistémico, su efecto sistémico más notable es la estimulación del sistema nervioso central (SNC).

En el hombre se manifiesta primero como sensación de bienestar y euforia, a veces puede aparecer disforia. Estos efectos pueden acompañarse por locuacidad, inquietud y excitación. En cantidades pequeñas de cocaína la actividad motora sigue bien coordinada, a medida que la dosis aumenta, aparecen temblores y convulsiones tónico-clónicas. Los centros vaso motor y de vómito pueden participar en la estimulación apareciendo emesis.

Después de la estimulación central viene la depresión. Eventualmente se deprimen los centros bulbares vitales y la muerte es el resultado de la falla respiratoria (6).

1.5.2.2 Sistema cardiovascular

Dosis pequeñas de cocaína administradas sistémicamente, disminuye la frecuencia cardiaca como resultado de estimulación vagal central, pero luego de dosis moderadas, la frecuencia cardiaca aumenta. Es probable que la frecuencia cardiaca sea el resultado de la mayor estimulación central simpática así como de los efectos periféricos de la cocaína sobre el sistema nervioso simpático (6).

1.5.2.3 Temperatura corporal

La cocaína es pirogénica. La mayor actividad muscular que acompaña a la estimulación de la cocaína aumenta la producción de calor, la vasoconstricción disminuye la pérdida de calor. La pirexia por cocaína es a menudo una característica notable de la intoxicación con ella y puede provocarse en animales con dosis subletales (6).

1.5.2.4 Toxicidad

La administración oral de cocaína es mucho menos tóxica que la administrada por otras vías, no más de 50 mg o 1mL de una solución al 5% aplicada por vía intravenosa o vía intramuscular, también se usa en las membranas mucosas. Es fatal una dosis alrededor de 1 y 2 gramos, puede ocurrir la muerte a dosis de 20 mL. La cocaína produce adicción por sus propiedades y presenta tolerancia hasta los 5 g. La dosis letal media (LD₅₀) por vía intravenosa en conejos 17 mg/kg y en ratas 17.5 mg/kg (10).

Los efectos tóxicos graves más comunes por cocaína incluyen arritmias cardíacas, infarto, miocarditis, insuficiencia cardíaca congestiva con volumen elevado, miocardiopatía dilatada, espasmo cerebrovascular con isquemia, neurológico transitorio o infarto cerebral o de la médula espinal, hemorragia intracerebral, disección aórtica, insuficiencia renal y hepática aguda, coagulación intravascular diseminada, convulsiones, hiperpirexia y depresión respiratoria. La cocaína produce problemas cardiovasculares y neurológicos fatales en personas jóvenes con arterias coronarias y cerebrales normales y sin antecedentes de convulsiones. Las convulsiones y la pérdida de la conciencia también pueden ser secundarias a los problemas cardíacos (6) (10).

Las mujeres que consumen cocaína durante el embarazo, tienen mayor probabilidad de tener abortos espontáneos en el primer trimestre y de presentar infarto placentario y muerte fetal hacia el final del embarazo. La ingestión de cocaína puede conducir al comienzo súbito de contracciones uterinas, taquicardia fetal y actividad fetal excesiva. También, aumenta la probabilidad de parto prematuro y hemorragia materna. Es probable que la mayor parte de la toxicidad se deba a los efectos vasoconstrictores de la droga. Además de los efectos depresores del apetito, todos los psicoestimulantes contribuyen a las deficiencias vitamínicas que son comunes entre quienes usan la droga y que junto con el escudo materno de la atención prenatal, complican más el embarazo y el desarrollo del feto, parece haber aumentado la incidencia de muerte infantil súbita entre los niños nacidos de madres dependientes de la cocaína (6).

El tratamiento de la toxicidad cardiovascular aguda inducida por la cocaína está dirigido a la reducción de los efectos excesivos de las catecolaminas y el manejo de las complicaciones. Aunque se han utilizado agentes bloqueantes beta adrenérgicos no selectivos, la estimulación vascular alfa adrenérgica sin oposición puede continuar causando hipertensión. Drogas como el labetalol, que bloquea ambos receptores adrenérgicos, alfa y beta, parecen más adecuados para la situación. Consideraciones similares abogan por el uso de labetalol para el tratamiento de la toxicidad de la anfetamina. Además, pueden ser útiles los bloqueadores de los canales de Ca^{++} , como nifedipina o nitrendipina. La nitrendipina puede reducir los efectos tóxicos agudos de la cocaína en modelos animales. La nitrendipina también parece atenuar algunos de los efectos subjetivos de la cocaína. La administración intravenosa de diazepam se ha utilizado para controlar las convulsiones inducidas por la cocaína o la anfetamina. Pueden requerirse medios físicos para prevenir la hipertemia y apoyo respiratorio. También, se indica la acidificación de la orina para acelerar la excreción de anfetaminas. Sin embargo, sólo fueron efectivos

los antagonistas selectivos de los receptores D₁ dopaminérgicos para evitar la muerte de roedores de la toxicidad de la cocaína (6).

1.5.2.5 Psicotoxicidad

Los consumidores de cocaína pueden manifestar aumento de la ansiedad pocas horas después de comenzar su uso, aún cuando los efectos de la euforia estén declinando. De igual modo, puede desarrollarse desconfianza y paranoia unas horas después de iniciar el consumo de dosis elevadas de cocaína, pudiendo establecerse una ideación paranoide total, con alucinaciones visuales, en el curso de un encuentro de 24 horas de consumo. Con frecuencia se producen cambios en la percepción y pseudoalucinaciones. Entre éstas, las más comunes son táctiles "gusanos de la cocaína" sobre la piel y visuales luces de la nieve (6).

1.5.2.6 Dependencia Física y síntomas de supresión

Después del consumo prolongado de cocaína o aún después de una embriaguez de unos pocos días de duración, la suspensión abrupta provoca síndrome de abstinencia caracterizado por depresión, ansiedad y anhelo por la droga que termina en fatiga general y una necesidad de dormir. Después del despertar inicial aparece hiperfatiga, somnolencia y depresión. El ánimo se restablece luego de un período de días, aunque la disforia puede persistir semanas en algunos casos. El anhelo por la droga puede aumentar y disminuir en las semanas posteriores, como respuesta a las emociones y a los estímulos relacionadas con la cocaína. Aunque estos signos y síntomas satisfacen los criterios para el síndrome de supresión, no se observan interrupciones fisiológicas evidentes que requieren la supresión gradual de la droga (6).

1.5.2.7 Mecanismo de Toxicidad

La cocaína interfiere con el proceso de las terminaciones nerviosas adrenérgicas de la noradrenalina. Como resultado, la acumulación de noradrenalina en los espacios sinápticos de sistema adrenérgico. Por lo tanto, la actividad simpatomimética está aumentada. La cocaína bloquea la recaptura de la dopamina e interfiere con la actividad de la serotonina (10).

1.5.2.8 Tolerancia

Se desarrolla tolerancia a algunos de los efectos centrales de la cocaína "arrebato" eufórico breve después de una sola dosis intravenosa; debe aumentarse la dosis al cabo de alrededor de una hora para experimentar efectos de igual intensidad. Así como, a los efectos de frecuencia cardíaca y la presión arterial en menor grado durante la infusión de cocaína en el curso de 4 horas; sin embargo es improbable que se logre una tolerancia significativa a sus acciones cardiovasculares, en encuestas algunos consumidores informan que necesitan más cocaína para producir los mismos efectos subjetivos (elevación del ánimo) experimentados con anterioridad (10).

CAPÍTULO 2

PRUEBAS PARA IDENTIFICACIÓN

DE COCAÍNA

EN MUESTRAS DECOMISADAS

15-A

CAPÍTULO 2

PRUEBAS PARA IDENTIFICACIÓN DE COCAÍNA EN MUESTRAS DECOMISADAS.

Existe una gran demanda para la identificación de sustancias decomisadas. Dicha identificación tanto cualitativa como cuantitativa, requiere en general de técnicas analíticas presuntivas y de confirmación relativamente sofisticadas. No obstante, son de gran ayuda los métodos de identificación preliminar, de carácter orientativo, que ayudan a dirigir la búsqueda analítica y que se pueden agrupar en:

- a) Técnicas de observación directa basada en la identificación morfológica de la muestra, que puede ser macro y microscópica. En función de la naturaleza de la muestra se seleccionará la técnica más adecuada para identificar las propiedades específicas de la muestra.
- b) Reacciones de coloración. La elección del método dependerá de la naturaleza, presentación y cantidad de la muestra. Multitud de sustancias dan lugar a una coloración cuando se mezclan con ciertos reactivos químicos. En algunas ocasiones el color puede ser específico de un compuesto, pero la mayor parte de los casos, la reacción es producida por varios compuestos clasificados en un determinado grupo en función de su estructura química. A veces la reacción la producen compuestos que no pertenecen al mismo grupo o categoría química.

El color puede variar en función de: a) Las condiciones de reacción. b) La cantidad de la muestra y c) La presencia de sustancias extrañas. Cuando la muestra contiene más de una sustancia o la droga es coloreada, se puede obtener una mezcla de colores, por lo que se

aconseja realizar una separación cromatográfica y posteriormente la reacción coloreada con los reveladores adecuados (23).

Pruebas Orientativas/Presuntivas

- a) Determinación de la presencia de aniones asociados a la cocaína
- b) Prueba de Bouchardat
- c) Tiocianato de Cobalto (cianos)
- d) Prueba de Scott
- e) Diazorreacción de Guerbet
- f) Reacción de Tanred
- g) Prueba de Dragendorff
- h) Cromatografía en capa fina
- i) Infrarrojo
- j) UV
- k) Cromatografía de gases

Prueba Confirmativa

- l) Cromatografía de gases /masas

2.1 PRUEBAS ORIENTATIVAS PARA IDENTIFICACIÓN DE COCAÍNA

Fundamento

En medicina suele usarse el clorhidrato de cocaína para producir anestesia e isquemia locales y anestesia espinal en las intervenciones quirúrgicas y estados dolorosos. Entre sus inconvenientes, cabe mencionar su toxicidad y la producción de hábito. La sobredosis de cocaína puede llevar al envenenamiento agudo, por lo que su uso está restringido por la ley. Para su identificación, se usan reactivos específicos para alcaloides como el reactivo de Bouchaerdat, prueba de Scott y la diazorreacción de Guerbet, entre otros (26).

2.2 PRUEBAS PARA DETERMINAR LA PRESENCIA DE ANIONES ASOCIADOS A LA COCAÍNA.

2.2.1 Identificación del ion cloruro

Una fracción de la solución acuosa o unos miligramos del producto, disueltos en 2 ó 3 mL de agua destilada, se tratan con una gota de solución nitrato de plata al 5%. Se forma un precipitado blanco insoluble en ácido nítrico concentrado, pero soluble en solución de amoníaco diluido, de la cual se vuelve a precipitar por adición de ácido nítrico (27).

2.2.2 Identificación de Sulfatos

Las soluciones que contienen sulfatos, dan un precipitado blanco cuando se les adiciona solución de cloruro de bario al 5%, y éste es insoluble en ácido clorhídrico.

2.2.3 Ensayo de Ferreira (formación de benzoato de metilo)

La sustancia problema se macera con unas gotas de solución de hidróxido de potasio metanólico. Si se obtiene un olor característico a benzoato de metilo indica la posible presencia de cocaína. Paralelamente se debe realizar el ensayo con cocaína de referencia.

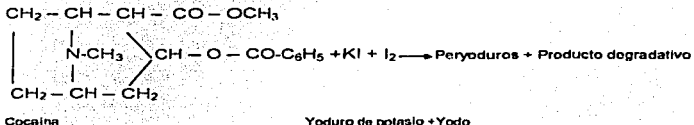
Nota: Son muy pocas las sustancias que dan un olor similar con esta prueba.

2.3 REACCIONES COLORIMÉTRICAS PARA IDENTIFICACIÓN DE COCAÍNA

Todas las reacciones colorimétricas para la identificación de cocaína son muy útiles como pruebas presuntivas, pero siempre deben ir acompañadas de pruebas confirmativas, como por ejemplo por cromatografía gases-masas.

2.3.1 Reacción de Bouchardat

Las soluciones de las sales de cocaína con el reactivo de Bouchardat dan un precipitado color pardo rojizo de peryoduros.



Material y reactivos

- 1 vaso de precipitados de 50 mL
- 1 pipeta de 5mL
- 1 gotero
- 1 mL de reactivo de Bouchardat
- 5 mL de agua destilada

Procedimiento

A una solución acuosa del problema, agregar unas gotas del reactivo de Bouchardat. En caso positivo aparecerá un precipitado pardo rojizo (26).

2.3.2 Reacción de Tiocianato de cobalto (Mathers)

Las bases orgánicas suelen formar complejos con los metales de transición como el cobalto y el radical SCN. La cocaína con el cobalto II tiocianato, produce un complejo de color azul característico que no desaparece al adicionar cloruro de estaño II.

Material y reactivos

1 Placa de prueba
2 goteros
Reactivo de tiocianato de cobalto II
Cloruro de estaño II

Procedimiento

Colocar sobre una placa de pruebas 3 gotas del reactivo tiocianato de cobalto II y adicionar unos miligramos de muestra. Observar si aparece inmediatamente una coloración azul. Si al agregar la misma cantidad de gotas de cloruro de estaño II, la coloración azul permanece, el resultado puede ser preliminar positivo para cocaína.

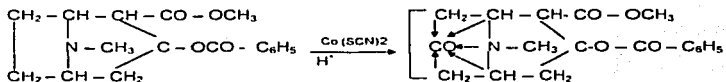
El límite de detección es de 5 microgramos, sensibilidad 97% y especificidad de 81.63% (27).

Material y reactivos

1 Placa de prueba
2 goteros
Reactivo de tiocianato de cobalto II
Cloruro de estaño II

2.3.3 Prueba de Scott (o de tiocianato de cobalto modificada)

Al tratar la cocaína pulverizada con el reactivo de Scott en medio ácido, se observa la aparición de una coloración azul debido a la formación de un complejo cobaltoso.



Cocaína

Complejo cobaltoso de cocaína

Material y Reactivos

- 1 tubo de ensaye
- 1 pipeta de 5 mL
- 1 gotero
- 1 mL de reactivo de Scott (tiocianato de cobalto II al 2% en agua)
- 1 mL de HCl concentrado
- 1 mL de cloroformo.

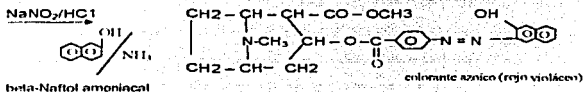
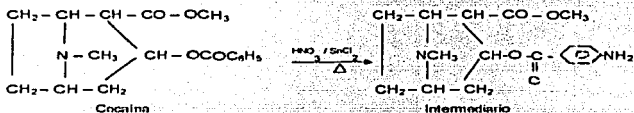
TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Procedimiento

En un tubo de ensaye que contenga muestra, agregar 7 gotas de la solución de Scott, se observará una coloración azul celeste en caso positivo, la cual nos indica la presencia probable de cocaína. Posteriormente, se agregan 2 gotas de ácido clorhídrico concentrado, en ese momento desaparece el color azul y aparece un color rosado, esto nos reitera presencia probable de cocaína. Posteriormente se agregan 1mL de cloroformo y se observan dos capas: en la superior se observará una solución transparente y en la inferior que es clorofórmica se observará un color azul con un ligero precipitado del mismo color, lo cual indica que hay presencia de cocaína. Este ensayo detecta 10 miligramos de cocaína. En la primera etapa presentan el mismo color que la cocaína, las sustancias tales como: butacaina, metapirileno, fenciclidina, dibucaina. Sin embargo, se diferencian de la cocaína en la tercera etapa, en la que únicamente en presencia de cocaína aparece el color azul en la capa clorofórmica (26).

2.3.4 Diazorreacción de Guerbet

En presencia de HNO_3 fumante y en caliente, el núcleo bencénico de la cocaína se nitra. Después de la reducción del grupo $-\text{NH}_2$ por el cloruro estanoso, después de la diaziación con NaNO_2 en presencia de HCl , la sal de diazonio obtenida se copula, en medio amoniacal con el beta naftol, obteniéndose un colorante azoico rojo anaranjado, soluble en H_2SO_4 dando una sal roja violáceo.



Material y Reactivos

- 1 cápsula de porcelana
- 1 pipeta de 5 mL
- 1 baño maría
- 1 gotero
- 1 mL de HNO_3 fumante
- 1 mL de H_2SO_4 concentrado
- 1 mL de cloruro estanoso 1/10
- 1 mL de nitrato de sodio 0.1%
- 1 mL de beta naftol a saturación en amoniaco 1/10

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Procedimiento

A una muestra de alcaloide contenida en una cápsula de porcelana añadir 2 ó 3 gotas de HNO_3 fumante, evaporar a sequedad en baño maría de 2 a 3 minutos, enfriar (la diazoación debe efectuarse en frío), adicionar algunas gotas de solución de nitrato de sodio, transcurridos de 2 a 3 minutos agregar 3 ó 4 gotas de una solución preparada en el acto, de beta naftol a saturación en amoniaco, se observará la aparición de un precipitado rojo anaranjado.

Si se adiciona 1 mL de H_2SO_4 concentrado se observará la disolución del precipitado (solución rojo violáceo). Esta reacción es muy sensible, pero no específica de la cocaína (26).

2.3.5 Reacción de Tanred

Esta reacción implica la formación de un complejo I_2Hg^{2-} . La reacción se fundamenta en la interacción entre el yodo y los grupos N^+ de los alcaloides y otras sustancias que contengan este grupo.

Material y reactivos

- 1 tubo de ensaye
- 1 gotero
- Solución reactivo de Tanred

Procedimiento

En un tubo de ensayo suspender unos miligramos de la muestra en agua destilada, agregar unas gotas del reactivo de Tanred, la aparición de un precipitado amarillo lechoso denota la presencia de alcaloides.

2.3.6 Prueba de Dragendorff (Para determinar alcaloides, morfina, heroína, etc.).

Material y reactivos

1 tubo de ensayo

1 gotero

Solución reactivo de Dragendorff

Procedimiento

Colocar unos miligramos de muestra en un tubo de ensayo con agua destilada, agregar unas gotas de reactivo de Dragendorff, un precipitado color naranja indica la presencia de alcaloides (cocaína, morfina, heroína, etc.).

Nota: La técnica colorimétrica más utilizada es la Bouchardat, dado que es la más económica y posee un alto grado de confiabilidad.

2.4 Cromatografía en capa fina

Preparación de la muestra:

Disolver 1 mg de muestra en 1 mL de metanol grado analítico y filtrar.

Parámetros de Calidad : Límite de detección: 1 microgramo. Sensibilidad: cercano al 100%. Especificidad 47%.

2.4.1 Sistema Cromatográfico No. 1

Fase móvil: Metanol, hidróxido de amonio (99:1.5).

Fase estacionaria: Silica gel HF ₂₅₄

Referencia Std : Cocaína.

Revelador: Dragendoff Spray.

2.4.2 Sistema Cromatográfico No. 2

Fase móvil: Metanol, butanol, ácido clorhídrico, éter etílico (60:40: 1.5:10).

Fase estacionaria: Silica gel HF ₂₅₄

Referencia Std: Cocaína.

Revelador: Dragendoff Spray.

2.4.3 Sistema Cromatográfico No. 3

Fase móvil: Cloroformo, acetona, hidróxido de amonio (80:50: 1.5:10).

Fase estacionaria: Silica gel HF ₂₅₄

Referencia Std: Cocaína.

Revelador: Dragendoff Spray.

2.4.4 Sistema Cromatográfico No. 4

Fase móvil: Cloroformo, metanol (90 : 10)

Fase estacionaria: Silica gel HF ₂₅₄

Referencia Std: Cocaína

Revelador: Dragendoff Spray

Nota: Las manchas pueden visualizarse a la luz ultravioleta, antes del revelado (27).

2.5 Espectrofotometría Infrarroja

La principal utilidad de la espectrofotometría en el infrarrojo, es la identificación de grupos funcionales en compuestos orgánicos, ya que los espectros correspondientes suelen tener numerosas bandas de absorción que sirven para realizar comparaciones e interpretaciones. Con excepción de los isómeros ópticos, no existen teóricamente dos compuestos que absorban exactamente igual y como consecuencia presenten el mismo espectro (15).

Preparación de la muestra

Método de disco de Haluro:

El material se pulveriza finamente, se toman 2 mg, se mezclan con el haluro alcalino, generalmente bromuro de potasio (200 mg), se tritura finamente en mortero, y por compresión se obtiene una pastilla delgada casi transparente.

La técnica se suele denominar "método del disco de bromuro de potasio". El cloruro de potasio también se puede usar y se considera superior al bromuro de potasio, porque es menos higroscópico. El haluro usado debe ser grado reactivo

para índice de refracción (IR), secado a 105° C mínimo durante una hora, y almacenando en desecador.

Si se procede con cuidado la pastilla puede guardarse indefinidamente, y la sustancia puede recuperarse de la tableta para futuros ensayos. Por eso, cuando se recibe una pequeña cantidad de la sustancia y se hace el análisis infrarrojo, se recomienda guardar la pastilla debidamente marcada (27).

Valores de referencia del espectro infrarrojo

Los valores de referencia de longitudes de onda en nm de los principales picos de la cocaína son: 1712, 1740, 1276, 1112, 716, 1036. (Fig. 2 y Tabla 1)

Picos	Grupo funcional
1712	Éster saturado cíclico
1740	Éster saturado acíclico
1276	Amina terciaria
1112	Alargamiento C-O del grupo éster
716	Anillo aromático
1036	Enlace carbono-nitrógeno

Tabla 1. Representa los grupos funcionales que coinciden con la aparición de picos en el espectro infrarrojo.

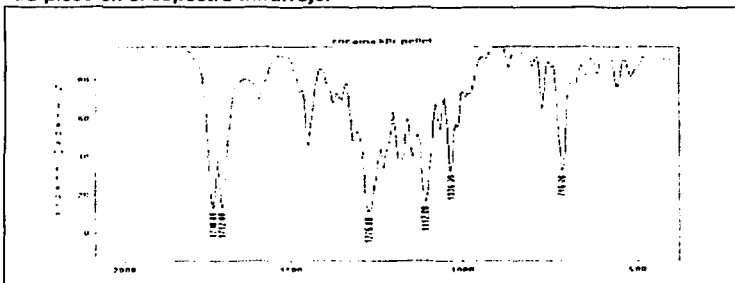


Fig.2 Se observan las diferentes longitudes de onda a las cuales absorben los grupos Funcionales correspondientes a cocaína.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2.6 Espectrofotometría Ultravioleta

Procedimiento

Disolver, en un tubo de ensayo, una pequeña cantidad de muestra en ácido sulfúrico y/o etanol, filtrar y correr el espectro en un rango de 200 a 320 nm (Fig.3).

- En ácido sulfúrico 0.1 N: Máximos a 233 y 275 nanómetros
- En etanol: Máximos a 230, 274 nm

Condiciones del equipo

Rango	200 – 300 nm
Intervalo	1
No. De ciclos	1
Velocidad de scan	480
Smooth	2
Valor mínimo	0
Valor máximo	1

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

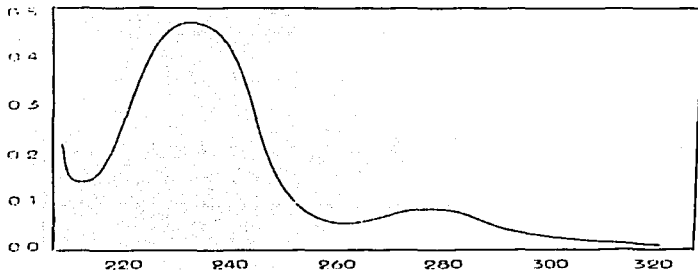


Fig. 3 Espectro de absorción ultravioleta de cocaína con un máximo de 233 nm.

Análisis Cuantitativo

Reactivos

Ácido sulfúrico 0.1 N

Cocaína clorhidrato (sustancia de referencia).

Procedimiento para realizar la curva de calibración

A partir de una solución madre de cocaína de 40 ppm (base o clorhidrato) en ácido sulfúrico 0.1 N, preparar soluciones de cinco niveles de concentración de 1, 5, 10, 16 y 20 ppm de la siguiente manera:

- 1) Disolver 10 mg de cocaína base en 250 mL de ácido sulfúrico 0.1 N para obtener una solución de 40 ppm (solución madre).
- 2) De la solución anterior tomar 5 mL, llevar a 10 mL con ácido sulfúrico 0.1 N para obtener una solución de 20 ppm. Leer la absorbancia a 233 nm.
- 3) De la solución tomar 5 mL y llevar a 10 mL con ácido sulfúrico 0.1 N para obtener una solución de 10 ppm. Leer la absorbancia a 233 nm.
- 4) De la solución anterior tomar 5 mL y llevar a 10 mL con ácido sulfúrico 0.1 N para obtener una solución de 5 ppm. Leer la absorbancia a 233 nm.
- 5) De la solución madre de 40 ppm tomar 10 mL y llevar a 25 mL con ácido sulfúrico 0.1 N, para obtener una solución de 16 ppm. Leer la absorbancia a 233 nm.
- 6) Gráficar absorbancia contra concentración (de todos los niveles).

Procedimiento para determinar la concentración de cocaína en la muestra

A.) Si se tiene curva de calibración:

- Identificar si la sustancia es cocaína base o clorhidrato.
- Preparar una solución de 20 ppm de la muestra problema en ácido sulfúrico 0.1N.
Leer la absorbancia a 233 nm e interpolar en la curva de calibración.

Parámetros de calidad del método

Sensibilidad: 97.5 %

Especificidad: 97.5 %

Límite de detección teórico: 0.040 mg

Límite de detección experimental: 0.0396 mg

Límite de cuantificación teórico: 0.07267 mg

Límite de cuantificación experimental: 0.07102 mg

B) Si no se tiene curva de calibración

Preparar una solución de 20 ppm tanto de la muestra problema como del estándar en ácido sulfúrico 0.1 N. Usar como blanco ácido sulfúrico 0.1 N.
Leer la absorbancia a 233nm.

Absorbancia problema / Absorbancia estándar X 100 = % de cocaína en la muestra.

Valores de referencia

Para una solución de 10 ppm de cocaína en ácido sulfúrico 0.1 N, la literatura reporta un valor de absorbancia de 0.43 a 233 nm, ($A^{1}_{1} = 43$)

Precisión: El coeficiente de variación o desviación estándar relativa (% RSD) menor del 5%.

Repetitividad: D.E = 0.01170

Coefficiente de Variabilidad (C.V) = 2.65%

Linealidad / Rango: De 1ppm a 20 ppm

Robustez/Solidez: C.V = 2.5%

2.7 Cromatografía de Gases

Después de las pruebas presuntivas la cromatografía de gases en drogas de abuso, debe ser una técnica rutinaria ya que se considera una técnica de identificación específica.

La separación del analito se lleva a cabo por un proceso de partición entre la fase móvil y la fase estacionaria, así mismo, la temperatura es importante la cual dependerá de la polaridad y volatilidad de la muestra.

Determinar el tiempo de retención de la cocaína en el sistema cromatográfico
PE – 8420

Muestras

- Sólidas: Basta una pequeña cantidad (aproximadamente 100 mg) para el análisis.
- Líquidas: Soluciones no acuosas, por ejemplo, un disolvente orgánico (cloroformo) que contengan cocaína en solución.

Equipo de laboratorio

- Cromatógrafo de gases con inyección de división de flujo y columna capilar de 12 metros, 0.25 mm de diámetro interno, con fase estacionaria 100% metilsilicona.
- Microjeringa de 1 a 5 microlitros en caso de que el cromatógrafo no cuente con autoinyector.
- Sistema de manejo de datos cromatográficos.
- Generador de hidrógeno.
- Base de datos: Estación de cromatografía de gases con integrador y procesamiento automático.

Preparación de sólidos

Solución de Cocaína Clorhidrato como muestra de referencia

Pesar 10 mg de Cocaína clorhidrato y llevar a 10 mL, en matraz aforado, con metanol grado reactivo analítico.

Muestra Problema

Pesar 10 mg de Cocaína clorhidrato y llevar a 10 mL, en matraz aforado, con metanol grado reactivo analítico.

Procedimiento

Condiciones Cromatográficas:

- Temperatura del inyector: 220° C
- Temperatura de la columna: 200°C durante 5 minutos, rampa de 30°C por minuto hasta 280°C durante 13 minutos.
- Temperatura del detector: 320°C
- Tiempo de corrida: 25 minutos
- Presión del gas de arrastre (He): 10 psi
- Presión de aire: 22 psi
- Presión de hidrógeno: 15 psi
- Presión del gas auxiliar (make-up): 10 psi
- Modo de inyección con división de flujo 10:1

Injectar 1 microlitro de metanol como corrida de limpieza. Después de finalizar la corrida anterior y verificar la limpieza de la jeringa y estabilidad de la columna, inyectar 1 mL de solución estándar de cocaína al 0.1% m/v. Verificar el tiempo de retención para cocaína y el área correspondiente.

- Tiempo de retención promedio $x = 8,298$ minutos
- Desviación estándar $s = 0,021$
- Desviación estándar relativa $RSD = 0,247$
- Área de pico promedio $a = 8108$
- Desviación estándar $Sa = 360$
- Desviación estándar relativa $SDa = 4,5\%$
- Altura de pico promedio $h = 1238$
- Desviación estándar $Sh = 55$
- Desviación estándar relativa $RSDh = 4,4\%$

Nota: Por comodidad se toman los resultados con dos cifras significativas solamente.

Los tiempos de retención pueden variar si cambian algunas de las condiciones del método. En la actualidad se trabaja con una presión del gas de arrastre de 9 psi, con lo que se tiene un tiempo de retención para la cocaína de 9.6 minutos.

Como se puede observar en el cromatograma de la Figura 4.

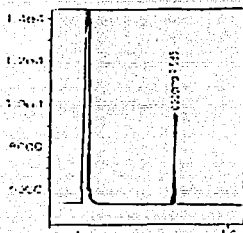


Fig. 4 Cromatograma donde se observa un pico con tiempo de retención de 9.585 aproximadamente a los 9 minutos correspondientes a cocaína.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CAPÍTULO 3

DETERMINACIÓN DE COCAÍNA

EN FLUIDOS BIOLÓGICOS

37-A

CAPÍTULO 3

DETERMINACIÓN DE COCAÍNA EN FLUIDOS BIOLÓGICOS

Los dos metabolitos principales de cocaína que se encuentran en fluidos biológicos son: benzoylecgonina (BE) y ecgonina metil éster (EME). La mejor determinación para BE es con el inmunoensayo comercial screening designado para detección de BE. La EME se determina mejor en screening de cromatografía de gases (9).

3.1 MUESTRAS PARA EL ANÁLISIS TOXICOLÓGICO

Las muestras (fluidos biológicos) usadas con mayor frecuencia son: orina, sangre contenido gástrico y muy rara vez humor vítreo y bilis (Tabla 2). A continuación se describen algunas consideraciones que hay que tener en cuenta para cada una de ellas.

Identificación de cocaína como droga de abuso tanto en muestras decemizadas como en fluidos biológicos

Tipos de fluidos	Ventajas	Desventajas
Orina	<p>*La concentración del tóxico puede llegar a ser 100 veces mayor que en sangre.</p> <p>*Generalmente contiene concentraciones detectables de tóxicos.</p> <p>*Exenta de proteínas.</p> <p>*Se obtiene fácilmente y en cantidades suficientes.</p>	<p>*Muchos tóxicos se eliminan por esta vía.</p> <p>*Si la muerte se produce rápidamente p.ej. inyección de un analgésico narcótico o por inhalación de ácido clanhídrico, la detección del tóxico o su metabolito será imposible.</p>
Sangre	<p>*Muy útil para análisis cuantitativos.</p> <p>*Se utiliza para el screening de tóxicos ácidos y neutros, cuyas concentraciones en caso de intoxicaciones son elevadas.</p> <p>*Para el estudio de gases y sustancias volátiles.</p> <p>*La mayor parte de los tóxicos van disueltos en el plasma o unidos a proteínas.</p>	
La Bilis	<p>*Útil para sustancias que eliminan por vía biliar</p> <p>*Muy útil en las muertes por sobredosis de opiáceos, por su alto contenido de glucoronidos del opio.</p>	<p>* Cuando el cuerpo esta en avanzado estado de descomposición es difícil determinar la concentración del tóxico.</p>
Humor Vitreo	<p>*Fácil accesibilidad.</p>	

Identificación de cocaína como droga de abuso tanto en muestras decomisadas como en fluidos biológicos

	<ul style="list-style-type: none">*Se obtienen 2 mL de cada ojo.*No contiene demasiadas proteínas*Contiene pocas enzimas.*Es más resistente a la contaminación microbiana.*Muy útil para el análisis de alcohol y otras drogas.	
--	---	--

Tabla 2. Algunas Ventajas y Desventajas de Muestras Biológicas.

3.2 Extracción de Tóxicos orgánicos

A estas sustancias las podemos clasificar en dos grandes grupos:

1. Ácidos débiles (barbitúricos) o fuertes (salicilatos), unos y otros extraídos con disolventes orgánicos en medio ácido.
2. Básicos: extraídos con disolventes orgánicos en medio básico (alcaloides, antidepresivos tricíclicos, etc.).

Cada una de las fracciones obtenidas ya pueden someterse al correspondiente análisis. En caso de muestras complejas (visceras), este proceso iría precedido de la consiguiente precipitación de proteínas. Por otra parte, dado que muchos tóxicos se encuentran en los medios biológicos conjugados con ácido glucorónido u otros componentes, puede ser necesario someter las muestras a una hidrólisis previa a la extracción, con objeto de facilitar la detección de dichos tóxicos. La hidrólisis puede ser química (tratamiento con ácido clorhídrico en caliente) o enzimática (beta glucuronidasa), aumentando así la recuperación de los tóxicos como la morfina, cannabis, fenotiacinas, etc., aunque puede ser perjudicial para algunos tóxicos lábiles, como la atropina y cocaína (15).

3.3 MÉTODOS DE INMUNOENSAYO

FUNDAMENTO QUÍMICO GENERAL

Se basa en reacciones de competencia entre antígeno y anticuerpo.

3.3.1 PRUEBA DE CAMPO DRUG CHECK 6™

Es un inmunoanálisis cualitativo a través de tiras reactivas, en el cual la droga y sus metabolitos en una muestra de orina, compiten con la conjugación inmovilizada de la droga por sus sitios limitados de anticuerpos, marcados en la tira reactiva. Utilizando anticuerpos que son específicos a diferentes tipos de drogas, las pruebas permiten un análisis independiente y simultáneo de cinco drogas con una sola muestra. El tiempo aproximado de reacción es de 5 minutos.

En el procedimiento de análisis, la orina se mezcla con la conjugación de tinta-anticuerpo y migra a lo largo de una membrana porosa. Cuando la concentración de una droga dada, está por debajo del límite de detección de la prueba, la conjugación de tinta-anticuerpo libre se enlaza a la conjugación de antígenos inmovilizada en la membrana, produciendo una línea de color rosa en zona de prueba apropiada para esa droga. A la inversa, cuando el nivel de la droga está en límite de detección sobre éste, la droga libre compete con la conjugación de antígeno inmovilizada en la membrana enlazándose a la conjugación de tinta-anticuerpo, formando un complejo de anticuerpos y antígenos, que impide el desarrollo de una línea de color rosa.

Sin importar los niveles de droga en la muestra, una línea de color rosa es producida en cada zona de control por una reacción inmunológica paralela.

Estas líneas sirven como medidas incorporadas de control de calidad, demostrando el reconocimiento de anticuerpos, verificando que los reactivos estén químicamente activos (25).

3.3.2 RADIOINMUNOENSAYO

Radioinmunoensayo (RIA) tiene la propiedad de detectar drogas en fluidos biológicos usando anticuerpos específicos de la droga y/o sus metabolitos. Varias marcas radiactivas son usadas como señal en presencia de drogas. La vida común aproximada del kits RIA es de aproximadamente 2 meses, significativamente corta en comparación con otros kits de inmunoensayo. La señal radiactiva tiene un rango amplio que hace de este ensayo uno de los métodos más sensibles para detección de drogas. Existen restricciones y disposiciones legales para la adquisición o compra de estos kits, ya que son materiales peligrosos por ser radioactivos. Históricamente el RIA es una de las primeras técnicas de inmunoensayo usadas para la detección de drogas de abuso y comercialmente disponible en kits (Abuscreen, Roche laboratories, Nutley, NJ; CON-DoA, Diagnostic Products, Los Angeles, CA; Direct RIA, Amersham, Artintong Heights, IL) (1) (2) (3).

3.3.3 FLUOROINMUNOENSAYO

La técnica de (FPIA) Fluorescencia de Polarización de Inmunoensayos desarrollada por Colbert y colaboradores emplean anticuerpos para la identificación de barbitúricos, anfetaminas y cocaína mediante un ingenioso método homogéneo en el que se usa sólo un reactivo. Este método es preciso y confiable para determinar desde el ensayo los diferentes valores de corte en comparación con otros métodos.

Comercialmente la aplicación de FPIA (TDx, Abbott Diagnostic, North Chicago, IL) se usa para la detección de drogas de abuso, es relativamente nueva y sencilla. Este ensayo, tiene buena aplicación solamente en un tipo de instrumento automatizado que generalmente es prestado por la casa comercial que vende el producto.

3.3.4 ENZIMA INMUNOENSAYO

Enzima inmunoensayo (EIAs), está considerada entre las más sencillas pruebas inmunológicas para detectar los metabolitos de las drogas de abuso en fluidos biológicos. La técnica de enzima inmunoensayo (Emit, Syva Company, Palo Alto, C.A), se usa como prueba inicial, es altamente sensible y específica para diferentes clases de drogas o para un ensayo o muestra en particular. Enzima inmunoensayo son comercialmente las más utilizadas en pruebas para la detección de drogas de abuso en muestras de orina, se usa una pequeña cantidad de muestra. Las muestras de orina son analizadas mediante el reactivo EMIT^R std- cocaína. Puede emplearse otro reactivo llamado EMIT^R ETS. Estas pruebas de (EIAs) han sido evaluadas en numerosos estudios en la última década (5).

Se basa en que cuando se adicionan los reactivos a la muestra, el anticuerpo unido a la droga es reconocido por una enzima específica y esta enzima unida a la droga se combina con el anticuerpo remanente en los sitios de unión, bajando así la actividad de la enzima. La cantidad de la enzima que queda sin unir permanece activa en la mezcla de reacción, la actividad de esta enzima residual, está directamente relacionada con la concentración de la droga en la muestra. La actividad de la enzima transforma a la Nicotinamida-Adenin-Dinucleótido (NAD) a Nicotinamida-Adenin-Dinucleótido en forma reducida (NADH), provocando esto un cambio de absorbancia.

Comparando este cambio de absorbancia con el de una muestra conocida que contenga el metabolito de la droga, se puede determinar la presencia de la misma en la muestra.

3.4. PRUEBAS CONFIRMATIVAS POR EXCELENCIA

La prueba confirmativa por excelencia es la cromatografía de Gases /Acoplada a masas

3.4.1 Propuesta 1. Determinación de cocaína por CG-MS

Después de una hidrólisis ácida para la liberación de cocaína usando como disolvente de extracción una mezcla de éter dietílico-isopropanol (90:10 v/v) a pH neutro (7). La detección se efectúa mediante CG/MS con extractos derivados de Metil Sulfato Trifluoro Acetamida (MSTFA) y N-metil bis (trifluoro acetamida) (MBTFA). Bajo las siguientes condiciones Cromatográficas:

CG (HP 6890) acoplado a espectro de masas (HP 5973).

Columna: HP1 de 25 m x 0.2 mm DI x 0-11 μ m EP.

Flujo en columna: 0.4 mL/minuto.

Presión: 10.8 (presión constante)

Temperatura del inyector: 280°C (modo split)

Modo de inyección Split (1:10)

Modo SIM (con los iones indicados en la tabla 3)

Solvente delay: 2.6 minutos

Temperatura auxiliar: 290°C

Temperatura del horno: 160°C (0.90 min) -7°C/min - 250°C (1.3 min) - 20°C /min - 300°C (9.99 min)

Tiempo de corrida de 27.50 min.

Se deben observar picos correspondientes a los tiempos de retención indicados en la Tabla 3 de los compuestos de interés.

Compuesto	Tiempo de retención
Cocaína	9.79
Ecgoninametilester	3.45
Benzoilecgonina	10.82

Tabla 3. Tiempos de retención de cocaína y sus metabolitos

En el análisis espectral se observan los iones característicos de cocaína y sus metabolitos (Tabla 4).

Identificación de cocaína como droga de abuso tanto en muestras decominadas como en fluidos biológicos

Compuesto de interés	Ion molecular	Ion base	Ion secundario
Cocaína	303	82	182
Benzoilecgonina	361	82	240
Ecgonina metil éster	182	82	96

Tabla 4. Iones característicos.

Nota: Para observar los picos cromatográficos a los tiempos de retención indicados de los compuestos buscados, es necesario cumplir las condiciones cromatográficas de espectrometría de masas indicadas anteriormente.

3.4.2 Propuesta 2: Análisis Rápido de Cocaína por MS*.

El análisis rápido por Espectroscopia de Masas (Rápido-MS) es una nueva técnica que trabaja muy bien con la trampa ionica del sistema Saturno del Cromatógrafo de Gases-Espectroscopia de Masas (CG/MS). La separación puede efectuarse diez veces más rápido de lo que se hace normalmente. El concepto de Rápido-MS permite la separación bajo presión reducida, permitiendo el uso de columnas cortas bajo una velocidad óptima de 90-100 cm/s El resultado es un análisis en corto tiempo y un incremento en la sensibilidad, debida a la rápida elusión de los componentes. Las columnas del análisis de Rápido-MS pueden usarse en todas las técnicas de inyección y no necesitan diferentes habilidades del analista, como en las columnas capilares en el sistema Saturno (Tabla 5).

TPSIS CON
FALLA DE ORIGEN

Identificación de cocaína como droga de abuso tanto en muestras decomisadas como en fluidos biológicos

Técnica:	GC-Rápida-MS
Columna:	CP-Sil 8 CB de bajo sangrado/MS de sílica fundida WCOT 10 m X 0.53 mm ϕ 0.25 μ m
Temperatura:	65°C (1.5 minutos) \rightarrow 250°C, 18°C/min
Gas acarreador:	Helio 120 Kpa (1.2 bares, 17 psi)
Injector:	Sin división, Temperatura 250°C
Detector:	Varian Saturno 2000 GC/MS Temperatura 250°C
Volumen de inyección:	1.0 μ L
Rango de concentración:	de 1 μ g/ μ L
Solvente de la muestra:	Hexano
Cortesía de:	B. Baars, Laboratorio de aplicaciones de Varian Middelburg, Holanda.

Tabla 5. Condiciones para la técnica GC-Rápida -MS

- Patente Pendiente:

Bajo estas condiciones se identifican picos mostrados en el cromatograma Fig. 5.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Identificación de Picos:

1. Cocaína
2. Benzoilecgonina-TMS
3. Codeína-TMS
4. Desconocido
5. Heroína-TMS

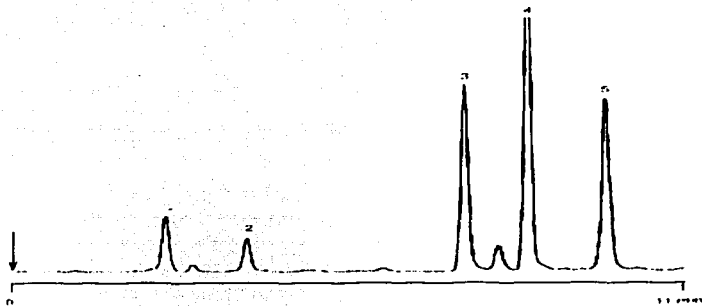


Fig. 5 Cromatograma donde se muestran los picos obtenidos de 1. Cocaína, 2. BE, 3. Codeína, 4. Desconocido y 5. Heroína.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Evaluación de los dos métodos propuestos para confirmación

Las técnicas confirmativas por CG-MS propuestas, difieren en el procesamiento de la muestra ya que una nos presenta la extracción líquido-líquido, donde se requieren habilidades minuciosas del analista y además gasto de disolventes y reactivos.

En el caso de la segunda propuesta, se trata de una técnica de extracción de fase sólida donde la elusión de los componentes es rápida por la velocidad usada de 90-100 cm/s, por lo que, no se requiere que el analista tenga experiencia en el manejo de columnas capilares.

Se dejan abiertas las propuestas metodológicas, para que se ajusten a las necesidades de quien las consulte.

Conclusión General

Se logró recopilar la información metodológica y analítica para la identificación de cocaína en muestras sólidas o en fluidos biológicos; que tiene como objeto, servir de apoyo para quien en algún momento esté interesado en realizar prácticamente los procedimientos, para detectar cocaína, ya sea como droga de abuso (en muestras decomisadas) o la detección de los metabolitos de la cocaína en fluidos biológicos, así como para validar, verificar y optimizar las técnicas aquí descritas.

Referencias Bibliográficas

1. Rosenstock L, Cullen MR. Routine urine testing for evidence of drug abuse in workers- the scientific ethical and legal reasons not to do it . J Gen intern M ED 1987. 2, 135-7
2. Hoffman A, Silvers J, eds. Sleal this urine test fighting drug hysteria in America New York. Penguin Books.1987. 60 -63
3. O' Connor JE, Rejent RA. EMIT and RIAhigh volumen test procedures for THC metabolites in urine GC/MS confirmation , J Anal Toxicol 1986.10, 178-80.
4. Cobert DL, Smith DS, Landon J,Sidki AM. Single reaction Polarization flouorinmunoassay for the cocaine metabolite, benzoylecgonine in urine. Ann clin Biochem 1986. 23, 37-41.
5. Bogusz, M.J., Althoff, H., Erkens, M., Maier,R.D., and Hofmann, R., "Internally and Diagnostic Aspects" Journal of Forensic Sciences, JFSCA, Vol. 40, No. 5, September 1995. 811-815.
6. Goodman y Gilman "Bases farmacológicas de la terapéutica". Ed. Panamericana Octava edición 1994 313,314,321,323, 529, 531 - 534,554, 1616
7. Miller, N.S.; Gold, M.S; Klahr, A.L., "The Diagnosis of alcohol and cannabis dependence (addiction) in cocaine dependence (addiction)", Int. J. Addict., 1990 Jul, 25 (7) 735-744.
8. Murakami CS, Ross BK. Local anesthesia in facial plastic surgery. In Cummings C.W, Fredrickson JM, et al., eds. Otolaryngology - Head and Neck Suergery, St. Louis: Mosby - Year Book 1993. 468.
9. Ramcharitar, V., Levine, B., and Smialek, J.E., "Benzoylecgonine and Ecgonine Metil Ester Concentrations in urine Specimens," Journal of Forensic Sciences, JFSC, Vol. 40 No.1, January 1995. 99-101.

10. E.G.C. Clark "Isolation and identification of Drugs" 2a; The Pharmaceutical Press, England, 1986. 29,489,490.
11. Bueno José A, Sabanés Francisco, Salvador Luis ,Gascon José "Psicofarmacología Clínica" Salvat 1985. 291.
12. Neal L, Benowitz MD "Poison and Drug" Overdose 1ª Associate Edit, Charles E, Becker MD.1991. 127-129.
13. The Merck Index An Encyclopedia of Drugs and Biologicals 20ª ed, 1996, Merck & Co., USA. 2517 y 2518.
14. Jenkins AJ, Goldberger BA. "Identification of unique cocaine metabolites and Smoking by-products in postmortem blood and urine specimens. J Forensic Sci 1997. 42(5):824-827.
15. Conley R.T "Espectroscopia Infrarroja" ed, Alambra España 1979.
16. Villanueva E, Cañadas A, Martínez PLA. "Investigación Toxicológica" En Medicina Legal y Toxicología. J.A Gisbert Calabuig, 4ª ed Masson Salvat 578-581.
17. Vargas E.A. "Medicina Forense y Deontología Médica" Trillas, México 1991. 792-796.
18. Suzanne Loebl, George Spratto, Ph.D. Limusa México 1986, 481
19. Dreisbach R.H y Roberson W.O "Manual de Toxicología Clínica" 6 ed Manual Moderno. México 1988. 280-287.
20. Gossel Thomas A. Bricker J.Douglas. ed Raven Press New York 1990. 324-325
21. Tello Flores F.J. "Medicina Forense" ed Harla 1 México 1991. 302-304
22. R.G. Smart. "Crack" cocaine use in Canada: A new epidemic? Am. J.Epidemiol.,(1988).127: 1315-1317
23. NIDA (<http://www.nida.nih>)
24. NCADI (<http://www.health.org>)
25. Bertram G. Katzung "Farmacología Básica y Clínica ed El manual moderno, S.A de C.V. 2 México 1986, 97
26. Diinsel (<http://www.diinsel.com/report.html>)

27. Martínez Peñuela Ma. Del Carmen "Manual de Prácticas de Laboratorio de Toxicología" Unidad Docente Interdisciplinaria y Ciencias Químicas. Xalapa, Veracruz. 1987, 74-79.
28. Manual de Procedimientos de la Procuraduría General de la Justicia, 2000.

Referencias Bibliográficas Recomendadas

29. Villanueva E, Cañadas A, Martínez PLA. "Investigación Toxicológica" En Medicina Legal y Toxicología. J.A Gisbert Calabuig, 4ª ed Masson Salvat 578-81.
30. Maceij J. Bogusz, M.D.; Helmut Althoff, M.D.; Manfred Erkens, Ph. D.; Rolf-Dieter Maier, Ph.D; and Rainer Hofmann, M.D. "Internally Concealed Cocaine: Analytical and Diagnostic Aspects" Journal of Forensic Sciences, JFSCA, Vol. 40, No.5, September 1995, pp.811-815.
31. Ramcharitar, V., Levine, B., and Smialek, J.E., "Benzoylcegonina and Ecgonine Methyl Ester Concentrations in urine Specimens" Journal of Forensic Sciences, JFSCA, Vol.40, No. 1, January 1995, pp 99-101.
32. Moriya, F. And Hashimoto, Y., "The effect of Postmortem Interval on the Concentrations of Cocaine and Cocaethylene in Blood and Tissues: An Experiment Using Rats. Journal of Forensic Sciences, JFSCA, Vol 41, No.1 January 1996, pp. 129-133.
33. Moore, J. M. and Cooper, D.A., "The Applications of Capillary Gas Chromatography-Electron Capture Detection in the Comparative Analyses of Illicit Cocaine Samples," Journal of Forensic Sciences, JFSCA, Vol.38, No. 6, November 1993, pp.1286-1304.

34. Hall BJ, Parikh AR, Brodbelt JS. "Aqueous phase hexylchloroformate derivatization And solid phase microextraction: Determination of Benzoylcegonina in Urine by GasChromatography-Quadrupole Ion Trap Mass Spectrometry. J Forensic Sci. 1999; Vol.44 (3): 527-534.
35. Moriya, F. And Hashimoto, Y., "Postmortem Stability of Cocaine and Cocaethylene in blood and Tissues of Humans and Rabbits." Journal of Forensic Sciences, JFSCA, Vpl.41, No.4, July 1996, pp. 612-616.
36. Stanley G. Korenman Jack D. "Barchas Biological Basis of Substance Abuse" New York. Oxford University Press. 1993, 165-181.
37. Bertram G. Katzung, "Farmacología Básica y Clínica" El Manual Moderno S.A. de C.V. 1986 2ª Edición, 252-259.
38. Kidwell, D. A., "Analysis of Phencyclidine and Cocaine in Human Hair by Tandem Mass Spectrometry," Journal of Forensic Sciences, JFSCA, Vol. 38, No. 2, March 1993, pp. 272-284
39. Espinosa Delgado Paula, Álvarez Vega David, "Seminario Sobre Control de Dopaje "Procedimiento de Análisis de Detección, Confirmación y en su Caso Cuantificación de Sustancias Nitrogenadas, Excretadas libres y Conjugadas, Madrid,1999, pp. 1-10.
40. Gerlits,J., "GC/MSQuantitation of Benzoylcegonine Following Liquid-liquid Extration of Urine", Journal of Forensic Sciences, JFSCA, Vol. 38 No. 5 September 1993, pp. 1210-1214.
41. Marcel Dekker All Ringts Resewed, "Recent Developments in Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology " , Edited Irving Sunshine, Palo Alto California1992, pp. 565-572.
42. Kim L. Kelly, " The Accuracy and Reability of Test for Drugs of Abuse in urine Samples ". Vol. 8 No. 5 ,1998, pp. 263-273.