



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
ZARAGOZA

***Diseño de un método para identificar y  
cuantificar cocaína en sangre,  
por HPLC/MS.***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A:

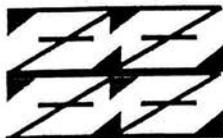
***ROSENDO BASABE CALDERÓN***

DIRECTOR DE TESIS: M. en C. VICENTE JESÚS HERNÁNDEZ ABAD.

MÉXICO, D.F.

2004

UNAM  
FES-Z



Lo humano  
eje  
de nuestra reflexión



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## AGRADECIMIENTOS.

A **DIOS**, porque creamos en él o no nunca, nunca debemos olvidarlo.

A mis **padres**, por todos los sacrificios, apoyo y confianza que tuvieron en mí.

A mis **hermanos**, por todo el apoyo incondicional en todo momento.

A mi **novia Lucia**, por el cariño y ternura que mostró durante todo este camino.

A mis **maestros y sinodales**, por su valiosa sabiduría que nos transmiten a lo largo de nuestro paso por la universidad.

A mis **amigos y compañeros**, porque gracias a ellos este largo camino no fue tedioso, sino que en todo momento nos animábamos unos a otros para no caer en la rutina.

A la **universidad**, por el gran apoyo que brinda a todo aquel que se acerca a ella.

En general gracias a todos por su gran apoyo y enseñanza ya que sin estas características mostradas para conmigo, el alcanzar esta meta hubiera sido más difícil, me han enseñado como andar este camino que apenas empieza...

**GRACIAS.**

## ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN.....	3
II.	OBJETIVOS.....	4
III.	ANTECEDENTES TEÓRICOS DE LA COCAÍNA.....	5
	A. Historia.....	5
	a. Dependencia física.....	10
	B. Propiedades fisicoquímicas.....	11
	a. Relación entre estructura y actividad.....	12
	C. Farmacología.....	13
	a. Mecanismo de acción y efectos.....	13
	b. Toxicidad.....	17
	D. Farmacocinética.....	18
	a. Biodisponibilidad.....	18
	b. Biotransformación.....	20
	c. Concentraciones en plasma.....	23
	d. Excreción.....	24
IV.	TÉCNICAS ANALÍTICAS.....	25
	A. Preparación de la muestra.....	25
	B. Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR o HPLC).....	26
	a. Equipo.....	27
	b. Aplicaciones.....	28
	C. Espectrometría de Masas (MS).....	30
	a. Equipo.....	30
	b. Aplicaciones.....	36
	D. HPLC acoplado a Ionización por Electro spray y Espectrometría de Masas.....	36
	a. Aplicaciones.....	38

V.	METODOLOGÍA.....	39
A.	Principio del Análisis.....	39
B.	Tipos de muestra.....	39
	a. Matrices biológicas.....	40
	b. Matrices no biológicas.....	41
	c. Aspectos legales.....	42
C.	Tratamiento.....	47
	a. Extracción del suero.....	47
D.	Validación del método analítico.....	48
E.	Método propuesto para el análisis de cocaína .....	51
VI.	CONCLUSIONES.....	52
VII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54

## I. INTRODUCCIÓN.

En Química Forense se requiere realizar métodos tanto preliminares como específicos, para descartar la presencia de algunos tóxicos en muestras sólidas, tejidos y fluidos biológicos y de acuerdo a los resultados obtenidos en los métodos preliminares, se escoge el método analítico específico para la determinación cuantitativa de los tóxicos que se sospecha están presentes en las muestras. La necesidad de un resultado cuantitativamente riguroso y exacto es lo que caracteriza los análisis en toxicología forense.

La orina es una muestra idónea para realizar gran variedad de ensayos preliminares (screening) de tóxicos, ya que la concentración de un tóxico en este fluido puede llegar a ser 100 veces mayor que en la sangre, y además la orina está exenta de proteínas, por lo que las interferencias son mínimas. Por esta razón sigue siendo la muestra de elección para la detección de fármacos de abuso. Sin embargo, una de las muestras más útiles para la identificación de tóxicos y especialmente para el análisis cuantitativo es la de sangre, ya que se encuentra presente el tóxico de origen y su nivel está relacionado con el daño, aunque la interferencia por sustancias endógenas es mayor que en la orina.

El presente trabajo tiene como finalidad, por medio de una revisión bibliográfica, la propuesta de un método de identificación y determinación cuantitativa de cocaína en muestras biológicas, así como su principal metabolito benzoilecgonina, utilizando el método cromatográfico, de HPLC acoplado a Espectrometría de Masas, ya que muchos de los ensayos generales, a pesar de que son sensibles, no son específicos; por esta razón se necesitan de métodos cuantitativos fiables para confirmar la presencia tanto de cocaína como de benzoilecgonina en la muestra y descartar posibles interferencias que pudieran alterar los resultados en los métodos de screening.

## II. OBJETIVOS.

- ☆ Realizar una revisión bibliográfica y hemerográfica de métodos analíticos que permitan la identificación y cuantificación de cocaína y sus metabolitos en matrices biológicas.
  
- ☆ Aplicar los conocimientos adquiridos en el Diplomado de Química Legal para elaborar una propuesta de un método confiable para identificar y cuantificar cocaína en muestras de sangre por HPLC/MS, aplicable a laboratorios forenses.
  
- ☆ Mencionar los pasos a seguir para la validación de este método, tomando en cuenta que se trata de una matriz biológica.

### III. ANTECEDENTES TEÓRICOS DE LA COCAÍNA.

#### A. HISTORIA.

La cocaína es un alcaloide encontrado en la planta de *Erythroxylon coca* que crece principalmente en los Andes de América del Sur, y, en menor grado, en la India y África. La planta puede alcanzar 9 pies de altura, su crecimiento es favorecido a grandes alturas (6000 pies), porque a más bajas (1500 pies), el volumen de alcaloide se ve disminuido significativamente.<sup>1,2,4</sup>

La cocaína abunda en las hojas de la coca (*Erythroxylon coca*). Durante siglos los nativos de los Andes habían mascado un extracto alcalino de estas hojas, en primer lugar en sus rituales religiosos y en segundo lugar con fines prácticos, con lo cual jamás sentían frío, hambre, ni sed y podían transportar cargas pesadas a través de las altas regiones andinas sin cansarse; además por sus acciones estimulantes y eufóricas. Este es un hábito que permitía a los campesinos sobrellevar la pobreza y el trabajo duro.<sup>1,2,4</sup>

El tratamiento que se le da al arbusto de coca es el siguiente: primero se deja que crezca aproximadamente 2 años después del tiempo de plantar; entonces, dependiendo de la altitud las hojas pueden segarse tres veces por año. Una vez que las hojas están secas, se convierten en una pasta que se usa para producir el clorhidrato de cocaína. El rendimiento de 100 kg de hojas de coca es aproximadamente 1 kg de pasta, u 800 g de clorhidrato de cocaína.<sup>1</sup>

La figura 1 muestra las hojas del arbusto de *Erythroxylon coca*, polvo de cocaína y "crack".

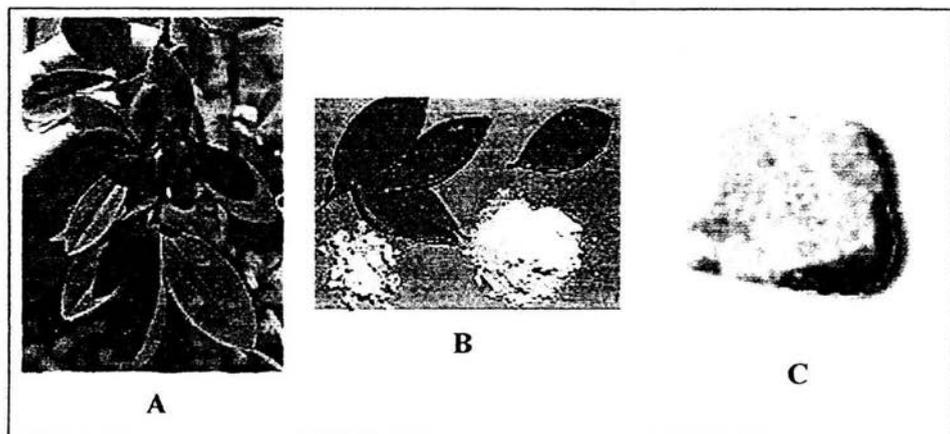


FIGURA 1. A: Arbusto de *Erythroxylon coca*; B: Hojas secas de cocaína y polvo extraído de estas y C: Cocaína en forma de "crack".

La cocaína es un fármaco estimulante extremadamente adictivo, que afecta directamente al Sistema Nervioso Central (SNC), que se ha usado durante 2000 años.<sup>1</sup>

Los Incas de Perú masticaban las hojas de la planta de coca en sus ceremonias religiosas. Después, durante la conquista española, los españoles encontraron que los indios peruanos no podían realizar su labor pesada en las minas cuando les prohibieron el uso de la planta. Una leyenda peruana antigua dice “Manko Kapa, quien era el hijo del Sol, descendió de los precipicios del Lago Titicaca y les trajo la planta maravillosa a los habitantes.” Se pusieron a menudo las plantas de la coca en las tumbas peruanas, incluso anteriormente al tiempo del Inca.<sup>1,2</sup>

En el siglo XIX, Carl Wöhler, el químico que sintetizó la urea, tenía las hojas de la coca que importaron a Alemania y las presentó a su estudiante graduado, Alberto Niemann, para analizarlas. Niemann fue el primero en aislar la cocaína con éxito de la planta de la coca. En la figura 3 se representa el procedimiento de extracción de la cocaína. Alrededor de 1860, la cocaína aparecía en varios elixires y tónicos, los cuales decían tener “propiedades mágicas”. Algunas de las preparaciones más famosas incluyeron la de Vin Mariani, una mezcla de vino y cocaína (ver figura 2); y la Coca-Cola original, que en ese momento era un jarabe de coca complementado con cafeína, así como también la comercialización de una tónica y remedio para el dolor de cabeza. La Coca-Cola que anunciaba la frase “has una pausa para refrescarte” se ha atribuido a menudo al contenido cola-cocaína. Hasta el momento, otros derivados de la planta de coca permanecen como “secreto” en los ingredientes de la bebida, sin embargo hasta 1904 se prohibió el uso de coca en la Coca-Cola.<sup>1</sup>

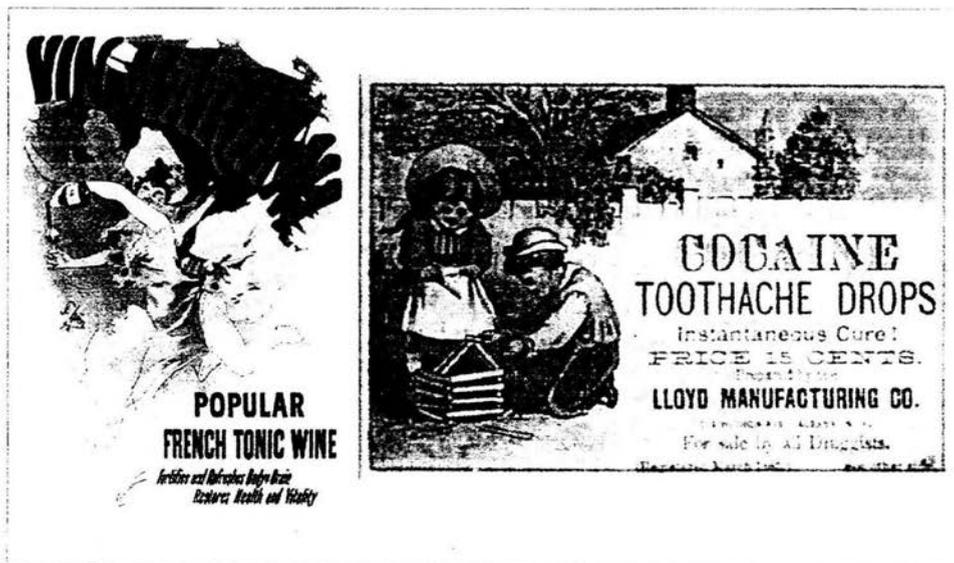


FIGURA 2. Preparaciones que en su formulación incluían cocaína.

El médico italiano Mantegazza fue el primero en interesarse en el estudio de la cocaína medicinalmente. Varios documentos habían sido escritos alrededor de 1870 sobre el uso potencial de cocaína; pero no fue hasta que Sigmund Freud popularizara la droga creando curiosidad en los círculos médicos europeos, también hizo que se conociera bien en la comunidad científica. En 1884, Carl Koller fue el primer médico que usó la cocaína como un anestésico tópico en la cirugía oftalmológica. Freud, un defensor del uso de la cocaína, dio la droga a muchos de sus pacientes y amigos. Después de la muerte de un amigo al que le había sido proporcionado el fármaco para tratar la dependencia de morfina, Freud admitió los riesgos del consumo de cocaína.<sup>1</sup>

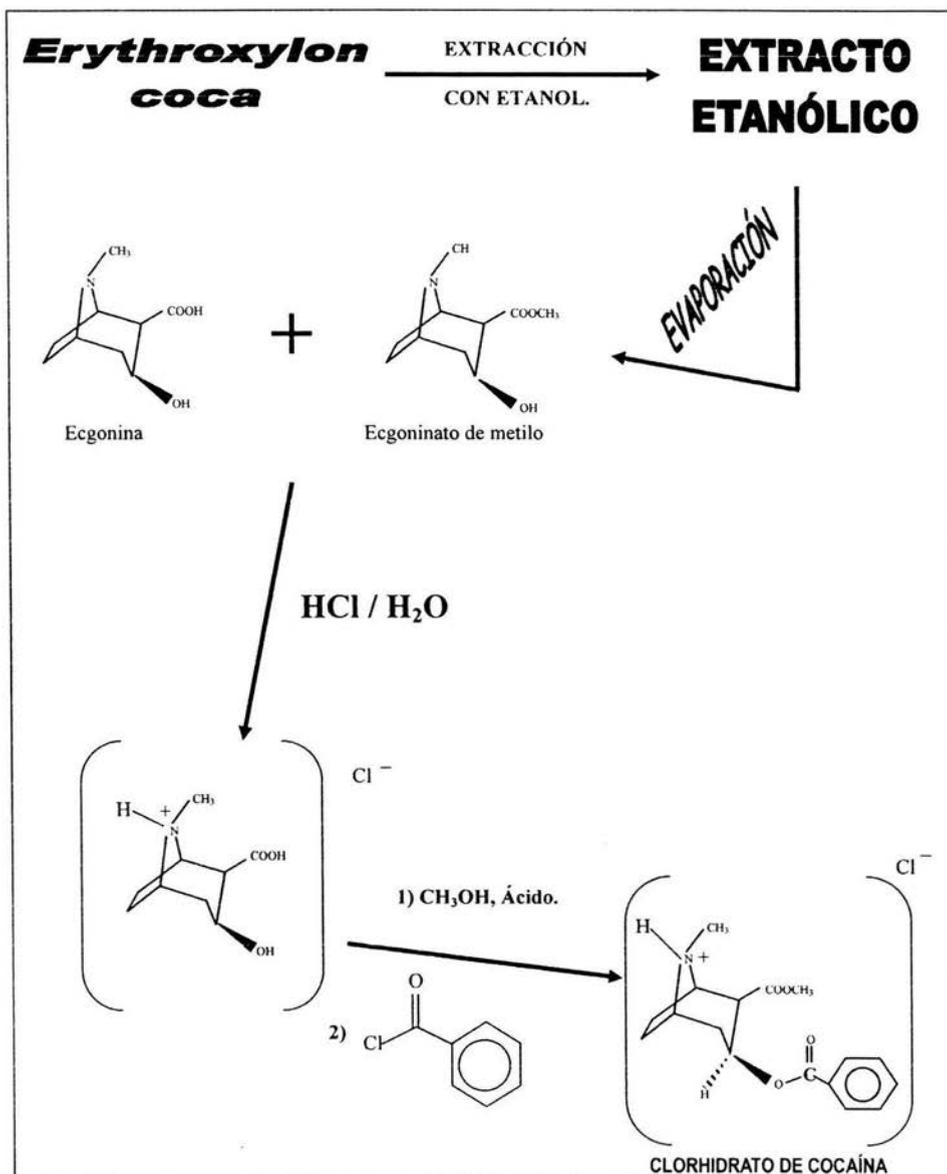
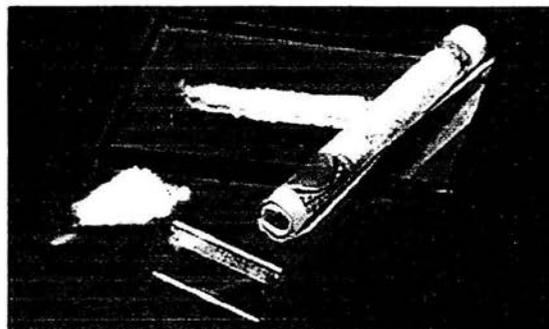


FIGURA 3. Procedimiento de extracción de cocaína.

A pesar de los numerosos informes tempranos de toxicidad de la cocaína, incluyendo arritmias cardíacas y fatalidades, en productos que contenían cocaína, estos fueron más populares. En 1914, cuando el abuso de la cocaína empezó a ser visto como un problema, la droga se etiquetó como un narcótico (aunque incorrectamente). La cocaína se ha fijado como un fármaco con algún valor médico, pero con un potencial alto para el abuso. Continúa teniendo algún uso médico pero casi se limita exclusivamente a la administración tópica como un anestésico local en la oreja, nariz, y cirugía de la garganta (como el clorhidrato del 10-20% en soluciones) y en los procedimientos de oftalmología (de 1-4% en solución). Sin embargo, esta función como anestésico ha sido reemplazada por otros medicamentos como lidocaína por ser menos susceptibles a generar dependencia.<sup>1,3</sup>

Hoy la cocaína es una de las drogas de abuso ilícitas más comunes. Ha adquirido numerosos nombres en la calle como son: "perico, crack, el polvo, polvo feliz, el dulce de la nariz, la piedra, la nieve, el speedball o bola rápida (cuando hay mezcla con la heroína), toque, y blanco". La cocaína se vende en la calle en dos formas: el clorhidrato de cocaína y el "crack".<sup>1,2</sup>

La forma de sal varía considerablemente en pureza, pero hoy es normalmente por lo menos del 30% puro. La forma de sal se diluye típicamente, a lo que llaman "el corte" con agentes como el manitol, lactosa, y sacarosa para agregar volumen. Además, estimulantes del sistema nervioso central prontamente disponibles como la cafeína, fenilpropanolamina, y efedrina, y otros anestésicos locales como la lidocaína, normalmente se usan procaína, y benzocaína como diluentes para estimular la droga real. Comúnmente se usa un espejo y una hoja de navaja para hacer el corte, entonces la cocaína se coloca en líneas delgadas aproximadamente 30-60 mm largo y 2 mm ancho (produciendo una media dosis de 25 mg) y aspirarla por la nariz a través de un popote o papel enrollado; es a través de las fosas nasales que se administra, ya que las membranas mucosas de la nariz la absorben (ver figura 4).<sup>1,2</sup>



**FIGURA 4. Modo de preparación de cocaína para insuflarla.**

Alternativamente, la cocaína puede consumirse en forma de “crack”. El “crack” es una forma libre de la base de cocaína que produce un sonido crujiente característico cuando se fuma esta mezcla; el “crack” se procesa con amonio o bicarbonato de sodio y agua, y se calienta para eliminar el clorhidrato, ya que este se fuma, el usuario siente euforia en menos de 10 segundos, debido al efecto tan rápido, casi inmediato que produce esta droga.<sup>1,3,4</sup>

#### **a. Dependencia Física.**

Para que una droga se considere adictiva, la persona debe desarrollar tolerancia hacia ella, así, dosis repetidas de la misma cantidad disminuyen la respuesta, por lo cual se tienen que aumentar las dosis o cantidad para conseguir efectos similares; y en segundo lugar, la droga debe de conducir a dependencia física, lo cual significa que si deja de consumir la droga, se desarrollará el síndrome de abstinencia.<sup>2,3,4</sup>

De acuerdo con esta definición, la cocaína no es adictiva, de modo que los cocainómanos pueden consumir la misma dosis todos los días y conseguir el mismo efecto; sin embargo, hay signos de el síndrome de abstinencia detectados con el encefalograma en los patrones del sueño.<sup>2,3,4</sup>

A pesar de lo anterior, el consumo de cocaína produce una dependencia psíquica similar a la de la marihuana y forma hábito rápidamente. Quienes mastican hoja de coca presentan niveles sanguíneos de cocaína similares a quienes la aspiran por la nariz, aunque con poca evidencia de daño físico.<sup>2</sup>

Este alcaloide produce un incremento dependiente de la dosis en la frecuencia cardíaca y la presión arterial, asociado a un aumento de la excitación, rendimiento mejorado en las tareas de vigilancia y alerta, y sensación de confianza en sí mismo y de bienestar.<sup>1,2,4</sup>

Unos cuantos centésimos de gramo de clorhidrato de cocaína extendidos finamente sobre una superficie lisa y dispuesta en varias líneas pueden ser aspirados por la nariz, mediante un papel enrollado para formar un tubo delgado; casi inmediatamente se experimenta excitación emotiva con mayor y mejor actividad mental y corporal, mientras que el pensamiento se torna más claro y poderoso. Estas sensaciones pasan en aproximadamente media hora.<sup>2,4</sup>

La “adicción” o consumo de cocaína se desarrolla más rápidamente que en el caso de la morfina. El consumidor encuentra pronto la dosis que le satisface y permanece en ella, sin tener que aumentarla como con morfina. Durante la alteración producida por la ingestión, la persona se anima, grita, ríe y manotea.<sup>2</sup>

Los consumidores del mundo occidental la emplean como excitante a fin de mejorar su auto imagen, o aumentar su actividad o productividad. El uso prolongado de cocaína puede llevar a un comportamiento compulsivo orientado por las drogas, que causan deterioro físico, económico y social.<sup>4</sup>

En 1979, en EUA, un informe del consejo estratégico en abuso de drogas, asentaba que aproximadamente 10 millones de estadounidenses habían consumido cocaína en los 12 meses anteriores, comparados con 10 000 en los 20 años previos.<sup>2</sup>

Se estima que han consumido cocaína en algún momento de su vida más de 23 millones de estadounidenses, pero el número de consumidores actual ha disminuido desde los 8.6 millones de usuarios ocasionales estimados, y los 5.8 millones de consumidores regulares, hasta 2.9 millones de consumidores ocasionales en 1988 y 1.3 millones de consumidores ocasionales en 1992. el número de consumidores asiduos (por lo menos una vez a la semana) se mantiene firme desde 1991, en cerca de 640 000 personas.<sup>5</sup>

## B. PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS.

La Cocaína también es llamada: Metil Benzoilecgonina y Neurocaína.

Fórmula molecular:  $C_{17}H_{21}NO_4$ .

Peso molecular: 303.4

La cocaína es un polvo cristalino blanco o cristales incoloros obtenidos de las hojas de *Erythroxylum coca* y otras especies, con un punto de fusión de aproximadamente 96 a 98°C ligeramente volátil.<sup>6,26</sup>

Es prácticamente insoluble en agua; soluble 1 en 7 de alcohol, 1 en 0.5 de cloroformo, 1 en 4 de éter.<sup>6,26</sup>

La Cocaína es un éster de ácido benzóico de la metilecgonina. La ecgonina es la base alcohólica amínica estrechamente relacionada con la tropina, alcohol amínico de la tropina. Tiene la misma estructura básica que los anestésicos locales sintéticos (figura 5).<sup>6</sup>

El clorhidrato de cocaína es termolábil y muy soluble en agua; esta última propiedad permite su absorción por la mucosa de la nariz.<sup>6</sup>

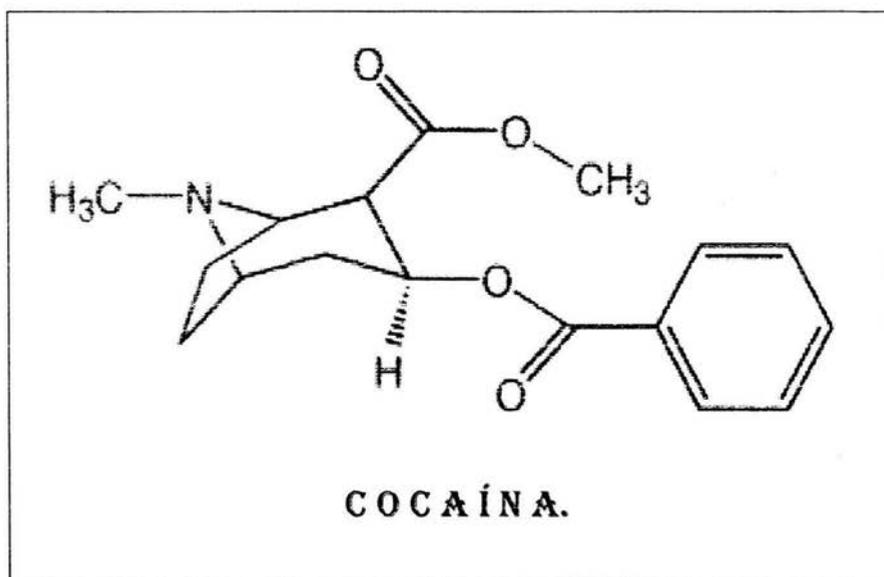


FIGURA 5. Fórmula estructural de la cocaína

a. Relación entre estructura y actividad.

La estructura de la cocaína contiene dominios hidrófilos e hidrófobos que están separados por un éster intermedio, o un enlace amídico; gran variedad de compuestos que contienen estos aspectos estructurales mínimos pueden satisfacer los requisitos para su acción como anestésicos locales. El grupo hidrófilo suele ser una amina terciaria, pero puede ser también una amina secundaria; el dominio hidrófobo debe ser una mitad aromática. La naturaleza del grupo de enlace determina algunas de las propiedades farmacológicas de estos agentes.<sup>5</sup>

La cualidad hidrófoba incrementa tanto la potencia como la duración de la acción de los anestésicos locales, esto se debe a que la asociación del fármaco en los sitios hidrófobos intensifica la distribución del mismo hacia sus sitios de acción y disminuye la tasa de metabolismo por las esterasas plasmáticas y las enzimas hepáticas; además el sitio receptor para estos fármacos sobre los canales de  $\text{Na}^+$ , se considera hidrófobo, de modo que incrementa la afinidad del receptor por los agentes anestésicos más hidrófobos, la cualidad hidrófoba incrementa también la toxicidad, de modo que el índice terapéutico en realidad disminuye para los fármacos más hidrófobos.<sup>5</sup>

### C. FARMACOLOGÍA.

#### a. Mecanismo de Acción y Efectos.

La acción de cocaína generalmente se ha atribuido a la inhibición del transportador de dopamina (DA), aunque otros mecanismos también podrían ser importantes. A concentraciones clínicamente pertinentes, se ha mostrado que la cocaína puede ligar receptores sigma 1.<sup>31</sup>

Los receptores Sigma 1 se han implicado a cocaína y metanfetaminas en el aprendizaje y memoria, esquizofrenia, depresión y la sensibilización conductual.<sup>31</sup>

- La interacción con receptores sigma 1.

Ahora, se conoce que los receptores sigma 1 y los ligandos asociados, incluso la cocaína y neuroesteroides, pueden afectar la señalización de iones  $Ca^{2+}$  al retículo endoplásmico en las células de NG-108 causando la disociación de un receptor adaptador de proteínas citoesqueléticas ankyrin del Inositol (1,4,5)- trifosfato en el retículo endoplásmico.<sup>31</sup>

Los ankyrins son proteínas que interconectan membranas proteínicas citoesqueléticas y moléculas de adherencia de la célula, jugando papeles importantes en muchas funciones celulares incluso arracimándose al cauce de iones, alterando la estructura, modulación, sustento de estabilidad, desarrollo, crecimiento y comunicación célula-célula de proteínas de la membrana.<sup>31</sup>

Los receptores Sigma 1 están unidos a proteínas ANK220 y receptores de Inositol (1,4,5)-trifosfato en el retículo endoplásmico como un complejo en el estado relajado de células. La siguiente activación por agonismo del (+) pentazocina, sulfato pregnenolona y receptores sigma 1 de la cocaína se disocian como un complejo receptor sigma 1-ANK220 de los receptores de Inositol (1,4,5)- trifosfato, en el retículo endoplásmico.<sup>31</sup>

Este resultado de la disociación de un ligando reforzado de Ins(1,4,5)P3 a los receptores de Ins(1,4,5)P3, causa un aumento de flujo de iones  $Ca^{2+}$  del retículo endoplásmico. El complejo ANK220 - receptor sigma 1 quizás transloca, vía el transporte de la vesícula, a otros organelos incluso el núcleo y membrana del plasma.<sup>31</sup>

Por esto las proteínas del citoesqueleto son importantes en la organización estructural y actividades de proteínas en un estado alterado de neuronas, y porque la cocaína puede afectar la dinámica de proteínas del citoesqueleto; se ha sugerido que la cocaína pudiera ejercer sus efectos de vida prolongados causando alteración estructural de células.<sup>31</sup>

- El papel del ion  $\text{Ca}^{2+}$  en los efectos vida larga de la cocaína.

Se conoce bien que los iones  $\text{Ca}^{2+}$  juegan papeles importantes en la diferenciación celular y proliferación, y en la activación de factores de la transcripción. Así, aunque suponen que las proteínas del citoesqueleto podrían jugar los papeles importantes en la acción de vida larga de la cocaína, es posible que los iones  $\text{Ca}^{2+}$  también pudieran jugar un papel importante en estos efectos. De hecho, los iones  $\text{Ca}^{2+}$  pueden, vía la activación de cinasas, cambiar la actividad intrínseca y organización de proteínas del citoesqueleto que sugieren que podría existir una relación entre los iones  $\text{Ca}^{2+}$  y el citoesqueleto mediando cambios de vida largos ejercidos por la cocaína.<sup>31</sup>

Basándose en las acciones de cocaína con el adaptador de proteína citoesquelética ankyrin, la cocaína podría causar las alteraciones de vida largas en las neuronas actuando recíprocamente con receptores D1 y sigma 1.<sup>31</sup>

La cocaína en el nivel sinapsis adrenérgica y de unión neuroefectora en la periferia, tiene el siguiente mecanismo de acción: bloquea el sistema de transporte de la membrana de la terminación nerviosa y el efecto que causa es el de acumular noradrenalina en los receptores.<sup>1,5</sup>

Las causas en el bloqueo del transportador de dopamina (DAT), por causa de la cocaína son un aumento en la concentración sináptica de dopamina (DA) que activa ambos receptores adenil ciclasa (CA) y fosfolipasa C $\beta$  (PLC- $\beta$ ) vía DA, D1A y D1x (un subtipo desconocido) respectivamente.<sup>31</sup>

La activación de PLC- $\beta$  resulta en un aumento en la concentración intracelular de inositol del (1,4,5)-trifosfato [Ins(1,4,5) P3] y un aumento en el flujo de iones  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo endoplásmico (ER). Este  $\text{Ca}^{2+}$  participa en la activación de cinasas y factores de la transcripción que podrían llevar a los efectos a corto y largo plazo inducidos por la cocaína. En el ER, la cocaína puede causar también la disociación de un complejo receptor sigma 1 (S) y ankyrin (específicamente los isómeros 220-kDa) Ins(1,4,5)-P3 al receptor (IP3R) en el ER. Como resultado, Ins(1,4,5) P3 liga receptores Ins(1,4,5) P3 reforzando al retículo endoplásmico y aumentando el flujo de iones  $\text{Ca}^{2+}$ . El complejo receptor sigma 1-ankyrin es translocado a la membrana del plasma y núcleo. La translocación del complejo receptor sigma 1-ankyrin, junto con un aumento de iones  $\text{Ca}^{2+}$  es el resultado de la disociación del estímulo de ambos receptores ankyrin Ins(1,4,5) P3 y receptores D1x podría alterar la expresión del gen, la actividad intrínseca y reorganización estructural de proteínas del citoesqueleto, la morfología de células y dendritas y las reestructuraciones topográficas de receptores e iones que encauzan en las áreas especializadas de la membrana del plasma. El efecto de cocaína en las proteínas del citoesqueleto podría representar una ruta bioquímica dirigida a por que los psicoestimulantes como la cocaína afecta los cambios de vida largos en las células. Ver figura 6.<sup>31</sup>

Las acciones clínicamente deseables de la cocaína son bloqueo de los impulsos nerviosos, a causa de sus propiedades anestésicas locales, y vasoconstricción local secundaria a inhibición de la recaptación de noradrenalina. Han disminuido de manera sostenida las aplicaciones clínicas de la cocaína.<sup>1,5</sup>

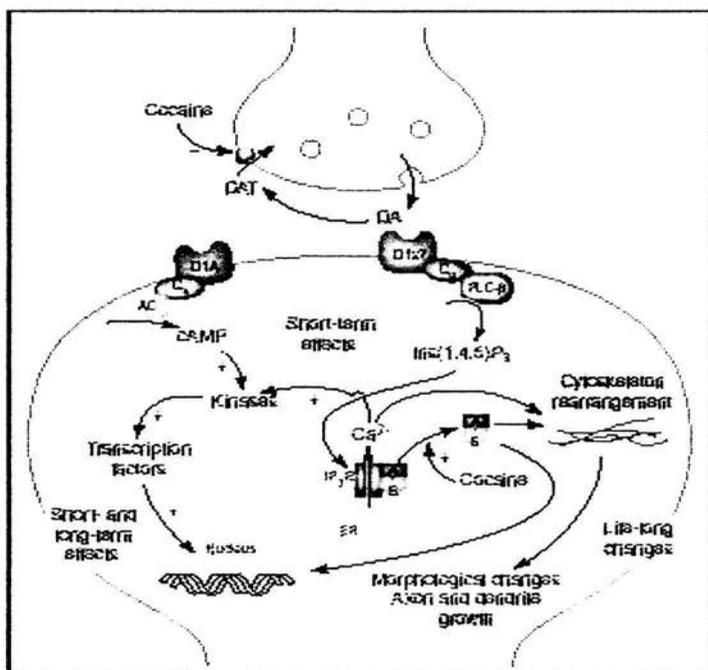


FIGURA 6. Cascadas bioquímicas inducidas por la cocaína y la relación potencial a corto y largo plazo y los efectos de vida largos causados por la cocaína.

Su alta toxicidad se debe al bloqueo de la captación de catecolaminas en los sistemas tanto central como periférico. Sus propiedades eufóricas se deben primordialmente a la inhibición de la captación de catecolaminas, en particular la dopamina, al nivel de sinapsis del sistema nervioso central. Otros anestésicos locales no bloquean la captación de noradrenalina ni producen sensibilización a las catecolaminas, vasoconstricción o midriasis, fenómenos característicos con la cocaína. En la actualidad, la cocaína se emplea primordialmente para producir anestesia tópica de las vías respiratorias superiores, sitio en el que sus propiedades vasoconstrictora y anestésica local combinadas, ofrecen anestesia y enjuntamiento de la mucosa con un solo agente.<sup>1,5</sup>

La cocaína se usa medicinalmente como un anestésico local tópico; el clorhidrato de cocaína se usa en solución en concentraciones de 1, 4 o 10% para aplicación tópica; para la mayor parte de las aplicaciones se prefiere el preparado al 1 o 4%, con el fin de reducir la toxicidad. Por su potencial de abuso, la cocaína se encuentra en la lista de la Drug Enforcement Agency como fármacos del tipo II.

Los anestésicos locales previenen la generación y la conducción del impulso nervioso. Su sitio primario de acción es la membrana celular.<sup>1,4,5</sup>

Los anestésicos locales bloquean la conducción al disminuir o prevenir el gran incremento transitorio en la permeabilidad de las membranas excitables al  $\text{Na}^+$  que normalmente se produce por una despolarización leve de la membrana. Esta acción de los anestésicos locales se debe a su interacción directa con canales de  $\text{Na}^+$  de compuerta de voltaje. Conforme a la acción anestésica se desarrolla progresivamente en un nervio, se incrementa de manera gradual el umbral para la excitabilidad eléctrica, se reduce la tasa de incremento del potencial de acción, se retrasa la conducción del impulso, y disminuye el factor de seguridad para la conducción; estos factores reducen la probabilidad de propagación del potencial de acción, y falla la conducción nerviosa.<sup>1,5</sup>

Además de los canales de  $\text{Na}^+$ , los anestésicos locales pueden fijarse también en otras proteínas de membrana; en particular pueden bloquear los canales de  $\text{K}^+$ , sin embargo, como la interacción de los anestésicos locales con los canales de  $\text{K}^+$  requiere concentraciones más altas del fármaco, el bloqueo de la conducción no conlleva cambio mayor ni sostenido en el potencial de membrana en reposo a causa del bloqueo de estos canales.<sup>1,5</sup>

En la actualidad se acepta en general que el mecanismo principal de acción de estos fármacos incluye su interacción con uno o más sitios de fijación específicos dentro del canal de  $\text{Na}^+$ .<sup>1,5</sup>

Clínicamente, su mecanismo de acción más importante es su habilidad de bloquear la conductancia del canal de sodio, y por eso para aumentar el umbral exigido genera un potencial de acción. La cocaína tiene acciones adicionales, ya que es el único entre los anestésicos locales, que tiene la habilidad de bloquear la recaptación del neurotransmisor de norepinefrina (NE), dopamina (DA), y serotonina (5-HT). La NE es la responsable de los efectos clásicos adrenérgicos vistos con el uso de la cocaína, incluyendo midriasis, vasoconstricción, hipertensión, taquicardia, y taquipnea. Mientras estos efectos pueden ser los toxicológicamente más importantes, los efectos conductuales de cocaína parecen ser mediados por sus acciones dopaminérgicas. Los efectos que se desean al consumir cocaína, son mediados por la DA; y estos incluyen intensa euforia, energía psíquica, excitación sexual elevada, y confianza en sí mismo (la elevación de humor). Los efectos indeseables potenciales incluyen paranoia, alucinaciones, y disforia. El estimulador central efectúa un "impulso" seguido por la depresión "caída o desplome". El refuerzo positivo de la caída es la razón principal para el desarrollo de abuso crónico de la cocaína.<sup>1,5</sup>

Después de una dosis aguda de cocaína, las concentraciones del cerebro de DA son brevemente elevadas y entonces notablemente reducidas hasta alcanzar las concentraciones normales, entonces el usuario pone o correlaciona el “impulso” y la “caída o desplome”. La cocaína previene que se retome la DA en la neurona dopaminérgica del ligando presináptico a los receptores en el transportador de DA localizada en el término nervioso dopaminérgico. Este retomar de DA, mediado por el sodio, cloruro, y energía-persona a cargo el transporte activo, se inhibe cuando la cocaína liga al sitio sodio-obligatorio en el transportador y altera el sitio cloruro-obligatorio, mientras así previene el arreglo de ambos iones; porque la translocación de DA por la membrana de la neurona presináptica se inhibe, las concentraciones de DA celulares extras aumentadas producen un estímulo crónico del receptor de DA en la neurona postsináptica. La administración de la cocaína crónica altera el transportador de DA en las regiones del mesolímbico del cerebro. Se han observado densidades aumentadas en el transportador de DA después de la muerte en cerebro del abusador de cocaína. Los usuarios de la cocaína crónicos administran la cocaína repetidamente para aumentar sus niveles sinápticos de DA. Este proceso es cíclico y demuestra cómo una “borrachera con cocaína”, esta seguida por una caída y por que es tan difícil quitarle la tentación al tratar a un enfermo.<sup>1,5</sup>

El delirio de excitación-cocaína, es un síndrome caracterizado por la hipertermia, el delirio, la agitación, la energía cardiorrespiratoria, y la muerte súbita, puede ser debido a una incapacidad del levantamiento regular del transportador de DA en la mayoría de usuarios de cocaína crónicos.<sup>1,5</sup>

Por lo que se concluiría que los receptores Sigma 1 son las únicas proteínas en el retículo endoplásmico que ligan psicotrópicos narcóticos como la cocaína. La cocaína, vía receptores sigma 1, puede usarse en la disociación de un adaptador proteínico citoesquelético como ankyrin del inositol (1,4,5)- trifosfato en receptores del retículo endoplásmico, como el complejo receptor sigma 1-ankyrin que entonces transloca a la membrana del plasma y núcleo. La disociación de los receptores sigma 1-ankyrin del Inositol (1,4,5)- trifosfato dan los aumentos intracelulares de concentración de iones  $Ca^{2+}$  que afectan la actividad de proteínas citoesqueléticas. Además, la cocaína podría aumentar el flujo de iones  $Ca^{2+}$  vía fosfolipasas por la unión de dopamina con receptores D1. Podría suponerse que la cocaína podría causar los cambios de vida largos en las neuronas, vía las proteínas del citoesqueleto actuando recíprocamente con receptores D1 y sigma 1.<sup>31</sup>

#### **b. Toxicidad.**

Otros riesgos del consumo de cocaína, además de su potencial de adicción, son arritmias cardíacas, isquemia del miocardio, miocarditis, disección aórtica, vasoconstricción cerebral y convulsiones. El consumo de cocaína se ha vinculado también con la muerte por traumatismo. Las embarazadas consumidoras de cocaína pueden experimentar trabajo de parto prematuro y desprendimiento prematuro de placenta.<sup>1,4,5</sup>

Se ha informado que la cocaína produce un orgasmo prolongado e intenso si se administra antes del coito y su empleo concurre a menudo con la actividad sexual compulsiva y promiscua. Sin embargo, a largo plazo, el consumo de cocaína suele culminar en disminución del impulso sexual; es frecuente la queja de problemas sexuales entre los consumidores de cocaína que solicitan tratamiento; también es común que soliciten la droga por trastornos psiquiátricos como ansiedad, depresión y psicosis.<sup>5</sup>

## D. FARMACOCINÉTICA.

### a. Biodisponibilidad.

La cocaína puede administrarse por las vías: intranasal (IN), intravenosa (IV), oralmente (VO), o fumada (SM). La cocaína normalmente no se administra por VO, porque, primero el resultado de los efectos de paso en la biodisponibilidad son bajos (aproximadamente 20%) y los efectos eufóricos reducidos debido a la entrega ineficaz al cerebro. La ruta de administración IV, es la única ruta que de forma consistente produce 100% de biodisponibilidad de droga administrada, las rutas IN o SM son bastante inconstantes; sin embargo, la conveniencia de estas dos últimas rutas de administración, es que son rápidas, ya que se tiene un intenso ataque de efectos, lo que hace a estas rutas de administración normalmente las de mayor uso.<sup>1,5</sup>

Por la ruta de administración IN, alcanza una concentración máxima en plasma a los 15 o 60 minutos, el efecto eufórico máximo se produce de los 15 a los 20 minutos.<sup>1,4</sup>

Se ha sugerido que la biodisponibilidad por administración IN, pueda ser dependiente a la dosis, la biodisponibilidad aumenta al ser la dosis más alta en función con la cantidad de droga disponible para la absorción. La biodisponibilidad se estima el rango de 25% a tan alto como 94%. En la ruta IN la cocaína es entrega al cerebro más eficazmente que la dirigida por la administración VO.<sup>1,4,5</sup>

Por la ruta de administración VO, la cocaína ingerida alcanza sus niveles máximos en sangre entre 50 y 90 minutos, la cocaína se absorbe mejor en el medio alcalino del intestino delgado que en el medio ácido del estómago.<sup>4</sup>

Cuando se fuma, el “crack” o cocaína es absorbida de manera rápida y completa a través de la circulación pulmonar; el efecto psicológico y fisiológico de 15mg de esta forma es similar al obtenido con 20mg de clorhidrato de cocaína por IV. La euforia se produce entre 6 y 11 minutos.<sup>1,4,5</sup>

La cocaína fumada produce una rápida e intensa eficacia de entregar la dosis al cerebro, similar a la ruta IV. A pesar de esto, estudios indican que la biodisponibilidad por la ruta SM es sólo del 57-70%, con variaciones considerables dentro de los estudios. La variación individual se basa en la técnica de fumar, la temperatura y naturaleza de la cocaína fumada, y la construcción del cigarrillo. Se ha postulado que la cocaína puede estar sufriendo

pirolisis en el cigarrillo, y que la primera fumada “el golpe” proporcione la mayor biodisponibilidad que los que se dan más tarde. La recuperación de cocaína residual de los cigarrillos que fueron fumados, después de ser estudiados demuestran que aproximadamente 25% de la dosis original de cocaína queda en el cigarrillo.<sup>1,5</sup>

Por IV, la biodisponibilidad de la cocaína es similar a la SM, aunque los efectos fisiológicos y psicológicos aparecen varios minutos antes.<sup>1,5</sup>

La vida media plasmática de la cocaína es de cerca de 50 minutos, pero los consumidores de la forma inhalable “crack” desean de manera típica más cocaína después de 10 a 30 minutos. Las administraciones IN e IV inducen también una euforia más breve que lo que cabría esperar por las concentraciones plasmáticas de la sustancia, lo que sugiere que la terminación del estado eufórico y la reanudación de la búsqueda de cocaína se relacionan con la concentración plasmática decreciente.<sup>1,5</sup>

En la autopsia, la concentración más elevada se encuentra en el riñón y la orina, seguida por el cerebro, sangre, hígado y bilis. La vida media aparente de la cocaína es de alrededor de 0.9 horas con la ingestión de la dosis terapéutica, comparada con 1.3 horas cuando se inhala, lo cual puede ser reflejo de la absorción nasal continua. El nivel de cocaína en sangre permanece detectable de 4 a 6 horas. En los usuarios crónicos, el promedio de vida media en sangre es de 48 minutos después de una inyección de 32 mg, intravenosa.<sup>1</sup>

La cocaína se difunde fácilmente a través de la barrera hemato-encefálica; por el contrario su metabolito, la benzoilecgonina, la pasa con dificultad. En los niveles máximos de sangre después de exposiciones agudas, el rango de cocaína cerebro-sangre es de alrededor de 4. Un rango cerebro-sangre por encima de 10 suele corresponder a sobredosis. Mientras que un rango de 1 a 1.5 sugiere acumulación crónica por uso prolongado o una exposición ocurrida ocho horas antes.<sup>5</sup>

En SNC, en dosis progresivas, causa primero estimulación de la corteza cerebral (euforia, hiperactividad y desasosiego); luego, al activar centros cerebrales inferiores causa temblor, hiperreflexia y convulsiones.<sup>1,5</sup>

En dosis elevadas, a la fase de excitación sigue una fase de depresión, caracterizada por coma, hiporreflexia y depresión cardiorrespiratoria.<sup>1,5</sup>

Se cree que la acción estimulante de la cocaína sobre el SNC puede ser la potencialización de las catecolaminas o deprimiendo vías inhibitorias centrales.<sup>1,5</sup>

En el sistema circulatorio, aún a dosis bajas de cocaína (25mg), por vía IV elevan la presión de la sangre y aceleran el pulso. Esta respuesta simpático mimética se atribuye al bloqueo del consumo de epinefrina y norepinefrina, con el consiguiente aumento de la concentración de neurotransmisores en los receptores adrenérgicos.<sup>1,5</sup>

Con dosis elevadas de cocaína se puede producir el paro del corazón, por alteraciones de la permeabilidad de la membrana al sodio.<sup>1,5</sup>

En el sistema respiratorio, por estimulación central, la cocaína causa al comienzo taquipnea, pero si se aumenta la dosis puede deprimirse la respiración hasta llegar a la muerte.<sup>1,5</sup>

En cuanto a la regulación térmica, en dosis elevadas, la cocaína produce hipertermia al aumentar la producción de calor (por efecto psicomotor) y disminuir la pérdida de calor (por acción sobre centros termorreguladores).<sup>1,5</sup>

En sistema digestivo, la cocaína produce náuseas y vómito por estímulo del centro del vómito, diarrea y cólicos abdominales por efectos simpático miméticos sobre la pared intestinal.<sup>1,5</sup>

#### **b. Biotransformación.**

La vía metabólica principal de la cocaína consiste en la hidrólisis de cada uno de sus dos grupos éster. La benzoilecgonina, producida al perderse el grupo metilo, representa el metabolito urinario principal y se encuentra en la orina durante dos a cinco días después de administrar repetidas dosis de cocaína. En la figura 7 se ilustran las rutas de la biotransformación de la cocaína. En consecuencia las pruebas de benzoilecgonina resultan útiles para identificar el consumo de cocaína, los grandes consumidores tienen cantidades detectables del metabolito en la orina hasta por 10 días después de haberse suministrado repetidas dosis de cocaína.<sup>1,7</sup>

La cocaína es metabolizada principalmente a benzoilecgonina y ecgonina metil éster por diferentes mecanismos. Si la cocaína se usa con alcohol etílico, entonces la etilcocaína, es un metabolito producido por la transesterificación de cocaína con alcohol etílico. Sin embargo, estas interacciones de la cocaína no son claras, y las interpretaciones de cocaína y concentraciones de metabolitos en sangre y otros tejidos son complicados por lo complejo de reacciones metabólicas *in vitro* e *in vivo*.<sup>1,7</sup>

Estudios de la estabilidad apoyan la creencia de que la cocaína es metabolizada a ecgonina metil éster por la vía de hidrólisis enzimática por pseudocolinesterasas y esterazas hepáticas a benzoilecgonina por la vía de hidrólisis espontánea a pH alcalino.<sup>1,5,7</sup>

Recientes estudios proporcionan fuerte evidencia de que la cocaína puede ser hidrolizada a benzoilecgonina por las carboxilesterasas hepáticas. Se han aislado y purificado dos tipos de esterazas de carboxilesterasas no específicas del hígado humano. Las metilesterasas hepáticas catalizan la conversión de cocaína a benzoilecgonina y la transesterificación de la cocaína a etilcocaína. En la ausencia de alcohol etílico, esta enzima hidroliza cocaína exclusivamente a benzoilecgonina. En presencia de cocaína y alcohol etílico, la transesterificación de cocaína a etilcocaína ocurre aproximadamente 3.5 veces más rápidamente que la hidrólisis a benzoilecgonina.<sup>1,5,7</sup>

Norcocaína, un metabolito de la cocaína producido por el citocromo hepático P-450, ha recibido estudios considerables debido a su conversión en un metabolito hepatotóxico.<sup>1,5,7</sup>

Norcocaína se metaboliza a la N-hidroxinorcocaína y entonces al nitróxido de norcocaína. Se pensaba que el nitróxido era un radical libre que llevaba a la hepatotoxicidad, pero se ha demostrado subsecuentemente que un producto de la oxidación extensa del ion nitro sódico de norcocaína, es el responsable. En los humanos, la norcocaína es un metabolito menor, y los informes de hepatotoxicidad atribuyeron a que el uso de la cocaína es raro. Sin embargo, se mostraron que las concentraciones de norcocaína pueden estar presentes en concentraciones mayores en personas con colinesterasas deficientes y en usuarios de cocaína simultáneamente con alcohol etílico.<sup>1</sup>

Anhidroecgonina metil éster (metilecgonidina) se ha identificado como el único metabolito de la cocaína en sangre después de la muerte y en orina después de la administración de la cocaína fumada. Aunque se ha informado que puede ser producido en el puerto inyección de un cromatógrafo de gases, en pequeñas cantidades menos de 1% de la conversión de cocaína a anhidroecgonina metil éster ocurre si el puerto inyección del cromatógrafo de gases se mantiene a 250 °C.<sup>1</sup>

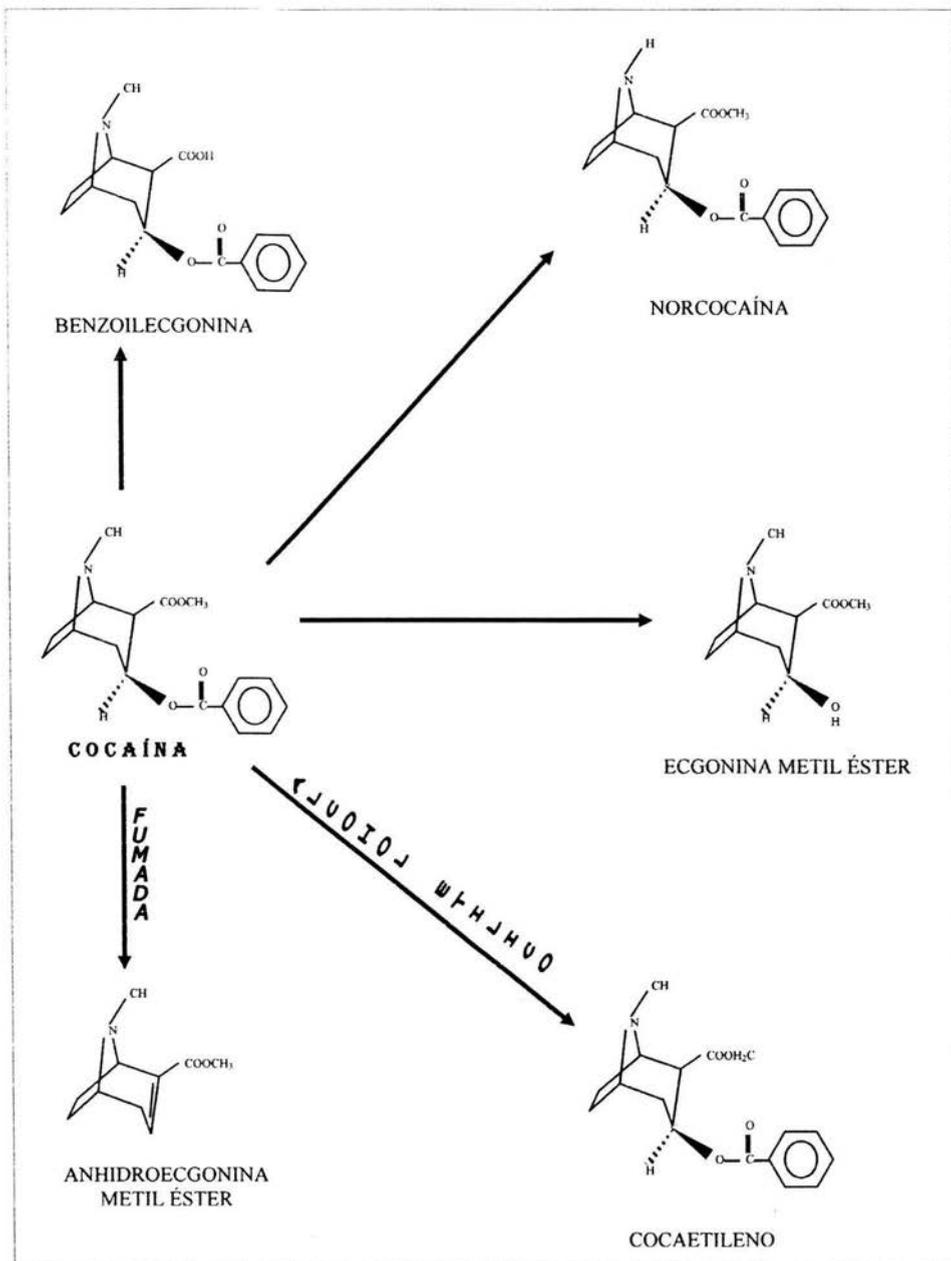


FIGURA 7. Principales metabolitos y derivados de la cocaína.

### C. Concentraciones en plasma.

Las concentraciones máximas de cocaína en plasma en estudios farmacocinéticos de dosis únicas por las siguientes rutas son: SM (por arriba de 100mg/L), IV (por arriba de 64mg/L), e IN (por arriba de 100mg/L) generalmente promediaron de 0.2 a 0.4mg/L. Por arriba de 1 a 2mg/L la cocaína era moderada en dosis crónicas múltiples por las rutas SM, IV, y PO sin efectos adversos. En un estudio dónde 100 y 200mg de cocaína fueron administrados por la ruta IV, se obtuvieron las concentraciones máximas en plasma de 0.87 y 3.2mg/L, respectivamente, no reportando toxicidad.<sup>1,4,5</sup>

En sangre, las dosis de 2 mg/Kg inhalada produce una concentración máxima en plasma de 0.16 µg/mL después de una hora; y por vía oral de 0.21 µg/mL después de una hora. Los efectos dependen de si la concentración de cocaína esta en ascenso o en descenso.<sup>1,4,5</sup>

En estudios realizados para determinar las concentraciones máximas en plasma por las diferentes vías de administración se encontraron los siguientes resultados:<sup>1,4,5</sup>

- Después de una dosis de 1.5 mg/Kg, administrada IN, las concentraciones máximas en plasma obtenidas después de una hora fueron de 0.12 a 0.47 µg/mL.
- Siguiendo una dosis de 16mg, administrada IV las concentraciones máximas en plasma reportadas después de 5 minutos fueron de 0.09 a 0.31 µg/mL.
- Después de una dosis de 2mg/Kg, administrado por vía oral, las concentraciones máximas en plasma obtenidas de 50 a 90 minutos fueron de 0.10 a 0.42 µg/mL.

La vida media en plasma es de aproximadamente 0.7 a 1.5 horas dependiendo de la dosis.

Su volumen de distribución es aproximadamente de 1 a 3 L/Kg.

La depuración plasmática es de 10 a 30 mL/min/Kg dependiendo de la dosis.<sup>1,4,5</sup>

**d.** Excreción.

La cocaína se excreta de modo rápido y casi totalmente metabolizada por las colinesterasas de la sangre. Sólo menos del 10% no sufre cambio.<sup>1,4,5</sup>

Se excretan cocaína y sus metabolitos casi exclusivamente en la orina por la filtración simple. Así la tasa de excreción urinaria y las concentraciones del plasma de cocaína y benzoilecgonina se relacionan entre sí, mientras indican que la proporción de la eliminación de las drogas es proporcional a la concentración en plasma. Después de una dosis de cocaína, se recuperaron del 64-69% de este metabolito en la orina dentro de los primeros 3 días sin tomar en cuenta la ruta de administración; 86% de este dentro del primer día, después de una dosis única de cocaína. Algunos informes indican que arriba del 90% de una dosis puede recuperarse en 24 horas en una muestra de orina. Una revisión de datos publicados indica que se excretan del 1 al 9% de la droga inalterada dependiendo del pH, del 26 al 54% como benzoilecgonina, del 18 al 41% como el éster de metil de ecgonina, y del 2 al 3% como ecgonina.<sup>1,4,5,7</sup>

El Anhidroecgonina metil éster y varios demetilados y metabolitos hidroxilados aparecen en menor cantidad en la orina. Después de continuar prolongando infusiones IV de cocaína, las vidas medias urinarias para la cocaína, benzoilecgonina y éster de metil de ecgonina son respectivamente 0.8, 4.5, y 3.1 horas, comparados a 2.9, 4.8, y 4.9 horas respectivamente, después de una dosis única fumada de cocaína.<sup>1</sup>

#### IV. TÉCNICAS ANALÍTICAS.

##### A. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA.

Para la preparación de la muestra de cocaína en la matriz biológica se requiere de realizar una serie de extracciones con disolventes adecuados, a manera de no modificar las cantidades presentes en la muestra.<sup>8</sup>

Estos compuestos pueden extraerse prontamente utilizando una mezcla de cloroformo-isopropanol (9:1). Estas condiciones también extraerán benzoilecgonina y ecgonina metil éster, aunque no con las recuperaciones óptimas. Los procedimientos de extracción en fase sólida (SPE), también usados para estos analitos, normalmente se usa la precipitación de proteínas antes de aplicar las soluciones del sobrenadante buffer a la columna de extracción. El eluyente es típicamente una mezcla de cloruro del metileno, isopropanol e hidróxido de amonio (78:20:2), aunque también se han usado otros disolventes de elución, dependiendo del estándar y la columna utilizada.<sup>1</sup>

La extracción de analitos polares como la ecgonina, presenta un desafío, porque es un ácido carboxílico y alcohol, por lo que debe extraerse utilizando los procedimientos líquido-líquido para que pueda extraerse. Se han intentado procedimientos de líquido-líquido que usan la extracción de intercambio iónico, pero las recuperaciones son bajas.<sup>1</sup>

Se han descrito procedimientos de SPE, que usan los procedimientos de intercambio aniónico para muestras de orina, pero no para muestras de sangre y tejidos después de la muerte. El método más prometedor para usar en estas muestras es el de precipitación de proteína con acetonitrilo; después de centrifugar la muestra, la capa superior se decanta, se evapora, y derivatiza, utilizando una conversión con p-nitro-n-propilcocaína; después el producto puede extraerse con los procedimientos líquido-líquido convencionales.<sup>1</sup>

Actualmente para este tipo de muestras se usan cartuchos de extracción para matrices biológicas utilizadas por Waters Corporation, que utilizan el método de extracción por balance hidrofílico-lipofílico (HLB), estos cartuchos de extracción tienen la ventaja de que retienen tanto fármacos polares como no polares, además no requieren de una muestra muy grande y el porcentaje de recobro es alto, y las condiciones utilizadas principalmente son metanol-agua, esta mezcla se adiciona a la muestra, se agrega ácido fosfórico, se hace un lavado con metanol al 5% y se eluye con metanol.<sup>27</sup>

## B. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (CLAR o HPLC).

La cromatografía es una extensión lógica de la distribución a contracorriente. En vez de una serie discreta de extracciones, ocurre un equilibrio continuo de soluto entre dos fases. En cromatografía, la fase móvil es un líquido o un gas; la fase estacionaria es comúnmente un líquido que recubre la superficie de partículas sólidas, a veces las partículas sólidas mismas pueden servir como fase estacionaria.<sup>1,8,9,10,11</sup>

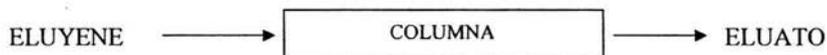
Los adelantos pusieron al cromatógrafo líquido como algo muy similar al cromatógrafo de gases (CG), que se había vuelto el método cromatográfico más popular de los años sesenta. Sin embargo, el HPLC no se limita en cuanto a la volatilidad y la estabilidad térmica de los compuestos como el CG, casi todas clases de compuestos orgánicos pueden ser separadas por esta técnica analítica, que es muy eficaz y rápida, y que utiliza los principios de cromatografía líquida básica.<sup>9,10,11</sup>

Las disminuciones en columna que condensa los diámetros produjeron los aumentos proporcionales en la resistencia de flujo del solvente. Como resultado, se introdujeron las bombas de presión constante, que bombean los líquidos por los sistemas de flujo constante. La eficacia del HPLC permitió usar muestras muy pequeñas, y los métodos clásicos colectivos de eluyentes para el análisis de cualquier tipo de muestras.<sup>9,10,11</sup>

El HPLC se desarrolló entre finales de 1960 y principios de 1970. Hoy, es una técnica de separación ampliamente aceptada para los análisis de muestras en una variedad de áreas, en las que están incluidas, la farmacéutica, biotecnológica, del medio ambiente, polímeros, y la industria alimentaria. El HPLC está disfrutando un aumento firme en los números de ventas instrumentales y publicaciones que describen las nuevas e innovadoras aplicaciones. Algunas recientes áreas de crecimiento incluyen miniaturización de sistemas de HPLC, análisis de ácidos nucleicos, proteínas intactas y extractos de proteínas, análisis de carbohidratos, y análisis de moléculas quirales.<sup>9,10,11,12</sup>

La separación de compuestos con el propósito de identificar, cuantificar o purificar, es uno de los aspectos desafiantes de la Química Analítica.

Las moléculas grandes corren la columna más rápido que las moléculas pequeñas. El eluyente es lo que entra y eluato es lo que sale. La fase móvil se llama eluyente, cuando emerge por la salida de la columna se denomina eluato.<sup>10,11</sup>



El proceso que consiste en hacer pasar un líquido o un gas a lo largo de una columna cromatográfica se le llama elución.<sup>10,11</sup>

El soluto tiene mayor afinidad por la fase estacionaria, se moverá con mayor lentitud a lo largo de la columna. La separación de los solutos depende de las interacciones con el adsorbente en la columna, se ha demostrado que la sílica es un adsorbente adecuado para cromatografía.<sup>10,11</sup>

En la cromatografía de gases, la fase móvil es un gas; mientras que la fase estacionaria, es usualmente un líquido no volátil que recubre un soporte sólido, pero algunas veces es un sólido; el soluto es un gas o líquido volátil.<sup>10,11</sup>

En la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR o HPLC), el líquido eluyente es impulsado a través de la columna a presiones elevadas. En este tipo de cromatografía se distingue:

- Fase estacionaria: puede ser líquida o sólida.
- Fase móvil: puede ser un líquido (un disolvente o una mezcla de disolventes).<sup>10,11</sup>

La cromatografía de líquidos es fundamental en química, porque la mayoría de los compuestos no son suficientemente volátiles o no tienen bastante estabilidad térmica para la cromatografía de gases.<sup>10,11</sup>

#### a. Equipo.

En cromatografía líquida, una muestra se aplica a la cima de una columna de separación llena de una fase estacionaria sólida y un arroyo de una fase móvil líquida. Los componentes de la mezcla están separados y surgen de la columna uno después de otro. El HPLC es una variante de la cromatografía líquida en que, para aumentar la eficacia de la separación, la fase móvil se obliga a fluir a través de la columna a una misma presión alta. La identificación de un compuesto está basado en su tiempo de retención (ése es el tiempo gastado por cada componente en la columna). La base de la separación en HPLC involucra la división de las moléculas del analito entre la fase móvil, líquida y la fase estacionaria sólida. Los componentes esenciales de un sistema de HPLC son: **A)** Depósito de disolvente, **B)** El sistema de bombeo, **C)** Un inyector de muestra de volumen fijo, **D)** Una pre-columna de guardia, **E)** Una columna analítica, **F)** Un detector, **G)** Un sistema de datos y **H)** Una impresora.<sup>9,11</sup>

En la figura 8 se presenta la configuración básica de un equipo de HPLC.

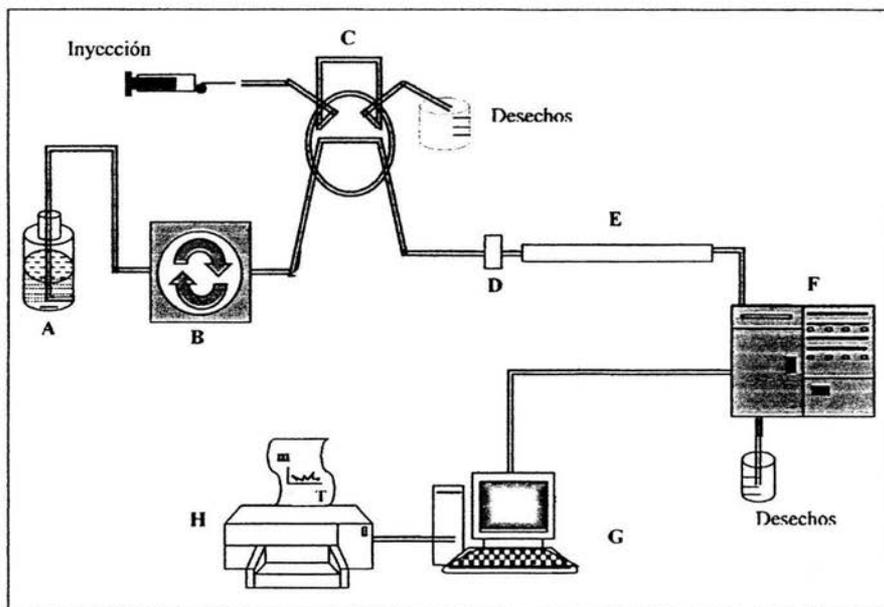


FIGURA 8. Configuración básica de un equipo de HPLC.

### b. Aplicaciones.

Características que debe cumplir la muestra para ser analizada por HPLC.

La muestra debe estar líquida para la inyección en la instrumentación; las muestras sólidas deben ser disueltas en un solvente o fase móvil compatible con la fase estacionaria.

Se inyectan de 1-100 $\mu$ L (generalmente 5-25 $\mu$ L); las cantidades de masa inyectadas varían, dependiendo de la sensibilidad y el rango dinámico del detector para el analito.

La limitación o la extensión al preparar la muestra requerida puede definirse como la complejidad relativa de la muestra. La preparación de la muestra puede incluir cualquiera de los pasos siguientes: la dilución, preconcentración, filtración, extracción, ultra filtración, o derivatización.

El tiempo del análisis está en un rango de 5 minutos a 2 horas (generalmente 10-25 minutos). La preparación de la muestra difiere de muestra a muestra a probar. La preparación de la muestra puede ser extensa y puede requerir más tiempo para la realización del análisis.<sup>9,12</sup>

Los usos generales para HPLC son:

- Separación de una variedad de compuestos: orgánicos, inorgánicos, compuestos biológicos, polímeros, compuestos quirales, compuestos térmicamente lábiles y desde pequeños iones hasta macromoléculas.
- Análisis de impurezas.
- Análisis de compuestos volátiles y no volátiles.
- Aislamiento y purificación de compuestos.
- Separación de compuestos estrechamente relacionados.<sup>9,11</sup>

Las aplicaciones más comunes para la cromatografía de alta resolución son las siguientes:

- Midiendo niveles de compuestos como los aminoácidos, ácidos nucleicos, y proteínas en muestras fisiológicas. Método cualitativo y cuantitativo.
- Midiendo los niveles de principios activos, subproductos sintéticos, o productos de degradación en las formas diferentes formas farmacéuticas.
- Midiendo niveles de compuestos tóxicos como pesticidas o insecticidas.
- Monitoreando muestras del medio ambiente.
- Purificando compuestos de mezclas complejas. Método no destructivo.
- Separando polímeros y determinando su distribución y peso molecular de los polímeros en una mezcla.
- Para control de calidad.
- Para seguir reacciones de síntesis.<sup>9,11</sup>

Las limitaciones de este método son las que a continuación se enumeran:

- La resolución puede ser difícil de lograr con muestras complejas.
- Sólo una muestra puede analizarse en un momento.
- Requiere el entrenamiento para perfeccionar las separaciones.
- El análisis de tiempo puede ser largo (comparado con electroforesis capilar).
- La preparación de la muestra es requerida a menudo.<sup>9,11</sup>

### C. ESPECTROMETRÍA DE MASAS.

Principio: una muestra es bombardeada por un arroyo de electrones, los cuales deben tener la energía suficiente para romper los enlaces covalentes en la muestra para la fragmentación de esta, muchos de estos fragmentos llevarán cargas eléctricas, algunos negativas y otros positivas, correspondiendo a la adición de uno o más electrones. Al Espectrómetro de Masas se proporcionan campos electrostáticos capaces de acelerar las partículas cobradas, es decir los iones gaseosos de señal de carga específica, normalmente positivos, a manera de ignorar los fragmentos neutros e iones de señal opuesta, obteniendo un registro característico para cada analito.<sup>9,11</sup>

El Espectrómetro de Masas es un instrumento que medirá la ionización de las moléculas (iones gaseosos) según sus proporciones de masa-a-carga, ( $m/z$ ). Los físicos que lo desarrollaron estaban interesados en explorar la interacción de partículas cobradas con los campos eléctricos y magnéticos; y después se descubrió que la tal información podría ser útil también para químicos. Principalmente en áreas con aplicaciones orgánicas y bioquímicas.<sup>9,11</sup>

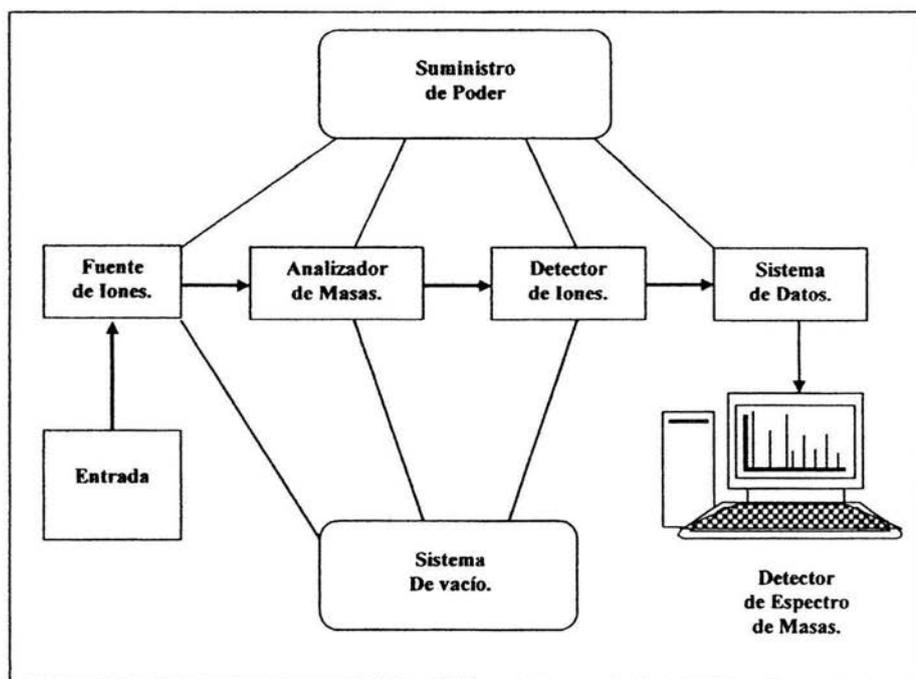
El espectro de masas de un compuesto puro ofrece valiosa información para fines de identificación cualitativa, siendo la determinación de la fragmentación de la molécula de gran ayuda para la identificación del compuesto; su campo de interés abarca todas las áreas donde sea precisa la identificación de compuestos: química orgánica, inorgánica, bioquímica, química agrícola, tecnología de los alimentos, medicina, por supuesto en química forense, etc.<sup>9,11</sup>

#### a. Equipo.

El espectrómetro de masas esta constituido básicamente por los siguientes componentes:

1. Cámara de ionización: electrones generados por un filamento bombardean una muestra, esto ocurre principalmente por impacto electrónico (EI), los fragmentos ionizados (carga +1) son repetidos por el electrodo positivo y conducidos al separador magnético.
2. Salida de vacío: todo el interior de un espectrómetro de masas debe encontrarse al alto vacío.
3. Separador magnético: los iones atraviesan un campo magnético, durante este paso solo atraviesan algunos iones de determinada masa y carga.
4. Detector: una válvula fotomultiplicadora o un fotodiodo genera una señal proporcional al número de iones que incide sobre un elemento.

La figura 9 indica la secuencia interna de los componentes que debe poseer un Espectrómetro de Masas.



**FIGURA 9.** diagrama de bloques de un típico Espectrómetro de Masas. Todos los segmentos están bajo el control de la computadora.

Qué es el Espectrómetro de Masas (MS).

Un MS es un potente sistema para análisis cualitativo y cuantitativo de analitos en cromatografía de gases y de líquidos. La espectrometría de masas es una técnica que se basa en ionizar moléculas gaseosas (de ordinario, convirtiéndolas en cationes), acelerarlas en un campo eléctrico, y luego, separarlas de acuerdo con sus masas.<sup>9,10,11</sup>

La figura 10 muestra un MS cuádruplo conectado a una columna tubular abierta de un cromatógrafo, que registra el espectro de masas de los picos a medida que se eluyen. Los eluatos pasan a través de un conector caliente a una cámara de ionización de impacto del espectrómetro, conectada a una bomba que la mantiene a un vacío elevado. Los iones son acelerados a través de un potencial de 5-15V antes de penetrar en el separador de masas cuádruplo.<sup>9,10,11</sup>

El separador consiste de cuatro barras metálicas paralelas a las que se aplica un voltaje constante y un voltaje oscilante de radiofrecuencia. El campo eléctrico desvía los iones, haciéndoles seguir trayectorias diversas a medida que van de la cámara de ionización hacia el detector, y permitiendo que solo lleguen al detector los que tienen una relación ( $m/z$ ) determinada. Los demás iones (no resonantes) chocan con los cilindros, y se pierden antes de llegar al detector. Variando rápidamente los voltajes aplicados, se seleccionan los iones de diferentes masas que llegan al detector. Con un espectrómetro de masas de cuádruplo se pueden registrar de dos a ocho espectros por segundo, de 800 unidades de masa cada uno. La cromatografía acoplada a un espectrómetro de masas se puede llevar a cabo detectando iones seleccionados o la corriente total de todos los iones.<sup>9</sup>

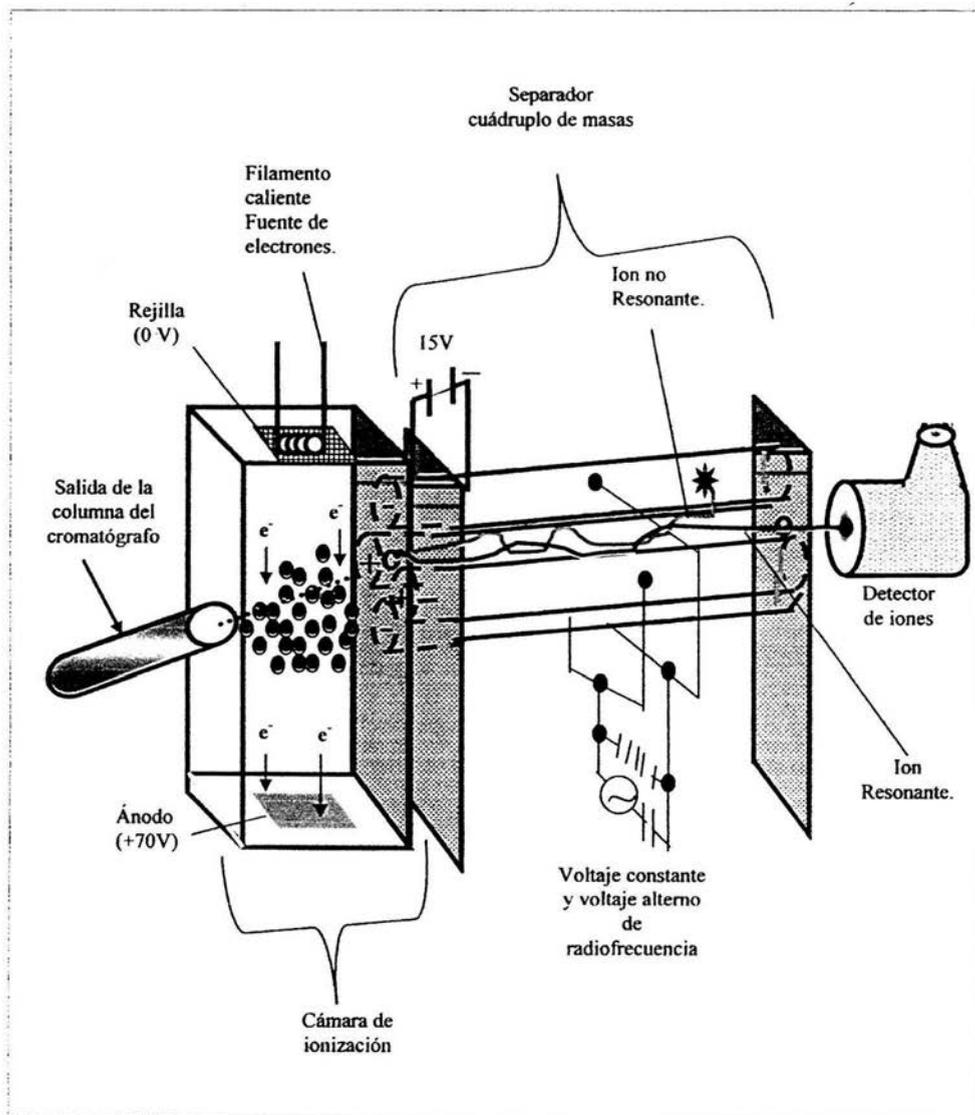
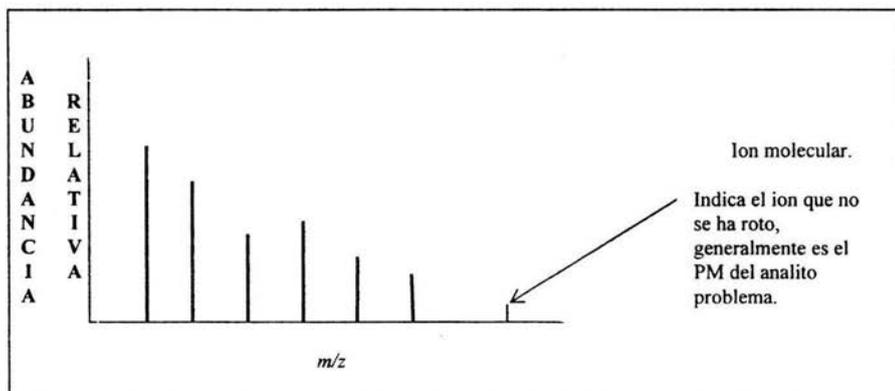


FIGURA 10. Espectrómetro de masas de cuádruplo. Las superficies con que se encaran los cuatro cilindros entre sí tienen una sección transversal hiperbólica.

El proceso de ionización de ordinario suministra suficiente energía para que las moléculas se rompan en diversos fragmentos. Un espectro de masas es un gráfico que muestra la abundancia relativa de cada fragmento que choca con el detector de un espectrómetro de masas.<sup>10,11</sup> Ver figura 11.

El eje de las abscisas de un espectro de masas es  $m/z$ , la masa del ion ( $m$ , en unidades de masa atómica) dividida por el número de cargas que lleva ( $z$ ). La mayoría de los iones tienen una sola carga, de modo que  $m/z$  es equivalente a la masa del ion en unidades de masa atómica.<sup>9,10,11</sup>

El ion molecular ( $M^+$ ), es la molécula ionizada que no ha sido fragmentada. Esta señal generalmente es pequeña y aparece del lado derecho del espectro de masas. Esto es cierto siempre y cuando la molécula no tenga N ni O.<sup>9,10,11</sup>



**FIGURA 11. Espectrómetro de Masas, se muestra ion molecular  $M^+$**

Las características más importantes de esta técnica son:

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

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

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



- II. Un ion formado se fragmenta:



- III. Como se observa en la figura 12 los fragmentos iónicos formados son separados magnéticamente de acuerdo con sus masas moleculares.<sup>10,11</sup>

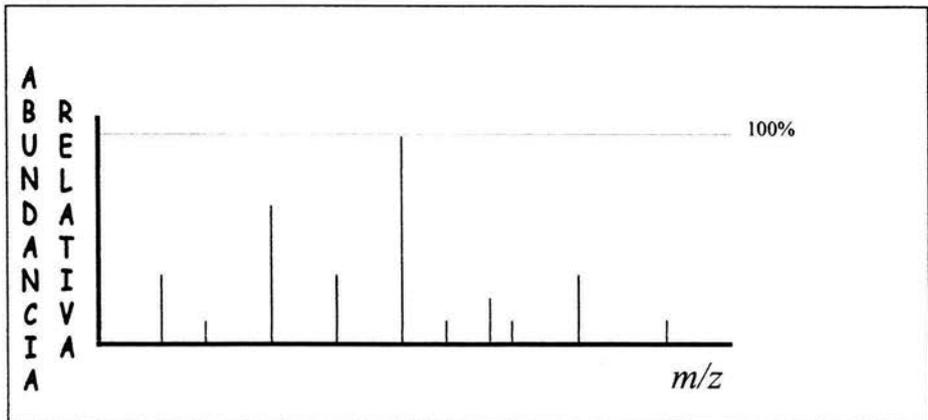


FIGURA 12. Espectro de masas de un analito. Gráfica de número de iones formados en función de la masa y carga iónica.



Las ventajas primarias del LC/MS son las siguientes:<sup>9,11</sup>

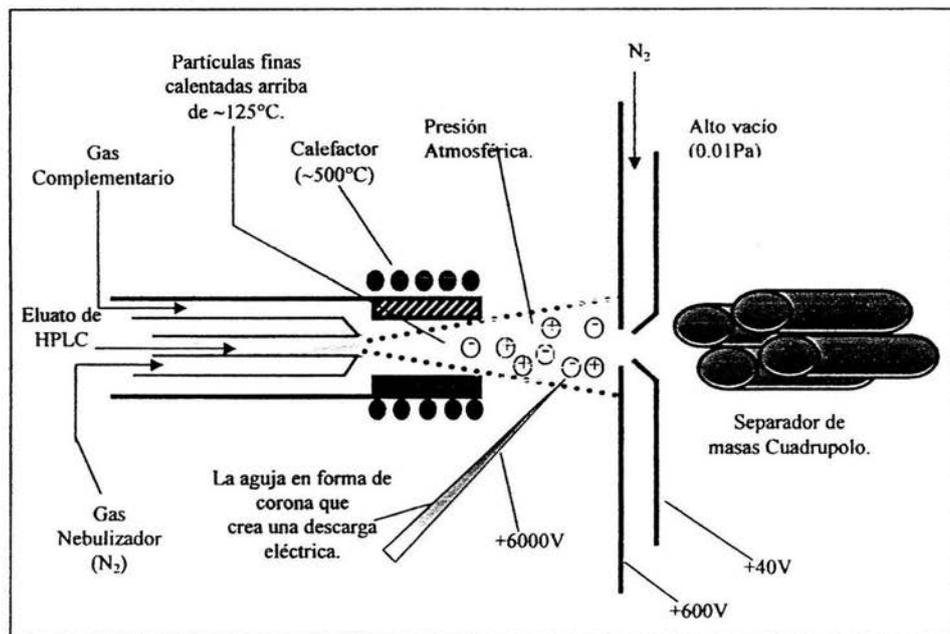
- Ambas capacidades las del HPLC y el MS son sinergistas reforzados. Por un lado, la necesidad para la separación de alta resolución por HPLC es reducida, y por otro lado, un espectrómetro de masas de baja resolución y económico puede usarse como un identificador de masas eficaz.<sup>9</sup>
- La especificidad molecular del análisis se mejora porque el analito se identifica los dos métodos por tiempo de retención cromatográfico y los datos de MS dan la estructura específica.
- Se analizan mezclas de complejidades variantes fácilmente.
- La sensibilidad de análisis se mejora porque la muestra entra en el MS en forma una banda estrecha, enfocada por HPLC.
- Se evitan varios pasos experimentales laboriosos, mientras se produce una pérdida mínima de la muestra y reducción en el tiempo de análisis global.
- Se requiere menos muestra que en el análisis de cromatografía de líquidos acoplado a masas desconectado.
- Debido a la pureza de la muestra por HPLC, la supresión en la señal en el análisis de MS se minimiza y la calidad del espectro de masas se mejora.<sup>9,10,11</sup>

#### Cómo funciona

Un instrumento de cromatografía de líquidos acoplado a un espectrómetro de masas, consiste en tres componentes principales: un cromatógrafo de líquidos (para separarse e identificarse una mezcla compleja de compuestos), una interfase (para transportar el analito a la fuente de iones de un espectrómetro de masas) y un espectrómetro de masas (para ionizar y friccionar el analito con los componentes individualmente separados).<sup>9,10,11</sup>

En la figura 13 se ilustra el funcionamiento del equipo acoplado.

Un aerosol fino se produce por el flujo de gas atomizando y el calentador. La descarga eléctrica de la aguja de la corona crea los iones gaseosos del analito. La alta capacidad de las bombas de vacío es requerida para ocuparse del alto flujo de solvente, para mantener un vacío adecuado en el espectrómetro de masas.<sup>9</sup>



**FIGURA 13.** Interfase entre la presión atmosférica e ionización química de una columna de Cromatografía Líquida y un Espectrómetro de masas.

**a.** Aplicaciones.

Aplicaciones comunes:

- Trazos de péptidos y de carbohidratos.
- Determinación de pureza y detección selectiva de una variedad de compuestos.
- Identificación de productos metabólicos.
- Identificación de modificaciones en las proteínas y péptidos.
- El análisis de drogas, toxinas, y los compuestos endógenos de muestras biológicas.
- La confirmación de síntesis de péptidos e identificación de los productos laterales.<sup>9,10,11</sup>

## V. METODOLOGÍA.

### A. PRINCIPIO DEL ANÁLISIS.

Al iniciar con esta propuesta de un método de análisis cualitativo y cuantitativo, es importante aclarar, que en este tipo de estudios realizados para cocaína por HPLC acoplado a Espectrometría de Masas, hay diferentes técnicas por espectrometría de masas y diferentes muestras biológicas.

Es necesario aclarar también que para la identificación de cocaína, es necesario tomar en cuenta el tipo de muestra de la cual será extraída para su posterior identificación, ya que como se mencionó en esta investigación, el principal metabolito de la cocaína encontrado en el organismo es la benzoilecgonina, por lo que esta última sustancia será de gran interés para su identificación y cuantificación.

El primer paso será siempre llevar a cabo las pruebas presuntivas, debido a que, el análisis cualitativo y cuantitativo por HPLC acoplado a Espectrometría de Masas, resulta ser muy caro y consume mucho tiempo en comparación con las pruebas presuntivas de screening, que además pueden dar una idea del tipo de sustancia que puede estar presente en la muestra biológica, y con esto orientar hacia la elección del procedimiento a seguir, por lo que se le dará un adecuado tratamiento a las muestras que presuntamente están consideradas como evidencias en casos legales.<sup>1-4,6,7</sup>

En el caso de observar que los resultados de las pruebas presuntivas apuntan hacia la identificación de cocaína, será necesario proceder con la prueba confirmativa, por lo que la muestra se procesará mediante extracciones, a manera de determinar la presencia de cocaína o sus metabolitos, analizando el extracto mediante HPLC acoplado a Espectrometría de Masas; mediante este análisis se identificarán y confirmarán la presencia de cocaína y sus metabolitos principales.<sup>1-4</sup>

Los constituyentes separados e identificados serán comparados con un estándar de cocaína, que se tratará de la misma manera.

### B. TIPOS DE MUESTRA.

En general todos los xenobióticos pueden ser determinados en matrices biológicas y de manera directa e indirecta.

Así como también en matrices no biológicas se pueden determinar sustancias de interés legal por métodos directos e indirectos.

Matrices biológicas.

Sangre, orina, jugo gástrico, tejido corporal, cabello, etc.

Matrices no biológicas.

Polvo seco sospechoso, plantas, hojas vegetales, tabletas, etc.

En cualquier caso se sugiere primero que se lleven a cabo los análisis presuntivos (screening), como pruebas colorimétricas y en algunos casos se debe llevar a cabo la cromatografía en capa fina, ya que por la gran cantidad de sustancia tóxicas existentes no sería posible llevar a cabo análisis confirmativos de muestras sin tener idea del tipo de sustancia que se trata. De otra manera no se conocerían ni las condiciones, ni el proceso a seguir para el análisis.

Las pruebas presuntivas serán siempre la base para cualquier análisis donde se sospeche de presencia de drogas de abuso.

**a.** Matrices biológicas.

Aspectos legales relacionados con la toma y conservación de muestras para un análisis de xenobióticos en fluidos biológicos.

- ⇒ El personal que tome la muestra es responsable de que se rotule, de su conservación antes de que llegue al laboratorio y de su transporte, además de facilitar los documentos necesarios con todos los datos requeridos (solicitud de peritaje).
- ⇒ La toma de muestra debe ser supervisada con el objetivo de que no sea adulterada o sustituida, lo que conlleva a la invalidación de la misma.
- ⇒ Las muestras para el análisis toxicológico deben recogerse teniendo en cuenta las condiciones particulares de cada caso y las referentes a la distribución y metabolismo.

Se recomienda la orina, como muestra idónea para el análisis de drogas de abuso, sin embargo la sangre también es una buena muestra para el análisis de este tipo de sustancias, ya que se puede identificar la sustancia sin haber sido modificada químicamente, es decir se encuentra la sustancia y sus metabolitos de interés, así como la selección de las muestras adecuadas para el análisis y su correcta conservación son requisitos indispensables en una investigación toxicológica.

- ⇒ Para muestras de orina se recomienda, inmediatamente después de su recolección, tomar la temperatura y pH; si se sospecha de cualquier adulteración, se debe notificar al laboratorio.

- ⇒ Para muestras de sangre es conveniente obtener las muestras donde ésta fluya libremente, sin necesidad de presionar algún tejido, la razón es que, si se presiona se recogerá también fluido hístico que puede tener concentraciones bastante diferentes del tóxico, introduciendo así modificaciones importantes en la concentración del tóxico detectado en la sangre.
- ⇒ El éxito de la investigación toxicológica se encuentra estrechamente ligado a la cantidad, calidad y grado de conservación de las muestras que se remitan. Las diversas actuaciones de la toxicología forense determinan el tipo de muestra y la investigación requerida en cada caso.
- ⇒ En la práctica las muestras para estas investigaciones se reducen a sangre y orina, que se remitirán en cantidad suficiente para llevar a cabo los análisis pertinentes y conservar una parte de aquéllas en el laboratorio durante algún tiempo para posteriores comprobaciones.

Sin embargo no por esto, las muestras de tejidos o fluidos biológicos dejan de ser de gran importancia para el análisis de tóxicos de interés forense.

#### **b. Matrices no biológicas.**

Aspectos relacionados con la conservación de muestras para el análisis de sustancias tóxicas en matrices no biológicas.

- ⇒ El personal que tome la muestra es responsable de que se rotule, de su conservación antes de que llegue al laboratorio y de su transporte, además de facilitar los documentos necesarios con todos los datos requeridos (solicitud de peritaje).
- ⇒ La toma de muestra debe ser supervisada con el objetivo de que no sea adulterada o sustituida, lo que conlleva a la invalidación de la misma.
- ⇒ Cuando las muestras a analizar son hojas frescas, será necesario para su mejor conservación y análisis posterior, someterlos a secado, a continuación se mencionan algunos métodos de conservación y secado utilizados comúnmente:
  - Las hojas secas se pueden conservar en perfectas condiciones durante algunas semanas en refrigeración, en recipientes plásticos o bolsas de papel.
  - La forma más fácil de secar las hojas es ponerlas sobre hojas de periódico o papel impreso, encima de una superficie plana, donde corra el aire, separando y distribuyendo las hojas a lo largo de todo el papel y sin que estén en contacto unas con otras; después de 2 a 3

días la mayoría de las hojas estarán secas, habiendo disminuido de tamaño y observándose también un cambio de color.

- La forma más recomendada es colocar las hojas en un horno a una temperatura de aproximadamente 30°C por algunas horas hasta el secado, una vez secas las hojas se trituran y se procede con la extracción.

⇒ Estas muestras se remitirán en cantidad suficiente para llevar a cabo los análisis pertinentes y conservar una parte de aquéllas en el laboratorio durante algún tiempo para posteriores comprobaciones.

### C. Aspectos legales.

Aunque etimológicamente la palabra *narcótico* hace referencia al sueño inducido artificialmente, en México y en muchas otras partes del mundo, siguiendo la doctrina estadounidense, se les llama narcóticos a todas las sustancias prohibidas, ya sea que produzcan sueño, lo quiten o simplemente no interfieran en las funciones del sueño. En la terminología oficial todas son *narcóticas*. Desde aquí es posible constatar que los criterios de clasificación oficial obedecen poco a la farmacología y mucho menos a la etimología.

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

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

En el código penal para el Distrito Federal, en el título séptimo, delitos contra la salud, capítulo I nos explica acerca de:<sup>28,29</sup>

La producción, tenencia, tráfico, proselitismo y otros actos en materia de narcóticos. Esto se especifica en los siguientes artículos:

**Artículo 193.** Se consideran narcóticos a los estupefacientes, psicotrópicos y demás sustancias o vegetales que determinen la Ley General de Salud, los convenios y tratados internacionales de observancia obligatoria en México y los que señalen las demás disposiciones legales aplicables en la materia.

Los narcóticos empleados en la comisión de los delitos a que se refiere este capítulo, se pondrán a disposición de la autoridad sanitaria federal, la que procederá de acuerdo con las disposiciones o leyes de la materia y su aprovechamiento lícito o a su destrucción.<sup>28,29</sup>

Tratándose de instrumentos y vehículos utilizados para cometer los delitos considerados en este capítulo, así como de objetos y productos de estos delitos, cualquiera que sea la naturaleza de dichos bienes, se estará a lo dispuesto en los artículos 40 y 41. Para este fin el Ministerio público dispondrá durante la averiguación previa el aseguramiento que corresponda y el destino procedente en apoyo a la procuraduría de justicia, o lo solicitará en el proceso, y promoverá el decomiso para que los bienes de que se trate o su producto se destine a la impartición de justicia, o bien, promoverá en su caso, la suspensión y la privación de derechos agrarios o de otra índole, ante las autoridades que resulten competentes conforme a las normas aplicadas.<sup>28,29</sup>

**Artículo 194.** Se impondrá prisión de diez a veinticinco años y de cien hasta quinientos días de multa al que:

**I.** Produzca, transporte, trafique, comercie, suministre aún gratuitamente o prescriba alguno de los narcóticos señalados en el artículo anterior, sin la autorización correspondiente a que se refiere la Ley General de Salud.

Para los efectos de esta fracción, por producir se entiende: manufacturar, fabricar, elaborar, preparar o acondicionar algún narcótico, y por comerciar: vender, comprar, adquirir o traspasar algún narcótico.

**II.** Introduzca o extraiga del país alguno de los narcóticos comprendidos en el artículo anterior, aunque fuere en forma momentánea o en tránsito.

Si la introducción o extracción a que se refiere esta fracción no llegare a consumarse, pero de los actos realizados se desprenda claramente que ésta era la finalidad del agente, la pena aplicable será de hasta las dos terceras partes de la prevista en el presente artículo.

**III.** Aporte recursos económicos de cualquier especie, o colabore de cualquier manera al financiamiento, supervisión o fomento para posibilitar la ejecución de alguno de los delitos a que se refiere este capítulo.

**IV.** Realice actos de publicidad o propaganda, para que se consuma cualesquiera de las sustancias comprendidas en el artículo anterior.

Las mismas penas previstas en este artículo y, además, privación del cargo o comisión e inhabilitación para ocupar otro hasta por cinco años, se impondrán al servidor público que,

en ejercicio de sus funciones o aprovechando su cargo, permita, autorice o tolere cualesquiera de las conductas señaladas en este artículo.<sup>28,29</sup>

**Artículo 195.** Se impondrá de cinco a quince años de prisión y de cien a trescientos cincuenta días de multa, al que posea alguno de los narcóticos señalados en el artículo 193, sin la autorización correspondiente a que se refiere la Ley General de Salud, siempre y cuando esa posesión sea con finalidad de realizar alguna de las conductas previstas en el artículo 194.

**Artículo 198.** Al que dedicándose como actividad principal a labores propias del campo, siembre, cultive o coseche plantas de marihuana, amapola, hongos alucinógenos, peyote o cualquier otro vegetal que produzca efectos similares, por cuenta propia, o con financiamiento de terceros, cuando en el concurren escasa instrucción y extrema necesidad económica, se le impondrá prisión de uno a seis años.

Igual pena se impondrá al que en un predio de su propiedad, tenencia o posesión, consienta la siembra, el cultivo o la cosecha de dichas plantas en circunstancias similares a la hipótesis anterior.<sup>28,29</sup>

Si en las conductas descritas en los dos párrafos anteriores no concurren las circunstancias que en ellos se precisan, la pena será de hasta las dos terceras partes de la prevista en el artículo 194, siempre y cuando la siembra, cultivo o cosecha se hagan con la finalidad de realizar alguna de las conductas previstas en las fracciones I y II de dicho artículo. Si falta esa finalidad la pena será de dos a ocho años de prisión.<sup>28,29</sup>

Si el delito fuere cometido por servidor público de alguna corporación policial, se le impondrá, además de la destitución del empleo, cargo o comisión públicos y se le inhabilitará de uno a cinco años para desempeñar otro, y si el delito lo cometiera un miembro de las Fuerzas Armadas Mexicanas en situación de retiro, de reserva o en activo, se le impondrá, además de la pena de prisión señalada, la baja definitiva de la Fuerza Armada a que pertenezca y se le inhabilitará de uno a cinco años para desempeñar cargo o comisión públicos.

En la ley general de salud en el capítulo VI en el apartado de sustancias psicotrópicas. Se encuentran los siguientes artículos:

**Artículo 255.** En relación con las medidas de control y vigilancia que deberán adoptar las autoridades sanitarias, las sustancias psicotrópicas se clasifican en cinco grupos:

- I. Las que tienen valor terapéutico escaso o nulo y que, por ser susceptibles de uso indebido o abuso, constituyen un problema especialmente grave para la salud pública.

- II. Cualquier otro producto, derivado o preparado que contenga las sustancias señaladas en la relación anterior y cuando expresamente lo determine la Secretaría de Salud o el Consejo de Salubridad General, sus precursores químicos y en general los de naturaleza análoga.
- III. Las que tienen algún valor terapéutico, pero constituyen un problema grave para la salud pública.
- IV. Las que tienen valor terapéutico, pero constituyen un problema para la salud pública.
- V. Las que tienen amplios usos terapéuticos y constituyen un problema menor para la salud pública.
- VI. Las que carecen de valor terapéutico y se utilizan corrientemente en la industria, mismas que se determinarán en las disposiciones reglamentarias correspondientes.  
28,29

A continuación se mencionan los siguientes puntos relacionados con la toma y conservación de muestras para análisis de sustancias tóxicas en matrices biológicas y no biológicas.

1. El personal que tome la muestra es responsable de que se rotule, de su conservación antes de que llegue al laboratorio y de su transporte, además de facilitar los documentos necesarios con todos los datos requeridos (solicitud de peritaje).
2. La toma de la muestra debe ser supervisada con el objetivo de que no sea adulterada o sustituida lo que conlleva a la invalidación de la misma.
3. Es importante mantener las muestras en frío y en un lugar oscuro en el período de tiempo entre su toma y el análisis de las mismas.
4. Cuando la muestra llega al laboratorio se debe de revisar contra las solicitudes de peritaje para asegurar que los datos coincidan plenamente, guardando una de las muestras para reiteración de los análisis si fuera necesario.
5. Las solicitudes de peritaje deben contener:
  - a) Órgano que solicita el peritaje y antecedentes del caso.
  - b) Nombre y apellidos del implicado, edad y peso.
  - c) Fecha, hora y tipo de muestra que se colecta.
  - d) Tiempo aproximado del último consumo.

- e) Sustancias consumidas en las últimas horas o días.
  - f) Patrón de consumo.
  - g) Temperatura y pH de la muestra en el momento de su recolección.
6. Los casos se deben inscribir en un registro de entrada, dándole a la misma un número consecutivo que será escrito en los frascos y en solicitud de peritaje por la persona que la reciba, anotando también la cantidad de muestra recibida, hora de recepción, etc.
7. Si los análisis no se comienzan en el momento de la recepción de las muestras deben guardarse en condiciones apropiadas dependiendo de la muestra.
- ✧ Lo más recomendable es el envío de sangre total con adición de un anticoagulante adecuado, tan pronto como sea posible. Se centrifuga para separar el plasma y evitar que la hemólisis de los eritrocitos interfiera con el análisis posterior.
  - ✧ La cocaína es un éster, y este puede ser hidrolizado fácilmente durante el almacenamiento a temperatura ambiente, e inclusive a bajas temperaturas, por las esterasas presentes en la sangre y tejidos; así mismo el pH alcalino durante la extracción puede promover que ésta sea hidrolizada.
  - ✧ Para contrarrestar la actividad esterásica, se puede adicionar a la muestra solución de fluoruro sódico al 1% p/v, la hidrólisis también puede reducirse llevando el pH de la muestra por debajo de 4.
8. Es importante mantener una completa seguridad y confidencialidad en todo momento, cualquier información relacionada con el caso debe considerarse secreta y colocarse en un lugar seguro.
9. Al concluir el caso debe realizarse un informe pericial dirigido al órgano de instrucción que lo solicita, el cual, debe reflejar no solo los resultados de los análisis realizados, sino todos los procedimientos que se utilizaron para arribar a los mismos.

Los objetivos que se persiguen en el terreno médico-legal mediante el análisis de este tipo de muestras son los siguientes:

- I. Establecer el diagnóstico de enfermedades que interesan con fines judiciales.
- II. Comprobar un estado tóxico y su pronóstico o circunstancias.
- III. Detectar el consumo de drogas de abuso.

La normativa correspondiente es la siguiente:

Sangre total sin coagular:

- Agente conservante: Dos gotas de heparina o de solución al 10% de fluoruro sódico o EDTA-K<sub>2</sub> por cada 5mL de sangre.
- Cantidad: Como mínimo 20mL para la investigación toxicológica general (screening) y la posterior confirmación y cuantificación del tóxico.
- Tipo de recipiente y rotulado: Las muestras se dispondrán en recipientes de tamaño adecuado, preferentemente limpios y secos, y cerrados herméticamente. Cada recipiente debe llevar una etiqueta con indicación de la muestra contenida, nombre del paciente, fecha, procedencia de la muestra y cualquier advertencia sobre las precauciones en su manipulación (SIDA, hepatitis, etc.).

### C. TRATAMIENTO.

La extracción de la cocaína se efectúa utilizando disolventes orgánicos, por ejemplo: metanol, éter, hexano, cloroformo, entre otros, así como también ácidos y bases diluidas.

#### a. Extracción a partir de suero.

La sangre es una de las muestras biológicas más útiles para la identificación de tóxicos y especialmente para el análisis cuantitativo. Sin embargo no hay que olvidar, que los tóxicos orgánicos básicos alcanzan concentraciones muy bajas en esta muestra, siendo muchas veces difícil su detección por los métodos de screening.

También debe tenerse en cuenta el hecho de la distribución del tóxico en la sangre. Normalmente los tóxicos se distribuyen entre los eritrocitos y el plasma en proporciones variables para cada sustancia.

La mayor parte de los tóxicos orgánicos van disueltos en el plasma o unidos a proteínas, mientras que son pocos los que se transportan unidos a los hematíes. Por ello la sangre total y el plasma son las muestras más representativas para este caso.

Usando sangre total nos aseguramos, de que, tanto los tóxicos que se concentran en los eritrocitos, como los que se unen a las proteínas van a estar presentes en la muestra analizada.

Sin embargo el plasma resulta más cómodo, ya que posee menos interferencias y pigmentos que la sangre y, se evita la formación de emulsiones con los disolventes orgánicos, como sucede frecuentemente con la sangre total.<sup>5</sup>

#### D. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO.

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

Debe considerarse y recordarse que al tratarse de matrices biológicas, se deben tomar las medidas de bioseguridad, ya que este tipo de muestras se consideran potencialmente peligrosas o infecciosas y manejarse de acuerdo a la normatividad aplicable.

La validación de métodos analíticos es parte fundamental del desarrollo de una nueva formulación y de la técnica de análisis, ya que es durante esta secuencia de pruebas y análisis, donde el químico se da cuenta si el estudio, el cual está siendo evaluado sistemáticamente, cumple con los propósitos para los cuales fue diseñado.

La validación de un método analítico se define como el proceso por el cual queda establecido, por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requerimientos para las aplicaciones analíticas deseadas.

El proceso de validación de un método en particular está basado en principios científicos adecuados y ha sido optimizado para propósitos prácticos de medición.

Como ya se había mencionado antes la cocaína es una sustancia de uso ilegal, por lo que los resultados obtenidos serán de gran valor al ser presentados en una corte, que esperará mediante la información proporcionada soportar o impugnar los argumentos presentados, con el fin de indicar sanciones penales; por esto es importante la fundamentación y homogeneidad en los resultados presentados tanto por la defensa como por la parte acusadora sobre la misma prueba, para que esto sea posible es necesario llegar a la validación.<sup>21</sup>

Las muestras deben manejarse de acuerdo a un PNO establecido previamente; los estudios deben ser realizados de acuerdo al Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación y con apego a las Buenas Prácticas Clínicas.

Con respecto a las condiciones de almacenamiento de las muestras, se debe evaluar la estabilidad del o los compuestos presentes en la matriz biológica, bajo las condiciones de almacenamiento en las que se mantendrán las muestras, por un periodo por lo menos equivalente al que transcurre desde la obtención de la muestra hasta su análisis.

Se debe evaluar la estabilidad del o los compuestos por analizar al congelar y descongelar a temperatura ambiente muestras de concentración conocida del o los compuestos en la matriz biológica; esto constituye un ciclo de congelación-descongelación. Se deben evaluar al menos dos ciclos de congelación-descongelación antes de analizar las muestras<sup>21</sup>.

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

1. Realizar la validación del método analítico con el mismo tipo de matriz biológica que aquella de las muestras biológicas.
2. Antes de la validación, establecer los criterios para aceptar o rechazar los experimentos de validación; sustentar científicamente estos criterios y documentar las medidas correctivas
3. Llevar a cabo la validación una vez establecidas las condiciones analíticas, e incluir como mínimo los parámetros que se describen a continuación:

✓ Rango: establecer el intervalo en función de las concentraciones esperadas del compuesto por analizar. Este debe estar constituido al menos por cinco concentraciones distintas sin incluir las muestras blanco, y debe incluir el límite de cuantificación y concentración máxima del rango.

✓ Recuperación absoluta: analizar al menos por triplicado un mínimo de tres concentraciones conocidas; baja, media y alta del o los compuestos por analizar en matriz biológica, dentro del rango. Comparar estos resultados con las respuestas de soluciones del mismo compuesto en las mismas concentraciones y en los mismos disolventes. El porcentaje de estas razones no necesariamente es el 100%, pero debe ser reproducible en cada nivel dentro del rango.

✓ Linealidad: definir un modelo que describa la relación matemática entre concentración y respuesta. Esta relación debe ser continua y reproducible a lo largo del rango.

✓ Precisión.

➤ Repetibilidad: analizar en un mismo día por quintuplicado, un mínimo de tres concentraciones conocidas; baja, media y alta del o los compuestos por analizar en la matriz biológica. Estas concentraciones deben ser diferentes a las de la curva de calibración, pero deben incluirse en el rango. El coeficiente de variación no debe ser mayor que el 15%.

➤ Reproducibilidad intralaboratorio: analizar por duplicado durante tres días, un mínimo de tres concentraciones conocidas; baja, media y alta del o los compuestos por analizar en matriz biológica. Estas concentraciones deben ser diferentes a las de la curva de calibración, pero deben incluirse en el rango. El coeficiente de variación no debe ser mayor que el 15%.

✓ Exactitud: el valor promedio de las determinaciones en cada nivel de concentración de los datos de repetibilidad y reproducibilidad deben estar dentro del  $\pm 15\%$  del valor nominal de concentración.

✓ Estabilidad: determinar las condiciones de temperatura y tiempo entre otros, en las que el compuesto permanezca estable en la matriz biológica, durante su manejo, almacenamiento y procesamiento, al evaluar la respuesta de la concentración del compuesto por analizar en la matriz biológica, en muestras preparadas al menos por duplicado, a tres niveles de concentración dentro del rango.

✓ Límite de cuantificación: analizar por quintuplicado la concentración más baja del rango de trabajo. Se considera que el punto tiene validez como límite de cuantificación, si su valor promedio cae dentro del  $\pm 20\%$ .

✓ Límite de detección: determinar la concentración a la cual la señal del compuesto por analizar en la matriz biológica puede distinguirse en los niveles de ruido o de una muestra libre del compuesto de interés.

✓ Selectividad: establecer la selectividad del método al analizar muestras blanco de la matriz biológica proveniente de por lo menos seis individuos. Evaluar el método contra posibles interferencias (por ejemplo: metabolitos, productos de degradación del compuesto de interés y cualquier otro fármaco o sustancia administrada de manera contaminante). No deben existir interferencias en la cuantificación del compuesto por analizar <sup>21</sup>.

Finalmente se debe elaborar un informe detallado de la validación del método analítico que incluya todos los criterios antes descritos.

### E. MÉTODO PROPUESTO PARA EL ANÁLISIS DE COCAÍNA.

1. Centrifugar para separar los eritrocitos del suero esto se realiza a 1200rpm por 3 minutos.
2. La extracción se realiza con un cartucho de balance lipofílico-hidrofílico (HLB) de 1cc/30mg.
3. Para precipitar proteínas, se agrega al cartucho una mezcla de metanol-agua (1:1), a un mL de suero, que previamente ha sido colocado en el cartucho, además se deben agregar 20 $\mu$ L de ácido fosfórico.
4. Después de esto se hace un lavado con metanol al 5% en agua; este se realiza para eliminar las proteínas u otras moléculas grandes que pudieran estar presentes en la muestra.
5. Eluir con metanol. Esto se hace para arrastrar las moléculas de interés, que en este caso es cocaína.
6. Concentrar la muestra bajo flujo de nitrógeno a 40°C y reconstituir con una mezcla de agua-metanol 80:20 v/v, estas condiciones son para correr la muestra en fase reversa.
7. Método de HPLC con columna C18, de 39mm x 150mm con precolumna de 3.9mm x20mm. La precolumna se utiliza para conservar en buenas condiciones la columna.
8. La muestra esta constituida por 1mL de extracto de suero reconstituido.
9. La fase móvil consta de **A)** fosfato de potasio 20mM a pH 7 y **B)** metanol. Estas condiciones se utilizan para que no existan cambios en la molécula de interés, que en este caso se trata de cocaína.
10. La velocidad de flujo es de 1.0mL por minuto.
11. La detección es con un detector de UV a 235nm.
12. Finalmente se inyecta la muestra al equipo de Espectrometría de Masas, para que sea identificada y cuantificada. Este equipo debe estar a su vez acoplado al sistema de Ionización por Electro Spray.
13. Estos equipos cuentan con bibliotecas electrónicas donde se pueden comparar los resultados obtenidos y dar un resultado confiable en el área de la química legal.

## VI. CONCLUSIONES

Al realizar la revisión bibliográfica sobre las propiedades de la cocaína, se encontró que puede ser encontrada sin modificación en sangre, principalmente en suero, pero también puede encontrarse su principal metabolito, el cual nos da una señal del consumo de este fármaco.

Cabe mencionar que este fármaco también puede ser encontrado en orina pero en mayor medida su metabolito por lo que se han realizado mucho más estudios en muestras de este tipo.

Los métodos presuntivos que se encuentran en uso actualmente son muy útiles, ya que nos dan una orientación de si el fármaco de interés este presente en la muestra.

Los resultados que se esperan son muy semejantes a los obtenidos en un Cromatógrafo de Gases acoplado a Espectrometría de Masas, es decir tanto el cromatograma como el espectro de masas, como el mostrado en la figura 14, el cual fue proporcionado por Laboratorios Azteca S.A. de C.V.

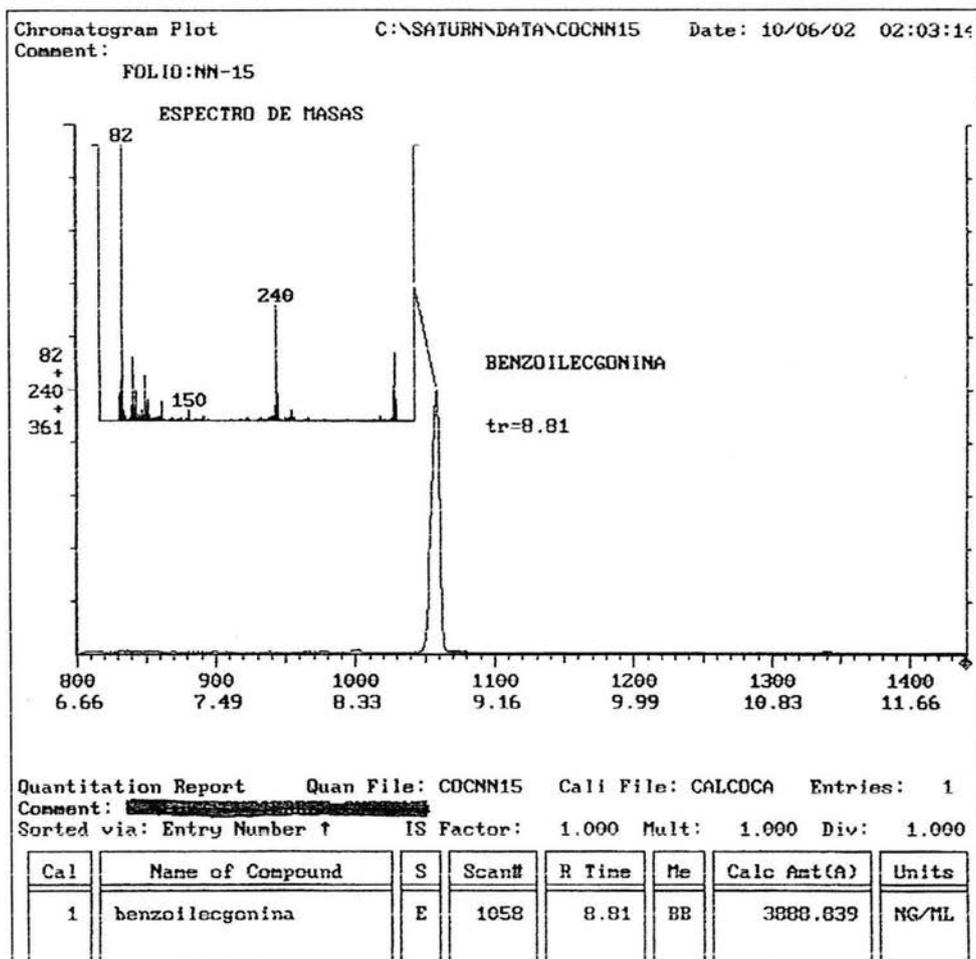
Las ventajas de este método propuesto son: la metodología de extracción es de manera muy rápida, el acoplamiento de los métodos de HPLC/MS son precisos y exactos, por lo que se reduce el análisis y permite la identificación y cuantificación tanto de cocaína como de sus metabolitos de interés.

Además de que estos equipos cuentan con bibliotecas electrónicas de diferentes compuestos, en donde los resultados de las muestras son identificados y comparados inmediatamente con estas.

También deben anexarse tanto los datos del individuo, como de la sustancia que se busca:

- Nombre.
- Edad.
- Sexo.
- Sustancia que se busca.
- Sustancia encontrada.
- Fecha y hora del estudio.

Finalmente con base en el Diplomado en Química Legal, al validar este método de identificación y cuantificación de cocaína se puede dar un soporte legal en el hallazgo de la cocaína o su metabolito principal (benzoilecgonina). Sin embargo no puede determinarse con que frecuencia se utiliza esta droga ni el deterioro o severidad del daño a la persona. Pero de esta manera si se puede dar una respuesta o dictamen confiable en el marco legal acerca del uso o consumo de la cocaína.



**FIGURA 14.. Cromatograma y espectro de Masas de Benzoilecgonina por GC/MS.**

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. Barry L. Principles of Forensic Toxicology. USA, 1999: 80-128, 221-245.
2. Flores. F. J. T. Medicina Forense. México. Editorial HARLA, 1991: 302-305.
3. Bernard Knight. Medicina Forense de Simpson. Santa Fe de Bogota, Colombia. El manual Moderno, 1994: 321, 325,326.
4. Vargas A. E.. Medicina Legal. México. Editorial Trillas, 1996: 314-321.
5. Goodman Gilman, Alfred. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica, 9ª. ed. Impreso en México: Mc Graw-Hill, 1996: 141, 142, 360, 361, 609-611.
6. Clarke's M A. Isolation and identification of Drugs in Pharmaceuticals, Body fluids, and Post-Mortem material, 3ªed. London :The Pharmaceutical Press, 1986:489-490.
7. Casarett and Doulls, Curtis D. Klaassen, Toxicology. The basic Science of Poisons. New York, USA. Mc Graw-Hill, 1996: 956-958.
8. Gisbert Calobaing J A. Medicina Legal y Toxicológica. México. Editorial Masson-Salvat, 1987: 576-608.
9. Settle F A. Handbook of Instrumental Technique for Analytical Chemistry, New Jersey, USA. Prentice Hall, 1997: 647-661.
10. Harris C D. Quantitative Chemical Analysis, 5a. edit. New York, USA., Edit. Iberoamericana, 1999: 742-749.
11. Harris C D. Química Analítica Cuantitativa. 4a. Ed. New York, USA. Editorial Iberoamericana. 1999: 619-629, 650-689.
12. Dennis J R., Maintaining and troubleshooting HPLC Systems, USA A Wiley-Interscience publication, John Wiley and sons, 1981: 1-5.
13. Lunn G. HPLC Methods for Analysis printed in USA, A Wiley- Interscience publication, John Wiley and sons, 2000: Vol.2: 1602-1605, 1614-1617.
14. Kelly L K. The Accuracy and Reliability of Test for Drugs of Abuse in Urine Samples, *Pharmacotherapy* 8,number 5 (1988), 263-275.
15. O. Quintela, A.M. Bermejo, M.J. Tabernero, S. Strano-Rossi, M. Chiarotti, A.C.S. Lucas, Evaluation of cocaine, amphetamines and cannabis use in university students through hair analysis: preliminary results, *Forensic Science International* 107 (2000), 273-279.
16. F. Ursitti, J. Klein, E. Sellers, and G. Koren, Use of Hair Analysis for Confirmation of Self-Reported Cocaine Use in Users with Negative Urine Tests, *clinical Toxicology*, 39(4), 361-366 (2001).
17. D.A. Kidwell, M.A. Blanco, F.P. Smith, Cocaine detection in a university population by hair analysis and skin swab testing, *Forensic Science International*, 84(1997) 75-86.
18. Day R A Jr. Química Analítica Cuantitativa, 5ª Edición, impreso en México, Prentice Hall, 1999: 665-683.
19. Saferstein R. Physical Evidence, Criminalistics and Introduction to Forensic Science.6ª. Edition, USA, 1998: 253-288.

20. Villanueva E, Cañadas A, Martínez J.A, Calabuig G., Investigación Toxicológica en Química Legal y Toxicológica, 4ª. Edición, México. Editorial Masson-Salvat, 1991: 576-608.
21. NOM-177-SSA1-1998, Pruebas y Procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable.
22. Baliková, M.; Vecerková, J. HPLC confirmation of cocaine and benzoylecgonine in biological samples using photodiode-array detection after toxicological screening, *J. Chromatogr. B*, 1994, 656, 267-273.
23. Fernández, P.; Lafuente, N.; Bermejo, A.M.; Lopez-Rivadulla, M.; Cruz, A. HPLC determination of cocaine and benzoylecgonine in plasma and urine from drugs abusers, *J. Anal. Toxicol.*, 1996, 20, 224-228.
24. Klaus F. Analytical Profiles of Drug Substances. Orlando Florida USA. Academic Press, Inc. 1986, pp. 151-231.
25. Roy, I.M.; Jefferies, T.M.; Threadgill, M.D.; Dewar, G.H. Analysis of cocaine, benzoylecgonine, ecgonine methyl ester, ethylcocaine and norcocaine in human urine using HPLC with post-column ion-pair extraction and fluorescence detection. *Journal Pharm. Biomed. Anal.* 1992, 10, 943-948.
26. James E.F. Reynolds. Martindale The Extra Pharmacopoeia, The universally acclaimed source of drug information, The Pharmaceutical Press Thirtieth edition. London 1993, pp 995-997, 1006-1008.
27. Notebook Oasis, Symmetry, Sentry and Waters are trademarks of Waters Corporation. 2000 waters Corporation.
28. Ley General de Salud. Elaborada en México D.F. a 26 de Diciembre de 1983. Publicada en el diario oficial de la federación el 7 de Febrero de 1984, última reforma aplicada el 5 de Enero de 2001. Congreso de Los Estados Unidos Mexicanos.
29. Código penal para el Distrito Federal en Materia Común y para toda la República en materia Federal, Título Séptimo, Artículo 197.
30. <http://www.medicinalegal.com.ar/buzon.htm>. martes 19 de mayo del 2003.
31. Tsung-Ping Su and Teruo Hayashi. Cocaine affects the dynamics of cytoskeletal proteins via sigma 1 receptors. *TRENDS in Pharmaceutical Sciences*. Vol 22 No.9 September 2001.
32. Matsumoto R., Liu Y., Lerner M., Howard E. Brackett D.  $\sigma$  Receptors: potential medications development target for anti-cocaine agents. *European Journal of Pharmacology*. 469 (2003) 1-12.
33. Matsumoto R., McCracken K., Pouw B., Zhang Y., Bowen W. Involvement of sigma receptors in the behavioral effects of cocaine: evidence from novel ligands and antisense oligodeoxynucleotides. *Neuropharmacology*. 42 (2002) 1043-1055.
34. Rerat C., Sauvain M., Rop P., Ruiz E., Bresson M., Viala A. Liquid chromatographic analysis of cocaine and benzoylecgonine in plasma of traditional coca chewers from Bolivia during exercise. *Journal of Ethnopharmacology*. 56 (1997) 173-178.

35. Antonilli L., Suriano C., Grassi M., Nencini P. Analysis of cocaethylene, benzoylecgonine and cocaine in human urine by high-performance thin-layer chromatography with ultraviolet detection: a comparison with high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*. 751 (2001) 19-27.
36. Sun L., Hall G., Lau C. High-performance liquid chromatographic determination of cocaine and its metabolites in serum microsomes with fluorimetric detection and its application to pharmacokinetics in rats. *Journal of Chromatography B*. 745 (2000) 315-323.
37. Needham S., Brown P. The high-performance liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry analysis of diverse basic pharmaceutical on cyanopropyl and pentafluorophenylpropyl stationary phases. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical analysis*. 23 (2000) 597-605.
38. Moeller M., Steinmeyer S., Kraemer T. Determination of drugs of abuse in blood. *Journal of Chromatography B*. 713 (1998) 91-109.
39. Jean ville P., Woods J., Baird T., Estapé E. Direct determination of ecgonine methyl ester and cocaine in rat plasma, utilizing on-line sample extraction coupled with rapid chromatography: quadrupole orthogonal acceleration time of flight detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical analysis*. 23 (2000) 897-907.
40. Needham S., Jeanville P., Brown P., Estapé E. Performance of a pentafluorophenylpropyl stationary phase for the electrospray ionization high-performance liquid chromatography-mass spectrometry-mass spectrometry assay of cocaine and its metabolite ecgonine methyl ester in human urine. *Journal of Chromatography B*. 748 (2000) 77-87.