



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUATITLÁN

“Confirmación de metabolitos de cocaína en sangre de muestras forenses,  
empleando Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas”

TRABAJO DE TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADO EN QUÍMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

Presenta:

MIGUEL ÁNGEL PÉREZ ALCÁNTARA

ASESOR: DRA. MARÍA OLIVIA NOGUEZ CÓRDOVA

COASESOR: Q.F.B. JOSE LUIS DOMÍNGUEZ RODRÍGUEZ

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2017



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA  
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales  
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

**Confirmación de metabolitos de cocaína en sangre de muestras forenses, empleando Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas.**

Que presenta el pasante: **Miguel Angel Pérez Alcántara**  
Con número de cuenta: 097316770 para obtener el Título de la carrera: Química Farmacéutico Biológica

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

**ATENTAMENTE**  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 20 de Enero de 2017.

**PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO**

	NOMBRE	FIRMA
<b>PRESIDENTE</b>	Dra. Luisa Martínez Aguilar	
<b>VOCAL</b>	M. en C. Eva Hernández Godínez	
<b>SECRETARIO</b>	Dra. Ma. Olivia Noguez Córdova	
<b>1er. SUPLENTE</b>	M. en C. Pablo Hernández Matamoros	
<b>2do. SUPLENTE</b>	Q.F.B. Daniel Raygoza Trejo	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

LMCF/cga

## AGRADECIMIENTOS

Gracias a mis asesores.

DRA. MARÍA OLIVIA NOGUEZ CÓRDOVA, por ser parte de este proyecto, por creer en él y en mi, invirtiéndole tiempo para lograr hacer este trabajo una realidad, aportando esfuerzo y tan atinadas observaciones, por respaldar cada paso dado durante esta investigación.

Q.F.B. JOSE LUIS DOMÍNGUEZ RODRÍGUEZ, por darme la oportunidad depositando su confianza para el desarrollo de esta investigación, por sus valiosas enseñanzas y experiencias durante todo este periodo, por compartir sus conocimientos brindándome la oportunidad de desenvolverme en el laboratorio, por hacer prosperas mis ideas y aptitudes.

A los dos les agradezco de todo corazón sus consejos y ser un motivo de inspiración.

Gracias a las instituciones.

Tribunal Superior de Justicia del Distrito Federal, al Laboratorio de química del Instituto de Ciencias Forenses, por la oportunidad de desarrollarme académica y profesionalmente, por hacer mi estancia una experiencia enriquecedora e inolvidable.

A mi casa la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, a cada uno de mis profesores, por proporcionarme cada una de las herramientas para enfrentarme al mundo laboral y hacerme crecer como persona.

GRACIAS.

## DEDICATORIAS.

Este trabajo se lo dedico a mis padres JORGE (Q.E.P.D.) Y JOSEFINA.

Porque sin su apoyo, comprensión, consejos, ayuda en los momentos difíciles y la aportación de los recursos necesarios para estudiar. Sin escatimar esfuerzo alguno han sacrificado gran parte de su vida para formarme y educarme.

A mis Hermanos y Familia.

Por estar siempre presentes, brindándome el apoyo y confianza para poderme realizar, gracias infinitamente por los consejos y por nunca dejarme caer en los momentos más difíciles y por ser mi motivación e inspiración ante el camino de la vida.

A cada una de las personas que tuve la suerte de coincidir.

A quienes saben lo que significa este proyecto.

A Dios y a la vida por bendecirme de tantas formas.

A todos y cada uno de ustedes GRACIAS.

El presente trabajo se llevo acabo en:

LABORATORIO DE QUÍMICA DEL INSTITUTO DE CIENCIAS FORENSES (INCIFO), DEL TRIBUNAL SUPERIOR DE JUSTICIA DEL DISTRITO FEDERAL (TSJDF), bajo la supervisión de Q.F.B. JOSE LUIS DOMÍNGUEZ RODRÍGUEZ.

## ÍNDICE

RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	2
2. ANTECEDENTES.	3
2.1 IMPACTO DE LA COCAÍNA EN EL MUNDO.	3
2.2. CARACTERÍSTICAS DE LA COCAÍNA.	4
2.2.1. FARMACOLOGÍA DE LA COCAÍNA.	7
2.2.2. FARMACOCINÉTICA DE LA COCAÍNA.	7
2.2.3. MECANISMO DE ACCIÓN DE LA COCAÍNA.	8
2.2.4. ABSORCIÓN DE LA COCAÍNA.	9
2.2.5. DISTRIBUCIÓN Y ALMACENAMIENTO DE LA COCAÍNA.	10
2.2.6. BIOTRANSFORMACIÓN DE LA COCAÍNA.	11
2.2.7. TOXICIDAD DE LA COCAÍNA.	12
2.3. FORMAS DE ABUSO DE LA COCAÍNA.	13
2.4. EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (EFS).	15
2.5. TÉCNICAS ANALÍTICAS PRESUNTIVAS.	16
2.6. TÉCNICAS ANALÍTICAS CONFIRMATIVAS.	17
2.7. DERIVATIZACIÓN.	18
3. OBJETIVO.	19
3.1. OBJETIVO GENERAL.	19
3.2. OBJETIVOS PARTICULARES.	19
4. JUSTIFICACIÓN.	19
5. HIPÓTESIS.	20
6. METODOLOGÍA.	20

6.1.1. EQUIPO.	20
6.1.2. MATERIALES.	20
6.1.3. REACTIVOS.	21
6.2. CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS.	22
6.3. MUESTREO.	22
6.3.1 TOMA DE MUESTRA.	22
6.3.2. RECEPCIÓN DE MUESTRAS.	23
6.4. PRUEBA PRESUNTIVA (EMIT).	24
6.5. PRUEBA CONFIRMATORIA.	25
6.5.1 DESPROTEINIZAR.	25
6.5.2 ACTIVAR LA COLUMNA.	25
6.5.3. LAVADO.	25
6.6. DESARROLLO DE LA ESTADIA.	26
6.6.1. DIAGRAMA EXPERIMENTAL.	27
6.7. ANÁLISIS PRESUNTIVO DE LA COCAÍNA.	28
6.7.1 TÉCNICA INMUNOENZIMÁTICA MÚLTIPLE (EMIT).	28
6.8. ANÁLISIS CONFIRMATORIO DE LA COCAÍNA.	29
6.8.1. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN.	29
6.8.1.1. DESPROTEINIZACIÓN.	29
6.8.1.2. DESPROTEINIZACIÓN (Modificada).	29
6.8.2. EXTRACCIÓN FASE SÓLIDA.	29
6.8.2.1. EXTRACCIÓN FASE SÓLIDA (Modificada 1.1).	30
6.8.2.2. Extracción Fase Sólida (Modificada 1.2).	30
6.8.2.3. EXTRACCIÓN FASE SÓLIDA (Modificada 1.3).	31
6.9. ANÁLISIS CONFIRMATIVO MEDIANTE (GC/MS).	31



7. RESULTADOS.	32
8. ANÁLISIS DE RESULTADOS.	32
9. DISCUSIÓN.	36
10. CONCLUSIÓN.	37
11. ACRONIMOS.	38
12. REFERENCIAS.	40

## INDICE DE TABLAS.

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas de la cocaína.	5
Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas de benzoilecgonina.	6
Tabla 3. Formas de abuso de la cocaína.	14
Tabla 4. Hoja de cadena de custodia.	22
Tabla 5. Formato cadena de custodia del INCIFO.	23
Tabla 6. Concentraciones de droga para el análisis preliminar.	28
Tabla 7. Resultados de las 10 muestras tomadas de Marzo a Junio del 2016.	32

## INDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Mecanismo de acción de la cocaína.	8
Figura 2. Concentraciones plasmáticas de cocaína.	9
Figura 3. Metabolismo de la cocaína.	11
Figura 4. Principio de la Inmunoenzimática múltiple.	17
Figura 5. Esquema básico de cromatógrafo de gases/espectrómetro de masas.	18
Figura 6. Gráfica de abuso de cocaína por edad.	33
Figura 7. Espectro de masas de metabolito de cocaína ( <i>benzoilecgonina</i> ) y sus principales iones 168, 124, 105, 77, <i>m/z</i> .	34
Figura 8. Patrón de fragmentación sugerido para BEG-Derivatizada.	35

## RESUMEN.

El uso de la cocaína en México, ha aumentado dramáticamente en los últimos años. A partir del siglo XX, se conoce más sobre los daños físicos, sociales, psicológicos y espirituales que esta droga provoca en los consumidores; sin embargo, hasta hoy los esfuerzos por prevenir el uso de cocaína han sido limitados e inconstantes, lo que ha generado graves daños en la sociedad.

La cocaína es una droga de abuso de uso común que tiene la característica de generar dependencia física (síndrome de abstinencia), dependencia psicológica y tolerancia; los efectos adversos causados por la cocaína se deben a la activación del sistema nervioso simpático.

El cuerpo humano tiene la capacidad de limpiarse por si solo de las drogas mediante el metabolismo y la excreción; por lo tanto, la exposición a una droga de abuso debe ser reciente para que sea detectada en sangre, saliva, sudor u orina.

Diseñar una metodología para la identificación de cocaína en sangre de origen forense, constituyó el objetivo de esta investigación. Se realizó el análisis de diez muestras de sangre aplicando la técnica inmunoenzimática múltiple (EMIT), las cuales fueron analizadas en el Laboratorio de Química del Instituto de Ciencias Forenses (INCIFO). Lo anteriormente se realizo mediante cromatografía de gases (CG) y espectrometría de masas (EM). Finalmente se obtuvieron fragmentos pertenecientes al metabolito Benzoilecgonina, en el espectro de cada una de las muestras, teniéndose valores de relación m/z con valor de 82, 105, 240 y 361 iones característicos; por lo que se asume que el método es repetible y eficaz para la identificación de dicha droga.

## 1. INTRODUCCIÓN.

En los últimos años, la cocaína ha sido definida como una droga por distintos organismos internacionales que se encargan de estudiar los efectos terapéuticos y tóxicos de las mismas. El NIDA (National Institute on Drug Abuse), la define como una droga estimulante y altamente activa. Por otro lado, el Diario de la Asociación Americana de Medicina refiere que la cocaína es un alcaloide que se obtiene secando las hojas de la planta de coca, el cual genera euforia y aumenta el estado enérgico y de alerta; sin embargo origina una fuerte adicción y desarrollo de graves problemas mentales y físicos. (National Institute on Drug Abuse, [2008]).

La cocaína es una droga natural, cuyo nombre científico es *Erythroxylum coca*. El arbusto de donde se extrae, es de origen amazónico y se localiza en la Cordillera de los Andes. Sus hojas son de forma oval y de color verde oscuro, miden hasta 6 cm de largo y contienen aproximadamente 1% de cocaína. Existen 200 especies de hojas de coca y solamente en cuatro de ellas se encuentra la cocaína, éstas poseen catorce alcaloides naturales con actividad farmacológica, dentro de los que destaca parte de la droga mencionada, la Benzoilecgonina. (National Institute on Drug Abuse, [2008]).

Debido al fácil acceso a esta droga y a los severos efectos estimulantes que produce en el sistema nervioso simpático, se ha determinado el análisis de consumo de cocaína como evidencia legal para casos específicos. (Drugfreeworld Organization, [2010]).

Por otro lado, el consumo de cocaína aumentó en la sociedad y los peligros de la droga poco a poco se volvieron más evidentes. La presión pública obligó a que en 1903 la compañía Coca-Cola eliminara las hojas de coca de su refresco. En 1905, se volvió común aspirar cocaína y en menos de cinco años, los hospitales y médicos comenzaron a informar en su literatura, de casos de daño nasal ocasionados por el uso de la droga. En 1912, el gobierno de los Estados Unidos informó de 5 mil muertes relacionadas con la cocaína en un año; y para 1922 fue prohibida oficialmente. (Drugfreeworld Organization, [2010])

En la década de los 70's, la cocaína surgió como la nueva droga de moda para los artistas y hombres de negocios. En algunas universidades norteamericanas, el porcentaje de estudiantes que habían experimentado con cocaína se incrementó diez veces entre 1970 y 1980. (National Institute on Drug Abuse, [2008]).

## 2. ANTECEDENTES.

A finales de 1970, los traficantes de drogas empezaron a establecer una elaborada red de contrabando de cocaína en los Estados Unidos. Fue en 1980, cuando la cocaína dejó de ser una alternativa solo para los ricos, para entonces, tenía la reputación en Norteamérica de ser la droga más adictiva y peligrosa, ligada a la pobreza, el crimen y la muerte. (National Institute on Drug Abuse, [2008])

A principios de los 90's, Colombia se convirtió en el país con el mayor cultivo de coca, los cárteles de la droga producían y exportaban de 500 a 800 toneladas de cocaína al año, que la embarcaban a Estados Unidos, Europa y Asia. Los cárteles más grandes fueron desmantelados por los organismos de cumplimiento de la ley a mediados de 1990, pero fueron reemplazados por grupos más pequeños, con más de 300 organizaciones que se sabe, están activas en el contrabando de drogas actualmente. Hacia 2008, la cocaína se había convertido en la segunda droga ilegal más traficada en el mundo. (Washton M., [1995]. National Institute on Drug Abuse, [2008]) A partir de 1998, la cocaína es una droga clasificada bajo la Lista II (Schedule II) de la Ley sobre Sustancias Controladas, lo que significa que se considera que tiene un gran potencial para usarse con abuso, pero que puede ser administrada para usos médicos legítimos, como anestésico local en ciertos tipos de cirugías de los ojos, oídos y garganta. (*The Journal of the American Medical Association*, [1998])

### 2.1. IMPACTO DE LA COCAÍNA EN EL MUNDO.

La cocaína es la segunda droga ilegal más traficada en el mundo. Las estadísticas más recientes muestran que el consumo internacional de cocaína ha continuado incrementándose, alcanzando ya 756 toneladas al año, con las cantidades más grandes interceptadas en Sudamérica, seguida de Norteamérica. (National Institute on Drug Abuse, [2008])

De acuerdo con el Centro de Supervisión de Drogas y Adicción a las Drogas Europeo, la cocaína es también la segunda droga ilegal más comúnmente usada en Europa. La Encuesta Nacional sobre el Uso de Drogas y la Salud (NSDUH, por sus siglas en inglés) calculó que en el 2008 en EUA existían 1.9 millones de usuarios de cocaína, 359,000 eran usuarios en ese momento de crack. Los adultos de 18 a 25 años de edad tenían la mayor prevalencia de uso de cocaína que cualquier otro grupo de edad, con el 1.5% de los adultos jóvenes habiendo reportado uso de cocaína en el mes anterior a la encuesta. (National Institute on Drug Abuse, [2008]).

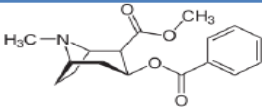
También hay diferencias étnicas y raciales, con el mayor consumo reportado por mestizos (1.1%), seguidos por los hispanos (0.9%), blancos (0.7%) y afroamericanos (0.9%). A partir de la década de 1980, el consumo de cocaína en México se considera un problema de salud pública debido a su incremento en áreas geográficas tradicionalmente problemáticas como la frontera norte y zonas turísticas del país, así como por la aparición de nuevas formas de uso (crack), y diferentes vías de administración (inhalada, fumada o inyectada), sobre todo entre los jóvenes. (National Institute on Drug Abuse, [2008]).

Lo anterior, ha ocasionado una evolución más rápida del uso al abuso, e incluso a la dependencia de esta sustancia. Esto se refleja en el incremento de la demanda de tratamiento por las complicaciones que conlleva su consumo, lo que a su vez representa un nuevo reto para los servicios de salud del país. (<http://www.salud.gob.mx>)

## 2.2. CARACTERÍSTICAS DE LA COCAÍNA.

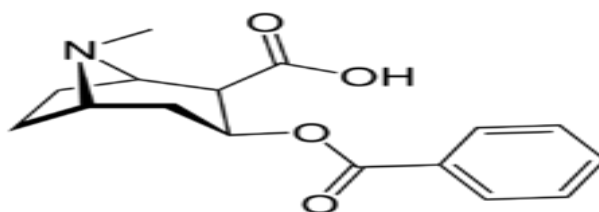
La cocaína es un alcaloide contenido en las hojas del arbusto *Erythroxylon coca*; también se puede obtener mediante síntesis a partir de la ecgonina o de sus derivados. Es una base aminoalcohólica estrechamente relacionada con la tropina (aminoalcohol de la atropina) y tiene la estructura fundamental de los anestésicos locales sintéticos. La cocaína es una benzoilmetilecgonina; es un éster del ácido benzoico y una base que contiene nitrógeno, su aspecto es un polvo cristalino inodoro, de un color blanco e incoloro que funde entre 36 y 98°C, en disolución saturada es alcalina a la prueba de tornasol, las propiedades fisicoquímicas se muestra en la Tabla 1. (Clarke's Analysis of Drugs, [2004]).

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas de la cocaína (Clarke's Analysis of Drugs, [2004]).

<b>Estructura química</b>	
	
<b>Nombre IUPAC</b>	Metil-[1R-(exo,exo)]-3-(benzoiloxi)-8-metil-8-azabicyclo[3.2.1]-octano-2 carboxilato
<b>Fórmula condensada</b>	C <sub>17</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>4</sub>
<b>Peso molecular</b>	303.4g/L
<b>Punto de fusión</b>	98°C
<b>Punto de ebullición</b>	187°C
<b>Pka</b>	8.6
<b>Aspecto</b>	Polvo cristalino de color blanco
<b>Volatilidad</b>	Ligeramente volátil
<b>Solubilidad</b>	Muy soluble en disolventes orgánicos: acetona, etanol, cloroformo; HCl: 1800-2500mg/mL (20°C)

Una vez absorbida la cocaína pasa rápidamente a la sangre y se distribuye por todo el organismo, teniendo especial afinidad por el cerebro. También atraviesa la barrera hematoencefálica y la barrera feto placentaria debido a su alta liposolubilidad. La cocaína tiene un volumen de distribución de 2 L/kg. La biotransformación del principio activo se inicia rápidamente en la sangre debido al pH del medio acuoso, el cual es potenciado por la presencia de colinesterasas y posteriormente se completa en el hígado donde es hidrolizada por colinesterasas por dichas enzimas produciendo sus dos metabolitos principales la benzoilecgonina (BEG) y la ecgoninametilester (EME). De 15 a 30 minutos después de la administración aparece la benzoilecgonina (BEG), el principal metabolito del cual se pensaba que era farmacológicamente inactivo. La BEG puede detectarse en plasma hasta 24 horas después de su administración. Las propiedades fisicoquímicas de la benzoilecgonina se muestran en la tabla 2. (Clarke's Analysis of Drugs, [2004]).

Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas de benzoilecgonina. (Clarke's Analysis of Drugs, [2004])



Estructura química

<p>Ácido 3-(benzoiloxi)-8-metil-8-azabicyclo[3.2.1]octano-2-metacoico            3β-hidroxi-1αH,5αH-tropano-2β-benzoato del ácido carboxílico</p>		
<p>Benzoato de ecgonina</p>		
<p><math>C_{16}H_{19}NO_4</math></p>		
<p>Peso molecular: 289,3</p>		
<p>Punto de fusión: 195°C (anhidra) (se descompone), 86-92°C (tetrahidrato), 200°C (clorhidrato)</p>		
Solubilidades (1g/mL)	Base	Clorhidrato
Agua (P. de ebullición)	soluble	soluble
Etanol	soluble	soluble
<p>Datos GC-MS (porcentaje de abundancia)</p>		
<p>289 (<math>M^+</math>, 5), 168 (26), 124 (100), 105 (31), 96 (19), 94 (26), 82 (61), 77 (40), 67(11) m/z</p>		
<p>Datos del infrarrojo (IR)</p>		
<p>Picos principales en los números de onda 1275, 1720, 1618, 717, 1116, 1316 <math>cm^{-1}</math></p>		
<p>Datos del ultravioleta (UV)</p>		
<p>Ácido acuoso 234nm, 274nm.</p>		



### 2.2.1. FARMACOLOGÍA DE LA COCAÍNA.

La cocaína es un estimulante del SNC, cuya acción se inicia en la corteza, bloquea al transportador que recobra la dopamina de la sinapsis, esto da por resultado el aumento de la estimulación dopaminérgica en zonas cerebrales de importancia crucial, impide la recaptación de los neurotransmisores (especialmente dopamina, pero también serotonina (5-HT) y noradrenalina (NE)) incrementando, en consecuencia, sus concentraciones en el espacio sináptico y aumentando los efectos inducidos por estos neurotransmisores. (Nora D y cols., [2010]).

### 2.2.2. FARMACOCINÉTICA DE LA COCAÍNA.

La cocaína se absorbe desde todos los sitios de aplicación incluyendo, las membranas mucosas y la mucosa gastrointestinal. La absorción aumenta en presencia de inflamación y los efectos sistémicos de la droga pueden así aumentar marcadamente. (Nora D y cols., [2010]).

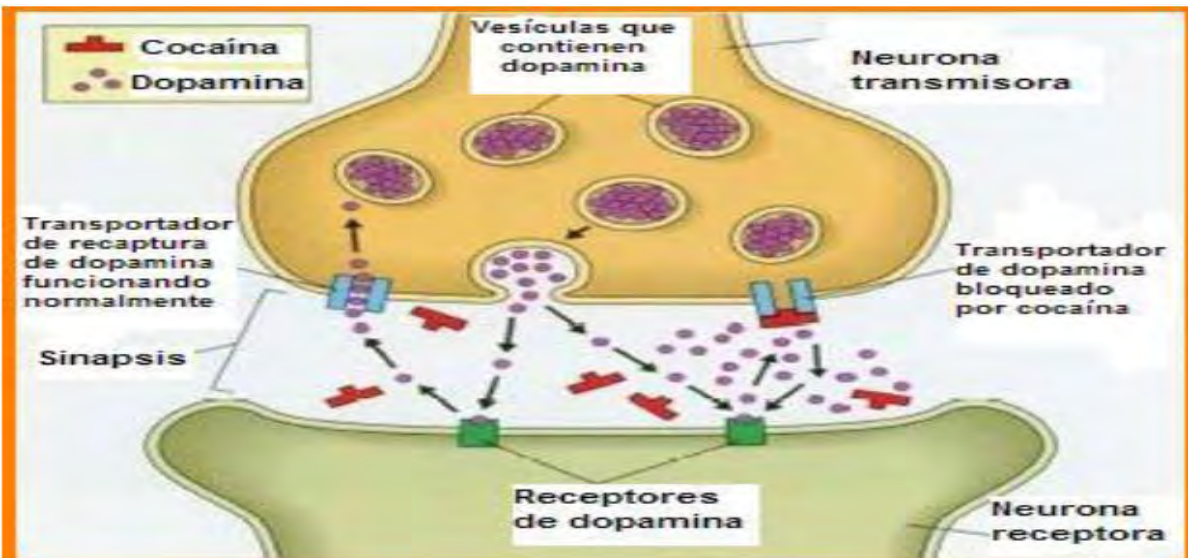
Se metaboliza principalmente en el hígado, la vida media de la cocaína en el plasma después de la administración oral o nasal es aproximadamente de una hora; una mínima parte se excreta sin cambio en la orina esto es del 1 al 9 % y del 35 al 55 % se excreta en forma de benzoilecgonina, el principal metabolito de la cocaína, ecgonina y su éster metílico. (Nora D y cols., [2010]).

La vía metabólica principal de la cocaína consiste en la hidrólisis (esterasa plasmática) de cada uno de sus grupos éster. La benzoilecgonina, producida al perderse el grupo metilo, representa el metabolito urinario principal y se encuentra en la orina durante dos a cinco días después de usar la droga; la benzoilecgonina puede detectarse en la orina cuatro horas después de la inhalación y permanece detectables en concentraciones superiores a los 1.00 ng/mL durante 48 horas. En consecuencia, las pruebas de benzoilecgonina resultan útiles para identificar el consumo de cocaína; los grandes consumidores tienen cantidades detectables del metabolito en la orina hasta durante 10 días después de haberse consumido este alcaloide. (Nora D y cols., [2010]).

### 2.2.3. MECANISMO DE ACCIÓN DE LA COCAÍNA.

La cocaína se comporta como una amina simpaticomimética de acción indirecta, es decir, es capaz de mimetizar las acciones de las catecolaminas no actuando directamente sobre los receptores adrenérgicos o dopaminérgicos, sino aumentando la disponibilidad del neurotransmisor en la hendidura sináptica, ya que actúa como inhibidor de los procesos de recaptación tipo I de noradrenalina y dopamina desde la hendidura sináptica hasta la terminal presináptica, (Nora D y cols., [2010]). Como se muestra en la figura 1.

Figura 1. Mecanismo de acción de la cocaína.



El aumento de la biodisponibilidad de dopamina y noradrenalina por la inhibición de la recaptación tipo I media la euforia que produce la cocaína, y parece que está implicada en el mecanismo de adicción. Por lo tanto, el consumo crónico de la droga también produce cambios en la disponibilidad de este neurotransmisor. (Redolar D., [2008])

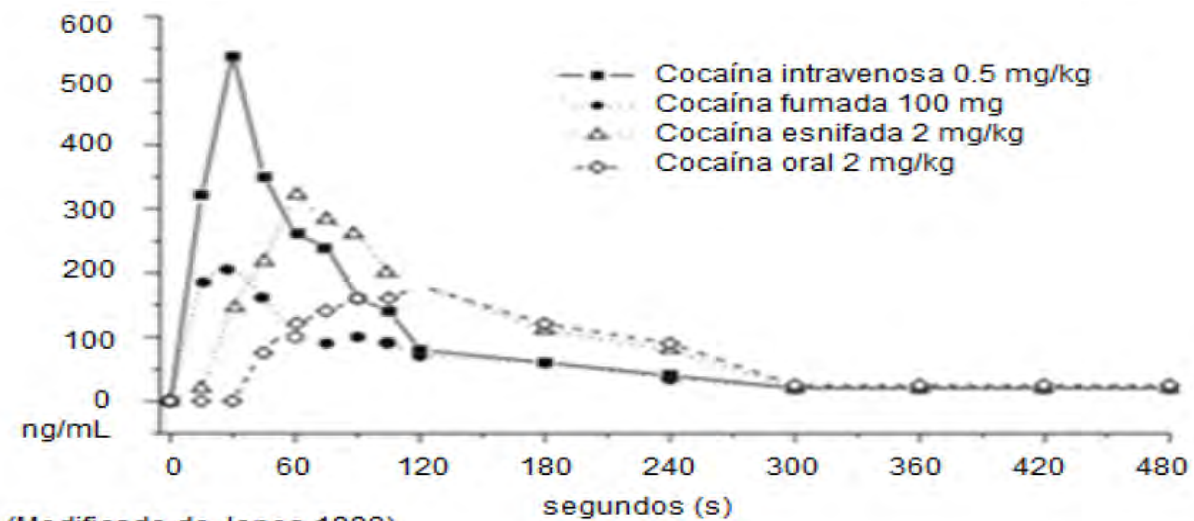
El exceso de noradrenalina que se produce por acción de la cocaína, es el responsable de la mayoría de los efectos farmacológicos y de las complicaciones agudas de su consumo, es decir, aumento de presión arterial, dilatación pupilar, sudoración, temblor, entre otros. (Fernández P., [2008])

La cocaína también bloquea la recaptación de serotonina que se refleja en la disminución de los metabolitos 3-metoxi-4-hidroxifenetilenglicol (MHPG) y ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA). Por los efectos producidos sobre la neurotransmisión catecolaminérgica y serotoninérgica se considera como una droga que produce dependencia. (Fernández P., [2008])

#### 2.2.4. ABSORCIÓN DE LA COCAÍNA.

La cantidad relativa de cocaína que se absorbe a nivel sistémico depende fundamentalmente de la vía de administración. La figura 2 muestra las diferencias temporales de los picos plasmáticos que se producen después de la administración de dosis equipotentes de cocaína por diferentes vías de administración a voluntarios sanos. (Lizasoain I. y cols., [2001])

Figura 2. Concentraciones plasmáticas de cocaína.



La absorción por la mucosa nasal después de esnifar y la absorción a través del tracto digestivo después de su administración oral es similar y mucho más lenta que después de fumar o después de la administración intravenosa. El pico plasmático se produce normalmente a los 60 segundos después de la administración nasal u oral; aunque como en otros parámetros de la cinética de la cocaína, la variabilidad individual es muy grande, con intervalos de 30 a 120 segundos. (Lizasoain I. y cols., [2001]).

La biodisponibilidad nasal u oral es de un 30-40%, aunque la variabilidad es mayor para la vía oral. (Lizasoain I. y cols., [2001]).

La cocaína fumada presenta una biodisponibilidad baja y variable. Las concentraciones máximas venosas y arteriales después de las diferentes administraciones varían enormemente, ya que también dependen de la frecuencia de las inyecciones. El rango de las dosis de cocaína en las personas, normalmente varían entre 0.2 a 3 ó 4 mg/Kg, dependiendo de la vía de administración, sin embargo las concentraciones plasmáticas máximas varían en un intervalo entre 50 a 2000 ng/mL. (Lizasoain I. y cols., [2001]). Barnett G. y cols., [2002])

#### 2.2.5. DISTRIBUCIÓN Y ALMACENAMIENTO DE LA COCAÍNA.

La cocaína después de ser administrada, se distribuye ampliamente por todo el organismo. Su volumen de distribución varía entre 1.5 a 2 L/Kg (57% por vía oral y aproximadamente 70% por vía nasal). (Lizasoain I. y cols., [2001])

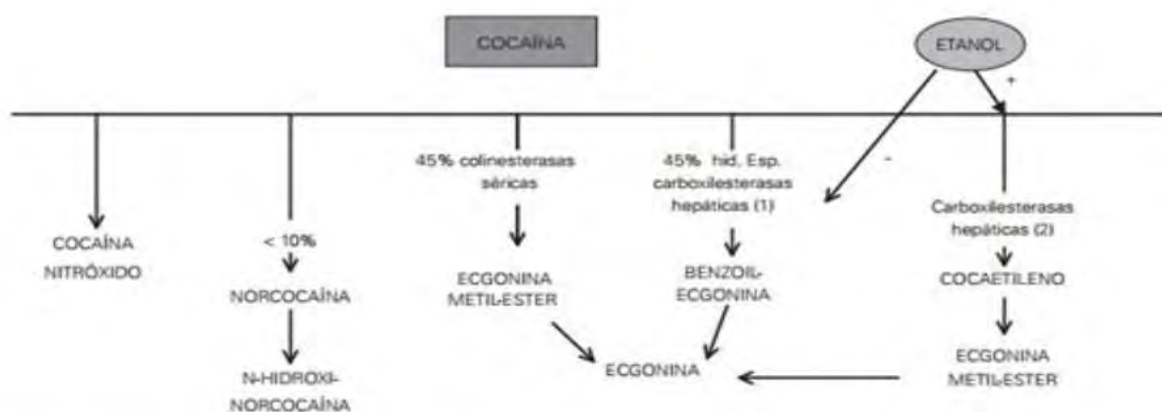
La cocaína que se consume, independientemente de la vía de administración, se almacena en diferentes matrices biológicas, en las que permanecerá durante un tiempo determinado debido al metabolismo activo presente en ellas, a excepción del cabello. (Kintz P., [1996])

En saliva se puede encontrar después de una hora y hasta un día de haberla consumido; en suero, plasma y sudor el intervalo de detección va de tres horas a dos días; en orina, la cual es la matriz más utilizada actualmente en los análisis de detección de drogas, permanece de seis horas a tres días. Finalmente, en pelo, lo cual incluye cabello, vello púbico y axilar, es permanente su presencia, debido a que no existe el metabolismo activo y la droga permanece intacta e inalterable una vez que se encuentra en la médula del folículo piloso. Es por este motivo que el análisis del pelo ha surgido como una ventana más amplia de detección de cocaína. (Kintz P., [1996])

## 2.2.6. BIOTRANSFORMACIÓN DE LA COCAÍNA.

La cocaína al entrar al organismo se metaboliza rápidamente por hidrólisis enzimática para producir tres metabolitos principales: benzoilecgonina (BE), ecgonina metil éster (EME) y finalmente, ecgonina (EC). Como lo muestra la Figura 3. (Lizasoain I. y cols., [2001]).

Figura 3. Metabolismo de la cocaína (Lizasoain I. y cols., [2001]).



(1) Cataliza la hidrólisis del metil-éster de cocaína a benzoilecgonina.

(2) Cataliza la etil transesterificación de cocaína a cocaetileno.

Del 1 al 5% de la cocaína administrada, se excreta por la orina sin cambios; la hidrólisis de la droga a benzoilecgonina se produce en un 45% de una dosis administrada; porcentaje similar a la obtención de ecgonina metil éster. Ninguno de los dos metabolitos posee actividad biológica significativa en humanos. (Lizasoain I. y cols., [2001]. Barnett G. y cols., [2002])

La benzoilecgonina es el metabolito, más utilizado para monitorear el consumo. Puede ser detectada en orina tres o cuatro días después del último consumo, lo cual dependerá de la cantidad de cocaína consumida y de la sensibilidad de la prueba. (Barnett G. y cols., [2002]).

La norcocaína nitróxido y otros radicales libres son metabolitos potencialmente activos pero se producen en pequeñas cantidades que generalmente no representan acciones farmacológicamente significativas en clínica humana. Cuando la cocaína se fuma, la droga se pirroliza a una serie de compuestos químicos dependiendo de la temperatura. El principal metabolito es la anhidroecgonina metil éster (AEME), también conocida como metil ecgonidina. Este metabolito es farmacológicamente activo en animales, sin embargo en humanos no se conoce con exactitud su perfil farmacológico, se cree que podría tener efectos inotrópicos negativos. (Lizasoain I. y cols., [2001])

En estudios *in vitro* se ha visto que el etanol, inhibe la actividad de la metilesterasa, disminuyendo la hidrólisis a benzoilecgonina. En presencia de etanol, la cocaína es transesterificada por esterases hepáticas a etilcocaína o cocaetileno y se incrementa la N-demetilación a norcocaína. El metabolito cocaetileno posee actividad farmacológica y tóxica, principalmente a nivel cardiaco e incluso hepático. Se puede determinar en orina, saliva, cabello o sudor al igual que los derivados etilo de la benzoilecgonina y ecgonina etil éster. (Lizasoain I. y cols., [2001])

#### 2.2.7. TOXICIDAD DE LA COCAÍNA.

Los efectos fisiológicos del consumo de la cocaína incluyen la constricción de los vasos sanguíneos, dilatación de las pupilas, y aumento en la temperatura, frecuencia cardiaca y presión arterial. (Washton M., [1995]).

La duración de los efectos eufóricos inmediatos de la droga, que incluyen hiperestimulación, claridad mental y disminución de la fatiga, dependen de la forma de administración. Cuanto más rápida sea la absorción, más intensa será la euforia pero más breve será su duración. (Washton M., [1995]).

Un aumento en el uso de cocaína puede reducir el período de tiempo que el consumidor se siente eufórico y aumenta el riesgo de adicción. (Fernández P., [2008]) Episodios de uso excesivo de altas dosis de cocaína pueden llevar a un estado creciente de irritabilidad, desasosiego y paranoia. Esto puede resultar en un período de psicosis paranoica total en la que el consumidor pierde el sentido de la realidad y padece de alucinaciones auditivas. (Washton M., [1995]).

Otras complicaciones asociadas con el uso de la cocaína incluyen alteraciones en el ritmo cardiaco, ataques al corazón, dolor en el pecho, falla respiratoria, apoplejía, convulsiones, dolor de cabeza, y complicaciones gastrointestinales tales como dolor abdominal y náuseas. Ya que la cocaína tiene la tendencia a disminuir el apetito, muchos usuarios habituales pueden presentar signos de desnutrición. (National Institute on Drug Abuse, [2008])

Las diferentes maneras en que se consume la cocaína pueden ocasionar diversos efectos adversos. Por ejemplo, la inhalación regular de la cocaína puede llevar a la pérdida del sentido del olfato, sangrados nasales, problemas para tragar, ronquera y secreción nasal crónica. La ingestión de la cocaína puede causar una gangrena intestinal grave debido a la reducción del flujo sanguíneo. (Washton M., [1995]).

Las personas que se inyectan cocaína pueden experimentar una reacción alérgica aguda y al igual que cualquier usuario de drogas inyectables, tienen mayor riesgo de contraer el VIH y otras enfermedades de transmisión sanguínea. Finalmente, al combinar el uso de la cocaína con el alcohol, el hígado humano fabrica una tercera sustancia, el etileno de cocaína, que intensifica los efectos eufóricos de la cocaína y potencialmente aumenta el riesgo de muerte repentina. (Fernández P., [2008]. Cami J. y cols., [1998]).

### 2.3. FORMAS DE ABUSO DE LA COCAÍNA.

Las formas de abuso de cocaína, son de gran interés ya que condicionan la farmacocinética, actividad farmacológica, toxicidad y el grado de adicción de la droga. (Lizasoain I. y cols., [2001]) Las principales vías de administración de la cocaína son: oral, nasal, intravenosa y pulmonar, como se muestra en la (Tabla 3). (National Institute on Drug Abuse, [2008]).

La forma de administración nasal, conocida como “esnifar” o “snorting”, es el proceso de inhalar la cocaína en polvo por la nariz, de donde pasa directamente a la sangre a través de las membranas nasales. También se puede aplicar la droga directamente sobre las mucosas. La inyección o la administración intravenosa, transportan la droga directamente a la sangre aumentando así la intensidad de su efecto. (National Institute on Drug Abuse, [2008]).

Al fumar, se inhala el vapor o el humo de la cocaína a los pulmones, donde la sangre lo absorbe a la misma velocidad que cuando se inyecta. El efecto eufórico resultante es casi inmediato, y es la razón por la cual la popularidad del crack aumentó enormemente a mediados de los años ochenta. (National Institute on Drug Abuse, [2008]).

Tabla 3. Formas de abuso de la cocaína.

Tipo de sustancia	Conc. de cocaína	Vía de administración	% en plasma	Velocidad aparición efectos	Conc. máxima en plasma	Duración de efectos (min)	Desarrollo de dependencia
Hojas de coca	0.5-15%	Mascado Infusión oral	20-30%	Lenta	60 min	30-60	No
Clorhidrato de cocaína	12-75%	Tópica: ocular, genital, intranasal.	20-30%	Rápida	5-10 min	30-60	Sí
		Parenteral: endovenosa, subcutánea, intramuscular.	100%		30-45 s	10-20	
Pasta de coca (sulfato de cocaína)	40-85%	Fumada	70-80%	Muy rápida	8-10 s	5-10	Sí
Cocaína base (alcaloide cocaína)	30-80%	Inhalada o fumada.	70-80%	Muy rápida	8-10 s	5-10	Sí

*Hojas de coca.* La absorción es muy variable dependiendo del contenido de las hojas, de la preparación usada y de la presencia o ausencia de sustancias alcalinas en la boca del masticador así como de la habilidad de éste. Las hojas de los arbustos originarios de Java son por lo general las más ricas en alcaloides totales y predomina en ellos la cinamil-cocaína. (Lizasoain I. y cols., [2001]).

*Pasta de coca.* También denominada sulfato de cocaína, pasta base o pasta; es el producto bruto o no refinado que resulta del primer proceso de extracción de la cocaína a partir de las hojas de coca. Se obtiene de la maceración de las hojas con ácido sulfúrico u otros productos químicos. Contiene de un 40 a 85% de sulfato de cocaína. Sirve de base para la elaboración posterior del clorhidrato de cocaína. (Lizasoain I. y cols., [2001]).

*Clorhidrato de cocaína.* Es la sal de la cocaína formada con HCl. Se presenta en forma de cristales escamosos blancos, se administra por vía nasal o intravenosa. No se puede fumar debido a que se destruye por el calor. (Lizasoain I. y cols., [2001]).

Dado que existe una intensa vascularización en la mucosa de la nasofaringe, la absorción es rápida así como sus efectos (locuacidad, sensación de energía) que duran entre 20 y 40 minutos. (Lizasoain I. y cols., [2001]).



Los efectos farmacológicos y psíquicos por cocaína endovenosa son inmediatos y potentes pero de breve duración, con aparición posterior de un intenso “crash”, estadio caracterizado por disforia, irritabilidad y alteraciones gastrointestinales. (Lizasoain I. y cols., [2001])

Cocaína base. Se obtiene mezclando el clorhidrato de cocaína con una disolución básica de amoníaco, hidróxido de sodio o bicarbonato sódico, luego se filtra el precipitado o se disuelve con éter y se deja que éste se evapore. (Lizasoain I. y cols., [2001]).

Existen dos formas de consumo: la primera consiste en inhalar los vapores de base libre (“free base”), extraída del clorhidrato con disolventes volátiles (éter) a muy alta temperatura (800 °C) utilizando mecheros de propano. El “Crack” o “rock” es la segunda forma de consumo. Es una forma de cocaína base que se obtiene añadiendo amoníaco a una disolución acuosa de clorhidrato de cocaína en presencia de bicarbonato sódico para alcalinizarla; se calienta a 98 °C; la base libre precipita en forma de pasta, que una vez seca tiene aspecto de porcelana, que se tritura en escamas. Se presenta como gránulos de 125 a 300 mg (1 ó 2 dosis). Generalmente se fuma ya que es más volátil, vaporizándose a bajas temperaturas en contraste con el clorhidrato de cocaína que se descompone antes de volatilizarse cuando se calienta. El popular nombre de crack procede del ruido de crepitación que producen los cristales cuando se calientan. (Foster M., [2008]. (Lizasoain I. y cols., [2001])

#### 2.4. EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (EFS).

En la EFS, la muestra se hace pasar a través de un cartucho empacado de un relleno sólido con grupos funcionales hidrofóbicos que funcionan como fase extractora, quedando los analitos de interés retenidos en dicha fase (Steven, et al., [1998]). La técnica de EFS implica cuatro pasos consecutivos, los cuales dependen del analito de interés:

1. Acondicionamiento del cartucho.
2. Adición de la muestra.
3. Lavado del cartucho (eliminación de interferentes).
4. Elución del analito.

Para la tipificación de cualquier sustancia tóxica contenida en una muestra, los laboratorios de Toxicología Forense siguen un proceso sistemático que implica una progresión de métodos que van desde los procedimientos inespecíficos hasta los más específicos, realizando para ello dos categorías diferentes de pruebas, denominadas técnicas de screening o presuntivas y técnicas confirmatorias. (Steven, et al., [1998] VIII)

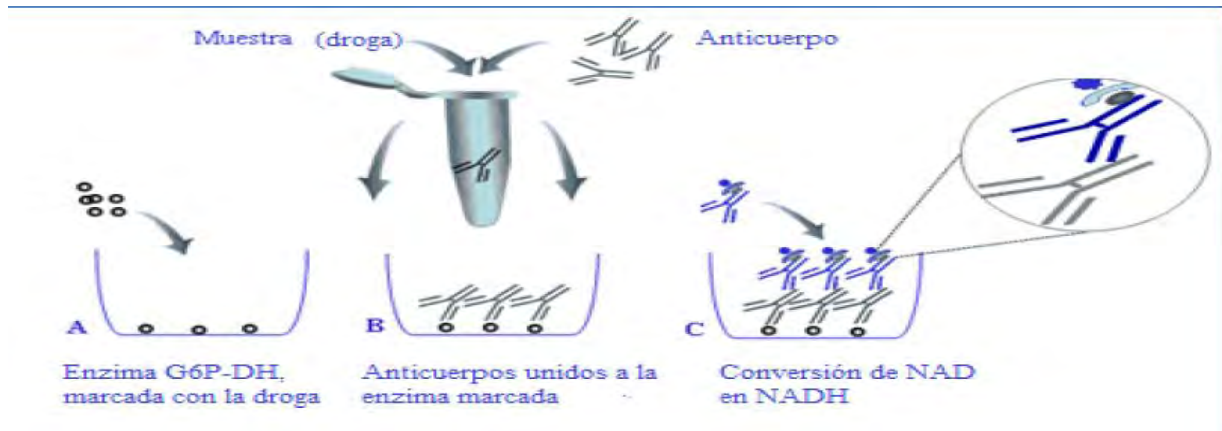
## 2.5. TÉCNICAS ANALÍTICAS PRESUNTIVAS.

Son técnicas empleadas para hacer una determinación preliminar y establecer la posibilidad de que un analito o grupo de analitos está presente en una muestra. Cabe señalar que las pruebas de screening no son suficiente para afirmar que una muestra es positiva o negativa a cualquier analito, ya que este tipo de análisis pueden resultar en falsos positivos o negativos y conducir a conclusiones erróneas debido a la baja especificidad de las técnicas empleadas, (Steven, et al., [1998]).

En la actualidad, los inmunoensayos se han convertido en una opción viable para ser aplicados cómo técnicas presuntivas debido a su rapidez y sensibilidad. Aunque estas técnicas suelen estar diseñadas para el análisis en muestras de orina, existen trabajos en los que se demuestra la posibilidad de aplicarlos a muestras de sangre realizando, por ejemplo, un extracto metanólico de sangre total o suero, en proporciones 2:1 antes de someter la muestra al análisis inmunoenzimático, (Olano, et al., [2013]).

El principio de la inmunoenzimática múltiple se muestra en la Figura 4, se basa en la hidrólisis de glucosa-6-fosfato (G6P) en presencia de la enzima bacteriana glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH), a la cual está unido el analito. La actividad enzimática convierte la coenzima nicotinamida adenina dinucleótido (NAD) en su forma reducida NADH, originando un cambio de absorbancia que se mide espectrofotométricamente a 340 nm. (Olano, et al., [2013]).

Figura 4. Principio de la Inmunoenzimática múltiple. (Flanagan, et al., [2007]).



El anticuerpo unido al conjugado enzima-analito disminuye la actividad enzimática y por lo tanto la velocidad de formación del NADH. El analito presente en la muestra compite con el analito marcado con la enzima G6PDH por la unión al anticuerpo, lo cual incrementa la fracción de enzima libre, y con ello incrementa la velocidad del cambio de absorbancia como consecuencia de la formación de NADH. (Flanagan, et al., [2007]).

Como el objetivo de estas pruebas es indicar si una sustancia tóxica está presente en una matriz biológica, por lo general con la intención de confirmar su identidad con una o más técnicas selectivas, una curva de calibración es normalmente innecesaria para estos ensayos. Sin embargo, se han establecido "límites de corte", sobre todo para drogas de abuso, por debajo del cual la droga no se considera presente en la muestra. (Flanagan, et al., [2007]).

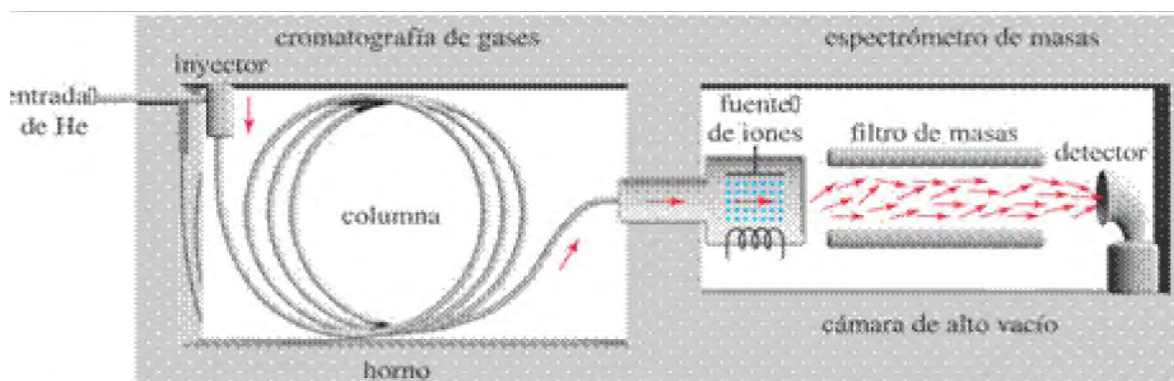
## 2.6. TÉCNICAS ANALÍTICAS CONFIRMATIVAS.

Como premisa fundamental en las áreas científicas y forenses, la detección o identificación inicial de una droga o sustancia tóxica debe ser confirmada siempre que sea posible por una segunda técnica basada en un principio físico-químico diferente, (García, et al., [2005]).

La elección del método confirmativo para una sustancia tóxica específica debe ser determinada de acuerdo al tipo de analito, la concentración del mismo en la muestra, la naturaleza de los reactivos empleados en el pre tratamiento y la instrumentación disponible. (Steven, et al., [1998]).

Por otro lado, la Cromatografía de gases/ Espectrometría de Masas, como se muestra en la Figura 5, se basa en la separación de los diferentes componentes de una muestra a través de su paso por la columna cromatográfica y en su posterior ionización. El resultado de éste proceso de fragmentación es un espectro conformado por varios fragmentos de masa representados como picos de diferente intensidad. (Steven, et al., [1998]). Los patrones de fragmentación de las sustancias controladas suelen ser únicos, y por lo tanto, se pueden utilizar para formar una conclusión en cuanto a la identidad de un analito, basando ésta en la comparación de los picos principales del espectro obtenido contra una biblioteca internacional de estándares (NIST). (Steven, et al., [1998]).

Figura 5. Esquema básico de cromatógrafo de gases/espectrómetro de masas.



## 2.7. DERIVATIZACIÓN.

Es un proceso químico orientado hacia la transformación de los analitos en otras especies más compatibles para lograr un análisis satisfactorio por la técnica de extracción en fase sólida, empleando Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometro de Masas. A menudo este procedimiento es empleado antes del análisis cromatográfico con el fin de mejorar la estabilidad térmica de los analitos, ajustar su volatilidad e incrementar su detectabilidad para proveer evidencia adicional de la identidad de dicho compuesto. Generalmente, se realizan tres tipos de reacciones: la siliación, acilación y alquilación. (Steven, et al., [1998]).

### 3. OBJETIVO.

#### 3.1. OBJETIVO GENERAL.

-Identificar y confirmar la presencia de metabolitos de cocaína (Benzoilecgonina) en muestras de sangre forense empleando Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas.

#### 3.2. OBJETIVOS PARTICULARES.

-En primera instancia, identificar la presencia de cocaína en muestras de sangre de origen forense aplicando la técnica inmunoenzimática múltiple (EMIT).

-Implementar una técnica de extracción en fase sólida, para cocaína en sangre de origen forense.

-Confirmar los resultados presuntamente positivos de Benzoilecgonina en las muestras empleando la Cromatografía de Gases acoplada a Espectrofotometro de Masas.

-Analizar los espectros de masas obtenidos como resultado del análisis.

-Establecer que el método de trabajo realizado dentro del Laboratorio de Química del INCIFO garantiza el correcto desempeño y resultados confiables.

### 4. JUSTIFICACIÓN

El consumo de sustancias psicoactivas es uno de los fenómenos crecientes en la era de la globalización internacional como, la violencia y la desintegración familiar, mismas que dañan de diversas maneras la salud física y mental de los individuos y de la sociedad que conformamos. En ese contexto, la droga de mayor consumo es la marihuana (*Cannabis sativa*), que en promedio comienza a consumirse entre los 15 y 18 años, seguida de la cocaína (*Erytroxylon coca*) y otras drogas médicas como son; opiáceos, benzodiazepinas y anfetaminas. Debido a lo anteriormente mencionado, este trabajo consiste en la ratificación de metabolitos de COCAINA en muestras de sangre forense empleando Cromatografía de gases acoplado a Espectrometría de masas para obtener así una relación de las muestras presuntamente positivas y así, llevar un control estadístico, garantizando un dictamen más completo para ejercer la ley.

## 5. HIPÓTESIS

Si se implementa una técnica de extracción en fase sólida para cocaína, y se emplea la Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas como método de identificación del metabolito benzoilecgonina en sangre de origen forense, ésta será apta en la aplicación en futuros análisis toxicológicos en apoyo a los requerimientos del laboratorio de Química Forense del INCIFO, garantizando con ello que se contará con un resultado de amplio sustento científico y legal.

## 6. METODOLOGIA.

### 6.1.1. EQUIPO.

Vortex (vortex mixer, 50100 Labnet).

Centrifuga (Syrelec Counter, 3293).

Placa de calentamiento (multiblock, LAB-LINE).

Horno (Ultra clean, 700).

Fuente de nitrógeno.

EMIT (V-TWIN, S-8166).

Cromatógrafos de Gases (Agilent Technologies, 6890N Network GL System).

Espectrometro de masas (Agilent Technologies, 5973 Network Mass Selective detector).

Columna de Separacion.

### 6.1.2. MATERIALES.

Bata y Guantes.

Tubos de plástico con rosca de 15 mL (GRM Globe).

Bulbos de 5 mL.

Jeringa para inyección de 10  $\mu$ L (Agilent).

Tubos de vidrio de 13X100 con tapa de rosca.

Cubetillas de reacción.

Gradillas.

Micropipeta de 20 a 200  $\mu$ L.

Puntillas para micropipeta.

Pizeta.

Cartuchos Baker.

Pipeta graduada 1, 2, 10 mL.

Vaso de precipitado. 10, 50 mL.

Matraz Volumétrico de 10, 100 mL.

Probeta Graduada 10, 50 ml.

Perilla.

Marcador de tinta indeleble.

### 6.1.3. REACTIVOS.

Sangre humana.

Metanol.

Buffer de Fosfatos pH 6.

Ácido Acético 1M.

Agua destilada.

Calibradores 0,1,2,3,5 (Assay).

Isopropanol.

Hidróxido de Amonio.

Diclorometano.

Derivatizante BTSFA-TSM.

## 6.2. CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS.

Para establecer las condiciones cromatográficas, que se programan dentro de un método mediante el software que controla el equipo. La configuración de los parámetros cromatográficos son de suma importancia, debido a que son los responsables de una correcta separación y detección de los compuestos presentes en sangre, (Willard, [1972]), los parámetros del método específicos son los siguientes:

Se utiliza una columna Hp5 al 5% de 30 µm X 0.25 µm X 0.25 µm

Puerto de inyección a 250 °C

Rampa de Temperatura partiendo de 100°C por 2min

Subir Temperatura 20°C/min hasta llegar a los 300°C

## 6.3. MUESTREO.

En el transcurso de la toma de muestra es necesario el uso de guantes de látex, el material para la recolección debe estar seco y debe ser desechable (botes de plástico, jeringas y pipetas).

Se debe seguir con una metodología para cumplir con los lineamientos de la institución, cadena de custodia y veracidad de las muestras.

Debe rotularse cada recipiente antes de colocar alguna muestra con el número de expediente.

Se registran los datos de cada muestra, en la hoja de cadena de custodia que se muestra a continuación, este formato se emplea en el laboratorio de química del instituto de ciencias forenses (INCIFO) para llevar un control de las muestras que se analizan.

TABLA 4. Hoja de cadena de custodia.

NOMBRE	EDAD	SEXO	FECHA	TIPO DE MUESTRA	NUMERO DE EXPEDIENTE	ANALISIS REQUERIDOS
Desconocido	50	M	11/10/2015	Sangre	0817377	QT y OH



Se realiza el seguimiento de las muestras, ya que cada tubo o frasco debe ir acompañado del formato hoja de cadena de custodia.

Tabla 5. Formato cadena de custodia del INCIFO.

<b>NOMBRE:</b> _____		
<b>No AVERIGUACION PREVIA:</b> _____	<b>EXPEDIENTE:</b> _____	
<b>TIPO DE MUESTRA:</b> ( S ) ( O ) ( H )	<b>ANALISIS REQUERIDO:</b> ( QT ) ( OH )	
<b>SEXO:</b> ( M ) ( F )	<b>FECHA:</b> _____	<b>EDAD:</b> _____
<b>MEDICO FORENSE:</b> _____		

### 6.3.1 TOMA DE MUESTRA.

1.-Tomar con una pipeta de plástico aproximadamente 20mL de sangre de la cavidad del cerebro, para llenar 2 tubos de plástico de 10mL. Previamente rotulados y evitar contaminar la muestra.

2.-Desechar el material usado.

3.-Depositar los tubos en un bote con su respectiva tarjeta.

### 6.3.2. RECEPCION DE MUESTRAS.

Las muestras son recibidas en el Laboratorio de Química del INCIFO, verificando la cantidad de tubos, el no. de expediente, estudios requeridos y tipo de muestra, firmando en original y copia a quien este a cargo. El original se archiva en la carpeta del Laboratorio de Química y la copia se regresa al anfiteatro para el archivo del médico perito.

Los tubos que contienen las muestras son retirados de los botes de plástico con sus respectivas tarjetas y ordenarlas de acuerdo al número de expediente en gradilla, se meten a refrigeración las muestras a -2 °C.

Se registran para controlar por dos ocasiones una para alcoholes (OH) y una para Química Toxicológica (QT), en la cual se tiene que descargar la información de las tarjetas de cada muestra recibida en ambas bitacoras si es solicitado ambos estudios con la finalidad de llevar un control.

#### 6.4. PRUEBA PRESUNTIVA (EMIT).

Sacar de refrigeración las muestras a trabajar y seguir la siguiente metodología.

- Usar equipo de protección personal (bata blanca y guantes).
- Etiquetar los tubos con el folio las muestras.
- Agregar a los tubos 2 mL de Metanol.
- Tomar con un bulbo 1 mL de sangre de cada una de las muestras y agregar a los tubos. (Utilizar un bulbo para cada muestra y desechar en el cesto de residuos biológicos).
- Agitar en el vortex para desnaturalizar las proteínas.
- Meter a la centrifuga a 4500 rpm/5min para precipitar y obtener el suero.
- Programar el equipo EMIT (introducir los folios de las muestras a realizar y seleccionar las drogas a detectar, verificar que las enzimas de las drogas y los calibradores estén bien administrados).
- Decantar el suero en las cubetillas de reacción y colocarlas en la ubicación que el equipo indique.
- Realizar el análisis con el equipo y esperar el resultado presuntivo.
- Concentraciones de droga empleados para el análisis

- . Registrar el resultado si este resulta positivo (por encima de la concentración de las enzimas) se determina la absorbancia.

[Enzima]----- Valor de corte

X ----- Valor medido

El resultado obtenido se confirma posteriormente en el GC/MS.

- . Desechar las cubetillas en el depósito de residuos biológicos así como cerrar los depósitos de las enzimas.

#### 6.5. PRUEBA CONFIRMATORIA.

Retirar de refrigeración las muestras que presuntamente hayan dado positivo y realizar la siguiente metodología.

##### 6.5.1 DESPROTEINIZAR.

- Tomar 2 mL de sangre y 4 mL Metanol colocarla dentro de un tubo de plástico de 15 mL.
- Agitar en Vortex 5 min y Centrifugar a 10000rpm/10 min.
- Separar sobrenadante.

##### 6.5.2 ACTIVAR LA COLUMNA.

- Colocar el cartucho en la columna.
- Agregar 2 mL de Metanol.
- Adicionar 2 mL de Buffer de Fosfatos pH 6.
- Añadir sobrenadante tratado.

##### 6.5.3. LAVADO.

- Agregar 6 mL de Agua Destilada.
- Adicionar 3 mL de Ácido Acético 1M.
- Dejar secar 5 minutos sin presión.
- Añadir 6 mL de Metanol.

Tirar desechos y cambiar tubo limpio de vidrio

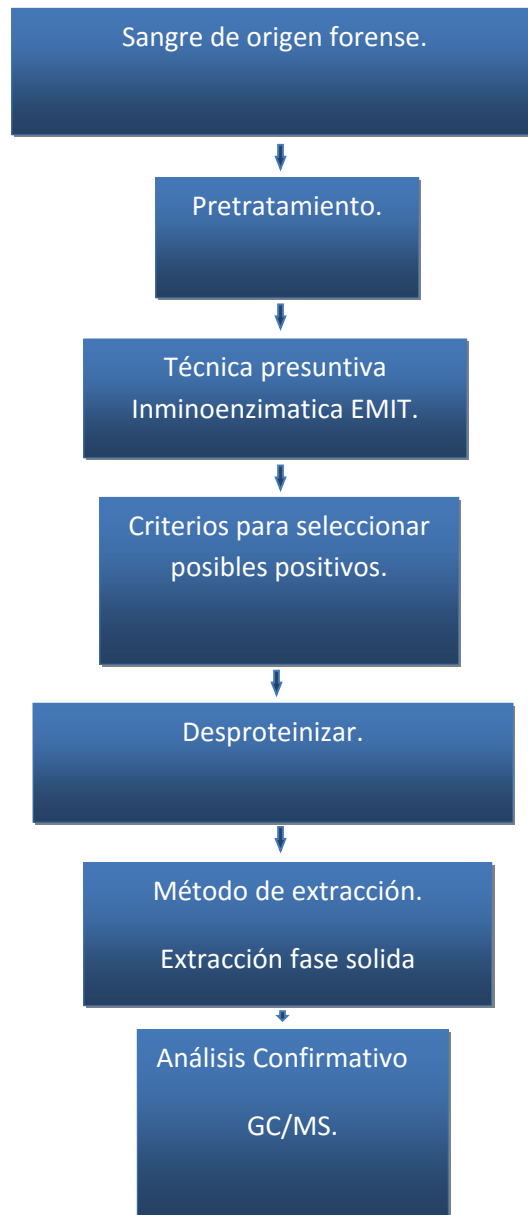
- Agregar 2 mL de Eluyente D.I.A.
- Concentrar a 60 °C con fuente de Nitrógeno.
- Depositar 40 µL del derivatizante BTSFA-TSM 100/1.
- Llevar a estufa a 60°C/30min, dejar enfriar 10min.
- Medir 3 µL e inyectar al Cromatógrafo de gases.
- Obtener el cromatograma para analizar y comparar con las masas obtenidas para identificar a los metabolitos.

#### 6.6. DESARROLLO DE LA ESTADIA.

Se utilizaron dos técnicas analíticas, la primera fue una prueba presuntiva por medio de la Técnica de Inmunoensayo Enzimático Multiplicado (EMIT) para identificar cocaína en muestras de origen forense y la segunda prueba es confirmatoria; mediante la técnica de cromatografía de gases acoplado a un espectrómetro de masas con el fin de encontrar fragmentos característicos presentes en la estructura química de la droga debido a que esta técnica indica el peso molecular (ión molecular) y fragmentación típica de la molécula encontrada en la muestra. Para ello se recolectaron 10 muestras positivas para cocaína de diferente procedencia, en un periodo de 3 meses.

### 6.6.1. DIAGRAMA EXPERIMENTAL.

\*Técnicas de extracción ensayadas en las muestras indicadas.



## 6.7. ANÁLISIS PRESUNTIVO DE LA COCAÍNA.

### 6.7.1 TÉCNICA INMUNOENZIMÁTICA MÚLTIPLE (EMIT).

El examen preliminar se realizó en un analizador V-Twin® marca Siemens®, equipado con una lámpara de yodo-cuarzo que emplea una longitud de onda entre 340 y 770 nm. La calibración del equipo se llevó a cabo una vez por semana; para este propósito se emplearon dos calibradores/controles (nivel 2 y 3) para los cinco grupos de drogas de abuso más comúnmente detectadas en el laboratorio toxicológico (anfetaminas, barbitúricos, benzodiazepinas, cannabinoides, metabolitos de cocaína y opiáceos); además se usó un control negativo (nivel 0) y otro positivo (nivel 5) para todas las drogas antes mencionadas. Las concentraciones de cada grupo de drogas empleadas en el análisis, se refieren en la tabla 6.

Tabla 6. Concentraciones de droga para el análisis preliminar (Federal Register, [2004]).

<b>DROGA</b>	<b>CONCENTRACIÓN [ng/mL]</b>
Anfetaminas	500
Barbitúricos	200
Benzodiazepina	200
Cannabinoides	50
Metabolitos de cocaína	150
Opiáceos	2000

La absorbancia obtenida para cada droga fue considerada como el “límite de corte”.

Técnica Inmunoenzimática Múltiple (EMIT). Se tomó una alícuota de 1 mL del sobrenadante obtenido en el pretratamiento, y se depositó en una cubetilla; ésta a su vez se colocó en el equipo, quien realizó el análisis de forma automatizada.

## 6.8. ANALISIS CONFIRMATORIO DE LA COCAÍNA.

### 6.8.1. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN.

El transcurso experimental para definir una técnica específica para la extracción de Benzoilecgonina se llevó a cabo en dos fases:

Fase I. Diseño y aplicación de diferentes técnicas de extracción a una muestra control, recurriendo al método de “ensayo y error”

Fase II. Elección y aplicación de técnica(s) específica(s) para la extracción de Benzoilecgonina a una población de muestras en general.

A continuación se detallan las técnicas ensayadas.

6.8.1.1. Desproteínización. En un tubo para centrifuga se colocaron 2 mL de metanol y 1 mL de sangre. La mezcla se homogeneizó en un vortex durante 5 minutos, y posteriormente se centrifugó por 15 minutos a 3500 rpm. Se recolecta el sobrenadante en otro tubo para su posterior análisis.

6.8.1.2. Desproteínización (Modificada). En un tubo para centrifuga se colocaron 4 mL de metanol y 2 mL de sangre. La mezcla se homogeneizó en un vortex durante 5 minutos, y posteriormente se centrifugó por 10 minutos a 10000 rpm. Se recolecta el sobrenadante en otro tubo para su posterior análisis.

### 6.8.2. EXTRACCIÓN FASE SÓLIDA.

En la columna se reciben los reactivos en un tubo de plástico de 15 mL y a una presión 3 PSI.

Activar columna. Se empleó un cartucho de extracción en fase sólida (EFS) Baker con fase estacionaria C18.

La fase estacionaria del cartucho de extracción fue activada con 2 mL de metanol y 2 mL de disolución buffer de fosfatos pH 6, y posteriormente se hizo pasar a través de éste la muestra (sobrenadante obtenido en el paso de desproteínización). Con una presión de 3 PSI, depositando el flujo de los reactivos constante.

A continuación, se eluyeron las impurezas adicionando al cartucho 6 mL de Agua Destilada, 3mL Ácido Acético 1M. y 6 mL Metanol. A una presión constante de 3 PSI.

Dejar durante 5 minutos y cambiar el tubo de plástico donde se reciben los residuos a un tubo de vidrio de 13X100.

Posteriormente se eluye con 1 mL de D.I.A. (80-20-2), concentrar a 40 °C casi a sequedad.

Derivatización. Se agregó al vial 40 µL de BSTFA-TMCS (99:1), se agito durante 5 segundos, y por último se incubó a 60 °C por 20 minutos.

#### 6.8.2.1. EXTRACCIÓN FASE SOLIDA (Modificada 1.1).

Activar Columna: La fase estacionaria se activo de la misma manera que la primera técnica.

Lavado: no se modifiko.

El reposo se modifiko a 2 minutos.

Se eluyo con 1 mL D.I.A., se concentro a 40°C con fuente de Nitrogeno a casi sequedad.

La derivatización fue la misma.

#### 6.8.2.2. EXTRACCIÓN FASE SOLIDA (Modificada 1.2).

La activación de la columna fue la misma.

Lavado, se modifiko eluyendo con 0.5 mL Buffer de fosfatos pH 6, 1 mL de mezcla Buffer-Metanol (80-20) y 1 mL de Ácido Acético 1M.

Se dejo reposar 2 minutos y se eluyo con 1 mL de D.I.A. (80-20-2), despues concentrar a 40 °C a casi sequedad.

La derivatizacion se modifiko agregando 5 µL de BSTFA-TMCS (99:1), se agitó durante 5 segundos, y por último se incubó a 60 °C por 20 minutos.



### 6.8.2.3. EXTRACCIÓN FASE SOLIDA (Modificada 1.3).

La activación y el lavado fueron los mismos que la técnica anterior.

Se dejó reposar 2 minutos y se eluyó con 1 mL de D.I.A. (80-20-2). Concentrar a 40 °C con fuente de Nitrógeno a casi sequedad.

La derivatización se modificó agregando 5 µL de BSTFA-TMCS (99:1), se agitó durante 5 segundos, y por último se incubó a 60 °C por 30 minutos.

### 6.9. ANÁLISIS CONFIRMATIVO MEDIANTE (GC/MS).

Las pruebas confirmativas se llevaron a cabo en un cromatógrafo de gases marca Agilent®, modelo 6890N acoplado a un detector de espectrometría de masas marca Agilent®, modelo 5973, y una columna capilar de la misma marca (30 m X 250 µm X 0.25 µm) con recubrimiento de fenilmetilsilohexano 5%.

Gas portador: Helio

Velocidad de flujo: 35 mL/min

Presión: 11.5 psi

Temperatura del inyector (modo splitless): 280 °C

Programa de temperatura:

Temperatura inicial de 80 °C, manteniéndose esta temperatura durante 1 minuto; después se incrementó a una velocidad de 10 °C/min hasta llegar a 280 °C, esta temperatura se mantuvo durante 6 minutos.

Tiempo total: 27 minutos.

## 7. RESULTADOS

Se analizaron 10 muestras de marzo a junio de 2016. En este año 2016 se presentaron muertes relacionadas con drogas desde adolescentes (18 años) hasta adultos mayores (70 años), las muestras tomadas fueron las que presuntamente dieron positivas en el EMIT.

Tabla 7. Resultados de las 10 muestras tomadas de Marzo a Junio del 2016.

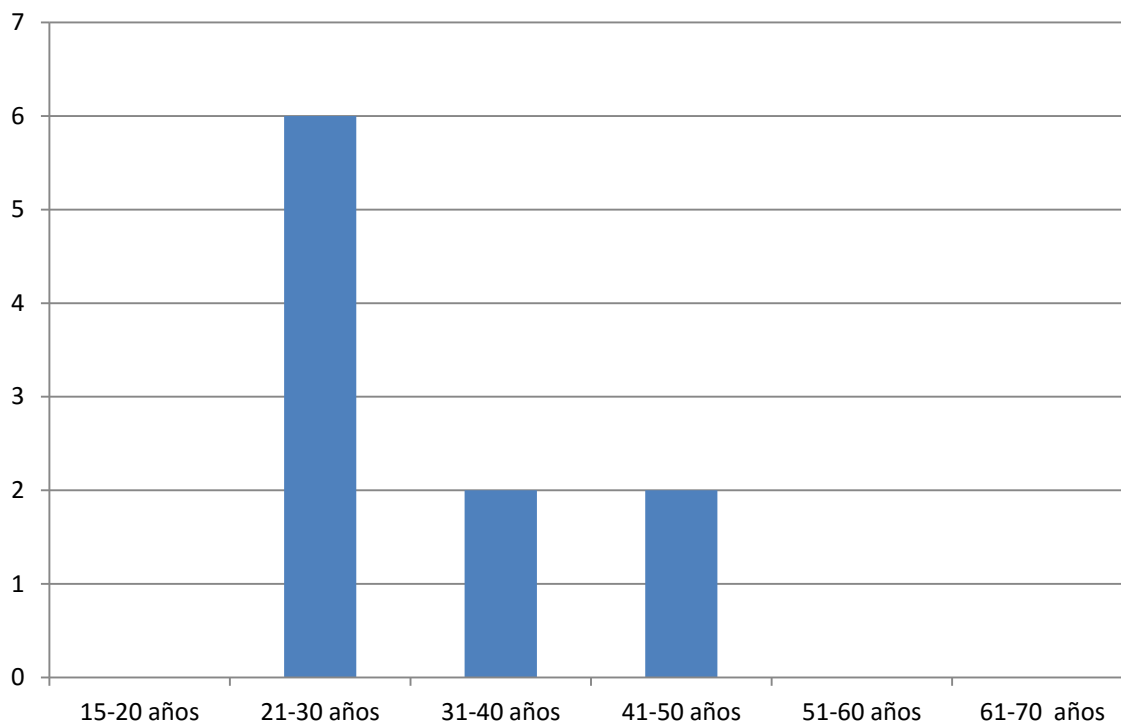
Análisis de muestras						
	FOLIO	DROGA	EDAD	GENERO	EMIT®II ng/mL	CG/EM (Cocaína)
1	2947	Cocaína	34	Masculino	0.414	+
2	2967	Cocaína	35-40	Masculino	0.354	+
3	3356	Cocaína	27	Masculino	0.494	+
4	3510	Cocaína	49	Masculino	0.371	+
5	3823	Cocaína	29	Masculino	0.336	+
6	3797	Cocaína	30	Masculino	0.386	+
7	3823	Cocaína	29	Masculino	0.331	+
8	3882	Cocaína	45-50	Masculino	0.341	+
9	3888	Cocaína	29	Masculino	0.374	+
10	4242	Cocaína	27	Masculino	0.330	+

EMIT®II (ng/mL): cocaína 150: 0.315. (Valor de corteo limite en EMIT para aceptar o rechazar positivos o negativos).

## 8. ANALISIS DE RESULTADOS

Al comparar la confirmación de Cocaína en muestras *postmortem* de Marzo a Junio de 2016, según grupo de edad, se observa que hubo un 100% casos en los masculinos, el grupo de mayor frecuencia en consumo se encontró entre 21-30 años, como lo muestra en la grafica 1.

Figura 6. Grafica de abuso de cocaína por edad.



Después de haber realizado las estadísticas y confirmar los resultados mediante la Cromatografía de Gases acoplada a la Espectroscopía de Masas, se obtuvieron los siguientes resultados con un tiempo de retención de entre 11 y 13 minutos.

En relación a los datos espectroscópicos los fragmentos (m/z) presentes y sus respectivas abundancias relativas son: 361(5), 346(2), 317(1), 303(1), no observándose el ion molecular (289), 272(1), 240(15), no observándose los fragmentos 289, 168, 124 y 105(100) correspondiente al pico base, 77(45).

Figura 7. Espectro de masas de metabolito de cocaína (*benzoilecgonina*) y sus principales iones 168, 124, 105, 77,  $m/z$ .

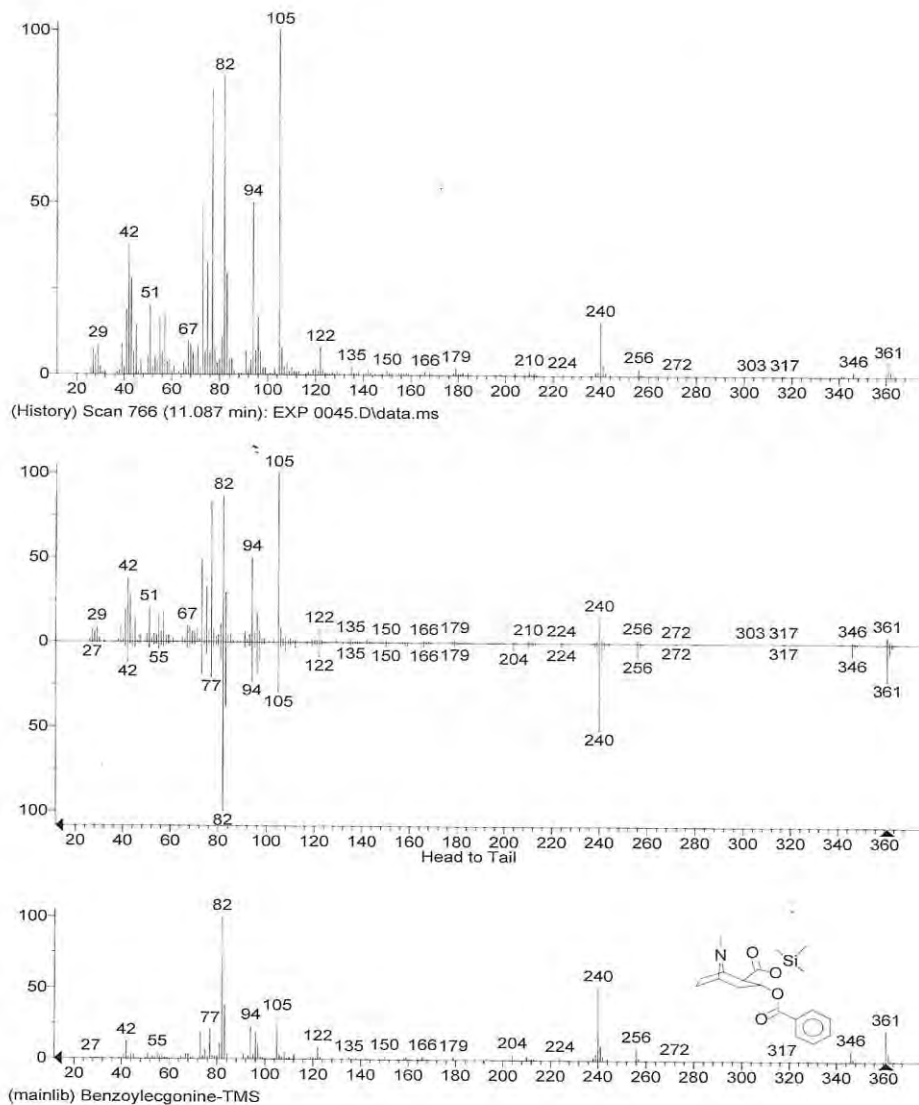
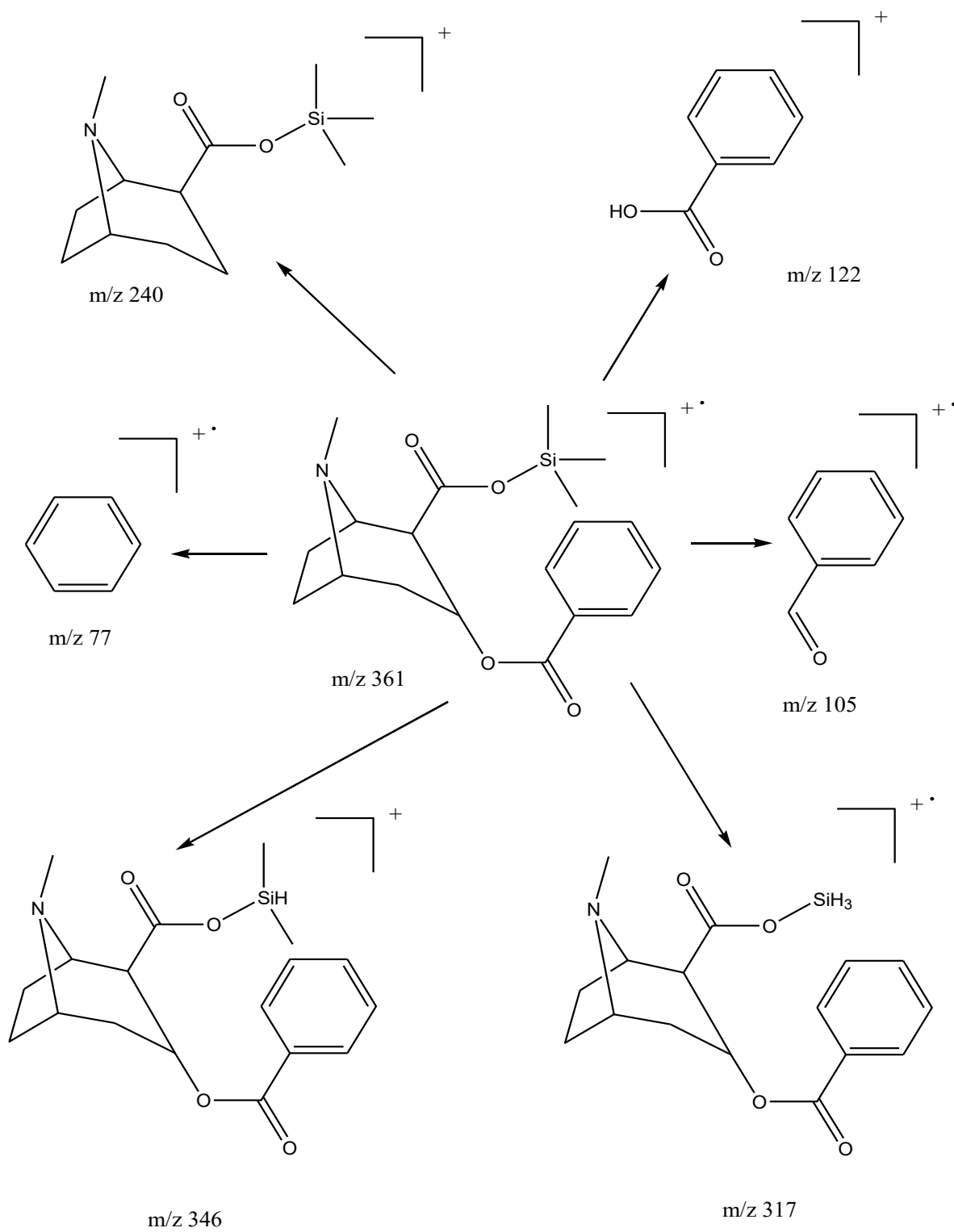


Figura 8. PATRON DE FRAGMENTACIÒN SUGERIDO PARA BEG-DERIVATIZADA.



## 9. DISCUSIÓN

Antes de continuar, es fundamental aclarar que, dado que el modelo experimental diseñado en este proyecto se enfoca solamente a la identificación y confirmación del metabolito de la cocaína (benzoilecgonina) presentes en muestras de sangre, el proceso de validación, tanto del método como del sistema, podría ser considerado en un futuro como una nueva línea de investigación que dará continuidad al presente estudio.

La anterior confirmación pudo lograrse una vez que con un tiempo de retención de 11-13 minutos se obtuvo un pico cromatográfico que al adquirir el correspondiente espectro de masas, se obtuvo un fragmento de  $m/z$  361, el cual se atribuye a la benzoilecgonina trimetil sililada. A partir de este fragmento obtenido, se propone el patrón de fragmentación de la figura 7, y que puede explicar los fragmentos obtenidos de las muestras analizadas. Lo anterior sugiere que en las muestras introducidas al Gases-masas para su análisis, contenían un metabolito de cocaína.

Por otro lado, de un total de 10 muestras de origen forense recibidas en el Laboratorio de Química del INCIFO durante el periodo comprendido por el estudio, corresponde a casos de defunciones donde el consumo de cocaína estuvo, directa o indirectamente relacionado con la muerte del individuo.

Al analizar este universo según el sexo, los hombres presentan la prevalencia de muerte más alta bajo los efectos de esta droga, representada por el 100% de los 10 casos analizados; en cuanto a la edad de los individuos cuyas defunciones estuvieron asociadas al consumo de cocaína, el rango se encontró entre los 21 a 30 años.

Como se señala en los resultados obtenidos en la Fase I de experimentación, sólo con las técnicas de extracción III y V fue posible aislar el metabolito de las muestras de sangre analizadas. El éxito obtenido con esta técnica se atribuye a la desproteínización inicial que sufrieron las muestras, para la técnica es un factor muy importante para detectar los analitos de interés toxicológico por la técnica de GC/MS. La necesidad de derivatizar los extractos conseguidos mediante procesos de extracción en fase sólida, radica en incrementar la estabilidad dándole así una mayor detectabilidad del metabolito en estudio y potencializar la señal de los productos. Cabe destacar que además de cocaína, la técnica puede ser empleada para extraer otras biomoléculas y compuestos químicos presentes en el fluido biológico examinado.

La detección en las diferentes muestras de sangre analizadas provee un indicio de que la persona a la cual corresponde dicho análisis consumió cocaína en un periodo de tiempo cercano a su defunción, sin embargo, aún sigue siendo difícil determinar cuánto tiempo hizo de ello.

No obstante, conociendo que el tiempo de vida media es de 24 hrs, se puede presumir que si se puede detectar este metabolito en sangre, la muestra fue tomada muy próxima al momento de la muerte del individuo, y por lo tanto, puede considerarse que éste se encontraba en un estado de intoxicación causado por el consumo de cocaína. Teniendo en cuenta esta correlación, será posible dictaminar las responsabilidades del individuo en cuestión en el acto delictivo con el que su muerte se encuentre relacionada.

## 10. CONCLUSIÓN

En base a los resultados obtenidos durante el tiempo estimado para este proyecto y su previo análisis de los mismos da pauta para asegurar que los objetivos y metas pretendidos fueron alcanzadas al 100%, ya que se logró identificar de manera experimental si las muestras remitidas al laboratorio y analizadas, efectivamente contenían a la sustancia llamada “benzoilecgonina”.

Mediante la técnica inmunoenzimática múltiple (EMIT) se logró detectar la presencia de cocaína en muestras de sangre de origen forense, las cuales, posteriormente fueron sometidas a tratamientos de extracción, en fase sólida.

Estos procedimientos de preparación de la muestra representan un paso trascendental en el proceso analítico, ya que aseguran que las muestras sean adecuadas para la determinación cromatográfica. Finalmente, la presencia de benzoilecgonina en las muestras analizadas fue confirmada por el método de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas

En este caso podemos decir que de las 10 muestras positivas en EMIT, Todas fueron confirmadas por CG/EM. Por medio del cromatograma en un tiempo de retención de 11 a 13 minutos, con ayuda del espectro de masas quien proporcionó fragmentos característicos.

Por lo que se puede resumir que la técnica implementada es adecuada en la aplicación de futuros análisis toxicológicos en apoyo a los requerimientos del Laboratorio de Química Forense del INCIFO, garantizando con ello que se contará con un resultado con sustento científico y legal.

## 11. ACRONIMOS.

CG	Cromatografía de gases.
EM	Espectrometría de masas.
NIDA	National Institute on Drug Abuse.
SHT	Sociedad de la prueba del pelo.
mg	miligramos.
Kg	kilogramo.
L	litro.
ml	mililitro.
mm	milímetro.
%	Porcentaje.
BEG	Benzoilecgonina.
EME	Ecgonina metil éster.
EC	Ecgonina.
BSTFA	N,O-Bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida
TMCS	Trimetilclorosilano.
m/z	Relación masa-carga.
TR	Tiempo de retención.
EMIT	Tecnica de Inmunoensayo Enzimatico Multiple.
NSDUH	Encuesta Nacional sobre el Uso de Drogas y Salud.
INCIFO	Instituto de Ciencias Forenses.
G6P:	glucosa-6-fosfato.



G6PDH	glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.
NAD	coenzima nicotinamida adenina dinucleótido
QT	Química Toxicológica.
SNC	Sistema Nervioso Central.
5-HT	Serotonina.
NE	Noradrenalina.
μL	Microlitros.

## 12. REFERENCIAS.

Washton A. M. La adicción a la cocaína: tratamiento, prevención y adicción. Ediciones Paidós Ibérica, S.A. Primera edición. Nueva York, 1995.

Urquiza M.M. La cocaína y sus consecuencias. Revista Liberaddictus. Artículo 798, 2009.

Moffat A. C., Osselton M. D., Widdop B., Galichet L. Y. Clarke's Analysis of Drugs and Poisons, Pharmaceutical Press. Electronic version 2004. Londres, 2010.

The Journal of the American Medical Association, 1998.

Nora D., Dardo T., Gene-Jack W., Joanna S., Frank T., Rita Z., Nelly A., Christopher W. H. Reduced Metabolism in Brain "Control Networks" following Cocaine-Cues Exposure in Female Cocaine Abusers. December 23, 2010.

Redolar, D. Cerebro y adicción. Editorial UOC. 1ª edición, Barcelona, 2008.

Fernández, P. Drogodependencias. Editorial médica panamericana. 3ª edición. 2008.

Lizasoain I.; Moro M.A.; Lorenzo P. Cocaína: aspectos farmacológicos. Departamento de Farmacología. Facultad de Medicina. Universidad Complutense de Madrid, 2001.

Foster O. M. Drugs, the straight facts: Crack. Nueva York. Editor David J. Triggle, 2008.

Barnett G, Hawks R, Resnick R. Cocaine pharmacokinetics in humans. J Ethnopharmacol. 2002.

Cami J, Farre M, Gonzalez ML, Segura J, de la Torre R. Cocaine metabolism in human after use of alcohol. Clinical and research implications. Recent Dev Alcohol. 1998.

Edward. J. Cone, Ph.D., Michael. J. Welch, Ph.D., and M. Beth GrigsonBabecki, M.A. Hair Testing for Drugs of Abuse: International Research on Standards and Technology, 1995.

Ross. Pawlina. Histología. Editorial médica panamericana. Quinta edición. Madrid, España, 2007.

Cocaine, surface contamination and the medico-legal implications of its transfer. Frederick P , Kevin R. Forensic Science Department, University of New Haven, 31 May 2011.

García S, Giménez M.P. Recursos humanos e instrumentales en un laboratorio toxicológico forense. Revista de Toxicología 2005.

Steven, B.; Karch, M. D. Drug Abuse Handook. CRC Press. San Francisco, California. USA. 1998.

Olano D, Rodríguez S, Prieto A. Análisis de drogas de abuso en muestras biológicas. En Ampliación de Postgrado en Toxicología-13. M. Repetto (ed.).

Kintz, P. Drug testing in hair. New York, 1996. Edited by CRC Press.