336427

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE MÉXICO
CAMPUS CHAPULTEPEC

ESCUELA DE QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
INCORPORADA A UNAM

"DETECCIÓN DEL PRINCIPAL METABOLITO DE COCAÍNA (BENZOILECGONINA, BE) EN ORINA MEDIANTE LA TÉCNICA DE INMUNOENSAYO ENZIMÁTICO MÚLTIPLE (EMIT) Y CROMATOGRAFÍA DE GASES / ESPECTROMETRÍA DE MASAS (GC/MS)"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUÍMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A :

LILIANA CRUZ CRUZ

DIR. DE TESIS: Q.F.B. ISIDRO HINOJOSA LOPEZ

México, D.F. 2005

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

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.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Lelana Cruz Cruz

FECHA: 25-Enero-2005

FIRMA:

JURADO.

PRESIDENTE: Q.F.B. ISIDRO HINOJOSA LÓPEZ

VOCAL: Q.F.B. JAVIER ARAIZA SANTIBAÑEZ

SECRETARIO: Q.F.B. BENJAMÍN A. FERNÁNDEZ FERNÁNDEZ

PRIMER SUPLENTE: Q.F.B. MARTHA L. LUNA ONTIVEROS

SEGUNDO SUPLENTE: I.A. FEDERICO SOTO SALAS

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA DE TESIS

PROCURADURÍA GENERAL DE LA REPUBLICA, DIRECCIÓN GENERAL DE COORDINACIÓN DE SERVICIOS CRIMINALÍSTICOS EN EL LABORATORIO DE QUÍMICA.

DIRECTOR DE TESIS: Q.F.B. ISIDRO HINOJOSA LÓPEZ

m340330

MÉXICO, D.F. **2005**

AGRADECIMIENTOS

A Dios::
Por darme la vida y guiarme por este camino que estoy cursando, porque con su ayuda y bendición he podido cumplir una de las metas más importante para mi.

A mis Padres:
Que con su apoyo, cariño y cuidados han estado conmigo en los momentos más importantes y difíciles de mi vida y que con esfuerzos hemos hecho realidad este sueño al igual que muchos otros, gracias por estar unidos, los quiero mucho.

A mis hermanas:
Que siempre han creído en mi y me han alentado para seguir adelante y han estado conmigo en las buenas y en las malas

A mi asesor:
Quién me apoyo en la realización de la tesis y creyó en mi; y que con su dedicación brindada cumplimos nuestros propósitos.

A mis sinodales:
Que con su ayuda y tiempo brindado se mejoraron diversos aspectos de la tesis.

A los profesores:
Que nos compartieron sus conocimientos y a quienes les digo que nunca dejen de superarse para ser mejor cada día

A mis amigas:
Que me brindaron su amistad incondicionalmente, porque me aceptaron con mis defectos y virtudes y de quienes recibí un consejo y apoyo cuando lo llegue a necesitar

A alguien muy especial para mi:
Esa persona quien me ha brindado su amistad durante años, me acepta tal y como soy, y que a pesar de las cosas que han pasado ambos seguimos saliendo adelante y forjándonos metas que cumpliremos.

A los Químicos de la PGR:
Que compartieron sus conocimientos, me apoyaron durante la realización de la tesis y siempre creyeron en mi.

INDICE:

JUSTIFICACIÓN 3

RESUMEN 4

INTRODUCCIÓN 6

OBJETIVOS

A) GENERAL 9

B) PARTICULAR 9

HIPÓTESIS 10

I. GENERALIDADES DE LA COCAÍNA 11

1) ORIGEN 11

A) Características macroscópicas 11

B) Características microscópicas 14

2) COMPOSICIÓN QUÍMICA 15

3) OBTENCIÓN Y PURIFICACIÓN 19

A) Técnica de Extracción 20

B) Conversión a Crack 22

II. USO TERAPÉUTICO 23

III. TOXICOCINÉTICA 23

1) EXPOSICIÓN

A) Vías de administración 23

2) ABSORCIÓN 25

3) DISTRIBUCIÓN 25

4) METABOLISMO 25

5) ELIMINACIÓN 29

IV. TOXICODINAMIA 29

1) MANIFESTACIONES CLÍNICAS 31

V. METODOLOGÍA 34
A) COLECCIÓN, MANEJO Y ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS 34
1) SITIO DE COLECCIÓN 34
2) TRANSPORTE Y ALMACENAMIENTO 35
3) LABORATORIO 36
4) SOLICITUD DEL ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS 37
5) ADULTERACIÓN 37
B) TÉCNICAS PRESUNTIVAS (FUNDAMENTO) 38
1) INMUNOENSAYO ENZIMÁTICO (EIA) 38
2) RADIOINMUNOENSAYO (RIA) 40
3) INMUNOENSAYO CON INMUNOADSORBENTES (ELISA) 42
4) INMUNOENSAYO DE FLUORESCENCIA POLARIZADA (FPIA) 45
5) CROMATOGRAFÍA DE CAPA DELGADA (TLC) 47
6) INHIBICIÓN DE AGLUTINACIÓN (LAI) 48
7) INMUNOENSAYO ENZIMATICO MÚLTIPLE (EMIT) 49
C) TÉCNICA CONFIRMATIVA (FUNDAMENTO) 52
1) CROMATOGRAFÍA DE GASES / ESPECTROMETRÍA DE MASAS (GC/MS) 52
D) PERFIL ANALÍTICO ESPECIFICO DE ESTE TRABAJO 58
a) Técnica de EMIT 58
b) Técnica de Gases / Masas 61
VI. RESULTADOS 68
VII. DISCUSIÓN (ANÁLISIS DE RESULTADOS) 71
VIII. CONCLUSIONES 73
IX. SUGERENCIAS 74
X. GLOSARIO 75
XI. BIBLIOGRAFÍA 79

JUSTIFICACION

En los últimos 2 años se ha observado un incremento en el consumo de cocaína en sus diferentes formas y presentaciones en México en personas de 12 a 35 años de edad, se considera necesario realizar un análisis de identificación del metabolito de cocaína (benzoilecgonina) presente en un fluido biológico (orina) por medio de una técnica presuntiva, técnica de inmunoensayo enzimático múltiple, (EMIT), la cual es confirmada con la técnica de cromatografía de gases / espectrometría de masas (CG / EM), de tal forma que los resultados obtenidos sean de alta confiabilidad para no encontrar falsos positivos y/o falsos negativos.

Así mismo con los datos obtenidos auxiliar a Instituciones de Justicia, así como educativas y/o empresas de Seguridad y con fines laborales, que les permita liberar o castigar a un inculpado según sea el caso, detección de una adicción, contratación o despido laboral y/o localizar áreas de oportunidad de consumo en estudiantes para tratar o expulsar a los mismos.

RESUMEN

En esta tesis se hablará acerca de las características principales de la cocaína, es decir, el origen, zona geográfica, forma de obtención, etc.; así mismo se tomarán en cuenta las vías de administración como es la vía intranasal (inhalación), fumada, vía intravenosa, vía intramuscular, vía oral.

Se explicara la toxicocinética (biodisponibilidad, distribución, biotransformación, eliminación), toxicodinamía y los usos terapéuticos que puede presentar. En la biotransformación se hablará de las principales rutas metabólicas conociendo así los principales metabolitos de la cocaína, así mismo los que se forman producto de la interacción o combinación de la misma con el etanol.

En la etapa de eliminación de cocaína se hará mención de los principales metabolitos identificados en la orina (benzoilecgonina, ecgoninametiléster y cocaetileno) conociendo el porcentaje de cada uno teóricamente.

Se mencionará la colección, manejo y almacenamiento de las muestras de orina que son recolectadas para realizar el análisis correspondientes.

Se estudiará el fundamento de las técnicas establecidas para la identificación de metabolitos de cocaína como son las técnicas: enzimoinmunoanálisis, (EIA); enzimoinmunoanálisis con inmunoadsorbentes, (ELISA); radioinmunoensayos, (RIA); fluoroinmunoanálisis de polarización, (FPIA); cromatografía en capa delgada, (TLC); inhibición de aglutinación, (LAI); técnicas de inmunoensayo

enzimático múltiple, (EMIT); y técnicas confirmativas como cromatografía de gases /espectrometría de masas, (GC/MS).

Sobre las muestras de orina se aplicara el siguiente proceso analítico: 1) una técnica presuntiva (EMIT) en donde se realiza la medición de temperatura, color y densidad de la orina; 2) una técnica confirmativa (GC/MS) en la cual se llevaran acabo los siguientes pasos: a)extracción líquido-líquido, b)extracción sólido-líquido, c) derivatización y d) identificación del principal metabolito por GC/MS

INTRODUCCIÓN

FIG. 1 Arbusto *Erythroxylaceae* (Ref. 48)

La cocaína es un alcaloide presente en las hojas del arbusto *Erythroxylaceae;* **(Fig. 1)** pueden distinguirse tres variedades que es *Erythroxylum coca,*(Andes de Perú y Bolivia); *Erythroxylum novogranatense,* (Colombia y Venezuela); *Erythroxylum novogranatense truxillense* (Norte de Perú y Ecuador).[8,29,39]

Durante siglos los nativos de los Andes (Incas de Perú) mascaron el extracto alcalino de estas hojas en sus ceremonias religiosas por sus acciones estimulantes y eufóricas; durante la conquista española, los españoles encontraron que los Incas de Perú no podían realizar labores pesadas en las minas cuando se les privaba de estas hojas.[14,21]

En el año de 1688 se introdujo la coca en Europa. En el año de 1860 Albert Niemann fue el primero en aislar la cocaína. Este investigador, al igual que muchos químicos de esa época, saborearon su compuesto recién aislado y observaron que producía adormecimiento de la lengua.[17,21,29]

El uso de cocaína alcanzó auge en medicina a finales del siglo XIX como sustituto de la morfina y era un constituyente principal de varios elíxires y sustancias tónicas que tenían propiedades "mágicas". Algunas de las preparaciones incluían el "Vin Mariani" una mezcla de vino y cocaína fabricado por Angelo Mariani y la Farmacéutica CORSICAN (París), este producto fue utilizado por celebridades tales como poetas, Papas y Presidentes.[14,24,29]

El médico Italiano Mantegazza fue el primero en interesarse en el estudio medicinal de la cocaína, y en 1870 escribió el uso potencial de la cocaína en el tratamiento de la adicción de morfina.[29]

Antes de 1880 H. H. Rusby y W. G. Mortimer hicieron la distinción entre las propiedades farmacológicas de la cocaína y la hoja de coca.[24]

En 1884, Sigmund Freud pública las propiedades medicinales de la cocaína; 5 meses más tarde, Carl Koller descubre el uso de la cocaína como anestésico tópico para operaciones oftálmicas. Poco después, Halstead popularizó su uso para la anestesia por infiltración y bloqueo de la conductancia.[14,21,29]

En 1886 en Atlanta, Georgia, John Pemberton introduce a esta ciudad una bebida elaborada de extractos de hoja de coca, nuez de cola africana y un jarabe dulce carbonatado, el producto fue llamado "Coca-Cola".[24]

En el siglo XIX la cocaína fue solo disponible en la forma de un producto botánico en solución pero cambio dramáticamente el consumo de la coca entrando el siglo XX.[24,29]

Cuando casas químicas, como Merck, comenzaron a producir significantes cantidades de cocaína episodios de toxicidad fueron más frecuentes, las opiniones de médicos profesionistas cambiaron y perdieron mucho de su entusiasmo por la droga.[29]

A causa de su toxicidad y sus propiedades adictivas, en 1892 se inició una búsqueda de sustitutivos sintéticos de la cocaína como anestésico local con las investigaciones de Einhorn y colaboradores. En 1905 este esfuerzo culminó en la síntesis de la procaína, que se convirtió en el prototipo de los anestésicos locales durante cerca de medio siglo. Los agentes más utilizados en la actualidad son procaína, lidocaína, bupivacaína y tetracaína.[14,21]

En 1923, Richard Willstatter fue capaz de sintetizar una mezcla de d-cocaína, l-cocaína, d-pseudococaína y l-pseudococaína. La síntesis de múltiples pasos requiere un alto grado de habilidad técnica en química orgánica y resultados en bajo rendimiento. Estos factores tanto económicos como técnicos hacen de la extracción a partir de la hoja de coca el método más adecuado en cantidad y calidad de obtención de cocaína para su distribución en mercados ilícitos.[24]

Hoy en día la cocaína es una de las drogas ilícitas de abuso más común, es vendida en la calle en dos formas: la sal, en forma de clorhidrato y el crack en forma de base. La forma en sal es típicamente diluida (cortada) con agentes como manitol, lactosa, sucrosa y anestésicos locales, entre otras.[29]

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

- Identificar la presencia del metabolito de cocaína (Benzoilecgonina) en orina mediante una técnica presuntiva (EMIT) y una técnica confirmativa (CG/EM).

OBJETIVO PARTICULAR:

- Realizar un análisis comparativo en base a resultados estadísticos de las técnicas de inmunoensayo en placa de un solo paso (EMIT) y Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas (GC/MS) para valorar la técnica de EMIT.

HIPÓTESIS

Si se detecta la presencia del metabolito de cocaína (Benzoilecgonina) en orina por la técnica en placa de un solo paso (EMIT), y se confirma por Cromatografía de Gases / Espectrometría de Masas (GC/SM), entonces se establece la confiabilidad de la técnica de inmunoensayo enzimático múltiple.

I. GENERALIDADES DE LA COCAINA

1) ORIGEN.

La cocaína es un alcaloide extraído de las hojas de coca procedentes de los arbustos de *Erythroxylaceae*, que se encuentra en el oeste de Sudamérica principalmente en Bolivia y Perú. *Erythroxylum coca* (de Bolivia o Huanuco) o *E. truxillense* (de Perú o Trujillo).[17,39]

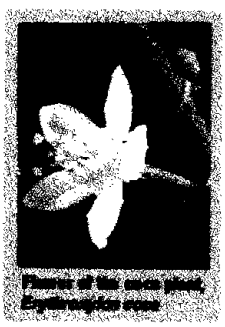
A) CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS.

La planta es cultivada con una altura variable según la región (0.5 – 2.0 m de altura). Sus ramas son rojizas, poseen hojas ovales, enteras, cortamente pecioladas de color verde pardusco. Las flores son pentámeras de color blanco amarillento **(Fig. 2d)**. El fruto es una pequeña drupa roja **(Fig. 2a, 2b, 2c)**.[8,17]

2a

2b

2c



2d

FIG. 2 a), b), c) representan el fruto como una pequeña drupa roja
d) flor de la planta de coca (Ref. 49)

En el caso de los *Erythroxylum* cultivados para la producción de hojas ricas en cocaína se distinguen tres taxones morfológicamente muy cercanas relacionadas con las especies *E. coca* y *E. novogranatense*:

E. coca (var. *coca*). **(Fig. 3a)** Originaria de los Andes de Perú y Bolivia: es el arbusto que actualmente se cultiva en la región oriental húmeda de la Cordillera, en las zonas de Cuzco y de Huanuco de Perú y en Bolivia, en las Yungas y en la zona de Cochabamba. Las hojas son verde oscuro, cortamente pecioladas, ovales de 2.5-7.5 cm de longitud y 1.5-4.0 cm de anchura **(Fig. 3b)**. El limbo elíptico varia de color pardo-verdoso a pardo y glabro; margen entero. Su nervio central forma una cresta aguda en la cara superior, tiene una arista en la superficie superior y se prolonga ligeramente fuera del limbo, constituyendo un apículo. El envés muestra dos líneas curvadas muy características, una a cada lado del nervio medio, corre desde la base al ápice de la hoja. Las estípulas son persistentes. La corteza del tallo es verrugosa.[8,17]

FIG. 3a *Erythroxylum coca;* (Ref. 49)

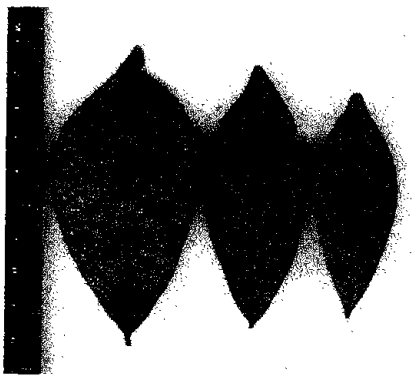


FIG. 3b Tamaño de las hojas de coca (Ref. 49)

E. novogranatense (var. *novogranatense*). **(Fig. 4)** Esta variedad propia de bosques crece en Colombia y en Venezuela. Las hojas son verde amarillento brillantes, su limbo elíptico y alargado; las estípulas se desintegran.[8,17]

FIG. 4 *Erytroxylum novogranatense* (Ref.49)

E. novogranatense (var. *truxillense*). **(Fig. 5)** Esta variedad es característica de las zonas secas del norte de Perú y Ecuador. Las hojas son de color verde pálido, miden de 3-6 cm de longitud y de 1-2 cm de ancho, son frágiles, consistencia más papirácea que las de Huanuco y rotas, posee un limbo elíptico de 1.6-5 cm de longitud; las líneas del envés no suelen ser patentes; las estípulas son marcescentes o persistentes. La corteza del tallo es lisa, la cresta de la enervación es aplanada.[8,17]

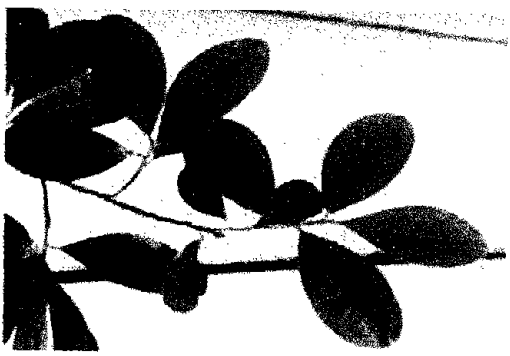


FIG. 5 *Erytroxylum novogranatense truxillense* (Ref. 49)

El estudio de la composición en flavonoides y las experiencias de hibridación sugieren que *E. novogranatense truxillense* es intermediario entre *E. coca* y *E. novogranatense novogranatense*, pero no se trata de un híbrido.[8,17]

B) CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS.

El meristela del nervio medio posee un arco de xilema y una banda de floema con una banda de fibras pericíclicas por debajo y, también, algo de esclerénquima por encima, por lo general hay una brecha a cada lado, entre el esclerénquima inferior y el superior.[17,43]

La epidermis tiene paredes anticlinales rectas y estomas del tipo rubiáceo en la superficie superior. La sección transversal de una hoja de coca muestra una epidermis superior, parénquima en empalizada con prismas de oxalato cálcico, parénquima lagunoso y una epidermis inferior papilosa muy características, con numerosos estomas. El nervio medio está parcialmente rodeado por un arco de fibras pericíclicas, por encima y por debajo del cual hay considerable cantidad de colénquima. En una preparación de epidermis inferior se observan las papilas como círculos muy marcados así como numerosos estomas, cada uno con cuatro células anejas, dos de las cuales poseen sus ejes longitudinales paralelos al ostíolo. El tejido que está por debajo de la epidermis esta constituido por colénquima.[17,43]

2) COMPOSICIÓN QUÍMICA.

La cocaína, $C_{17}H_{21}NO_4$, benzoilmetilecgonina **(Fig. 6)** o ácido 8-azabiciclo-[3.2.1]-octano-2-carboxílico, es un éster del ácido benzoico y el alcohol amínico (metilecgonina) que contiene una molécula de tropina que está estructuralmente pero no farmacológicamente relacionada a la atropina. La porción ecgonina de la molécula tiene cuatro átomos de carbono asimétricos y pueden existir como racémico (8 isómeros ópticamente activos). La cocaína es clandestinamente sintetizada, con fines ilícitos, de (-)-ecgonina en la presencia de metanol y ácido benzoico, después de la hidrólisis del alcaloide éster extraído de la planta. En (-)-cocaína, el benzoil y metiléster son localizados *cis* al puente de nitrógeno. (+)-pseudococaína, con el metiléster localizada *trans* al puente de nitrógeno, el cual es también activo. [4,21,29,39]

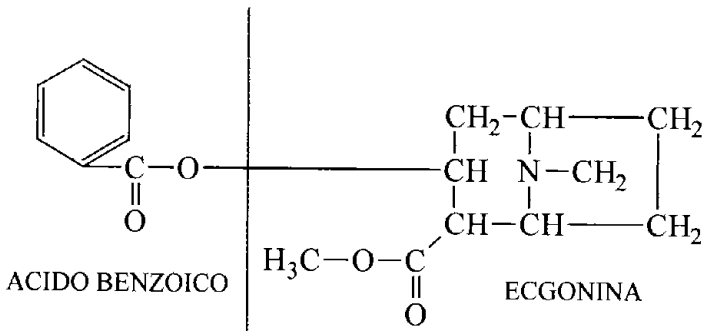


FIG. 6 ESTRUCTURA DE LA COCAINA (Ref. 39)

La cocaína es estructuralmente diferente de otros anestésicos locales por virtud de su molécula tropina. Sin embargo, semejante a otros anestésicos locales, la cocaína consiste de una región hidrofóbica e hidrofílica. La región hidrofóbica contiene un anillo benceno, la región hidrofílica consiste de una amina secundaria o terciaria. La cocaína es también similar a otros

anestésicos locales debido a su enlace éster, el cual permite al cuerpo hidrolizar y desactivar la droga. Sin embargo el grupo éster es también susceptible a una hidrólisis "in vitro".[21,29]

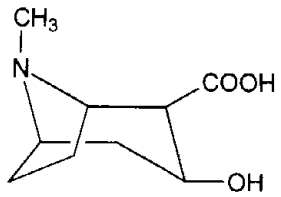
Las hojas de coca contienen aproximadamente 0.5-1.5% de alcaloides totales que dependen de la especie, variedad, origen geográfico, etc. El constituyente principal es un alcaloide éster, la cocaína (metilbenzoilecgonina), acompañada de derivados de la ecgonina: cinanmilcocaína, ($C_{19}H_{23}NO_4$) tropacaínas (3β-benzoiloxitropano, $C_{15}H_{19}NO_2$) y α-truxilina, ($C_{19}H_{23}N0_4$); algunas pirrolidonas [higrina, ($C_8H_{15}NO$), cuscohigrina, ($C_{13}H_{24}N_2O$), dihidrocusconigrina], **(Fig. 7)** así como heterósidos cristalinos y ácido cocatánico. También contiene una esencia (Van Romburgh, 1984) el salicilato de metilo ($C_8H_8O_3$) junto con N-metilpirrol, posiblemente N,N-dimetilbenzilamina y dos dihidrobenzaldehídos.[4,8,22,43]

El sabor es débilmente amargo; su olor débil (droga fresca) se vuelve netamente aromático (droga seca); esto se explica por la presencia de la esencia de trans-2-hexenal y cis-hexen-1-1 [8,17]

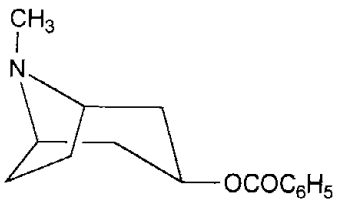
La cocaína cristaliza fácilmente en alcohol caliente o éter de petróleo obteniendo prismas monocíclicos, grandes y descoloridos los cuales funden a 98°C. Tiene un sabor un poco amargo provocando anestesia temporal en la lengua.[4,17,21]

Con respecto a la solubilidad se observa que es difícilmente soluble en agua, pero su solubilidad mejora cuando se utiliza como disolvente el alcohol, éter, benceno, cloroformo y/o éter acético. Cuando la cocaína es

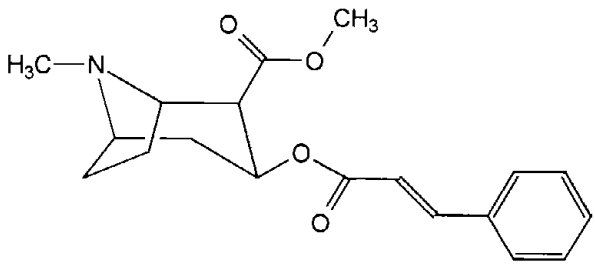
disuelta con ácidos forman sales, por ejemplo, la sal de cocaína hidroclorada.[4]



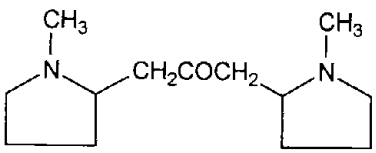
ECGONINA



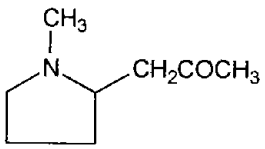
TROPACAINA



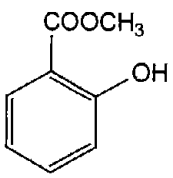
CINNAMILCOCAÍNA



CUSCOHIGRINA

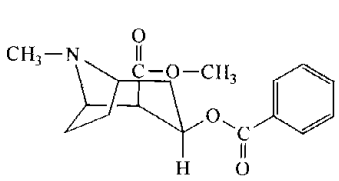


HIGRINA

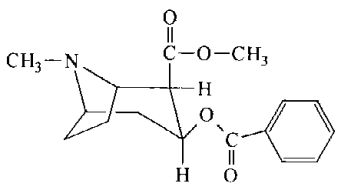


METIL SALICILATO

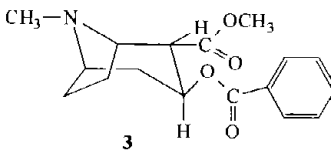
FIG. 7 Derivados de la ecgonina: cinnamilcocaína, tropacaína algunas pirrolidonas; y la esencia: salicilato de metilo (Ref. 22)



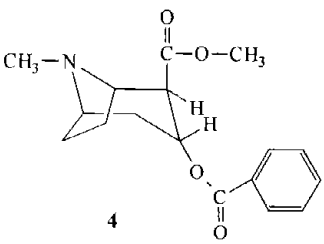
1



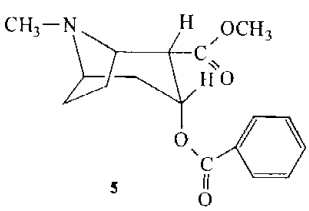
2



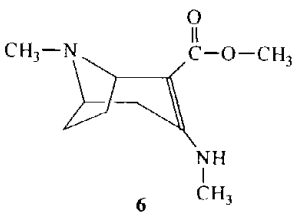
3



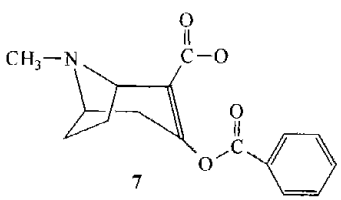
4



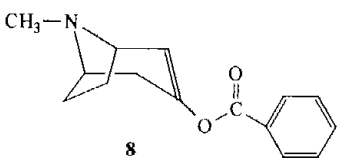
5



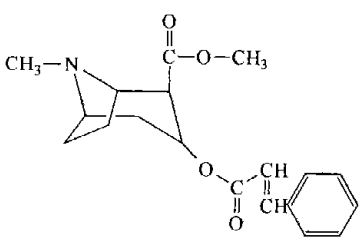
6



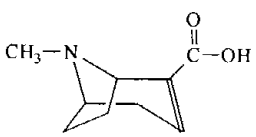
7



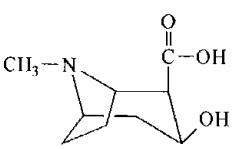
8



9



10



11

FIG. 8 Estructuras químicas de enantiómeros y diastereoisómeros: d-cocaína (1), l-cocaína (2), pseudococaína (3), alococaína (4), pseudoalococaína (5), 3-aminometil-2-metoxicarbonil-8-metil-8-azabiciclo(3.2.1)oct-2-eno (6), 3-benzoiloxi-2-metoxicarbonil-8-metil-8-azabiciclo(3.2.1)oct-2-eno (7), 3-benzoiloxi-8-metil-8-azabiciclo(3.2.1)-oct-2-eno (8), cinamoilcocaina (9), ecgonidina (10),y ecgonina (11). (Ref.30)

Las estructuras químicas de enantiómeros, **(Fig. 8)** diastereoisómeros y las impurezas comunes de la cocaína son la d-cocaína, l-cocaína, pseudococaína, alococaína, pseudoalococaína, 3-aminometil-2-metoxicarbonil-8-metil-8-azabiciclo(3.2.1.)oct-2-eno, 3-benzoyloxi-2-metoxicarbonil-8-metil-8-azabiciclo(3.2.1.)oct-2-2eno, 3-benzoiloxi-8-metil-8-azabiciclo(3.2.1)oct-2-eno, cinamoilcocaina, ecgonidina, y ecgonina. [30]

3) OBTENCION Y PURIFICACIÓN.

Las hojas completamente desarrolladas se recolectan en tiempo seco y bueno **(Fig. 9)**, las hojas se ponen a secar a la sombra sobre suelos de concreto en cobertizos ventilados con aire seco, cuando el tiempo es malo, se secan con calor artificial.[43]

FIG. 9 Cultivación y recolección de las hojas de coca desarrolladas (Ref.49)

Posteriormente se extraen los alcaloides impuros conjuntamente con los productos no alcaloídicos con ácido sulfúrico diluído o por tratamiento con cal y petróleo o diversos disolventes orgánicos, obteniéndolos en forma sólida. [8,17,43]

Las técnicas de obtención y purificación involucran 3 pasos:

- Extracción de pasta de coca cruda a partir de la hoja de coca **(Fig. 10a, 10b)**
- Purificación de la pasta de coca a cocaína base
- Conversión de cocaína base a clorhidrato de cocaína **(Fig. 10c)**

Fig. 10a Hojas de coca (Ref. 50)

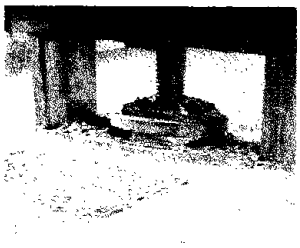


Fig. 10b Trituración de las hojas (Ref.50)

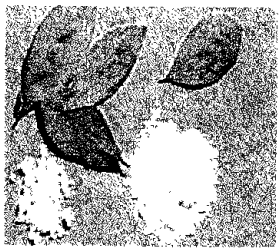


Fig. 10c Hojas y Clorhidrato de cocaína (Ref. 50)

A) TÉCNICA DE EXTRACCIÓN

1er. Técnica[24]

- El primer paso involucra la maceración de una determinada cantidad de hojas de coca con agua de cal y después se agrega queroseno con agitación.
- Dejar reposar por un determinado tiempo para poder ser extraído el queroseno de la fase acuosa, una vez separado el queroseno se le agrega una solución de ácido sulfúrico diluido con agitación, en ese momento es separado el queroseno de la fase acuosa.
- La fase acuosa es retenida y neutralizada con piedra caliza o alguna sustancia alcalina, se observa la formación de un precipitado (pasta de coca cruda) conteniendo de 30 a 80% de cocaína.
- Este material sólido es aislado por filtración para purificación de la cocaína.

- La pasta de coca es disuelto en ácido sulfúrico diluido y solución de permanganato de potasio diluido, este último oxida las impurezas.
- Esta mezcla se filtra y se le agrega hidróxido de amonio al líquido filtrado para precipitar la cocaína base
- Posteriormente se convierte a clorhidrato de cocaína, con una solución de ácido clorhídrico diluido, formando un precipitado, clorhidrato de cocaína.

2ª. Técnica[24]

- Las hojas se pican y se ponen en maceración con suficiente ácido sulfúrico concentrado para cubrir la cantidad de hojas, se forma una solución acuosa de sulfato de cocaína
- La solución de coca se filtra para remover el material insoluble (impurezas).
- Se agrega más ácido sulfúrico a las hojas, y esta extracción se realiza 2 ó 3 veces.
- Después de recolectar todos los filtrados se agrega un exceso de piedra caliza o solución de carbonato con agitación, y se neutraliza el exceso de ácido y se obtiene el sulfato de cocaína.
- La pasta de coca se extrae con un volumen pequeño de queroseno
- Posteriormente el queroseno se extrae con ácido sulfúrico diluido.
- Se agrega una base inorgánica para precipitar la pasta de coca.
- La base resultante se disuelve en acetona, éter o una mezcla de ambos, partes iguales.
- Se prepara una mezcla de ácido clorhídrico diluido en acetona, formando un precipitado (clorhidrato de cocaína) el cual se filtra y se lleva a sequedad absoluta.

B) CONVERSIÓN A CRACK

El término Crack es usa para describir la forma de cocaína base, la cual se convierte a clorhidrato de cocaína y puede fumarse en una pipa. Normalmente se consume por inhalación en un tubo o por inyección.[24]

El clorhidrato de cocaína se convierte a cocaína base por medio de 2 caminos:

1er. Método.[24]
Disolver el clorhidrato de cocaína en agua y agregar bicarbonato de sodio o amoniaco. El agua se hierve por un periodo corto hasta derretir el precipitado de cocaína formando un aceite, posteriormente se agrega hielo al vaso de reacción, el aceite comienza a solidificarse y el agua se vierte del vaso obteniendo la cocaína base sólida que es fácilmente removida, esta se corta con un cuchillo en pequeños pedazos y se pone a secar.

2º. Método.[24]
Disolver el clorhidrato de cocaína en agua, se agrega bicarbonato de sodio o amonio y se mezcla, después se agrega dietiléter a la solución anterior y se agita; esta mezcla se separa en dos fases, el éter en la parte superior y la fase acuosa en la parte inferior. Posteriormente el éter se decanta y se evapora para obtener la cocaína base (base libre) formada a partir del clorhidrato de cocaína.

II. USO TERAPÉUTICO

La cocaína se puede emplear para producir anestesia tópica de las vías respiratorias superiores, sitio en el que sus propiedades vasoconstrictora y anestésica local combinadas, ofrecen anestesia y enjutamiento de la mucosa con un solo agente. 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 del 1 al 4%, con el fin de reducir la toxicidad.[21,27,29]

III. TOXICOCINETICA.

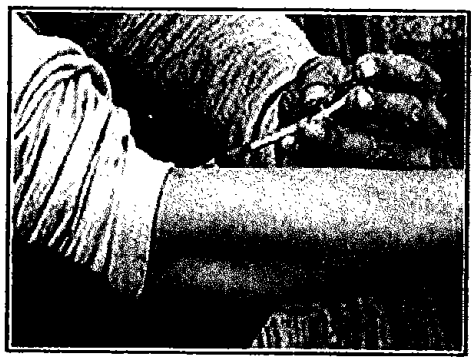
1) EXPOSICIÓN

A) Vías de Administración

La cocaína puede administrarse por vía intranasal (IN), (es decir inhalada), por vía intravenosa (IV), intramuscular (IM),oral (PO), fumada (SM), sublingual, vaginal o rectal.[2,29,32]

La cocaína no se administra normalmente por vía oral porque debido al efecto del primer paso tiene baja biodisponibilidad (aproximadamente 20%) y reduce los efectos eufóricos. La administración intravenosa **(Fig. 11)** es la única ruta en donde se lleva acabo el 100% de la biodisponibilidad de la droga, pero es poco común, ya que puede ocasionar con rapidez la muerte por hipoxia, arritmias, paro cardiaco y convulsiones La biodisponibilidad de cocaína administrada en forma intranasal o por fumar es muy variable, sin embargo es la ruta de mayor uso.[14,24,29]

FIG. 11 Administración Intravenosa (IV) de Cocaína (Ref. 50)



Por vía intranasal (IN) **(Fig. 12)** se retarda la absorción debido a la vasoconstricción, si la cocaína es inhalada la absorción puede ser de un 25% hasta un 94% de la dosis administrada, causa su efecto estimulante máximo en el curso de una hora y se desvanece con lentitud; cuando se fuma la biodisponibilidad es del 57-70%. La eficiencia por la ruta fumada depende de diversos factores como la temperatura utilizada para vaporizar la cocaína.[13,14,24,29]

FIG. 12 Vía Intranasal (IN) de cocaína (inhalación) (Ref.51)

(Ref. 54)

2) ABSORCIÓN

La cocaína se absorbe fácilmente por las membranas mucosas del tracto gastrointestinal (GI), sin embargo dicha absorción es lenta debido a que provoca una vasoconstricción local. También puede incorporarse al organismo por vía parenteral o por piel erosionada. Por vía bucal se hidroliza fácilmente con disminución de su toxicidad. Posteriormente pasa al hígado antes de entrar a la circulación sistémica general donde se destruye con rapidez por vía enzimática y puede excretarse en pequeñas cantidades sin cambios y principalmente como benzoilecgonina en la orina y accesoriamente por la saliva u otros humores. La vida media plasmática es de aproximadamente 50 minutos.[24,26,39]

3) DISTRIBUCIÓN.

Después de una dosis intravenosa de cocaína las concentraciones altas se encuentran en el cerebro, bazo, riñón y pulmón después de 15 minutos, con las concentraciones más bajas en la sangre, corazón y músculo. La unión de proteína en plasma en humanos es aproximadamente 91% a bajas concentraciones. La cocaína se une a las proteínas del plasma y la albúmina.[24,29]

4) METABOLISMO.

En la biotransformación **(Fig. 13)** de la cocaína (COC) se encuentran los siguientes metabolitos: Norcocaína, Benzoilecgonina, Ecgonina Metiléster y Ecgonina.

El metabolito Norcocaína, un N-dimetil de cocaína tiene una actividad parecida a la cocaína debido a que inhibe la recaptación de norefinefrina y dicho metabolito es un anestésico local más activo. Norcocaína se forma en el hígado por una N-desmetilación por oxidasas o por el citocromo P450 (*in*

vivo). En los humanos, el metabolito norcocaína se encuentra en menor grado, sin embargo, cuando existen concentraciones mayores es debido a deficiencias de las colinesterasas y en usuarios que consumen alcohol etílico simultáneamente. La excreción de este metabolito es de 2.6% a 6.2% de la dosis administrada de cocaína.[10,25,29]

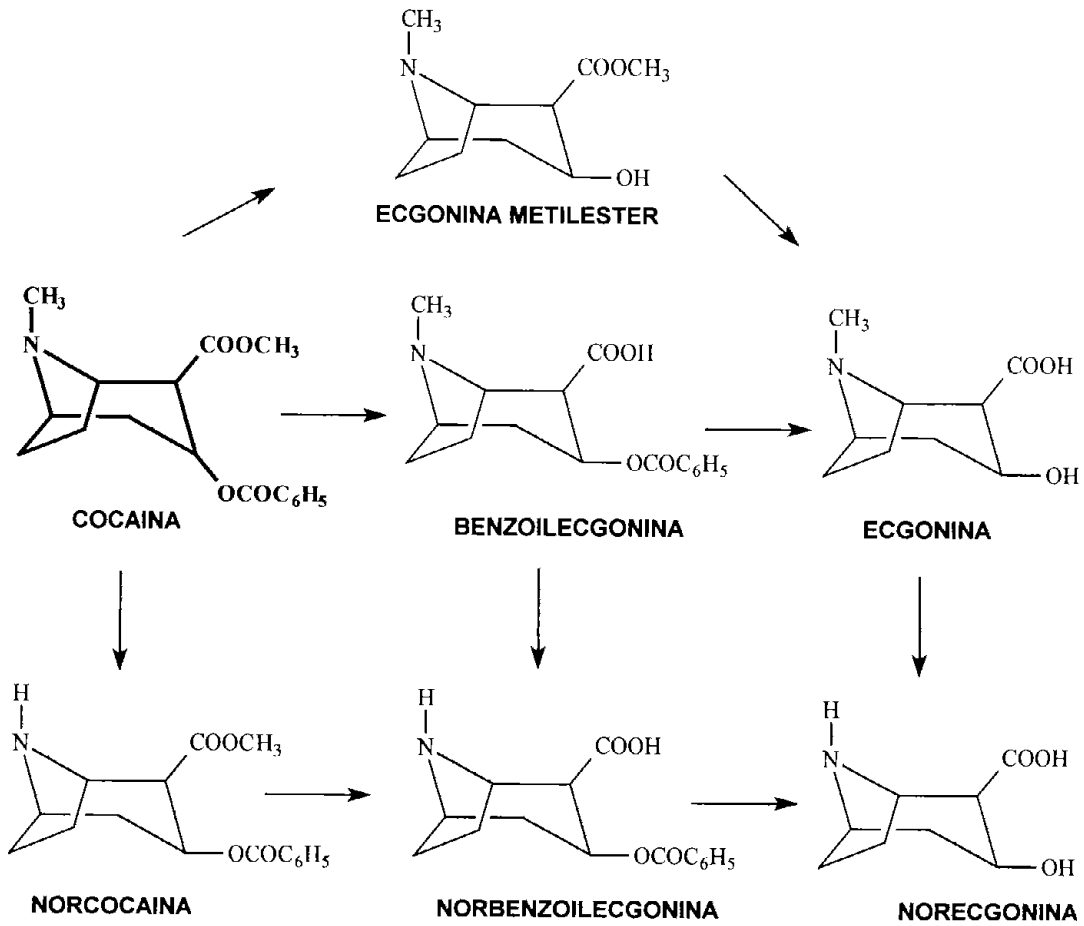


FIG. 13 METABOLISMO DE LA COCAINA (Ref. 26,39)

El metabolito benzoilecgonina (BE) representa un 20% a 45% de la biotransformación de una dosis administrada, se cree que se forma por una hidrólisis no enzimática, es decir, por hidrólisis espontánea a pH fisiológico y alcalino. Recientes estudios mencionan que la cocaína puede ser hidrolizada a benzoilecgonina por la carboxilesterasa. La metilesterasa in vivo cataliza la conversión de cocaína a benzoilecgonina y la transesterificación de cocaína a etilcocaina. También una N – desmetilación de benzoilecgonina produce benzoilnorecgonina.[25,29,31,39]

El metabolito ecgonina metiléster (EME) se encuentra entre un 32% a 49% de la dosis administrada, y se produce por una colinesterasa del plasma, por medio de una hidrólisis enzimática por la pseudocolinesterasa y esterasas del hígado; se excreta por la orina y se encuentra en las primeras 28 horas. La benzoilesterasa se emplea para catalizar la conversión de cocaína a ecgonina metiléster. [25,29,39]

De 1% a 3% de una dosis administrada de cocaína se excreta en la orina como ecgonina, este metabolito puede obtenerse por hidrólisis de la benzoilecgonina mediante una colinesterasa del plasma o por hidrólisis no enzimática del ecgonina metiléster.[25,29,39]

Y solamente una pequeña porción de la cocaína administrada se excreta sin cambios, este porcentaje inalterado depende del pH de la orina.[24,39]

Sí la cocaína se utiliza simultáneamente con alcohol, entonces el metabolito etilcocaína o cocaetileno (CE) **(Fig. 14)** se produce por metilesterasas del hígado catalizando una transesterificación. Este metabolito tiene propiedades fisicoquímicas y una estructura similar a la cocaína. El

promedio de vida media de etilcocaína es cerca de 120 minutos, ligeramente más largo a cocaína. La etilcocaína también se puede metabolizar a benzoilecgonina. El metabolito etilcocaína puede ser identificado en muestras de sangre en post-muerte de usuarios que consumían simultáneamente etanol y cocaína.[2,5,29]

El metabolito anhidroecgonina metiléster (AEME) (metilecgonidina) **(Fig. 14)** se encuentra en usuarios de fumadores de cocaína. Este se forma como resultado de una degradación termal de cocaína. También se ha identificado como un único metabolito en post-muerte tanto en sangre como orina.[13,25,29]

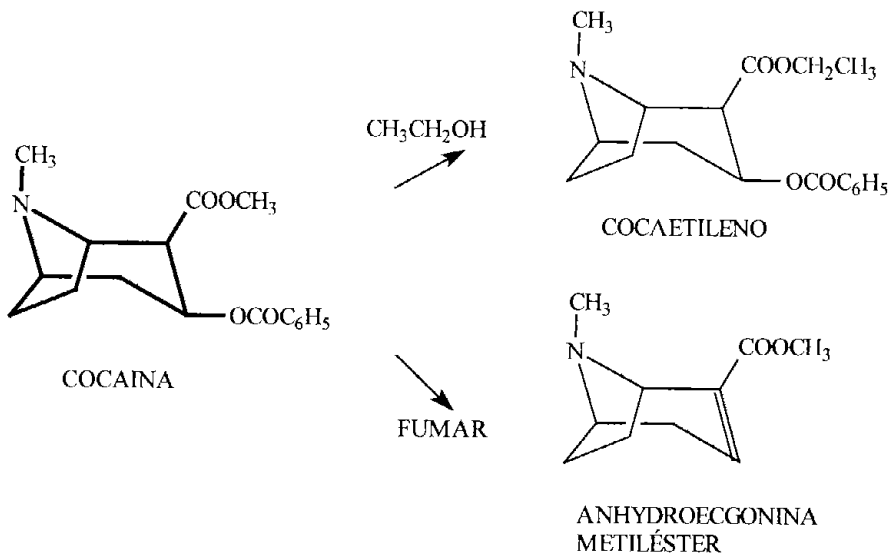


FIG. 14 METABOLISMO DE COCAINA EN USUARIOS QUE CONSUMEN SIMULTANEAMENTE ETANOL Y COCAINA O QUE FUMAN COCAINA (Ref.24,26)

5) ELIMINACIÓN.

Aproximadamente 85 a 90% de una dosis de cocaína y de sus metabolitos se recupera dentro de las primeras 24 horas en la orina. Cerca del 1 a 9% de la dosis se excreta sin cambios, 35 a 54% como benzoilecgonina, el principal metabolito, y 32 a 49% como ecgonina metiléster.[25]

La benzoilecgonina se encuentra en plasma dentro de los primeros 15 – 30 minutos de administrada la cocaína por vía IV, SM e IN debido a su metabolismo en sangre por colinesterasas. El promedio de vida media de formación por administración IV, SM e IN es 34, 29 y 112 minutos, respectivamente. La vida media de eliminación es 347, 324 y 213 minutos, respectivamente.[24,25,29]

La cocaína y sus metabolitos se excretan en la orina casi exclusivamente por simple filtración glomerular. La velocidad de excreción urinaria es paralela a la concentración plasmática de cocaína y BE, lo cual, indica que la velocidad de eliminación es proporcional a la concentración plasmática.[24,25,29]

IV. TOXICODINAMIA.

El mecanismo de acción más importante de la cocaína es la habilidad a bloquear la conducción del canal de sodio y en relación con el incremento al umbral requerido para generar un potencial de acción. También incluye la habilidad de bloquear la recaptación de neurotransmisores como la norepinefrina o noradrenalina (NE), dopamina (DA) y serotonina (5-TH).[21,27,29]

La NE **(Fig. 15)** es responsable del efecto adrenérgico la cual incluye midriasis, vasoconstricción, hipertensión, taquicardia y taquipnea.[21,29]

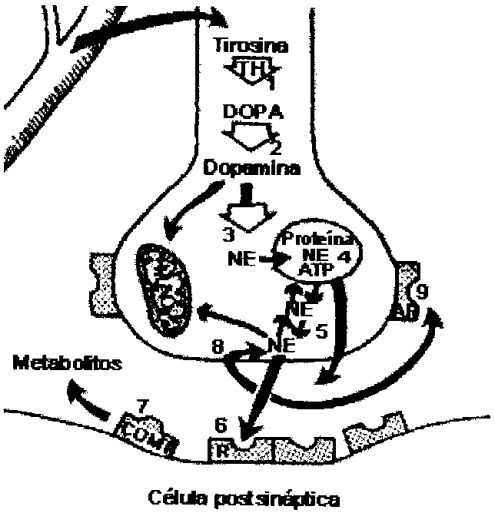


FIG. 15 La sinapsis noradrenérgica

Los efectos mediados por DA **(Fig. 16)** incluye intensa euforia, energía psíquica, aumenta la excitación sexual y confianza en si mismo (elevación de autoestima). El potencial indeseable incluye paranoia, alucinaciones y disforia. Después de una dosis de cocaína, la concentración de DA en el cerebro es brevemente elevada y se reduce posteriormente a concentraciones normales. [21,29]

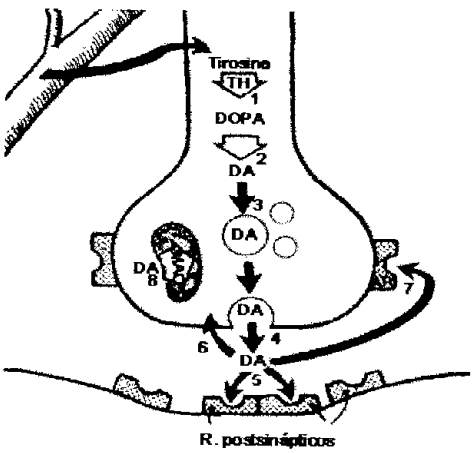


FIG. 16 La sinapsis dopaminérgica

La cocaína también se une al transporte de 5-TH **(Fig. 17)** e inhibe la recaptación del mismo. Cuando se retira el uso crónico de cocaína existe un incremento en concentraciones de 5-TH sináptico alterando la función del receptor presináptico 5-TH, estas alteraciones implican depresión y ansiedad después del retiro del consumo de cocaína. [21,29]

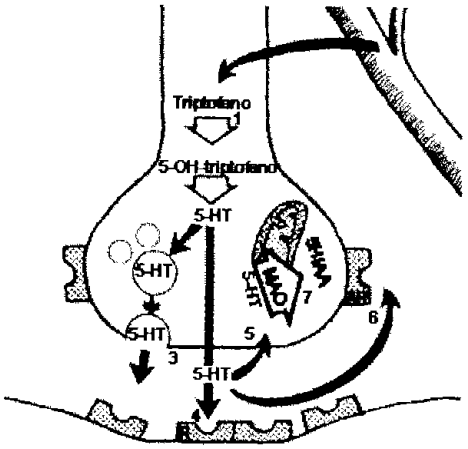


FIG. 17 La sinapsis serotoninérgica

El metabolito cocaetileno es un bloqueador de la recaptación de dopamina, produce convulsiones con una potencia similar a la cocaína y es frecuentemente más toxico con respecto a la cocaína.[2,14,21,27]

1) MANIFESTACIONES CLINICAS TOXICOLOGICAS.

Las manifestaciones clínicas seguidas de una intoxicación aguda de cocaína se deben a una estimulación del Sistema Nervioso Central (SNC) provocando psicosis y epilepsia; con dosis pequeñas hay un incremento en la actividad motora y los efectos se caracterizan por euforia, aumento de la excitación, inquietud, confusión, aprehensión, ansiedad y delirio. A medida que se incrementa la dosis provoca temblores y convulsiones. [3,21,29,39]

Los usuarios desarrollan convulsiones aproximadamente 30 a 60 minutos después de una administración oral y se presentan dentro de 5 minutos a una hora cuando se fuma la cocaína. [21,29]

La administración de cocaína provoca fallas en la vía respiratoria provocando arritmias ventriculares, disfunción respiratoria dando como resultado cianosis. [3,21,29,39]

La cocaína provoca importantes efectos cardiovasculares como arritmias cardiacas, isquemia del miocárdio, miocarditis, disfunción aórtica, vasoconstricción cerebral y convulsiones. [29,39]

Otros síntomas incluyen sequedad de la garganta y nariz, nausea, mareos, dolor de cabeza, vómito, dolor estomacal, cólicos, espasmo gástrico, pérdida de apetito, anorexia, deterioro del sentido del oído y olfato, sudoración, midriasis, hipertensión y contracción muscular. [4,27,39]

Las dosis altas inducen euforia de duración breve, que en muchos casos va seguida del deseo de obtener más fármaco. Puede ocurrir actividad motora involuntaria, conducta esteriotipada y paranoia, después de las dosis repetidas. [21,29]

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 una actividad sexual compulsiva y promiscua. Si embargo, a largo plazo, el consumo de cocaína suele culminar en disminución del impulso sexual. [21]

Entre los consumidores crónicos intensos se observan irritabilidad y mayor propensión a la violencia. Los síntomas además de disturbios siquiátricos,

incluye rinitis, (con posible perforación nasal), perdida de aliento, sudor frío, temblores, conducta violenta de protección, distorsión de la percepción, taquicardia, taquipnea, disnea y comportamiento hipercinético. El consumo de esta droga puede dañar arterias cerebrales y ruptura del vaso. [4,24,29,39]

La cocaína puede inducir epilepsia y puede empeorar la pre-existente enfermedad cardiaca coronaria a punto de provocar un ataque al corazón debido a la mayor cantidad de cocaína administrada que puede tolerar el sistema cardiovascular. [24,29,39]

El término "coked out" es usado para describir los cambios psicológicos en usuarios crónicos. Tales individuos tienen la dificultad en tener buena concentración y el poder recordar; puede crecer su mal humor y desconfianza, pueden sufrir esquizofrenia; pueden ser agresivos y experimentar ataques de paranoia, pánico o alucinaciones táctiles. [3,21,24]

El tratamiento sintomático es crítico, aunque puede ocurrir muerte tan de repente que el tratamiento no puede ser instituido. En adición al soporte respiratorio y cardiovascular, la hipertermia puede tratarse con enfriamiento externo. El Diazepam puede usarse para el control de captura y ayuda del paciente. La clorpromacina puede usarse para ventaja de los antidopaminérgicos, antiadrenérgicos, antihipertérmicos y efectos sedativos. [21,24]

La vida media plasmática es cerca de 50 minutos, pero los consumidores de la forma fumada como crack desean de manera típica más cocaína después de 10 a 30 minutos. Las administraciones intranasal e intravenosa inducen una euforia más breve. [21,29,39]

V. METODOLOGIA

A) COLECCIÓN, MANEJO Y ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS

Hay una variedad de muestras usadas para la comprobación del abuso de drogas. El tipo de muestra seleccionado para el análisis puede verse afectado por la colección de la muestra, transporte, manejo e integridad de la misma, por tal motivo se consideran diversos aspectos a seguir para la colección, manejo y almacenamiento de las muestras siguiendo la *cadena de custodia*.[29,32]

La *cadena de custodia* se refiere a los procedimientos que mantienen la integridad, identificación y seguridad de cada una de las muestras seguidos por el manejo y almacenamiento desde el punto de colección hasta su disposición final.[29,32]

1) SITIO DE COLECCIÓN.[20]

- En el sitio de colección asegura que los procedimientos de la colección, manejo, empaquetamiento, transporte y almacenamiento tengan la documentación conveniente y métodos de seguridad necesaria.
- El personal debe tener experiencia en el proceso de colección y debe ser supervisado por personal autorizado capacitado.
- En el sitio de colección no debe estar presente ningún tipo de sustancia que pueda usarse para adulterar la muestra.
- Las muestras de orina deben colectarse por duplicado en 2 frascos de 50 ml el cual se llena a 2/3 del frasco. Los envases y tapas **(Fig. 18a)** deben ser de plástico previamente analizados para evitar interacciones con el material y la muestra.

- Después de la colección de la muestra se debe registrar la temperatura, pH, características de la orina (color, precipitación, presencia de espuma), gravedad específica, etc.
- Los envases **(Fig. 18b)** deben taparse, sellarse y rotularse correctamente.
- La etiqueta debe adherirse al envase y no a la tapa para evitar cambios de muestras accidentales.

18a

FIG. 18a Envases y Tapas de plástico; (Cortesía de la PGR)

18b

18b Identificación de la muestra (Cortesía de la PGR)

2) TRANSPORTE Y ALMACENAMIENTO.[20]

- Se debe llenar una solicitud con los datos necesarios requeridos la cual acompaña la muestra, dicha solicitud se entrega al personal encargado del transporte.
- Las muestras deben protegerse de la luz directa y el calor, por tal motivo es conveniente transportarlas en un caja la cual debe contener hielo.

- El personal encargado del transporte de las muestras **(Fig.19)** son los responsables de mantener en buenas condiciones cada una de las muestras.

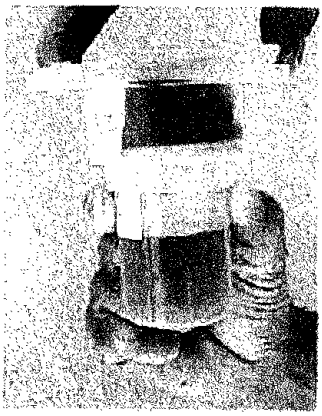


FIG. 19 Condiciones del transporte de las muestras (Cortesía de la PGR)

3) LABORATORIO.[20]

- En el laboratorio una persona autorizada es la encargada de recibir e inspeccionar la seguridad de las muestras y la documentación que la acompaña.
- Una vez asegurado que las muestras y solicitudes están en orden se realiza un reconocimiento por escrito de lo recibido y se le entrega una copia al personal encargado del transporte.
- El laboratorio se encarga del registro del documento y la seguridad o medidas de integridad de las muestras y confidencialidad de los resultados.
- Uno de los dos frascos con muestra recolectados se utiliza para el análisis y el otro se almacena **(Fig. 20)** en el congelador para análisis posteriores requeridos si es necesario, generalmente la muestras congeladas a –20°C son estables por varios meses y hasta aproximadamente 2 años.

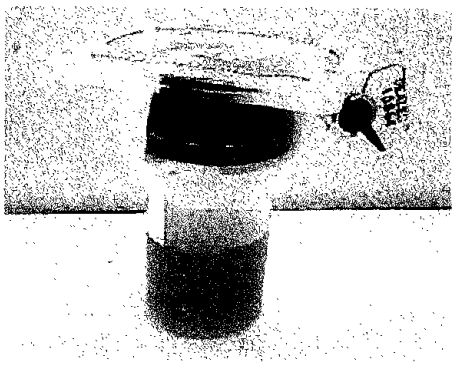


FIG. 20 Almacenamiento de la muestra
(Cortesía de la PGR)

4) SOLICITUD DE ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS.[20]

- La solicitud contienen datos de identificación del donador, de la persona que supervisó la colección de la muestra, de la persona encargada del transporte, número de muestras colectadas, datos y tiempo de colección, temperatura y pH al tiempo de la colección.
- Se incluye información adicional que especifica la droga en estudio y la validez de la muestra.

5) ADULTERACIÓN DE MUESTRAS.[20]

En el sitio de colección de muestras pueden existir sustancias que pueden alterar e invalidar la muestra. Entre las sustancias que pueden llegar a invalidar una muestra se encuentran la sal de mesa, detergentes o blanqueadores como el hipoclorito que pueden destruir la droga o afectar los ensayos generando falsos negativos, así como alcohol, amoníaco, ácido ascórbico, jugo de limón, peróxido y vinagre.[20,29,32]

B) TÉCNICAS PRESUNTIVAS

Antes de empezar un análisis deben considerarse varios factores: la cantidad de muestra disponible, la naturaleza de la droga a buscar, y la posible biotransformación de la droga. El conocimiento de la biotransformación de la droga es a menudo esencial antes de realizar un análisis. En algunos casos, los metabolitos proporcionan la única evidencia de que una droga se ha administrado y deben aislarse los metabolitos activos e identificarse.[26]

INMUNOENSAYOS. (LIA, EIA, TLC, RIA, ELISA, FPIA, EMIT).

Los ensayos inmunológicos son procedimientos en los cuales se utilizan reacciones inmunológicas que ocurren entre dos tipos de sustancias, antígeno y anticuerpo. El principio de estos análisis es que se produce un enlace reversible específico entre un antígeno y el anticuerpo correspondiente, y esta interacción da lugar a un complejo que puede diferenciarse del ligando enlazado o "libre".[1,23,36,41]

1) ENZIMOINMUNOANALISIS (EIA).

Las enzimas son catalizadores biológicos que convierten un sustrato en cierto producto. La enzima no se consume al participar en la reacción. Una sola enzima puede convertir millones de moléculas de sustrato en moléculas de producto. Esta enorme amplificación significa que es posible detectar una muy pequeña cantidad de enzima. Cuando una enzima se utiliza para marcar un anticuerpo o un antígeno, se puede detectar cantidades muy pequeñas del complejo antígeno-anticuerpo.[23,33,37]

Los EIA no están limitados por rigurosas normas de seguridad y requerimientos asociados con la manipulación de radioisótopos de los sistemas de RIA. Otras ventajas de los EIA sobre los RIA incluye el tiempo de conservación más prolongado de los reactivos y la eliminación de instrumentos de conteo de radiaciones. [23,33,37]

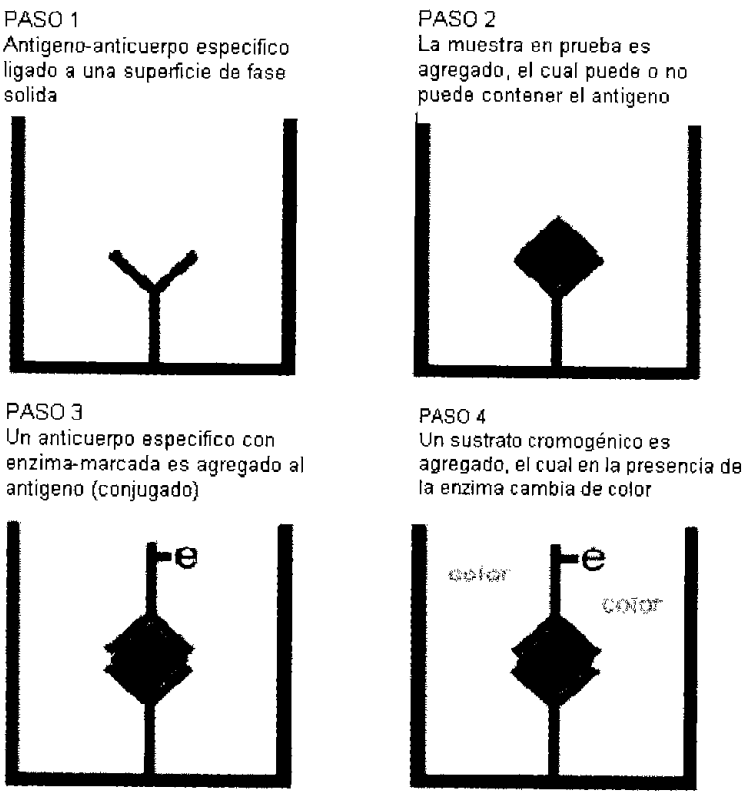


FIG. 21 Enzimoinmunoanálisis **(EIA)** (Ref. 47)

En EIA se consideran dos tipos de ensayos de inmunoanálisis los heterogéneos y los homogéneos. Los EIA **(Fig. 21)** heterogéneos son los procedimientos que requieren la separación física del complejo antígeno-anticuerpo de los constituyentes no fijados a fin de poder efectuar la medición de la actividad enzimática asociada con el complejo o con los componentes no fijados. Los EIA homogéneos no requieren esta

separación física para la determinación final, ya que la enzima o el sustrato son parte de la reacción. Los ensayos heterogéneos pueden subdividirse en aquellos en los que el anticuerpo está marcado con la enzima y aquellos en los que el antígeno está marcado. Un tipo de ensayo para antígeno involucra la cobertura de una superficie con anticuerpo, seguida de una reacción con el antígeno en estudio; el grado de dicha reacción se revela mediante anticuerpo marcado con enzima, este tipo de metodología se suele designar como "sándwich". Una segunda configuración frecuentemente utilizada es del tipo competitivo, en el cual el antígeno se marca con enzima. El antígeno marcado compite con antígeno no marcado en la muestra en estudio por los sitios de unión de un anticuerpo inmovilizado en una fase sólida, como poliestireno, látex o hierro.[23,33,37]

2) RADIOINMUNOANALISIS (RIA).

En el RIA **(Fig. 22)** el ligando y una cantidad constante de ligando radiomarcado compiten por un numero limitado de sitios de unión del anticuerpo. La concentración de anticuerpo es usualmente suficiente para fijar entre 30 y 80% del material marcado. En el RIA se determina la radiactividad fijada al anticuerpo luego de la etapa de separación, la curva dosis-respuesta tendrá una pendiente negativa. A medida que la concentración de ligando no marcado aumenta y los sitios de unión del anticuerpo se aproximan a la saturación, la pendiente se eleva. Cuando se monitorea el ligando radiomarcado no combinado, la curva dosis-respuesta tiene una pendiente positiva. [1,16,23,37]

El RIA es aplicable a la medición de ligandos de alto y bajo peso molecular, siempre que el procedimiento de marcación o el conjugado del ligando marcado en sí no afecte adversamente la inmunorreactividad del ligando.[1,16,23,37]

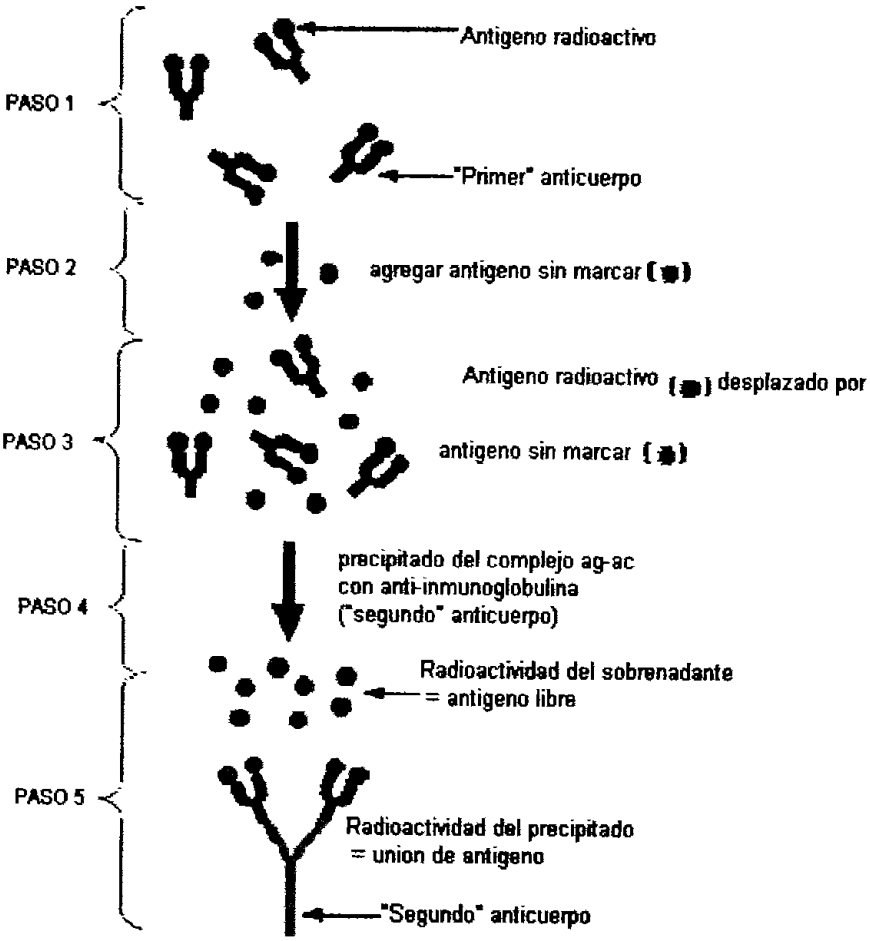


FIG. 22 Radioinmunoanálisis **(RIA)** (Ref. 45)

VENTAJAS.

- Utiliza un marcador radioisotópico que emite radiaciones gamma altas.
- El yodo [I^{125}] es suficientemente sensible para detectar antígenos a concentraciones picomolares o inferiores.
- La sensibilidad depende del marcador que se emplee en el análisis y de la afinidad del anticuerpo hacia el antígeno.
- Resulta muy práctico para procesar lotes grandes de muestras.

DESVENTAJAS.

- Los marcadores radioisotópicos tienen una vida corta (uno o dos meses), lo que se traduce como ineficiencia, costo elevado y desperdicio.
- Es difícil desechar este tipo de sustancias y almacenarlas.
- Es necesario tener en cuenta los riesgos de exposición de los seres humanos a los radioisotópos.

3) ENZIMOINMUNOANALISIS CON INMUNOADSORBENTES. (ELISA).

Ensayo heterogéneo **(Fig. 23)** de unión de proteínas que pueden utilizar un ligando marcado con enzima que compite con el ligando de la muestra por el anticuerpo inmovilizado en fase sólida. [1,9,23,37]

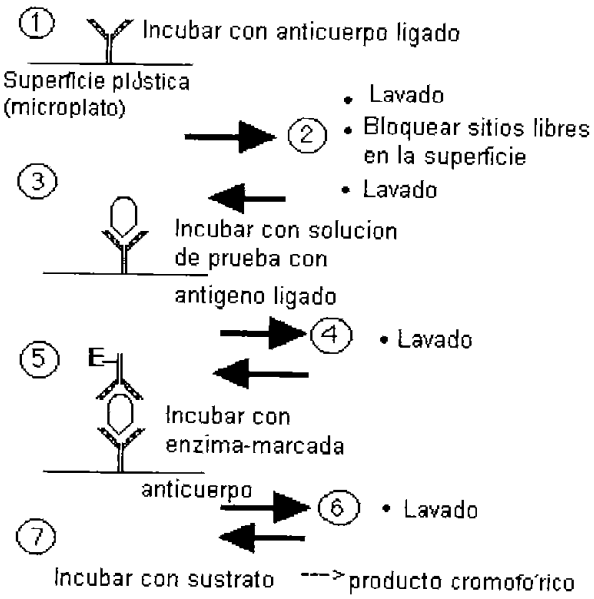


FIG. 23 Enzimoinmunoanálisis con inmunoadsorbentes **(ELISA)** (Ref. 46)

Los enzimoinmunoanálisis con inmunoadsorbentes (ELISA) **(Fig. 24)** son ensayos no isotópicos heterogéneos que usualmente emplean un anticuerpo inmovilizado en un soporte sólido y el ligando esta marcado con la enzima. [1,9,23,37]

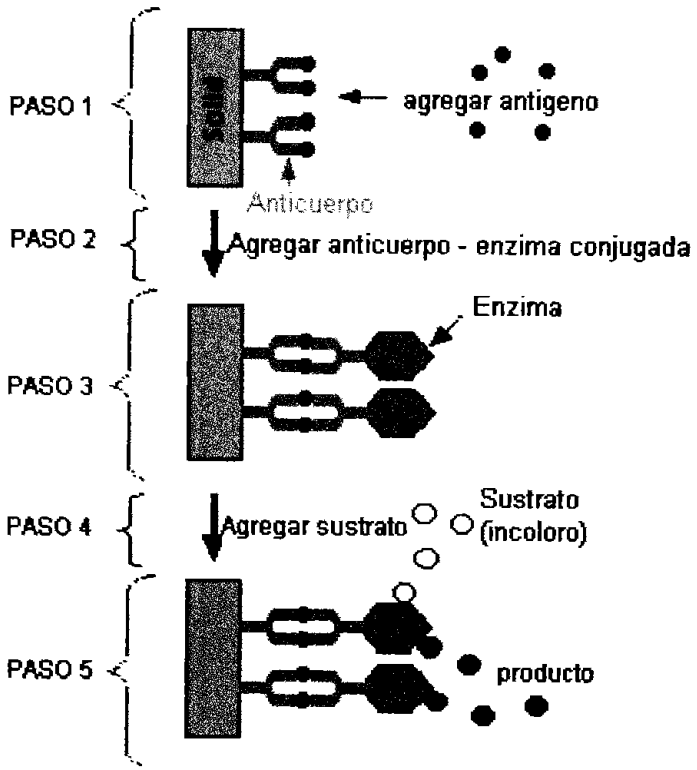


FIG. 24 Enzimoinmunoanálisis con inmunoadsorbentes **(ELISA)** (Ref.46)

La fosfatasa alcalina, β-galactosidasa, glucosa oxidasa, glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, peroxidasa son enzimas utilizadas para el ELISA. Estas enzimas son útiles para marcar por que satisfacen los siguientes criterios:

- Las enzimas poseen una elevada especificidad.
- La amplificación observada con una enzima está relacionada con la cantidad de sustrato convertida en producto durante el tiempo de incubación.
- Las enzimas con las más altas actividades específicas son potencialmente capaces de dar la mayor amplificación.
- Los ensayos que utilizan tales enzimas pueden exhibir mayor sensibilidad y ser capaces de detectar concentraciones menores de ligando.
- Las marcas son estables durante el ensayo y si se conservan refrigeradas.
- Las enzimas no están presentes en el líquido biológico o tejido a analizar.
- Las enzimas todavía retienen la mayor parte de su actividad cuando se fijan al ligando (o anticuerpo).[1,9,23,37]

VENTAJAS.

- Emplea antígenos conjugados con enzimas y anticuerpos.
- Se pueden almacenar en condiciones estériles.
- Pueden utilizarse durante dos años, sin pérdida apreciable de su actividad enzimática inmunológica.
- El uso de enzimas como marcadores conlleva un riesgo mínimo de contaminación.
- Los procedimientos son relativamente fáciles de ejecutar.

- No se requiere equipo costoso
- El análisis puede llevarse a cabo en laboratorios equipados con espectrofotómetros simples.
- La especificidad de la prueba depende de los anticuerpos que se utilicen.
- No se ve limitado por la cantidad de anticuerpo marcado que se añade a cada tubo de ensayo.
- Es muy sensible y detecta picogramos de la sustancia en estudio.

DESVENTAJAS.

- La mayoría de los análisis requiere pasos múltiples de separación e incubación.
- Toman más tiempo para efectuar el ensayo.

4) FLUOROINMUNOANÁLISIS DE POLARIZACIÓN (FIAP)

La polarización de fluorescencia es una técnica que ha sido utilizada a menudo para estudiar interacciones de unión proteína-ligando, pero sólo recientemente ha sido aplicada en forma rutinaria a los sistemas de inmunoanálisis clínicos. Estos ensayos se basan en la cantidad de luz fluorescente polarizada que se detecta cuando el fluoróforo o marca se excita con luz polarizada plana. El grado de polarización de fluorescencia depende de la velocidad de rotación del complejo fluoróforo-ligando en solución. Las moléculas pequeñas rotan libremente y en consecuencia la luz fluorescente emitida por la molécula es relativamente despolarizada, mientras que las grandes moléculas como las proteínas rotan en forma más lenta, produciendo un mayor grado de polarización de la luz fluorescente emitida. Cuando un anticuerpo fija un ligando de bajo peso molecular marcado con un fluoróforo la polarización de fluorescencia del ligando marcado aumenta, dado que la rotación del complejo ligando marcado-

anticuerpo es mucho más lenta que la de los ligandos marcados solos. El ligando no marcado va a competir con el ligando marcado por los sitios de unión del anticuerpo de modo que la cantidad de luz fluorescente polarizada resultante de una reacción de unión competitiva es inversamente proporcional a la concentración de ligando no marcado en la reacción. [23,40]

Los inmunoanálisis de polarización de fluorescencia han sido limitados a la medición de ligandos de bajo peso molecular tales como drogas y algunas hormonas. [1,23,40]

VENTAJAS.

- Son bastantes exactas y se ven menos afectadas por variaciones en la intensidad de fluorescencia.
- Se obtiene con facilidad una precisión del orden de 1% o mayor en la medición, por lo tanto son ensayos más precisos.
- Esta técnica no requiere de la separación de marcador enlazado y libre.

DESVENTAJAS.

- Se limita a determinaciones que puedan realizarse con compuestos fluorescentes.
- Los instrumentos que se requieren para efectuar las mediciones son especializados y sólo miden la intensidad de fluorescencia o la polarización.
- El sistema es menos flexible que la espectroscopía de absorción.
- Es de suma importancia controlar la temperatura y la viscosidad y emplear muestras no hemolizadas y no lipémicas que no produzcan fluorescencia que interfiera.

5) CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA (TLC)

La TLC **(Fig. 25)** es una excelente técnica de detección o confirmación para grandes laboratorios y los de capacidad más limitada. El método no requiere instrumental y es relativamente económico. Sus ventajas adicionales incluyen la flexibilidad de realizar análisis simultáneos de un mayor número de drogas y de muestras.[23]

FIG. 25a Colocar la muestra con un capilar de vidrio en la parte inferior de la placa

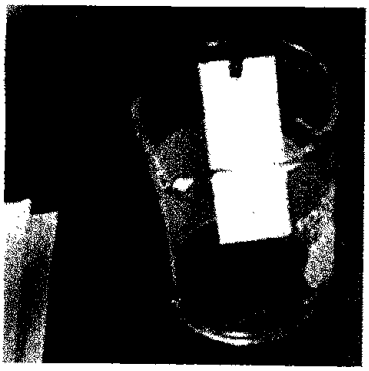


FIG. 25b Introducir la placa en un vaso de precipitado con el disolvente apropiado

FIG. 25c Cerrar el recipiente y dejar que el líquido ascienda por capilaridad

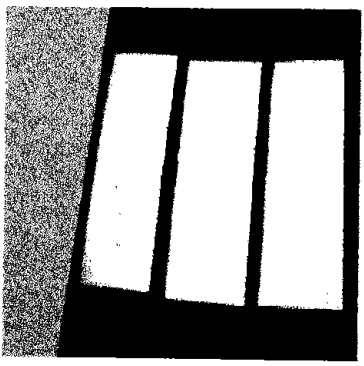


FIG. 25d Revelar la placa para poner de manifiesto donde se encuentran los puntos

FIG. 23 Cromatografía en capa fina **(TLC)** (Ref. 53)

La sensibilidad de la mayoría de las técnicas de TLC es adecuada en los casos de sobredosis y abuso de drogas, y la especificidad es a menudo aceptable. Un inconveniente de las técnicas de TLC era el largo tiempo de obtención de resultados. Según el método utilizado, dicho período puede ser de 2 a 4 horas. Se dispone de métodos comerciales más nuevos, basados en los mismos principios que la TLC pero con un desarrollo acelerado de las etapas de detección. Estos han reducido el tiempo del ensayo a 1 a 3 horas. [23]

VENTAJAS.

- Puede separar y detectar más compuestos que otro método.

DESVENTAJAS.

- Imposible detectar todas las drogas con una extracción o un sistema cromatográfico
- Detección subjetiva.

6) INHIBICIÓN DE LA AGLUTINACIÓN (LIA)

Es una adaptación de las reacciones de aglutinación que permite la detección y cuantificación de antígenos solubles. Las concentraciones de anticuerpo y partículas son cuidadosamente controladas para evitar un exceso de anticuerpo. [23,29,41]

Los resultados se evalúan por inhibición competitiva de la aglutinación mediante incubación previa del anticuerpo con la solución del antígeno conocido. Cuando el anticuerpo se incuba con la solución del antígeno en estudio, éste se une a los sitios combinantes del anticuerpo que se hallan disponibles. Este anticuerpo ya combinado se añade luego a las

suspensiones de antígeno particulado. La incapacidad de aglutinar indica que se han saturado suficientes sitios de acción del anticuerpo con una forma soluble del mismo antígeno de modo que no hay suficiente disponibilidad de dichos sitios para la fijación y unión cruzada con el antígeno soluble puede realizarse por evaluación del grado de inhibición en diluciones seriadas de la solución del antígeno.[23,29,41]

VENTAJAS.

- Es un método para control rápido de una respuesta del anticuerpo en algunas infecciones virales.

DESVENTAJAS.

- Puede no tener la sensibilidad adecuada y puede requerirse una reacción más lenta y sensible.

7) INMUNOENSAYO ENZIMÁTICO MULTIPLE (EMIT)

La técnica de inmunoensayo enzimático múltiple (EMIT) **(Fig. 26)** es un inmunoanálisis homogéneo en el cual un ligando de bajo peso molecular se marca con una enzima cuya actividad está inhibida cuando el ligando se une a un anticuerpo específico. La unión competitiva de un ligando no marcado con el anticuerpo libera la inhibición y genera una respuesta en proporción a la concentración del ligando. Este protocolo de ensayo no requiere una etapa para separar la marca unida al anticuerpo de la marca libre. [3,31,33]

La unión del anticuerpo con el ligando marcado con enzima varía la actividad enzimática de la marca, de modo que la marca unida al anticuerpo puede distinguirse del ligando marcado no combinado. [3,31,33]

En muchos casos, la unión del anticuerpo con el ligando marcado inhibe estéricamente la enzima impidiendo el acceso de su sustrato al sitio catalítico.[3,31,33]

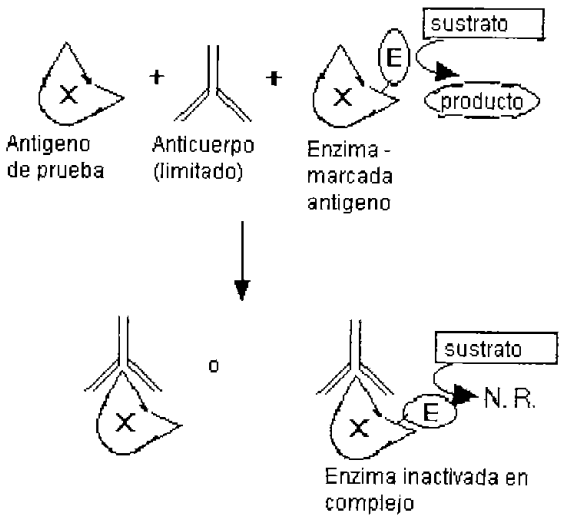


FIG. 26 Inmunoensayo enzimático múltiple **(EMIT)** (Ref.44)

VENTAJAS.

- No requiere un paso de separación.
- Resulta adecuado para procesos automatizados en muchos analizadores enzimáticos.
- Es fácil de realizar.
- Los reactivos tienen una vida media relativamente prolongada.
- Es bastante sensible y exacto para efectuar pruebas de fármacos en orina.

DESVENTAJAS.

- Medicamentos de estructura química muy similar reaccionan en forma cruzada con el anticuerpo de prueba y afectan la especificidad del análisis produciendo resultados positivos.
- Posible interferencia debido a enzimas endógenas o sustancias que afectan la actividad enzimática, el analista debe considerar esta posibilidad.

En base a un cuadro comparativo de técnicas presuntivas para la detección del principal metabolito de cocaína (benzoilecgonina, BE) basada en estudios realizados y reportados en el articulo (ref. No. 38) concluye que las técnicas de mayor confiabilidad son EMIT y RIA, a continuación se presenta el cuadro comparativo en donde se reportan cada uno de los criterios analizados[38]:

TECNICA	MUESTRAS ANALIZADAS	NIVEL DE CORTE	RESULTADOS POSITIVOS	CONFIRMACIÓN DE MUESTRAS POSITIVAS	CONFIRMACIÓN DE MUESTRAS NEGATIVAS
EMIT-1 *	552	300	123	119	422
EMIT-2 *	484	300	101	99	370
RIA	402	300	121	119	279

TÉCNICA	% FALSOS POSITIVOS	%FALSOS NEGATIVOS	SENSIBILIDAD	ESPECIFICIDAD
EMIT-1 *	0.9	5.6	94.4	99.1
EMIT-2 *	0.5	11.6	88.4	99.5
RIA	0.7	1.7	98.3	99.3

* EMIT-1 y EMIT-2 es debido a que se realizaron en dos laboratorios diferentes pero con las mismas condiciones. (Ref. 38)

C) TÉCNICAS CONFIRMATIVAS

Para determinar un perfil de la cocaína presente en un espécimen, se utilizan procedimientos como la cromatografía de gases, espectrometría de masas, cromatografía de gases / espectrometría de masas (GC/MS), que permite la separación simultánea, y una determinación cualitativa y/o cuantitativa de cada compuesto.[30]

1) CROMATOGRAFÍA DE GASES / ESPECTROMETRIA DE MASAS

ESPECTROMETRÍA DE MASAS.

La espectrometría de masas (MS) es el primer paso de un método de análisis típico en donde se introduce la muestra de interés. Si la muestra no se encuentra en forma gaseosa, esta es convertida a este estado y luego ionizado por (1) impacto electrónico (EI), o (2) iones producidos por EI de la selección de reactivos gaseosos, tal como metano, isobutano, y amonio. El último proceso se llama ionización química convencional (CI).[42]

La MS proporciona el peso molecular e información acerca de la formula molecular. Con la llegada de electrones de alta energía a la muestra se rompe la molécula, en donde se mide la masa de los fragmentos usando esta información para reconstruir la molécula. [35,42]

Un espectrómetro de masas ioniza las moléculas en un alto vacío, clasifica los iones de acuerdo a sus masas y registra la abundancia de los iones de cada una de las masas. [18,42]

Se han presentado espectros de EI de los compuestos de cocaína para la identificación. También se han explorado las rutas de fragmentación de

cocaína **(Fig. 27)** el establecimiento de estas rutas es basado en las siguientes consideraciones:

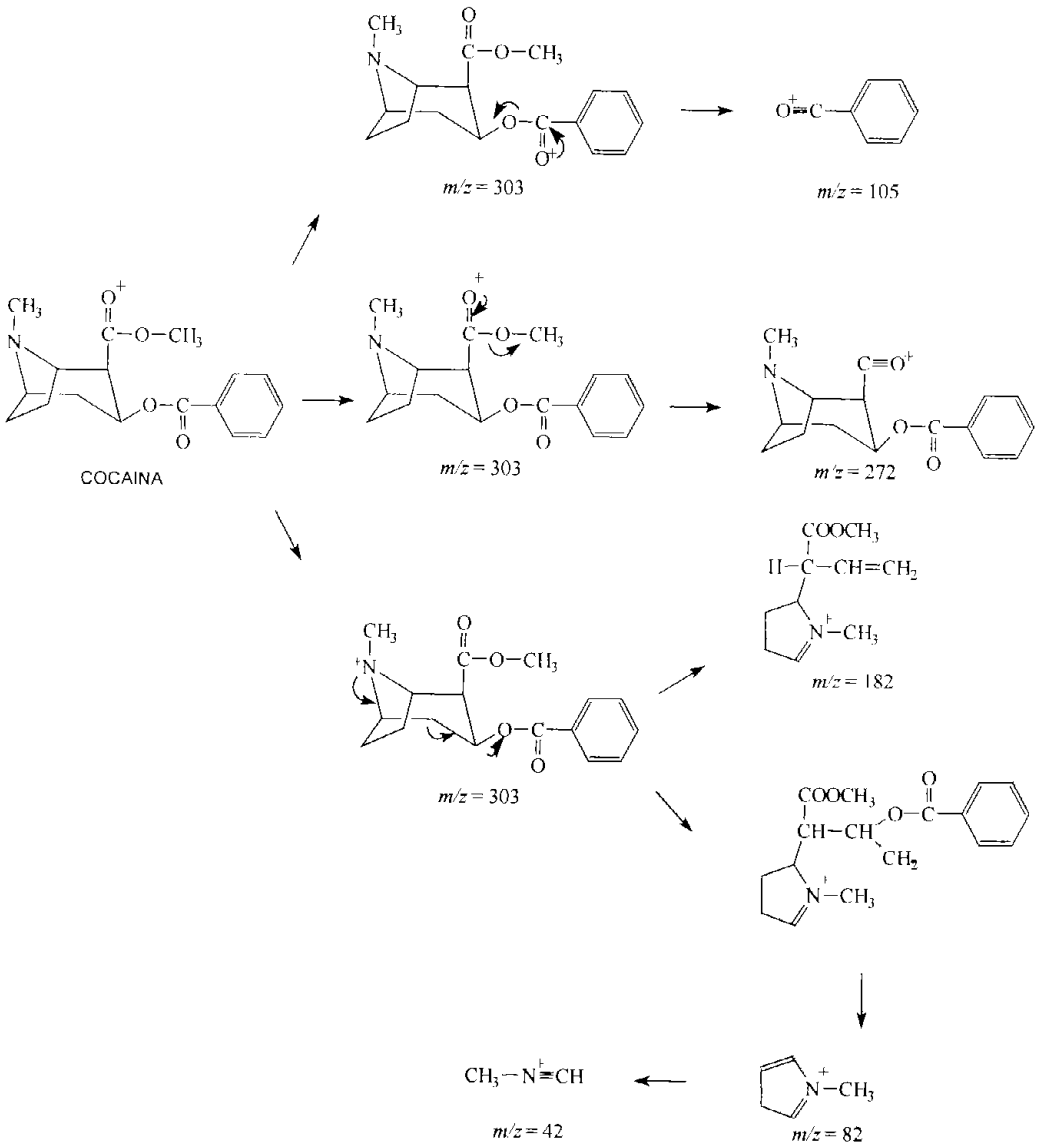


FIG. 27 RUTA DE FRAGMENTACIÓN DE LA COCAÍNA (Ref. 30)

La carga del ion molecular que se localiza inicialmente en el átomo de N y, en menor grado, en los dos átomos de carbonilos; y los cambios de masa de iones derivados de los análogos del deuterio y los compuestos relacionados, como la cinamoilcocaina, benzoilecgonina, metilecgonina, y etilecgonina. [11,30]

CROMATOGRAFÍA DE GASES.

La cromatografía de gases (CG) es una técnica física que separa compuestos basados en su distribución entre un gas y una fase estacionaria. La fase estacionaria puede ser un líquido y un sólido, y la fase móvil es un gas que pasa sobre la fase estacionaria. [23,29]

Fase móvil. El gas portador debe ser inerte a fin de no reaccionar con los componentes de la muestra. Las impurezas comunes en el gas portador son humedad, oxígeno e hidrocarburos. Cada uno de estos contaminantes puede afectar adversamente diversos detectores produciendo registros inestables de líneas de base o picos extraños. En ciertas situaciones las impurezas del gas portador pueden interaccionar con los componentes de la muestra, impidiendo su análisis. [7,11,29]

La elección del gas portador influye sobre el rendimiento de la columna (eficiencia y resolución) y el tiempo requerido para el análisis (tiempo de retención). [12]

Fase estacionaria. En cromatografía sólido-gaseosa (CSG), la columna es empaquetada con un material sólido adsorbente en el cual los componentes de la muestra se particionan por adsorción en la superficie del sólido. [11,29]

Los sólidos cromatográficos más comunes para las fases de adsorción, están hechos con tierra de diatomeas. El material puede ser también triturado, mezclado y prensado formando ladrillos de color rosado, a diferencia del material original que es blanco, debido a que el procesamiento introduce impurezas minerales que forman óxidos y silicatos. Este material posee mayor densidad y es menos frágil que el material blanco. Su tamaño de poro es de 2μ, comparado con los 9μ del material blanco. En consecuencia se obtiene mayor eficiencia con el material rosado. [7,11,12]

La fase estacionaria en cromatografía líquido-gaseosa (CLG) es una fina película de líquido que se mantiene sobre una plataforma o soporte inerte. En cromatografía capilar, el líquido cubre las paredes de los tubos. En las columnas empaquetadas, el líquido se mantiene en forma de una fina película a través de la superficie de un soporte inerte. El soporte debe ser inerte y no influir sobre la separación. [11,23]

Derivatización. Con frecuencia es deseable modificar químicamente una molécula de modo que los nuevos productos formados posean propiedades preferibles a las de sus precursores. Puede ser necesario derivatizar un compuesto para hacerlo volátil y estable como gas, siendo entonces analizable por CG. También se preparan derivados para lograr sensibilidad, selectividad o especificidad para una determinada separación. Los derivados pueden eluir la columna más rápidamente, formar menos colas, producir picos más agudos, proveer estabilidad a compuestos termolábiles y aumentar la resolución. Se involucra una reacción química entre un grupo funcional de la molécula de la muestra (generalmente un grupo polar, que reduce la volatilidad o interacciona con la fase estacionaria aumentando el

tiempo de retención) y una molécula menor (agente derivatizante) que forma un nuevo producto de mayor volatilidad y menor coeficiente de partición. [11,23,29,55]

CROMATOGRAFÍA DE GASES / ESPECTROMETRIA DE MASAS

Cuando un cromatógrafo de gases se le coloca en interfase con un espectrómetro de masa (GC/MS), **(Fig. 28)**, la combinación provee los datos analíticos mas objetivos de los métodos existentes para la dilucidación estructural de un compuesto desconocido. [7,23]

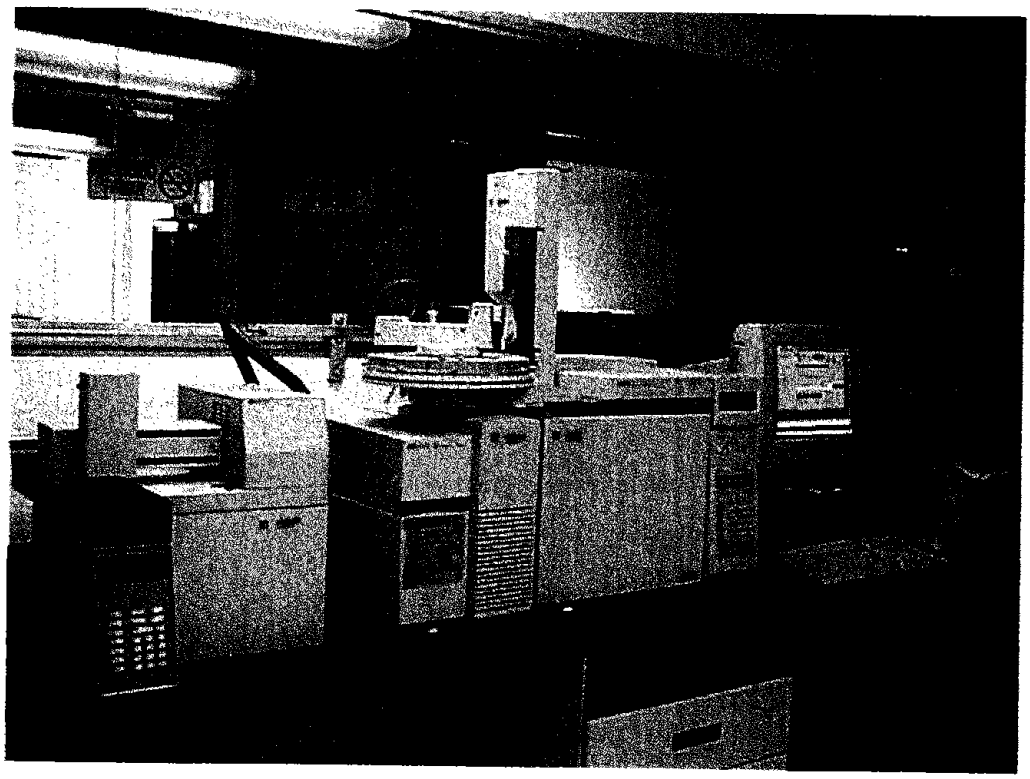


FIG. 28 Cromatógrafo de Gases / Espectrómetro de Masas (GC/MS)
(Cortesía de la PGR)

El sistema GC/MS se utiliza como método de confirmación y de selección primaria en la investigación de drogas cuando se requieren resultados rápidos. [23]

Las muestras deben ser extraídas y es necesario que la droga sea volátil o bien es derivatizada para hacerla volátil. Las muestras pueden ser cromatografiadas en una columna simple o inyectadas en varias columnas selectivas a fin de incrementar la especificidad y sensibilidad. Los compuestos se identifican por sus respectivos tiempos de retención, además se dispone de detectores específicos que pueden proporcionar una mayor información. [11,23,32]

El sistema GC/MS convencional requiere considerable experiencia técnica y los costos de equipamiento son elevados. [11,23]

D) PERFIL ANALÍTICO ESPECIFICO DE ESTE TRABAJO

a) TÉCNICA DE EMIT

MATERIAL:
- Cubetas de reacción
- Contenedor de desechos

REACTIVOS:
- Solución buffer
- Agua destilada

EQUIPO:
- Aparato de EMIT

MUESTRAS BIOLÓGICAS:
- Muestras de orina

PROCEDIMIENTO:

1.- Colocar en el respectivo lugar, marcado tanto para reactivos como para calibradores de los metabolitos de la droga a detectar en caso de estar presentes en las muestras de orina a analizar.

2.- Colocar cubetas de reacción, suficientes en base al número de calibración y muestras a analizar.

3.- Colocar cubetas con las muestras a analizar, en este tipo de instrumento se pueden analizar hasta 70 por corrida.

4.- Programar en los iconos y comandos correspondientes de los metabolitos de las drogas a detectar, en base al orden en el que se colocaron tanto los reactivos como los calibradores de cada una de las drogas, siendo las más comunes, metabolitos de cannabis, Cocaína,

Anfetaminas, Benzodiacepinas y opiáceos; en los cuales cada uno de ellos debe contar con niveles de calibración alto, medio y bajo.

5.- Previo a iniciar la corrida debe verificarse la lámpara, la longitud de onda a la cual está programada y el nivel de rango de detección; igualmente debe realizarse un lavado del sistema con solución buffer, agua destilada y tener un contenedor de desechos agregado al equipo.

6.- Una vez realizadas todos los aspectos anteriores, iniciar la corrida.

7.- Conforme se van obteniendo los resultados impresos, se revisa que la calibración haya sido adecuada e igualmente se aplican los criterios de aceptación con respecto a los valores igual o por arriba de la línea de corte.

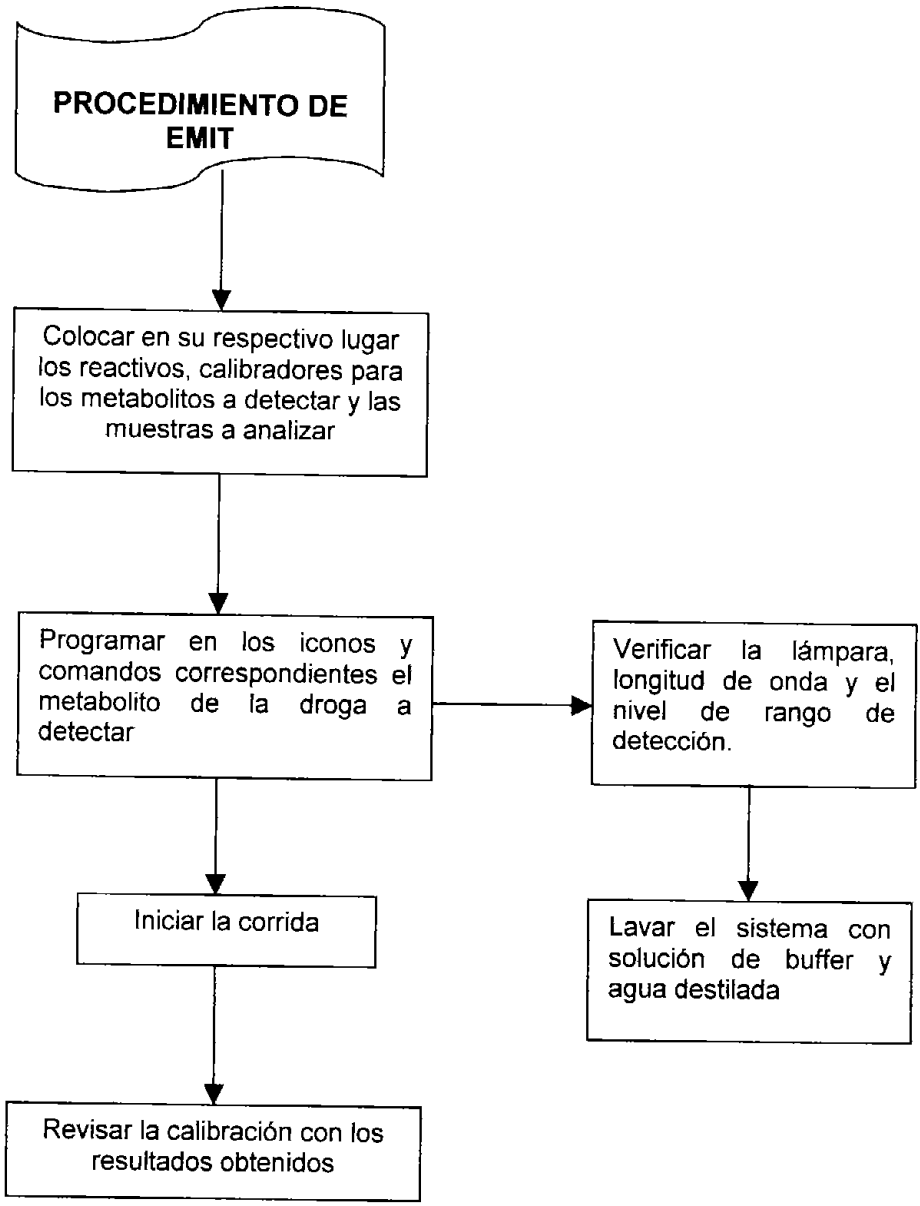


DIAGRAMA DE FLUJO, Elaborado por: Liliana Cruz Cruz, Septiembre, 2004

b) TÉCNICA DE GASES / MASAS

ANALISIS DE COCAINA Y BENZOILECGONINA EN ORINA POR FASE LÍQUIDA

MATERIAL:

- Gradilla para tubos de ensayo de 16x150 mm
- Gradilla para tubos de ensayo de 13x150 mm
- Tubos de ensayo con rosca de 16X150 mm
- Tubos de ensayo con rosca de 13X150 mm
- Pipeta serológica de 2 ml
- Pipeta serológica de 5 ml
- Termómetro
- Baño maría
- Micropipeta de 50µl
- Micropipeta de 1µl

REACTIVOS:

- Buffer de borato de sodio pH = 9.2
- Cloruro de n-butilo
- Ácido clorhídrico metanólico
- Acetato de etilo
- Ácido clorhídrico 0.1N
- Buffer de carbonato pH = 9
- Nitrógeno

MUESTRAS BIOLÓGICAS:

- Muestras de orina

EQUIPO:

- Agitador vortex
- Centrífuga

PROCEDIMIENTO:

1. En un tubo de rosca agregar: 2 ml de muestra, buffer de borato de sodio saturado con pH 9.2 y un estándar interno (codeína)
2. Agitar en vortex.
3. Agregar cloruro de n-butilo.
4. Mezclar por 15 minutos
5. Centrifugar por 10 minutos ***
6. Pasar la capa orgánica a otro tubo de ensayo y agregar ácido clorhídrico metanólico.
7. Evaporar a sequedad a 60°C en un evaporador con baño maría con aire (también se puede emplear nitrógeno seco)
8. Reconstituir con 50 μl de acetato de etilo
9. Inyectar 1 μl en el GC/MS

***PROCESO DE LIMPIEZA

1. Transferir la capa orgánica a un tubo que contenga 1.5 ml de HCl 0.1 N
2. Tapar y mezclar por 1 minuto
3. Centrifugar por 5 minutos
4. Descartar la capa orgánica
5. Agregar buffer de carbonato pH 9.0
6. Agregar cloruro de n-butilo
7. Mezclar por 15 minutos
8. Centrifugar por 10 minutos
9. Continuar con el paso del procedimiento anterior

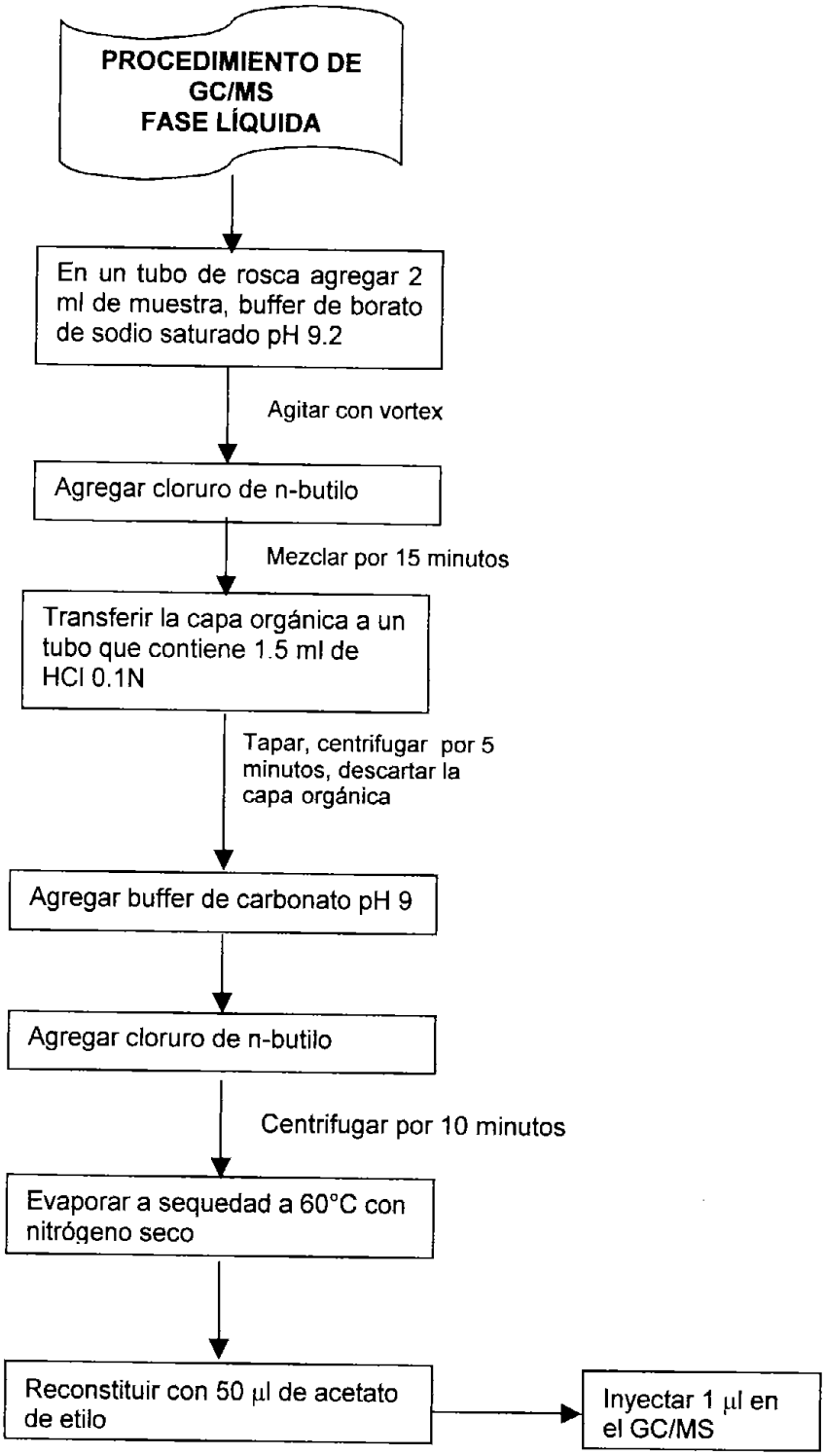


DIAGRAMA DE FLUJO, Elaborado por Liliana Cruz Cruz, Septiembre, 2004

ANALISIS DE COCAINA Y BENZOILECGONINA EN ORINA POR FASE SÓLIDA

MATERIAL:

- Gradilla para tubos de ensayo de 16x150 mm
- Tubos de ensayo con rosca de 16x150 mm
- Pipetas serológicas de 2 ml
- Pipetas serológicas de 5 ml
- Pipetas serológicas de 10 ml
- Cartuchos

REACTIVOS:

- Buffer de fosfato pH = 6
- Metanol
- Ácido clorhídrico 0.1N
- Cloruro de metileno
- Isopropanol
- Hidróxido de amonio
- BSTFA (N,o-bis-trimetilsililtrifluoroacetamida)
- TMCS (trimetilclorosilano)
- Papel pH
- Agua desionizada

MUESTRAS BIOLÓGICAS:

- Muestras de orina

EQUIPO:

- Agitador vortex
- Bomba de vacío

PROCEDIMIENTO:

1. DESCRIPCIÓN DE LAS MUESTRAS

CONTROL POSITIVO: muestra negativa a la que se le adicionó 100µl de la mezcla de cocaína y metabolitos (benzoilecgonina y metilecgonina).

MUESTRA DESCONOCIDA: diluida (2.0 ml de orina en 3.0 ml de agua desionizada).

2. TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS.

Las muestras se tratan:

- Adicionar Buffer de Fosfato pH 6 (evita hidrólisis de cocaína)
- Adicionar estándar interno (codeína)
- Mezclar (vortex)
- Medir pH = 6.0 (papel)

3. ACONDICIONAMIENTO DE LOS CARTUCHOS

- Identificar los cartuchos según las muestras a analizar
- Colocarlos en la base de la cámara de vacío
- Adicionar a cada cartucho 2.0 ml de metanol
- Crear vacío de 5 mm Hg, abrir válvulas para que eluya el metanol
- Adicionar 2.0 ml de Buffer de Fosfato y eluir igual que el metanol.

4. APLICACIÓN DE LAS MUESTRAS.

- Adicionar a cada cartucho toda la muestra, eluir.
- Descartar los solventes de las elusiones previas.

5. LAVADO DEL CARTUCHO.

- Adicionar 6.0 ml de agua desionizada. Eluir
- Adicionar 3.0 ml de HCl 0.1 N y eluir
- Secar el cartucho con una presión de 15 mm Hg / 5 minutos.
- Adicionar 9.0 ml de metanol y eluir.

6. ELUSIÓN DE COCAINA Y METABOLITOS.

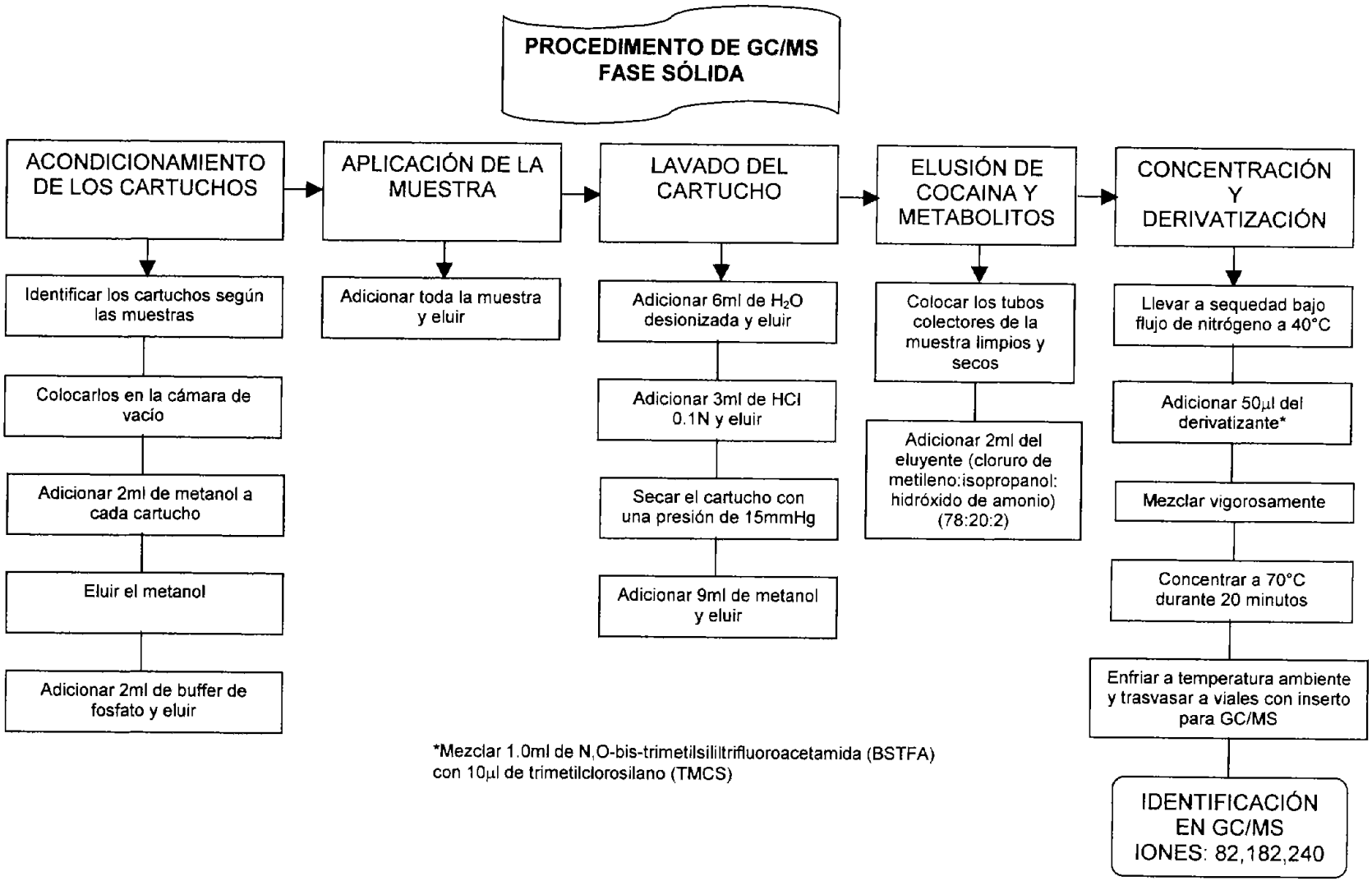
- Preparación del eluyente (cloruro de metileno : isopropanol : hidróxido de amonio en la siguiente relación 78:20:2).
- Descartar los solventes.
- Colocar tubos colectores de la muestra limpios y secos.
- Adicionar 2.0 ml del eluyente. Eluir.

CONCENTRACIÓN Y DERIVATIZACION DE LA MUESTRA.

- Cada tubo se coloca en baño maría entre 30°C y 40°C (máxima) bajo flujo de aire hasta sequedad. (evitar contacto con agua).
- Adicionar 50 µl de derivatizante. Mezclar 1.0 ml de N,o-bis-trimetilsililtrifluoroacetamida (BSTFA) (presentación de ampolla) con 10 µl de trimetilclorosilano (TMCS) y almacenar en frasco color ámbar en refrigeración.
- Mezclar vigorosamente.
- Concentrar en seco a 70°C durante 20 minutos.
- Enfriar a temperatura ambiente.
- Trasvasar a viales con inserto para CG/MS.

CUANTIFICACION POR CROMATOGRAFÍA GASES / MASAS

- Condiciones del equipo.
- Método [modo selected ion monitoring (SIM)] creado para la extracción en fase sólida
- Usando modo SIM con un programa de temperaturas.
- Monitorear los iones.


PROCEDIMENTO DE GC/MS
FASE SÓLIDA
ACONDICIONAMIENTO DE LOS CARTUCHOS
Identificar los cartuchos según las muestras
Colocarlos en la cámara de vacío
Adicionar 2ml de metanol a cada cartucho
Eluir el metanol
Adicionar 2ml de buffer de fosfato y eluir
APLICACIÓN DE LA MUESTRA
Adicionar toda la muestra y eluir
LAVADO DEL CARTUCHO
Adicionar 6ml de H_2O desionizada y eluir
Adicionar 3ml de HCl 0.1N y eluir
Secar el cartucho con una presión de 15mmHg
Adicionar 9ml de metanol y eluir
ELUSIÓN DE COCAINA Y METABOLITOS
Colocar los tubos colectores de la muestra limpios y secos
Adicionar 2ml del eluyente (cloruro de metileno:isopropanol: hidróxido de amonio) (78:20:2)
CONCENTRACIÓN Y DERIVATIZACIÓN
Llevar a sequedad bajo flujo de nitrógeno a 40°C
Adicionar 50µl del derivatizante*
Mezclar vigorosamente
Concentrar a 70°C durante 20 minutos
Enfriar a temperatura ambiente y trasvasar a viales con inserto para GC/MS
IDENTIFICACIÓN EN GC/MS
IONES: 82,182,240
*Mezclar 1.0ml de N,O-bis-trimetilsililtrifluoroacetamida (BSTFA) con 10µl de trimetilclorosilano (TMCS)

VI. RESULTADOS

CRITERIO DE ANALISIS

Muestras de fluido biológico: **orina**

TÉCNICA DE DISCERNIMIENTO EMPLEADA:

Inmunoensayo Enzimático Múltiple (EMIT)

CRITERIO DE INCLUSIÓN:

De un universo muestral de mil (1000), se separaron cien (100) con resultado positivo para metabolitos de cocaína (benzoilecgonina). Todo valor igual o por arriba de la línea de corte (300 ng / ml) establecida en la detección de metabolitos de cocaína en fluidos biológicos, siendo el caso que nos ocupa de orina, se considera positivo según acuerdos internacionales establecidos por Substance Abuse and Mental Health Services Administration (SAMHSA) y Food and Drug Administration (FDA).

CRITERIO DE EXCLUSIÓN:

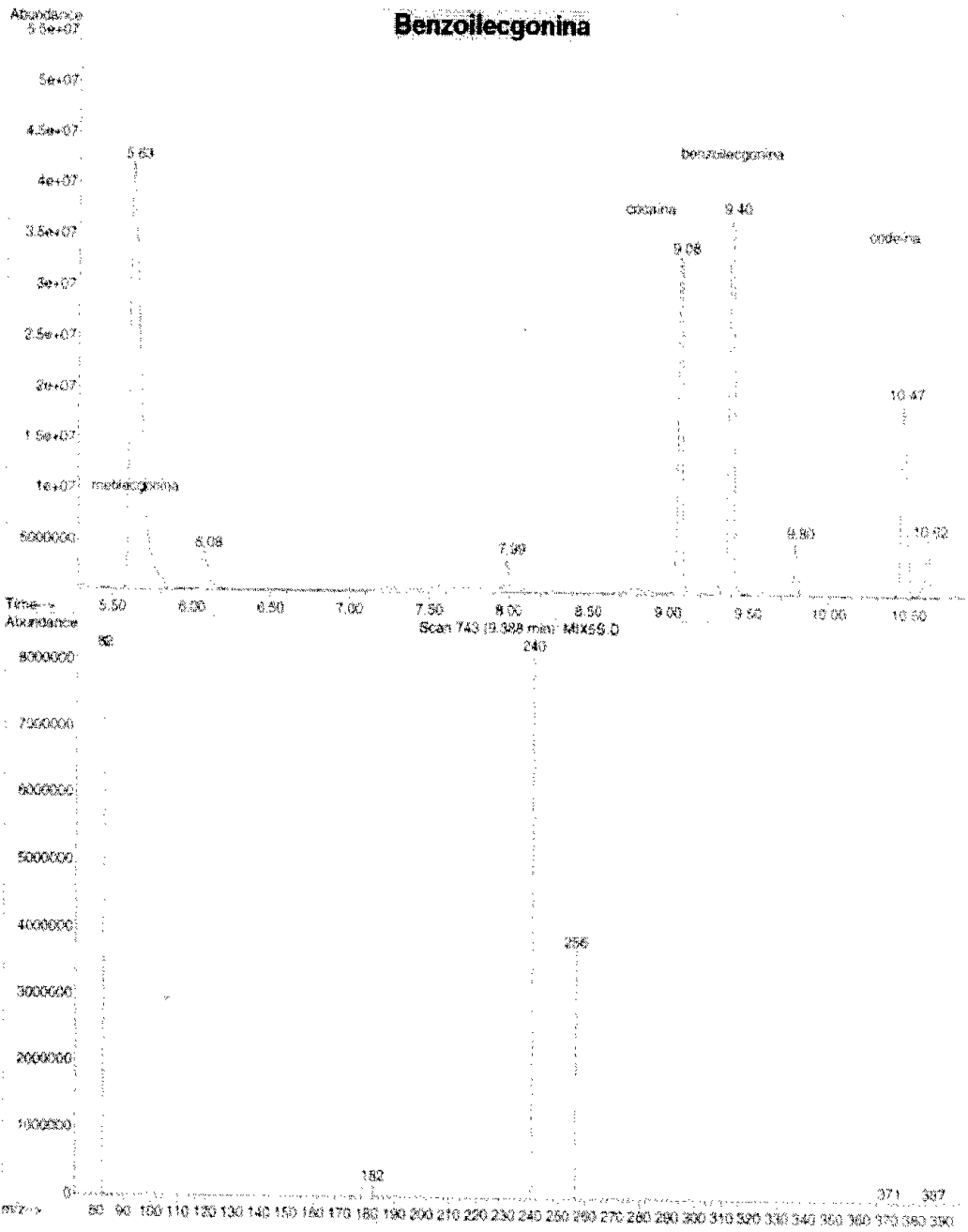
Todas las muestras con resultado negativo en EMIT (valores por debajo de la línea de corte establecida), se descartan para análisis confirmatorio.

TÉCNICA DE CONFIRMACIÓN:

Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC/MS)
Empleada esta última como prueba reina por su alta confiabilidad.

Al aplicar la técnica de Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas sobre las muestras en estudio, empleando una columna capilar de 30 metros de longitud, con fase estacionaria de metilfenilsilicona al 5% y helio de ultra alta pureza como fase móvil, se obtuvieron cromatogramas con tiempo de retención característicos de benzoilecgonina derivatizado con N-metil-n-ter-butildimetilsililtrifluoroacetamida (MTBSTFA):ACETONITRILO y al ser monitoreado por espectrometría de masas, se obtuvieron espectros de masa carga con patrones de fragmentación característicos de benzoilecgonina derivatizados, confirmando su presencia en las muestras en estudio.

El 100% de las muestras positivas identificadas como tales por EMIT, se confirmaron plenamente como positivas por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas empleada esta última como prueba reina para valorar la confiabilidad de la técnica de EMIT.



Cromatógrafo de Gases y Espectro de Masas obtenidos del Cromatógrafo de Gases (Hewlett-Packard: 6890) acoplado al Espectrómetro de Masas (Hewlett-Packard: 5973)

VII. DISCUSIÓN (ANÁLISIS DE RESULTADOS)

Con los resultados obtenidos se confirma la hipótesis de este trabajo y se cumple con los objetivos fijados, debido a que se pudo determinar la presencia de los metabolitos de cocaína (BE), tanto por la técnica de EMIT como de GC/MS.

Se observa en la información bibliográfica que después de un análisis de la misma una de las técnicas de inmunoensayo más confiables es la de EMIT por su grado de sensibilidad y especificidad compitiendo aún con la RIA, sin embargo desde el punto de vista de costos entre una y otra técnica es significativa la diferencia, siendo RIA mucho más cara.

La empresa que comercializa el equipo de EMIT maneja en sus reactivos y calibradores una confiabilidad del 99.0% lo cual nos indica que de cada una nos daría un resultado Falso-Positivo, sin embargo, al menos en las cien (100) muestras con base en nuestro criterio de inclusión para las muestras positivas considerando los valores de referencia establecidos por los organismos como SAMHSA y FDA que establecen una línea de corte en análisis de discernimiento como es el caso de las técnicas de inmunoensayo enzimático entre otras ya analizadas anteriormente, el 100% de nuestras muestras positivas (bajo el criterio de inclusión) por EMIT, se confirmaron plenamente por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas al ser identificado el metabolito de la benzoilecgonina, principal metabolito de la cocaína, en orina.

Con respecto al análisis estadístico se menciona que este no fue efectuado debido a que no se obtuvieron resultados falsos-negativos y falsos-positivos, esto es, por que se siguió los criterios de SAMHSA y FDA donde

se menciona que toda muestra negativa presuntiva no es confirmada, solo aquellas positivas obteniendo una confirmación del 100% de las muestras en estudio.

VIII. CONCLUSIONES

La técnica de Inmunoensayo Enzimático Múltiple (EMIT) tiene una alta especificidad, para la identificación del principal metabolito de la cocaína (benzoilecgonina) en un fluido biológico como la orina.

Con base a los criterios de inclusión, el universo de análisis muestral que fue de 100, con los resultados positivos por EMIT, fueron confirmados el 100% por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, lo cual nos permite establecer que la técnica EMIT es específica y confiable para la detección del principal metabolito de la cocaína (benzoilecgonina) en un fluido biológico como la orina.

Con base a la conclusión anterior, todos los resultados nos llevan a establecer que la técnica de EMIT es específica y confiable, debido a que el 100% de los resultados positivos por EMIT como prueba presuntiva, fueron confirmados por una técnica de probada confiabilidad, empleada como la prueba reina (Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas) de este análisis comparativo.

En todo análisis para la detección de metabolitos de drogas de abuso y de forma específica, el motivo de este trabajo que es el principal metabolito de la cocaína (benzoilecgonina) en fluido biológico (orina) de acuerdo al método científico y a los criterios internacionales deben realizarse pruebas tanto presuntivas como confirmativas.

IX. SUGERENCIAS.

1.- Debido a que en nuestros resultados se obtuvo una confiabilidad del 100%, es necesario aumentar el número de muestras positivas a confirmar por GC/MS para tener un rango de confiabilidad más amplio. Y aunque estadísticamente es aceptable es necesario ampliar el universo muestral.

2.- Tomar en cuenta el valor de la línea de corte (300 ng/ml) para considerar una muestra positiva o negativa, es decir, cuando nuestra muestra nos dé un resultado negativo por EMIT y se confirma en GC/MS obteniendo un valor menor a 300 ng/ml el resultado será negativo, por lo contrario, si es mayor o igual a la línea de corte, es positivo.

3.- Del conjunto de muestras analizadas para la presencia del metabolito de cocaína (benzoilecgonina, BE) mediante EMIT confirmar las muestras negativas para evitar resultados Falsos-negativos , aunque no se apegue a lo establecido por los organismos internacionales FDA y SAMHSA; pero desde el punto de vista confiabilidad y Control de calidad es necesario también confirmar las negativas.

4.- Considerar la especificidad (estructuras moleculares similares a otras drogas), la reactividad cruzada (sustancias relacionadas) e interferencia (compuestos o sustancias que ingresadas al organismo o directamente en la muestra pueden alterar la matriz) que se pueden llegar a encontrar en el análisis de las muestras, para descartar resultados falsos-negativos inducidos.

X. GLOSARIO:

ALCALOIDE: Se refiere a la capacidad que tiene una sustancia de neutralizar un ión hidrógeno, por lo que se llaman alcaloides. La capacidad del nitrógeno para donar un par de electrones no compartidos, tiene una función central en la ionización de fármacos. Los compuestos que tienen un nitrógeno trivalente ya sean amina primaria, secundaria o terciaria, son capaces de asociarse con el ion H+ y, por tanto, de adquirir una carga positiva; por ello, en condiciones ácidas se convierten en cationes como metilaminas, epinefrina, difenhidramina, derivadas de una amina primaria, secundaria y terciaria, respectivamente.

ANSIEDAD. (Del latín *anxietas*, ansiedad). Fenómeno psíquico característico por trastornos afectivos e intelectuales, inquietud, tedio, falta de atención o de memoria, obnubilación momentánea de la inteligencia o de la intensidad de la representación mental, que puede llegar hasta la seudo-alucinación, una pérdida momentánea de la conciencia y de la personalidad. La ansiedad, cuando alcanza su periodo último, se acompaña de angustia, fenómeno físico.

ANTICUERPO: Sustancias que antagonizan los cuerpos o antígenos extraños al organismo; son producidas por las grandes proteínas, denominadas inmunoglobulinas específicas; son originadas por la presencia de un antígeno. Su liberación se induce por un contacto secundario con el antígeno.

ANTÍGENO: Es todo aquel material, propio o extraño, soluble o particulado, que es capaz de despertar una respuesta inmunitaria en un individuo inmunológicamente competente.

CATALIZADOR: Sustancia que provoca la aceleración de una reacción química, de manera que una vez finalizada ésta permanece sin modificaciones

CIANOSIS (Del gr. *kyanos*, azul) Coloración azul violácea de la piel, principalmente acentuada en las extremidades, característica de una hematosis insuficiente, se observa en las afecciones cardíacas.

COCAINA: (Metilbenzoilecgonina). Es un alcaloide extraído de las hojas de coca. Es un estimulante del sistema nervioso central. Es considerado como una droga ilícita y es clasificado como un estupefaciente.

DELIRIO: (Del latín *delirare*, salir del surco o figurado, divagar, delirar.) Exteriorización verbal de ideas sin ilación, bajo la influencia de estados psíquicos variables, febriles, alucinatorios, de confusión, de demencia.

DIASTEREOISÓMEROS o DIASTEREÓMEROS: Estereoisómeros que no son imágenes especulares entre sí.

DRUPA: (L. *drupa* oliva excesivamente madura). Fruto pétreo en el cual la parte externa de la pared del ovario forma una piel, la parte media se convierte en una estructura carnosa y jugosa y la parte interna forma un hueso o piedra alrededor de la semilla.

ENANTIÓMERO: Cuando una sustancia tiene un carbón asimétrico, hay isomería óptica en la que uno de los isómeros desvía el plano de la luz polarizada hacia la derecha y el otro hacia la izquierda. La presencia

simultánea de ambos en un compuesto constituye la mezcla racémica; también le llaman racemato.

ENZIMAS: Materiales biológicos (proteínas) con propiedades catalíticas.

ESTEREOISÓMEROS: (Isómeros configuracionales). Término empleado para referirse a dos sustancias con la misma composición en grupos y constitución atómica. Difieren en la posición espacial de estos constituyentes. Isómeros cuyos átomos están enlazados entre sí en el mismo orden, pero que difieren en su orientación en el espacio.

FLOEMA: (Gr. *phloios* corteza). Tipo de tejido vascular en las plantas; transporta elementos nutritivos orgánicos hacia arriba y hacia abajo del tallo o la raíz

ISÓMEROS: Diferentes compuestos con la misma formula molecular

LIGANDO: Molécula o parte de una molécula reversiblemente unida por la proteína de unión en un ensayo de unión competitiva. Usualmente es la variable analítica, pero puede ser también un reactante cruzado.

MACERACIÓN: Procedimiento químico que consiste en dejar un solvente apropiado en contacto con un fármaco durante varios días a temperatura ambiente, en un frasco de boca ancha con tapón esmerilado, es decir, ablandar un sólido por su inmersión en un líquido; después se exprime el residuo con una prensa y se filtran los líquidos; después se exprime el residuo con una prensa y se filtran los líquidos.

MARCESCENTES: Cálices y corolas que ya marchitos permanecen alrededor del ovario y de las hojas secas que quedan adheridas a la planta.

MIDRÍASIS: (Del gr. *mydriasis*.) f. Dilatación de la pupila, que por consiguiente es de dimensiones exageradas.

NEUROTRANSMISOR: Sustancia química liberada por una neurona a nivel de un receptor específico o de una célula adyacente, la cual transmite información a través de la regulación o la modulación del potencial de reposo y el índice de descarga de la célula postsináptica

PARANOIA: (Del gr. *para*, de través, y *noeo*, pensar) Delirio sistematizado, delirio de los perseguidos y locura razonante.

PECIOLO: (*L. petiolus* pie pequeño o tallo de fruto) Pezón o pedúnculo por la cual se fija una hoja al tallo.

TAQUICARDIA: (Del gr. *tachys*, pronto, y *kardia*, corazón) Aumento del número de los latidos cardíacos que por su proximidad, dan al ritmo del corazón una cadencia rápida característica.

TAQUIPNEA: (Del gr. *tachys*, rápido, y *pneo*, yo respiro). Aumento del número de los movimientos respiratorios que por su aproximación, dan a la respiración una cadencia rápida característica.

XILEMA: Tejido de las traqueofitas que conducen agua y disuelven sales; consta de traqueidas y vasos; pueden proporcionar soporte mecánico.

XI. BIBLIOGRAFÍA.

1- Anderson, C, S, Ph. D., Cockayne, S, Ph. D., "QUIMICA CLINICA", Trad. Ma. Teresa Aguilar, ED. Interamericana McGraw-Hill, México, 1995, pp. 95-99, 100-106

2- Anderson, P, O, "HANDBOOK OF CLINICAL DRUG DATA", 10a, ED. McGraw-Hill Medical Publishing Division, N. Y., 2002, pp. 819, 832, 868, 900, 901, 936

3- Arena, J, M, "POISONING CHEMISTRY – SYMPTOMS – TREATMENTS, ED. Charles C. Thomas Publisher, USA, 1963, pp. 202-204,

4- Autenrieth, W, "LABORATORY MANUAL FOR THE DETECTION OF POISONS AND POWERFUL DRUG", 6a, ED. Philadelphia P. Blakiston's Sun & Co., © 1928, pp. 185-191

5- Bailey, N, D, Studies of cocaethylene (Ethylcocaine) formation by human tissues in vitro. J, Anal, Toxicol, (1994) 18: 13-15

6- Bevan, A, J, "FUNDAMENTOS DE FARMACOLOGIA, INTRODUCCION A LOS PRINCIPIOS DE ACCION DE LOS FÁRMACOS", ED. Harla, Harper & Row Latinoamericana, 1982, pp. 97-98

7- Brad J, May, B.S.; Aashish R, P, and J, S, Brodbelt, Ph.D. Determination of Benzoylecgonine in urine by Gas Chromatography-Quadrupole ion trap mass spectrometry. J, Forensic Sci, (1999) 44(3): 527-534

8- Bruneton, J, "FARMACOGNOSIA, FITOQUIMICA, PLANTAS MEDICINALES", 2a, Trad. Ángel Villar del Fresno, ED. Acriba, S.A., Zaragoza (España), 2001, pp.818-822

9- Butler, E, J, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. J, Immunol, (2000) 21(2&3): 165-209

10- Calabrese, E, J, "MULTIPLE CHEMICAL INTERACTIONS", ED. Lewis Publishers, 1991, pp. 498

11- Chamberlain, J, "THE ANALYSIS OF DRUGS IN BIOLOGICAL FLUIDS", 2a, ED. CRC Press, Boca Raton, 1995, pp.

12- Chang, W, T, Ph.D., Smith, J, B.S., Liu, H, R, Ph.D., "Isotopic Analogs as Internal Standards for Quantitative GC/MS analysis – Molecular Abundance and Retention time difference as interference factors", J, Forensic Sci, (2002) 47(4): 873-881

13- Cone, J, E, Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of cocaine. J, Anal, Toxicol, (1995) 19: 459-478

14- Conn, P, M, Gebhart, G, F, "PRINCIPIOS DE FARMACOLOGÍA", ED. Manual Moderno, 1991, pp. 183, 184, 192, 193, 196-200

15- DICCIONARIO TERMINOLÓGICO DE CIENCIAS MEDICAS, 12a, ED. SALVAT, Barcelona, 1984

16- Eli B, Sydney L, "INMUNOLOGY, A SHORT COURSE", 2a, ED. Wiley-Liss, New York, 1991, pp. 117-127

17- Evans, W, C, "TREASE Y EVANS, FARMACOGNOSIA", 13a, ED. Interamericana McGraw-Hill, México, 1991, pp. 618-621

18- Fessendeh, QUIMICA ORGANICA, 2a, ED. Grupo Iberoamericano, 1982, pp. 942-951

19- Figueroa H, J, L, "GLOSARIO FARMACOLÓGICO", 2a, ED. UTEHA, México, 1999, pp. 28, 51, 80, 136, 144, 223, 226,

20- Guiadance for Industry and/or for FDA Reviewers/Staff and/or Complance, "GUIADANCE FOR PRESCRIPTION USE DRUGS OF ABUSE ASSAYS PREMARKET MODIFICATIONS", CDRH, August 31, 1995

21- Hardman, J, G, Limbird, L, E, Molinoff, P, B, Ruddon, R, W, Gilman, A, G, "GOODMAN & GILMAN, LAS BASES FARMACOLOGICAS DE LA TERAPEUTICA", 9a, ED. McGraw-Hill Interamericana, México, 1993, Vol. I, pp. 353, 354, 360, 609, 610.

22- INDEX MERCK "An encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals", 13th, ED. Merck, Whitehouse Station, NJ, 2001

23- Kaplan, A, L, Pesce, J, A, "QUIMICA CLINICA, TÉCNICAS DE LABORATORIO – FISIOPATOLOGIA – MÉTODOS DE ANÁLISIS, TEORÍA, ANÁLISIS Y CORRELACIÓN", 6a reimp., Trad. Dr. Ubaldo Patrone, ED. Médica Panamericana, Buenos Aires, 1992, pp. 245, 258-270, 1599-1604

24- Karch, B, S. "DRUG ABUSE HANDBOOK", ED. CRC Press, Boston, London, 1998, pp. 184-187

25- Kintz, P, Cirimele, V, Sengler, C, and Mangin, P, Testing human hair and urine for anhydroecgonine methyl ester, a pyrolysis product of cocaine. J, Anal, Toxicol, (1995) 19: 479-482

26- Klaassen, C, D, "CASARETT & DOULL, TOXICOLOGY, THE BASIC SCIENCE OF POISONS", 5a, ED. McGraw-Hill, New York, 1996, pp. 951-966

27- Klaassen, C, D, Watkins, J, B, "CASARETT & DOULL, MANUAL DE TOXICOLOGÍA", 5a, ED. McGraw-Hill, 2001, pp. 247, 248, 335, 449, 450, 469, 493

28- Korte, T, Pykäläinen, J, Lillsunde, P, and Seppälä, T, Comparison of RapiTest with EMIT d.a.u. and GC-MS for the analysis of drugs in urine. J, Anal, Toxicol, (1997) 21: 49-53

29- Levine, B, "PRINCIPLES OF FORENSIC TOXICOLOGY", Office of the Chief Medical Examiner State of Maryland and Division of Forensic Toxicology Armed Forces Institute of Pathology., USA, 1999, American Association for Clinical Chemistry , pp. 31-45, 67-69, 80-169, 221-245

30- Liv, H, R, Gadzala, G, D, "HANDBOOK OF DRUG ANALYSIS, APPLICATIONS IN FORENSIC AND CLINICAL LABORATORIES", ED. American Chemical Society, Washintong, a.c.

31- Logan B, K, and Smirnow, D, Lack of predictable site-dependent differences and time-dependent changes in postmortem concentrations of cocaine, benzoylecgonine, and cocaethylene in humans. J, Anal, Toxicol, (1997) 20: 23-31

32- MANUAL OR USE BY NATIONAL LABORATORIES, United Nations, New York, 1995

33- Moore, C, Ph.D.; Deitermann, D, B.S.; Lewis, D, B.A.; Feeley, B, B.S.; and Niedbala, R, S, Ph.D. The detection of Cocaine in hair specimens using micro-plate enzyme immunoassay. J, Forensic Sci, (2001) 46(5): 609-612

34- O'Neal, L, C, Crouch, J, D, Fatah, A, A, Validation of twelve chemical spot tests for the detection of drugs of abuse. Forensic Sci, Int, (2000) 109: 189-201

35- Pine, et.al., QUÍMICA ORGANICA, 2a, ED. McGraw-Hill, 1988, pp. 510-516

36- Roitt, M, I, "INMUNOLOGIA, FUNDAMENTOS", 7a, ED. Médica Panamericana, México, 1994, pp. 88-105

37- Rojas E, O, "INMUNOLOGIA (de memoria)", 2a, ED. Médica Panamericana, México, 2001, pp. 163-165

38- S, D, Ferrera, L, Tedeschi, G, Frison, G, Brusini, and F, Castagna, Drugs-of-Abuse testing in urine: statistical approach and experimental comparison of immunochemical and chromatographic techniques. J, Anal, Toxicol, (1994)18: 278-291

39- Skoutakis, V. A. "CLINICAL TOXICOLOGY OF DRUG: PRINCIPLES AND PRACTICE", ED. Lea & Febiger, Philadelphia, 1982, pp. 201-213

40- Stites, P, D, "INMUNOLOGIA BÁSICA Y CLINICA", 8a, ED. Manual Moderno, México, 1996, pp. 218, 219

41- Tizard, R, I, "INMUNOLOGY AND INTRODUCCIÓN", 3a, ED. Saunders College Publishing, Philadelphia, 1992, pp.212-228

42- Wade, L, G, JR., "QUÍMICA ORGANICA", 2a, ED. Pearson Educación, México, 1993, pp. 509-521

43- Wallis, T, E, "MANUAL DE FARMACOGNOSIA", Trad. Maria Teresa Toral, ED. Editorial Continental, S.A., México, 1966,

44- http://www.resonancepub.com/Immunassay.htm

45- http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/R/Radio immunoassay.html

46- http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/E/Elisa. html

47- http://www.tdh.state.tx.us/lab/serology_eia.htm

48- http://html.rincondelvago.com/cocaina_2.html

49- http://www2.aro.net/lambo/seeds/seeds.htm

50- http://antidrogas.com.br

51- http://www.csi-csif-murcia.com/adicciones/4/contenido.htm

52- http://www.psicomag.com/neurobiologia/LOS%20NEUROTRANSMISORES%20EN%20GENERAL.php

53- http://www.monografias.com/trabajos6/coca/coca.shtml#biblio

54- http://www.mind-surf.net/drogas/cocaína.htm

55- http://www.medicinalegal.com.ar/bruzon.htm